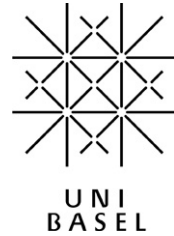


BUFO

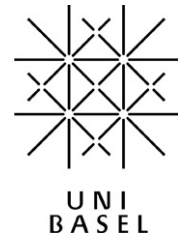


Structuration et caractérisation génétiques des
populations de Sonneur à ventre jaune *Bombina
variegata* en Alsace.



Jean-Pierre Vacher et Sylvain Ursenbacher

Janvier 2014



Structuration et caractérisation génétiques des populations de sonneur à ventre jaune *Bombina variegata* 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

Avant-propos

Ce rapport a été rédigé dans le cadre de la mise en application de la fiche n°2 du Plan régional d'actions en faveur du Sonneur à ventre jaune. 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 par les préfectures des deux départements couverts.

Nous tenons à remercier pour leur aide sur le terrain (par ordre alphabétique) : Gaël Fellet, Anne Ganet, Fanny Gosselin, Priscilla Illy, Julie Lambrey, Victoria Michel et Alexandre Wilhelm.

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	10
2.4.1	Détection des allèles nuls	10
2.4.2	F-statistiques	10
2.4.3	Structuration des populations	10
2.4.4	Effet « <i>bottleneck</i> »	11
3	Résultats	12
3.1	Détection des allèles nuls	12
3.2	Variation et diversité génétiques	12
3.3	Structuration des populations	13
3.3.1	Analyse en clusters	13
3.3.2	Isolement par la distance	13
3.4	Effet « <i>bottleneck</i> »	13
4	Discussion	15
4.1	Populations isolées en Alsace	16
4.1.1	Kesseldorf	16
4.1.2	Saint-Nabor	16
4.2	Comparaison avec d'autres populations	17
5	Conclusion	18
	Conclusion	19
	Bibliographie	20

Chapitre 1

Introduction

Du fait de leur biologie particulière et d'exigences écologiques strictes, les amphibiens sont particulièrement sensibles aux diverses pressions qui pèsent 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). Suite à ce constat, le Ministère en charge des questions relatives à la biodiversité a intégré trois espèces d'amphibiens dans le programme de Plans nationaux d'actions, parmi lesquelles se trouve le Sonneur à ventre jaune.

Le Sonneur à ventre jaune est un amphibien de la famille des Bombinatoridae endémique d'Europe, où il se rencontre dans une grande moitié ouest. En France, où elle atteint sa limite ouest, l'espèce a connu une nette régression au cours du XXème siècle (Lescure *et al.*, 2011). Actuellement, il est présent dans la plupart des régions de l'est et du centre : Alsace, Bourgogne, Centre, Champagne-Ardenne, Île-de-France, Limousin, Lorraine, Rhône-Alpes. Il atteint sa limite occidentale de distribution dans les régions Aquitaine, Midi-Pyrénées, Normandie et Poitou-Charentes. En Alsace, le Sonneur à ventre jaune est assez répandu, mais possède une distribution en « *patches* » (Thiriet et Vacher, 2010). Il est en effet présent dans la plupart des

grands massifs forestiers de plaine, et ne se rencontre pas au delà de 500 m d'altitude. Il est ainsi absent du massif des Vosges, exceptées certaines stations du piémont.

Suite à la diffusion du Plan national d'actions en faveur du Sonneur à ventre jaune, un Plan régional d'actions a été mis en place en Alsace sous l'égide de la DREAL Alsace. Ce plan a été rédigé et validé en 2012 (Vacher, 2013). Dans le cadre de sa mise en application, une étude sur la caractérisation génétique des populations de Sonneur à ventre jaune a été menée en 2013, dont les objectifs étaient multiples. Il s'agissait d'une part de définir génétiquement les populations, de caractériser leur diversité génétique, et enfin de vérifier s'il existait des ruptures de connexion entre les populations. Les résultats exposés dans le présent rapport ont permis de dresser l'état de conservation de l'espèce dans la région, et d'identifier les priorités d'actions à mettre en place en termes de gestion conservatoire des populations et des sites.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1 Aire d'étude

Nous avons récolté des échantillons d'ADN dans dix localités réparties sur l'ensemble de la région (tab. 2.1, fig. 2.1).

