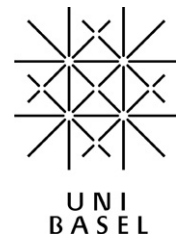


BUFO



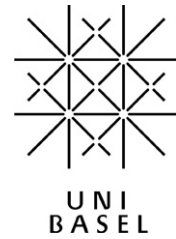
Structuration et diversité génétiques du Triton crêté,
Triturus cristatus, en Alsace.



Jean-Pierre Vacher et Sylvain Ursenbacher

Octobre 2014

BUFO



Structuration et diversité génétiques du Triton crêté, *Triturus cristatus*, en Alsace.

Rapport rédigé par Jean-Pierre Vacher^{1,2,3} et Sylvain Ursenbacher¹.

¹Institut für Natur- Landschafts- und Umweltschutz (NLU), St. Johannis-Vorstadt 10, 4056 Basel, Suisse. *s.ursenbacher@unibas.ch*

²BUFO, association pour l'étude et la protection des Amphibiens et Reptiles d'Alsace, 8 rue Adèle Riton, 67000 Strasbourg.

³(Adresse actuelle) Laboratoire Évolution et Diversité Biologique, Bât. 4R1 Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9. *jpvacher@gmail.com*

Octobre 2014

Avant-propos

Le présent travail a été confié à l'association BUFO par la DREAL Alsace.

Une autorisation de capture a été délivrée à Jean-Pierre Vacher et à Victoria Michel (BUFO) par les préfetures des deux départements couverts.

Nous tenons à remercier pour leur aide sur le terrain (par ordre alphabétique) : Marion Bailleul, Ianis Bouteloup, Aimeric Eble, Alain Fizesan, Fanny Gosselin, Camille Hellio, Julie Lambrey, Victoria Michel, Julie Reynaud et Jacques Thiriet.

Nous remercions également Valerie Zwahlen (NLU) pour son aide précieuse lors de la phase de travail de laboratoire.

Table des matières

1	Introduction	5
2	Matériel et méthodes	7
2.1	Aire d'étude	7
2.2	Échantillonnage sur le terrain et récolte d'ADN	8
2.3	Analyses génétiques	9
2.4	Analyses statistiques	9
2.4.1	Détection des allèles nuls et déséquilibre génotypique	9
2.4.2	F-statistiques	10
2.4.3	Structuration des populations	10
3	Résultats	12
3.1	Détection des allèles nuls et déséquilibre génotypique	12
3.2	Variation et diversité génétiques	12
3.3	Structuration des populations	13
4	Discussion	15
5	Conclusion	19
	Bibliographie	21

Chapitre 1

Introduction

Du fait de leur biologie particulière et d'exigences écologiques strictes, les amphibiens sont particulièrement sensibles aux diverses pressions qui pèsent actuellement sur la biodiversité. En l'état actuel des connaissances, ils représentent le groupe de vertébrés le plus menacé à l'échelle de la planète (Stuart *et al.*, 2008). En Europe, 85 espèces sont actuellement recensées, dont 64 sont endémiques, soit un taux d'endémisme de 75.3 % (Temple et Cox, 2009). La Liste rouge des amphibiens d'Europe indique que 19 espèces sont menacées, soit 22.9 %, dont toutes sont endémiques (Temple et Cox, 2009). Bien que ce nombre soit inférieur à la moyenne mondiale (qui est de l'ordre de 35 % d'espèces menacées), il n'en demeure pas moins préoccupant car les principales causes de déclin de nos espèces sont d'origine humaine, avec en premier lieu la destruction des habitats naturels et la pollution (Temple et Cox, 2009). En France, la Liste rouge nationale publiée en 2009 indique qu'une espèce d'amphibien sur cinq est menacée (Comité français de l'UICN, 2009).

Le Triton crêté, *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768), est un amphibien de la famille des Salamandridae réparti dans la moitié nord de l'Europe, depuis l'ouest de la France jusqu'à l'est de la Russie (Jehle *et al.*, 2011). Il fait partie d'un complexe d'espèces qui en comprend actuellement six (Jehle *et al.*, 2011; Wielstra *et al.*, 2010; Wielstra et Arntzen, 2011; Wielstra *et al.*, 2013), et au moins une lignée divergente au sein de *Triturus karelinii* qui pourrait constituer une septième espèce distincte (Wielstra et Arntzen, 2011). *Triturus cristatus* est l'espèce qui a la plus vaste distribution au sein de ce complexe (Jehle *et al.*, 2011; Wielstra *et al.*, 2010). En France, il est présent dans les deux tiers nord du pays, avec quelques populations méridionales très isolées en Languedoc-Roussillon et Provence-Alpes-Côte d'Azur (Lescure et de Massary, 2012). Il a été classé dans la catégorie « Préoccupation mineure » (LC) dans la Liste rouge nationale (Comité

français de l’UICN, 2009), du fait de sa répartition encore assez vaste sur l’ensemble du territoire français. En Alsace, le Triton crêté est répandu le long de la bande rhénane ainsi que dans le Sundgau (Thiriet et Vacher, 2010). Il est également présent çà et là dans la plaine, notamment aux abords de la forêt de la Harth et dans le ried Centre Alsace. Il est par contre quasi absent du massif de Haguenau, et ne se rencontre pas dans les Vosges. Il est présent dans quelques stations du piémont, mais ne se rencontre pas au delà de 300 m d’altitude (Thiriet et Vacher, 2010).

Le Triton crêté est inscrit à l’annexe II de la Directive « Habitats-Faune-Flore ». Ainsi, il est mentionné dans les Documents d’Objectifs (DOCOB) de sept sites Natura 2000 dans lesquels il a été inventorié en Alsace (tab. 1.1). Dans ce cadre, sa prise en compte est nécessaire au sein des actions proposées dans le DOCOB. Cependant, peu d’informations sont disponibles sur l’état de conservation des populations, ce qui rend difficile l’appréciation de leurs besoins lors des diagnostics écologiques et de la rédaction des recommandations de gestion des sites naturels. Ainsi, l’association BUFO a mis en place une étude génétique et écologique à l’échelle régionale.

Code	Nom du site	Département
FR4201797	Secteur alluvial Rhin-Ried-Bruch, Bas-Rhin	67
FR4201797	La Lauter	67
FR4201798	Massif forestier de Haguenau	67
FR4201810	Vallée de la Doller	68
FR4201811	Sundgau région des étangs	68
FR4201813	Hardt nord	68
FR4202000	Secteur alluvial Rhin-Ried-Bruch, Haut-Rhin	68

TABLE 1.1 – Liste des sites Natura 2000 en Zone spéciale de conservation (ZSC) d’Alsace où le Triton crêté est mentionné dans le formulaire standard de données du DOCOB.

Le présent rapport s’attache à rapporter les résultats du volet génétique, dont l’objectif est de définir d’une part la diversité génétique des populations de Triton crêté en Alsace, et d’autre part d’évaluer les ruptures de connexion entre les populations par le biais du flux de gènes. Pour répondre à ces questionnements, nous avons utilisé des marqueurs microsatellites de l’ADN nucléaire de sept populations réparties le long de la bande rhénane, sur le piémont et en lisière de la forêt de la Harth.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1 Aire d'étude

Les échantillons d'ADN ont été récoltés en 2013 et 2014 dans sept localités d'Alsace (tab. 2.1, fig. 2.1). Les distances entre les sites varient de 3.8 km à 106.5 km (tab. 3).

