

Les loups du Bhoutan appartiennent à l'ancienne lignée des loups de l'Himalaya (*Canis lupus chanco*)

Ecology and Evolution

WILEY

RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

Wolves in Bhutan Are Part of the Ancient Himalayan Wolf (*Canis lupus chanco*) Lineage

Tashi Dhendup^{1,2}  | Antonio Sampedro^{3,4} | Joshua J. Robinson⁵ | Jan E. Janečka⁵ | Geraldine Werhahn^{3,6,7}

¹School of the Environment, The University of Queensland, Queensland, Australia | ²Department of Forests and Park Services, Ministry of Energy and Natural Resources, Royal Government of Bhutan, Thimphu, Bhutan | ³Himalayan Wolves Project, Himalayan Carnivore Foundation, St. Gallen, Switzerland | ⁴Biodiversity Research Institute (CSIC—University of Oviedo—Principality of Asturias), Mieres, Spain | ⁵Department of Biological Sciences, Duquesne University, Pittsburgh, Pennsylvania, USA | ⁶Wildlife Conservation Research Unit (WildCRU), Department of Biology, University of Oxford, Oxford, UK | ⁷IUCN SSC Canid Specialist Group, Oxford, UK

Correspondence: Tashi Dhendup (t.dhendup@uq.edu.au)

Received: 6 May 2026 | Revised: 23 July 2026 | Accepted: 7 August 2026

Keywords: Asia | Bhutan | biodiversity | Himalayan wolf | wildlife

Résumé

On distingue **trois lignées** de loups en Asie du Sud, à savoir le loup de l'Himalaya (*Canis lupus chanco*), qui vit dans les hautes montagnes de l'Himalaya et sur le plateau Tibétain ; le loup Indien (*Canis lupus pallipes*), présent sur le sous-continent Indien ; et le loup gris holarctique, représenté par plusieurs sous-espèces de *Canis lupus*, que l'on trouve dans les régions voisines d'Asie centrale. Le loup de l'Himalaya représente une lignée de loups de haute altitude distincte sur le plan évolutif ; pourtant, les données génétiques restent rares dans l'est de l'Himalaya, y compris au Bhoutan, ce qui constitue une lacune critique dans les connaissances. Au cours du recensement national des léopards des neiges mené au Bhoutan (2022-2023), des excréments présumés de léopards des neiges ont été collectés et une partie d'entre eux a été génétiquement identifiée comme appartenant à *C. lupus*. Nous avons extrait l'ADN et amplifié la région de contrôle mitochondriale (boucle D) ainsi que les séquences du cytochrome *b* à partir de 13 échantillons (Parc national de Jigme Dorji : $n = 1$; Parc national du Centenaire de Wangchuck : $n = 12$). Les analyses phylogénétiques ont placé toutes les séquences Bhoutanaises au sein du clade monophylétique du loup de l'Himalaya, et les réseaux d'haplotypes par jonction médiane ont fourni un soutien concordant à ce classement. Tous les haplotypes détectés correspondaient à ceux précédemment signalés dans le nord-ouest du Népal, indiquant que les loups Bhoutanais appartiennent au clade connu de l'ADN mitochondrial du loup de l'Himalaya. Ces résultats fournissent la première preuve génétique de la présence de la lignée du loup de l'Himalaya au Bhoutan et permettent une première évaluation de la diversité de l'ADN mitochondrial. Un échantillonnage non invasif élargi à l'ensemble du Bhoutan, y compris dans les zones où la présence de loups a été signalée mais qui ne sont pas encore représentées sur le plan génétique (par exemple, la réserve naturelle stricte de Jigme Khesar et la division forestière de Paro), associé à l'identification individuelle et à des marqueurs nucléaires, sera nécessaire pour quantifier la diversité génétique et la connectivité des populations, et fournir de premières estimations de

la taille des populations. Un tel échantillonnage sera essentiel pour évaluer la structure des populations à petite échelle et éclairer la planification nationale de la conservation de cette lignée de loups menacée, endémique de la Haute Asie.

1. INTRODUCTION

Le loup de l'Himalaya (*Canis lupus chanco*) est un prédateur au sommet de la chaîne alimentaire de la haute chaîne Himalayenne et du plateau Tibétain. Il est classé comme « vulnérable » sur la Liste rouge de l'UICN dans l'ensemble de son aire de répartition mondiale en raison de la petite taille de sa population et de son déclin (Werhahn et al. 2024). Le loup de l'Himalaya est largement considéré comme l'une des lignées de loups les plus anciennes et les plus distinctes sur le plan évolutif en Asie.

Les données génétiques, en particulier l'ADN mitochondrial (ADNmt), complétées par des marqueurs nucléaires, indiquent que cette lignée forme **un clade monophylétique basal** par rapport au complexe loup-chien largement répandu (complexe holarctique loup gris/chien domestique), ce qui correspond à une divergence ancienne et profonde (Aggarwal et al. 2007 ; Hennelly et al. 2025 ; Sharma et al. 2004 ; Werhahn et al. 2017). Les estimations de la date de divergence varient selon les ensembles de données et les étalonnages, mais les analyses basées sur l'ADNmt situent généralement la séparation il y a plusieurs centaines de milliers d'années, certaines études suggérant une séparation plus ancienne, comprise entre 0,35 et 0,74 million d'années (Hennelly 2022 ; Sharma et al. 2004 ; Werhahn et al. 2018). Au-delà de l'ADNmt, les données issues des marqueurs des chromosomes sexuels (par exemple, les loci ZF) et des polymorphismes nucléaires à un seul nucléotide (SNP) associés à la voie de l'hypoxie soutiennent l'hypothèse d'une spécialisation fonctionnelle adaptée aux environnements de haute altitude et pauvres en oxygène (Liu et al. 2019 ; Signore et al. 2019 ; Werhahn et al. 2018 ; Zhang et al. 2014). Une différenciation phénotypique supplémentaire (notamment une divergence acoustique des hurlements et des variations crâniennes) a également été observée (Hennelly et al. 2017 ; Shrotriya et al. 2012 ; Viranta et al. 2025 ; Werhahn et al. 2020, 2018, 2022).

Le Bhoutan est situé à la lisière sud-est de l'aire de répartition du loup de l'Himalaya, qui englobe l'Himalaya et le plateau Tibétain. On soupçonne que la lignée du loup de l'Himalaya soit également présente au Bhoutan (Figure 1). À l'ouest du Bhoutan, les loups de l'État Indien du Sikkim, dont la présence n'est connue que dans un nombre limité de sites, ont été génétiquement identifiés comme des loups de l'Himalaya, tandis que dans l'Arunachal Pradesh, le long de la frontière Indo-Chinoise, ils n'ont pas fait l'objet d'une analyse génétique (Choudhury 2015 ; Joshi et al. 2020). Au nord, la connectivité est assurée par des cols de haute altitude, facilitant les déplacements de la faune sauvage, comme le confirme le flux génétique entre les léopards des neiges (*Panthera uncia*) du Bhoutan, du Tibet et du Népal (Dhendup et al. 2025). Par conséquent, les loups présents dans les paysages de haute altitude du Bhoutan pourraient être reliés, par dispersion, à d'autres populations régionales de part et d'autre de ces frontières et pourraient appartenir à la lignée du loup de l'Himalaya ; toutefois, l'identité sous-spécifique des loups du Bhoutan reste incertaine en l'absence d'échantillonnage génétique ciblé et d'évaluation phylogéographique systématique au sein même du Bhoutan.



