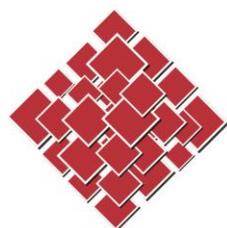




Pôle départemental de Recherches sur la biodiversité en Isère

Rapport scientifique :

CONNECTIPOP38 : comprendre les relations entre le paysage et la structuration des populations animales



**École Pratique
des Hautes Études**

Laboratoire Biogéographie et Ecologie des Vertébrés



30/03/2015

Fiche de synthèse

1 - Titre du projet : CONNECTIPOP38**2 - Organisme public gestionnaire de la subvention**

Nom de l'organisme public : ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES (EPHE)

Adresse postale : 4-14 rue Ferrus, 75014 PARIS

3 - Coordination du projet

Nom du Laboratoire : Biogéographie et Ecologie des Vertébrés

Nom du Directeur : Claude MIAUD

Nom du Responsable du projet : Claude MIAUD

Tél. : 04 67 61 33 43

e-mail : claude.miaud@cefe.cnrs.fr

Adresse postale : 1919, route de Mende 34293 MONTPELLIER

**4 - Liste des partenaires scientifiques ou techniques
collaborant au projet (signatures obligatoires en bas de la fiche)**

Claude Miaud Directeur d'Etude EPHE

Claudine Montgelard, Maître de Conférences EPHE

Véronique Arnal, Technicienne EPHE

Laboratoire de Biogéographie et Ecologie des Vertébrés, UMR Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 1919 route de Mende, 34 293 Montpellier.

Stéphanie Blanc-Manel, Professeur

LPED, Université Aix-Marseille / Laboratoire de réalisation des travaux : UMR AMAP - CIRAD TA A51/PS2 34398 Montpellier cedex 5

Projet Connectipop38 : comprendre les relations entre le paysage et la structuration des populations animales

1 - Présentation du programme

1.1 - Contexte scientifique :

Le changement d'usage des terres et la destruction des habitats diminuent drastiquement les habitats favorables pour de nombreuses espèces. Mais la diminution des surfaces d'habitats favorables s'accompagne également de leur fragmentation dans le paysage, avec comme conséquence possible une altération des processus d'échanges entre populations.

Les amphibiens accomplissent des mouvements obligatoires dans le paysage pour passer de leur habitat terrestre à leur habitat aquatique de reproduction et leurs capacités de dispersion sont relativement réduites. Il en résulte qu'ils sont particulièrement vulnérables aux modifications des paysages et la présence d'infrastructures de transports. En effet, les autoroutes, routes et voies ferrées ont été identifiées comme des barrières significatives aux migrations des amphibiens (e.g. Fahrig et al. 1995; Mazerolle et al. 2005; Elzanowski et al. 2009) et il existe de nombreux efforts pour en limiter les effets (construction de passages à petite faune temporaires ou permanentes), l'objectif étant principalement de restaurer la connectivité des populations.

La connectivité du paysage désigne la connectivité fonctionnelle (la réponse des espèces au paysage via la dispersion) et la connectivité structurelle (la configuration spatiale des éléments du paysage, comme leur proximité ou la présence barrières) (Taylor et al. 1993; Baguette and Van Dyck 2007). Le changement d'usage des terres, la dégradation et la fragmentation des habitats peut diminuer la richesse spécifique et l'abondance des amphibiens (Beebee 1997; Pope et al. 2000; Joly et al. 2001), ainsi que la diversité génétique et augmenter la différenciation génétique entre les populations (Reh & Seitz 1990; Hitchings & Beebee 1997; Seppä & Laurila 1999; Spear et al. 2005), et finalement altérer la viabilité des populations (Biek et al. 2002; Gibbs & Shriver 2005; Schmidt et al. 2005).

La problématique des relations entre la structure du paysage et le fonctionnement des populations animales (et à terme leur viabilité) est maintenant bien posée, en particulier chez les amphibiens. Il reste néanmoins des progrès importants à réaliser d'une part sur l'estimation de la dynamique de l'impact de la fragmentation du paysage (en combien de temps la création d'une barrière va

impacter le fonctionnement d'une population ?), et d'autre part sur l'identification de l'échelle spatiale à laquelle la dynamique démographique se réalise (massif, bassin, région ?).

Le programme « Connectipop38 » ambitionne d'étudier ces deux aspects (objectifs 1 et 2 ci-dessous) grâce aux connaissances acquises au cours des 10 dernières années en Isère et Savoie sur les populations de grenouille rousse (*Rana temporaria*), et à l'apport de nouveaux outils méthodologiques (marqueurs moléculaires, analyses spatiales).

1.2 Site d'étude :

Le site d'étude se situe en Savoie/Isère sur une étendue de 6400km² (figure 1). C. Miaud (UMR Laboratoire d'Ecologie Alpine jusqu'en 2011, Laboratoire biogéographie et Ecologie des vertébrés de l'EPHE depuis 2012) y développe depuis le début des années 2000 des études intensives sur le concept de la fragmentation des paysages, à la fois d'un point de vue du développement d'outils d'analyses ainsi que sur l'impact sur les populations animales. L'espèce sélectionnée est la Grenouille rousse car cette espèce est largement répartie dans cette région et ces caractéristiques biologiques (migrations de reproduction, longévité, etc.) en font un excellent modèle d'étude des relations entre structure des populations et structure du paysage.

Nous disposons d'une description précise des paysages de la région, en terme d'occupation des sols (SIG avec des cartographies à la résolution de 25 m). Une cartographie de la probabilité d'occurrence de la Grenouille rousse (notre modèle d'étude), ainsi que des modélisations des possibilités de déplacements des amphibiens ont été produites pour cette région (modélisation MaxEnt et cartes de friction, Decout et al., 2012).

Ce site a été sélectionné car il présente des éléments paysagers bien différenciés et des éléments fragmentant (routes, autoroutes, voies ferrées) importants et en densités variées.

L'espèce choisie est la Grenouille rousse car elle est distribuée dans l'ensemble de la zone d'étude et sa répartition y est particulièrement bien connue (en particulier grâce aux inventaires réalisés par le réseau des gestionnaires d'espaces protégés et les ONG de protection de l'environnement).