Population	Dpt.	Localisation	Longitude	Latitude	n
1	67	Forêt de la Robertsau	7.81587	48.61589	27
2	67	RNN de l'île du Rohrschollen	7.79566	48.51633	29
3	67	site CSA du Heyssel	7.757154	48.498139	23
4	68	site CSA de Bergheim	7.362174	48.191698	23
5	68	Baltzenheim	7.57036	48.09117	24
6	68	Île du Rhin à Geiswasser	7.60891	47.99243	23
7	68	Dietwiller	7.436192	47.698286	18

TABLE 2.1 – Liste des sites échantillonnés en Alsace en 2013 et 2014 et nombre d'échantillons (n) récoltés par site. Les coordonnées géographiques sont en degrés décimaux WGS 84.

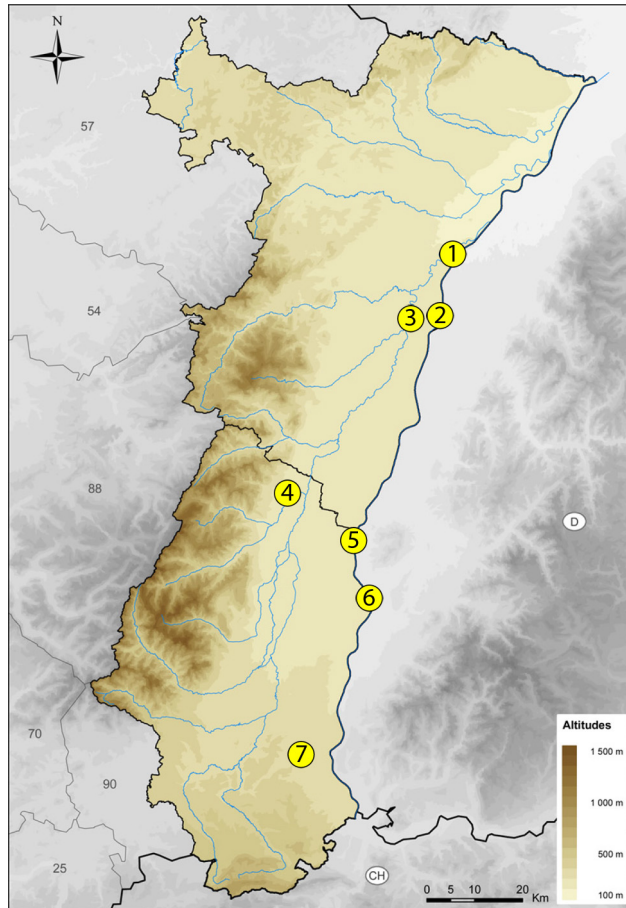


FIGURE 2.1 – Répartition des localités échantillonnées pour le Triton crête en 2013 et 2014. Les numéros correspondent à ceux reportés dans le tableau 2.1.

2.2 Échantillonnage sur le terrain et récolte d'ADN

La récolte de l'ADN a été réalisée directement sur le terrain en prélevant de la salive et des cellules épithéliales de la bouche à l'aide d'écouvillons en coton (fig. 2.2). Durant cette opération, la manipulation de l'animal ne prend que quelques secondes. Cette technique, peu invasive, se révèle particulièrement efficace sur les amphibiens (Broquet *et al.*, 2007; Pidancier *et al.*, 2003). Nous avons prélevé l'ADN de 174 Tritons crêtés dans le cadre de ce travail. Les écouvillons sont ensuite stockés au sec, à température constante (réfrigérateur ou congélateur).



FIGURE 2.2 – Manipulation d'un Triton crêté pour le prélèvement d'ADN par frottis buccal à l'aide d'un écouvillon. © Jacques Thiriet

2.3 Analyses génétiques

L'ADN contenu dans chaque échantillon a été extrait au laboratoire du NLU (Université de Bâle) en utilisant le kit QIAGEN DNeasy Blood & Tissue et selon le protocole d'extraction donné par le fournisseur. Certains points du protocole ont été modifiés pour l'extraction de l'ADN contenu dans les écouvillons (temps de digestion allongé à 8 heures, dose et temps de repos du dernier buffer doublés).

Nous avons ensuite amplifié par PCR pour l'ensemble des échantillons récoltés les loci microsatellites suivants : Tcri13, Tcri27, Tcri29, Tcri32, Tcri35, Tcri36, Tcri43 et Tcri46 (Krupa *et al.*, 2002). Nous avons utilisé des primers fluorescents pour marquer les microsatellites. Les produits PCR sont ensuite regroupés en multiplex, puis mélangés à un mix-microsatellite contenant un marqueur de taille (GENESCAN 500 LIZ, Applied Biosystem). Les préparations obtenues sont analysées par un séquenceur automatique (AB3130xl Applied Biosystems) qui reconnaît la fluorescence. Ainsi, la taille des différents allèles de chaque locus microsatellite a pu être lue à l'aide du logiciel PEAK SCANNER v.1.0 (Applied Biosystem).

2.4 Analyses statistiques

2.4.1 Détection des allèles nuls et déséquilibre génotypique

La présence d'allèles nuls dans chaque population a été contrôlée à l'aide du logiciel MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Le déséquilibre génotypique entre chaque paire

de microsatellites a été estimé à l'aide du logiciel FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 1995).

2.4.2 F-statistiques

Les valeurs d'hétérozygotie attendue (H_E), la richesse allélique (A_R), le coefficient de consanguinité (F_{IS}) et l'indice de fixation (F_{ST}), ont été calculées à l'aide du logiciel FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 1995). De plus, nous avons calculé manuellement la valeur d'hétérozygotie observée (H_O). Nous avons également réalisé une analyse structurale hiérarchique de la diversité génétique (AMOVA) avec le logiciel GenAlEx v.6.5 (Peakall et Smouse, 2006) pour déterminer la variation moléculaire entre les individus, entre les populations et au sein des individus.

2.4.3 Structuration des populations

Nous avons en premier lieu testé l'effet de la distance sur la différenciation génétique (isolement par la distance) des populations de Triton crêté à l'aide d'un test de Mantel (Mantel, 1967) en comparant la valeur de F_{ST} corrigée ($F_{ST}/[1-F_{ST}]$) avec la distance géographique corrigée (\ln) entre chaque paire de populations. Cette transformation fournit une évaluation plus précise du niveau d'isolation par la distance comparativement à la méthode sans correction (Rousset, 1997). Ce test a été réalisé avec le logiciel R v. 2.12.2 (<http://cran.r-project.org/>) en utilisant la fonction `mantel.rtest` du package `ade4` (Thioulouse *et al.*, 1997) et 10 000 répétitions afin de tester la significativité.