FIGURE 1. Un loup de l'Himalaya (*Canis lupus chanco*) photographié par un piège photographique dans le centre du Bhoutan lors du recensement national des léopards des neiges mené au Bhoutan en 2022-2023 (altitude : 4 313 m). Source : DoFPS, Bhoutan

Les loups restent l'un des grands carnivores les moins étudiés du Bhoutan et ne sont connus que dans un nombre limité de zones, notamment le Parc national du Centenaire de Wangchuck (WCNP), le Parc national de Jigme Dorji (JDNP), la Réserve naturelle stricte de Jigme Khesar (JKSNR) et la Division forestière de Paro (PFD) (Dhendup et al. 2024 ; **Figure 2**). Des **témoignages anecdotiques** suggèrent que l'espèce aurait été proche de l'extinction locale par le passé ; **cependant**, des observations récentes indiquent un regain progressif de sa présence. Cela se traduit par des signalements de plus en plus fréquents de conflits entre l'homme et la faune sauvage dans les zones de haute altitude, où les loups sont confrontés à des menaces liées aux attaques sur le bétail, tout comme les léopards des neiges (BBS 2024 ; Jamtsho et Katel 2019). Malgré ces préoccupations, les études de terrain spécifiques et le suivi systématique font largement défaut. Des détections opportunistes de « prises accessoires » issues de campagnes de piégeage photographique ciblant d'autres espèces suggèrent que les loups pourraient actuellement occuper moins de 7% du territoire national (Dhendup et al. 2024). Afin d'assurer la poursuite de son rétablissement, l'espèce bénéficie d'une protection au titre de l'annexe II de la loi de 2023 sur la conservation des forêts et de la nature du Bhoutan (RGoB 2023). **Cependant**, le Bhoutan ne dispose actuellement d'aucun programme national spécifique axé sur la recherche sur les loups, l'atténuation des conflits ou la planification de la conservation.

Nous avons prélevé des échantillons de crottes lors du deuxième recensement national des léopards des neiges au Bhoutan, qui ont été identifiés génétiquement comme appartenant à l'espèce *Canis lupus* (NCD 2023). À partir de l'ADN extrait de ces échantillons fécaux, nous avons séquencé la région de contrôle mitochondriale (boucle D) et le gène du cytochrome b, et avons décrit pour la première fois les lignées mitochondriales existantes de loups au Bhoutan.

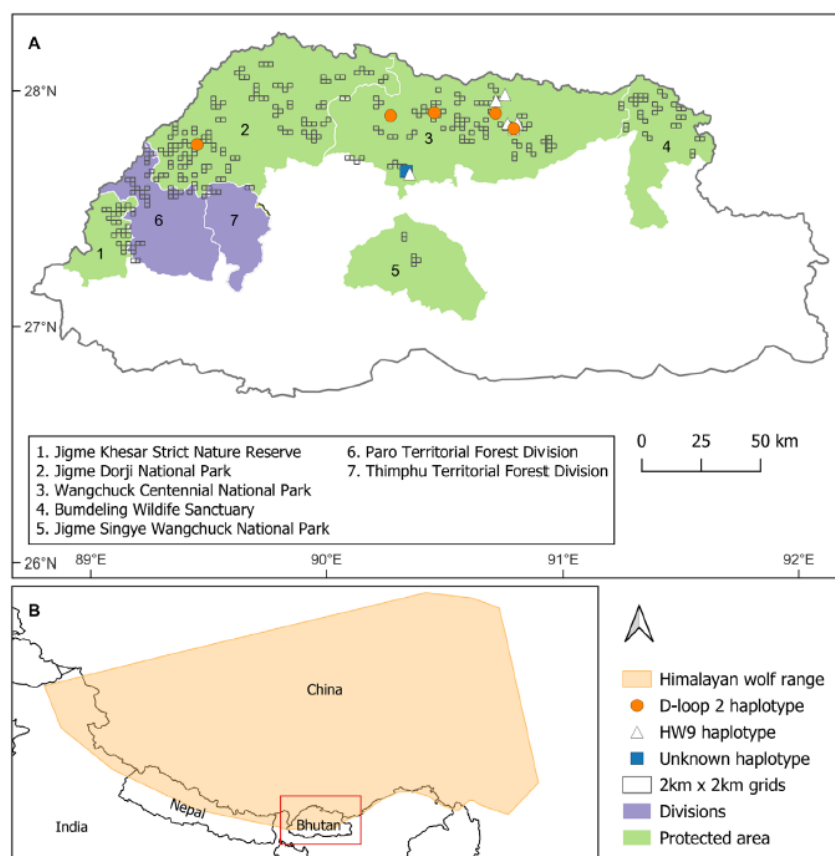


FIGURE 2. (A) Carte de la zone couverte par l'étude nationale sur le léopard des neiges au Bhoutan en 2022-2023, indiquant la grille d'échantillonnage de 2 × 2 km et les emplacements des échantillons positifs pour le loup avec des haplotypes de la boucle D observés (*D-loop2*, *HW9* ou inconnu). (B) Localisation du Bhoutan au sein de l'aire de répartition géographique du loup de l'Himalaya, d'après les données de répartition issues de la Liste rouge de l'UICN (Werhahn et al. 2024).

2. MATERIEL et METHODES

2.1. Zone d'étude et prélèvement d'échantillons

Le Bhoutan a mené une étude systématique à l'échelle nationale sur le léopard des neiges en 2022-2023, couvrant tous les habitats potentiels de cette espèce à travers le pays. Une grille de 2 km × 2 km a été superposée sur des altitudes comprises entre 3 400 et 5 200 m au-dessus du niveau de la mer, et après avoir pris en compte les questions d'accessibilité, 310 cellules de la grille ont été sélectionnées pour le déploiement de pièges photographiques dans les zones suivantes : JKSNR, PFD, JDNP, WCNP, la réserve naturelle de Bumdeling, la division forestière de Thimphu et le parc national Jigme Singe Wangchuck (NCD 2023 ; Figure 2).

Parallèlement à la mise en place des pièges photographiques, des excréments présumés de léopards des neiges ont été collectés lors de l'installation, de la surveillance et de la récupération des pièges, le long des itinéraires de déplacement et sur les sites d'installation des pièges, afin d'évaluer la diversité génétique et la structure de la population (Dhendup et al. 2025).

Au total, 184 excréments présumés de léopards des neiges ont été collectés et conservés dans des flacons en plastique contenant un dessiccant à base de silice. Afin de minimiser la contamination, les protocoles de terrain exigeaient le port d'une nouvelle paire de gants pour

chaque échantillon d'excréments. Les échantillons ont ensuite été transportés vers un laboratoire de génétique spécialisé de l'université Duquesne aux États-Unis, où l'extraction de l'ADN et les analyses de laboratoire qui ont suivi ont été réalisées.