Population	Dpt.	Localisation	Longitude	Latitude	N
1	67	Epfig	7.47915	48.32227	30
2	67	Rhinau-Réserve naturelle	7.68352	48.29720	30
3	67	Beinheim	8.08455	48.84318	30
4	68	Baltzenheim	7.56705	48.08897	30
5	67	Sélestat-Illwald	7.46824	48.23220	30
6	67	Mackenheim	7.62074	48.18065	30
7	67	Kesseldorf	8.05637	48.88934	30
8	67	Haguenau-Grundel	7.77181	48.87257	30
9	68	Emlingen	7.288884	47.628508	30
10	67	Saint-Nabor	7.41462	48.44597	20

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

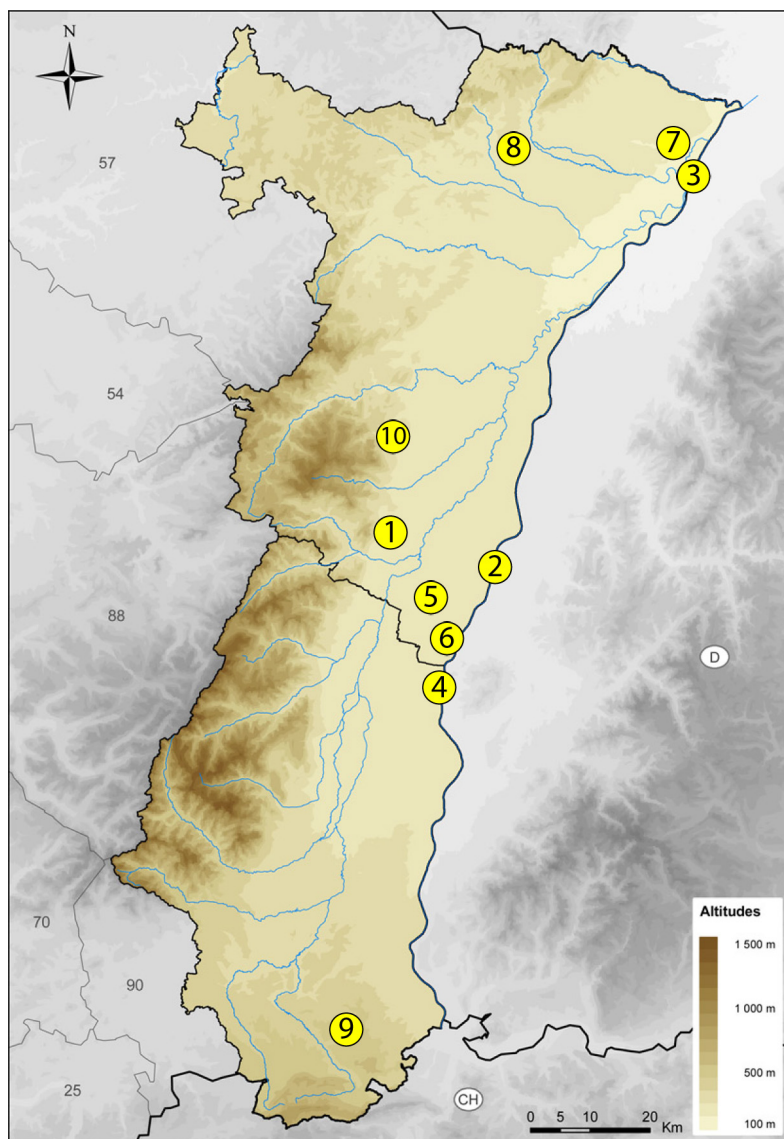


FIGURE 2.1 – Répartition des localités échantillonnées pour le Sonneur à ventre jaune en 2013. Les numéros correspondent à ceux reportés dans le tableau 2.1.

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 30 sonneurs par sites, excepté celui de Saint-Nabor où 20 individus ont été échantillonnés. Au total, l'ADN de 290 Sonneurs à ventre jaune a été récolté 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 Sonneur à ventre jaune pour le prélèvement d'ADN par frottis buccal à l'aide d'un écouvillon. © Jean-Pierre Vacher

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).

Des marqueurs microsatellites ont été développés pour une espèce parente, le Sonneur à ventre de feu, *Bombina bombina*, et certains s'amplifient également pour le Sonneur à ventre jaune (Hauswaldt *et al.*, 2007; Stuckas et Tiedemann, 2006). Ainsi, nous avons amplifié par PCR pour l'ensemble des échantillons récoltés les microsatellites suivants : Bobom9H, Bobom10F, Bobom8A, BobomB13, Bobom5F et BobomF22 (Hauswaldt *et al.*, 2007; Stuckas et Tiedemann, 2006). Suite à des tests préliminaires, nous avons apporté des ajustements aux conditions de PCR de certains microsatellites pour la température et la concentration en MgCl₂. Nous avons utilisé des primers fluorescents pour marquer les microsatellites. Les produits PCR sont ensuite regroupés en multiplexes, 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

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).

