



HAL
open science

Flux de gènes inter- et intra-spécifiques chez des espèces de vallées alluviales : cas des tritons palmés et ponctués en vallée de la Loire

Aurélie Johanet

► **To cite this version:**

Aurélie Johanet. Flux de gènes inter- et intra-spécifiques chez des espèces de vallées alluviales : cas des tritons palmés et ponctués en vallée de la Loire. Interactions entre organismes. Université d'Angers, 2009. Français. NNT : . tel-00477761

HAL Id: tel-00477761

<https://theses.hal.science/tel-00477761>

Submitted on 30 Apr 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE D'ANGERS**

Spécialité : **Biologie des organismes**

Ecole doctorale : **VENAM**

Présentée par

Aurélie Johanet

**Flux de gènes inter- et intra-spécifiques chez des espèces de vallées
alluviales : cas des tritons palmés et ponctués en vallée de la Loire**

Devant le jury ci-dessous :

M. François Bonhomme , Directeur de recherche, CNRS Montpellier	Rapporteur
M. Mathieu Denoël , Chercheur Qualifié FNRS, Université de Liège	Rapporteur
M. Claude Miaud , Professeur, Université de Savoie	Examineur
M. Michel Baguette , Professeur, MNHN Paris	Examineur
M. Alain Pagano , Maître de Conférences HDR, Université d'Angers	Directeur
M. Christophe Lemaire Maître de Conférences, Université d'Angers	Co-encadrant

Directeur de Thèse de 2005 à 2006 : **Thierry Lodé** (Professeur, Université d'Angers)

Equipe GECCO, LEESA, Université d'Angers, 2 bd Lavoisier, 49045 ANGERS Cedex, France

UMR 77 PaVé, INRA Agrocampus Ouest, 42 rue Georges Morel, 49070 Beaucouzé, France

REMERCIEMENTS

Une liste exhaustive serait impossible. C'est pourquoi, en particulier, je voudrais dire

Merci

à François Bonhomme, Mathieu Denoël, Claude Miaud et Michel Baguette qui ont accepté de juger cette thèse et d'y apporter des critiques constructives.

à Christophe Lemaire sans qui ces recherches n'auraient pas été aussi croustillantes. Ses idées, ses compétences, sa curiosité ont permis d'enrichir la totalité de mes recherches. Sa détermination et son optimisme ont permis d'avancer à toutes les étapes de cette aventure.

à Thierry Lodé pour m'avoir offert cette chance et à Alain Pagano pour avoir accepté de reprendre la direction de la thèse.

à Jean Secondi pour m'avoir intégrée dans ses recherches menées en éthologie mais aussi pour toutes les fois où il est intervenu dans ma thèse. Sa connaissance du modèle biologique, ses avis m'ont souvent permis de prendre du recul et ont été déterminants sur divers points de la thèse.

à Olivier Pays pour ses précieux conseils en statistiques à chaque fois que je le sollicitais.

à Nicolas Bierne et Sandrine Plénet pour leur sympathie et leurs conseils avisés lors des réunions du comité de thèse. A chaque fois ce travail a pu être recadré de façon pertinente.

à Stéphane Sourice et Viviane Hardouineau qui m'ont aidée à tous les stades de ma thèse. Plus que l'aide technique, leur soutien moral a été de très grande importance pendant ces quatre années !

à tous ceux qui m'ont aidée sur le terrain et ont rendu le barbotage encore plus rigolo (« au moins on a bien rigolé ! ») : Alexandre Monguillon, Richard Robin, Tangui Duret, Edouard Beslot, Didier Faux, Julien Goebel, Laurent Lemonnier, Fabien Solé, Jonathan Dobigeon,

Guillaume Réthoré, Antoine Leclerc. Même si bien souvent nous rentrions bredouilles on ne revenait jamais déçus ; plus que des stagiaires, quelques uns sont devenus de très bons amis. Merci aussi aux étudiants, amis et proches qui se sont prêtés au jeu pour un soir ou deux et se sont initiés aux joies du terrain.

à tous ceux qui ont bien voulu échantillonner pour nous ou nous envoyer des petits bouts de tritons : Pim Arntzen, Mickaël Barrioz, Trevor Beebee, Francisco Javier Diego-Rasilla, Julien Endelin, Franck Grossiord, Christiane Jakob, Pierre Joly, Martina Lužnik, Jon Loman, Claude Miaud, Alexandre Monguillon, Pierre Marty, François Oger, Cécile Patrelle, Dirk Schmeller, Jon Skei, Gaël Zannetty.

à Trent Garner, Robert Jehle, Deborah Dawson et Didier Peltier qui ont partagé avec moi le défi ambitieux (ou extravagant) du développement de marqueurs microsatellites pour le triton palmé ...

à Tanguy Duret, François Saves, David Henriot et Julien Goebel pour les coups de main qu'ils ont donné en génétique et le partage de déboires ou au contraire de belles découvertes.

à l'équipe de neurophysio, en particulier Hélène Tricoire-Leignel, Christian Legros et Sophie Quinchard, pour leur gentillesse et pour tous les p'tits tuyaux échangés en salle bio mol.

à Solène Couëdel pour m'avoir accueillie à la plate-forme de génétique Ouest-Génope à l'INRA du Rheu et aux techniciennes pour tous les conseils qui m'ont permis de gagner du temps.

à Virginie Ducrot pour m'avoir hébergée chez elle sur Rennes pendant une bonne partie des manips (euh...3 mois ?) et de m'avoir changé les idées à coup de danse bretonne et de séries US pendant cette période un peu stressante.

à Richard Robin d'avoir accepté de se coller aux essais de squelettochronologie sur tritons palmés, ce n'était pas gagné d'avance... et ça ne l'est toujours pas... Merci quand même à Robert Filmon et Sonia Georgault du service commun d'imagerie et d'analyse

microscopiques (SCIAM) pour nous avoir donné accès au microscope électronique pour nos coupes de doigts.

à Jonathan Dobigeon pour l'aide qu'il m'a apportée dans l'utilisation des SIG, sans son esprit d'initiative et son autodidactisme nous n'y serions peut être pas parvenus !

à Véronique Chureau de l'accueil pour son naturel et sa serviabilité.

à mes collègues et amis Audrey Chaput-Bardy, Cécile Patrelle, Virginie Lepetz et Jérôme Legentil pour tous les supers moments partagés et toutes nos discussions existentielles. Je leur souhaite chance et courage pour la suite (et amour aussi).

à mes amis qui se sont intéressés jusqu'au bout (peut-être n'y croyaient-ils plus) aux tritons et à l'histoire de ma thèse. Merci de m'avoir encouragée et surtout d'exister tout simplement.

à Fabrice de se charger bien souvent seul de ce que je n'ai jamais le temps de faire... merci surtout de m'épauler de divers façon au quotidien et de donner du piment à ma vie en dehors de la thèse !

à mes parents pour m'aimer autant. Sans leur confiance (ou leur patience) je n'aurai jamais pu écrire ces lignes. Evidemment plus qu'un soutien matériel, c'est un soutien moral inébranlable.

Cette thèse a été financée par Angers Loire Métropole, la Région Pays-de-Loire et La DIREN Pays-de-Loire et une partie des analyses génétiques à la plateforme Ouest-Génopole a été financée par la Région Bretagne

SOMMAIRE

PREAMBULE : DE L'ECHELLE MACRO- A L'ECHELLE MICRO-EVOLUTIVE	1
--	----------

CHAPITRE I – ETAT DE L'ART.....3

1 - L'hybridation et l'isolement reproducteur ou comment maintenir son intégrité face à un flux de gènes.....	3
L'étude de l'hybridation	3
Les barrières d'isolement reproducteur chez les amphibiens.....	4
L'influence de l'environnement sur l'introgression	6
2 – Les flux de gènes intraspécifiques et la structure de population neutre et sous sélection.....	11
Capacités dispersives et structure de population chez les amphibiens.....	11
La génétique du paysage : barrières et corridors au flux de gènes	18
Les flux de gènes et l'adaptation chez les amphibiens	23
3 - Les modèles biologiques tritons palmés et ponctués	26
Répartition	26
Description	27
Biologie, éthologie	28
Ecologie.....	31
Menaces et intérêt de l'étude de la génétique des populations de tritons palmés	32
Spéciation et hybridation des tritons palmés et ponctués	33
4 - Les caractéristiques d'une vallée alluviale et le cas de la vallée de la Loire	37
Les annexes hydrauliques et la biodiversité	37
Les annexes hydrauliques de la Loire.....	38
5 - Plan de la thèse.....	43

CHAPITRE II – SITES ET PROTOCOLES D'ETUDE.....45

1 - L'échantillonnage.....	45
L'échantillonnage en Vallée de la Loire.....	45
L'échantillonnage en Europe.....	46
2 - Mise au point de marqueurs moléculaires	50
Les marqueurs microsatellites	50
ARTICLE 1 – CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE LOCI IN TWO CLOSELY RELATED <i>LISSOTRITON</i> NEWT SPECIES	50
Les marqueurs mitochondriaux	55
3 - Caractérisation du paysage.....	59
4 - Mesures morphométriques.....	60

CHAPITRE III – ETUDE DE L’ISOLEMENT REPRODUCTEUR ENTRE DEUX ESPECES SYMPATRIQUES.....61

ARTICLE 2 – WIDESPREAD INTROGRESSION DOES NOT LEAK INTO ALLOTOPY IN A BROAD SYMPATRIC ZONE. 63

ARTICLE 3 - A CASE OF REPRODUCTIVE CHARACTER DISPLACEMENT IN FEMALE PALMATE NEWTS (*LISSOTRITON HELVETICUS*) 107

ARTICLE 4 – ASYMMETRIC SEX AND SPECIES RECOGNITION IN NEWTS, IMPLICATIONS FOR THE HYBRIDIZATION PROCESS IN A BROAD CONTACT ZONE. 119

CHAPITRE IV – STRUCTURE DES POPULATIONS DE TRITONS PALMES EN VALLEE DE LA LOIRE.....151

Introduction 151

Matériel et Méthodes..... 154

Echantillonnage 154

Génotypage..... 155

Analyse des données..... 155

Résultats 163

Analyse de la diversité génétique intra-population 163

Analyse de la structure génétique entre populations 166

Estimation bayésienne de la structure de population..... 174

Effet des cours d’eau et de la topographie sur la structure de population 175

Rôle de la vallée dans le flux de gènes 179

Discussion..... 181

Un patron d’isolement par la distance et un fonctionnement en métapopulation 181

Un flux génétique relativement important..... 182

Pas de barrières paysagères évidentes à la dispersion 184

Les flux de gènes en vallée alluviale 185

Conclusion..... 186

CHAPITRE V – FLUX DE GENES ET ADAPTATIONS.....189

Introduction 189

Matériel et méthodes 192

Echantillonnage 192

Analyses génétiques 193

Analyses du polymorphisme au locus du CMH-*DAB* 193

Résultats 196

Phylogénie des séquences de CMH-*DAB*..... 196

Diversité au locus du CMH-*DAB* 197

Structure génétique au locus du CMH-*DAB* 199

Détection de la sélection au locus du CMH-*DAB* 203

Discussion.....	205
Phylogénie des séquences de CMH- <i>DAB</i> et potentialités d'introgession avec le triton ponctué	205
Une sélection positive à l'échelle européenne.....	206
Variation au locus du CMH- <i>DAB</i> à l'échelle régionale	208
Conclusion.....	208

CHAPITRE VI – DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES209

Flux de gènes interspécifiques : hybridation et isolement reproducteur chez deux espèces largement sympatriques.....	209
Les barrières prézygotiques et l'influence de l'environnement.....	210
Les barrières postzygotiques	211
Conséquences de l'hybridation.....	212
Perspectives dans l'étude de l'hybridation et de l'isolement reproducteur	213
Conclusion.....	215
Flux de gènes interspécifiques: Flux de gènes neutres et sous sélection chez une espèce ubiquiste	217
Rappel des principaux résultats	217
Perspectives dans l'étude de la génétique du paysage.....	219
Perspectives dans l'étude de la sélection au CMH.....	220

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES221

ANNEXE I – LA SQUELETTOCHRONOLOGIE247

PREAMBULE : DE L'ECHELLE MACRO- A

L'ECHELLE MICRO-EVOLUTIVE

Le flux de gènes est défini comme le passage des gènes par reproduction d'un groupe d'organismes à un autre. Il peut se faire au travers des frontières de l'espèce (flux de gènes **interspécifique**) ou à l'intérieur d'une espèce, entre populations (flux de gènes **intraspécifique**). Ces deux modalités de flux de gènes peuvent être conditionnées par des facteurs **endogènes** (sélection sexuelle ; capacité dispersive de l'espèce) et/ou **exogènes**. Dans ce dernier cas, le paysage peut par exemple jouer un rôle positif (corridor) ou au contraire négatif (barrière à la reproduction ; barrière à la dispersion) sur le maintien des ressemblances génétiques entre individus.

Les amphibiens sont retrouvés sur tous les continents excepté l'Antarctique. Ils exhibent une grande diversité de stratégies de reproduction et des traits d'histoire de vie. Ce sont les tétrapodes actuels les plus primitifs. Il est alors attendu que de nombreuses barrières prézygotiques et postzygotiques se soient mises en place. Pourtant, malgré des divergences génétiques importantes, **beaucoup d'espèces continuent à échanger des gènes**. Il apparaît, entre autres que la diversité des formes, des couleurs et des comportements ne permet pas toujours la mise en place de barrières prézygotiques complètes. De plus, la plupart des amphibiens de milieu tempéré se rassemblent dans des mares de taille restreinte pour se reproduire, favorisant l'occurrence de croisements interspécifiques, et donc d'hybridation.

La philopatrie des amphibiens et leurs capacités dispersives limitées contribuent souvent à structurer les populations ; les amphibiens sont les vertébrés montrant **les plus forts niveaux de différenciation génétique** entre populations. En particulier, les espèces à cycle de vie biphasique sont régulièrement contraintes de se déplacer d'un habitat aquatique à un habitat terrestre. Les amphibiens représentent donc un modèle de choix pour l'étude de la génétique des populations et de l'influence des éléments paysagers sur le flux de gènes entre populations (*i.e.* **génétique du paysage**). La grande variabilité des milieux qu'ils occupent est une occasion pour explorer les **adaptations locales**, et plus particulièrement, les relations complexes entre flux de gènes neutre et sous sélection.

Dans cette thèse, les phénomènes de flux de gènes neutre et sous sélection à l'échelle macro- et microévolutive seront étudiés chez deux espèces de tritons, le triton palmé et le triton ponctué, dans un paysage particulier : la vallée alluviale. Cette thèse s'inscrit dans le plan Loire Grandeur Nature. Elle est financée en partie par la DIREN Pays-de-Loire qui coordonne les travaux d'études et de gestion sur les annexes hydrauliques de la Loire. La DIREN souhaitait notamment connaître l'impact du fleuve, d'une part sur la distribution des communautés d'amphibiens des annexes hydrauliques de la Loire (l'étude réalisée n'est pas présentée dans la thèse, mais disponible sur demande) et d'autre part, sur la connectivité des populations d'une espèce modèle d'amphibien.

CHAPITRE I

ÉTAT DE L'ART

1 - L'hybridation et l'isolement reproducteur ou comment maintenir son intégrité face à un flux de gènes

L'étude de l'hybridation

Depuis l'exploration de l'origine des espèces par Charles Darwin (1859), l'hybridation et l'étude de la spéciation ont fait l'objet de nombreux débats (Coyne & Orr 2004). Alors que les zoologistes, tels que Theodosius Dobzhansky (1937) et Ernst Mayr (1942), considéraient les animaux hybrides comme « rares » ou « exceptionnels », les botanistes ont très tôt considéré l'hybridation comme un mécanisme répandu, générateur important de diversité génétique et donc comme un processus évolutif important (Stebbins 1950). Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de multiplier les recherches sur l'hybridation pour des systèmes biologiques très divers (Mallet 2005). L'hybridation dans la nature se révèle plus commune que ce que l'on supposait à l'origine. Elle impliquerait approximativement 10% des espèces animales et 25% des espèces végétales (Mallet 2005). Lorsque l'hybride est viable et fertile, le flux de gènes peut quelquefois franchir les barrières de l'espèce par le biais des rétrocroisements (ou *backcross*) avec l'une ou les deux espèces parentales (Rieseberg & Wendel 1993). L'incorporation de gènes d'une espèce dans le complexe génique d'une autre à travers l'hybridation a été nommée introgression par Anderson & Hubricht (1938).

Depuis les cinquante dernières années, l'étude de l'hybridation et de l'introgression ont permis de mieux mettre en évidence les différentes composantes de l'isolement reproducteur entre espèces (Ramsey *et al.* 2003), ainsi que la façon dont les flux de gènes et la recombinaison peuvent agir pour **générer de nouveaux haplotypes** facilitant l'adaptation (Arnold 1997). Les zones hybrides représentent à ce titre un outil privilégié pour étudier les processus de divergence entre lignées, et les mécanismes limitant les échanges génétiques pouvant aboutir à la spéciation, ou au contraire la rencontre d'entités plus ou moins différenciées.