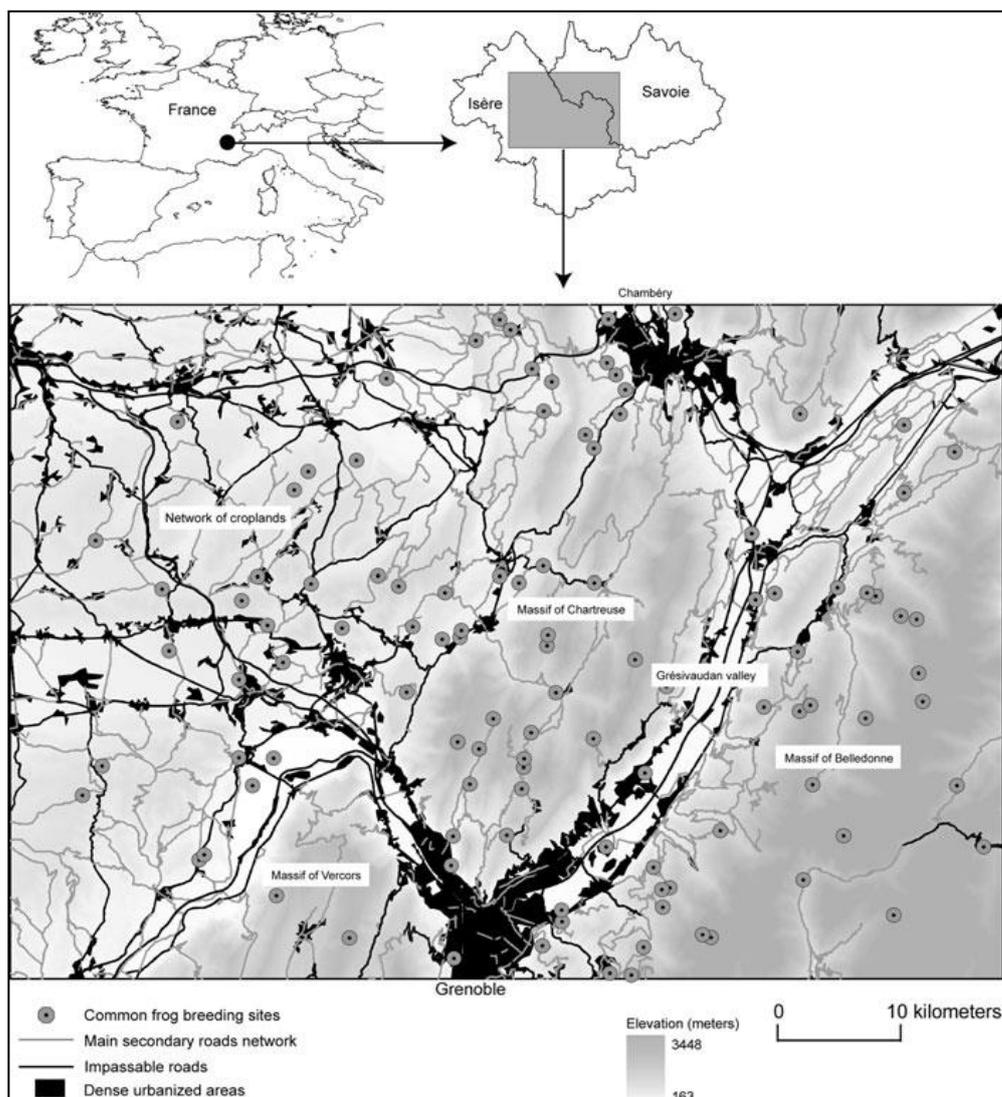


Figure 1 : Le site d'étude entre Grenoble au sud et Chambéry au Nord.

Pour ce programme nous avons élaboré deux objectifs afin de répondre pour répondre à la problématique énoncée plus haut, le premier traitant de l'aspect spatial et le second de l'aspect temporel.

2. Objectifs 1 : aspects spatial

2.1 Présentation :

Le premier volet de ce projet concernait l'étude des interactions entre le paysage et ses perturbations (au sens de la présence de milieux défavorables et/ou infranchissables) et la structure génétique et les flux de gènes chez la Grenouille rousse à l'échelle régionale. Le but est de déterminer l'organisation spatiale (e.g. existence d'une ou plusieurs métapopulations et de sites isolés) de la Grenouille rousse dans l'aire étudiée, d'identifier les éventuelles barrières (présence

de milieux défavorables et/ou infranchissables), et d'évaluer les mesures d'aménagement du territoire (e.g. passages à faune, Trame verte).

Une métapopulation est définie génétiquement et démographiquement (Waples & Gaggiotti, 2006) : il existe des échanges possibles permettant la recolonisation d'un patch dans lequel une sous-population aurait disparue, mais l'intensité de ces échanges doit être faible, c'est-à-dire ne pas permettre la synchronisation démographique des sous-populations connectées. D'autre part, les patches de cette métapopulations sont constitués – étant donné la biologie de la Grenouille rousse – par les sites de reproduction échantillonnés.

2.2. Matériel et méthodes

a) Echantillonnage :

Les prélèvements de tissus (têtards) de Grenouille rousse dans tous les sites de reproduction de l'espèce dans la région considérée ont été réalisés en 2010 et 2011 (Tableau 1). Il en résulte un jeu de données de 49 populations de reproduction disponibles (avec un nombre d'échantillons de 50 à 100 par population) pour les analyses génétiques. Etant donné la connaissance de la répartition de cette espèce dans cette région et les efforts d'échantillonnage réalisés en 2010 et 2011 grâce aux conservatoires des espaces naturels et aux ONGs, nous considérons que cet échantillonnage est quasi-exhaustif, ce qui est très important en génétique des populations (existence de populations fantômes = non échantillonnées).

b) Analyses génétiques :

Le volet concernant la connectivité des populations est basée sur l'analyse de locus microsatellites. Pour permettre de révéler la structure génétique à une échelle spatiale fine, Il est nécessaire d'obtenir un grand nombre de marqueurs génétiques. En effet plus le nombre de marqueurs est important, plus le pouvoir de résolution (i.e. identification des sous-populations, des zones d'échanges ou de ruptures de connectivité, etc.) sera élevé. Ce point peut être un problème en particulier pour les espèces non-modèles comme la grenouille rousse. Toutefois 145 locus ont été développé et sont disponibles (Matsuba & Merilä, 2009) pour cette espèce.

Un locus microsatellites est une répétition plus ou moins importantes (selon les individus et populations) de plusieurs nucléotides telles que par exemple GCGCGCGCGCGCGCGCGCGC. La variation de nombre de répétitions constitue les allèles (ou variant). Chaque individu possède une

paires de répétition pour chaque locus microsatellites et ces deux allèles ne possèdent pas obligatoirement le même nombre de répétitions.

Tableau 1 : Echantillons disponibles. Les échantillons sont constitués de 50-100 têtards par site aquatique. Ils ont été obtenus par capture directe dans l'eau, mais le plus souvent par échantillonnage de fragments de ponte et élevage au laboratoire.

N°	Nom abrégée	Département	Commune	Lieu dit	échantillon	
1	Motte_Poney	73	Cognin / La Motte Servolex	Poney Club	2002	2011
2	Motte_Fourneaux	73	La Motte Servolex	Les Fourneaux	2002	2011
3	Cognin_Mollasses	73	Cognin	Les Mollasses	2002	2011
4	tremblay_Lagun	73	Le Tremblay	Bassins de lagunage	2002	2011
5	Aiguebelle_Lac_Sud	73	Aiguebelle le lac	sud du lac aiguebelette (la Combe)	2002	2011
6	Tremblay_Serraz	73	Le Tremblay	La Serraz	2002	2011
7	Villard_Siard	73	Villard d'Héry	Villard-Siard		2011
8	Chamb_Combe	73	Chambéry-le-vieux	La Combe verte	2002	2011
9	Cognin_Forezan	73	Cognin	Parc du Forezan		2011
10	Thibault_Pisserote	73	St Thibault	Lac de Pisserote		2011
11	Alban_Collomb	73	St Alban de Montbel	Le Collomb		2011
12	Bourget_Chateau	73	Le Bourget du Lac	Château Thomas II		2011
13	Vimines_Pierre	73	Vimines / Pierre rouge	marais les Vénats		2011
14	Revel_Granges	38	Revel	Les Granges de Freydières		2011
15	Motte_College	73	La Motte Servolex	rond point Collège	2002	2011
16	Sappey_Sagnes	38	Le Sappey en Chartreuse	Marais des Sagnes		2011
17	Voiron_Teisson	38	Voiron	La Teissonnière		2011
18	Déserts_Plainpanais	73	Les Déserts	Col de Plainpalais		2011
19	Entremont_Plagne	38	St Pierre d'Entremont	Les Buis		2011
20	François_Tourbiere	73	St François de Sales	Tourbière des Creusates	2002	2011
21	Thuile_Lac	73	La Thuile	Lac de la Thuile		2011
22	Mery_Jacquièr	73	Mery	Les Jacquiers	2002	2011
23	Sonnaz_Fontaine	73	Sonnaz	Les Fontaines	2002	2011
24	Nances_Lac_Nord	73	Nances	Nord du lac d'Aiguebelette	2002	2011
25	Feclas_Pertuizet	73	Les Déserts / Féclas	Marais de Pertuizet		2011
26	Novalaise_Lavoue	73	Novalaise (Marcieux)	D921 Lavoue		2011
27	Déserts_Féclas	73	Les Déserts	La Féclaz (Mas Marais)		2011
28	Attignat_D39	73	Attignat-Oncin	D39 500 m avant St François à droite		2011
29	Table_Etelles	73	La Table	Les Etelles		2011
30	StPierre-Entremont_Buis	38	St Pierre d'Entremont	Les Buis		2011
31	StPierre-Chartreuse_Charmette	38	ST Pierre de Chartreuse	Col de la Charmette		2011
32	Motte_Lycée	73	La Motte Servolex	Lycée agricole	2002	disparu
33	Verel_Pragondran	73	Verel Pragondran	Pragondran	2002	disparu
34	Déserts_Corniche	73	Les Déserts	La corniche (Revart)		2011
35	Lépin_Mas	73	Lépin le Lac / Attignat-Oncin	Le Mas		2011
36	Attignat_Village	73	Attignat-Oncin	Le Village		2011
37	StQuentin_Gouret	38	St Quentin sur Isère	Le Gouret		2011
38	StDidier_Combe	38	St Didier de Bizonnes	Etang de la combe Blanche		2011
39	StJulien_Lac	38	St Julien de Raz	Le Lac		2011
40	StLaurent_Herretang	38	St Laurent du Pont	Tourbière de l'Herretang		2011
41	Valencogne_Vivier	38	Valencogne	Etang du vivier		2011
42	Méaudre_Gaillardes	38	Méaudre	Les Gaillardes		2011
43	Claix_Peuil	38	Claix	Tourbière de Peuil		2011
44	Chapereillan_Gravière	38	Chapareillan	grande gravière bordant A41		2011
45	Lancey_Lary	38	La Combe de Lancey	Le Mas Lary		2011
46	StMartin_Seiglières	38	St Martin d'Uriage	Marais des Seiglières		2011
47	Cheylas_Maupas	38	Le Cheylas	Etang de la ferme de Maupas		2011
48	Allevard_Mirande	38	Allevard	Lac de la Mirande		2011
49	StPierre-allevard_Sailles	38	St Pierre d'Allevard	Marais de Sailles		2011
50	Theys_Vincent	38	Theys	Les vincent		2011
51	Sappey_Porte	38	Le Sappey en Chartreuse	Col de Porte		2011