De plus, nous avons employé deux approches en clustering basées sur des modèles bayésiens pour inférer la structuration génétique des populations. La première méthode utilise le programme STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000), qui classe les individus en clusters selon leur génotype, sans prendre en compte leur origine géographique. C'est le logiciel standard, couramment utilisé pour ce type d'analyse. Nous avons également utilisé le programme GENELAND v.4.0.3 (Guillot *et al.*, 2005), qui regroupe également les individus en clusters mais qui prend en compte les coordonnées spatiales des individus préalablement à l'analyse. Cette méthode dans le cadre d'une analyse spatialisée offre l'avantage d'une meilleure définition des clusters.

STRUCTURE Nous avons testé la structuration génétique des différentes populations de Triton crêté à l'aide du logiciel STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). L'analyse avec STRUCTURE est basée sur les écarts à l'équilibre d'Hardy-Weinberg pour détecter une éventuelle structuration des populations. Dans notre cas, nous avons présélectionné 1 à 7 clusters différents

($K=1-7$) pour l'analyse. Nous avons réalisé une simulation avec un réplicat de 400 000 MCMC (chaîne de Monte Carlo Markov) après 200 000 itérations de *burn-in* et 10 simulations pour les sept valeurs de K . Nous avons ensuite déterminé le nombre correct de clusters en estimant la probabilité logarithmique des données $[\text{Ln } P(D)]$ pour chaque K et en les confrontant avec la valeur de delta K (Evanno *et al.*, 2005). Cette valeur de delta K est un moyen de déterminer l'inflexion dans la courbe des $[\text{Ln } P(D)]$. Un pic dans la courbe des delta K est alors observé pour le nombre le plus probable de clusters.

GENELAND Pour l'analyse avec GENELAND, nous avons dans un premier temps effectué cinq *runs* indépendant en MCMC avec un nombre de K qui variait de 1 à 7, avec les paramètres suivants : 1 000 000 MCMC itérations, 50 000 de « *thinning* », le taux maximum du processus de Poisson fixé à 100, et l'incertitude des coordonnées géographiques fixée à 0.2 km. Nous avons ensuite effectué 100 *runs* du modèle MCMC avec les mêmes paramètres, mais avec une valeur de K fixée au nombre inféré lors des précédentes simulations. Nous avons sélectionné les dix *runs* avec la plus haute valeur logarithmique moyenne de probabilité postérieure, et nous avons calculé la probabilité postérieure d'appartenance des populations pour chaque pixel du domaine spatial pour chacun des dix *runs* sélectionnés, avec un *burnin* de 10 itérations. Le nombre de pixels a été fixé à 100 pour l'axe des abscisses, et à 350 pour l'axe des ordonnées (proportions approximatives de l'Alsace), afin d'éviter d'avoir deux sites dans le même pixel. Enfin, nous avons calculé la probabilité postérieure d'appartenance de chaque population pour chaque pixel du domaine spatial, et la population modale pour chaque individu.

Suite à ce travail de modélisation, nous avons ensuite effectué les analyses de génétique des populations standard sur la base des populations définies par GENELAND, avec le calcul des F_{ST} et F_{IS} à l'aide de FSTAT v2.9.3.2, et nous avons testé la significativité de la structure inférée à l'aide d'une AMOVA dans GenAIEX v.6.5.

Chapitre 3

Résultats

3.1 Détection des allèles nuls et déséquilibre génotypique

MICRO CHECKER n'a pas indiqué de présence probable d'allèle nuls dans le jeu de données de microsatellites. Cependant, nous avons retiré Tcri43 des analyses, car ce marqueur n'était pas informatif (pas de variation). En effet, tous les individus présentaient la même taille d'allèle et étaient tous homozygotes pour ce marqueur. Ainsi, nous avons donc procédé au reste des analyses avec un jeu de sept microsatellites.

De plus, nous n'avons pas détecté de déséquilibre génotypique entre les paires de microsatellites.

3.2 Variation et diversité génétiques

Le nombre d'allèles varie de 9 (Tcri29 et Tcri35) à 13 (Tcri32) pour les 174 individus analysés (tab. 1 en annexe). La valeur moyenne de richesse allélique A_R est de 6.25 (calculée sur un échantillon de 16 individus diploïdes). Les populations 3 et 4 montrent des valeurs d' A_R plus faibles, respectivement 3.79 et 3.64 (tab. 2). La valeur moyenne d'hétérozygotie attendue H_E est de 0.62, et la valeur moyenne d'hétérozygotie observée H_O est de 0.56. De plus, la valeur moyenne de l'indice de fixation F_{ST} est égale à 0.13 ($p < 0.05$). Les valeurs de F_{ST} par paire dans les sept populations de Triton crêté sont données dans le tableau 3 en annexe. Ces valeurs renseignent sur le taux de différenciation qui existe entre les populations, sachant qu'entre 0 et 5 %, la différenciation est faible, 5 et 15%, elle est modérée, entre 15 et 25 %, elle est marquée, et très marquée au delà de 25 % (Wright, 1978). Enfin, la valeur moyenne du coefficient de consanguinité

F_{IS} est 0.06. L'analyse AMOVA a révélé un pourcentage de variance moléculaire importante au sein des individus (78%, $p < 0.001$), et moyenne entre les populations (12%, $p < 0.001$) et entre les individus (10%, $p < 0.001$).

3.3 Structuration des populations

STRUCTURE L'analyse en clusters réalisée avec STRUCTURE a révélé la présence de trois clusters de populations (fig. 3.1). L'estimation des probabilités logarithmiques des données [$\ln P(D)$] était en effet maximale pour $K = 3$ (fig. 1 en annexe). D'après l'histogramme présenté en fig. 3.1, les populations 3 et 4 représentent deux clusters distincts.

