

# BUFO

**Association BUFO**

8, rue Adèle Riton

67000 Strasbourg

Contact : Victoria Michel

EVOLUTION  
& DIVERSITE  
BIOLOGIQUE



**Laboratoire Evolution & Diversité Biologique**

Université Toulouse III Paul Sabatier

Bâtiment 4R1

118, route de Narbonne

31062 Toulouse cedex 9

**Structuration génétique des populations de tritons palmés  
(*Lissotriton helveticus*) en Alsace**

*Travaux réalisés en 2014 par :*

Audrey TROCHET (post-doctorante, [audrey.trochet@univ-tlse3.fr](mailto:audrey.trochet@univ-tlse3.fr))

Roselyne ETIENNE (adjoint technique)

Hugo LE CHEVALIER (stagiaire)

Thomas JOUBIN (stagiaire)

Alexandre RIBERON (maître de conférences)

*Projet financé par :*



## Sommaire

<b>1. Contexte de l'étude</b> .....	3
1.1. <i>La dispersion</i> .....	3
1.2. <i>Mesurer et estimer la dispersion</i> .....	5
1.3. <i>Génétique des populations et écologie du paysage</i> .....	5
1.4. <i>Trame verte et bleue</i> .....	7
1.5. <i>Objectifs de l'étude</i> .....	8
<b>2. Méthodes</b> .....	9
2.1. <i>Espèce étudiée et site d'échantillonnage</i> .....	11
2.2. <i>Analyses génétiques</i> .....	13
2.2.1. <i>Extraction d'ADN</i> .....	13
2.2.2. <i>PCR (polymerase chain reaction)</i> .....	13
2.3. <i>Analyse des résultats</i> .....	14
2.3.1. <i>La diversité génétique globale</i> .....	14
2.3.2. <i>Analyses par sous-populations</i> .....	14
2.3.3. <i>Isolement par la distance</i> .....	17
2.3.4. <i>Détection de migrants</i> .....	17
<b>3. Résultats</b> .....	17
3.1. <i>Diversité génétique et structuration des populations</i> .....	17
3.2. <i>Détection de migrants</i> .....	19
<b>4. Discussion et recommandations</b> .....	20
<b>5. Bibliographie</b> .....	22

## 1. Contexte de l'étude

Dans la nature, les individus d'une même espèce se dispersent et se répartissent en plusieurs populations. Chacune des populations peut évoluer et acquérir une originalité génétique, plus ou moins différente de celle des populations voisines. On assiste alors une **diversification des populations**. Cependant, le plus souvent, elles continuent à échanger des individus par des événements de dispersion (pas d'isolement total). Ce flux de dispersion (i.e. **flux de gènes**) tend à homogénéiser les populations (brassage génétique) et à limiter leur diversification.

### 1.1. *La dispersion*

La dispersion est définie comme étant un mouvement individuel unidirectionnel pouvant induire des flux de gènes (Ronce, 2007 ; Fig. 1). En d'autres termes, des individus peuvent quitter leur population de naissance vers une autre population, et ce pour diverses raisons. Lorsque qu'un individu disperse sans se reproduire dans son nouveau patch d'habitat, on parle de « dispersion écologique ». Ce phénomène n'engendre pas de flux de gènes entre les populations, et n'induit donc pas de brassage génétique. Lorsqu'un individu dispersant se reproduit dans son nouveau patch d'habitat, on parle alors de « **dispersion efficace** » (Fig. 1). Dans ce cas uniquement, on assiste à un **brassage génétique** entre les populations (flux de gènes). La dispersion va ainsi limiter les effets néfastes de la dérive génétique et limiter le risque de consanguinité, ce qui réduira le risque d'extinction des populations. Par conséquent, la dispersion est un processus essentiel au maintien à long terme des populations et ce à tous les niveaux d'organisation biologique (Fig. 2).

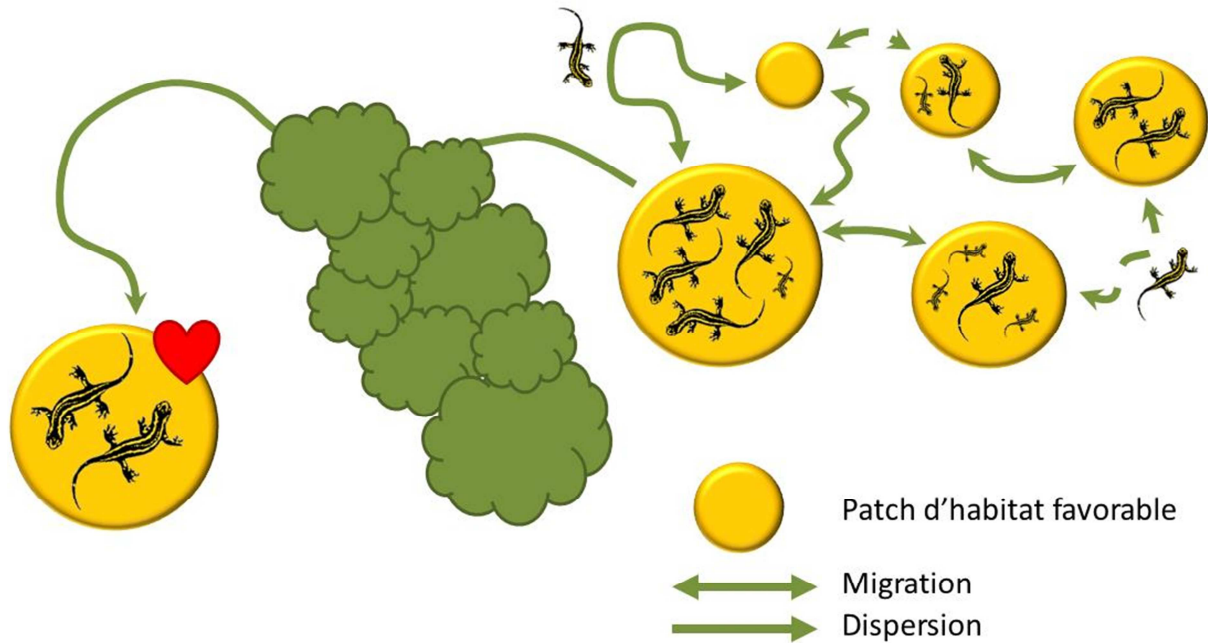


Figure 1. Mouvements individuels observés entre les populations d'une même espèce. Les flèches aller-retour se réfèrent à des mouvements de type migratoire. La flèche unidirectionnel montre un événement de dispersion, où l'individu dispersant peut se reproduire dans son nouveau patch d'habitat, et participer par conséquent aux flux de gènes entre populations (« dispersion efficace »).