2.2. Analyse en laboratoire des échantillons génétiques de loups

Un metabarcoding initial de l'ADN des échantillons d'excréments ($n = 184$) a été réalisé afin d'identifier l'origine de chaque excrément et les proies potentiellement consommées. Un fragment d'environ 100 pb de l'ARN ribosomique 12S mitochondrial (MT-RNRI) a été choisi comme code-barres ADN en raison de son utilisation répandue pour l'identification taxonomique des excréments de mammifères et d'oiseaux (Riaz et al. 2011 ; van der Heyde et al. 2021). Les réactions PCR contenaient 1 μ L de matrice d'ADN (extraite à l'aide du kit Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini), 5 μ L de KAPA HIFI HotStart Ready Mix (2x), 0,5 μ L des amorces sens et antisens 12SV5 (20 pM ; Riaz et al. 2011) et 3 μ L d'eau de qualité PCR. Chaque amorce comportait l'adaptateur Illumina à l'extrémité 5' afin de permettre l'indexation, comme décrit ci-dessous. Les PCR ont été réalisées dans les conditions suivantes : dénaturation à 95°C pendant 3 min, suivie de 40 cycles à 95°C pendant 30 s, 60°C pendant 30 s et 72°C pendant 30 s, avec une extension finale à 72°C pendant 5 min. Les produits ont été validés par électrophorèse sur gel. Les amplicons ont été purifiés à l'aide de billes Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, États-Unis). Une PCR d'indexation a été utilisée pour incorporer des codes-barres uniques à chaque échantillon à l'aide d'un kit d'indexation Nextera XT (Illumina Inc., San Diego, CA, États-Unis). Les réactions de PCR contenaient 5 L de matrice d'ADN, 12,5 pL de KAPA HIFI HotStart Ready Mix (2X), 2,5 L d'amorce d'indexation sens, 2,5 pL d'amorce d'indexation antisens et 2,5 L d'eau de qualité PCR. Les PCR ont été réalisées dans les conditions suivantes : dénaturation à 95°C pendant 3 min, suivie de 10 cycles à 95°C pendant 30 s, 55°C pendant 30 s et 72°C pendant 30 s, avec une extension finale à 72°C pendant 5 min. Les produits ont été purifiés à l'aide de billes Agencourt AMPure XP, séparés sur un gel d'agarose et colorés avec du GelGreen. Les échantillons ont été regroupés et dilués à une concentration de 4 nM. La bibliothèque a été chargée et séquencée sur un Illumina MiSeq à l'aide d'un séquençage en paire (paired-end) avec le kit de réactifs MiSeq 2x250 bp Reagent Micro Kit V2 au laboratoire Janecka Genomics.

Après le séquençage, les séquences FASTQ ont été démultiplexées, les adaptateurs ont été supprimés et les lectures ont été importées dans CLC Genomic Workbench v22 (Qiagen Bioinformatics, Redwood City, CA, États-Unis) pour une analyse préliminaire. La qualité des lectures brutes a été vérifiée et celles-ci ont été tronquées avec un seuil de qualité de 0,05. L'assemblage de novo a été réalisé à l'aide des paramètres suivants : un coût de mésappariement de 2, un coût d'insertion de 2, un coût de délétion de 3, une longueur minimale de contig de 90 pb, une fraction de longueur de 90% et un seuil de similarité de 94%. Les correspondances non spécifiques ont été mappées de manière aléatoire. Les séquences de consensus de chaque contig comportant au moins 500 lectures ont été extraites et identifiées à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) du NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les contigs ont été attribués à l'espèce présentant l'identité maximale la plus élevée dans la base de données GenBank, à condition que cette identité maximale soit d'au moins 97%. Dans les cas où plusieurs espèces de carnivores ont été identifiées, le carnivore présentant le plus grand nombre de lectures a été désigné comme espèce source. **Cependant**, aucun excrément ne contenait à la fois des lectures de léopard

des neiges et de *Canis* spp. L'espèce d'origine de 24 excréments a été identifiée comme *Canis* spp. lors de l'analyse initiale, car le code-barres MT-RNRI ne permettait pas de distinguer les chiens domestiques (*Canis lupus familiaris*) des loups de l'Himalaya (*Canis lupus chanco*).

Les 24 excréments provenant de *Canis* spp. ont fait l'objet d'une nouvelle analyse dans le cadre d'un cycle supplémentaire de métabarcodage. Lors de ce cycle, le code-barres MT-RNRI et deux autres loci ont été amplifiés. Le code-barres MT-RNRI a été amplifié dans les mêmes conditions que lors du premier cycle. Les deux autres loci comprenaient un segment de 508 pb du cytochrome b et un segment de 242 pb de la région de contrôle (boucle D), à l'aide d'amorces précédemment utilisées dans une analyse phylogénétique des loups de l'Himalaya (Ghazali et al. 2016 ; Werhahn et al. 2017). Les trois marqueurs ont été amplifiés dans des réactions PCR distinctes. Les réactions PCR pour les loci du cytochrome b et de la boucle D contenaient 2 L de matrice d'ADN, 14 ML de KAPA HIFI HotStart Ready Mix (2×), 2 L de chaque amorce (10 M) avec le surplomb d'indexation Illumina à l'extrémité 5', et 0,1 L d'albumine sérique bovine (10 mg/mL). La PCR du cytochrome b a été réalisée dans les conditions suivantes : dénaturation à 95°C pendant 5 min, suivie de 35 cycles à 95°C pendant 30 s, 50°C pendant 90 s et 72°C pendant 30 s, avec une extension finale à 72°C pendant 10 min. La PCR de la boucle D a été réalisée dans les conditions suivantes : dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, suivie de 40 cycles à 95°C pendant 30 secondes, 67°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes, puis une extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Les produits ont été visualisés, purifiés, indexés et regroupés en pools de 4 millions, comme décrit précédemment. Les trois pools ont été combinés (95% MT-RNRI, 2,5% cytochrome b, 2,5% boucle D), indexés selon le protocole décrit ci-dessus, puis séquencés sur le MiSeq.

Les séquences FASTQ ont été importées dans CLC Genomic Workbench, et les lectures MT-RNRI ont été analysées comme décrit précédemment afin de garantir la cohérence entre les séries de séquençage. Les lectures du cytochrome b et de la boucle D ont été mappées aux séquences de référence du loup de l'Himalaya (numéros d'accès GenBank : KY996534 (cytochrome b) et NC_010340 (boucle D)) à l'aide des paramètres décrits précédemment, à l'exception de la fraction de longueur qui était de 40% et du seuil de similarité fixé à 90%. Les séquences consensuelles ont été extraites et comparées à la base de données GenBank afin de déterminer si un échantillon contenait des séquences provenant soit du loup de l'Himalaya, soit du chien domestique. L'identification était considérée comme validée si les séquences consensuelles présentaient au moins 97% de similarité avec le meilleur résultat de la base de données. Afin d'obtenir une couverture complète du cytochrome b, nous avons purifié les produits de PCR des individus identifiés comme des loups de l'Himalaya à l'aide de kits de purification d'ADN ZR (Zymo Research, Irvine, CA, États-Unis) et les avons envoyés pour être séquencés par la méthode Sanger sur un instrument Applied Biosystems 3730xl au Biotechnology Resource Center de l'université de Cornell, NY, États-Unis.