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 testé la structuration génétique des différentes populations de Sonneur à ventre jaune à l'aide du logiciel STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). L'analyse se base sur une méthode de *clustering* qui regroupe les individus dans des clusters en fonction de leur génotype. Cette analyse est basée sur les écarts à l'équilibre d'Hardy-Weinberg pour détecter une éventuelle structuration des populations. Elle regroupe les individus sans prendre en compte leur origine dans un nombre prédéfini de clusters. Dans notre cas, nous avons présélectionné de 1 à 10 clusters différents ($K=1-10$). 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 $[\ln P(D)]$ 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 $[\ln P(D)]$. Un pic dans la courbe des delta K est alors observé pour le nombre le plus probable de clusters.

De plus, nous avons testé l'effet de la distance sur la différenciation génétique (isolement par la distance) des populations de Sonneur à ventre jaune 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 couple 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.

2.4.4 Effet « *bottleneck* »

Nous avons testé s'il existait un effet de « *bottleneck* » au sein de la population de sonneur à l'aide du logiciel BOTTLENECK v.1.2.02 (Piry *et al.*, 1999). Un « *bottleneck* » correspond à une importante perte de diversité génétique survenue à la suite d'une forte réduction des effectifs au cours d'un laps de temps pouvant être très long. Un « *bottleneck* » peut par exemple être détecté au sein d'une population créée à partir d'un très faible nombre d'individus ou à la suite d'un événement historique qui a réduit les effectifs à quelques centaines ou dizaines d'individus. Ce signal peut être détecté même si depuis cet événement (qui peut avoir eu lieu il y a quelques générations ou plus anciennement), les effectifs de la population ont considérablement crû. Le logiciel BOTTLENECK calcule l'hétérozygotie attendue à l'équilibre mutation-dérive d'un nombre d'allèles pour un locus donné et un effectif donné en utilisant les modèles de mutation SMM (« *stepwise mutation model* »), TPM (« *two-phase model* ») et IAM (« *infinite allele model* »). Dans le cas d'une analyse utilisant des marqueurs microsatellites, les modèles SMM et TPM sont les plus appropriés (Luikart et Cornuet, 1998). Comme nous avons utilisé moins de 20 loci pour l'analyse, nous avons testé si l'hétérozygotie observée dévie de celle attendue à l'aide d'un test de Wilcoxon avec le logiciel BOTTLENECK.

Chapitre 3

Résultats

3.1 Détection des allèles nuls

MICROCHECKER n'a pas détecté d'allèles nuls dans le jeu de données. Ainsi, nous avons gardé les données de génotypage de l'ensemble des marqueurs pour la suite des analyses.

3.2 Variation et diversité génétiques

Le nombre d'allèles varie de 5 (B13 et F22) à 11 (9H et 10F) pour les 290 individus analysés (tab. 1 en annexe). La valeur moyenne de richesse allélique A_R est de 4.79 (calculée sur un échantillon de 16 individus diploïdes). La valeur moyenne d'hétérozygotie attendue H_E est de 0.51, et la valeur moyenne d'hétérozygotie observée H_O est de 0.57. De plus, la valeur moyenne de l'indice de fixation F_{ST} est égale à 0.13 ($p < 0.001$). Les populations 7 (Kesseldorf) et 10 (Saint-Nabor) montrent des valeurs de richesse allélique plus faibles que l'ensemble des autres populations (tab. 2 en annexe). De plus, la population 10 montre des valeurs d'hétérozygotie attendue et observée bien plus faibles que le reste des populations (tab. 2 en annexe). Les valeurs de F_{ST} par paire dans les dix populations de Sonneur à ventre jaune sont données dans le tableau 3 en annexe. Enfin, la valeur moyenne du coefficient de consanguinité F_{IS} est -0.11 ($p < 0.005$). L'analyse AMOVA a révélé un pourcentage de variance moléculaire très importante au sein des individus (89%), très modérée entre les populations (11%) et nulle entre les individus.