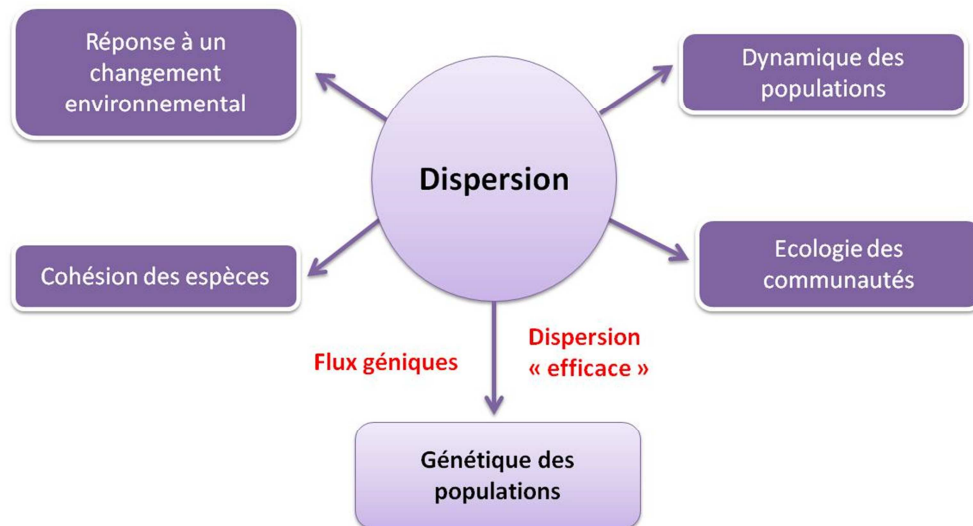


Figure 2. La dispersion : processus essentiel au maintien à long terme des populations, à tous les niveaux d'organisation biologique.

### *1.2. Mesurer et estimer la dispersion*

La dispersion est un processus complexe, et peut être mesurée suivant 2 méthodes distinctes. Dans un premier temps, des suivis individuels de mouvement (radio télémétrie, capture-marquage-recapture) peuvent permettre d'estimer la proportion d'individus dispersants et les distances de dispersion effectuées. Basée sur des méthodes directes, cette première approche fait référence à la dispersion écologique, puisque, comme expliqué précédemment, tous les individus qui dispersent pourront être suivis, mais aucune donnée concernant les individus dispersants qui se reproduisent ne sera disponible.

Puisque la dispersion est un mouvement individuel pouvant induire des flux de gènes entre les individus, ce processus peut également être identifiable à l'aide d'outils moléculaires (Broquet & Petit, 2009). La dispersion peut donc être mesurée dans un second temps de manière indirecte grâce à l'analyse des flux de gènes existants entre les populations, conséquence des reproductions effectuées dans les patchs d'habitat d'arrivée (méthode relative à la dispersion efficace).

### *1.3. Génétique des populations et écologie du paysage*

La dispersion est donc un des moteurs de l'arrangement spatial de la diversité génétique entre les populations. Mais ce n'est pas le seul processus qui rentre en compte. En particulier, le comportement, la morphologie, la physiologie des individus peut impacter l'organisation spatiale des populations. Outre ces facteurs internes, le paysage, et la qualité de l'habitat notamment, vont jouer un rôle non négligeable dans la répartition spatiale des populations. La qualité de l'habitat peut avoir des conséquences sur les événements de dispersion, et par conséquent, sur l'arrangement spatial de la diversité génétique des populations. Par exemple, un habitat de bonne qualité, permettant aux individus dispersants d'avoir de faible risque de prédation et/ou de mortalité, et offrant d'importantes ressources de nourriture, pourra favoriser les événements de dispersion entre les populations. A l'inverse, un habitat de mauvaise qualité, ou fragmenté, augmentera le risque de mortalité des individus qui auront pris le risque de disperser à travers ce paysage, et par conséquent, la dispersion et les flux de gènes seront moindres que dans un habitat de bonne qualité, augmentant le risque de consanguinité au sein des populations.

Chez les amphibiens, les zones agricoles (Cushman, 2006; Ray et al., 2002; Joly et al., 2001; Gray 2002; Beebee 1983; Gray et al., 2004), les zones urbaines (Delis et al., 1996) et le développement des routes (Fahrig et al., 1995; Carr et al., 2002) ont montré des effets négatifs sur les populations de ces espèces. En particuliers, les routes sont souvent considérées comme des barrières à la dispersion, empêchant les échanges entre populations, du au fort risque de mortalité qu'elles engendrent. A l'inverse, les zones humides et les zones forestières (Denoël & Ficetola, 2007; Griffiths, 1996) sont quant à elles réputées pour offrir aux amphibiens de bonnes qualités d'habitat. En effet, les zones humides sont nécessaires à la reproduction de ces espèces, et les forêts vont leur offrir de grandes quantités de nourriture, une diminution du risque de dessiccation grâce au taux d'humidité présent constamment dans la litière forestière, et limiter le risque de prédation. Ainsi, la structuration du paysage au sein et autour des populations d'amphibiens pourra fortement organiser la diversité génétique de ces populations. Par exemple, on peut s'attendre à ce que la présence de bandes forestière favorise la dispersion des individus, alors que ces événements pourraient être fortement réduits dans un paysage agricole (Fig. 3). Par conséquent, le taux de consanguinité au sein des populations pourrait être plus important dans les populations agricoles que dans les populations forestières, ce qui pourrait engendrer un risque non négligeable d'extinction de ces populations.

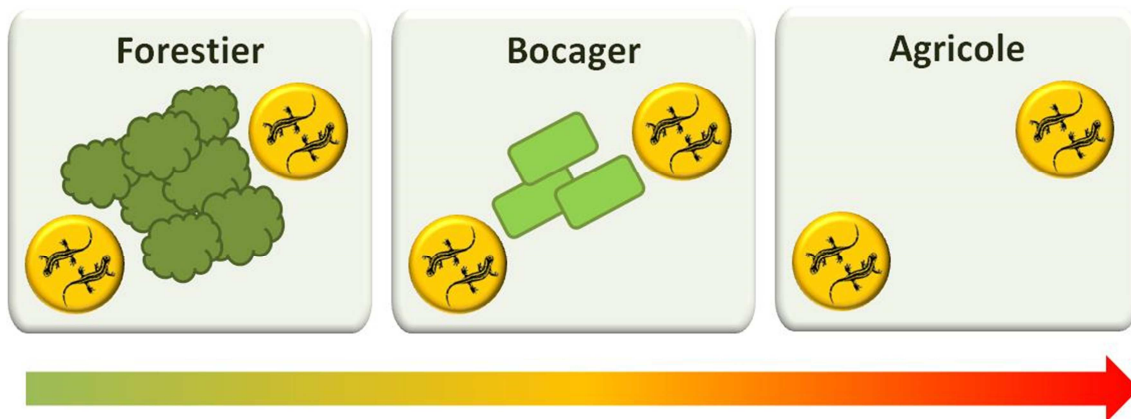


Figure 3. Hypothèses de structuration génétique induite par l'organisation du paysage. On s'attend à ce que les populations forestières favorisent les événements de dispersion, alors que ces échanges pourraient être plus rares entre des populations agricoles. La flèche correspond au risque potentiel de consanguinité en fonction des paysages (risque de consanguinité fort dans les populations agricoles).