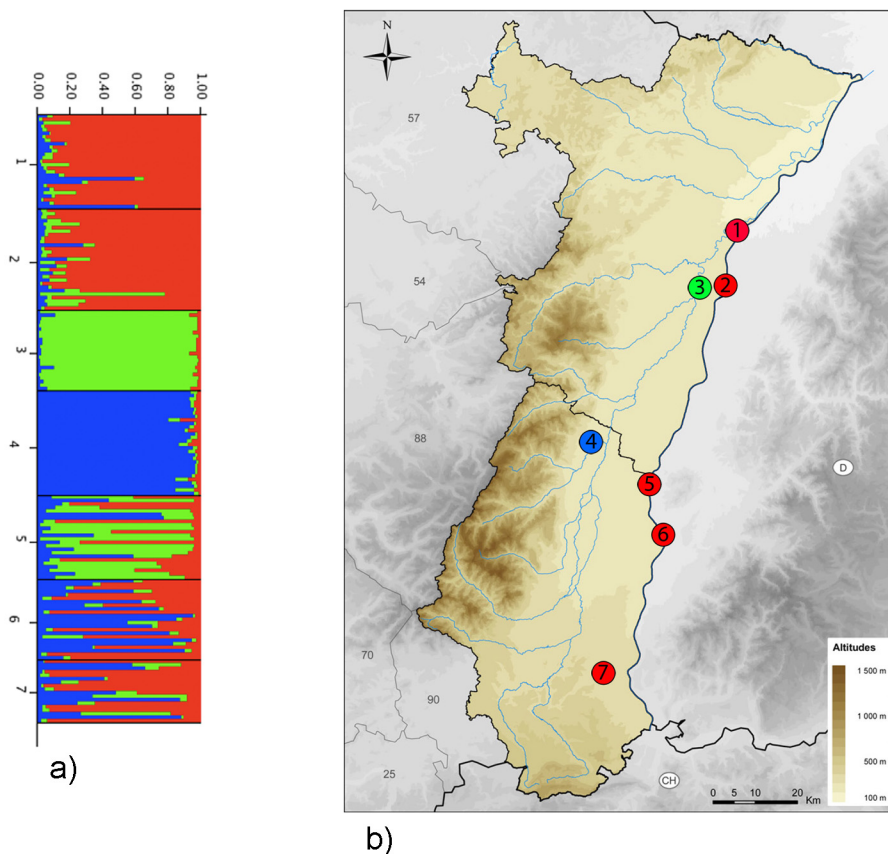


FIGURE 3.1 – Graphique de sortie de STRUCTURE pour $K = 3$ (a), et représentation cartographique (b) des trois différents clusters de populations de Triton crête identifiées avec STRUCTURE. Les numéros des populations sur le graphique et sur la carte correspondent à ceux reportés dans le tableau 2.1.

Bien que les populations 1 et 2 tendent à se grouper en un cluster différencié sur le graphique de la figure 3.1, la régression linéaire de Mantel n'a pas permis de détecter d'effet de la distance sur l'isolation génétique des populations.

GENELAND L'analyse réalisée avec GENELAND indique un nombre de cinq clusters au sein des populations étudiées. Le premier cluster regroupe les populations 1 et 2 ($n = 56$), le second cluster correspond à la population 3 ($n = 23$), le troisième cluster à la population 4 ($n = 30$), le quatrième cluster regroupe les populations 5 et 6 ($n = 47$), et le cinquième cluster correspond à la population 7 ($n = 18$) (fig. 3.2). FSTAT n'a pas révélé de déséquilibre génotypique au sein des cinq populations inférées. Les clusters 2 et 3 (Heyssel et Bergheim) sont celles avec les valeurs de F_{ST} les plus hautes, respectivement 0.18 et 0.16. Les clusters 1, 4 et 5 ont des valeurs de F_{ST} de 0.09, 0.11 et 0.12. De plus, la richesse allélique est significativement plus faible au sein de ces deux clusters, respectivement 3.79 et 3.64 (moyenne des cinq populations inférées = 6.25 ; $Kruskal.test = 14.74$, $p=0.005$). Enfin, l'analyse AMOVA indique que la variance moléculaire est principalement expliquée par la différenciation au sein des individus (77 %, $p = 0.001$), mais la différenciation entre les populations explique 11 % de la variance ($p = 0.001$), et entre les individus 12 % de la variance ($p = 0.001$).

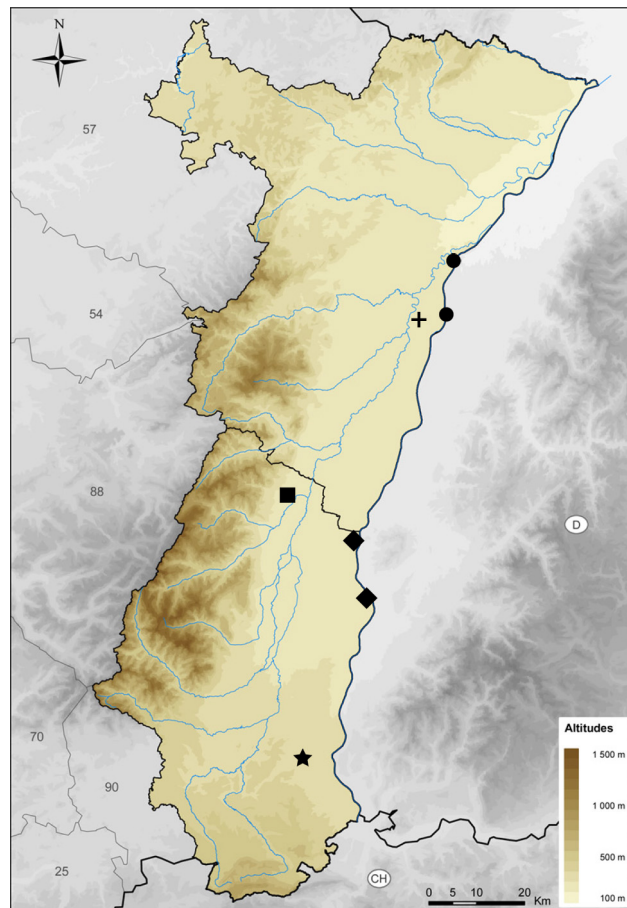


FIGURE 3.2 – Carte de sortie de GENELAND pour $K = 5$. Cercle noir = cluster 1; signe “+” = cluster 2; carré noir = cluster 3; losange noir = cluster 4; étoile noire = cluster 5.

Chapitre 4

Discussion

La diversité génétique observée en Alsace semble en accord avec ce qui a été observé en Saxe-Anhalt (Meyer et Grosse, 2007), sur un secteur situé entre l’Autriche et la Bavière (Maletzky *et al.*, 2010) et dans l’ouest de la France (Jehle *et al.*, 2001), même si notre jeu de données diffère parfois avec certains de ces travaux (nombre de microsatellites différent avec Meyer et Grosse (2007) qui n’en ont utilisé que quatre par exemple), avec une valeur d’hétérozygotie attendue de 0.6 (min. 0.55 ; max. 0.75), et une richesse allélique moyenne de 6.25 (min. 3.64 ; max. 6.58).

Par contre, les populations de Triton crêté en Alsace semblent peu interconnectées. En effet, les valeurs moyennes de F_{ST} pour chaque population sont assez élevées, aux alentours de 10 % (tab. 3). L’indice de fixation F_{ST} donne une indication sur le flux de gènes entre populations, et donc sur la différenciation génétique qui existe entre populations. Rappelons que d’une manière générale chez les vertébrés, des valeurs de F_{ST} comprises entre 5 et 15% indiquent une différenciation modérée, et celles comprises entre 15 et 25 % indiquent une différenciation marquée entre *patches* de populations (Frankham *et al.*, 2007; Wright, 1978). Les valeurs de F_{ST} de la population 3 avoisine 20 %, et celle de la population 4, 15 %, ce qui indique une différenciation génétique marquée pour ces deux populations. Ces valeurs sont d’ailleurs corroborées par l’analyse en clusters, qui montre que ces deux populations forment deux groupes génétiques différenciés du reste des populations échantillonnées. De plus, si on considère que les tailles de population efficaces (N_e) sont comprises entre 10 et 100 dans les populations, et la relation $F_{ST}=1/(4N_e m+1)$, alors on obtient $9 N_e m$ par génération, soit 0.1 à 1 migrant par génération. Ce calcul indique qu’il y a globalement moins d’un migrant par génération entre les différentes populations étudiées.