3.3 Structuration des populations

3.3.1 Analyse en clusters

L'analyse réalisée avec STRUCTURE a révélé la présence de trois clusters différents et nettement séparés (fig. 3.1), qui correspondent à la population 7 (Kesseldorf), la population 10 (Saint-Nabor) et un regroupement de l'ensemble des autres populations. Cependant, l'estimation des probabilités logarithmiques des données $[\ln P(D)]$ était maximale pour $K = 4$ (fig. 1 en annexe). Nous observons en effet sur le graphique de sortie de STRUCTURE (fig. 3.1) un éventuel quatrième cluster, qui pourrait correspondre au regroupement des populations 8 et 9. Mais nous observons du mélange génétique au sein de ce cluster, et lorsque l'on augmente le nombre de K lors de l'analyse, le mélange génétique est encore plus marqué et il n'est plus possible de différencier cet éventuel quatrième cluster, alors que les deux populations différenciées restent toujours bien séparées. Pour cette raison, nous considérons que trois clusters génétiques sont présents en Alsace. Ce résultat indique ainsi que les populations de Saint-Nabor et de Kesseldorf se différencient, et représenteraient des isolats.

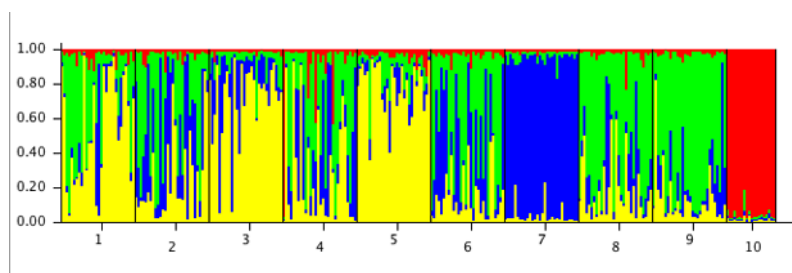


FIGURE 3.1 – Graphique de sortie de STRUCTURE pour $K = 4$. Les numéros sur l'axe des abscisses correspondent aux populations.

3.3.2 Isolement par la distance

Le test de corrélation de Mantel n'a pas révélé d'isolement par la distance ($r = -0.06$, $p = 0.7$).

3.4 Effet « *bottleneck* »

L'analyse avec BOTTLENECK a révélé un signal de chute d'effectif au sein de la population d'Emlingen (Wilcoxon test : $p = 0.03$ sous SMM et $p = 0.04$ sous TPM). Les résultats pour la population de Saint-Nabor indiquent un effet qui peut être considéré comme significatif avec le modèle T.P.M. puisqu'il tombe à 5 %, mais non significatif avec le modèle S.M.M.

Modèle	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	Pop8	Pop9	Pop10
T.P.M.	0.07	0.07	0.4	0.03*	0.5	0.05*	0.4	0.07	0.03*	0.05*
S.M.M.	0.4	0.3	0.6	0.07	0.5	0.07	0.7	0.4	0.04*	0.2

TABLE 3.1 – Valeurs de p du test de Wilcoxon pour l’excès d’hétérozygote au sein des populations calculées avec BOTTLENECK v.1.2.02. Le seuil est fixé à 5 %. Les valeurs suivies d’un * sont celles qui sont significatives.

Chapitre 4

Discussion

Le plus souvent, les populations en cœur d’aire de répartition possèdent une diversité génétique plus importante que celles en limite d’aire (Eckert *et al.*, 2008). Ce patron s’observe chez plusieurs amphibiens, comme par exemple la grenouille de Lataste (Garner *et al.*, 2003) ou encore la grenouille nord-américaine *Rana sylvatica* (Peterman *et al.*, 2013). D’après les données sur la répartition mondiale du Sonneur à ventre jaune (Gollmann *et al.*, 2011), nous pouvons considérer que les populations alsaciennes de Sonneur à ventre jaune se trouvent au cœur de l’aire de répartition de l’espèce. Ainsi, nous nous attendions à trouver une diversité génétique globalement assez forte en Alsace. Nos résultats confirment cette hypothèse, avec une richesse allélique moyenne de 4.79 sur l’ensemble des populations, et une valeur d’hétérozygotie attendue (H_E) de 0.51. De plus, bien que l’espèce possède une répartition encore assez large dans la région, les populations de Sonneur à ventre jaune étudiées montrent toutes une tendance à la différenciation, mais cette différenciation est modérée, avec des valeurs de F_{ST} comprises aux alentours de 10%. Cette tendance est également attendue à l’échelle étudiée, car le Sonneur à ventre jaune possède une aire vitale et des capacités de dispersion assez réduites, caractéristiques intrinsèques à sa morphologie et à son mode de vie principalement lié aux petites zones humides forestières. Ainsi, il est normal que l’on détecte un flux de gènes restreint entre les populations, qui sont pour la plupart distantes de plusieurs kilomètres. Cette structuration apparente résulte certainement d’évènements récents ayant conduits à une réduction du flux de gène, mais qui n’ont pas d’influence sur la diversité globale du fait de la répartition large et d’un flux de gènes ancien qui devait être très important. Seules deux populations se singularisent, en particulier celle de Saint-Nabor, qui montre un indice de différenciation sévère, à 27%, et celle de Kessel-dorf, avec un indice proche de 20% (tab. 2 en annexe). La différenciation génétique très marquée

de ces deux populations est corroborée par l'analyse en clusters, qui les fait ressortir comme deux groupes séparés du reste des populations, qui elles sont toutes regroupées en une seule entité génétique. Ce résultat est assez inattendu, car ces deux populations ne semblent pas plus géographiquement déconnectées que les autres.