#### 1.4. Trame verte et bleue

Dans ce contexte de fragmentation des habitats et d'isolement des populations, la mise en place de la **Trame verte et bleue** en 2007 a pour objectif de maintenir et reconstituer un réseau d'échanges sur le territoire national pour que les espèces animales et végétales puissent communiquer, circuler, s'alimenter et se reproduire. Le but ultime de cette politique d'aménagement du territoire est d'enrayer la perte de biodiversité attribuée aux effets négatifs de la fragmentation des habitats. La fragmentation des habitats est la principale menace d'extinction de nombreuses espèces à travers le globe, et se caractérise par la réduction des patches d'habitats et par l'éloignement géographique de ces patches. Par conséquent, la fragmentation des habitats risque de freiner les événements de dispersion réalisés par les individus, et ainsi augmenter le risque de consanguinité et le risque d'extinction au sein des populations. Afin de contrecarrer les effets négatifs de la fragmentation des habitats et d'en réduire ses conséquences, la **Trame verte et bleue** vise à (re)constituer un réseau écologique cohérent, constitué de *réservoirs de biodiversité* et de *corridors écologiques* qui permettent aux populations de circuler et d'accéder aux zones vitales nécessaires à leur cycle de vie.

La difficulté d'une telle organisation spatiale bénéfique aux espèces qui y vivent est de **quantifier dans un premier temps l'état des lieux des échanges entre populations**, afin d'identifier les réservoirs de biodiversité et de proposer des solutions d'aménagement de corridors écologiques entre ces entités. La détection de populations « sources » (= réservoirs de biodiversité) ainsi que la mise en place de ces corridors écologiques (corridors verts, passage à faune) entre populations peut être réalisée grâce aux outils de la génétique des populations. A l'inverse, la génétique des populations peut également être utilisée pour évaluer le taux de succès de ces structures visant à réduire les effets de la fragmentation des habitats (Holderegger & Wagner, 2008).

### 1.5. Objectifs de l'étude

Le but de cette étude est de déterminer, au travers des patrons de distributions des fréquences alléliques, comment la dispersion (parmi d'autres déterminants évolutifs) a pu façonner l'arrangement spatial de la diversité génétique. En d'autres termes, les objectifs de cette étude sont de :

- (1) **estimer la diversité génétique** des populations : une population à faible diversité génétique (i.e. forte consanguinité), du fait d'un nombre de reproducteurs insuffisants, risque un phénomène de dérive génétique qui mettrait en jeu à court terme sa viabilité;
- (2) de mettre en évidence **les flux de gènes existants** entre les populations (et également les populations « sources »).

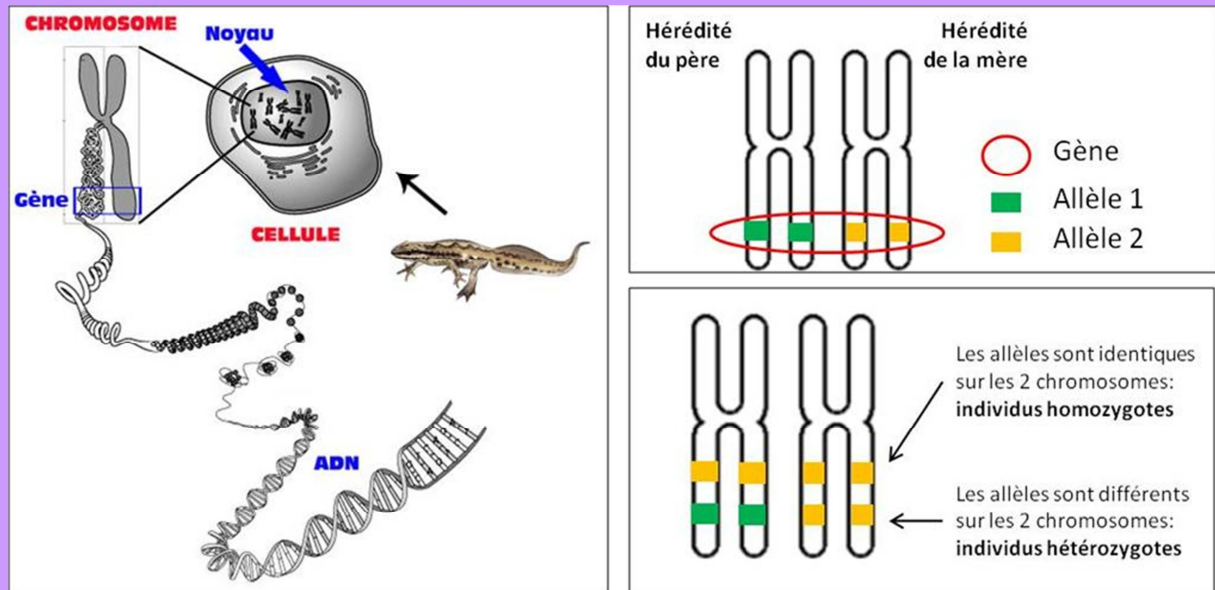
Ces résultats pourront permettre ultérieurement d'appliquer des **solutions d'aménagement du territoire** ciblées dans le but si besoin de (re)connecter les populations, protéger les populations sources, ou encore restaurer de nouvelles populations.



## 2. Méthodes

### Encadré 1. Rappel de génétique

L'ADN, support nucléaire des gènes, est composé de 4 unités chimiques, dites "bases" (A, T, G et C). Un gène correspond à un enchainement précis (séquence) et spécifique de ces bases (exemple: ATGCGCT). Les différentes "formes" (= séquences) qui peuvent exister pour un même gène sont les allèles. La position d'un gène sur le chromosome est le locus. A tout locus, un individu possède deux allèles, l'un hérité de sa mère, l'autre de son père.



Sur la chaîne d'ADN sont aussi dispersés des fragments dits "satellites" (mini- et microsatellites) qui sont dits "non codants", cela signifiant qu'ils sont sans "signification" apparente, leur fonction est en fait inconnue. Ces fragments comprennent en région centrale des répétitions d'un motif de 1 à 5 paires de bases, pour une taille totale de plusieurs dizaines à quelques centaines de paires de bases.

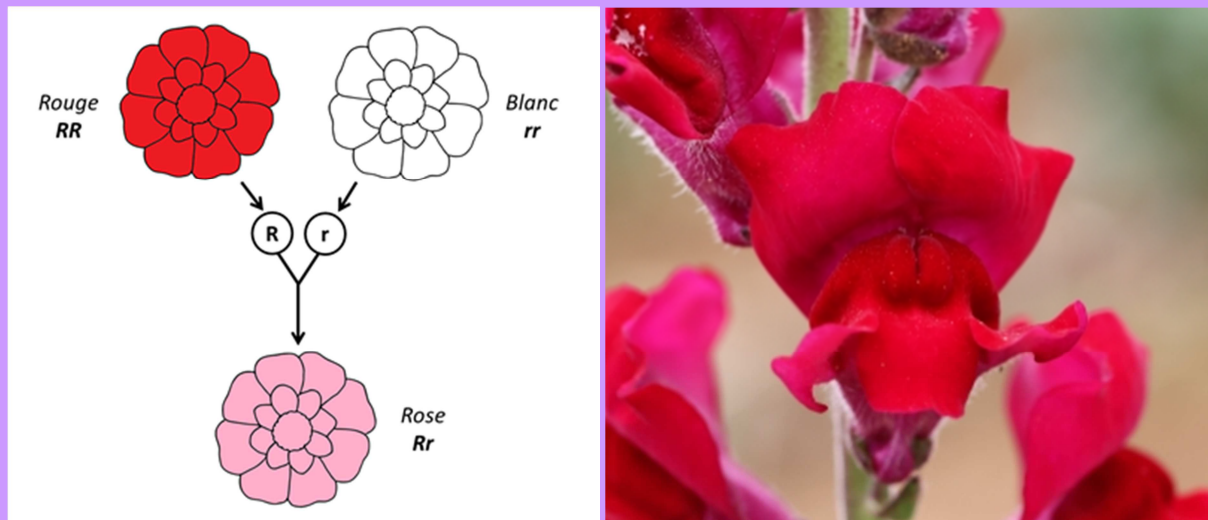
Du fait de cette non-signification, ces fragments ne subissent aucune pression de sélection : ils sont ainsi généralement très polymorphes. De manière accidentelle, la répétition centrale peut lors d'une réplication (lors de la multiplication ou de la division cellulaire), subir une délétion (un motif sera alors manquant) ou une insertion (un motif répliqué en excès). Cela a pour conséquence, dans le premier cas, une diminution du poids de ce fragment, ou dans le second une augmentation. Ce sont, après isolement de ce fragment, ces différences de poids qui permettent de **caractériser chaque individu**.