2.3. Analyse phylogénétique de l'ADNmt

Afin d'identifier les haplotypes uniques de la boucle D et du cytochrome b chez les loups de l'Himalaya du Bhoutan, nous avons utilisé les packages *pegas* (version 1.3) et *ape* (version 5.8-1) dans R (Paradis 2010 ; Paradis et Schliep 2019). Les séquences de la boucle D et du cytochrome b ont été importées sous forme d'objets DNABin, et les haplotypes ont été

identifiés à l'aide de la fonction *haplotype()*, en attribuant chaque haplotype à l'origine géographique des individus échantillonnés.

Afin de contextualiser la position phylogéographique de nos échantillons, nous avons intégré des séquences de référence accessibles au public issues de la base de données GenBank du NCBI (Tableau S1), comprenant 30 séquences de la boucle D et 11 séquences de cytochrome b provenant de canidés d'Asie centrale, tels que le renard tibétain (*Vulpes ferrilata*) et le chacal doré (*C. aureus*), ainsi que le coyote (*C. latrans*) d'Amérique du Nord, le chien domestique et les loups gris holarctiques (*C. lupus* sp.) du monde entier. L'ensemble de données de référence comprenait un mélange de fragments mitochondriaux ciblés (boucle D et cytochrome b) et de génomes mitochondriaux complets. Lorsque cela était nécessaire, les segments s'alignant avec les séquences que nous avons générées ont été extraits des génomes mitochondriaux complets à l'aide de la fonction *matchPattern()* du package *Biostrings*, version 2.78 (Pagès et al. 2025). Pour cette étape, nous avons utilisé comme modèles des séquences de référence publiées du loup de l'Himalaya, dont les numéros d'accès GenBank sont : KY996530.1 (boucle D) et KY996533.1 (cytochrome b).

L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide de ClustalW et de MUSCLE V3 (Chenna et al. 2003 ; Edgar 2004 ; Veen et Hoekstra 2020). Nous avons comparé les indicateurs de qualité d'alignement entre les deux méthodes et avons observé une forte concordance (99,6 % de similitude dans les distances par paires). Afin de garantir la cohérence méthodologique avec les analyses précédentes des haplotypes mitochondriaux du loup de l'Himalaya, nous avons utilisé les alignements ClustalW pour le traitement en aval (Werhahn et al. 2017).

Les séquences alignées ont été tronquées à une longueur consensuelle de 242 pb pour la boucle D et de 508 pb pour le cytochrome b (Werhahn et al. 2017). Les réseaux d'haplotypes ont été construits à l'aide de l'algorithme Median-Joining (Bandelt et al. 1999), tel qu'implémenté dans PopART version 1.7 (Leigh et al. 2015). Les relations phylogénétiques ont été reconstituées séparément pour les fragments de 508 pb du cytochrome b et de 242 pb de la boucle D à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance dans IO-TREE v2. La sélection des modèles a été effectuée avec ModelFinder selon le critère d'information bayésien (BIC). Les modèles les mieux adaptés étaient TPM2u + F + G4 pour le *cytochrome b* et K2P + G4 pour la boucle D. Le soutien des nœuds a été évalué à l'aide de 1 000 répliques bootstrap ultra-rapides et de 1 000 tests SH-aLRT ; les arbres ont été enracinés au point médian et visualisés dans FigTree v1.4.4.

2.4. Estimation de la diversité génétique

Nous avons délimité les individus putatifs en ne considérant les échantillons partageant le même haplotype comme appartenant au même individu que lorsqu'ils avaient été prélevés à moins de 50 km l'un de l'autre ; les haplotypes identiques détectés à plus de 50 km de distance ont été attribués, par mesure de prudence, à des individus différents. Nous avons ensuite quantifié la diversité des haplotypes à partir de ces attributions à l'aide d'un estimateur non biaisé (Nei 1987), mis en œuvre via une fonction personnalisée appliquée séparément au cytochrome b et à la boucle D. Pour évaluer le polymorphisme des régions sélectionnées, nous avons calculé la diversité nucléotidique (π) directement à partir des alignements de séquences utilisés pour la comparaison des échantillons de canidés dans le réseau

d'haplotypes. Nous avons utilisé la fonction *nuc.div()* du package R *pegas* (Paradis 2010), qui calcule la proportion moyenne de différences nucléotidiques par paires entre les séquences. Afin de caractériser plus en détail la divergence des séquences, les différences nucléotidiques par paires ont été calculées à l'aide de la fonction *dist.dna* du package *ape* (Paradis et Schliep 2019), en utilisant le modèle de distance brute ('N') et la suppression par paires des sites manquants, générant ainsi des matrices de distance complètes pour les deux régions sur l'ensemble des échantillons de canidés.

3. RESULTATS

3.1. Diversité génétique

Nous avons réussi à amplifier des marqueurs d'ADN mitochondrial à partir de 13 excréments de loups (1 provenant du JDNP et 12 du WCNP), ce qui a permis d'obtenir des séquences exploitables pour 12 échantillons au niveau de la boucle D et 11 échantillons au niveau du cytochrome *b*. Nous avons identifié deux haplotypes de la boucle D et un haplotype du cytochrome *b* (Tableau S2). Les 11 séquences du cytochrome *b* étaient toutes identiques, ce qui indique l'absence de variation haplotypique au sein des échantillons ($H_d = 0$), et correspondaient à l'haplotype précédemment rapporté par Werhahn et al. (2017) pour la région de l'Haut-Humla, au nord-ouest du Népal (numéro d'accès GenBank : KY996533). **En revanche**, la variation de la boucle D était plus importante : cinq échantillons correspondaient à l'haplotype de la boucle D 2 du loup de l'Himalaya (numéro d'accès GenBank du NCBI : KY996530), et sept correspondaient à l'haplotype HW9_Museum Nepal (numéro d'accès GenBank du NCBI : AY333738).

En appliquant notre règle prudente de distance entre haplotypes, nous avons identifié cinq individus putatifs parmi les 13 échantillons positifs pour l'ADN mitochondrial. La boucle D présentait une diversité d'haplotypes modérée ($H_d = 0,5303$) et une différence moyenne de nucléotides de 5,36% sur l'ensemble des sites alignés.

3.2. Phylogéographie

Les séquences d'ADNmt correspondaient à des haplotypes connus au sein de la lignée maternelle du loup de l'Himalaya. Dans la phylogénie du cytochrome *b*, les échantillons du Bhoutan formaient un **clade** fortement soutenu avec des haplotypes de loup de l'Himalaya décrits précédemment et étaient presque identiques aux séquences provenant du Tibet et du Népal, ce qui les séparait clairement des autres lignées de loups (Figure 3).

Bien que la boucle D ait présenté une plus grande variation de séquence et un soutien plus faible au niveau de certains nœuds peu profonds, sa topologie globale était cohérente avec celle des résultats du cytochrome *b*. La phylogénie de la boucle D a également placé les séquences du Bhoutan au sein du clade du loup Himalayen, les regroupant avec des échantillons provenant du Tibet, du Népal et du Qinghai, et a fourni un soutien solide pour les distinguer des autres lignées de loups (Figure 4). L'haplotype D-loop 2 du loup de l'Himalaya a été décrit pour la première fois par Werhahn et al. (2017) à partir d'un échantillon provenant du nord-ouest du Népal (numéro d'accès GenBank : KY996530), tandis que l'haplotype HW9_Museum Nepal (numéro d'accès GenBank : AY333738) a été décrit pour la première fois par Sharma et al. (2004) à partir d'un spécimen de musée collecté au Népal.