4.1 Populations isolées en Alsace

4.1.1 Kesseldorf

La population de Kesseldorf est intégrée dans le massif forestier de Haguenau, et les analyses montrent une différenciation forte avec la population du lieu-dit du « *Grundel* », elle aussi intégrée dans le massif forestier. Par contre, les populations de Kesseldorf et de Beinheim, qui sont assez éloignées (23.7 km) et surtout séparées par l'autoroute A35, montrent un indice de différenciation de 11%, ce qui est de l'ordre de ce qui est observé globalement au sein de l'ensemble de la zone d'étude. Ainsi, bien que l'indice de différenciation entre les populations de Kesseldorf et de Beinheim, elles aussi séparées par l'autoroute A35, soit de 20%, indiquant une différenciation prononcée, nous pouvons écarter l'effet fragmentant de l'autoroute comme facteur explicatif de cette différenciation génétique. D'autres facteurs doivent entrer en jeu pour expliquer la différenciation marquée de la population de Kesseldorf, mais nous ne les avons pas identifiés dans le cadre de cette étude.

4.1.2 Saint-Nabor

En ce qui concerne la population de Saint-Nabor, la tendance à la différenciation est encore plus marquée, et nous pouvons même la qualifier de population isolée. Nos résultats indiquent que le flux de gènes en faveur de cette population est très réduit, voire inexistant. Une estimation de la taille de la population par CMR a été menée en 2013, avec une moyenne de 213 individus calculée. Cette valeur ne correspond pas à la taille efficace de population (non calculée dans le cadre de ce travail), c'est-à-dire au nombre de reproducteurs, qui doit être inférieur au nombre estimé par l'analyse CMR. À titre de comparaison, un comptage à vue a été effectué en 2003 en une soirée, et avait permis de dénombrer environ 300 individus différents. Même si ces valeurs ne sont pas comparables, elles indiquent tout de même une tendance au déclin en termes d'effectifs bruts. Il est fort possible que cette population soit actuellement totalement isolée et connaisse un effet de dérive liée à une chute d'effectif. Nos résultats n'indiquent cependant pas d'effet

bottleneck pour cette population, ce qui peut s'expliquer par une taille efficace de population encore assez élevée, qui ne permet pas de détecter des événements de chute d'effectif récents (10 ans). De plus, nous avons observé cette année un Sonneur à ventre jaune sur une localité non loin du site (4km), ce qui pourrait laisser penser qu'il existe tout de même des individus migrants. Les populations reproductrices les plus proches se trouvent dans le ried Centre Alsace, de part et d'autre de l'autoroute. La population d'Epfig par exemple se trouve à 20 km de celle de Saint-Nabor, et du même côté de l'autoroute. Ainsi, il apparaît peu probable que l'autoroute constitue un élément fragmentant, d'autant que la population d'Epfig et celle de l'Illwald, situées de part et d'autre de cette autoroute, ne montrent pas de différenciation marquée¹.

Les facteurs responsables de l'isolation de cette population n'ont pas été identifiés. Des opérations de gestion conservatoire ont eu lieu sur le site, ce qui a permis de pérenniser des sites de reproduction de l'espèce. Ainsi, il est étonnant de constater une isolation génétique de cette population, qui au contraire devrait être en bon état de conservation.

4.2 Comparaison avec d'autres populations

Il existe peu d'études qui ont exploré la diversité génétique du Sonneur à ventre jaune. Un travail mené dans la frange nord de l'aire de répartition de l'espèce, en Basse-Saxe, montre une diversité génétique réduite (Weihmann *et al.*, 2009).

Nous avons également pu mener des analyses au sein d'une population en limite sud-ouest d'aire de répartition, dans le département du Lot. Les valeurs de variation et de diversité génétiques sont globalement plus faibles au sein de la population lotoise (Vacher et Ursenbacher, données non publiées). En effet, lorsque l'on analyse la population lotoise avec 10 populations alsaciennes, la richesse allélique moyenne² est de 4.85, alors qu'elle n'est que de 2.65 pour la population du Lot. De même, l'hétérozygotie attendue est en moyenne de 0.49, et seulement 0.33 pour la population lotoise.