Caractériser l'originalité génétique des sites échantillonnés passera donc par l'analyse génétique des individus qui y vivent. On parlera alors de la **diversité génétique** des populations. La diversité génétique peut se mesurer grâce à l'estimation des **fréquences alléliques** présentes au sein des populations. La fréquence allélique est la fréquence à laquelle se trouve l'allèle d'un gène dans une population. La somme des fréquences alléliques de tous

les allèles d'un gène dans une population est donc par définition égale à 1. Chez les individus diploïdes, il y a **deux allèles** du même gène à un locus donné, un allèle d'origine paternelle, le second d'origine maternelle. Ces allèles peuvent être semblables chez un sujet dit **homozygote** (ou identiques en cas de consanguinité) ou différents chez un sujet **hétérozygote**.

La **consanguinité** est un régime de reproduction où les unions se font entre individus apparentés. Il en découle une augmentation des **individus homozygotes**, du fait que les individus s'étant reproduits ont souvent les mêmes gènes hérités de leur ancêtre commun (Henry & Gouyon, 2003). A partir des fréquences alléliques, nous pourrions donc estimer les taux d'**hétérozygotie** et d'**homozygotie moyens** des populations échantillonnées, ce qui nous renseignera sur le **taux de consanguinité** présent au sein des populations, et également sur les échanges existants entre les sites.

**Encadré 2. Exemple de mesure de variation génétique dans les populations naturelles : le cas du polymorphisme floral chez le muflier à grandes fleurs (*Antirrhinum majus*)**



La corolle du muflier peut prendre différentes couleurs : rouge, blanche ou rose. Les individus rouges et blancs sont homozygotes (2 allèles semblables RR ou rr) et les individus roses sont hétérozygotes (2 allèles différents R et r). Dans une population de 400 plantes, on observe 165 individus rouges (génotype RR), 45 individus blancs (génotype rr) et 190 individus roses (génotype Rr). La fréquence allélique de l'allèle R dans la population sera notée  $p$  et sera égale à  $[2 \times \text{nombre d'individus rouges (165)} + 1 \times \text{nombre d'individus roses (190)}] / (2 \times \text{nombre total d'individus})$ . Au total donc, la fréquence allélique  $p$  de l'allèle R sera de 0.65. Suivant la même procédure, la fréquence allélique de l'allèle r sera notée  $q$  et sera de 0.35. Notons ici que comme annoncé précédemment, la somme des fréquences alléliques d'une population est égale à 1 ( $p + q = 0.65 + 0.35 = 1$ ).

### 2.1. Espèce étudiée et site d'échantillonnage

Le triton palmé est un amphibien urodèle commun en Europe de l'Ouest. Cette espèce est relativement opportuniste, et se retrouve dans de nombreux habitats, aussi bien en milieu agricole, qu'en milieu forestiers, ou en milieu urbains. C'est un petit triton, de quelques centimètres de long (Fig. 4). La femelle est plus grande et plus grosse que le mâle. Le mâle quant à lui arbore de vives couleurs en période de reproduction, et développe une palmure sur les pattes arrières ainsi qu'un filament au bout de la queue. Ces particularités physiques sont des caractères sexuels secondaires, qui seront utilisés lors de la parade nuptiale (Fig. 4). La plupart des petits tritons sont considérés comme étant des espèces à faible capacité de dispersion (quelques centaines de mètres maximum : Smith & Green, 2005; Boissinot, 2009).



Figure 4. Tritons palmés. Le mâle (première photo) est plus petit et plus fin que la femelle (deuxième photo). On observe sur le mâle la présence de palmures noires au niveau des pattes arrières, ainsi qu'un filament au bout de la queue.

Afin de caractériser la diversité et la structuration génétique de populations de tritons palmés, 3 mares ont été échantillonnées en Alsace, dans lesquelles un maximum de 10 individus ont été capturés (Fig. 5 et Tableau 1). Au total, 24 individus ont été échantillonnés (11 femelles et 13 males). Pour chaque individu, nous avons mesuré la taille museau-cloaque et la taille de la patte arrière. Les tritons ont ensuite été pesés. Nous avons également pris de l'ADN par la méthode des écouvillons buccaux stériles frottés à l'intérieur de la cavité buccale de chaque individu. Les cotons des écouvillons ont ensuite été conservés dans du tampon d'extraction TE 1x. Après les mesures, les individus ont été immédiatement relâchés sur place.