Les barrières d'isolement reproducteur chez les amphibiens

Le concept biologique de l'espèce (Mayr 1942) s'appuie entièrement sur l'isolement reproducteur, c'est-à-dire l'ensemble des facteurs biologiques (barrières) qui vont empêcher les membres de deux espèces distinctes d'engendrer une progéniture viable et féconde. Dobzhansky (1937) distingue les barrières intervenant avant l'accouplement ou la fécondation (barrières prézygotiques) des barrières intervenant après (barrières postzygotiques) (cf. encadré 1).

Encadré 1 : Les barrières d'isolement reproducteur (Coyne & Orr 2004)

Les barrières prézygotiques

- l'isolement **écologique** ou d'habitat lorsque dans une même région géographique, les populations occupent des habitats différents.
- l'isolement saisonnier ou **temporel**, lorsque la copulation a lieu à des moments différents.
- l'isolement **sexuel ou éthologique**, lorsque l'attraction sexuelle entre membres d'espèces différentes est faible ou nulle.
- l'isolement **mécanique**, lorsqu'une incompatibilité anatomique entre organes génitaux empêche la fécondation.
- l'isolement **gamétique**. Chez les organismes à fécondation externe, les gamètes mâles et femelles d'espèces différentes peuvent ne pas s'attirer les uns avec les autres. Chez les organismes à fécondation interne, les gamètes d'une espèce peuvent être inaptes à survivre dans les conduits génitaux d'une autre espèce.

Les barrières postzygotiques

- la **léthalité** des hybrides lorsque la viabilité des zygotes hybrides est réduite ou nulle.
- la **stérilité** des hybrides lorsque les hybrides F₁ d'un sexe, ou des deux, sont incapables de produire des gamètes fonctionnels.
- la **dégénérescence** des hybrides lorsque la viabilité ou la fertilité des hybrides de deuxième génération (F₂) ou de rétrocroisements est réduite.

Parmi les barrières **prézygotiques** les plus efficaces chez les amphibiens, l'isolement écologique est souvent reporté. Par exemple, chez les grands tritons, alors que leurs habitats sont similaires en allopatrie, en sympatrie les tritons marbrés *Triturus marmoratus* sont retrouvés en terrain vallonné et boisés et les tritons crêtés *T. cristatus* en milieux plats et ouverts (Schoorl & Zuiderwijk 1981). Leur période de reproduction est aussi décalée (Bouton 1986). L'isolement sexuel des amphibiens se base souvent sur plusieurs signaux de reconnaissance (e.g. visuel, auditif, sensoriel, Duellman & Trueb 1994). De nombreuses espèces utilisent des phéromones intervenant dans la communication chimique (Osikowski *et al.* 2008; Palmer *et al.* 2005; Rajchard 2005). Chez les urodèles, les comportements de parade sont très élaborés et montrent des différences entre espèces proches (Sparreboom 1986; Wambreuse 1984; Zuiderwijk 1990). Les barrières mécaniques et gamétiques sont citées de façon plus anecdotique (Beachy 1996; Islam *et al.* 2008).

Les barrières **postzygotiques** chez les amphibiens semblent particulièrement perméables. Leurs faibles taux d'évolution moléculaire sont probablement responsables de la diminution d'incompatibilités génétiques entre espèces (Martin & Palumbi 1993; Wilson *et al.* 1974). Les travaux d'Avise *et al.* (1998) montrent que la spéciation chez les amphibiens est généralement un phénomène plus long que chez les autres vertébrés. Des expériences de croisements menées chez 92 espèces de crapauds révèlent qu'un temps de divergence important (voir Malone & Fontenot 2008) est nécessaire avant que l'isolement reproducteur soit complet. Les tritons européens ont eux aussi montré leur capacité d'hybridation naturelle (Arntzen *et al.* 1998; Arntzen *et al.* 2009; Babik *et al.* 2005a; Maletzky *et al.* 2008; Mikulíček *et al.* 2004) ou par croisements expérimentaux (Benazzi 1957; Braaksma 1948; Cogălniceanu 1994; Mancino *et al.* 1978; 1979; Raghianti *et al.* 1980; Spurway & Callan 1960). L'isolement postzygotique peut affecter les hybrides des deux sexes, voire d'un seul. D'après la règle de **Haldane** (1922), lorsque un sexe est absent, rare, ou stérile, parmi les hybrides de première génération (*i.e.* F₁) de deux taxons animaux, il s'agit du sexe hétérogamétique (*i.e.*, XY or ZW). De nombreux exemples chez différents taxons ont alimenté cette règle très empirique et plusieurs hypothèses ont été avancées pour en expliquer les fondements génétiques (voir Coyne & Orr 2004). Par exemple, chez les tritons, les mâles constituent le sexe hétérogamétique (XY) (Hillis & Green 1990). Arntzen *et al.* (2009) ont détecté un excès de femelles (72%) chez des hybrides issus du croisement naturel entre tritons marbrés *Triturus marmoratus* et crêtés *T. cristatus*.

L'influence de l'environnement sur l'introgression

La maintenance de l'intégrité de deux espèces, ou au contraire le potentiel créatif de l'hybridation naturelle, dépend de la production de génotypes recombinants qui présenteront ou non une meilleure valeur sélective (*i.e. fitness*) que leurs parents. La valeur sélective de l'hybride peut être influencée par la sélection endogène ou exogène (*cf.* encadré 2). Par exemple, la sélection exogène exercée sur les sonneurs est à l'origine de la formation d'une zone hybride en mosaïque ; les sonneurs à ventre de feu *Bombina bombina* se reproduisant dans des vallées et prairies alluviales (plutôt adaptés aux milieux semi-permanents) et les sonneurs à ventre jaune *B. variegata*, dans des flaques de plateaux (plutôt adaptés aux milieux temporaires) (Vines *et al.* 2003; Yanchukov *et al.* 2006). Les salamandres tigrées *Ambystoma tigrinum mavotium* et *A. californiensis* forment une zone hybride qui dépend de l'hydrologie et l'écologie de la mare (Fitzpatrick & Shaffer 2004). Ce type de zone hybride est aussi documentée chez les grenouilles vertes en Europe (Pagano *et al.* 2001) ou encore chez les crapauds *Bufo americanus* et *B. fowleri* en Ontario (Green & Parent 2003).

Encadré 2 : la sélection endogène et exogène

La sélection endogène

Elle impose le maintien de différents allèles dans différents fonds génétiques par le biais d'**interactions incompatibles** à l'intérieur du génome (irrégularités méiotiques, anormalités physiologique ou de développement...). La sélection endogène peut aboutir au développement de **zones de tension** (Barton & Hewitt 1985), dans lesquelles les clines étroits sont maintenus par un équilibre entre immigration d'individus purs et sélection contre leur progéniture hybride.

La sélection exogène

Elle impose le maintien de différents allèles dans différents **environnements** par le biais de compromis (*trade-offs*) liés à l'**adaptation locale**. La distribution des génotypes à l'intérieur de la zone de contact est donc gouvernée par l'adaptation aux différents environnements (Burke & Arnold 2001). Elle est susceptible d'apparaître dans une **zone hybride en mosaïque** dans laquelle différentes populations ségrègent spatialement selon la distribution des habitats (Endler 1977).

L'influence de l'environnement sur les probabilités de croisements interspécifiques

Pour diverses raisons, la littérature regorge d'exemples pour lesquels l'environnement, joue un rôle sur les probabilités de reproduction avec un partenaire hétérospécifique.

La **perception des signaux de reconnaissance spécifique** est directement liée à la qualité de l'habitat. Les habitats aquatiques sont particulièrement intéressants. En effet, les signaux visuels dépendent d'une combinaison entre le spectre de lumière transmis à travers l'habitat terrestre, et le spectre résultant des caractéristiques optiques de l'eau (Endler 1990; 1991). L'efficacité des signaux olfactifs dépendra des caractéristiques chimiques de l'eau comme le pH ou la quantité d'acide humique (Fisher *et al.* 2006; Heuschele & Candolin 2007; Hubbard *et al.* 2002). Ainsi, chez les cichlides du Lac Victoria, les mécanismes d'isolement reproducteur basés sur la couleur sont atténués dans les eaux rendues turbides par les activités humaines (Seehausen *et al.* 1997). Chez les salamandres tigrées *Ambystoma tigrinum mavortium* et *A. californiense*, la fréquence des allèles introgressés est plus élevée dans les mares artificielles (turbides et eutrophes) que dans les autres types de mares saisonnières (Fitzpatrick & Shaffer 2004).

Lorsqu'une **espèce est plus abondante** que l'autre, la rareté d'un partenaire conspécifique augmente la fréquence d'accouplements hétérospécifiques (Hubbs 1955; Randler 2002; Secondi *et al.* 2006). Une espèce peut être rare en bordure de son aire de répartition (Brown 1984; Brown *et al.* 1995), parce qu'elle explore de nouveaux habitats (Cordero & Summers-Smith 1993) ou par impact anthropique. Par exemple, la déforestation et la fragmentation de l'habitat dans la Cordillère des Andes colombienne sont responsables de la décimation des populations de passereaux, de la difficulté à trouver un partenaire conspécifique, et donc des probabilités croissantes d'hybridation entre deux espèces de passereaux (Cadena *et al.* 2007).

De la même façon, le **biais de sex-ratio** d'une espèce augmente la probabilité d'accouplements hétérospécifiques (Wirtz 1999). Ainsi, les mâles de nombreuses espèces d'anoures au *sex-ratio* opérationnel déséquilibré (ex 8:1 pour le crapaud commun, Brede & Beebee 2006) tentent des pseudo-copulations avec d'autres espèces (sans pour autant qu'il y ait fécondation).

Les invasions d'espèces provoquées par l'homme (Arnold 1997; Goodman *et al.* 1999) et les organismes génétiquement modifiés (Raybould & Gray 1994), peuvent contribuer à la création de nouveaux processus d'hybridation. En outre, l'**influence anthropique** (par destruction d'habitat notamment) peut favoriser des remises en contact de deux espèces ayant initialement des habitats séparés écologiquement ou spatialement et donc des hybridations

(Den Nijs 1999). Ainsi, la création de rigoles de drainage favorise la formation de zones-hybrides entre trois espèces de *Rorippa* (Brassicaceae) (Bleeker & Hurka 2001). Chez les Protéacées *Banksia hookeriana* et *B. prionotes*, l'hybridation n'a lieu que dans les habitats perturbés (bords de routes, puits de mines abandonnées, lignes de chemin de fer, coupe-feu...); dans ces environnements anthropisés, le meilleur accès aux ressources à travers la réduction de niveau des ressources génère des plantes plus grosses qui produisent plus de fleurs. Consécutivement, la floraison précoce d'une espèce et prolongée chez l'autre espèce cassent la barrière phénologique (Lamont *et al.* 2003). Dans des forêts de pins en Allemagne, la pollution de l'air a permis l'invasion d'espèces de violettes qui produisent des hybrides plus adaptées que les espèces parentes (Neuffer *et al.* 1999). L'hybridation est plus importante dans les paysages fragmentés semi-ruraux entre les noyers *Juglans cinerea* et *J. ailantifolia* (Hoban *et al.* 2009).

L'environnement, l'introgression différentielle et la sélection naturelle des hybrides

La diminution de valeur sélective des hybrides est généralement due à la dépression hybride qui résulte de la réduction de l'adaptation locale ou de rupture de complexes de gènes co-adaptés (Shields 1993). Néanmoins, les forces évolutives affectent différemment les parties du génome. Des analyses récentes utilisant plusieurs marqueurs moléculaires ont mis en évidence l'**hétérogénéité** des patrons de différenciation entre marqueurs, faisant le lien avec les bases génétiques de l'isolement et l'adaptation écologique. Des études d'introgression menées à grande échelle sur des génomes de cotons (Martinsen *et al.* 2001), de chênes (Scotti-Saintagne *et al.* 2004), de tournesols (Bull *et al.* 2006), de drosophiles (Machado *et al.* 2007), de moustiques (Turner *et al.* 2005) et de souris (Payseur *et al.* 2004) concluent que la perméabilité aux allèles étrangers varie selon les génomes et leurs différentes portions. Les conséquences évolutives du flux de gènes interspécifiques dépendent donc largement des facteurs environnementaux. De la même façon que la reproduction sexuée peut combiner plusieurs groupes d'allèles différents dans un fond génétique commun et permettre l'adaptation, l'hybridation entre espèces peut transférer les allèles d'un fond génétique dans un autre si cela n'est pas **contrecarré par la sélection** (Rieseberg *et al.* 2003). Dans le contexte particulier des milieux alluviaux, une étude récente sur les iris de Louisiane met en évidence que l'introgression par certains allèles du génome d'*Iris fulva* (tolérant les crues du Mississippi) accroît la survie des *Iris brevifolia* dans des conditions extrêmes d'inondation (Martin *et al.* 2006), alors que ces derniers ne tolèrent pas l'inondation dans leur habitat

originel (plateaux). Chez les crapauds, les femelles de *Spea bombifrons* produisent plus d'hybrides viables (qui atteignent la métamorphose plus rapidement) en se croisant avec des mâles de *S. multiplicata* dans des mares très éphémères. Les travaux expérimentaux de Parris *et al.* (1999) effectués sur les grenouilles léopards suggèrent que les hybrides seraient plus adaptés (développement larvaire plus rapide) que l'un des phénotypes parentaux (*Rana blairi*) dans des environnements fluctuants et imprévisibles.

Au contraire, certains gènes sous sélection, associés à un choix de partenaire sexuel assorti, **permettent ou maintiennent l'isolement reproducteur** entre espèces (Dieckmann & Doebeli 1999; Kondrashov & Kondrashov 1999). Par exemple, le choix d'un partenaire reproducteur le mieux adapté aux locus du complexe majeur d'histocompatibilité (*i.e.* **CMH**) peut favoriser certaines adaptations locales et donc accélérer le processus de séparation des populations ou des espèces, amenant les gènes du système immunitaire à agir comme des gènes pléiotropiques de la spéciation (*i.e.* "traits magiques", Eizaguirre *et al.* 2009). Eizaguirre *et al.* (2009), suite aux travaux de Scharsack *et al.* (2007) sur les épinoches *Gasterosteus aculeatus* de lacs et de rivières, ont imaginé le modèle suivant. Trois groupes de poissons sympatriques, limnétiques, benthiques et leurs hybrides, vivent dans un lac avec deux habitats : limnétique et benthique. Chaque écotype a développé une défense immunitaire contre les parasites sympatriques. Dans l'habitat limnétique, une augmentation de la charge parasite décroît la valeur sélective de l'écotype benthique et *vice versa*. La figure I.1 (a) montre que la sélection exercée sur les gènes du CMH par une communauté de parasites fixes augmente la fréquence des génotypes les mieux adaptés (limnétiques) et diminue la fréquence des génotypes les moins adaptés (benthiques) dans l'habitat limnétique. En absence de sélection, les accouplements sont aléatoires. Cependant, si un génotype est mieux adapté, le choix d'un partenaire basé sur le CMH est possible. La figure I.1 (b) illustre l'accélération de la différenciation entre écotypes (populations ou espèces) sous l'action pléiotrope des gènes du CMH en fonction de la résistance aux parasites et du choix sexuel.

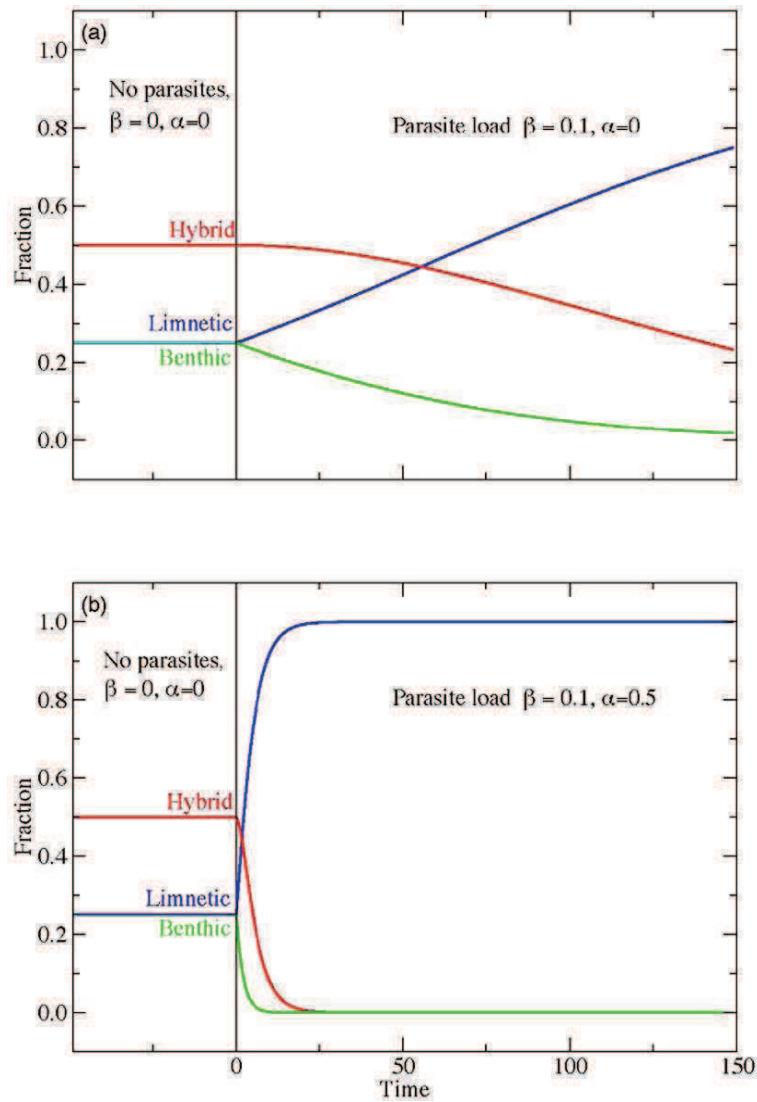


Figure I.1 (a) Sans parasites et sans choix de partenaire, la sélection est neutre. Au temps $t=0$, les parasites sont ajoutés au système ($\beta = 0,1$). Dans l'habitat limnétique (colonne d'eau), le génotype limnétique pour le CMH est le mieux adapté et donc augmente en fréquence jusqu'à ce qu'il domine la population. (b) Avec un choix de partenaire pour le génotype CMH le plus adapté ($\alpha = 0,5$), la dynamique est plus rapide pour la même charge parasitaire. Si les mêmes gènes répondant aux pressions environnementales (parasites) sont aussi impliqués dans le choix de partenaire, cela accélère la séparation des populations (Eizaguirre *et al.* 2009).