Ces données indiquent que le patron « traditionnel » de diversité génétique plus forte au sein de l'aire et plus faible en périphérie semble s'appliquer au Sonneur à ventre jaune.

1. Cependant, pour ces deux populations, il est également possible que nous n'ayons pas détecté de signal de dérive du fait de l'âge assez récent de l'autoroute (environ 25 ans). La présence d'un passage à grande faune et d'ouvrages d'art sous l'autoroute au niveau de la forêt d'Epfig nous laissent tout de même penser que la connexion entre les populations de part et d'autre de cet axe restent possibles.

2. Calculée sur un échantillon de 16 individus diploïdes.

Chapitre 5

Conclusion

La présente étude soulève plusieurs points. D'une part, le Sonneur à ventre jaune est une espèce qui semble avoir une diversité génétique et un flux de gènes plus élevés au cœur de l'aire de répartition qu'en périphérie d'aire. Ainsi, les poches populationnelles qui montrent une différenciation marquée au sein de l'aire de répartition sont certainement des populations isolées, et soumises à diverses pressions (dérive, consanguinité...). L'isolement des populations peut résulter de divers facteurs, parfois facilement identifiables (construction de route, déforestation, urbanisation, déplacement d'individus...), mais parfois il est difficile de connaître les facteurs qui ont mené une population à se différencier. C'est le cas des deux populations de Saint-Nabor et de Kesseldorf. La population de Kesseldorf est incluse dans le massif de Haguenau, et nous n'avons pas identifié d'éléments du paysage qui puisse constituer une barrière géographique au flux de gènes entre cette population et d'autres au sein du massif. Concernant la population de Saint-Nabor, nous pouvons penser que l'isolement provient d'une interaction de plusieurs facteurs, comme la mutation des pratiques agricoles de plaine qui ont mené à une transformation des paysages et notamment la disparition de prairies et d'éléments arbustifs et arborés (bois, haies) dans le ried Centre Alsace, couplé à la construction de l'autoroute A35 et de la voie rapide D500 dans le même secteur. Des analyses plus poussées seraient nécessaires afin de connaître avec précision la raison de la différenciation marquée de cette population. Quoi qu'il en soit, nous pouvons considérer que cette population du piémont possède actuellement un risque d'extinction assez élevé si aucune mesure de conservation adéquate en sa faveur n'est prise. Cette situation est d'autant plus préoccupante que des mares ont été creusées et qu'un suivi est réalisé depuis la reprise des travaux pour la mise en sécurité du site en 2009. Nous préconisons dans un premier temps d'augmenter le nombre de mares et la surface allouée à leur implantation sur le site afin de

pérenniser et dynamiser la population. De plus, il serait intéressant d'adapter l'actuel protocole de suivi, ou de le compléter par des études plus fines, afin de déterminer quels pourraient être les facteurs de déclin de cette population. Nous pensons par exemple à une étude écotoxicologique (pollution de l'eau par les engins ?), une étude sur le succès reproducteur, ou encore une étude sur le taux de fécondité des femelles. Enfin, il serait souhaitable de travailler sur les possibilités de connexion avec d'autres populations de plaine, notamment par l'aménagement de sites de reproduction annexes.

En conclusion, le Sonneur à ventre jaune semble globalement en assez bon état de conservation en Alsace. La population de Saint-Nabor nécessite cependant une attention particulière, car elle est actuellement isolée de l'ensemble des autres populations, et sa diversité génétique est affaiblie.

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.
- ECKERT, C., SAMIS, K. et LOUGHEED, S. (2008). Genetic variation across species’ geographical ranges : the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17:1170–1188.
- 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.
- GARNER, T., ANGELONE, S. et PEARMAN, P. (2003). Genetic depletion in swiss populations of *Rana latastei* : conservation implications. *Biological Conservation*, 114:371–376.
- GOLLMANN, B., GOLLMANN, G. et GROSSENBACHER, K. (2011). *Bombina variegata* (Linnaeus 1758) - *Gelbbauchunke*, pages 303–361. Grossenbacher, K. (ed.). Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Band 5/I. Froschluche I. Aula Verlag.
- GOUDET, J. (1995). Fstat version 1.2 : a computer program to calculate fstatistics. *Journal of Heredity*, 86(6):485–486.
- HAUSWALDT, J., SCHRÖDER, C. et TIEDEMANN, R. (2007). Nine new tetranucleotide microsatellite markers for the fire-bellied toad (*Bombina bombina*). *Molecular Ecology Notes*, 7(1):49–52.
- LESCURE, J., PICHENOT, J. et COCHARD, P. (2011). Régression de *Bombina variegata* (Linné, 1758) en France par l’analyse de sa répartition passée et présente. *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, 137:5–41.
- LUIKART, G. et CORNUET, J.-M. (1998). Empirical evaluation of a test identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12:228–237.
- MANTEL, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209–220.
- 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.