L'obtention de ces informations pour plusieurs locus permet de différencier chaque individu. La probabilité de retrouver deux individus ayant la même information génétique pour tous les locus est quasi inexistante : Pour 10 locus à 10 allèles la probabilité de retrouver deux individus identiques est proche de 1 chance sur 10 millions, ou d'en notre cas où le nombre d'allèles est plus important la probabilité est proche de 1 chance sur 50 milliards.

Le programme Connectipop38 visait à obtenir une vingtaine de locus polymorphes pour une dizaine d'individus pour les 49 sites échantillonnés (soit 490 individus pour 9800 génotypes identifiés).

Les tests de sélection de locus microsatellites effectués pour l'utilisation d'une vingtaine de locus ont permis d'obtenir une dizaine de locus très polymorphes adaptés au dimensionnement de notre étude. Après ces tests préliminaires, nous avons décidé de modifier la stratégie d'échantillonnage dans les prélèvements disponibles, à savoir d'analyser une vingtaine d'individus par site.

Parmi les 49 sites disponibles, nous avons pu analyser 31 sites, soit un total de 620 individus (pour 6200 génotypes).

Le déficit d'analyses de sites (de 49 disponibles à 31 réalisés) s'explique par notre choix d'augmenter le nombre d'analyses pour l'étude temporelle (voir ci-après), soit environ 340 individus supplémentaires (pour 3400 génotypes identifiés).

c) Analyses de données :

Pour déterminer la structure spatiale des populations, deux méthodes de clustérisation par Monte Carlo-Markov Chain (MCMC) ont été utilisées. Le premier, couramment utilisé en génétique des populations – logiciel Structure (Pritchard 2001) - ne pose aucun a priori de positionnement spatiale des individus. Nous l'avons abandonné car la mise au point des paramètres optimaux pour son utilisation s'est avérée trop gourmande en temps, avec une absence de convergence malgré un burning de 200.000 et 800.000 itérations.

Pour ces raisons, les analyses de données ont principalement été conduites avec le logiciel BAPS6 (Corander et al. 2008) qui est un logiciel de clusterisation spatialisé : les individus sont localisés spatialement (en utilisation de façon individu-centré).

L'analyse a été conduite pour les 31 sites. Une analyse plus complète, incluant le génotypage des 19 derniers sites, est envisagée à la suite de cette étude (projet de thèse).

La plupart des analyses ont été réalisées par Guillaume TESTUD dans le cadre de son stage de Master 2. Un tableau récapitulatif des caractéristiques génétiques sites est disponible en annexe 2.

2.3. Résultats

Les caractéristiques génétiques des « populations » échantillonnées sont données dans le tableau 2 (adapté de Testud, 2014).

Tableau 2 : *Caractéristiques génétiques des sous-populations de Grenouille rousse du secteur de Chambéry-Grenoble par l'étude de polymorphisme de marqueurs microsatellites*

Nom du site	Nombre de pontes observées	N	N _a	N _e	N _{allèle privé}	H _o	H _e	Fis	
Motte_Poney	300	20	9,64	5,63	1	0,77	0,74	-0,01	ns
Motte_Fourneaux	800	20	7,64	4,35	1	0,72	0,70	0,00	ns
Cognin_Mollasses	> 1000	20	11,09	6,28	1	0,74	0,74	0,04	ns
Tremblay_Lagun	250	19	9,45	5,94	0	0,72	0,74	0,07	ns
Aiguebelle_lac_Sud	> 1000	20	10,45	5,95	1	0,70	0,74	0,07	ns
Tremblay_Serraz	150	20	7,64	3,95	0	0,78	0,67	-0,13	*
Villard_Siard	1500	20	8,82	4,88	5	0,67	0,70	0,07	ns
Chamb_Combe	120	20	6,55	4,26	0	0,69	0,66	-0,03	ns
Cognin_Forezan	200	20	9,45	5,66	2	0,70	0,71	0,03	ns
Thibault_Pisserote	400	20	9,45	5,90	0	0,75	0,76	0,04	ns
Alban_Collomb	100	20	7,73	5,28	0	0,75	0,74	0,02	ns
Bourget_Chateau	40	20	7,36	4,30	0	0,79	0,69	-0,11	*
Vimines_Pierre	300	20	10,18	6,27	3	0,72	0,77	0,08	ns
Revel_Granges	>1000	19	8,91	5,33	4	0,71	0,75	0,07	ns
Motte_College	65	20	8,64	5,22	1	0,76	0,74	-0,01	ns
Sappey_Sagnes	>1000	20	9,00	5,44	4	0,74	0,75	0,04	ns
Voiron_Teisson	>1000	20	9,45	5,71	2	0,73	0,70	-0,01	ns
Désert_Plainpanais	300	20	10,00	5,29	2	0,69	0,73	0,08	ns
Entremont_Plagne	15	20	6,36	3,88	1	0,67	0,65	0,00	ns
François_Tourbiere	1000	20	9,55	5,66	1	0,72	0,73	0,03	ns
Thuile_Lac	> 1000	20	7,45	4,84	1	0,76	0,70	-0,06	*
Mery_Jacquière	7	16	6,64	4,50	1	0,84	0,72	-0,12	*
Sommaz_Fontaine	40	20	6,27	4,14	0	0,72	0,68	-0,04	ns
Nances_lac_Nord	200	10	8,00	5,58	0	0,74	0,74	0,05	ns

Avec le nombre d'individus (N), nombre moyen d'allèles par locus (N_a), nombre moyen d'allèles efficaces par locus (N_e) c'est-à-dire le nombre d'allèle moyen théorique si tous les allèles avaient la même fréquence, nombre d'allèles privés, hétérozygotie observée (H_o), hétérozygotie attendue (H_e), Indice de fixation (Fis) et sa significativité.

L'analyse de la structure des 31 « populations » effectuée grâce au logiciel BAPS6 est donnée dans la figure 2. Chaque site aquatique est représenté par des polygones (fig. 2a). Les couleurs observés au sein de ces polygones informent du partitionnement des individus lors de la clustérisation. Ainsi, si on observe une couleur dominante sur quasi tous les sites, on peut en conclure que les sites partagent de nombreux individus génétiquement appariés. Ils peuvent ainsi former une grande population subdivisée constituées de nombreux sites de reproduction échangeant régulièrement des individus. Si on observe plusieurs gros groupes de couleurs différentes, il existe une structuration spatiale avec des ensembles échangeant pas ou peu d'individus. On peut être en présence d'une organisation métapopulationnelle. Enfin si on observe différentes couleurs au sein d'un même site - mais qui ne se retrouvent quasi nul par ailleurs – le site peut être considéré comme isolé, isolement plus ou moins important selon le nombre d'individus qui diffèrent du reste de la (méta)population.

La figure 2(a, b) argumente pour la présence d'une seule population globale allant de Voiron à St François de Sales, du fait de la présence d'une couleur dominante pour de nombreux sites (vert clair).