2 – Les flux de gènes intraspécifiques et la structure de population neutre et sous sélection

A l'intérieur d'une espèce, le flux de gènes correspond au transfert d'allèles d'une population à une autre et fait l'objet de la génétique des populations. Les unités à l'intérieur desquelles les individus s'unissent le plus souvent sont appelées des **dèmes**. Ces dèmes peuvent être **plus ou moins isolés** les uns des autres, former des unités **discrètes** ou il peut y avoir une certaine **continuité** génétique entre dèmes voisins. La **dérive génétique**, par fixation aléatoire des allèles, va agir différemment dans chaque dème, et ceux-ci vont progressivement se différencier les uns des autres. Ces dèmes peuvent être eux-mêmes organisés en groupes dont les individus s'unissent occasionnellement et maintiennent des contacts entre eux par l'échange de gènes véhiculés par des **migrants**.

Le flux de gènes va dépendre (i) des capacités de dispersion intrinsèques de l'organisme et (ii) de la perméabilité de la matrice paysagère. Par exemple, en milieu marin, les grandes tailles efficaces et le peu de barrières physiques génèrent un flux de gènes important (Ward *et al.* 2005). Au contraire, les espèces terrestres (hormis plantes et animaux volants) ont des capacités dispersives généralement beaucoup plus limitées.

Capacités dispersives et structure de population chez les amphibiens

Les capacités migratoires

Les faibles capacités migratoires des amphibiens sont souvent associées à leur **dépendance** aux milieux humides ou des zones humides pour les corridors de dispersion en raison du risque de dessiccation et de la prédation associé à la dispersion terrestre (Duellman & Trueb 1994; Rothermel 2004; Rothermel & Semlitsch 2002; Sinsch 1990), et à la **lenteur** de la locomotion terrestre (Rothermel & Semlitsch 2002). Les amphibiens se déplacent donc

généralement sur de plus petites distances que les autres petits tétrapodes (Sinsch 1990). Smith & Green (2005), suite à une étude bibliographique menée sur 166 articles scientifiques concernant la distance maximale parcourue par 90 espèces d'amphibiens, ont conclu que 44% des espèces ne dispersent pas plus de 400 m ; seules 5% sont capables de montrer des distances de dispersion maximales supérieures à 10 km (figure I.2). Chez les Urodèles, 94% des distances maximales de dispersion sont inférieures à 1 km dont 64% ne dépassent pas 400 m. Seules 2% des espèces montrent une dispersion maximale supérieure à 10 km. De récentes études tendent à montrer que des migrants occasionnels connecteraient les populations séparées de dizaines de kilomètres.

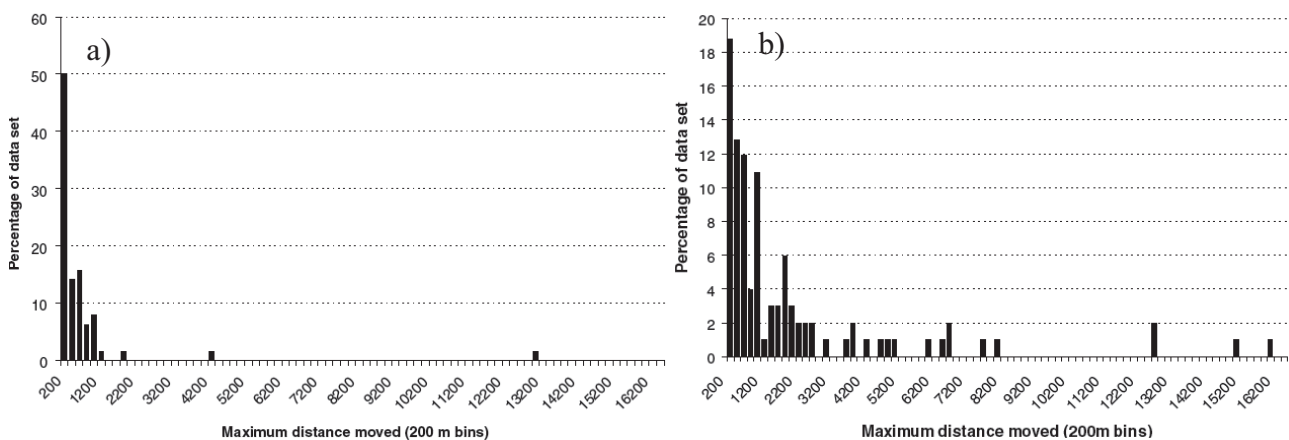


Figure I.2 Histogrammes de fréquence de la distance maximale parcourue par a) 37 espèces de salamandres et b) 53 espèces d'anoures (Smith & Green 2005).

La philopatrie

Comme beaucoup de vertébrés, plusieurs espèces d'amphibiens montrent une grande fidélité à leur site de ponte (Duellman & Trueb 1994). Plusieurs études illustrent qu'ils sont capables de retourner à leur site de ponte après avoir été déplacés sur des distances relativement grandes. Par exemple, 38% des 747 individus de tritons *Taricha rivularis* déplacés de 4 km sont retournés à leur site de ponte l'année même (Twitty *et al.* 1967). De nombreux suivis par capture-marquage-recapture ont démontré que la majorité des amphibiens sont retrouvés au même endroit d'une année sur l'autre (cf tableau I.1) (voir aussi Gamble *et al.* 2007).

Tableau I.1 Exemple de fidélité au site de ponte chez les amphibiens (d'après Smith & Green 2005).

Species	Fidelity	Source
<i>Triturus vulgaris</i>	Not a single one of 2500 marked individuals changed breeding ponds between seasons.	Bell 1977
<i>Plethodon cinereus</i>	Philopatric to the same cover object between years.	Placyk and Graves 2001
<i>Triturus vulgaris</i>	Philopatric to the same cover object between years.	Dolmen 1981
<i>Bufo bufo</i>	93% of females and 96% of males that survived between years, returned to the same breeding ponds.	Reading et al. 1991
<i>Bufo marinus</i>	No significant homing effect.	Seebacher and Alford 1999
<i>Bufo marinus</i>	Return to their home site with 100% accuracy when displaced up to 70 m, or 165 m.	Brattstrom 1962, Carpenter and Gillingham 1987
<i>Bufo americanus</i>	Returned to within 5 m of their original site after a 235 m translocation.	Dole 1972
<i>Pseudacris triseriata triseriata</i>	The majority of recaptures were within 100 m of the initial capture site.	Kramer 1973
<i>Pseudacris maculata</i>	The maximum distance moved is only 250 m.	Spencer 1964
<i>Hyla regilla</i>	71% of males were found in the same portion of the same pond when recaptured the following year.	Jameson 1957
<i>Mixophyes iteratus</i>	89% of individuals were recaptured 5 m or less away from where they were marked.	Lemckert and Brassil 2000
<i>Rana sylvatica</i>	100% of adults and 82% of juvenile are faithful to their first breeding pond or natal pond respectively.	Berven and Grudzien 1990
<i>Rana sylvatica</i>	The mean distance between captures was only 11.25 m for 298 individuals.	Bellis 1965
<i>Rana pipiens</i>	98% of returned to their home pond after a one-kilometer displacement.	Dole 1968
<i>Rana muscosa</i>	89% percent of were recaptured at the same pond between breeding seasons.	Pope and Matthews 2001
<i>Rana muscosa</i>	50% of translocated individuals returned to their initial site within 20 days after a 630 m translocation.	Matthews 2003
<i>Rana lessonae</i> and <i>Rana ridibunda</i>	88% of individuals monitored between years did not move from their capture pond.	Holenweg Peter 2001
<i>Rana aurora draytonii</i>	75% did not move from their site over the course of a year and 90% of these philopatric individuals were never more than 60 m from the water.	Bulger et al. 2003

La structure des populations d'amphibiens

La philopatrie et les capacités de dispersion limitées des amphibiens ont mené beaucoup d'études à conclure sur de **fortes structures** de population (Alexandrino *et al.* 2000; Andersen *et al.* 2004; Bradley Shaffer *et al.* 2000; Cabe *et al.* 2007; García-París *et al.* 2000; Hitchings & Beebe 1997; Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005; Lampert *et al.* 2003; Larson *et al.* 1984; Monsen & Blouin 2003; Noël *et al.* 2007; Palo *et al.* 2004). Ward *et al.* (1992) concluent, à partir d'une étude comparative du polymorphisme allozymique chez les animaux, que les amphibiens présentent un degré beaucoup plus élevé de structure génétique de populations que pour tous les autres taxons animaux. Cependant, d'autres études sur les amphibiens ont suggéré que leurs mouvements n'étaient pas si limités (Trenham *et al.* 2001) et qu'il peut y avoir potentiellement des **flux de gènes élevés** au sein de certaines espèces ou populations (Burns *et al.* 2004; Funk *et al.* 2005; Newman & Squire 2001; Pabijan & Babik 2006). La différenciation génétique peut donc être trouvée à l'échelle de quelques mètres (ex : estimations de F_{ST} significatives de 0,015 entre populations de *Plethodon cinereus* séparées par 200 m, Cabe *et al.* 2007) à quelques centaines de kilomètres (ex : estimations de F_{ST} non significatives de 0,021 entre populations de *Mesotriton alpestris* séparées par 349 km, Pabijan & Babik 2006).

Quelques auteurs (Chan & Zamudio 2009; Newman & Squire 2001) ont fait la synthèse du niveau de différenciation par espèce, néanmoins ils se basent sur des estimations de F_{ST} globaux et les grandes différences d'échelle géographique ne permettent pas vraiment de réaliser des comparaisons. Dans la figure I.3, nous avons rassemblé des valeurs d'estimations de F_{ST} (sur locus microsatellites uniquement) pour les espèces d'urodèles dont les données par paires de populations étaient disponibles dans la littérature.

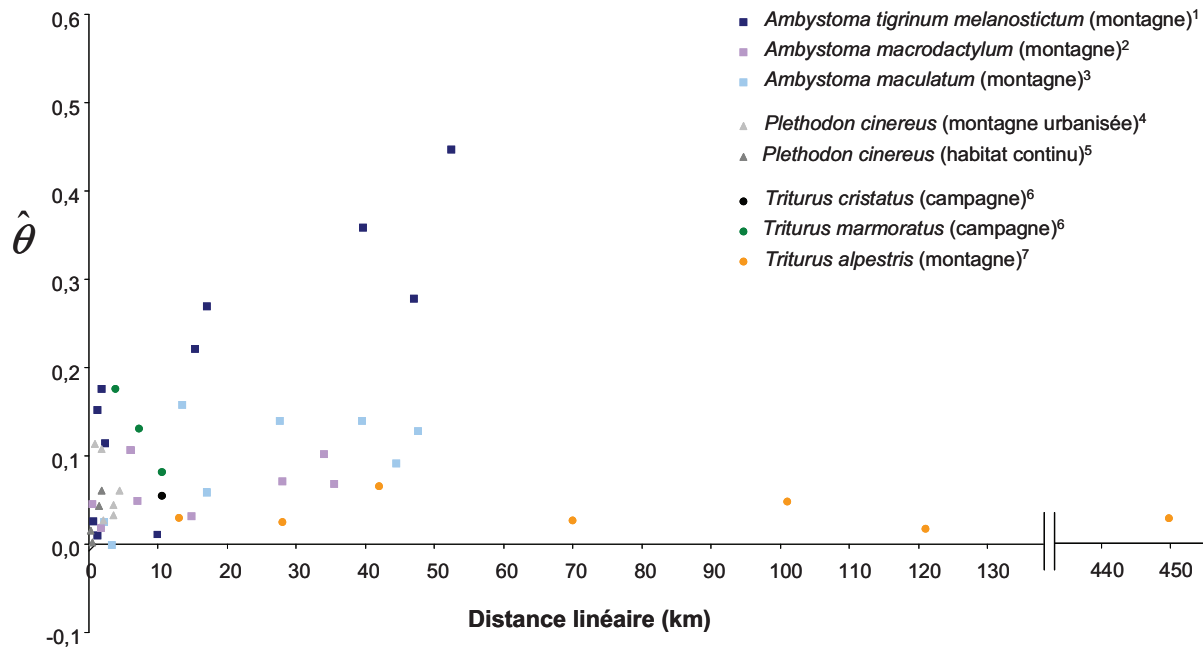


Figure I.3 Estimations de F_{ST} par paires pour quelques espèces d'urodèles. ¹ Spear *et al.* 2005; ² Giordano *et al.* 2007; ³ Zamudio & Wiercivorek 2007; ⁴ Noël *et al.* 2007; ⁵ Cabe *et al.* 2007; ⁶ Jehle *et al.* 2001; ⁷ Pabijan & Babik 2006.

Les flux de gènes sont principalement influencés par les **capacités intrinsèques des individus** et par les **paramètres environnementaux** (voir partie suivante « génétique du paysage »). Par exemple, les salamandres pléthodontidés représentent un des groupes avec les plus grands niveaux de différenciation observés chez les animaux (Highton 1977; Larson *et al.* 1984; Wright 1978). Toutes les espèces ne répondent pas de la même façon en termes de différenciation génétique à un même type de paysage. Par exemple en montagne les différenciations entre populations peuvent être fortes (*Ambystoma tigrinum melanostictum*, Spear *et al.* 2005) ou modérées (*Mesotriton alpestris*, Pabijan & Babik 2006). Néanmoins ces résultats sont à modérer au vu du biais que peut provoquer le polymorphisme (et donc la probabilité d'homoplasie) et l'hétérozygotie élevée associés à certains microsatellites (ex : des microsatellites à 58 et 71 allèles chez *Mesotriton alpestris*) (Hedrick 1999; Lemaire *et al.* 2000; O'Reilly *et al.* 2004). Chez les anoures, Brede & Beebe (2004) ont montré que deux

espèces vivant dans la même région présentent des structures de populations très différentes ; un flux de gènes beaucoup plus important est noté pour la grenouille rousse *Rana temporaria* que pour le crapaud commun *Bufo bufo* (ex : Estimations de F_{ST} de 0,048 chez la grenouille rousse vs 0,333* chez le crapaud commun).

L'**historique de colonisation** a aussi un rôle dans la structure actuelle des populations. Dans le cas du triton alpestre *Mesotriton alpestris*, l'effet fondateur dans les populations marginales issues d'un seul refuge glaciaire expliquerait la faible différenciation entre populations (Pabijan & Babik 2006).

A quelques exceptions près (Beebee & Rowe 2000; Burns *et al.* 2004; Hitchings & Beebee 1996; Knopp & Merilä 2009; Monsen & Blouin 2003; Palo *et al.* 2004; Rowe *et al.* 1998), la plupart des études se focalisent sur de petites échelles (voir notamment les études sur les pléthodontidés, Cabe *et al.* 2007; Noël *et al.* 2007; White *et al.* 2000). Par conséquent, les patrons de diversité génétique et de différenciation à **grande échelle**, ainsi que les causes de cette variabilité, restent mal connus.

Les modèles de migration

Différents modèles de migration ont été proposés afin d'expliquer les patrons observés *in situ*. (cf. encadré 3). L'**isolement par la distance** est un patron fréquemment rencontré dans l'étude des populations d'amphibiens chez lesquels la restriction géographique de la dispersion provoque l'accumulation de divergences génétiques entre populations. Ainsi ce patron a été retrouvé chez la grenouille des champs *Rana arvalis* (Knopp & Merilä 2009; Vos *et al.* 2001), le crapaud calamite *Bufo calamita* (Rowe *et al.* 2000), le triton à peau rugueuse *Taricha granulosa* (Kuchta & Tan 2005), la salamandre à longs doigts *Ambystoma macrodactylum* (Tallmon *et al.* 2000), ou encore la salamandre tachetée *Ambystoma maculatum* (Zamudio & Wiczorek 2007). L'isolement par la distance peut suivre un modèle en **pas japonais** (*i.e.* stepping-stone) comme cela a été suggéré pour le crapaud *Bufo canorus* dans la région de Yosemite où les migrations occasionnelles ne se font que dans les sites voisins (Bradley Shaffer *et al.* 2000), pour les crapauds de vallées désertiques *Anaxyrus cognatus* et *Scaphiopus couchii* (Chan & Zamudio 2009) ou encore pour les tritons crêtés *Triturus cristatus* et marbrés *T. marmoratus* (Jehle *et al.* 2005).