- PETERMAN, W., FEIST, S., SEMLITSCH, R. et EGGERT, L. (2013). Conservation and management of peripheral populations : Spatial and temporal influences of the genetic structure of wood frog (*Rana sylvatica*) populations. *Biological Conservation*, 158:351–358.
- 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.
- PIRY, S., LUIKART, G. et CORNUET, J.-M. (1999). Bottleneck : A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90(4):502–503.
- 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.
- STUCKAS, H. et TIEDEMANN, R. (2006). Eight new microsatellite loci for the critically endangered fire-bellied toad *Bombina bombina* and their cross-species applicability among anurans. *Molecular Ecology Notes*, 6:150–152.
- 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.
- VACHER, J.-P. (2013). Le Sonneur à ventre jaune (*Bombina variegata*) en Alsace : statut, menaces et plan régional d’actions. *Ciconia*, 37(1-2):52–62.
- 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.
- WEIHMANN, F., PODLOUCKY, R., HAUSWALDT, S. et PRÖHL, H. (2009). Naturschutzgenetische Untersuchungen von Populationen der Gelbbauchunke (*Bombina v. variegata*) im südlichen Niedersachsen. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 16(2):183–200.

Table des figures

2.1	Répartition des localités échantillonnées pour le Sonneur à ventre jaune en 2013. Les numéros correspondent à ceux reportés dans le tableau 2.1.	8
2.2	Manipulation d'un Sonneur à ventre jaune pour le prélèvement d'ADN par frottis buccal à l'aide d'un écouvillon. © Jean-Pierre Vacher	9
3.1	Graphique de sortie de STRUCTURE pour $K = 4$. Les numéros sur l'axe des abscisses correspondent aux populations.	13
1	Probabilité logarithmique des données $[\ln P(D)]$ obtenues à partir du programme STRUCTURE v.2.3.3 pour le jeu de données contenant six microsatellites 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	25
Couverture : Deux mâles de Sonneurs à ventre jaune, <i>Bombina variegata</i> , dans une ornière de la forêt de Haguenau (67), le 16 juillet 2013 © Jean-Pierre Vacher		

Liste des tableaux

2.1	Liste des sites échantillonnés en Alsace en 2013 et nombre d'échantillons récoltés par site. Les coordonnées géographiques sont en degrés décimaux WGS 84.	7
3.1	Valeurs de p du test de Wilcoxon pour l'excès d'hétérozygote au sein des populations calculées avec BOTTLENECK v.1.2.02. Le seuil est fixé à 5 %. Les valeurs suivies d'un * sont celles qui sont significatives.	14
1	Loci microsatellites utilisés pour <i>Bombina variegata</i> en Alsace avec les niveaux de variabilité des microsatellites basés sur 290 individus et estimés avec FSTAT v.2.9.3.2.	24
2	Diversité génétique observée dans les dix populations de <i>Bombina variegata</i> en Alsace étudiées à partir de six marqueurs microsatellites. Les valeurs sont calculées avec FSTAT v.2.9.3.2. La richesse allélique (A_R) est calculée sur la base de 16 individus diploïdes.	24
3	Estimations par paire des F_{ST} dans dix populations de <i>Bombina variegata</i> en Alsace pour six 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 à $p < 0.05$. Les valeurs dans la partie supérieure correspondent aux distances entre sites (km).	25

Annexe

Microsatellite	Taille (bp)	Nombre d'allèles	H_O	H_E	F_{IS}	F_{ST}
Bobom9H	131-183	11	0.57	0.5	-0.008	0.181
Bobom10F	197-233	11	0.59	0.56	-0.061	0.152
Bobom8A	288-332	9	0.57	0.57	0.025	0.194
BobomB13	114-124	5	0.24	0.22	-0.057	0.095
Bobom5F	110-166	11	0.76	0.66	-0.148	0.072
BobomF22	134-146	5	0.77	0.51	-0.448	0.044

TABLE 1 – Loci microsatellites utilisés pour *Bombina variegata* en Alsace avec les niveaux de variabilité des microsatellites basés sur 290 individus et estimés avec FSTAT v.2.9.3.2.