Le réseau d'haplotypes par méthode de la jonction médiane a corroboré ces résultats phylogénétiques, plaçant toutes les séquences issues d'excréments au sein du groupe des loups de l'Himalaya. Le réseau de la boucle D montre en outre que les haplotypes du loup de l'Himalaya forment un groupe distinct, et que les deux haplotypes détectés dans le JDNP et le WCNP représentent des lignées maternelles différentes au sein de ce groupe (Figure 5). Dans le réseau du cytochrome *b*, seuls deux haplotypes du loup de l'Himalaya ont été recensés dans la littérature à ce jour, dont l'un correspondait à l'haplotype du Bhoutan (Figure 6). Leur position intermédiaire entre les haplotypes du loup et les nœuds ancestraux reconstruits reliant le coyote et le renard Tibétain pourrait correspondre à une divergence basale au sein d'une phylogénie plus large des canidés.

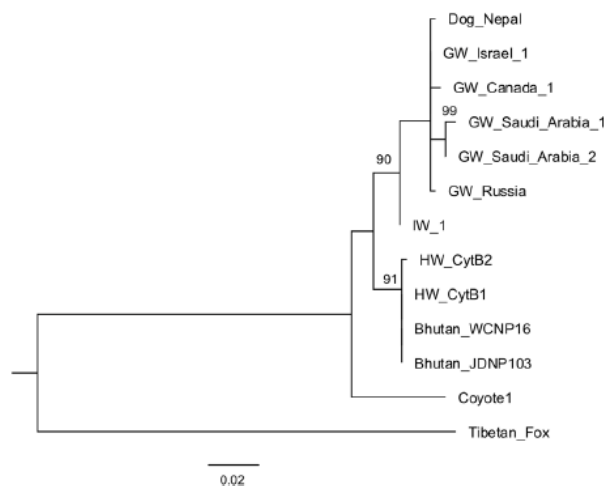


FIGURE 3. Arbre phylogénétique établi selon la méthode du maximum de vraisemblance à partir du fragment de 508 pb du cytochrome *b*, reconstruit dans IQ-TREE v2 (GW : loup gris, HW : loup de l'Himalaya, IW : loup Indien)

4. DISCUSSION

Nos résultats d'analyse de l'ADN mitochondrial suggèrent que les loups du Bhoutan appartiennent à la lignée du loup de l'Himalaya. Sur les 13 échantillons d'excréments amplifiés provenant de deux zones protégées (JDNP et WCNP), les séquences de la boucle D ($n = 12$) et du cytochrome *b* ($n = 11$) étaient identiques et formaient un groupe au sein du clade monophylétique représentant le loup de l'Himalaya. L'analyse du réseau d'haplotypes a confirmé cette classification. Ensemble, ces inférences phylogénétiques et basées sur le réseau fournissent des preuves solides indiquant que les loups des paysages de haute altitude du Bhoutan appartiennent au clade du loup Himalayen. Cependant, une analyse plus approfondie à l'aide de marqueurs nucléaires est nécessaire pour évaluer plus précisément leur position phylogéographique et l'état de leurs populations.

La composition des haplotypes corrobore également cette classification et suggère la continuité de la lignée mitochondriale du loup de l'Himalaya au Bhoutan et dans l'Himalaya central. Le cytochrome *b* était invariant (cytochrome *B* du loup de l'Himalaya 1 ; KY996533) dans tous les échantillons séquencés ($n = 11$), tandis que la boucle *D* a révélé deux haplotypes : la boucle *D* du loup Himalayen 2 (numéro d'accès NCBI GenBank KY996530 ; $n = 5$, y compris l'échantillon unique provenant du JDNP) et HW9_Museum Népal (numéro d'accès NCBI GenBank AY333738 ; $n = 7$). Les deux haplotypes de la boucle *D* étaient

présents au sein du WCNP, et l'haplotype de la boucle *D* 2 était commun aux deux parcs. Tous les haplotypes correspondaient à ceux précédemment signalés dans le nord-ouest du Népal (Sharma et al. 2004 ; Werhahn et al. 2017), ce qui indique que les loups du Bhoutan s'inscrivent dans la diversité connue de l'ADN mitochondrial des loups de l'Himalaya et forment un clade distinct. Bien que ce partage d'haplotypes soit compatible avec une ascendance maternelle commune et reflète vraisemblablement une **connectivité historique** et/ou actuelle via des déplacements le long de la chaîne Himalayenne, les conclusions sont limitées par le caractère unique de l'échantillon du JDNP, l'hérédité maternelle de l'ADNmt et la non-indépendance potentielle des échantillons de crottes en l'absence d'identification individuelle. Des marqueurs nucléaires seront nécessaires pour évaluer le flux génétique contemporain et la structure à petite échelle.

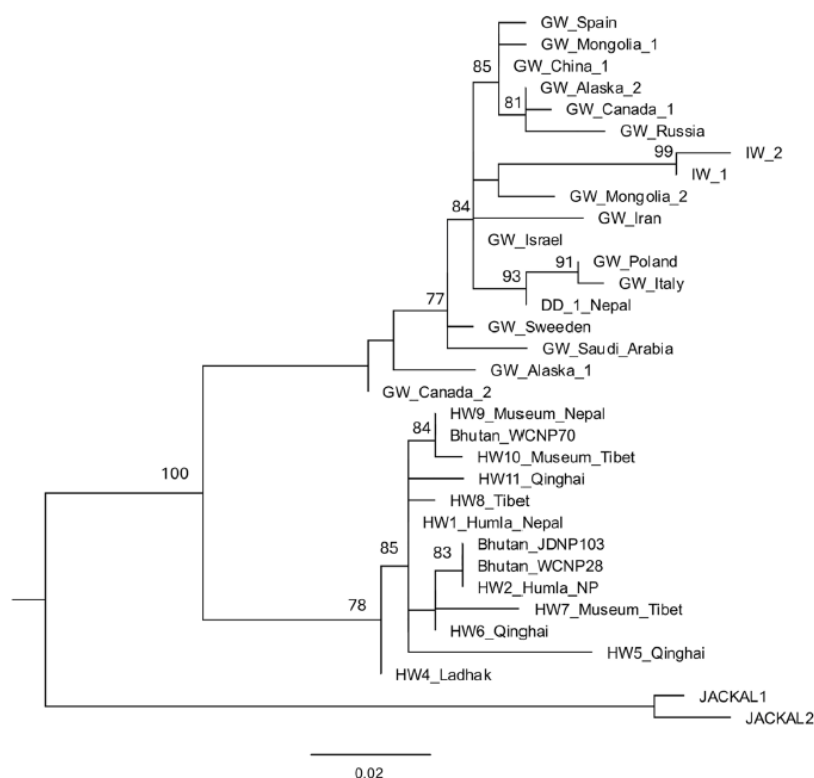


FIGURE 4. Arbre phylogénétique établi selon la méthode du maximum de vraisemblance à partir du fragment de 242 pb de la *région de contrôle* (boucle *D*), reconstruit dans IQ-TREE v2. DD : chien domestique ; GW : loup gris ; HW : loup de l'Himalaya ; IW : loup Indien