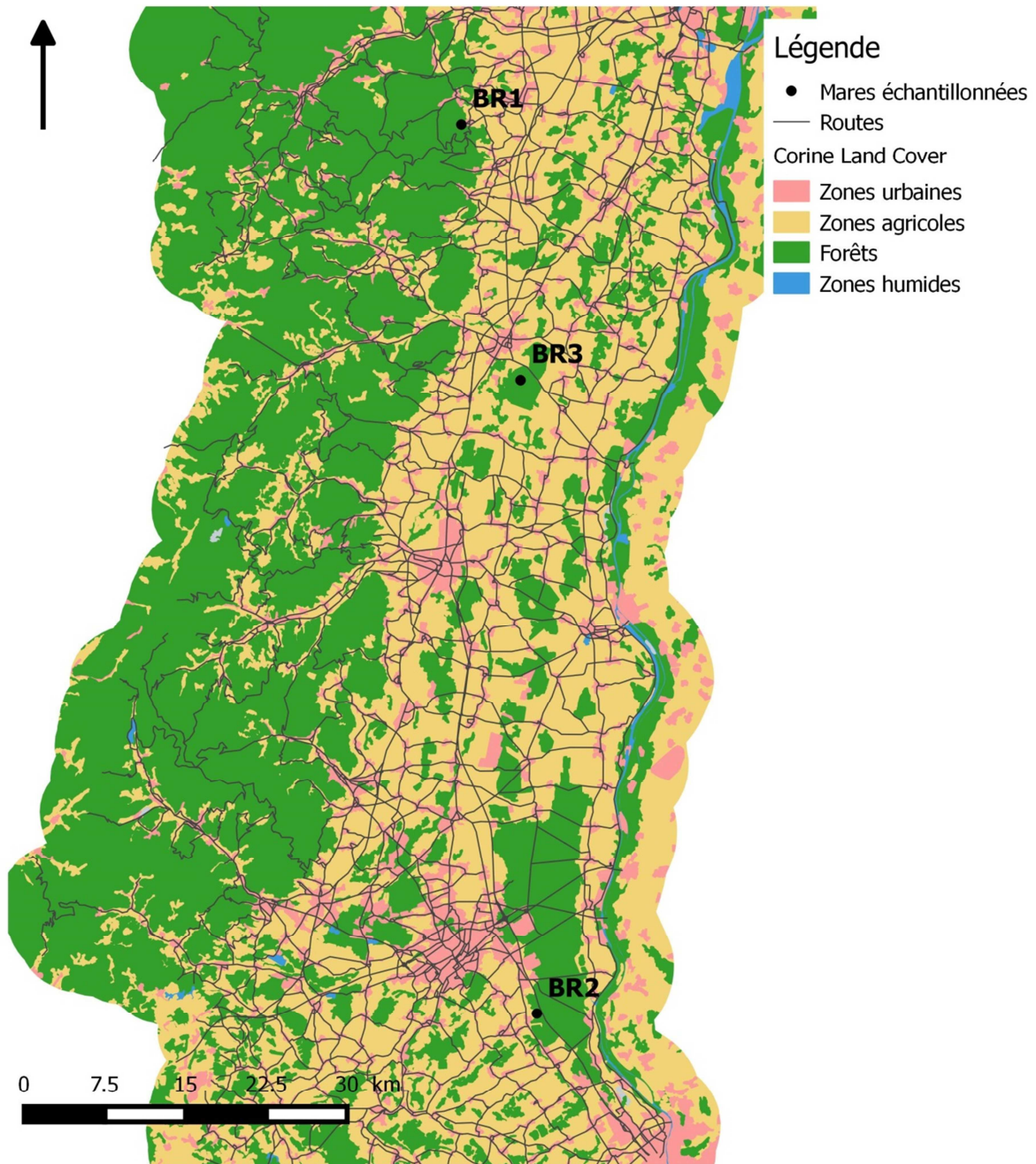


Figure 5. Carte des 3 sites où les tritons palmés ont été échantillonnés en Alsace.

Tableau 1. Numéro des mares échantillonnées, coordonnées géographiques (Lambert II étendue), nombre de femelles ( $N_f$ ) et nombre de mâles ( $N_m$ ) capturés par site dans le cadre de l'étude.

Code mares	Latitude	Longitude	$N_f$	$N_m$	$N_{total}$
BR1	975472.4	2395123.1	4	4	8
BR2	982488.4	2312356.2	1	5	6
BR3	980971.7	2371382.5	6	4	10

## 2.2. Analyses génétiques

### 2.2.1. Extraction d'ADN

A partir des écouvillons buccaux, l'ADN a été extrait pour chaque individu suivant la méthode d'extraction aux sels (sodium-dodecyl-sulfate (SDS) - protéinase K/Phenol - Chloroforme; voir Sambrook & Russell, 2001).

### 2.2.2. PCR (polymerase chain reaction)

La PCR permet d'obtenir une très grande quantité du fragment d'ADN utile. A chaque échantillon d'ADN à caractériser sont ajoutés divers réactifs (eau, dNTP, tampon, polymérase) et un couple d'amorces. Une amorce est une séquence d'une vingtaine de paires de bases, située de part et d'autre du fragment microsatellite, et spécifique de ce dernier. A chaque cycle, les 2 brins d'ADN se séparent, et le fragment situé entre les 2 amorces est synthétisé : il y a ainsi une augmentation exponentielle de la quantité de fragment d'ADN utile. Nous avons utilisé 11 loci (Lh1, Lh6, Lh7, Lh9, Lh13, Lh16, Lh17, Lh18, Lh19, Lh44, Us9) dont les détails sont disponibles dans Johanet et al. (2009) et dans Drechsler et al. (2013). Les 11 paires de loci ont été regroupées par 2 ou 3 afin de former 4 multiplex. Les PCR ont été réalisées grâce à l'utilisation de kit Type-it Microsatellite PCR (Qiagen). Sur chaque paire d'amorce, l'une d'elle a été marquée avec un colorant fluorescent (Eurofins Genomics). Les produits issus des PCR ont ensuite été placés dans un Analyseur d'ADN 48 capillaires 3730x1 (Applied Biosystems). La taille des fragments a été déterminée et analysée avec un marqueur de taille (ROX500) sous le logiciel GENEMAPPER (Fig. 6).



Figure 6. Extraction d'ADN à partir d'écouvillons buccaux, PCR, et analyses des fragments sous GENEMAPPER.

## 2.3. Analyse des résultats

### 2.3.1. La diversité génétique globale

#### Encadré 3. Le modèle de Hardy-Weinberg

L'équilibre de Hardy-Weinberg reste le modèle théorique central de la génétique des populations. La notion d'équilibre dans le modèle de Hardy-Weinberg est assujettie à différentes hypothèses : la population sur laquelle on étudie cette notion d'équilibre est panmictique (les couples se forment au hasard); la population est très grande en effectif ; il ne doit y avoir dans la population, *ni sélection, ni mutation, ni migration*. Dans ces conditions, la diversité génétique de la population se maintient et doit tendre vers un équilibre stable.

Si les hypothèses du modèle de Hardy-Weinberg sont respectées, on peut prédire exactement les **fréquences génotypiques** à partir des **fréquences alléliques** de la population. Si l'on reprend l'exemple du muflier (soit  $p$  la fréquence de l'allèle R et  $q$  la fréquence de l'allèle r) :

Fréquence du génotype RR (rouge) :  $p \times p = p^2$

Fréquence du génotype rr (blanc) :  $q \times q = q^2$

Fréquence du génotype Rr (rose) :  $2 \times p \times q = 2pq$

Les proportions de Hardy-Weinberg, relatives aux fréquences en hétérozygotes et homozygotes, renseignent sur le statut génétique de la population. On calcule alors deux hétérozygoties : l'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse d'Hardy-Weinberg (appelée hétérozygotie attendue  $H_E$ ), qui est égale à  $2pq$  et l'hétérozygotie observée ( $H_O$ ). Si les hypothèses du modèle d'Hardy-Weinberg sont respectées,  $H_O$  sera égal à  $H_E$ . Si l'hétérozygotie observée est inférieure à l'hétérozygotie attendue ( $H_O < H_E$ ), cela signifie qu'il y a plus d'homozygotes que prévus dans les populations étudiées. Cet excès d'homozygotes pourra alors être assimilé à un risque de consanguinité au sein des populations.

A partir de fréquences alléliques, l'hétérozygotie attendue ( $H_E$ ) et l'hétérozygotie observée ( $H_O$ ) ont été calculées avec le logiciel ARLEQUIN (Excoffier & Lischer, 2010) pour chaque mare échantillonnée et pour la population globale. Nous avons testé si les mares étaient dans les conditions du modèle d'Hardy-Weinberg ( $H_E = H_O$ ) ou non ( $H_E < \text{ou} > H_O$ ).