Ainsi cette population comprend 13 sites pour qui tous les individus ont été attribués à la population globale : Motte-Poney (1) Cognin-Mollasses (3) Tremblay-Lagunage (4) Aiguebelette Lac-Sud (5) Cognin-Forezan (9) Thibault-Pisserote (10) Voiron-Teisson (17) Déserts-Plainpalais (18) St François-Tourbières (20) Féclas-Pertuizet (25) Novalaise-Navoue (26) Déserts-Féclas (27) St Pierre-Chartreuse-Charmette (31) (Les N° renvoient à l'annexe 1 et la figure 2a).

Différent sites plus ou moins différenciés de cette population sont ensuite décelés tels que : - Vimines-Pierre(13), le moins différencié avec 2 individus différencié sur 20,

- Mery-jacquiere (22), seul site comprenant aucun individu attribué à la population.

Le tableau dans la figure 2 précise cette différenciation des sites, en indiquant le pourcentage d'individus attribués pour chaque site à la population globale. On peut aussi remarquer que deux groupes de deux sites possèdent des individus attribués à un groupe commun :

- sites Alban-Collomb (11) et Nances Lac-Nord (24),

- sites Entremont-Plagne (19) et Attignat_D39 (28).

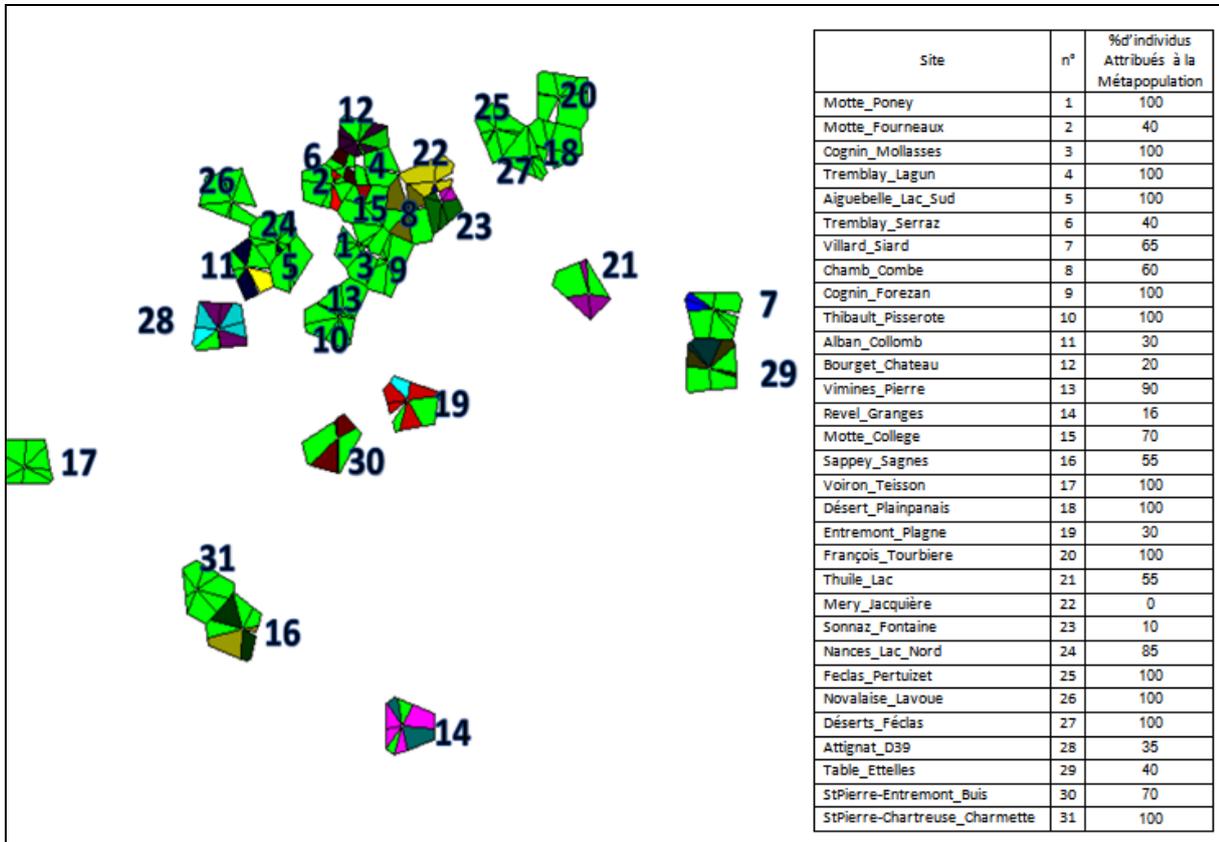
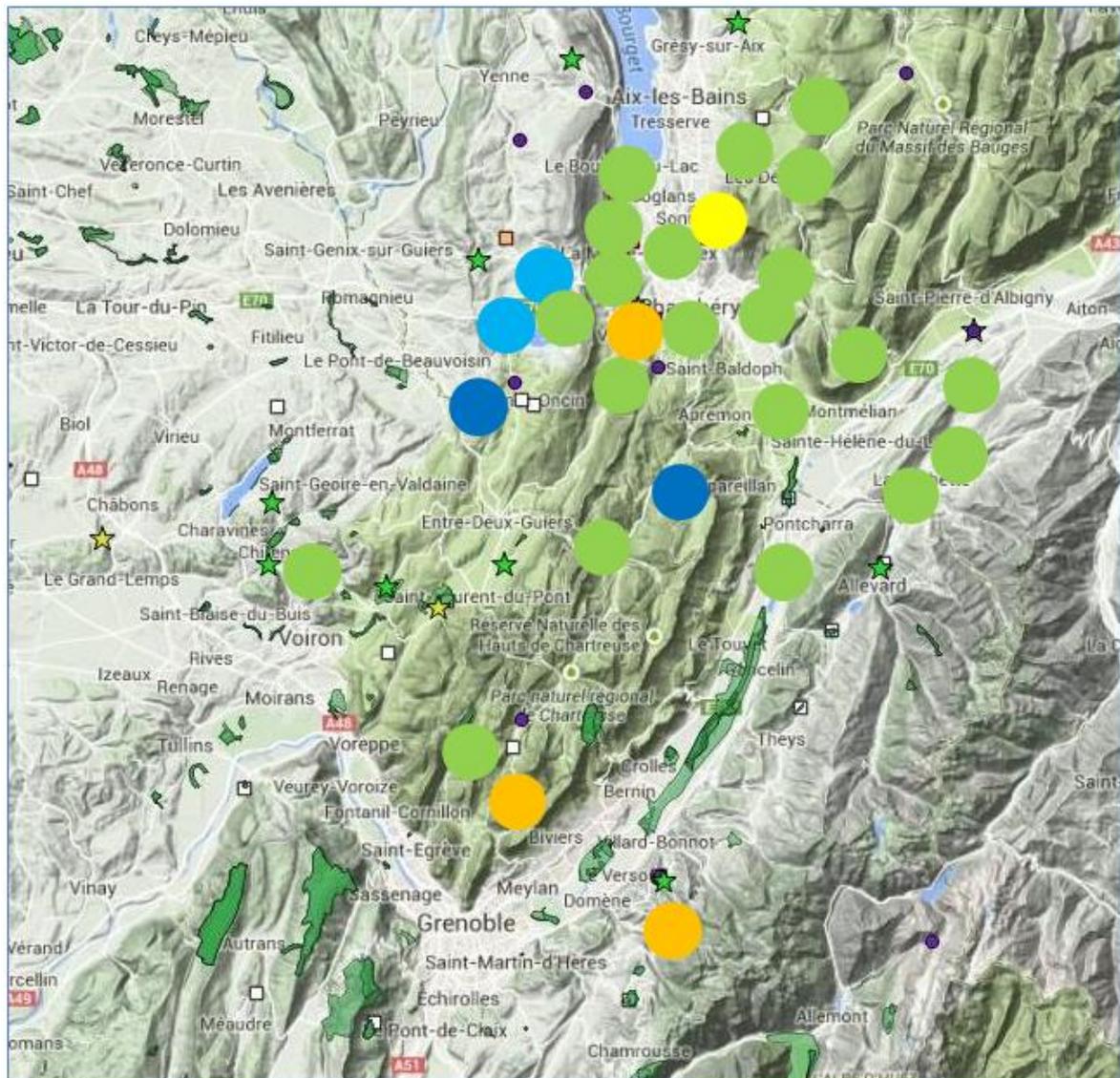


Figure 2 (a) : Analyse de la structure des 31 populations effectuée grâce au logiciel BAPS6. Chaque site (N° dans le tableau) est représenté par des polygones, et positionné dans l'aire d'étude. Les couleurs observés au sein de ces polygones informent du partitionnement des individus lors de la clustérisation (voir texte). Une simplification graphique est donnée par la figure 2 (b).