Les capacités dispersives limitées, la forte fidélité au site de ponte et les habitats de reproduction disjoints des amphibiens sont souvent responsables d'un fonctionnement en **métapopulation** (Marsh & Treham 2001). Citons, entre autres espèces, les tritons crêtés et

marbrés *Triturus cristatus* et *T. marmoratus* (Jehle *et al.* 2005), les salamandres ponctuées *Ambystoma maculatum* (Zamudio & Wieczorek 2007), les crapauds calamites *Bufo calamita* (Rowe *et al.* 2000), les grenouilles de lesson *Rana lessonae* (Sjögren 1991), les rainettes vertes *Hyla arborea* (Dubey *et al.* 2009). Néanmoins, d'autres études montrent que certaines espèces forment des populations trop isolées pour supporter ce modèle (*Bufo americanus*, *Bufo fowleri*, *Pseudacris crucifer*, *Rana sylvatica*, *Rana pipens*, *Rana clamitans*, *Rana catesbeiana*, voir Smith & Green 2005).

Encadré 3 : Les modèles de migrations

Modèle de populations en îles (Wright 1969)

Les dèmes échangent entre eux des migrants, avec la même probabilité $m/(d-1)$. Les dèmes sont donc interconnectés par des flux de gènes identiques (figure I.4 a) ; la migration est aussi appelée isotrope. Ce n'est guère vraisemblable dans les populations naturelles à part chez certaines espèces marines (Sköld *et al.* 2003)

Modèles en stepping-stone

Malécot (1948) a introduit des modèles de migration entre dèmes plus réalistes que le modèle en île. Dans ces modèles l'échange de migrants est plus probable entre dèmes géographiquement proches les uns des autres qu'entre dèmes éloignés. C'est donc un modèle spatialement structuré. Kimura (1953) a comparé ces modèles aux dalles permettant de circuler dans les jardins japonais. Dans les modèles en une dimension (figure I.4 b), les migrations se font selon un axe principal. Un dème va échanger des gènes avec ses deux dèmes voisins à un taux $m/2$. Dans les modèles en deux dimensions, les dèmes sont arrangés selon deux axes, et un dème échangera des gènes avec ses quatre plus proches voisins à un taux $m/4$. Ce modèle s'applique souvent pour les espèces marines de milieux côtiers (Hellberg 1994).

Modèles avec taux de migration arbitraires

Ils ne sont pas forcément symétriques. D'une manière générale, la variabilité génétique sera plus importante dans une population avec des taux de migrations très variables entre dèmes, car il y aura des dèmes très isolés où la dérive génétique sera forte et conduira rapidement à l'élimination de certains allèles (figure I.4 c).

Modèle d'isolement par la distance (Malécot 1950)

Les dèmes sont situés dans un espace continu. Les individus migrent dans un dème situé à une certaine distance avec une probabilité inversement proportionnelle à la distance géographique séparant ces dèmes.

Modèles de métapopulations

Ils ont été introduits pour mieux représenter la réalité et pour tenir compte de la nature dynamique des populations et des dèmes (Hanski & Gaggiotti 2004). Il y a en effet de nombreuses situations où les dèmes ont des tailles variables et peuvent même disparaître temporairement avant d'être créés à nouveau par de nouveaux migrants venant d'une population voisine et réoccupant le nouveau territoire. Ces propriétés sont assez typiques de petites populations. D'une manière générale, des dèmes de tailles inégales sont plus différenciés que des dèmes de tailles sensiblement équivalentes, car la dérive génétique sera surtout plus forte dans les petites populations. Les extinctions de dèmes contribuent aussi à augmenter la variabilité globale de la population, en éliminant certains allèles. Enfin, les recolonisations sont souvent accompagnées d'effets fondateurs, qui entraînent de grandes perturbations de fréquences alléliques, et qui vont donc aussi contribuer à l'augmentation de la variabilité génétique entre dèmes par rapport à un ensemble de populations arrangées en îles (figure I.4 d).

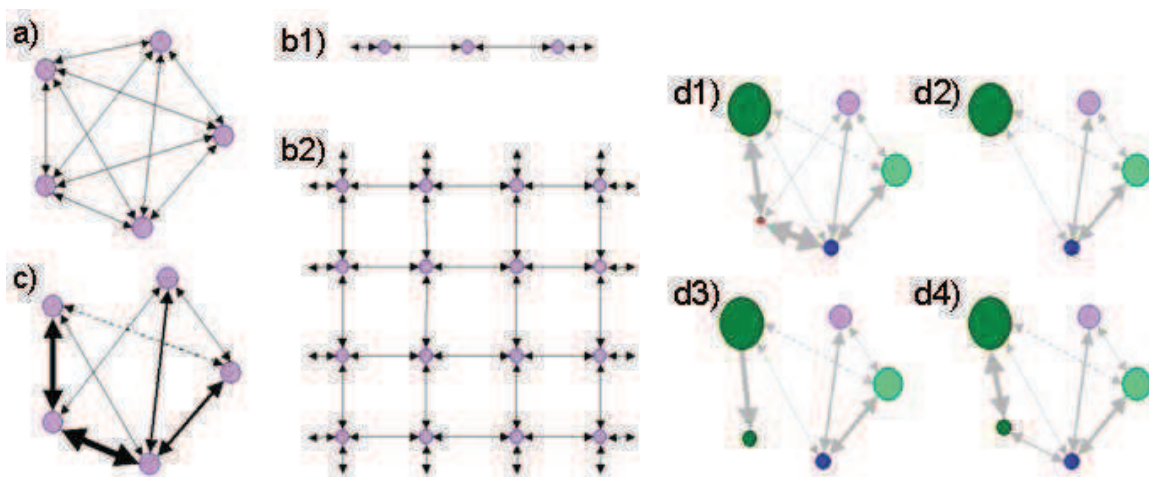


Figure I.4 Modèles de population a) en îles, en stepping-stone b1) en une dimension, b2) en deux dimensions, c) avec taux de migration arbitraires (taux de migration proportionnels à l'épaisseur des flèches) et en métapopulation dans laquelle d1) la taille des dèmes varie et les taux de migration sont arbitraires, d2) un dème disparaît, d3) un processus de recolonisation à partir d'un autre dème reconstitue un dème, d4) le nouveau dème reprend des échanges avec les autres dèmes (d'après Excoffier 2006 <http://genet.univ-tours.fr/EXCOFFIER/Laurent/GMDP>).

La génétique du paysage : barrières et corridors au flux de gènes

La génétique du paysage ou « landscape genetics » est une nouvelle discipline qui étudie l'influence du paysage et de l'environnement sur les processus microévolutifs tels que le flux de gènes, la dérive génétique et la sélection (Manel *et al.* 2003). La première étape de la génétique du paysage est la détection et la localisation dans l'espace des discontinuités génétiques entre populations. La seconde étape est de déterminer la relation de ces discontinuités avec les caractéristiques paysagères et environnementales. Ces éléments peuvent agir sur la dispersion des individus comme des **barrières** (montagnes, fleuves, routes...) ou comme des **corridors** tels que les vallées de basse altitude pour les chiens de prairie à queue noire (Antolin *et al.* 2006) ou les zones boisées pour les chevreuils (Coulon *et al.* 2004). La génétique du paysage est de plus en plus utilisée en biologie de la **conservation** et gestion des populations pour maintenir des corridors entre populations ou encore délimiter des unités de gestion ou de conservation (Crandall *et al.* 2000; Moritz 2002).

Les amphibiens se reproduisant dans des mares sont de bons candidats pour élucider les interactions entre dispersion et paysage : ils présentent typiquement une distribution en **taches**, ils sont physiologiquement **dépendants** d'un milieu humide et possèdent souvent une grande **spécificité** d'habitat (Duellman & Trueb 1994). Les espèces se reproduisant dans des habitats aquatiques doivent utiliser pour compléter leur cycle de vie des environnements parfois distincts pour la reproduction, le développement larvaire et la survie des adultes (Pope *et al.* 2000). La structure du paysage a donc une incidence majeure sur le comportement locomoteur des individus, donc sur le taux de dispersion et donc le flux de gènes entre populations. De plus en plus d'études récentes s'intéressent au flux de gènes intraspécifique chez les amphibiens (e.g. Stevens *et al.* 2006b; Vos *et al.* 2001). En effet, un déclin global des amphibiens a été mis en évidence à travers le monde depuis quelques décennies (Blaustein & Bancroft 2007; Stuart *et al.* 2004). En particulier, la **destruction et la fragmentation de l'habitat** (construction d'infrastructures routières, urbanisation, intensification des pratiques agricoles) affectent l'abondance, la richesse spécifique et la diversité génétique des amphibiens (Cushman 2006; Knutson *et al.* 1999). Ils s'ajoutent aux effets combinés des changements climatiques, des radiations UV, de la pollution, des pathogènes, de l'introduction d'espèces exotiques qui font des amphibiens le phylum le plus menacé (Beebee & Griffiths 2005). Du fait des modifications anthropogéniques croissantes de l'habitat, il est

particulièrement important de comprendre les conséquences génétiques et démographiques des changements de la composition et la configuration du paysage (Gibbs 1998a; Guerry & Hunter Jr 2002; Manel *et al.* 2003). La fragmentation de l'habitat est une cause majeure impliquée dans l'extinction des espèces (Burkey & Reed 2006; Fahrig 2002), et une des conséquences évidentes de la fragmentation est la rupture des processus de dispersion dans les métapopulations (Gonzalez *et al.* 1998) qui en retour diminue les probabilités de persistance régionale des populations (Blaustein *et al.* 1994; Sjögren 1991).

Les barrières à la dispersion des amphibiens

Les barrières naturelles telles que les **cours d'eau** peuvent structurer les populations d'amphibiens. Dans l'étude de Marsh *et al.* (2007) le déplacement expérimental de salamandres rayées *Plethodon cinereus* sur la berge opposée de petits cours d'eau (d'ordre 1 ou 2), par comparaison à un déplacement d'une distance équivalente vers l'intérieur de la forêt, provoque un taux de retour moitié moindre. Un cours d'eau d'ordre 2 (5 à 7 mètres de large) contribue à la différenciation génétique des populations de part et d'autre. Lampert *et al.* (2003) ont mis en évidence que la rivière Chagres est une barrière au flux de gènes pour les grenouilles túngara *Physalaemus pustulosus* à Panama. Wagner *et al.* (2005) ont montré que la rivière Columbia différencie des unités génétiques discrètes chez la salamandre des Montagnes Larsh *Plethodon larselli*. La rivière Mondego sépare deux groupes de populations chez la salamandre *Chioglossa lusitanica* dans la péninsule ibérique (Alexandrino *et al.* 2000). Au contraire, aucun effet barrière significatif sur le flux de gènes n'a été détecté dans l'étude de différentes espèces amazoniennes (Gascon *et al.* 1998; Loughheed *et al.* 1999). Les nombreuses rivières qui sillonnent la répartition du triton japonais *Hynobius nebulosus* ne semblent pas non plus avoir de rôle dans la structure des populations (Matsui *et al.* 2006).

La **topographie** peut être directement reliée à l'énergie requise pour la dispersion. Les crêtes de montagne et les différences d'élévation sont associées avec un accroissement de la différenciation génétique entre sites de grenouilles ponctuées *Rana luteiventris* (Funk *et al.* 2005). Chez la salamandre à longs doigts *Ambystoma macrodactylum*, la différenciation génétique entre bassins séparés par des crêtes est élevée ($G_{ST} = 0,30$) par rapport à la divergence à l'intérieur des bassins dans lesquels les populations se trouvent en panmixie (Tallmon *et al.* 2000). Chez le triton alpestre *Mesotriton alpestris*, la différenciation génétique est trois fois plus grande ($\hat{\theta}$ moyen = 0.096) entre régions montagneuses qu'à l'intérieur des vallées ($\hat{\theta}$ moyen = 0,037) (Pabijan & Babik 2006). Le relief est également négativement

corrélé avec les flux de gènes chez les salamandres tigrées *Ambystoma tigrinum melanostictum* (Spear *et al.* 2005). Cependant, Zhan *et al.* (2009) ont montré, dans les montagnes chinoises, les grenouilles *Rana chensinensis* maintiennent un flux de gènes élevé ($\hat{\theta}$ global de 0,088 sur les sites centraux) sans qu'aucune barrière à leur dispersion ne concorde avec les reliefs.

Les voies routières et ferroviaires peuvent être particulièrement fatales lorsqu'elles coupent un chemin de migration (DeMaynadier & Hunter Jr 2000; Marsh *et al.* 2005; Sillero 2008). Un amphibien a en effet une probabilité de 34 à 61% d'être tué en traversant une route et de 89 à 98% en traversant une autoroute (Hels & Buchwald 2001). Les barrières linéaires à la dispersion telles que les **routes** et les **voies de chemin de fer** ont souvent un effet significatif sur la distance génétique (Vos *et al.* 2001).

L'urbanisation menace aujourd'hui un amphibien sur trois (Hamer & McDonnell 2008). En milieu **urbain**, Hitchings & Beebee (1997) ont estimé le F_{ST} à 0,388 entre des populations séparées de 0,8 à 4.4 km alors qu'il était deux fois moindre en contexte rural pour des mares séparées de 93 km. Noël *et al.* (2007) ont montré que les populations de salamandres à dos rouge *Plethodon cinereus* en contexte fragmenté par l'urbanisation étaient génétiquement plus différenciées que les populations localisées dans des habitats ruraux.

Les **champs cultivés** et les pâtures intensives sont généralement évités par beaucoup d'amphibiens (Gibbs 1998a) comme cela a été démontré chez le crapaud calamite *Bufo calamita* par des expériences en milieu contrôlé (Stevens *et al.* 2006a). La **fragmentation** des habitats forestiers limitent la dispersion des espèces inféodées à ce milieu (voir cependant Marsh *et al.* 2004; McDonough & Paton 2007) telles que la grenouille à pattes rouges *Rana aurora aurora* (Chan-McLeod 2003) ou la grenouille à queue *Ascaphus truei Stejneger* (Matsuda & Richardson 2005) dans les jeunes clairières.

Les corridors de dispersion des amphibiens

Au contraire, l'**homogénéité** du paysage facilite les flux de gènes comme cela a été montré chez des crapauds des vallées désertiques (Chan & Zamudio 2009). Alors que les reliefs structurent les populations, les amphibiens de **vallée** montrent, par comparaison des connectivités entre sites plus importantes (Funk *et al.* 2005; Giordano *et al.* 2007; Pabijan & Babik 2006; Spear *et al.* 2005; Zamudio & Wieczorek 2007). A l'intérieur d'un bassin versant, les populations des deux espèces de salamandres *Desmognathus marmoratus* et *D.*

quadrangulatus montraient même plus de ressemblances entre elles qu'entre congénères d'autres bassins dans le sud des Appalaches (Jones *et al.* 2006).

Le cas particulier des vallées alluviales

Le rôle de la vallée alluviale dans la dispersion, en particulier par le biais des événements de crue, a été mis en évidence chez de nombreuses espèces aquatiques telles les poissons (Burrige *et al.* 2006; Hernandez-Martich *et al.* 1995), plantes (Thomas *et al.* 2006), copépodes (Frisch *et al.* 2005), gastéropodes (Evanno *et al.* 2006) ou encore larves d'insectes (Jackson *et al.* 1999). Néanmoins, aux patrons d'inondations s'intercalent des patrons d'assèchement des pièces d'eau. Les effets des inondations fluviales sur les amphibiens peuvent être séparés en effets directs et indirects dont les conséquences sont positives ou négatives.

D'une part, les inondations saisonnières de la plaine alluviale laissent derrière elles de **nombreux sites aquatiques** favorables aux amphibiens (très riches en nutriments garantissant une croissance optimale du phytoplancton et de larves d'amphibiens). Sujets à une dessiccation élevée à cause de leur peau perméable, le corridor riparien représente un couloir **humide** favorable pour la reproduction mais aussi la migration des amphibiens (Duellman & Trueb 1994). Ainsi, Giordano *et al.* (2007) ont mis en évidence que les salamandres à longs doigts *Ambystoma macrodactylum* se reproduisant le long de la Bull River dans de grandes prairies inondables comportant de nombreuses mares montraient des flux de gènes significativement plus élevés qu'en altitude dans les montagnes du Nord-Ouest du Montana. Les juvéniles et adultes de salamandre *Chioglossa lusitanica* effectuent de longues distances de migration parallèlement aux cours d'eau le long des berges humides (Arntzen 1981; 1994). Chez le triton crêté du Danube *Triturus dobrogicus*, espèce typique de plaine alluviale, l'homogénéisation du flux de gènes est imputable à la forte connectivité des populations (Wallis & Arntzen 1989). Dans une partie non canalisée du Danube, Ellinger et Jehle (1997) suggèrent une dispersion plus importante des individus d'une population de cette espèce qu'au niveau des parties canalisées. De très faibles valeurs de différenciation génétique ont été reportées pour la grenouille *Rana sylvatica* dans les prairies humides ($\hat{\theta} \approx 0,025$ sur 20 km) (Newman & Squire 2001). L'utilisation des corridors ripariens par les salamandres *Ambystoma maculatum* (Purrenhage *et al.* 2009) et les grenouilles *Rana chensinensis* (Zhan *et al.* 2009) maintiendrait la connectivité entre régions montagneuses.