### 2.3.2. Analyses par sous-populations

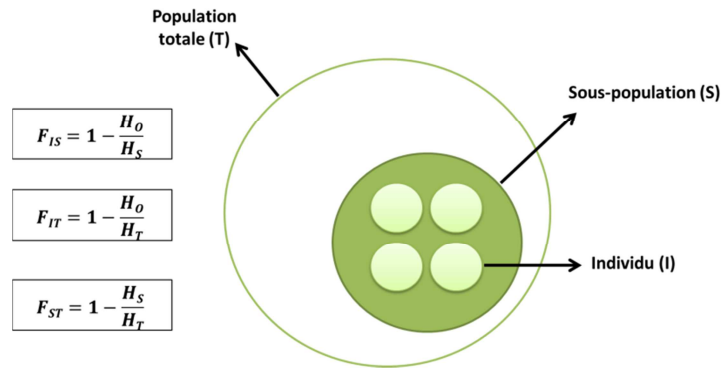
Dans une population subdivisée, on distingue 3 niveaux de complexité: l'individu (I), la sous-population (S) et la population totale (T). Les indices de fixation de Wright (1969) suivants considèrent (Fig. 7) :  $H_I$  : hétérozygotie observée d'un individu dans sa sous-population,  $H_S$  : hétérozygotie théorique d'un individu dans sa sous-population panmictique,  $H_T$  : hétérozygotie théorique d'un individu dans la population totale en panmixie. Le **coefficient de**

**consanguinité**  $F_{IS}$  est calculé à l'intérieur de la sous-population par  $F_{IS} = (H_S - H_I) / H_T$ . L'index de fixation  $F_{ST}$  exprime la diminution de l'hétérozygotie liée à la divergence entre la sous-population et la population totale.  $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$ . Cet index est donc utilisé comme **index de différenciation génétique** entre les sous-populations (Wright, 1969 ; Weir & Cockerham, 1984). Si le  $F_{ST}$  est égal ou très proche de 0, cela signifie qu'il y a de nombreux échanges génétiques entre les populations (peu de différenciation génétique, population panmictique). A l'inverse, si le  $F_{ST}$  est proche de 1, cela se traduit par une forte différenciation génétique entre les populations, suggérant très peu voire aucun flux de gènes entre les populations. D'après Wright (1978), un  $F_{ST}$  compris entre 0 et 0.05 révèle une différenciation faible ; un  $F_{ST}$  compris entre 0.05 et 0.15 traduit une différenciation modérée ; un  $F_{ST}$  entre 0.15 et 0.25 suggère une différenciation importante et au-delà de 0.25, le  $F_{ST}$  illustre une différenciation très importante.

L'indice  $F_{IS}$  nous renseignera donc sur la déviance de l'hétérozygotie observée chez un individu par rapport à l'hétérozygotie attendue en cas de reproduction aléatoire (modèle de Hardy-Weinberg). Cet indice nous apportera des informations sur le degré de **consanguinité des individus** issus de **croisements entre individus apparentés** directement au sein des mares. L'indice  $F_{ST}$  nous renseignera également sur le taux de consanguinité global existant entre les populations, mais cette fois-ci, cet indice nous apportera des informations concernant la **consanguinité résultant d'une subdivision de la population** (les populations et/effectifs sont trop faibles et au fur et à mesure des reproductions, même aléatoires, on assiste à une perte d'individus hétérozygotes). Les 3 indices  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  et  $F_{IT}$  ont été calculé grâce au logiciel ARLEQUIN (Excoffier & Lischer, 2010).

Nous avons également utilisé le logiciel STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), qui implémente une méthode de clustering pour l'inférence de la structure génétique de populations à partir de données génétiques sous la forme de marqueurs indépendants. L'objectif est de grouper les individus (et donc les mares échantillonnées) en populations. En d'autres termes, cette méthode permet de nous renseigner sur le niveau de complexité des mares échantillonnées. Chaque mare est-elle une population ou plusieurs mares forment-elles une **métapopulation** ? Pour cela, les résultats de STRUCTURE sont analysés avec STRUCTURE HARVESTER (Earl et al., 2012), logiciel qui nous donnera un indice ( $\Delta K$ ) nous permettant de délimiter le nombre de groupes présents au sein des 5 mares échantillonnées.

Figure 7. Schéma des 3 niveaux de complexité : la population totale (T), les sous-populations (S) et les individus (I) au sein de ces sous populations et leurs indices associés.



#### Encadré 4. Le concept de métapopulations

Ce concept est décrit pour la première fois par Levins en 1969. Il définit la métapopulation comme un ensemble de populations d'individus d'une même espèce séparées spatialement ou temporellement et étant interconnectées par des événements de dispersion. Ces populations occupent des parcelles d'habitat de qualité variable au sein de la métapopulation et à tout moment certaines parcelles pourront être disponibles et inoccupées. La zone intermédiaire appelée la matrice de l'habitat est vue comme inutilisable mais peut être traversée.

Au sein d'une métapopulation, la population d'un patch d'habitat peut s'éteindre et ce dernier peut ensuite être recolonisé grâce à une dispersion au départ d'autres patches d'habitat (Fig. 8). La métapopulation dans son ensemble peut alors être stable même si certaines parties fluctuent. Sa persistance dépend donc d'un équilibre stochastique entre les extinctions locales et la recolonisation de sites vacants. Cependant, l'isolement et l'éloignement progressif des habitats, comme peut engendrer une fragmentation des habitats par exemple, peuvent entraîner un risque important d'extinction sans possible recolonisation et disparition de la métapopulation. La persistance d'une population dépendra ainsi : des interactions spécifiques, des caractéristiques écopaysagères (fragmentation des habitats ou corridors écologiques) et des phénomènes de stochasticité démographique et environnementale. La survie d'une métapopulation est donc dépendante du bon état des connexions entre ses sous-populations.

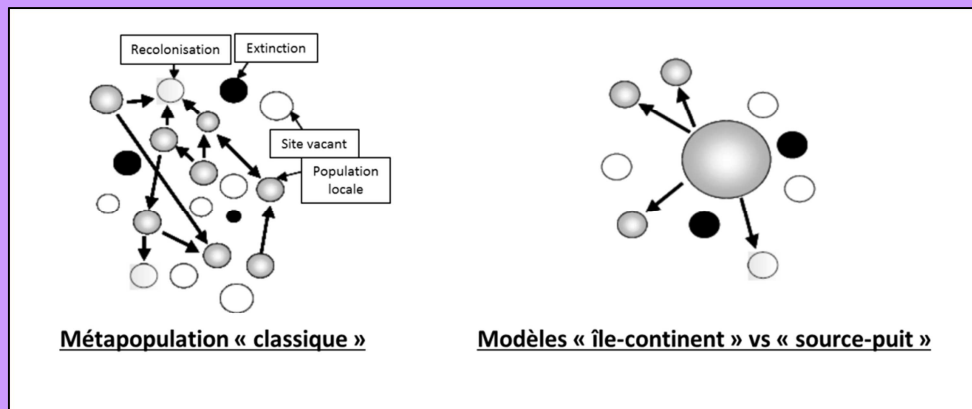


Figure 8. Structure de deux modèles de métapopulations. Chaque rond représente une sous-population (par exemple une mare) et les flèches représentent les événements de dispersion essentiels pour le maintien de la métapopulation. Le gros rond gris (sous-population « source ») représente une population à fort effectif, fournissant de nombreux migrants vers d'autres populations, et garantissant un flux de gènes suffisant pour maintenir la stabilité de la métapopulation à long terme.