- Site échantillonné en 2002 & 2011, individus génotypés
- Site échantillonné en 2011, individus génotypés
- Site échantillonné en 2011, individus à génotyper

Figure 2(b) : Schématisation de l'organisation métapopulationnelle dans la région de Chambéry-Grenoble basée sur la structuration génétique de la Grenouille rousse à l'aide du polymorphisme de marqueurs microsatellites.

2.4. Discussion :

L'analyse de la structuration génétique des Grenouilles rousses qui se reproduisent dans 31 sites aquatiques de la région Chambéry-Grenoble montre que :

Il existe une continuité génétique des individus de Voiron à St François de Sales. Cette « population » comprend 13 sites formant un ensemble qualifié de « population globale ». Cet ensemble présente des échanges d'individus dont les flux (sens et intensité) seront estimés à l'occasion de nouvelles analyses. La définition stricte d'une métapopulation sous-entend la présence d'échanges très faibles (mais possibles), ce qui reste à estimer, et un asynchronisme des sous-populations. Nous n'avons pas de suivi démographique de ces sous-populations, seulement une estimation du nombre de ponte observée pour l'année de prélèvement. On pourra faire un nouveau comptage à l'avenir (2016) pour vérifier cette taille « annuelle » des populations de reproduction.

Le suivi démographique réalisé entre 2000 et 2005 sur les 11 sites du secteur Chambéry-Le Bourget du Lac montre un asynchronisme démographique entre les sites (Safner et al. 2011). Il est donc fort probable qu'un tel asynchronisme existe à l'échelle de la région Chambéry-Grenoble. Dans l'état de nos connaissances, nous conserverons le terme de population globale pour cet ensemble de 13 sites de reproduction.

Les autres sites étudiés présentent une différenciation plus ou moins importantes par rapport à cette population. Le site de Mery-jacquiere (22) ne comporte pour l'année étudiée aucun individu attribué à la population globale, ce qui renforce l'idée d'échanges très faibles entre les sous-populations. Certains sites peuvent aussi se regrouper par affinité génétique comme les sites Alban-Collomb (11) et Nances_Lac-Nord (24) et les sites Entremont-Plagne (19) et Attignat_D39 (28).

A l'échelle globale de ces 31 sites, on est en présence de sites pouvant être relativement isolés, mais conservant une continuité génétique. D'un point de vue démographique, on peut aussi faire l'hypothèse ici de l'asynchronisme de ces sous-populations. On peut donc raisonnablement penser qu'à l'échelle globale une synchronisation démographique n'existe pas, et que nous sommes en présence d'une structure métapopulationnelle.

3. Objectifs 2 : aspect temporel

3.1 Présentation :

Si comprendre comment les organisations spatiales des populations répondent aux changements des paysages est primordial dans le cadre de la conservation d'espèces dans des environnements soumis à de fortes pressions d'origine humaine (comme c'est le cas pour la région considérée ici), il est particulièrement important d'estimer le temps (en nombre de générations) pour que la présence d'une barrière s'inscrive dans les caractéristiques génétiques d'une population. Il peut exister un temps de latence pour que la signature d'une barrière ne soit détectée au sein d'une (méta)population. A l'inverse, la suppression d'une barrière (passage à faune) ne peut être perceptible qu'après plusieurs générations.

Pour aborder ce thème, nous avons profité de l'existence d'un échantillonnage réalisé en 2002 et en 2011 dans un secteur de l'aire d'étude. Proche de Chambéry, ce secteur à vue la circulation routière fortement augmenter au cours des 15 dernières années, amenant un effet barrière supposées des principales routes au sein de la population de Grenouille rousse présente.

3.1 Matériel et méthodes

a) Echantillonnage :

Les prélèvements de tissus (têtards) de Grenouille rousse ont été réalisés dans 14 sites de présence de l'espèce (échantillonnage exhaustif) en 2002. A l'occasion de l'échantillonnage de 2010-2011, le même secteur (Secteur entre Chambéry et le Lac du Bourget, ci-après secteur Chambéry-Bourget) a été échantillonné et des têtards ont été récoltés dans l'ensemble des sites colonisés par l'espèce. Parmi les 14 sites échantillonnés en 2002, deux ont été détruits (comblement pour extension de l'urbanisation). Deux nouveaux sites ont aussi été créer entre temps (Tableau dans les figures suivantes).

b) Analyses génétiques :

L'analyse réalisée sur le secteur de Chambéry-Bourget à partir d'échantillons de 2002 (Safner et al., 2011) a été réalisée à l'aide de 7 marqueurs microsatellites.

Pour notre étude, nous disposons de 10 microsatellites validés (voir 2.2.b). Afin que la comparaison entre 2002 et 2011 soit valable, il faut utiliser les mêmes marqueurs génétiques et de préférence la même plateforme de biologie moléculaire. Ayant conservés dans l'alcool des individus collectés en

2002, nous avons pu les géotyper avec les 10 nouveaux marqueurs développés pour l'étude présente (soit environ 340 individus supplémentaires pour 3400 géotypes identifiés).

c) Analyses de données :

Les données génétiques ont été analysées en trois étapes :

- La première analyse porte sur les 14 sites de 2002,
- la seconde porte sur les 14 sites de 2011,
- la troisième est l'analyse conjointe des 14 sites de 2002 et de 2011.

3.2. Résultats

a) Structuration génétique Chambéry-Bourget en 2002

L'analyse de la structuration des 14 sites en 2002 (figure 3) montre la présence de nombreux polygones de même couleur (rouge), indiquant l'apparentement génétique et donc des échanges fréquents (organisation populationnelle). Mais il existe également trois sites qui se différencient des précédents, Nances_lac-Nord (N), Motte-Lycée (O), et Tremblay-Lagunage (D) :

- Le site de Nances lac-Nord n'avait pas été analysé dans la publication de Safner et al. (2011, voir la figure originale en annexe 1), aussi aucune comparaison avec cet article ne sera faite pour ce site.
- Le site de Tremblay-Lagunage était déjà considéré différents des autres sites dans Safner et al. (2011). Les auteurs avaient proposé l'hypothèse d'un effet fondateur, au vu de la construction récente du point d'eau (bassin de décantation). La nouvelle analyse réalisée avec 10 microsatellites confirment la singularité de ce site.
- Concernant le site de la Motte-Lycée, sa singularité par rapport aux autres sites n'avaient pas été détecté par Safner et al. (2011). Son faible effectif en 2002 avait été souligné comme un facteur de risque d'extinction important. La différenciation observée pour ce site pourrait provenir de son faible effectif (effet de consanguinité), hypothèse qui sera testée ultérieurement.

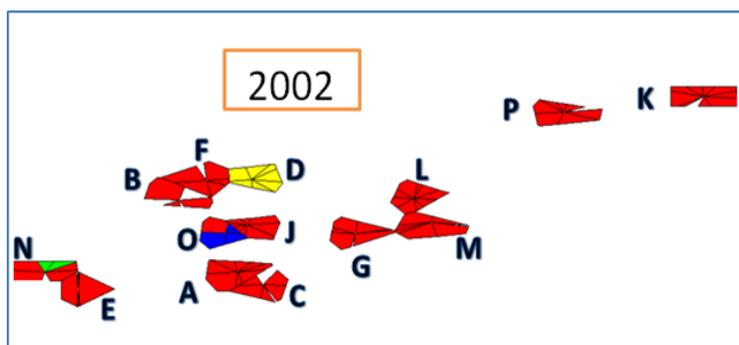


Figure 3 : Analyse de la structure des 14 populations effectuée grâce au logiciel BAPS6 dans le secteur de Chambéry-Le Bourget du Lac à partir d'individus collectés en 2002. Chaque site est annoté par une lettre dans le tableau ci-contre. Couleurs et polygones, voir texte.