D'autre part, en période de crue, le courant participe à la **dispersion passive** des individus. Ainsi, les têtards du crapaud alyte de Majorque *Alytes muletensis* sont-ils emportés par le courant lorsque les pluies font déborder les torrents (Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005). Chez la salamandre à deux bandes *Eurycea bislineata*, les larves montrent de façon prédominante une dispersion vers l'aval dans les cours d'eau des Appalaches (Bruce 1986). Il en est de même pour les larves de salamandre de *Chioglossa lusitanica* (Arntzen 1981; 1994; Thiesmeier 1994). Cette dispersion asymétrique vers l'aval a été suggérée pour des larves de grenouilles *Ascaphus truei* (Hayes *et al.* 2006) le crapaud *Bufo spinulosus* (Méndez *et al.* 2004) ou la grenouille des collines Kenyanes *Schoutedenella xenodactyloides* (Measey *et al.* 2007). De façon plus anecdotique, Wooten *et al.* (2009) relatent que la diversité chez les salamandres de ruisseau *Desmognathus folkertsi* au sein d'un même cours d'eau s'expliquerait par le relâcher de seaux d'appâts (en l'occurrence les larves de cette salamandre) par les pêcheurs dans le sud des Appalaches.

Cependant, les paysages que constituent les vallées alluviales peuvent comporter des éléments néfastes à la viabilité des amphibiens. En effet, les courants d'inondation au début d'un événement de crue peuvent être défavorables à chaque étape du cycle de vie des amphibiens. Par une étude de capture-marquage-recapture effectuée sur neuf ans sur une population de *Triturus dobrogicus* d'une île du Danube, Ellinger et Jehle (1997) ont mis en évidence que les perturbations causées par les inondations du fleuve augmentaient la **mortalité**.

Les crues peuvent également favoriser la colonisation par des **prédateurs** des amphibiens, tels que les poissons, des sites aquatiques qui ne sont pas habituellement connectés avec le cours d'eau. Ainsi, la plus grande richesse des espèces d'amphibiens dans le Rhône a été observée dans les plaines d'inondation temporaire dépourvues de poissons, sites qui ont été protégés contre les inondations (Morand & Joly 1995). La recolonisation des populations de grenouilles des montagnes à pattes jaunes *Rana muscosa* éteintes dans la Sierra Nevada (Californie) est rendue impossible à cause de la reconnexion avec le fleuve habité par des poissons prédateurs (Bradford 1991).

A l'inverse, lorsque l'inondation de certaines pièces d'eau est très peu fréquente, la **longévité de leurs habitants** peut s'en trouver diminuée, comme cela a été observé pour le triton ponctué *Lissotriton vulgaris* dans la plaine alluviale du cours inférieur du Danube (Cogălniceanu & Miaud 2003). De la même façon, en comparant des populations de *Lissotriton vulgaris meridionalis* permanentes et de mares temporaires, Nobili et Accordi

(1997) ont montré que l'âge à la maturité était plus bas et que la longévité tendait à diminuer dans les environnements les plus imprévisibles.

Les flux de gènes et l'adaptation chez les amphibiens

Les relations entre flux de gènes et adaptations locales sont souvent complexes et encore mal définies. En effet, si la dispersion peut favoriser la propagation de **mutants favorables**, elle peut aussi permettre une **homogénéisation** de la variation génétique entre populations retardant l'adaptation locale par l'apport d'allèles moins adaptés (Lenormand 2002). Une des questions centrales en biologie évolutive est donc de savoir si les métapopulations consistent en de petites populations subdivisées avec un flux de gènes restreints ou de larges populations homogènes (Hanski & Simberloff 1997). Si les populations sont subdivisées (*i.e.* si le flux de gènes est suffisamment restreint), et si la **variabilité génétique** le permet, des pressions de sélection différentes peuvent conduire à l'apparition d'**adaptations locales**.

Beaucoup d'espèces d'amphibiens habitent des milieux très contrastés (Duellman & Trueb 1994). Un fort niveau de variabilité est habituellement observé dans les populations vivant dans des conditions écologiques variables (Mayr 1963). Les gradients environnementaux tendent à accroître la plasticité phénotypique des traits associés aux phénotypes optimaux dans les conditions environnementales locales, et quand le flux de gènes est restreint entre populations, la sélection tend à favoriser les adaptations locales à la plasticité (Pigliucci 2001). La différenciation génétique chez les animaux terrestres peut être détectée à l'échelle de quelques mètres (Waser & Price 1989) comme à plusieurs kilomètres (Edmands 1999) ; les amphibiens sont les vertébrés montrant les plus fortes différenciations génétiques entre populations (Ward *et al.* 1992). Ils représentent à ce titre de bons organismes modèles pour étudier les adaptations locales. Néanmoins, beaucoup d'espèces s'organisent en populations de **faible taille efficace** (Jehle *et al.* 2005; Schmeller & Merilä 2007). Dans les populations de petite taille efficace, l'intensité de la **dérive génétique aléatoire** limite la possibilité de fixation des allèles par sélection naturelle (Kimura 1983). Cela est d'autant plus vrai dans les contextes fragmentés (*e.g.* *Rana temporaria* dans un contexte d'agriculture intensive, Johansson *et al.* 2007). A partir de simulations (Lacy 1987), Noël *et al.* (2007) ont montré que l'impact de l'urbanisation peut provoquer une diminution de diversité génétique par dérive chez la salamandre *Plethodon cinereus* en seulement 30 générations. Ainsi, l'étude du flux de gènes est fondamentale pour déterminer les facteurs qui permettent ou empêchent l'adaptation

locale et pour décrire les dynamiques qui facilitent la propagation de nouvelles mutations bénéfiques (Reed & Frankham 2001; Sork *et al.* 1999).

Beaucoup d'études se sont intéressées à l'existence, l'émergence ou le maintien des adaptations locales chez les amphibiens. Néanmoins, très peu d'entre elles apportent de preuves génétiques des observations réalisées en conditions contrôlées ou en transplantation réciproques (tableau I.2) (voir cependant Cano *et al.* 2004; Kishida *et al.* 2007). En effet, une valeur sélective différente entre deux populations ne signifie pas forcément la présence sous-jacente d'une adaptation locale. Par exemple, si la taille efficace est suffisamment faible, la dérive génétique peut fixer différents allèles dont certains faiblement délétères dans différents milieux (Wright 1931). Il est quand même intéressant de souligner que certaines de ces études suggèrent l'existence de différenciation génétique à de très petites échelles (dizaines à centaines de mètres chez *Rana sylvatica*, Skelly 2004 ; voir aussi, Berven 1982; Freidenburg & Skelly 2004; Relyea 2002). Des études récentes de génétique ont su mettre en lien les variations alléliques avec des caractéristiques environnementales. Par exemple, Teacher *et al.* (2009) ont mis en évidence une sélection directionnelle au niveau des gènes du CMH de classe I chez des grenouilles rousses *Rana temporaria* exposées à un pathogène viral (*Ranavirus*) introduit il y a seulement 10 ans dans les populations naturelles du sud de l'Angleterre. L'émergence de ces adaptations locales est remarquable de par leur rapidité et leur localité ; les populations infectées alternent avec les populations non infectées (figure I.5).

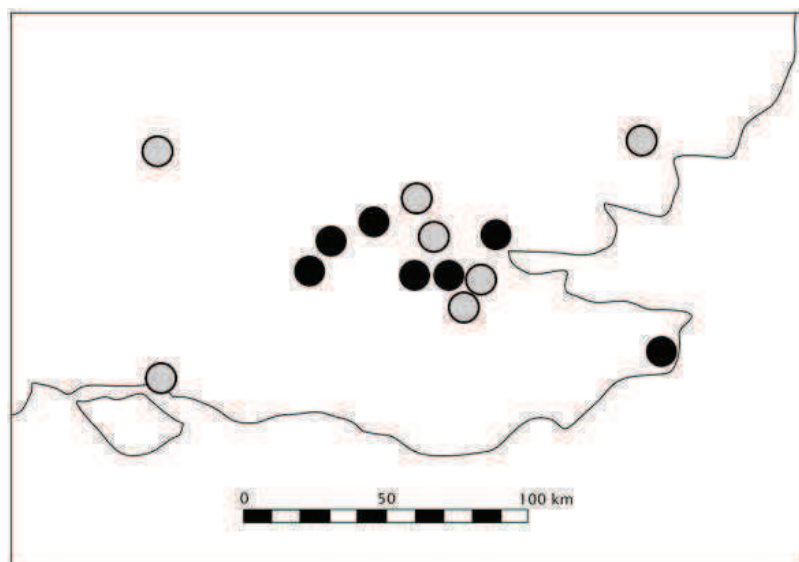


Figure I.5 Localisation des populations de *Rana temporaria* infectées par le *Ranavirus* (en noir) et non infectées (en gris) dans le Sud-Est de l'Angleterre (Teacher *et al.* 2009).

Tableau I.2 Synthèse des expériences suggérant la présence d'adaptations locales chez les amphibiens selon des techniques d'élevage en laboratoire (E) et/ou de transplantation réciproque (T).

Milieu	Adaptation	Espèce	Approche	Auteurs
Altitude	Développement des larves accéléré et taille à la métamorphose supérieure en altitude	<i>Rana arvalis</i>	E	Berven 1987
	Taux de croissance et développement accéléré et taille à la métamorphose plus grande en altitude	<i>Rana arvalis</i>	T	Berven 1982
Latitude	Reproduction retardée, développement et croissance accélérés sur les coteaux	<i>Rana latastei</i>	E	Ficetola & Bernardi 2005
Température	Développement des embryons et croissance des têtards plus rapide et âge à la métamorphose plus élevé en haute latitude	<i>Rana temporaria</i>	E	Palo <i>et al.</i> 2003
	Taux de développement et de croissance accéléré en haute latitude	<i>Rana temporaria</i>		Laugen <i>et al.</i> 2003
	Développement des embryons et croissance des têtards plus rapide et âge à la métamorphose supérieur en haute latitude	<i>Rana temporaria</i>	E	Merilä <i>et al.</i> 2000
UV	Développement larvaire plus rapide des individus de milieu ombragé	<i>Rana sylvatica</i>	E	Skelly 2004
	Sélection d'habitat	<i>Rana sylvatica</i>	E	Freidenburg & Skelly 2004
	Ecllosion plus rapide des individus de milieux les plus froids	<i>Rana sylvatica</i>	E	Skelly & Freidenburg 2000
Salinité	Résistance chez les populations d'altitude	<i>Rana temporaria</i>	E	Marquis & Miaud 2008
	Tolérance chez certaines populations	<i>Bufo calamita</i>	E & T	Gomez-Mestre & Tejedo 2003; 2004
pH	Survie supérieure des embryons de milieu acide en environnement acide	<i>Rana arvalis</i>	T	Persson <i>et al.</i> 2007
	Investissement maternel dans des gros œufs en environnement acide	<i>Rana arvalis</i>	E	Räsänen <i>et al.</i> 2005
Nitrate	Tolérance chez certaines populations	<i>Rana temporaria</i>	E	Johansson <i>et al.</i> 2001
Risque de dessiccation	Développement des têtards plus rapide (plasticité phénotypique adaptative)	<i>Rana temporaria</i>	E	Lind & Johansson 2007
	Développement des têtards plus rapide	<i>Rana temporaria</i>	E	Laurila & Kujasalo 1999
Présence de prédateurs	Développement des têtards plus rapide	<i>Rana temporaria</i>	E	Loman 1999
Rapidité de la fuite	Développement des larves plus rapide	<i>Ambystoma maculatum</i>	E	Urban 2008
	Différences de comportement (réduction d'activité), morphologie (queue plus large et corps plus court) et traits d'histoire de vie (développement larvaire plus lent)	<i>Rana sylvatica</i>	E & T	Relyea 2002
	Rapidité de la fuite	<i>Ambystoma barbouri</i>	E	Storfer 1999

3 - Les modèles biologiques tritons palmés et ponctués

Afin d'apporter des éléments de réponse à l'étude de la structure des populations en contexte alluvial, nous avons étudié les flux de gènes chez une espèce réputée peu dispersive, le triton palmé. De plus, l'analyse du flux de gènes interspécifique avec le triton ponctué a permis d'étudier l'intensité d'hybridation et l'isolement reproducteur entre deux espèces à grand chevauchement géographique et écologique. Protégées, ces espèces sont néanmoins assez communes à l'échelle européenne et sur la zone d'étude.

Répartition

Le triton palmé *Lissotriton helveticus* (Razoumowsky 1789) est une espèce lacunaire de l'Europe occidentale (figure I.6). Il est largement répandu en France et est une des espèces les plus communes en plaine. Dans le Maine-et-Loire, il est communément présent (Mourgaud & Pailley 2005).

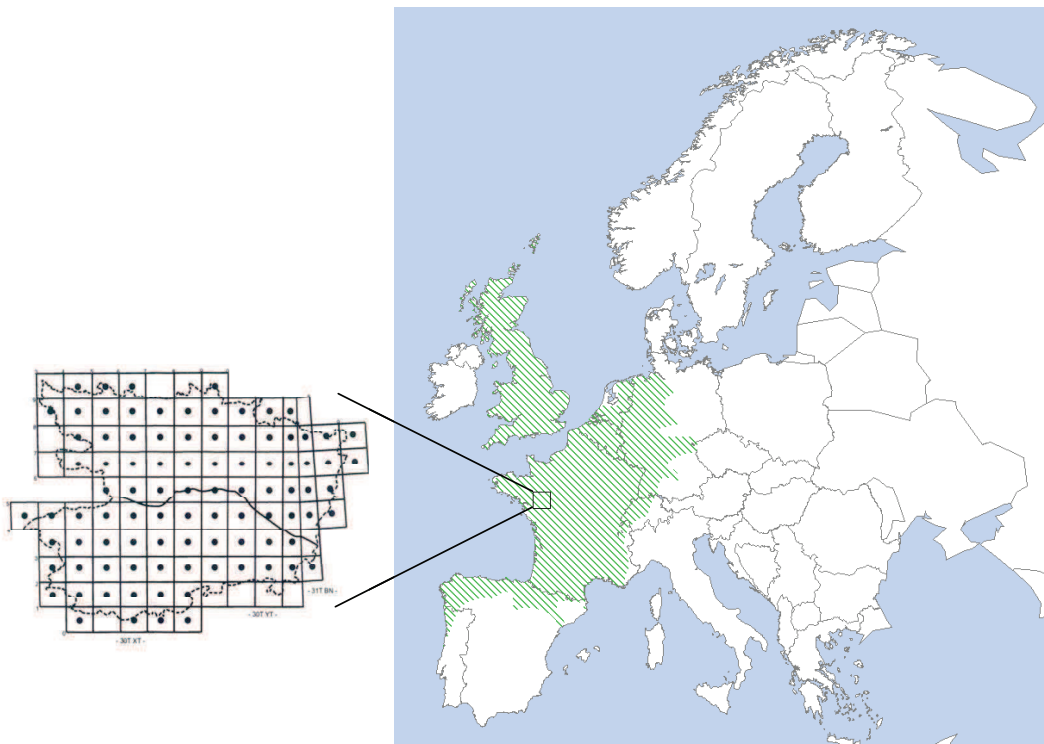


Figure I.6 Répartition du triton palmé *L. h. helveticus* en Europe (Duguet & Melki 2003) et en Maine-et-Loire (Mourgaud & Pailley 2005). La présence de l'espèce y est symbolisée par un point à l'intérieur d'une maille UTM 10 x 10 km dont le réseau couvre le département.

Le triton ponctué *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus 1758) est une espèce septentrionale eurasiatique à répartition lacunaire (figure I.7). Sa limite sud de répartition correspond à la vallée de la Loire où ses effectifs sont particulièrement **restreints** (Mourgaud & Pailley 2005). Peu commun en Maine-et-Loire il fréquente surtout les bras morts et les mares situées en pied de levée de protection ou de voie de chemin de fer en vallée de la Loire (Mourgaud & Pailley 2005).

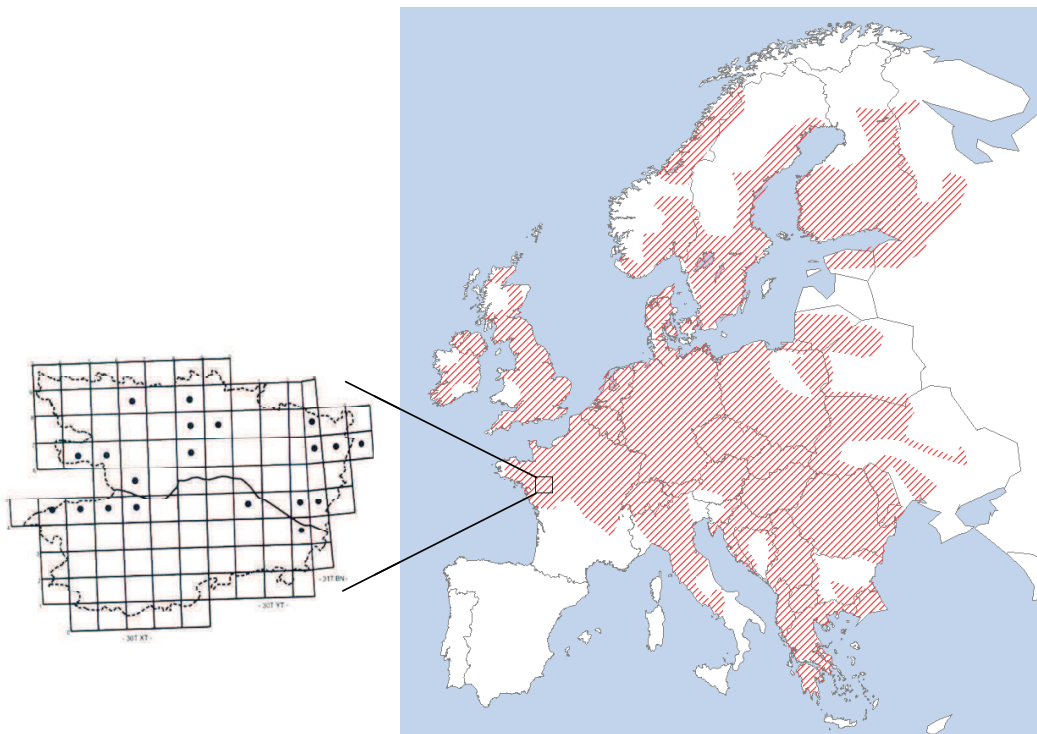


Figure I.7 Répartition du triton ponctué *L. v. vulgaris* en Europe, France (Duguet & Melki 2003) et Maine-et-Loire (Mourgaud & Pailley 2005).