### 2.3.3. Isolement par la distance

Le principe de l'isolement par la distance prédit que plus les individus sont éloignés géographiquement, plus ils seront différents génétiquement. Ce principe sera testé ici par un test de Mantel (Mantel & Valand, 1970) réalisé sous le logiciel R, en comparant les  $F_{ST}$  par paires calculés précédemment et la distance géographique entre chaque paire de mares calculées avec le logiciel ArcGIS 10.

### 2.3.4. Détection de migrants

Enfin, afin d'avoir de plus amples informations sur les événements de dispersion effectués entre les mares échantillonnées, nous avons réalisé des analyses de détection de migrants et des tests d'assignation avec le logiciel GENECLASS2 (Piry et al., 2004). Les résultats nous permettront également d'identifier les mares « sources » au sein des mares étudiées.

## 3. Résultats

### 3.1. Diversité génétique et structuration des populations

Tous les individus ont été analysés avec les 11 microsatellites présentés plus haut. Sur 3 mares échantillonnées, 2 montrent un écart par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg ( $P < 0.05$ ). L'hétérozygotie moyenne attendue ( $H_E : 0.5160 \pm 0.2315$ ) est supérieure à l'hétérozygotie observée ( $H_O : 0.4333 \pm 0.0404$ ), ce qui suggère un excès en homozygotes et un déficit en hétérozygotes au sein des mares (Tableau 2).

Tableau 2. Hétérozygotie observée ( $H_O$ ), attendue ( $H_E$ ), indice de consanguinité ( $F_{IS}$ ) et nombre d'individus échantillonnés par mare. Aucune valeur de  $F_{IS}$  n'est significative.

Code mare	N	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$
BR1	8	$0.48 \pm 0.20$	$0.46 \pm 0.28$	0.1812
BR2	6	$0.41 \pm 0.20$	$0.58 \pm 0.18$	0.2268
BR3	10	$0.41 \pm 0.30$	$0.51 \pm 0.18$	0.0175

La variance génétique est plus importante à l'intérieur des mares qu'entre mares (à l'intérieur = 20.27%, entre mares = 6.20%). Le coefficient de consanguinité global  $F_{IS}$  est de 0.1280 et est significatif ( $P = 0.0264$ ). Une valeur de  $F_{IS}$  importante et positive montre un déficit global

en hétérozygotes dans les mares échantillonnées, suggérant une forte influence de la consanguinité au sein des mares. Les coefficients de consanguinité  $F_{IS}$  sont présentés dans le Tableau 2 pour chacune des mares. On remarque cependant qu'aucune valeur de  $F_{IS}$  par mare n'est significative, ce qui suggère une faible importance de la consanguinité au sein des mares.

La valeur de  $F_{ST}$  globale est de 0.0782 parmi toutes les mares, et n'est pas significatif ( $P = 0.0538$ ) supposant une faible différenciation génétique entre les mares. Deux valeurs de  $F_{ST}$  par paires montrent cependant des taux importants, et sont significatifs (entre les mares BR1 et BR3 et entre les mares BR2 et BR3; Tableau 3). La valeur globale de  $F_{IT}$  est de 0.1961 et est également significative ( $P = 0.0020$ ). La valeur de  $F_{IT}$  traduit d'un déficit global de 19.61% en hétérozygotes parmi les 3 mares échantillonnées.

Tableau 3.  $F_{ST}$  par paires (diagonales du dessous) et distances géographiques entre mares échantillonnées (diagonales du dessus, en km). Les valeurs en gras montrent les  $F_{ST}$  significatifs.

	BR1	BR2	BR3
BR1	-	83.0637	24.3692
BR2	-0.0000	-	59.0458
BR3	<b>0.1505</b>	<b>0.0603</b>	-

Le test de Mantel a révélé qu'il n'y avait pas de relation entre les  $F_{ST}$  par paires et les distances géographiques entre mares (test de Mantel : -0.9098,  $P = 1$ ). Ce résultat suggère que les individus éloignés n'étaient pas plus différents génétiquement que des individus proches géographiquement.

Les analyses réalisées sous le logiciel STRUCTURE ont mis en évidence 1 seul cluster génétique parmi les 3 mares échantillonnées. Ce résultat démontre qu'il existe une très faible différenciation génétique entre les mares échantillonnées, et on peut s'attendre à ce que des échanges d'individus soient réalisés entre elles.

### 3.2. Détection de migrants

Parmi les 24 individus analysés, le logiciel GENECLASS2 n'a pas identifié de migrants potentiels de 1<sup>ère</sup> génération (Tableau 4). Globalement, peu d'échanges ont donc lieu entre les mares échantillonnées. Cependant, les tests d'assignation démontrent que les mares échantillonnées ont de fortes similitudes avec la mare BR3. BR3 pourrait être une population source au sein de ce réseau (Tableau 4 ; Fig. 9).

Tableau 4. Résumé des analyses de détection de migrants et des tests d'assignation réalisés sous GENECLASS2. Le pourcentage de migrants est comparé par rapport au nombre d'individus échantillonnés.

Code mares	N	Détection de migrants			Tests d'assignation	
		Nombre de migrants potentiels	Pourcentage de migrants	Mare d'origine	Mare assignée	Plus forte probabilité d'assignation
BR1	8	0	0.00%	0	BR2	0.5864
BR2	6	0	0.00%	0	BR3	0.4213
BR3	10	0	0.00%	0	BR3	0.6214

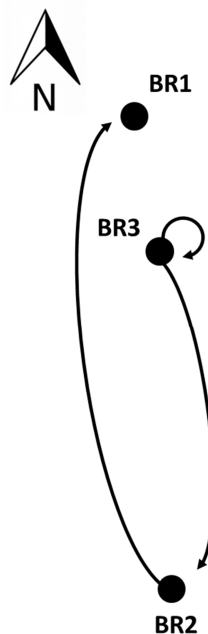


Figure 9. Résumé des tests d'assignation réalisés sous GENECLASS2. Les flèches représentent l'assignement le plus probable entre les mares échantillonnées.

#### **4. Discussion et recommandations**

De nombreuses mares et zones humides sont recensées en Alsace. Le triton palmé (*Lissotriton helveticus*) y est présent de manière relativement importante. Dans le cadre de cette étude de connectivité des habitats, ce petit triton est une excellente espèce à étudier de par son opportunisme au niveau des habitats qu'il fréquente, et par ses capacités de dispersion relativement limitées (Smith & Green, 2005).

Les analyses de structuration et de diversité génétique ont révélée plusieurs résultats sur cette espèce. Dans un premier temps, nous n'avons pas identifié de phénomène d'isolement par la distance. Ce pattern a cependant été souvent observé chez les amphibiens, pour lesquels de faible capacité de dispersion provoque l'accumulation de divergences génétiques entre populations (Knopp & Merilä, 2009; Kuchta & Tan, 2006; Rowe et al., 2000; Tallmon et al., 2000; Vos et al., 2001; Zamudio & Wiczorek, 2007).