L'absence d'haplotypes d'ADNmt nouveaux dans cet ensemble de données doit être interprétée avec prudence et n'est pas inattendue compte tenu de la petite taille de l'échantillon et du nombre de marqueurs utilisés. **Premièrement**, l'ensemble de données présenté ici est restreint et spatialement déséquilibré (avec un seul échantillon amplifié avec succès provenant du JDNP), ce qui limite la capacité à détecter des haplotypes rares ou localisés, en particulier si la diversité de l'ADNmt est faible ou inégalement répartie. **Deuxièmement**, l'échantillonnage à partir d'excréments peut, par inadvertance, suréchantillonner les mêmes individus, gonfler la fréquence apparente des haplotypes courants et réduire la taille effective de l'échantillon lorsque l'identité des individus est inconnue. **Troisièmement**, le cytochrome *b* est relativement conservé et n'a pas été entièrement séquencé ; même dans la boucle *D*, les fragments courts typiques des ensembles de données non invasifs ont conduit à un nombre réduit de substitutions observées, limitant

ainsi la résolution nécessaire pour distinguer des variantes maternelles étroitement apparentées.

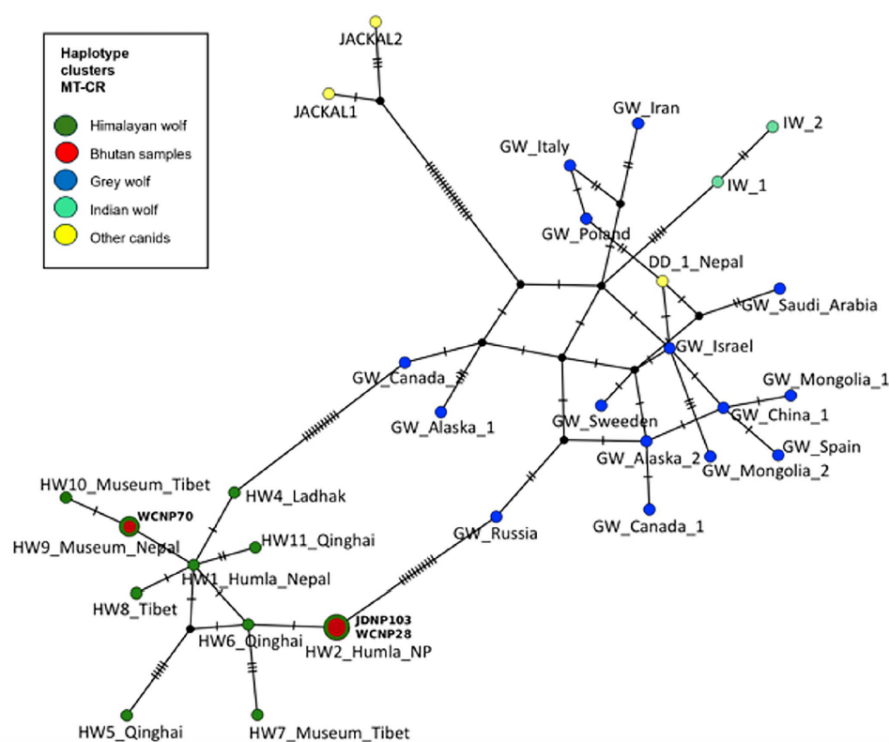


FIGURE 5. Réseau de type « median-joining » basé sur les haplotypes de la boucle D de 242 pb chez les canidés. La position relative des loups du Bhoutan, d'après les échantillons actuellement étudiés, est mise en évidence en rouge. Chaque cercle représente un haplotype différent, et sa taille est proportionnelle au nombre d'échantillons qui le partagent. DD : chien domestique ; GW : loup gris ; HW : loup de l'Himalaya ; IW : loup Indien

Par conséquent, un échantillonnage supplémentaire couvrant un ensemble plus large de localités, associé à l'identification des individus, à des mitogénomes complets et à des données génomiques nucléaires à plus haute résolution, sera nécessaire pour caractériser de manière plus exhaustive la diversité génétique des loups au Bhoutan. Un échantillonnage plus complet sera nécessaire pour vérifier si des haplotypes spécifiques au Bhoutan apparaissent à faible fréquence ou dans des régions non échantillonnées, une hypothèse cohérente avec les ensembles de données plus larges sur l'ADN mitochondrial des loups de l'Himalaya générés à partir de fragments comparables de la boucle *D* et du cytochrome *b* (Werhahn et al. 2018).

Il est important de noter que la richesse limitée en haplotypes d'ADNmt détectée au Bhoutan correspond aux tendances observées dans l'ensemble de l'aire de répartition du loup de l'Himalaya lorsque des fragments courts comparables d'ADNmt sont analysés. Au Népal, un échantillonnage non invasif à grande échelle (excréments et poils) utilisant des fragments courts de la boucle *D* et du cytochrome *b* a révélé une faible richesse en haplotypes au sein des régions : Humla comptait 3 haplotypes, Dolpa 3 haplotypes et la zone de conservation de Kanchenjunga 1 haplotype, malgré des échantillons de grande taille (séquences de la boucle *D* : Humla $n = 72$, Dolpa $n = 89$, KCA $n = 13$; sous-ensembles de cytochrome *b* : Humla $n = 24$, Dolpa $n = 16$, KCA $n = 7$) (Werhahn et al. 2018). **De même,** en Inde, l'analyse d'un fragment de boucle *D* de 225 pb issu de 19 échantillons prélevés dans la nature n'a

identifié que deux haplotypes dans l'ensemble de données principal (dont un haplotype très répandu partagé avec le plateau Qinghai-Tibet), et l'ensemble de données combiné élargi (incluant des séquences publiées) a révélé un pool d'haplotypes plus vaste mais toujours structuré géographiquement, comportant à la fois des variantes partagées et des variantes propres (Joshi et al. 2020). **Dans l'ensemble**, ces études indiquent que les loups de l'Himalaya présentent souvent une richesse en haplotypes d'ADNmt relativement faible dans les fragments courts à grande échelle spatiale, ce qui suggère qu'un échantillonnage modeste au Bhoutan devrait permettre de retrouver les haplotypes précédemment documentés, même si des variantes rares ou localisées supplémentaires existent et restent non détectées.