Par comparaison, et à une échelle plus petite (~ 20 km distance maximum entre populations), les valeurs de F_{ST} sont très variables et atteignent des valeurs importantes sur un site d'étude en Autriche et en Bavière, s'échelonnant de 0.01 et 0.52 % (Maletzky *et al.*, 2010). Notons que dans le cadre de cette étude, les auteurs n'ont pas non plus détecté d'effet d'isolement par la distance des populations de Triton crêté.

L'analyse en clusters indique qu'il existe au moins cinq clusters génétiques au sein des populations de Triton crêté en Alsace. Les valeurs par paire de F_{ST} au sein des cinq clusters sont toutes significatives, ce qui indique qu'il existe une différenciation assez marquée entre les clusters. Les valeurs par paires de F_{ST} entre les clusters 1, 4 et 5 sont 0.06 (1-4), 0.06 (1-5) et 0.09 (4-5). Ces valeurs sont congruentes avec une séparation en cinq clusters, qui sont de surcroît répartis géographiquement selon un axe nord-sud (fig. 3.2).

Tous ces résultats montrent que les populations semblent échanger peu de gènes entre elles. Il serait donc probable que cet isolement génétique ait un effet négatif sur d'autres paramètres, comme par exemple une diversité génétique amoindrie du fait de la dérive, et un taux de consanguinité élevé. Or, nous observons que le taux de consanguinité est faible (pas de F_{IS} significatifs), que l'hétérozygotie attendue et l'hétérozygotie observée sont assez élevées (tab. 2). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que les populations maintiennent des effectifs assez importants, ce qui réduit la dérive génétique. Il est également envisageable que la dynamique des populations soit régie par un fonctionnement en métapopulations, qui ont peu de connexions entre elles, et que nous n'avons pu détecter avec notre jeu de données (voir la conclusion).

Concernant les populations 3 et 4, elles possèdent une diversité génétique (A_R) significativement plus faible (Kruskal = 18.76, $p < 0.01$) par rapport aux autres populations. Ces deux sites semblent les plus déconnectés, et cette faible diversité génétique résulte certainement de cet isolement. Notons tout de même que la richesse allélique A_R a été calculée sur la base de 16 individus (biais dû à l'échantillonnage), et qu'il est probable que la valeur d' A_R aurait été plus forte si elle avait été calculée avec un nombre plus élevé d'individus.

D'après Jehle *et al.* (2011), une population de Triton crêté typique contient entre 20 et 200 individus adultes, avec des variations interannuelles importantes. Une étude menée en parallèle par BUFO (Julie Reynaud, rapport de stage non publié) en 2014 sur la caractérisation de paramètres démographiques de populations de Triton crêté en Alsace indique une estimation de

taille de population de 98 individus sur le site 3, 48 individus sur le site 4 et 31 individus sur le site 7 (la taille des populations n'a pas été estimée sur les autres sites).

Population 3 : site CSA du Heyssel Cette population est très proche de celle du l'île du Rohrschollen (population 2), située à 3.8 km à vol d'oiseau (tab. 3). Le site représente une zone ouverte située en lisière de la forêt du Neuhof et gérée de manière conservatoire, constitué d'un réseau de mares et de prairies de fauche. Il est bordé par une autoroute au sud (mise en service en 2002), et d'un cours d'eau à l'est, le Rhin Tortu. Si l'autoroute constituait un élément fragmentant, qui aurait isolé la population au cours de la dernière décennie, cela signifierait que l'axe de migration principal emprunté par les individus partait vers le sud. Il serait intéressant de continuer les investigations en récoltant des données de populations qui se trouvent à l'intérieur de la forêt du Neuhof au nord, afin de les confronter avec les données obtenues dans le cadre de cette étude pour savoir s'il existe une connexion entre les populations par la forêt. Nous pourrions penser que le Rhin Tortu pourrait constituer un corridor favorable aux déplacements du Triton crêté au sein de cet ensemble. Il est effectivement possible qu'une métapopulation, déconnectée des autres populations de la région, existe dans la forêt du Neuhof, incluant le site du Heyssel, et que nous n'ayons travaillé que sur un échantillon de cette métapopulation. Cette hypothèse nous apparaît probable, car le site du Heyssel et la forêt du Neuhof représenteraient ainsi un ensemble isolé au sud par l'autoroute, à l'ouest et au nord par les agglomérations d'Illkirch-Graffenstaden et Strasbourg, et à l'est par le Rhin canalisé (fig. 4.1).

Population 4 : site CSA de Bergheim Ce site se trouve en bordure du piémont. Il s'agit d'une grande mare localisée dans une petite zone boisée comprenant une série d'étangs. Le site en question est géré de manière conservatoire. Selon l'atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles d'Alsace (Thiriet et Vacher, 2010), peu de populations de Triton crêté se rencontrent sur le piémont ou sur sa marge. Ainsi, ce site pourrait constituer une zone refuge pour une population qui s'est retrouvée isolée des populations du Ried centre-Alsace et de la bande rhénane suite aux divers aménagements et modifications de l'occupation des sols que l'on observe dans ce secteur de l'Alsace. En effet, Bergheim est bordé par un large axe routier orienté nord-sud (autoroute A35/RN83 entre Colmar et Strasbourg), et la zone où se situe la mare est entourée de secteurs d'agriculture intensive (maïs et vignes), ce qui n'est pas favorable aux déplacements des amphibiens (Miaud et Sanuy, 2005). De prime abord, il est peu probable que cette mare fasse partie d'une métapopulation, mais constituerait plutôt un site isolé. Des études complémentaires

seraient à mettre en place pour vérifier cette hypothèse. D'ailleurs, cette population montre les valeurs d'hétérozygotie attendue et de richesse allélique les plus faibles (tab. 2), ce qui pourrait s'expliquer effectivement par son caractère tendant à l'isolement.