Description

D'une longueur de 5 à 8 cm (pour les mâles) à 5.5 à 9.5 cm (pour les femelles), le triton palmé est le plus petit triton du genre (Duguet & Melki 2003). Le dimorphisme sexuel est très marqué (figure I.8). Les mâles, s'ornent en période de reproduction de palmures aux pattes arrières et d'un filament caudal, des caractères sexuels secondaires probablement évalués par la femelle durant la parade nuptiale (Griffiths & Mylotte 1988).

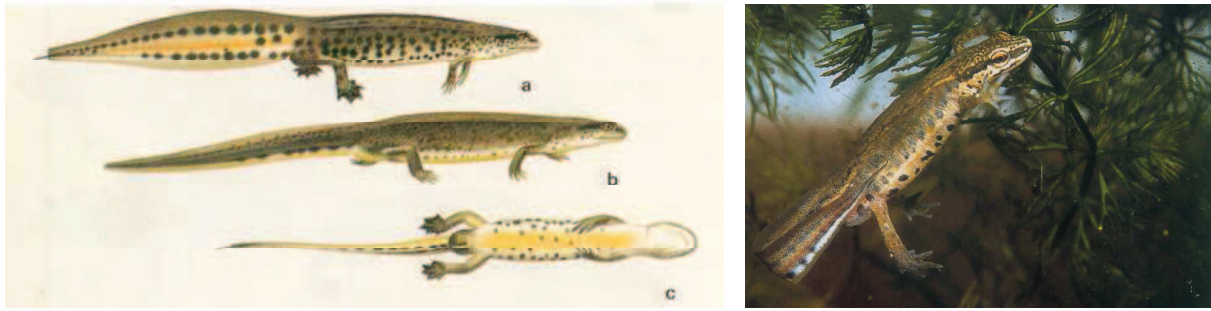


Figure I.8 Dessin d'un triton palmé mâle (a), femelle (b) et mâle en face ventrale (c) et photographie d'un mâle en période nuptiale (V. Ruffray).

Les individus de tritons ponctués sont un peu plus grands que ceux de tritons palmés (7 à 9 cm pour les mâles, 6.5 à 9cm pour les femelles) (Duguet & Melki 2003). Mâles de tritons palmés et ponctués présentent des **caractères sexuels secondaires très divergents**. Les mâles ponctués s'ornent en période de reproduction de membranes formant des lobes autour des doigts des pattes arrières, d'une crête dentelée et présentent de grosses ponctuations noires sur leur ventre orange (Griffiths & Mylotte 1988) (figure I.9). Les femelles sont légèrement plus fines et plus grandes que les femelles de tritons palmés, possèdent une coloration orange sur le ventre et le cloaque et la gorge marbrée. Au contraire des femelles de ponctués, les femelles de tritons palmés possèdent un très court filament à la pointe de la queue.

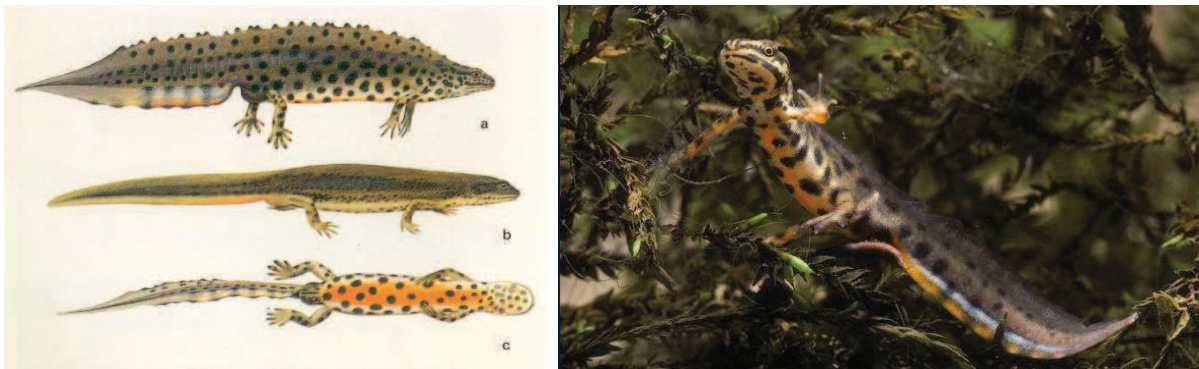


Figure I.9 Dessin d'un triton ponctué mâle (a), femelle (b) et mâle en face ventrale (c) et photographie d'un mâle en période nuptiale (www.osifimages.com).

Biologie, éthologie

La période de reproduction débute à partir de février et se termine au plus tard en juin pour le triton palmé. Elle débute un peu plus tard pour le triton ponctué (mars). Les adultes se rassemblent en milieu aquatique où les mâles initient une **parade** nuptiale complexe (figure I.10). Le comportement de parade des deux tritons est fortement similaire avec quelques variations dans la durée, la fréquence et la succession des séquences (Halliday 1977; Roberts

1990; Wambreuse 1984). La parade commence par une phase de reconnaissance de la femelle dans laquelle le mâle tourne autour de sa partenaire et renifle son cloaque. Dans chacune des phases d'orientation, de parade statique (dans laquelle le mâle fournit des stimuli mécaniques, chimiques et visuels) et de retraite, chacun des deux sexes peut choisir d'interrompre la parade. Celle-ci se concrétise si la femelle accepte le spermatophore que le mâle dépose. Mâles et femelles peuvent se reproduire plusieurs fois au cours de la saison de reproduction (Gabor & Halliday 1997; Garner & Schmidt 2003; Osikowski & Rafinski 2001; Verrell 1985; 1986). Chez les tritons, les mâles les plus grands seraient capables de produire plus de spermatophores (Halliday 1977; Howard *et al.* 1997). Néanmoins la production s'affaiblit au fur et à mesure de la saison et s'est montrée limitante chez le triton alpestre (Hoeck & Garner 2007). Il existe un **choix** des mâles pour les femelles les plus grandes (Verrell 1985; 1986) et un choix des femelles pour les mâles à la crête développée (Gabor & Halliday 1997; Hedlund 1990).

Après fécondation interne, les femelles enroulent chacun de leur 200 à 400 œufs dans la végétation ; la femelle palmée est plus sélective quant au choix des végétaux suggérant un investissement encore plus important (Griffiths 1996; Griffiths & Mylotte 1987; Norris & Hosie 2005) (figure I.10). L'incubation durant environ 1 mois. La larve se métamorphose en 2 ou 3 mois et le juvénile quittant les eaux ne mesure pas plus de 4 cm (Griffiths 1996).

Après la métamorphose, les juvéniles peuvent rester plusieurs années en milieu terrestre avant d'atteindre la maturité. La **maturité** sexuelle est atteinte vers 2 à 5 ans selon les populations de tritons ponctués (Cogălniceanu & Miaud 2003), et 4 à 5 ans pour une population de triton palmé de montagne (Guyétant *et al.* 1991), les mâles étant plus précoces (Bell 1977; Cogălniceanu & Miaud 2003; Guyétant *et al.* 1991; Marnell 1998b). La néoténie est rencontrée chez cette espèce, parfois fréquente dans certaines régions (Causse du Massif Central) (Denoël 2006). La **dispersion** du juvénile, généralement terrestre, peut l'éloigner de plus d'1 km de son lieu de naissance (Duguet & Melki 2003). Le taux de survie annuel des juvéniles avoisine les 80% (Bell 1977).

La reproduction est suivie d'une **migration** post-nuptiale. Les urodèles du genre *Lissotriton* font partie des organismes ayant les capacités de dispersion les plus faibles. La dispersion peut atteindre 150 m chez le triton palmé (Miaud 1990) et 50 à 180 m chez le triton ponctué (Warwick 1949). Bell (1977) ayant marqué 2500 individus de tritons ponctués constate qu'aucun d'entre eux n'a changé de site de reproduction d'une saison à l'autre. Guyétant *et al.* (1991) suggère une **fidélité** au site de ponte pour une population de tritons palmés de montagne.

En dehors de la période de reproduction, les adultes ont une vie aquatique ou terrestre, l'hivernation se déroulant dans la vase ou sous un tapis végétal. Ils se nourrissent de divers arthropodes, vers, mollusques à terre et de larves d'insectes, de petits crustacés, de têtards et de larves de tritons en phase aquatique. La **longévité** maximale atteinte par le triton ponctué est de 5 à 11 ans selon les populations (Bell 1977; Cogălniceanu & Miaud 2003), de 8 ans pour une population de tritons palmés de plaine (Miaud 1990) et jusqu'à 11 ans en montagne (Guyétant *et al.* 1991). Le taux annuel de survie avoisine 50% chez les adultes (Bell 1977). Alors que les mâles sont mûres plus tôt, les femelles tendent à montrer de meilleures capacités de survie (Bell 1977; Cogălniceanu & Miaud 2003; Guyétant *et al.* 1991; Marnell 1998b).

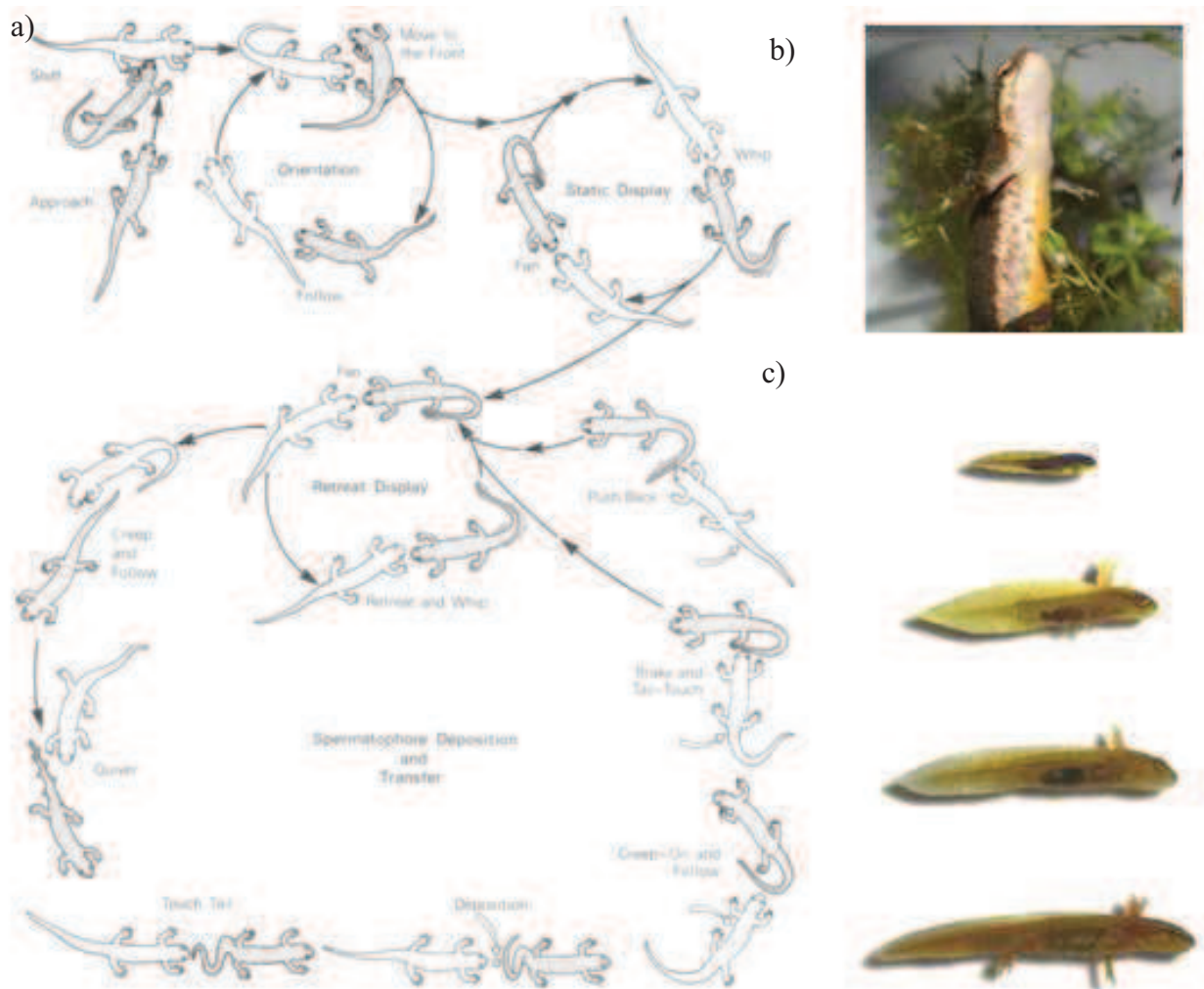


Figure I.10 a) Séquences de la parade du triton ponctué, le mâle est en gris (d'après Halliday 1977). b) Femelle de triton palmé enroulant ses œufs à la végétation aquatique et c) larves de triton palmé à 10, 18, 25 et 29 mm (Miaud & Muratet 2004).

Ecologie

Considéré comme **ubiquiste**, le triton palmé se reproduit dans une large gamme de milieux aquatiques stagnants ou à courant lent, les mares, étangs, tourbières, petits ruisseaux et leurs abords, préférant les mares relativement profondes, fermées et exemptes de poissons (Denoël & Ficetola 2008; Denoël & Lehmann 2006; Jakob *et al.* 2003; Thorn & Raffaelli 2001) (figure I.11). Il semble dépendre de la présence d'un couvert boisé minimum en milieu terrestre à proximité de sa zone de reproduction et sa présence est négativement influencée par la présence de culture (Denoël & Ficetola 2008). Le triton palmé occupe une niche écologique plus large que celle du ponctué, fréquentant abondamment les vallées alluviales. Cependant, sur la région de chevauchement de leur aires de répartition, ce dernier le remplace dans les secteurs inondables en fond de vallée et dans les zones arrière littorales (Duguet & Melki 2003).



Figure I.11 Mares à tritons palmés a) Forêt de Longuenée, La Membrolle-sur-Longuenée, 49 ; b) La maison neuve, Chalonnnes, 49 ; c) Les Rivières, la Varenne, 44

Le triton ponctué est une espèce de plaine et de colline, assez inféodée aux milieux littoraux d'une part et **alluviaux** d'autre part. L'habitat terrestre inclut des formations arborées, néanmoins il peut se maintenir dans les milieux ouverts, voire même sur des remblais dénudés mais riches en abris de toute sorte. Il accepte une grande diversité de plans d'eau : bras-morts, divers mares et bassins, ruisseaux, bas-marais, marécages, fossés de drainage... même si sa présence est négativement corrélée à l'urbanisation du paysage (Arntzen 1986; Denoël & Ficetola 2008; Duguet & Melki 2003; Marnell 1998a). Il s'accommode plus de substrats sableux que vaseux (Rannap *et al.* 2009). Comme pour le triton palmé, il peut s'accommoder de submersion prolongée, en zone alluviale mais fuit la présence de poissons prédateurs (Denoël & Ficetola 2008; Rannap *et al.* 2009). Sa présence est positivement corrélée à celle de ses conspécifiques dans les mares voisines (Rannap *et al.*

2009). En Pays-de-Loire, sa présence est inféodée à un habitat prairial uniquement en milieu alluvial (Mourgaud & Pailley 2005) (figure I.12).