Site	n°	2002	2011
Motte_Poney	A	Oui	Oui
Motte_Fourneaux	B	Oui	Oui
Cognin_Mollasses	C	Oui	Oui
Tremblay_Lagun	D	Oui	Oui
Aiguebelle_Lac_Sud	E	Oui	Oui
Tremblay_Serraz	F	Oui	Oui
Chamb_Combe	G	Oui	Oui
Cognin_Forezan	H	Non	Oui
Bourget_Chateau	I	Non	Oui
Motte_College	J	Oui	Oui
François_Tourbiere	K	Oui	Oui
Mery_Jacquièr	L	Oui	Oui
Sonnaz_Fontaine	M	Oui	Oui
Nances_Lac_Nord	N	Oui	Oui
Motte_Lycée	O	Oui	Non
Verel_Pragondran	P	Oui	Non

b) Structuration génétique Chambéry-Bourget en 2011

Entre 2002 et 2011, deux sites ont été supprimés (Motte_Lycée et Verel_Pragondran). En revanche, deux sites sont apparus, Bourget-Chateau et Cognin-Forezan, pour lesquels un effet fondateur pouvait être attendu.

L'analyse de la structuration des 14 sites en 2011 (figure 4) montre la présence de nombreux polygones de même couleur (vert), indiquant l'apparentement génétique et donc des échanges fréquents (organisation populationnelle).

Le site de tremblay-lagunage, isolé en 2002, n'est plus singularisé en 2011. Il est connecté avec les autres sites, et on peut faire l'hypothèse que ces échanges ont fait disparaître l'effet fondateur.

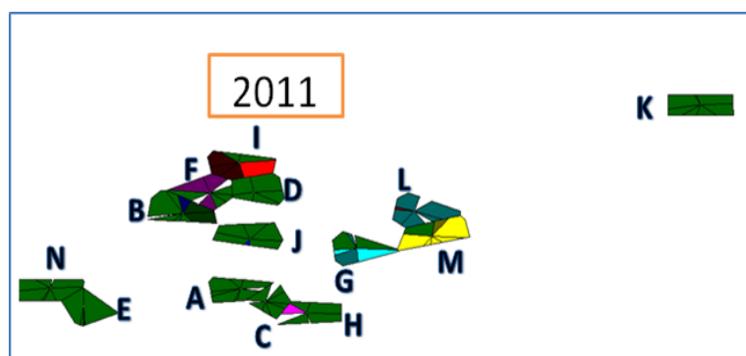


Figure 4 : Analyse de la structure des 14 populations effectuée grâce au logiciel BAPS6 dans le secteur de Chambéry-Le Bourget du Lac à partir d'individus collectés en 2011. Chaque site est annoté par une lettre dans le tableau ci-contre. Couleurs et polygones, voir texte.

Il y a maintenant 7 sites qui présentent une certaine singularité au sein de la population globale : les sites du Bourget-Chateau et de Cognin-Forezan - apparus récemment - pour lesquels on peut attribuer cette différenciation à deux effets fondateurs.

Les sites de Mery-Jacquière, Sonnaz-Fontaine et Chambéry-Combe apparaissent différenciés, contrairement à la structure de 2002 présenté plus haut. Néanmoins Safner et al. (2011) avaient observé ces trois sites comme relativement isolés. Les hypothèses proposées étaient un isolement provoqué par les barrière infranchissable que sont les routes et autoroutes du secteur. Ce facteur d'isolement est toujours d'actualité, et expliquerait la singularité génétique de ces trois sites.

Les deux derniers sites qui se distinguent sont la Motte-Fourneaux et Tremblay-Serraz. Il existerait donc une barrière aux flux d'individus se traduisant par un effet décelable au niveau génétique. Ces deux sites sont principalement séparés de la population globale par l'autoroute A43 et par la route RN504, et la même hypothèse sur le rôle de barrière peut être émise pour ces populations.

c) Evolution de la structuration génétique Chambéry-Bourget entre 2002 et 2011

La comparaison entre les sites de 2002 et 2011 dans l'analyse conjointe des données de 2002 et 2011 (figure 5), montre la continuité temporelle de la structure de la population (individus affiché en violet), une cohérence entre les analyses séparés des sites en 2002 et en 2011 avec l'analyse conjointe, mais aussi d'une augmentation de l'isolement des différents sites. L'hypothèse soutenue ici est que cette isolement provient d'une diminution des flux de gènes entre sites, et donc de échanges possibles d'individus. L'augmentation avérée de l'anthropisation et des flux routiers dans le secteur de Chambéry-Le Bourget est la cause la plus probable de cet isolement des sous-populations.



Figure 5 : Comparaison de la structure des 14 populations effectuée grâce au logiciel BAPS6 dans le secteur de Chambéry-Le Bourget du Lac à partir d'individus collectés en 2002 et 2011. Chaque individu est représenté par une ligne verticale, une même couleur indique une similitude génétique.

Nous avons également réalisé une analyse conjointe avec les 11 sites (au lieu de 14) pour 2002 et 2011, comme cela avait été fait dans le travail de Safner et al. (2011) (Figure 6 et 7). Une sous-

structuration apparait, qui n'avait pas été mise en évidence dans l'analyse précédente (Safner et al. 2011) :

- En 2002, Mery-Jacquière, Sonnaz-Fontaine et Chambéry-Combe et Verel-Pragondran sont isolés des autres sites et forment un groupe à part entière.
- En 2011, ce groupe est conservé même si la plupart des sites divergent les uns des autres, avec presque la moitié du pool génétique différencié pour chaque site. Les autres informations que l'on peut extraire de la carte de 2002 (Figure 6) sont similaires à celles détectées par l'analyse précédente (figure 3). Comme précédemment on observe aussi une augmentation de la différenciations entre 2002 et 2011 et le début de divergence de la Motte-Fourneaux et Tremblay-Serraz (Figure 7).

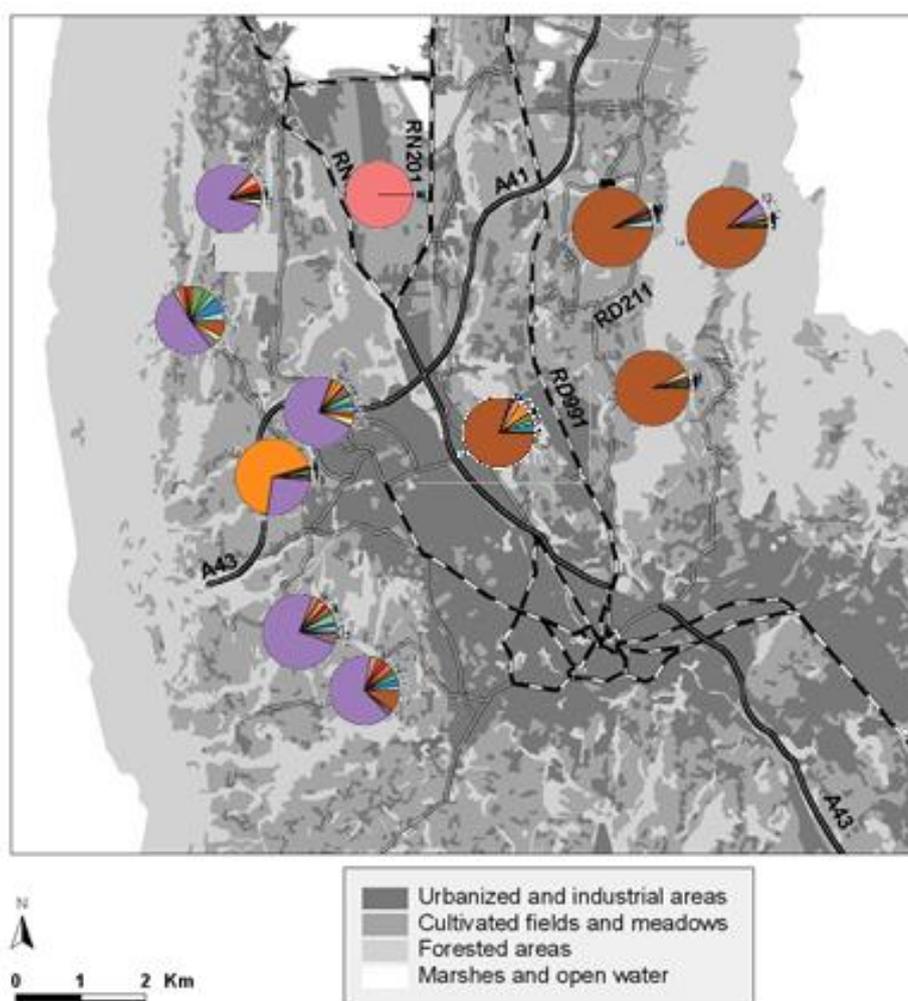


Figure 6 : Structuration génétique en 2002 des 11 du secteur Chambéry-Le Bourget du Lac obtenu à partir de BAPS et en analyse conjointe avec les données de 2011. Les parts attribuées à chaque cluster défini par BAPS6 pour chaque site sont représentées sous la forme de camemberts