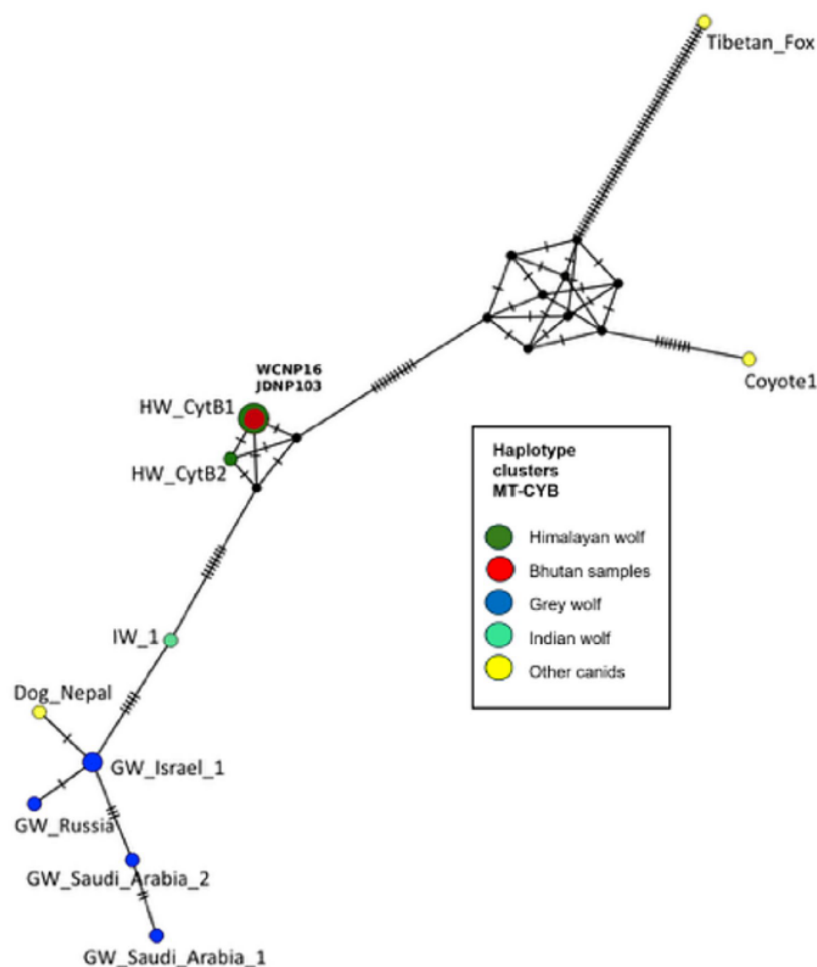


FIGURE 6. Réseau de jonction médiane basé sur les haplotypes du cytochrome *b* de 508 pb chez les canidés. La position relative des loups du Bhoutan, d'après les échantillons actuellement étudiés, est mise en évidence en rouge. Chaque cercle représente un haplotype différent, et sa taille est proportionnelle au nombre d'échantillons qui le partagent. DD : chien domestique ; GW : loup gris ; HW : loup de l'Himalaya ; IW : loup Indien

Au Népal, la population de loups de l'Himalaya devrait être très faible, et l'espèce est classée au niveau national comme « en danger critique d'extinction » (Jnawali et al. 2011). **En Inde**, Shrotriya (2020) a estimé le nombre total d'individus dans l'Himalaya indien entre 378 et 630. Pour le **Bhoutan**, les informations de référence restent limitées. Les données existantes issues de pièges photographiques indiquent que les loups sont principalement présents dans le centre du Bhoutan, avec des observations supplémentaires dans la réserve naturelle de JKSNR et la réserve de PFD à l'ouest ; **cependant**, ces zones n'étaient pas représentées dans notre échantillonnage génétique. Dans ce contexte, nos données d'ADN mitochondrial

corroborent l'interprétation selon laquelle les loups de haute altitude du Bhoutan font partie de la lignée des loups de l'Himalaya et que les lignées maternelles ne sont pas fortement isolées à l'échelle de l'échantillonnage. Cette interprétation s'appuie sur nos données montrant que la population de loups échantillonnée s'inscrit dans le clade des loups de l'Himalaya, ainsi que sur le partage d'haplotypes observé entre les loups du WCNP et du JDNP et les haplotypes publiés provenant du Népal.

Cependant, les lacunes apparentes en matière d'habitat approprié entre le WCNP et le JDNP, ainsi qu'entre le JDNP et le JKSNR, soulignent la possibilité de **contraintes de connectivité** qui ne peuvent être évaluées à l'aide de l'ensemble de données actuel (Dhendup et al. 2024). Parallèlement, ces lacunes peuvent refléter les limites du modèle d'adéquation de l'habitat plutôt que de véritables barrières à la dispersion et devraient faire l'objet d'une étude plus approfondie sur le terrain. **De plus, l'absence de barrières biogéographiques marquées à l'échelle de ce paysage pourrait faciliter les déplacements et contribuer à l'homogénéité génétique observée dans notre analyse actuelle.** Un échantillonnage non invasif élargi et systématiquement conçu, couvrant les paysages alpins et subalpins du Bhoutan – en donnant la priorité au JKSNR et au PFD ainsi qu'aux éventuelles lacunes d'habitat intermédiaires –, est donc nécessaire pour établir une référence génétique nationale, identifier les goulots d'étranglement potentiels en matière de connectivité et vérifier si ces discontinuités d'habitat correspondent à des **barrières fonctionnelles**. L'intégration du génotypage nucléaire (pour identifier les individus et quantifier le flux génétique) à des relevés de terrain ciblés et à des évaluations des conflits entre l'homme et le loup sera essentielle pour délimiter des unités de conservation, hiérarchiser les couloirs de déplacement entre le WCNP, le JDN et la JKSNR, et orienter une gestion nationale fondée sur des données probantes de cette lignée de loups menacée et distincte sur le plan évolutif au Bhoutan. Nous recommandons en outre d'étendre l'échantillonnage afin d'inclure les populations de loups voisines de l'Arunachal Pradesh du côté Indien, en particulier dans la région de Tawang, ainsi que celles du plateau Tibétain adjacent, dans la Région autonome du Tibet en Chine.

L'inclusion de ces populations renforcera les conclusions concernant la connectivité et les limites des lignées, et soulignera davantage la nécessité de politiques transfrontalières coordonnées pour assurer la conservation à long terme des loups de l'Himalaya.