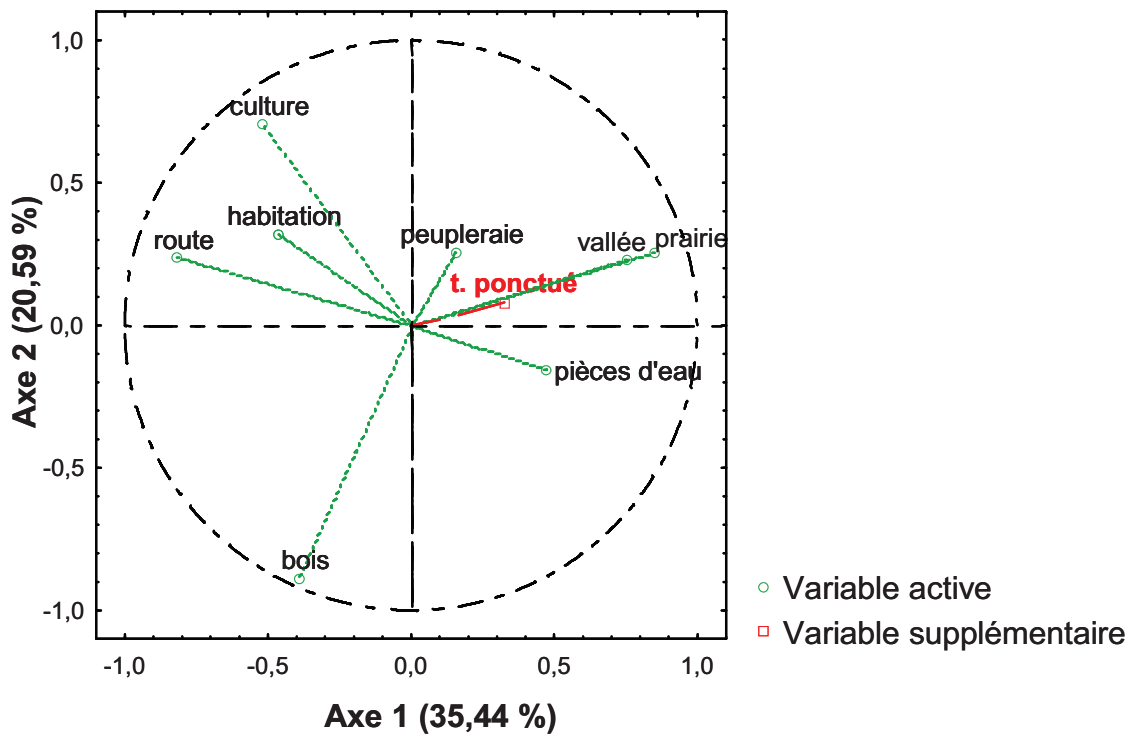


Figure I.12 AFC réalisée sur huit variables environnementales sur le site des Pays-de-Loire selon Johanet *et al.* (2009). La présence du triton ponctué est indiquée comme variable supplémentaire.

Menaces et intérêt de l'étude de la génétique des populations de tritons palmés

Les tritons palmés et ponctuéés sont **protégés** en France. Ils sont classés parmi les espèces « **A Surveiller** » dans le livre rouge des vertébrés de France. Entre 1950 et 1970, le triton palmé a disparu des Alpes-Maritimes et du Var, vraisemblablement du fait de l'urbanisation littorale. Le déclin du triton ponctué a été mis en évidence en Franche-Comté, peut-être à cause de la dégradation des milieux alluviaux auxquels il est souvent inféodé (Duguet & Melki 2003).

Les tritons palmés et ponctuéés sont des espèces protégées mais **ne sont pas en danger** (statut : at least concerned, IUCN 2008). De plus en plus, les études en génétique de la conservation ne se restreignent pas aux espèces en danger. Afin d'étudier les patrons et processus de diversité génétique et les principes liés à la conservation, les travaux sur les espèces communes sont nécessaires. En effet, les effectifs des espèces en danger sont souvent

faibles et il est difficile d'avoir un échantillonnage suffisant pour les analyses génétiques. Il est aussi intéressant d'utiliser des petits animaux comme modèles pour étudier les effets de la fragmentation des habitats et de l'isolement sur la diversité génétique. D'autres espèces de tritons comme le triton crêté *Triturus cristatus*, ont souffert de déclin dramatique sur la zone d'étude et sont listés dans les directives habitat (Le réseau Natura 2000 2009). L'étude des variations génétiques chez le triton palmé offre une opportunité de comprendre les patrons naturels de variation génétique d'une espèce d'amphibien dans un environnement encore relativement préservé où les populations n'ont visiblement pas subi de déclin.

Au cours de nos recherches, nous estimerons les **flux de gènes** et la **structure de population** chez le triton palmé en vallée de la Loire. En particulier, nous testerons l'influence de la **vallée alluviale** comme corridor ou au contraire comme barrière à la dispersion. Ces travaux permettront d'apporter des éléments de réponse sur l'importance de la matrice paysagère pour la viabilité des populations naturelles.

Spéciation et hybridation des tritons palmés et ponctués

L'hypothèse d'une remise en contact secondaire

L'hybridation entre tritons palmés et ponctués résulterait d'un contact secondaire postglaciaire (Spurway & Callan 1960). Durant les dernières glaciations (*i.e.* Würm, de 115 000 à 10 000 ans BP) les deux espèces auraient formé un anneau (*ring species*) autour des Pyrénées (figure I.13). La distribution du triton palmé aurait été davantage méridionale, s'étendant au sud de l'Espagne jusqu'au Nord de l'Afrique. L'extinction ou le retrait des formes hypothétiques du nord de l'Afrique aurait été postglaciaire ou lors d'une période interglaciaire. Le triton ponctué aurait vécu très proche de la limite sud des glaces, dans la péninsule balkanique et en Asie mineure (Thorn & Raffaelli 2001). Les populations auraient suivi le retrait des glaces lors de leur expansion dans les plaines du nord de l'Europe, et auraient colonisé l'Irlande avant que la mer la sépare de la Grande-Bretagne. La divergence actuelle des formes serait probablement une conséquence des changements climatiques durant le Pléistocène (de 1.8 MA à 12 000 ans BP). Deux théories alternatives sont avancées : la différenciation serait due (1) à l'isolement de populations relictuelles relativement grandes durant le rétrécissement de la distribution ou (2) à l'isolement de très petites populations colonisatrices (peut-être quelques femelles inséminées) pendant l'expansion de la distribution.

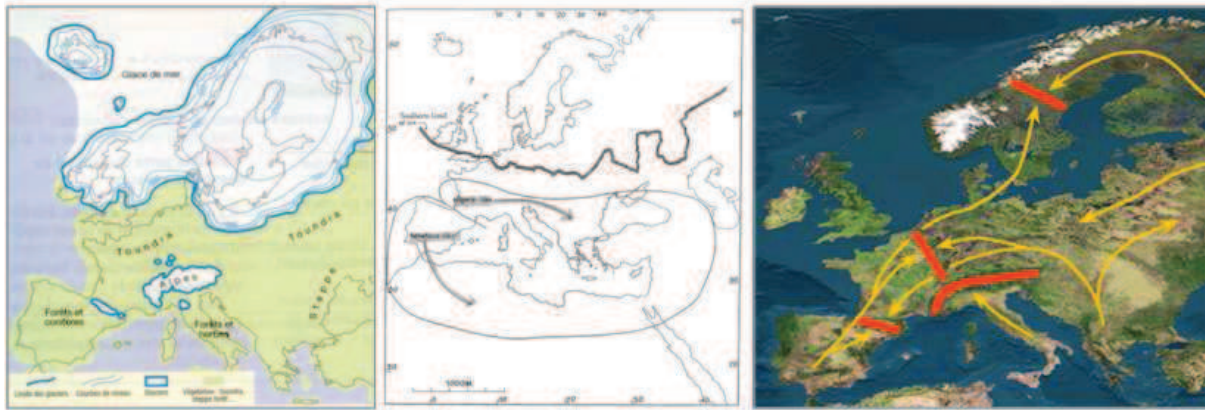


Figure I.13 a) L'Europe durant la dernière période glaciaire (glaciation Würm). b) Distribution suggérée des espèces en anneau durant les glaciations. L'extension maximum de la limite des glaces en Scandinavie est figurée. c) Principales voies de colonisation post-glaciaire en Europe (en jaune) et zones de contacts (en orange) d'après Taberlet *et al.* (1998).

Les potentialités d'hybridation et l'introgression

Lorsqu'ils ne sont pas complètement différenciés en allopatrie, de nombreux taxons sont concernés par l'hybridation lors de leur remise en contact secondaire. C'est le scénario le plus populaire relatif à l'origine des zones hybrides (Mayr 1942).

Les tritons palmés et ponctués présentent un large **chevauchement géographique, écologique et temporel** (Chadwick *et al.* 2006; Griffiths 1986; 1987). La période de reproduction étant similaire, il n'est pas rare de voir les deux espèces parader au même moment dans la même mare (Smith 1969; Wambreuse 1984).

Halliday (1977) a observé en conditions expérimentales une réponse positive des femelles de tritons palmés à la cour de mâles ponctués, allant jusqu'à prélever les spermatophores déposés. Les deux espèces étant similaires en taille et en morphologie et les spermatophores étant utilisés par les deux espèces pour le transfert de sperme, les **barrières mécaniques** semblent négligées.

Le **comportement sexuel** semble être le principal isolement reproducteur entre les deux espèces. Toutefois, les différences seraient limitées à la phase d'exhibition (Halliday 1972; Wambreuse 1984). Roberts (1990) a montré qu'en condition expérimentale, le choix d'un partenaire conspécifique n'était pas généralisé. Par exemple, ni les femelles ponctués ni les mâles ponctués ne sont attirés par le conspécifique sur le seul critère visuel.

Les croisements dirigés entre tritons palmés et ponctués indiquent que 67% (26 individus sur 39 résultants de croisements entre femelles ponctuées et mâles palmés) et 87% (68 individus sur 78 résultants de croisements entre femelles palmées et mâles ponctués) ont

donné naissance à des F_1 qui se sont correctement métamorphosés (Spurway & Callan 1960). La **viabilité** des hybrides produits artificiellement ou naturellement indique que les barrières postzygotiques ne sont pas complètes entre les deux espèces. Les auteurs supposent cependant une maturation sexuelle incomplète. Benazzi (1957) conclut sur une **fécondité limitée** de l'hybride. Wolterstorff (in Benazzi 1957) a mis en évidence que les œufs des backcross dans une expérience de croisement entre une femelle F_1 et un mâle *L.v.* étaient correctement développés. Par contre un croisement entre hybrides F_1 a généré peu d'œufs F_2 dont seulement deux se sont développés. Cependant certains indices d'introgression ont été trouvés sur un site d'étude dans le Nord-Pas-de-Calais au moyen de marqueurs allozymiques (Arntzen *et al.* 1998). Quelques hybrides ont été rencontrés dans plusieurs endroits de la zone de contact (Arntzen *et al.* 1998; Beebee *et al.* 1999; Griffiths *et al.* 1987; Schlüpmann *et al.* 1999) (figure I.14).

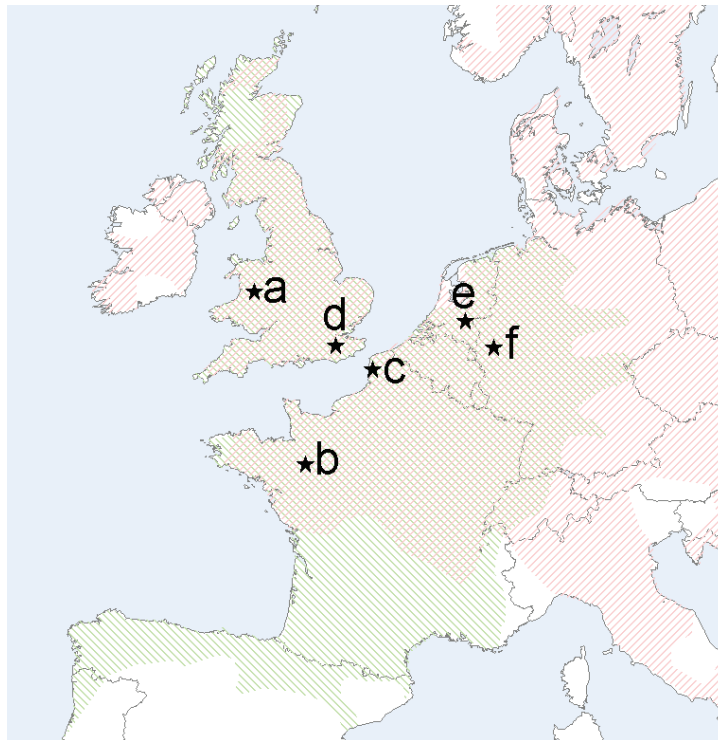


Figure I.14 Localisation des hybrides trouvés d'après la littérature : ★a, Griffiths *et al.* 1987; b, c, Arntzen *et al.* 1998; d, e, Beebee *et al.* 1999; f, Schlüpmann *et al.* 1999.

Cependant, seuls des mâles hybrides ont été retrouvés. Or, selon la loi de Haldane (1922), les mâles (sexe hétérogamétique chez les tritons, Hillis & Green 1990) seraient moins viables que les femelles. La difficulté à différencier les femelles des deux espèces ainsi que la ressemblance potentielle des individus rétrocroisés pourraient sous-estimer le taux d'hybridation dans les populations naturelles (Naisbit *et al.* 2003). Eu égard à la porosité de certaines barrières d'isolement reproducteur entre ces deux espèces (*cf.* figure I.15

récapitulative), nous émettons l'hypothèse que l'hybridation soit plus fréquente qu'observée dans les populations naturelles.

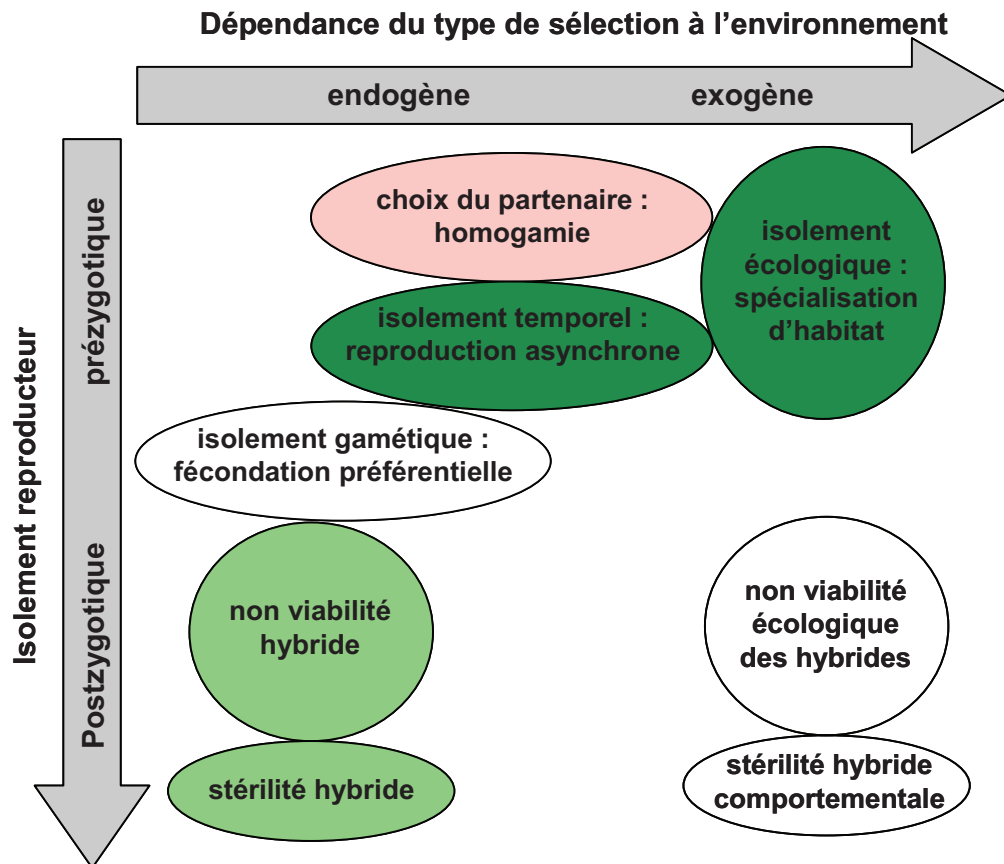


Figure I.15 Mécanismes d'isolement reproducteur, classés selon le moment de leur efficacité (avant ou après la formation du zygote) et la nature des pressions sélectives (dépendante ou indépendante de l'environnement) (d'après Bierne 2001). Les disques de couleur vert foncé indiquent une absence évidente de barrière (Chadwick *et al.* 2006; Griffiths 1986; 1987) ; vert clair des barrières perméables (Arntzen *et al.* 1998; Beebe *et al.* 1999; Benazzi 1957; Griffiths *et al.* 1987; Schlüpmann *et al.* 1999; Spurway & Callan 1960), rouge clair des barrières plutôt efficaces mais parfois poreuses (Halliday 1972; Roberts 1990; Wambreuse 1984), blanc des barrières non testées.

Au cours de nos recherches, nous évaluerons par une analyse génétique, le taux d'**hybridation** et le **flux de gènes** dans les populations naturelles et testerons l'hypothèse de **Haldane** (1922). Ceci nous permettra d'apporter des éléments de discussion sur la **viabilité** et la **fertilité** des hybrides. Nous concentrerons notre étude sur une zone marginale de la répartition du triton ponctué, **la vallée de la Loire**. Dans cette zone les effectifs restreints de ponctué par rapport à ceux de palmés pourraient favoriser les accouplements interspécifiques (Hubbs 1955; Randler 2002; Secondi *et al.* 2006).

L'ensemble des travaux ayant été principalement effectué dans un contexte paysager particulier, il convient de définir les caractéristiques d'une vallée alluviale et les particularités de la vallée de la Loire.