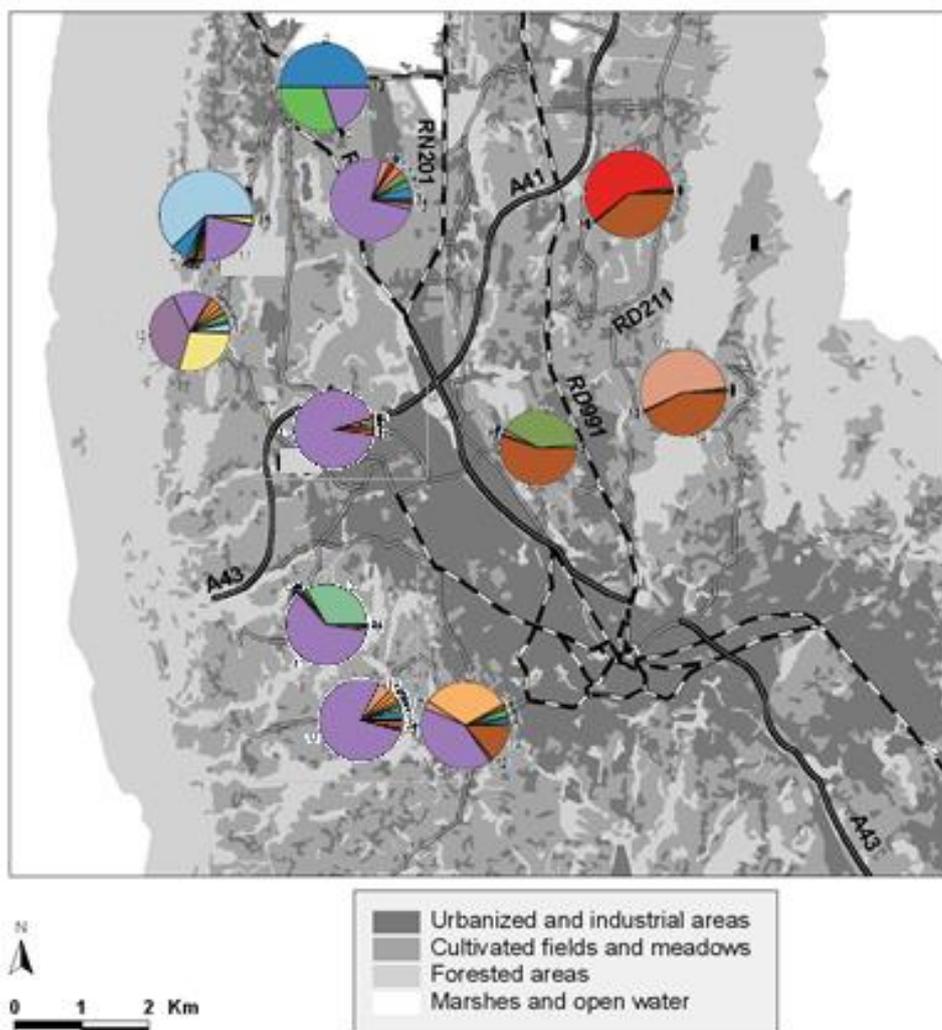


Figure 7 : Structuration génétique en 2011 des 11 du secteur Chambéry-Le Bourget du Lac obtenu à partir de BAPS et en analyse conjointe avec les données de 2002. Les parts attribuées à chaque cluster défini par BAPS6 pour chaque site sont représentées sous la forme de camemberts.

3.3. Discussion

La comparaison 2002-2011, permise par la conservation d'échantillons collectés en 2002, permet de vérifier les hypothèses émises dans le travail de Safner et al. (2011).

D'un point de vue général, on observe une augmentation de l'isolement génétique des sous-populations entre 2002 et 2011.

D'un point de vue particulier, l'hypothèse de l'effet fondateur proposé pour expliquer la singularité du site Tremblay-Lagunage apparaît plausible du fait que cette sous-population est maintenant

(2011) indissociable de la population globale, indique une bonne connectivité de ce site avec les autres sous-populations.

L'isolement observée autour de Mery, Chambéry le Vieux (Combe) et Sonnaz se confirme en 2011, et cet effet était déjà présent en 2002.

Les sites de Tremblay-Serraz et Motte-Fourneaux commence à apparaitre isolés en 2011 alors qu'ils ne l'étaient pas en 2002. C'est deux sites sont situés en marge du secteur le plus urbanisé (bas du piémont), et on aurait pu penser qu'ils sont relativement préservés. L'isolement génétique, observé en 2,5 générations, montre cependant que ces sous-populations subissent un effet de la modification générale de l'environnement de cette région.

Si les facteurs qui concourent à ces évolutions se maintiennent (comme l'augmentation du trafic routier), on doit s'attendre à ce que la métapopulation de Chambéry-Le Bourget du Lac se divise encore plus, avec une absence totale d'échanges possible entre les sous-populations. Il n'y aura donc plus de possibilité de recolonisation d'un site qui deviendrait favorable à l'espèce, ou d'un site où l'espèce aurait disparu suivant les aléas démographiques.

Le « nouveau » site du Bourget-Chateau différent à priori à cause d'un l'effet fondateur devrait converger avec vers une similarité génétique avec les sites géographiquement les plus proche (Tremblay-Serraz et Motte-Fourneaux). Cependant, on observe une augmentation de l'isolement de ces sites. Il n'est pas dit que les échanges soient maintenant possibles jusqu'à Bourget-Château, et ce site pourrait alors évoluer isolement.

Le « nouveau » site de Cognin-Forezan est issu d'une colonisation par des individus de Cognin-mollasses (données de radiopistage, mise en eau récente du site). Il est probable que ces deux sites vont converger génétiquement.

4. Conclusion et perspective :

Les objectifs du projet étaient (1) d'étudier les interactions entre le paysage et ses perturbations (au sens de la présence de milieux défavorables et/ou infranchissables) et la structure génétique (et les flux de gènes) chez la Grenouille rousse à l'échelle régionale, et (2) d'effectuer une comparaison temporelle entre 2002 et 2011 afin de mettre en évidence les facteurs environnementaux responsables de la structure et de son évolution potentielle.

a) Aspect spatial :

Les questions abordées sur la structuration génétique d'une espèce (sous-populations connectées, métapopulations, autres ?) font parties des interrogations majeures de la communauté scientifique en génétique du paysage (Martínez-Solano et al. 2005 ; Holderegger & Wagner 2008 ; Balkenhol et al. 2009a ; Anderson et al. 2010 ; Cushman & Landguth 2010a ; Dyer et al. 2010 ; Pavlacky et al. 2012 ; Manel & Holderegger 2013 ; Prunier et al. 2014).

L'analyse de 31 sous-populations à l'échelle de la région Chambéry-Grenoble apporte des informations pertinentes sur l'échelle de fonctionnement métapopulationnel du système. Dans notre proposition initiale, nous envisagions une étude à une échelle plus vaste (environ 50 sites), permettant d'inclure d'autres barrières potentielles (autoroute Grenoble-Lyon). Nous envisagions également de tester les effets éventuels des actions de prévention de la perte de connectivité (présence de passages à faune), ou de menaces sur les sous-populations (sites d'écrasement).