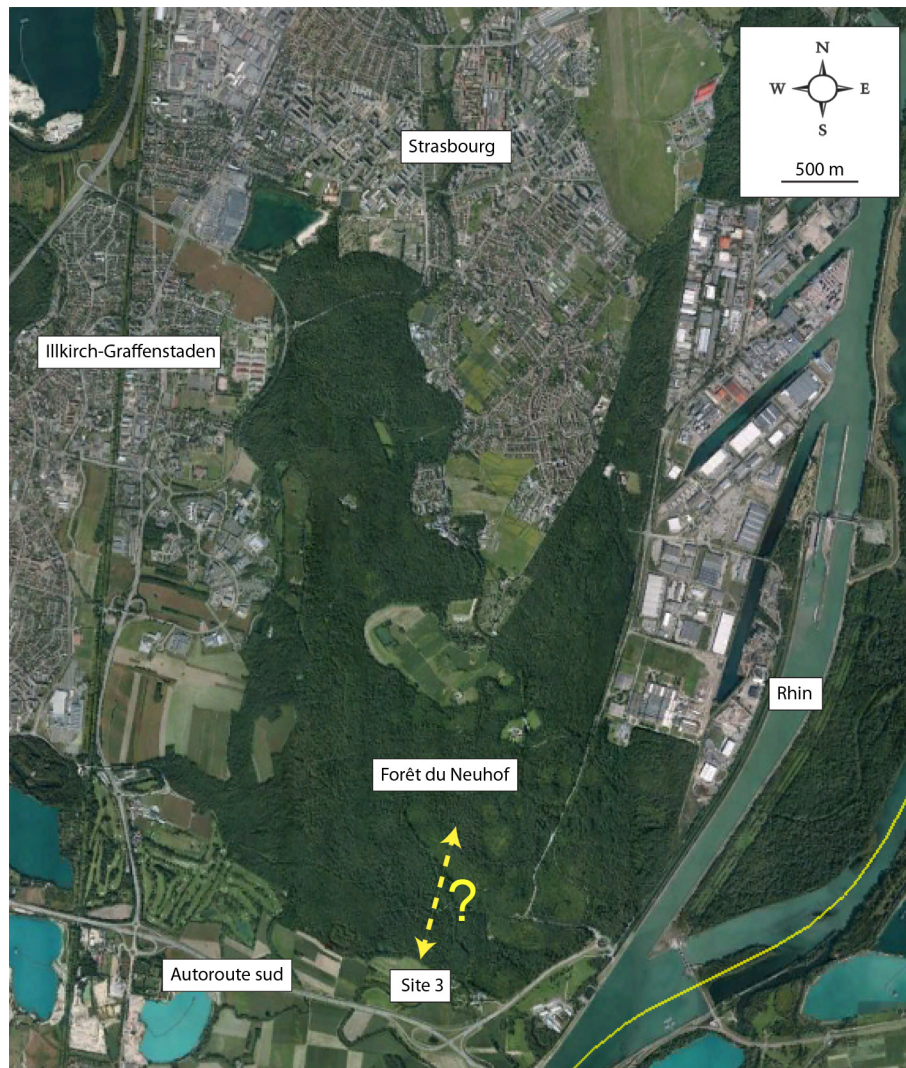


FIGURE 4.1 – Vue satellite de l'ensemble formé par la forêt du Neuhof, avec le site 3 qui la jouxte au sud, et les différents éléments induisant l'isolement de l'ensemble (source Google Earth). La flèche jaune et le ? indiquent les échanges possibles entre une potentielle population située dans la forêt et la population 3.

Chapitre 5

Conclusion

Peu d'études ont montré un fonctionnement en métapopulations chez le Triton crêté (Griffiths et Williams, 2001; Griffiths *et al.*, 2010; Jehle *et al.*, 2005, 2011), avec des sources et des puits, des mouvements migratoires entre ces sous-unités, et des événements asynchrones de colonisation et d'extinction des mares. Pour le Triton crêté, une telle dynamique de population implique une connectivité forte entre les unités populationnelles à faible échelle ($\sim 1\text{km}$). Ce facteur constitue un élément important pour la dynamique des populations de cette espèce. Caractériser un fonctionnement en métapopulations requiert des méthodes assez difficiles à mettre en place sur le terrain. D'une part, il faut travailler à une échelle assez restreinte, de l'ordre de 600 à 1500 m pour le Triton crêté (Jehle *et al.*, 2011). De plus, pour estimer le taux de migration, l'origine des migrants, le taux d'extinction et de colonisation des sites, et l'identification des sites sources et des puits, il convient d'utiliser des méthodes d'analyse basées sur la capture-recapture (Griffiths *et al.*, 2010) et la génétique des populations (Jehle *et al.*, 2005). Enfin, ces données peuvent être utilisées pertinemment dans le cadre d'opérations de conservation de l'espèce si elles sont confrontées à des données géographiques d'occupation du sol *via* une analyse basée sur l'utilisation d'un système d'information géographique. Notre étude se situe à une échelle trop grande pour une analyse de métapopulation. Comme nous n'avons pas intégré un réseau de sites assez proches les uns des autres ($<1500\text{m}$), nous n'avons pu déceler un quelconque fonctionnement en métapopulations. Cependant, nos résultats montrent un flux de gènes globalement réduit, parfois même entre des populations qui sont distantes de moins de 10 kilomètres, mais avec une diversité génétique globalement bonne. Il est ainsi probable que les populations fonctionnent en métapopulations, notamment dans les forêts du Rhin qui comportent beaucoup de pièces d'eau temporaires, lesquelles sont utilisées par les tritons durant la phase de reproduction. Afin

de compléter les données contenues dans le présent rapport, il serait intéressant de mettre en place dans les années à venir une étude de caractérisation des métapopulations du Triton crêté en Alsace. Elle serait notamment un préalable adéquat à la mise en place d'un programme de « Trame Verte et Bleue » par exemple, ou encore pourrait être intégrée dans le plan de gestion des réserves naturelles nationales rhénanes qui abritent l'espèce afin de caractériser la fonctionnalité des différentes mares et bras morts pour la dynamique des populations.

Deux cas particuliers posent tout de même question, il s'agit du site de Bergheim, situé quasiment sur le piémont, et surtout celui du Heysel, au sud de Strasbourg. Ce dernier apparaît totalement déconnecté du reste des sites, malgré une situation géographique favorable en lisière de forêt. Une attention particulière devra être portée à ce site en termes de connections avec d'autres habitats, notamment au sein de la forêt du Neuhof qui le borde au nord. Malgré la présence d'une autoroute au sud, nous n'avons actuellement pas identifié d'éléments qui pourraient aggraver l'isolement de cette population par rapport aux autres populations étudiées le long du Rhin. Il serait notamment intéressant d'inscrire ce site comme prioritaire pour l'espèce dans le schéma régional de « Trame Verte et Bleue ». Notons que les actions de conservation actuellement en cours sur le site (gestion par le Conservatoire des sites alsaciens, chantiers bénévoles en hiver pour maintenir les zones humides en eau, intégration au plan de gestion de la Réserve naturelle régionale du Neuhof) sont favorables à la persistance de cette population. Quant au site de Bergheim, il est isolé sur le plan génétique et aussi sur le plan géographique. Comme les rares populations de Triton crêté qui sont encore présentes sur le piémont ou sur ses marges se trouvent actuellement isolées les unes des autres, il serait également intéressant de les prendre en compte dans le schéma de « Trame Verte et Bleue », mais en y intégrant un axe nord-sud, ce qui n'est pas le cas actuellement (connexions envisagées d'ouest en est). L'aménagement de mares relais et interconnectées entre les sites actuellement connus pourrait être expérimenté à moyen terme. La mise en place d'un tel réseau d'habitats humides le long du piémont serait un projet novateur et le Triton crêté pourrait constituer l'une des espèces indicatrices.