Population	n	H_O	H_E	A_R	F_{IS}	F_{ST}
1	30	0.533	0.551	4.19	0.024	0.107
2	30	0.655	0.586	4.06	-0.126	0.097
3	30	0.466	0.422	3.37	-0.104	0.163
4	30	0.655	0.616	4.15	-0.09	0.104
5	30	0.666	0.567	3.85	-0.186	0.107
6	30	0.644	0.554	4.17	-0.171	0.10
7	30	0.505	0.431	2.65	-0.163	0.19
8	30	0.616	0.549	3.94	-0.15	0.107
9	30	0.577	0.498	3.05	-0.225	0.125
10	20	0.283	0.329	2.47	0.087	0.276

TABLE 2 – Diversité génétique observée dans les dix populations de *Bombina variegata* en Alsace étudiées à partir de six marqueurs microsatellites. Les valeurs sont calculées avec FSTAT v.2.9.3.2. La richesse allélique (A_R) est calculée sur la base de 16 individus diploïdes.

Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 (n=30)	-	15.8	73.2	27.8	11	19	75.6	64	79	13.8
2 (n=30)	0.0653	-	69	23.4	17	12.3	72	65	79	26.7
3 (n=30)	0.0725	0.0913	-	92.5	82.8	81.7	5.6	23.7	147.6	66.7
4 (n=30)	0.0769	0.0677	0.1574	-	17.5	11.3	95.8	88.5	54.8	41.2
5 (n=30)	0.0523	0.0865	0.11	0.0532	-	12	85	75.2	67.8	24
6 (n=30)	0.0879	0.0319	0.1416	0.0812	0.093	-	85	77.7	66.2	32.8
7 (n=30)	0.1872	0.1254	0.2095	0.1645	0.1815	0.1399	-	20.6	151	68.3
8 (n=30)	0.0596	0.0582	0.1168	0.0538	0.0821	0.052	0.191	-	142.7	54.4
9 (n=30)	0.1027	0.0853	0.1632	0.0954	0.1086	0.0473	0.1515	0.0863	-	91
10 (n=20)	0.2662	0.2644	0.405	0.1936	0.2034	0.2315	0.3624	0.2683	0.293	-

TABLE 3 – Estimations par paire des F_{ST} dans dix populations de *Bombina variegata* en Alsace pour six 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 à $p < 0.05$. Les valeurs dans la partie supérieure correspondent aux distances entre sites (km).

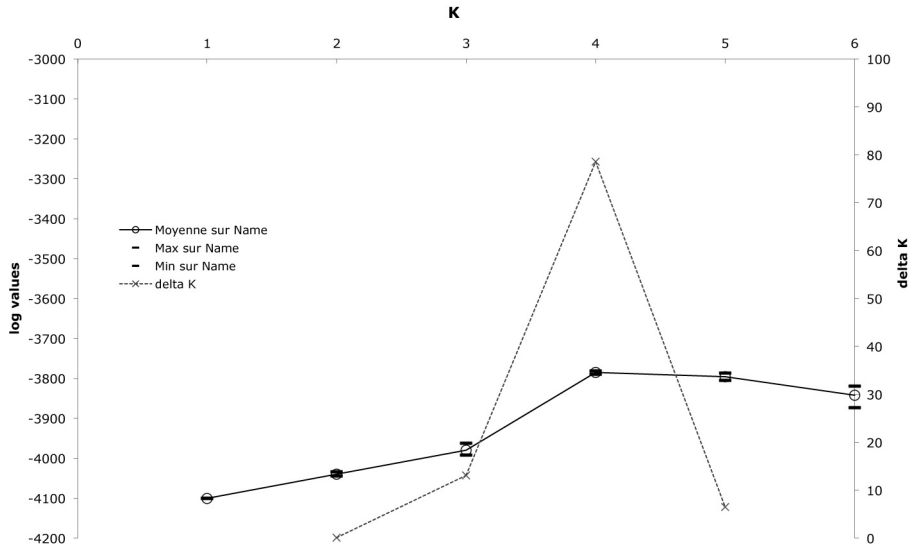


FIGURE 1 – Probabilité logarithmique des données $[\ln P(D)]$ obtenues à partir du programme STRUCTURE v.2.3.3 pour le jeu de données contenant six microsatellites sur dix simulations pour chaque K. Les cercles clairs correspondent à la moyenne des $[\ln P(D)]$, les barres noires correspondent aux valeurs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