References

- Aggarwal, R. K., T. Kivisild, J. Ramadevi, and L. Singh. 2007. "Mitochondrial DNA Coding Region Sequences Support the Phylogenetic Distinction of Two Indian Wolf Species." *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45, no. 2: 89–175.
- Bandelt, H., P. Forster, and A. Rohl. 1999. "Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies." *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- BBS. 2024. "Reappearance of Himalayan Wolves in Soe and Lingzhi, Threatening Livestock." Bhutan Broadcasting Service Corporation Limited. <https://www.bbs.bt/219849/>.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, et al. 2003. "Multiple Sequence Alignment With the Clustal Series of Programs." *Nucleic Acids Research* 31, no. 13: 3497–3500. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg500>.
- Choudhury, A. 2015. "The Tibetan Wolf *Canis lupus chanco* Gray (Mammalia: Carnivora: Canidae) in Northeastern India With a Recent Sighting From Northern Sikkim, India." *Journal of Threatened Taxa* 7, no. 8: 7475–7476. <https://doi.org/10.11609/JOTT.04206.7475-6>.
- Dhendup, T., L. Letro, T. Tandin, and S. Wangdi. 2024. "Distribution and Potential Habitat of the Vulnerable Himalayan Wolf *Canis lupus chanco* in Bhutan." *Oryx* 59, no. 1: 119–122. <https://doi.org/10.1017/S0030605324000127>.
- Dhendup, T., J. J. Robinson, G. Sorger, et al. 2025. "Population Genetic Structure of Snow Leopards (*Panthera uncia*) in Bhutan and Connectivity With Regional Populations." *Global Ecology and Conservation* 62: e03860. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2025.e03860>.
- Edgar, R. C. 2004. "MUSCLE: Multiple Sequence Alignment With High Accuracy and High Throughput." *Nucleic Acids Research* 32, no. 5: 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- Ghazali, M., J. Kaden, and H. Senn. 2016. "RZSS WildGenes Laboratory Training Guide: Himalayan Wolf Zinc-Finger Testing."
- Hennelly, L. 2022. "Divergence, Selection, and Demographic History of Wolves in Eurasia Using Genomic Data." University of California Davis, USA. <https://escholarship.org/uc/item/9022h7qv>.
- Hennelly, L., B. Habib, H. Root-Gutteridge, V. Palacios, and D. Passilongo. 2017. "Howl Variation Across Himalayan, North African, Indian, and Holarctic Wolf Clades: Tracing Divergence in the World's Oldest Wolf Lineages Using Acoustics." *Current Zoology* 63, no. 3: 341–348. <https://doi.org/10.1093/cz/zox001>.
- Hennelly, L. M., B. R. Parreira, A. Noble, et al. 2025. "Continent-Wide View of Genomic Diversity and Divergence in the Wolves of Asia." *Communications Biology* 9: 330. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-09379-9>.
- Jamtsho, Y., and O. Katel. 2019. "Livestock Depredation by Snow Leopard and Tibetan Wolf: Implications for Herders' Livelihoods in Wangchuck Centennial National Park, Bhutan." *Pastoralism* 9, no. 1: 1. <https://doi.org/10.1186/s13570-018-0136-2>.
- Jnawall, S. R., H. S. Baral, S. Lee, et al. 2011. "The Status of Nepal's Mammals: The National Red List Series."
- Joshi, B., S. Lyngdoh, S. K. Singh, et al. 2020. "Revisiting the Woolly Wolf (*Canis lupus chanco*) Phylogeny in Himalaya: Addressing Taxonomy, Spatial Extent and Distribution of an Ancient Lineage in Asia." *PLoS One* 15, no. 4: e0231621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231621>.
- Leigh, J. W., D. Bryant, and S. Nakagawa. 2015. "Popart: Full-Feature Software for Haplotype Network Construction." *Methods in Ecology and Evolution* 6, no. 9: 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>.
- Liu, G., C. Zhao, X. Yang, et al. 2019. "Comparative Analysis of Peripheral Blood Reveals Transcriptomic Adaptations to Extreme Environments on the Qinghai-Tibetan Plateau in the Gray Wolf (*Canis lupus chanco*)." *Organisms Diversity & Evolution* 19, no. 3: 543–556. <https://doi.org/10.1007/s13127-019-00405-3>.
- NCD. 2023. "Snow Leopard Status in Bhutan: National Snow Leopard Survey Report 2022–2023."
- Nel, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press.
- Pages, H., P. Aboyoun, R. Gentleman, and S. DebRoy. 2025. "Biostrings: Efficient Manipulation of Biological Strings-R Package Version 2.78.0 In Press."
- Paradis, E. 2010. "Pegas: An R Package for Population Genetics With an Integrated-Modular Approach." *Bioinformatics* 26, no. 3: 419–420. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>.
- Paradis, E., and K. Schliep. 2019. "Ape 5.0: An Environment for Modern Phylogenetics and Evolutionary Analyses in R." *Bioinformatics* 35, no. 3: 528–536.
- RGOB. 2023. *Forest and Nature Conservation Act of Bhutan*. Royal Government of Bhutan.
- Riaz, T., W. Shehzad, A. Viari, F. Pompanon, P. Taberlet, and E. Colssac. 2011. "ecoPrimers: Inference of New DNA Barcode Markers From Whole Genome Sequence Analysis." *Nucleic Acids Research* 39, no. 21: e145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr732>.
- Sharma, D. K., J. E. Maldonado, Y. V. Jhala, and R. C. Fleischer. 2004. "Ancient Wolf Lineages in India." *Proceedings. Biological Sciences* 271, no. Suppl 3: S1–S4. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0071>.
- Shrottriya, S. 2020. "Status, Distribution and Foraging Ecology of Wolf in the North-Western Himalayan Landscape, India Saurashtra University."
- Shrottriya, S., S. Lyngdoh, and B. Habib. 2012. "Wolves in Trans-Himalayas_165 Years of Taxonomic Confusion." *Current Science* 103, no. 8: 885–887.
- Signore, A. V., Y. Z. Yang, Q. Y. Yang, et al. 2019. "Adaptive Changes in Hemoglobin Function in High-Altitude Tibetan Canids Were Derived via Gene Conversion and Introgression." *Molecular Biology and Evolution* 36, no. 10: 2227–2237. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz097>.
- van der Heyde, M., P. W. Bateman, M. Bunce, G. Wardell-Johnson, N. E. White, and P. Nevill. 2021. "Scat DNA Provides Important Data for

Effective Monitoring of Mammal and Bird Biodiversity.” *Biodiversity and Conservation* 30, no. 12: 3585–3602. <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02264-x>.

Veen, L. E., and A. G. Hoekstra. 2020. “Easing Multiscale Model Design and Coupling With MUSCLE 3.” In *Computational Science – ICCS 2020*, edited by V. V. Krzhizhanovskaya, G. Závodszky, M. H. Lees, et al., 425–438. Springer International Publishing.

Viranta, S., G. Werhahn, and F. A. Machado. 2025. “Morphometric Evidence for the Differentiation of the Himalayan Wolf *Canis lupus chanco* (Canidae; Carnivora).” *Mammal Research* 70, no. 2: 195–203. <https://doi.org/10.1007/s13364-025-00793-2>.

Werhahn, G., L. M. Hennelly, S. J. Lyngdoh, B. Habib, S. Viranta, and S. Shrotriya. 2024. “*Canis lupus* ssp. Chanco (Amended Version of 2023 Assessment).”

Werhahn, G., Y. Liu, Y. Meng, et al. 2020. “Himalayan Wolf Distribution and Admixture Based on Multiple Genetic Markers.” *Journal of Biogeography* 47, no. 6: 1272–1285. <https://doi.org/10.1111/jbi.13824>.

Werhahn, G., H. Senn, M. Ghazali, et al. 2018. “The Unique Genetic Adaptation of the Himalayan Wolf to High-Altitudes and Consequences for Conservation.” *Global Ecology and Conservation* 16: e00455. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2018.e00455>.

Werhahn, G., H. Senn, J. Kaden, et al. 2017. “Phylogenetic Evidence for the Ancient Himalayan Wolf: Towards a Clarification of Its Taxonomic Status Based on Genetic Sampling From Western Nepal.” *Royal Society Open Science* 4, no. 6: 170186. <https://doi.org/10.1098/rsos.170186>.

Werhahn, G., H. Senn, D. W. Macdonald, and C. Sillero-Zubiri. 2022. “The Diversity in the Genus *Canis* Challenges Conservation Biology: A Review of Available Data on Asian Wolves.” *Frontiers in Ecology and Evolution* 10: 782528. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.782528>.

Zhang, W., Z. Fan, E. Han, et al. 2014. “Hypoxia Adaptations in the Grey Wolf (*Canis lupus chanco*) From Qinghai-Tibet Plateau.” *PLoS Genetics* 10: e1004466.