Bibliographie

- BROQUET, T., BERSET-BRAENDLI, L., EMARESI, G. et FUMAGALLI, L. (2007). Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics*, 8(2):509–511.
- COMITÉ FRANÇAIS DE L’UICN (2009). La liste rouge des espèces menacées en France. Reptiles et Amphibiens de France métropolitaine. 8 p.
- EVANNO, G., REGNAUT, S. et GOUDET, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure : a simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611–2620.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J. D. et BRISCOE, D. (2007). *A primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press. 220 p.
- GOUDET, J. (1995). Fstat version 1.2 : a computer program to calculate fstatistics. *Journal of Heredity*, 86(6):485–486.
- GRIFFITHS, R. A., SEWELL, D. et MCCREA, R. (2010). Dynamics of a declining amphibian metapopulation : Survival, dispersal and the impact of climate. *Biological Conservation*, 143:485–491.
- GRIFFITHS, R. A. et WILLIAMS, C. (2001). Population modelling of Great Crested Newts (*Triturus cristatus*). *Rana*, 4:239–247.
- GUILLOT, G., MORTIER, F. et ESTOUP, A. (2005). Geneland : a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5(3):712–715.
- JEHLE, R., ARNTZEN, J., BURKE, T., KRUPA, A. et HÖDL, W. (2001). The annual number of breeding adults and the effective population size of syntopic newts (*Triturus cristatus*, *Triturus marmoratus*). *Molecular Ecology*, 10:839–850.
- JEHLE, R., THIESMEIER, B. et FOSTER, J. (2011). *The Crested Newt*. Laurenti Verlag, Bielefeld.
- JEHLE, R., WILSON, G., ARNTZEN, J. et BURKE, T. (2005). Contemporary gene flow and the spatio-temporal genetic structure of subdivided newt populations (*Triturus cristatus*, *Triturus marmoratus*). *Journal of Evolutionary Biology*, 18(3):619–628.
- KRUPA, A., JEHL, R., DAWSON, D., GENTLE, L., GIBBS, M., ARNTZEN, J. et BURKE, T. (2002). Microsatellite loci in the crested newt (*Triturus cristatus*) and their utility in other newt taxa. *Conservation Genetics*, 3:87–89.

- LESCURE, J. et de MASSARY, J. (2012). *Atlas des Amphibiens et Reptiles de France*. Biotope, Mèze/MNHN, Paris.
- MALETZKY, A., KAISER, R. et MIKULICEK, P. (2010). Conservation genetics of crested newt species *Triturus cristatus* and *Triturus carnifex* within a contact zone in central europe : Impact of interspecific introgression and gene flow. *Diversity*, 2:28–46.
- MANTEL, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209–220.
- MEYER, S. et GROSSE, W.-R. (2007). Populationgröße, Altersstruktur und genetische Diversität einer Metapopulation der Kammolches (*Triturus cristatus*) in der Kulturlandschaft Sachsen-Anhalts. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 14:9–24.
- MIAUD, C. et SANUY, D. (2005). Terrestrial habitat preferences of the natterjack toad during and after the breeding season in a landscape of intensive agricultural activity. *Amphibia-Reptilia*, 26(3):359–366.
- PEAKALL, R. et SMOUSE, P. (2006). Genalex 6 : genetic analysis in excel. population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6:288–295.
- PIDANCIER, N., MIQUEL, C. et MIAUD, C. (2003). Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for dna analysis in amphibians. *Herpetological Journal*, 13:175–178.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. et DONNELLY, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945–959.
- ROUSSET, F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow F -statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145:1219–1228.
- STUART, S., HOFFMANN, M., CHANSON, J., COX, N., BERRIDGE, R., RAMANI, P. et YOUNG, B. (2008). *Threatened Amphibians of the World*. Lynx Edicions ; IUCN ; Conservation International. 758 p.
- TEMPLE, H. J. et COX, N. A. (2009). European Red List of Amphibians. Rapport technique, Luxembourg : Office for Official Publications of the European Communities. 32 p.
- THIOULOUSE, J., CHESSEL, D., DOLÉDEC, S. et OLIVIER, J.-M. (1997). Ade-4 : a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*, 7:75–83.
- THIRIET, J. et VACHER, J.-P. (2010). *Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles d'Alsace*. BUFO, Colmar/Strasbourg. 273 p.
- VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W., WILLS, D. et SHIPLEY, P. (2004). Micro-checker : software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4:535–538.
- WIELSTRA, B. et ARNTZEN, J. (2011). Unraveling the rapid radiation of crested newts (*Triturus cristatus* super-species) using complete mitogenomic sequences. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1):162.

- WIELSTRA, B., LITVINCHUK, S., NAUMOV, B., TZANKOV, N. et ARNTZEN, J. W. (2013). A revised taxonomy of crested newts in the *Triturus karelinii* group (Amphibia : Caudata : Salamandridae), with the description of a new species. *Zootaxa*, 3682(3):441–453.
- WIELSTRA, B., THEMUDO, G. E., GÜÇLÜ, O., OLGUN, K., POYARKOV, N. A. et ARNTZEN, J. W. (2010). Cryptic crested newt diversity at the Eurasian transition : The mitochondrial DNA phylogeography of Near Eastern *Triturus* newts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(3):888–896.
- WRIGHT, S. (1978). *Evolution and the Genetics of Populations : Variability Within and Among Natural Populations*, 4th Edition. University of Chicago Press, Chicago.

Table des figures

2.1	Répartition des localités échantillonnées pour le Triton crêté en 2013 et 2014. Les numéros correspondent à ceux reportés dans le tableau 2.1.	8
2.2	Manipulation d'un Triton crêté pour le prélèvement d'ADN par frottis buccal à l'aide d'un écouvillon. © Jacques Thiriet	9
3.1	Graphique de sortie de STRUCTURE pour $K = 3$ (a), et représentation cartographique (b) des trois différents clusters de populations de Triton crêté identifiées avec STRUCTURE. Les numéros des populations sur le graphique et sur la carte correspondent à ceux reportés dans le tableau 2.1.	13
3.2	Carte de sortie de GENELAND pour $K = 5$. Cercle noir = cluster 1 ; signe "+" = cluster 2 ; carré noir = cluster 3 ; losange noir = cluster 4 ; étoile noire = cluster 5.	14
4.1	Vue satellite de l'ensemble formé par la forêt du Neuhof, avec le site 3 qui la jouxte au sud, et les différents éléments induisant l'isolement de l'ensemble (source Google Earth). La flèche jaune et le ? indiquent les échanges possibles entre une potentielle population située dans la forêt et la population 3.	18
1	Probabilité logarithmique des données $[\ln P(D)]$ obtenues à partir du programme STRUCTURE v.2.3.3 pour le jeu de données contenant sept microsattellites sur dix simulations pour chaque K . Les cercles clairs correspondent à la moyenne des $[\ln P(D)]$, les barres noires correspondent aux valeurs maximales et minimales des $[\ln P(D)]$, et la ligne en pointillés correspond aux valeurs de delta K	27

Couverture : Mâle de Triton crêté, *Triturus cristatus*, dans une mare de la Réserve naturelle nationale de l'Île de Rhinau (67), le 14 mai 2013 © Jean-Pierre Vacher