Le coefficient  $F_{ST}$  a été calculé entre les populations. Ce paramètre de différenciation génétique ( $F_{ST} = 0.0782$ ) entre les mares alsaciennes révèle qu'il n'existe aucune différenciation génétique entre elles. Le  $F_{ST}$  est très faible et non significatif, ce qui suggère l'existence d'échanges d'individus (événements de dispersion) entre les mares.

Malgré une valeur de  $F_{IS}$  significative, les mares échantillonnées ne sont pas isolées les unes des autres ( $F_{ST}$  non significatif). On observe cependant peu d'échanges d'individus. Il est important de noter ici que, même si les analyses ont identifié peu (voire pas du tout) de migrants, et par conséquent peu de mares potentiellement « sources », cela ne concerne que les migrants de 1<sup>ère</sup> génération. En d'autres termes, il est fort probable que d'une année sur l'autre, les mares sources soient différentes au sein du réseau. Il semble donc important de ne pas négliger les mares échantillonnées, mares qui pourraient être très importantes dans le fonctionnement des populations de ce réseau.

A partir de ces résultats, la prospection de mares accueillant des tritons palmés (notamment entre les mares étudiées ici), et l'incorporation de ces mares et individus dans des analyses similaires de génétique des populations est fortement recommandée dans un premier temps. Par la suite, la restauration de mares et/ou la création de nouvelles mares, offrant aux tritons palmés de nouveaux patchs d'habitat favorables, pourraient être de bonnes mesures

compensatoires afin de réduire les taux de consanguinité observés actuellement au sein des mares échantillonnées. La mise en place de corridors écologiques entre ces mares pourrait également favoriser plus d'échanges entre ces habitats. Un suivi des individus et des mares au cours du temps, couplés à des analyses de génétique des populations serait pertinents afin d'étudier l'évolution de la structuration et de la diversité génétique des tritons palmés (comment vont évoluer les indices  $F_{IS}$  et  $F_{ST}$  au cours du temps ?), en vue de futures aménagement du territoire pour la préservation de cette espèce au sein de la région alsacienne.

## 5. Bibliographie

- Beebee TJC (1983) Habitat selection by amphibians across an agricultural land-heathland transect in Britain. *Biological Conservation* **27**, 111-124
- Boissinot A (2009) Influence de la structure du biotope de reproduction et de l'agencement du paysage, sur le peuplement d'amphibiens d'une région bocagère de l'ouest de la France. (Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire de Biogéographie et d'Ecologie des Vertébrés (EPHE/CEFE))
- Broquet T & Petit E (2009) Molecular estimation of dispersal for ecology and population genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**, 193-216
- Carr LW, Fahrig L, Pope SE (2002) *Impacts of landscape transformation by roads*. In *Applying landscape ecology in biological conservation* (pp. 225-243). Springer New York
- Cushman SA (2006) Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation* **128**, 231-240
- Delis PR, Mushinsky HR & McCoy ED (1996) Decline of some west-central Florida anuran populations in response to habitat degradation. *Biodiversity and Conservation* **5**, 1579-1595
- Denoël M & Ficetola GF (2007) Landscape-level thresholds and newt conservation. *Ecological Applications* **17**, 302-309
- Drechsler A, Geller D, Freund K, Schmeller DS, Künzel S, Rupp O, Loyau A, Denoël M, Valbuena-Ureña E & Steinfartz S (2013) What remains of a 454 run: estimation of success rate of microsatellite loci development in selected newt species (*Calotriton asper*, *Lissotriton helveticus*, *Triturus cristatus*). *Ecology and Evolution* **3**, 3947-3957
- Earl DA & vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359-361
- Excoffier L & Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567
- Fahrig L, Pedlar JH, Pope SE, Taylor PD & Wegner JF (1995) Effect of road traffic on amphibian density. *Biological Conservation* **73**, 177-182

- Gray MJ (2002) Effect of anthropogenic disturbance and landscape structure on body size, demographics and chaotic dynamics of southern high plains amphibians. PhD Thesis, Texas Tech University, Lubbock, USA, 180 pp
- Gray MJ Smith LM & Leyva RI (2004) Influence of agricultural landscape structure on a southern High Plains, USA, amphibian assemblage. *Landscape Ecology* **19**, 719-729.
- Griffiths RA (1996) *Newts and salamanders of Europe*. London: Academic Press
- Henry JP & Gouyon P-H (2003) *Précis de génétique des populations : Cours, exercices et problèmes résolus*. Eds: Dunod. 180 pp
- Holderegger R & Wagner HH (2008) Landscape genetics. *Bioscience* **58**, 199-208
- Johanet A, Picard D, Garner TWJ, Dawson DA, Morales-Hojas R, Jehle R, et al. (2009) Characterization of microsatellite loci in two closely related Lissotriton newt species. *Conservation Genetics* **10**, 1903–1906
- Joly P, Miaud C, Lehmann A & Grolet O (2001) Habitat matrix effects on pond occupancy in newts. *Conservation Biology* **15**, 239-248
- Jordana J, Alexandrino P, Beja-Pereira A, Bessa I, Canon J, Carretero Y & Dunner S (2003) Genetic structure of eighteen local South European beef cattle breeds by comparative F-statistics analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **120**, 73-87
- Knopp T & Merilä J (2009) Microsatellite variation and population structure of the moor frog (*Rana arvalis*) in scandinavia. *Molecular Ecology* **18**, 2996-3005
- Kuchta SR & Tan AM (2006) Lineage diversification on an evolving landscape: Phylogeography of the California newt, *Taricha torosa* (Caudata: Salamandridae). *Biological Journal of the Linnean Society* **89**, 213-239
- Levins R (1969) Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomology Society of America* **71**, 237-240
- Mantel NA, & Valand RS (1970) A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics* **26**, 547-558
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L & Estoup A (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* **95**, 536–539
- Pritchard JK, Stephens P, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959

- Ray N, Lehmann A & Joly P (2002) Modeling spatial distribution of amphibians populations: a GIS approach based on habitat matrix permeability. *Biodiversity and Conservation* **11**, 2143-2165
- Ronce O (2007) How Does It Feel to Be like a Rolling Stone? Ten Questions about Dispersal Evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**, 231–253.
- Rowe G, Beebee TJC & Burke T (2000) A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, metapopulations. *Oikos* **88**, 641-651
- Sambrook J & Russell D (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
- Smith M & Green D (2005) Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: Are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* **28**, 110–128
- Tallmon DA, Funk WC, Dunlap WW & Allendorf FW (2000) Genetic differentiation among long-toed Salamander (*Ambystoma macrodactylum*) populations. *Copeia* 27-35
- Vos CC, Antonisse-De Jong AG, Goedhart PW & Smulders MJM (2001) Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity* **86**, 598-608
- Weir BS & Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358–1370
- Wright S (1969) *The Theory of Gene Frequencies, Evolution and the Genetics of Populations*, Vol 2. University of Chicago Press: Chicago
- Zamudio KR & Wiczorek AM (2007) Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. *Molecular Ecology* **16**, 257-274