Le premier objectif concerne la conservation de la grenouille rousse avec l'identification éventuelle de zones particulièrement importantes pour la viabilité de l'espèce à une échelle « régionale », leur localisation en fonction de l'aménagement territorial en espaces protégés (Réserves, ENS, arrêtés de biotope, etc.).

L'inventaire réalisé en 2012 (Miaud, non publié, grâce aux informations fournis par les ONG de Savoie et Isère, et des conservatoires des espaces Naturels de ce deux départements) montre l'existence de 4 passages à amphibiens permanents et plus de 10 passages à amphibiens temporaires dans la zone d'étude, et il existe également un inventaire des sites d'écrasements (routes) pour les deux départements. La suite de ce travail – qui est programmé dans le cadre d'un projet de thèse (dossier de montage d'un financement de type CIFRE avec un bureau d'étude privé en cours, rédaction d'une réponse à l'appel d'offre Biodiversité du CG38 2015) - est de compléter les analyses génétiques sur les sites échantillonnés en 2011 (19 sites) et de réaliser des analyses

génétiques sur la structure régionale complète. Il ne s'agira non plus comme dans ce travail de faire une cartographie instantanée de cette structure, mais d'utiliser des outils d'analyse dynamique qui pourront évaluer le fonctionnement métapopulationnel : on pourra ainsi tester le rôle des différentes sous-population dans le fonctionnement global, le rôle des éco-passages, le rôle des populations situés dans des ENS. Ces analyses nécessitent des mois de travail à temps plein et seront aussi conçu dans un soucis de concertation avec les opérateurs de terrain afin de faire partager les questionnements, les analyses et les résultats.

La méthode proposée dans ce travail (problématique, échantillonnage, analyses génétiques, analyses statistiques) pourra également servir pour de nombreux autres organismes soumis aux changements environnementaux d'origine anthropiques et pour lesquels la réponse actuelle est la gestion d'espaces « réduits » (espaces naturels) et la mise en place de zones d'échanges (Trame Verte et Bleue).

b) Aspect temporel

L'estimation du temps de latence entre l'apparition d'une barrière géographiques telles que la fragmentation autoroutière et la mise en place d'une structuration génétique décelable est un enjeu majeur dans les études sur la connectivité (Holzhauer et al. 2006 ; Spear & Storfer 2008 ; Corlatti et al. 2009 ; Balkenhol & Waits 2009 ; Clark et al. 2010 ; Landguth et al. 2010 ; Prunier et al. 2014).

Les résultats de la comparaison 2002-2011 sont particulièrement intéressants car ils permettent d'expliquer les phénomènes provoquant les isolements ou regroupements de sous-populations. Outre une valorisation scientifique (publication) possible dès maintenant, ils démontrent l'intérêt de ces suivis temporels des populations, très rares dans la littérature. Nous n'avons actuellement qu'un intervalle de temps correspondant à 2,5 générations de la Grenouille rousse. Nous envisageons de réaliser une campagne de prélèvement en 2016 dans l'ensemble des sites de la région Chambéry-Grenoble afin d'en obtenir un deuxième pour la métapopulation de Chambéry-Le Bourget du Lac (2002-2011-2016) et un nouveau pour l'ensemble des autres sites (2011-2016).

Comme pour l'aspect spatial, nous replacerons ces résultats en regard des actions environnementales en cours sur le même territoire (ENS, passages à faune, augmentation du trafic, etc.). Les résultats attendus sont donc une évaluation du temps nécessaire pour que des actions de conservation (espaces protégés, écopassages, etc.) ou des modifications du paysage (urbanisation,

augmentation du trafic routier) s'inscrivent dans la structuration génétique d'un petit vertébré terrestre.



Reproduction de la Grenouille rousse *Rana temporaria* ©
Photo de Cyril Ruoso (<http://www.cyrilruoso.com/>)

6. Principales publications citées :

- Alvarez, N. Thiel-Egenter C, Tribsch A., Holderegger R., Manel S. et al. (2009). History or ecology ? Substrate type as a major driver of spatial genetic structure in Alpine plants. *Ecology Letters*, 12:632-240.
- Balkenhol N, Waits LP (2009) Molecular road ecology: exploring the potential of genetics for investigating transportation impacts on wildlife. *Molecular Ecology*, 18, 4151–4164.
- Cushman SA, Landguth EL (2010a) Scale dependent inference in landscape genetics. *Landscape Ecology*, 25, 967–979.
- Decout S., Manel S., Miaud C. & S. Luque, 2012 - Integrative approach for landscape-based graph connectivity analysis: a case study with the common frog (*Rana temporaria*) in human-dominated landscapes. *Landscape Ecology* 27(2): 267–279.
- Decout S., Manel S., Miaud C. & S. Luque, 2012 - Integrative approach for landscape-based graph connectivity analysis: a case study with the common frog (*Rana temporaria*) in human-dominated landscapes. *Landscape Ecology* 27(2): 267–279.
- Dyer RJ, Nason JD (2004) Population Graphs: the graph theoretic shape of genetic structure. *Molecular Ecology* 13, 1713-1727.
- Dyer RJ, Nason JD, Garrick RC (2010) Landscape modelling of gene flow: improved power using conditional genetic distance derived from the topology of population networks. *Molecular Ecology* 19, 3746-3759.
- Holderegger R, Wagner HH (2008) Landscape genetics. *Bioscience*, 58, 199–207.
- Jay F, Manel S, Durand E, Thuiller W, Taberlet P, Holderegger R, François O. (2012) Forecasting changes in population genetic structure of Alpine plants in response to global warming. *Molecular Ecology*. 21: 2353-2368.
- Jay F, Manel S, Durand E, Thuiller W, Taberlet P, Holderegger R, François O. (2012) Forecasting changes in population genetic structure of Alpine plants in response to global warming. *Molecular Ecology*. 21: 2353-2368
- Landguth EL, Cushman SA, Schwartz MK, et al. (2010) Quantifying the lag time to detect barriers in landscape genetics. *Molecular Ecology* 19, 4179-4191.
- Lizee, MH, Manel S., Mauffrey JF, Tatoni T, Deschamps-Cottin M (2012) Matrix configuration and patch isolation influences override the species-area relationship for urban butterfly communities. *Landscape Ecology*, 27: 159-169.
- Manel S, Holderegger R (2013) Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 614–621.
- Matsuba C. and J. Merilä (2009) - Isolation and characterization of 145 polymorphic microsatellite loci for the common frog (*Rana temporaria*). *Mol Ecol resources* 9: 555-562.
- Prunier JG, Kaufmann B, Léna J-P et al. (2014) A 40-year-old divided highway does not prevent gene flow in the alpine newt *Ichthyosaura alpestris*. *Conservation Genetics*, 15, 453–468.
- Safner T, Miller MP, Mcrae B, Fortin MJ, Manel S (2011) Comparison of Bayesian clustering and edge detection methods for inferring boundaries in landscape genetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 12:865-889.

- Safner T., C. Miaud, O. Gaggiotti, S. Decout, D. Rioux, S. Zundel and S. Manel (2011) Combining demography and genetic analysis to assess the population structure of an amphibian in a human-dominated landscape. *Conservation Genetics*, 12:161–173.
- Safner T., C. Miaud, O. Gaggiotti, S. Decout, D. Rioux, S. Zundel and S. Manel (2011) Combining demography and genetic analysis to assess the population structure of an amphibian in a human-dominated landscape. *Conservation Genetics*, 12:161–173.
- Segelbacher G, Cushman SA, Epperson BK, Fortin MJ, Francois O, Hard O, Holderegger R, Taberlet P, Waits LP, Manel S (2010) Landscape Genetics: Concepts and Challenges in a conservation context. *Conservation Genetics*, 11:375-385.
- Sinsch U., Oromi N., Miaud C., Denton J. & D. Sanuy, 2012 - Connectivity of local amphibian populations: modeling the migratory capacity of radio-tracked natterjack toads. *Animal Conservation*, in press.

ANNEXE

Annexe 1

Figure tirée de Safner et al. (2011)

Représentation de la structure génétique obtenus à partir de l'analyse Baps des échantillons de 2002 génotypé avec 7 autres locus microsatellites

Les camemberts représente la part de chaque cluster déterminée à l'aide du programme « baps » au sein de chaque site aquatique.