Liste des tableaux

1.1	Liste des sites Natura 2000 en Zone spéciale de conservation (ZSC) d'Alsace où le Triton crêté est mentionné dans le formulaire standard de données du DOCOB.	6
2.1	Liste des sites échantillonnés en Alsace en 2013 et 2014 et nombre d'échantillons (n) récoltés par site. Les coordonnées géographiques sont en degrés décimaux WGS 84.	7
1	Loci microsatellites utilisés pour <i>Triturus cristatus</i> en Alsace avec les niveaux de variabilité des microsatellites basés sur 174 individus et estimés avec FSTAT v.2.9.3.2. Les valeurs marquées d'un * sont significatives ($p < 0.005$).	26
2	Diversité génétique observée dans les sept populations de <i>Triturus cristatus</i> en Alsace, étudiée à partir de sept marqueurs microsatellites. Les valeurs ont été calculées avec FSTAT v.2.9.3.2. n =nombre d'individus; H_O =hétérozygotie observée; H_E =hétérozygotie attendue; A_R =richesse allélique; F_{IS} =coefficient de consanguinité; F_{ST} =indice de fixation. La richesse allélique (A_R) est calculée sur la base de 16 individus diploïdes.	26
3	Estimations par paire des F_{ST} dans sept populations de <i>Triturus cristatus</i> en Alsace pour sept loci microsatellites calculées avec FSTAT v.2.9.3.2. et distances (km) entre les populations. Les valeurs dans la partie inférieure correspondent aux F_{ST} et sont toutes significatives ($p < 0.05$). Les valeurs dans la partie supérieure correspondent aux distances entre les sites (km).	27

Annexes

Microsatellite	Taille (bp)	Nombre d'allèles	H_O	H_E	F_{IS}	F_{ST}
Tcri13	122-138	11	0.4	0.4	-0.043	0.109*
Tcri27	249-285	11	0.69	0.74	0.049	0.126*
Tcri29	292-336	9	0.59	0.64	0.026	0.094*
Tcri32	431-467	13	0.66	0.69	0.035	0.118*
Tcri35	206-238	9	0.55	0.58	-0.009*	0.159*
Tcri36	242-326	11	0.56	0.72	0.149*	0.144*
Tcri46	268-304	11	0.5	0.73	0.186*	0.155*

TABLE 1 – Loci microsatellites utilisés pour *Triturus cristatus* en Alsace avec les niveaux de variabilité des microsatellites basés sur 174 individus et estimés avec FSTAT v.2.9.3.2. Les valeurs marquées d'un * sont significatives ($p < 0.005$).

Population	n	H_O	H_E	A_R	F_{IS}	F_{ST}
1	27	0.682	0.758	6.584	0.1	0.09*
2	29	0.655	0.687	5.065	0.026	0.104*
3	23	0.546	0.605	3.79	-0.014	0.182*
4	30	0.495	0.543	3.642	0.055	0.166*
5	24	0.482	0.558	4.38	0.105	0.129*
6	23	0.534	0.573	4.299	0.077	0.117*
7	18	0.579	0.663	5.551	0.089	0.117*

TABLE 2 – Diversité génétique observée dans les sept populations de *Triturus cristatus* en Alsace, étudiée à partir de sept marqueurs microsatellites. Les valeurs ont été calculées avec FSTAT v.2.9.3.2. n=nombre d'individus; H_O =hétérozygotie observée; H_E =hétérozygotie attendue; A_R =richesse allélique; F_{IS} =coefficient de consanguinité; F_{ST} =indice de fixation. La richesse allélique (A_R) est calculée sur la base de 16 individus diploïdes.

Population	1	2	3	4	5	6	7
1 (n=27)	-	11.5	14.5	58.5	61.6	71.7	106.5
2 (n=29)	0.0468	-	3.8	48.6	50	60	95
3 (n=23)	0.1358	0.1414	-	44.8	47	57.2	92
4 (n=30)	0.1266	0.1646	0.2391	-	19.1	28.8	55.1
5 (n=24)	0.0894	0.1035	0.174	0.2089	-	11.3	44.9
6 (n=23)	0.0856	0.0912	0.2117	0.1262	0.0844	-	35.2
7 (n=18)	0.0699	0.0819	0.1334	0.1193	0.1193	0.1052	-

TABLE 3 – Estimations par paire des F_{ST} dans sept populations de *Triturus cristatus* en Alsace pour sept loci microsatellites calculées avec FSTAT v.2.9.3.2. et distances (km) entre les populations. Les valeurs dans la partie inférieure correspondent aux F_{ST} et sont toutes significatives ($p < 0.05$). Les valeurs dans la partie supérieure correspondent aux distances entre les sites (km).

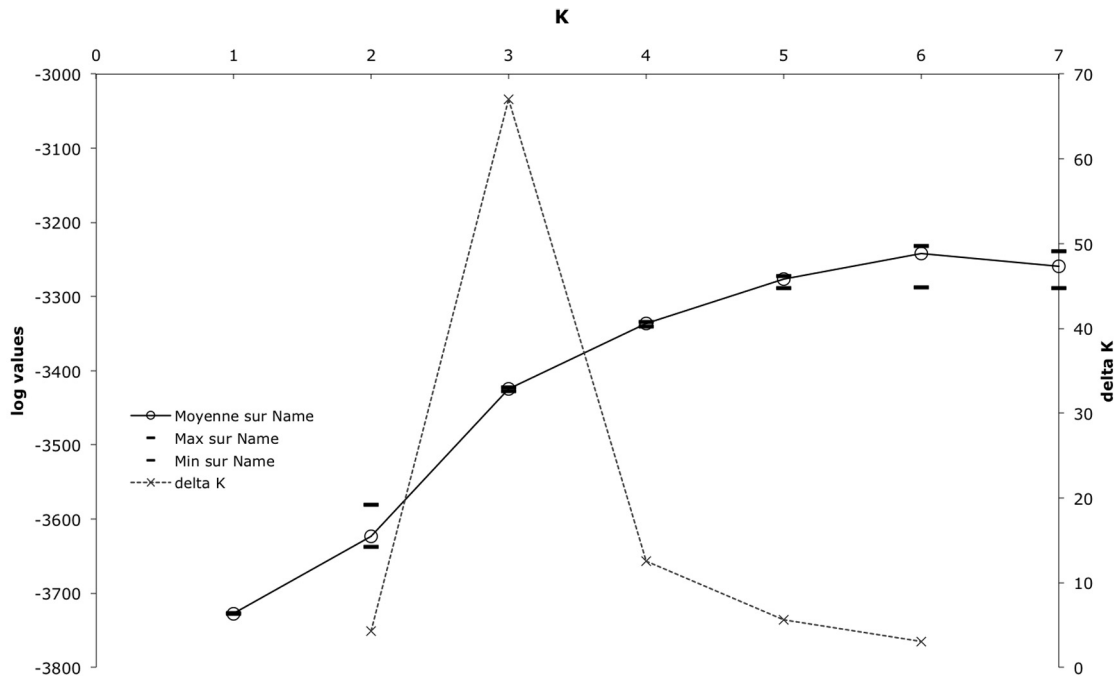


FIGURE 1 – Probabilité logarithmique des données $[\text{Ln } P(D)]$ obtenues à partir du programme STRUCTURE v.2.3.3 pour le jeu de données contenant sept microsatellites sur dix simulations pour chaque K. Les cercles clairs correspondent à la moyenne des $[\text{Ln } P(D)]$, les barres noires correspondent aux valeurs maximales et minimales des $[\text{Ln } P(D)]$, et la ligne en pointillés correspond aux valeurs de delta K.