4 - Les caractéristiques d'une vallée alluviale et le cas de la vallée de la Loire

Les annexes hydrauliques et la biodiversité

Les cours d'eau sont des systèmes ouverts régis par des entrées et des sorties permanentes d'eau et de matière. Ces flux liquides et solides, avec d'autres paramètres physiques comme la pente de la vallée et la granulométrie des sédiments du lit et des berges, contribuent à modeler les formes de l'hydrosystème fluvial. A cet hydrosystème, dont l'axe principal est longitudinal (de l'amont vers l'aval), s'ajoute un axe latéral (du cours d'eau vers le lit majeur) qui s'accompagne de biotopes typiques façonnés par ce moteur géodynamique. Le milieu aquatique est donc assorti d'**annexes hydrauliques** : bras secondaires, bras morts, prairies inondables, marais, marécages (Ward 1998) (figure I.16). Ces dépendances du fleuve situées dans le lit majeur ou plaine d'inondation sont des écosystèmes interconnectés par le réseau hydrologique de surface ou par le réseau souterrain, hydrauliquement actifs à partir d'une certaine hauteur de la ligne d'eau (Malavoi & Souchon 1996).

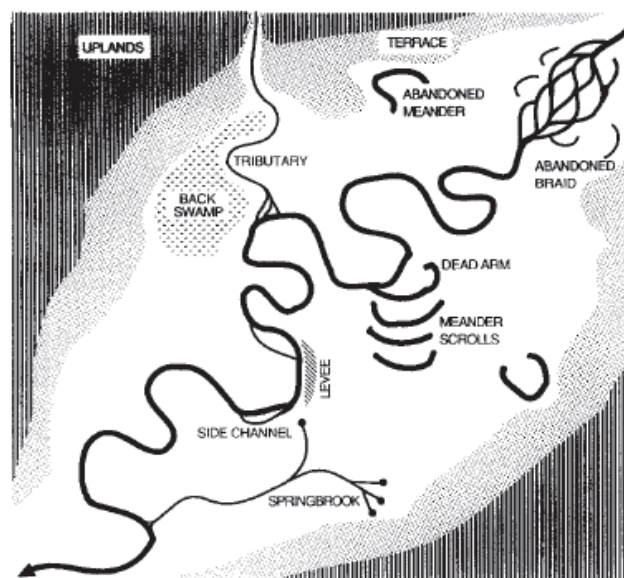


Figure I.16 Quelques éléments géomorphiques majeurs d'une plaine alluviale (→ sens du courant) (Ward 1998).

Ces pièces d'eau, superficielles ou profondes diffèrent entre elles d'une part par leur **dimension** (des bras morts de grande surface aux cuvettes de quelques mètres carrés ; des pièces d'eau profondes aux mares et flaques). La **proximité de la rivière** joue un rôle essentiel dans les fluctuations annuelles du niveau hydraulique. Ainsi, le **retrait et le**

remplissage sont plus ou moins tardifs et importants. Selon le cas, l'eau elle-même est renouvelée toutes les années ou seulement lors des grandes crues. Certaines annexes éloignées du courant peuvent ainsi rester **isolées plusieurs années**, alors que d'autres sont submergées toutes les saisons de hautes eaux. La **variabilité spatio-temporelle** de ces processus joue un rôle important dans la détermination de l'hétérogénéité et la stabilité physique des habitats ainsi que dans la diversité des paysages alluviaux (Ward *et al.* 1999; Ward & Wiens 2001), ce qui engendre une **biodiversité** élevée dans la plaine d'inondation (Baber *et al.* 2004; Monk *et al.* 2008; Morand & Joly 1995; Tockner *et al.* 1999; Ward 1998; Ward *et al.* 2002; Ward *et al.* 1999) (figure I.17). Les habitats alluviaux augmentent la richesse régionale de plus de 50% en moyenne (Sabo *et al.* 2005).

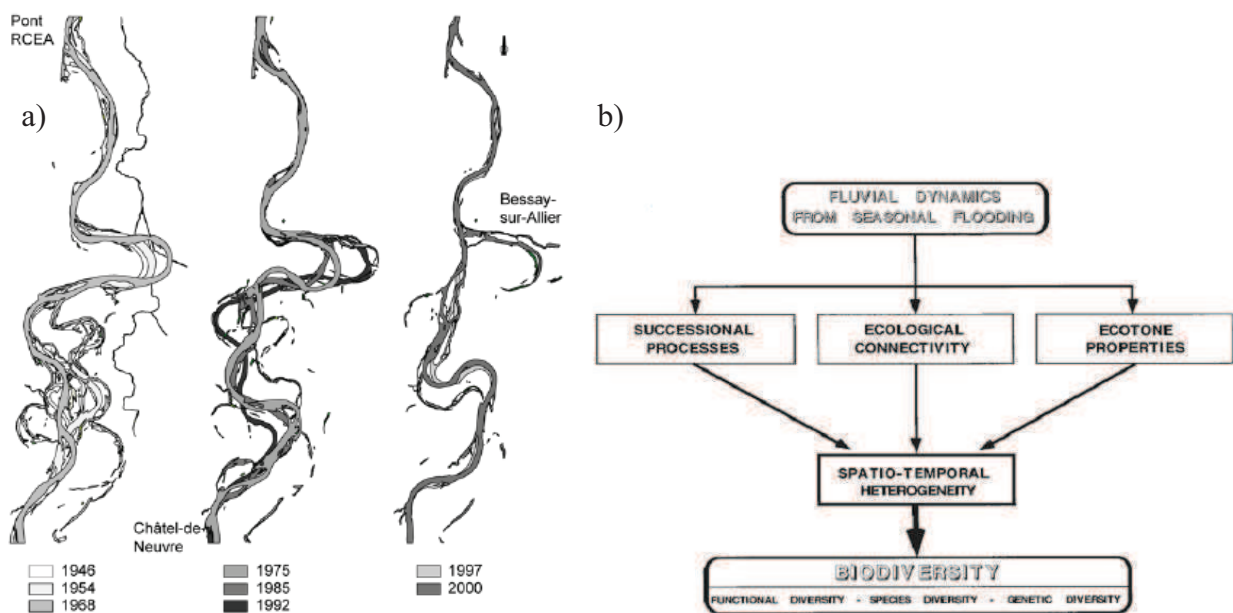


Figure I.17 a) Instabilité temporelle d'un train de méandres dans la Réserve Naturelle du Val d'Allier. b) Diagramme simplifié illustrant l'importance du rôle de la dynamique fluviale dans le maintien des écotones, de la connectivité et de la succession comme déterminants majeurs de l'hétérogénéité de l'habitat et de la biodiversité dans les plaines alluviales (Ward *et al.* 1999).

Les annexes hydrauliques de la Loire

La Loire est le plus long fleuve français (plus de 1 000 km) et son bassin d'une superficie totale de 117 000 km² se déploie de l'Ardèche montagnarde à la Bretagne, recouvrant un cinquième du territoire français (Bouchardy 2002) (figure I.18). La Loire compte parmi les cours d'eau les moins aménagés d'Europe ce qui permet la présence d'une grande variété de milieux semi-humides profitant à de très nombreuses espèces animales et végétales, remarquables par leur diversité et souvent leur rareté. En particulier, la région du Val de Loire entre Sully-sur-Loire dans le Loiret, et Chalonnes-sur-Loire en Maine-et-Loire, a été inscrite

au patrimoine mondial de l'UNESCO en 2000 (<http://whc.unesco.org/>) et représente le plus grand site classé de France. La vallée de la Loire s'étendant des Ponts-de-Cé à Nantes a été classée périmètre Natura 2000 (Le réseau Natura 2000 2009).

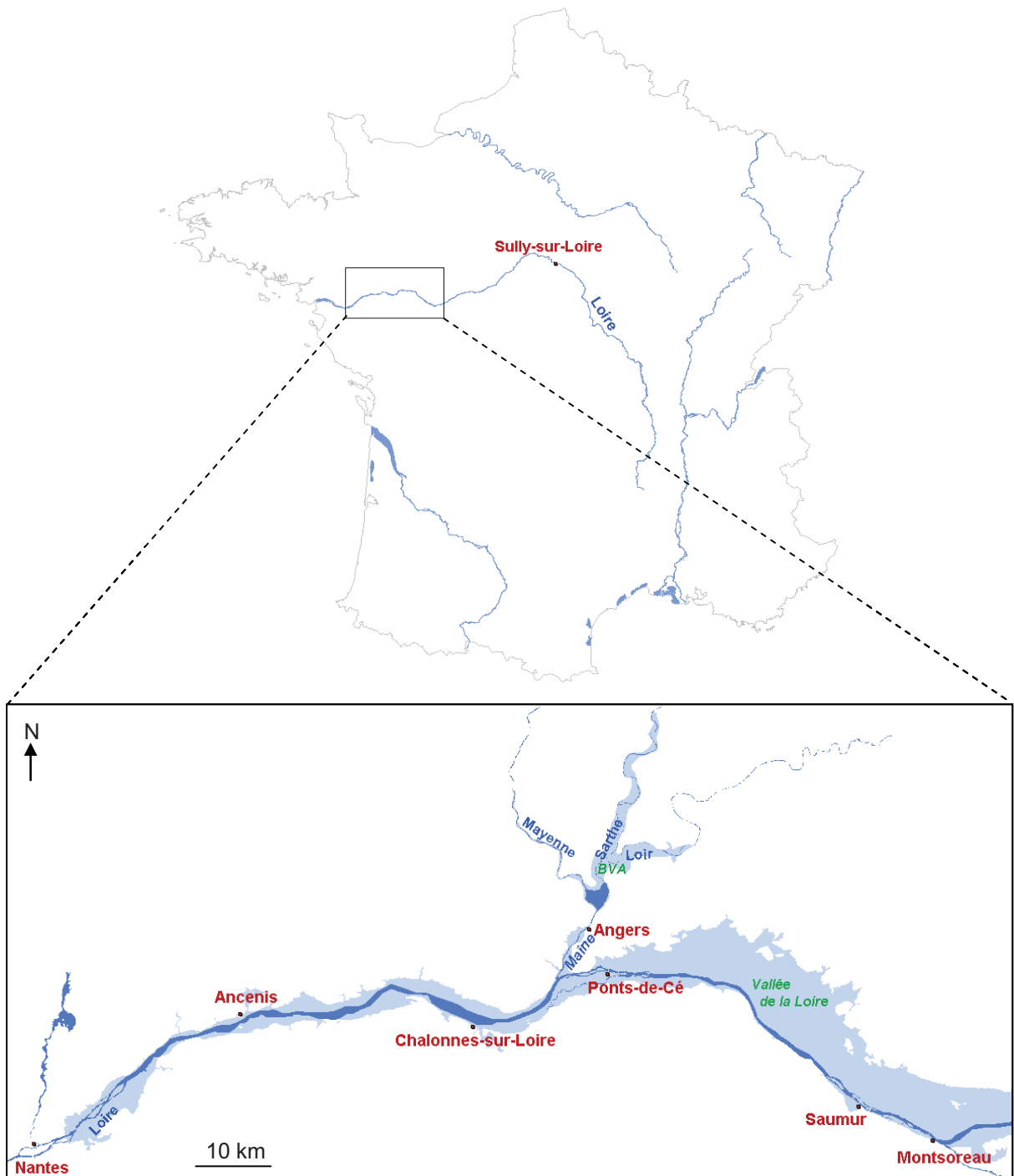


Figure I.18 Vallée de la Loire et agrandissement sur la zone d'étude. La vallée de la Loire comprise dans la limite des plus hautes eaux connues est indiquée en bleu clair ; les basses vallées angevines (BVA) sont les vallées des quatre affluents de la Loire : la Maine, la Mayenne, la Sarthe et le Loir.

En Pays-de-Loire, les annexes hydrauliques sont appelées « boires » (figure I.19). **Les boires** sont des dépressions de la plaine alluviale, anciens bras abandonnés. Elles sont caractérisées par une végétation permanente et une connexion unique, le plus souvent à l'aval. Quand leur fond est perméable (sable, gravier), le niveau de l'eau y suit celui de la nappe alluviale par capillarité ; quand elles sont étanches, elles se remplissent des eaux de ruissellement des coteaux ou des affluents, ou par débordement direct du fleuve. Leur agencement, généralement parallèle au fleuve, est dû à la topographie particulière du remplissage sédimentaire ; les abords du lit mineur (*i.e.* le bourrelet de rive) plus élevés que les pieds de coteaux s'opposent souvent à la fusion directe des eaux. **Les basses vallées** d'affluents (ex : BVA, figure I.18) sont des zones inondables submergées par les eaux de l'affluent ou lors du refoulement des eaux de la Loire. Le bourrelet de rive contraint l'affluent à emprunter une ou plusieurs boires avant de se jeter dans le fleuve. Dans la majorité des cas, des vannages placés à leur débouché dans la vallée y maintiennent un certain niveau d'eau pendant l'étiage.

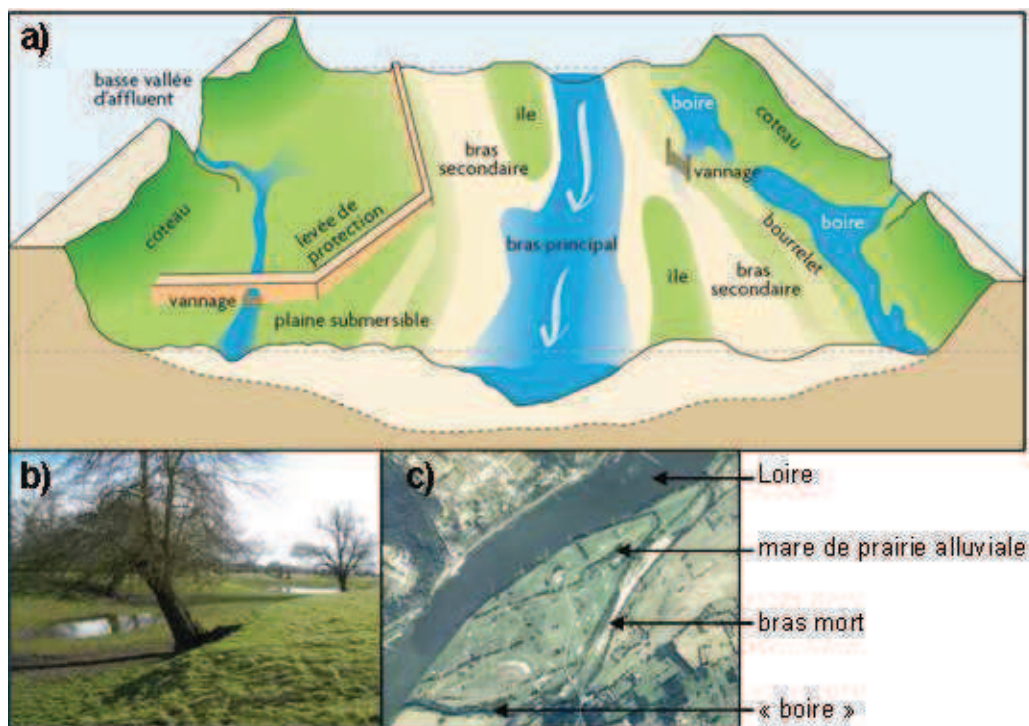


Figure I.19 a) Localisation et disposition des annexes hydrauliques dans un paysage typique de la vallée de la Loire (GIP Loire Estuaire 2003). b) Ile de la Poste, la Ménière, 49. c) Vue aérienne de la Loire à Thouaré, 44.

La mise en eau des annexes hydrauliques, et donc leur temporarité, est directement liée aux crues de la Loire qui ont lieu de novembre à mars, voire mai pour les plus tardives (figures I.20 et I.21).

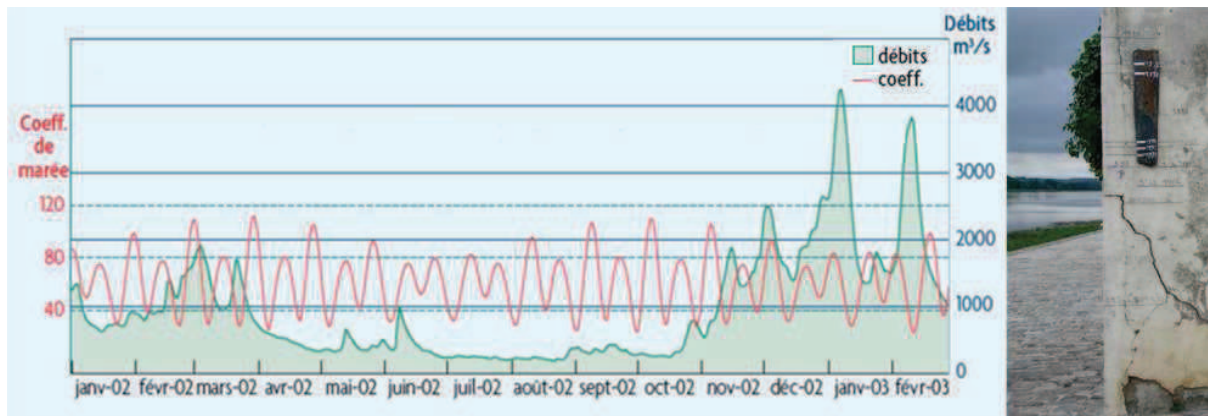


Figure I.20 Hydrogramme de la Loire et photographie représentant quelques hauteurs d'eau maximales atteintes par les crues à Bouchemaine (49) (GIP Loire Estuaire 2003).

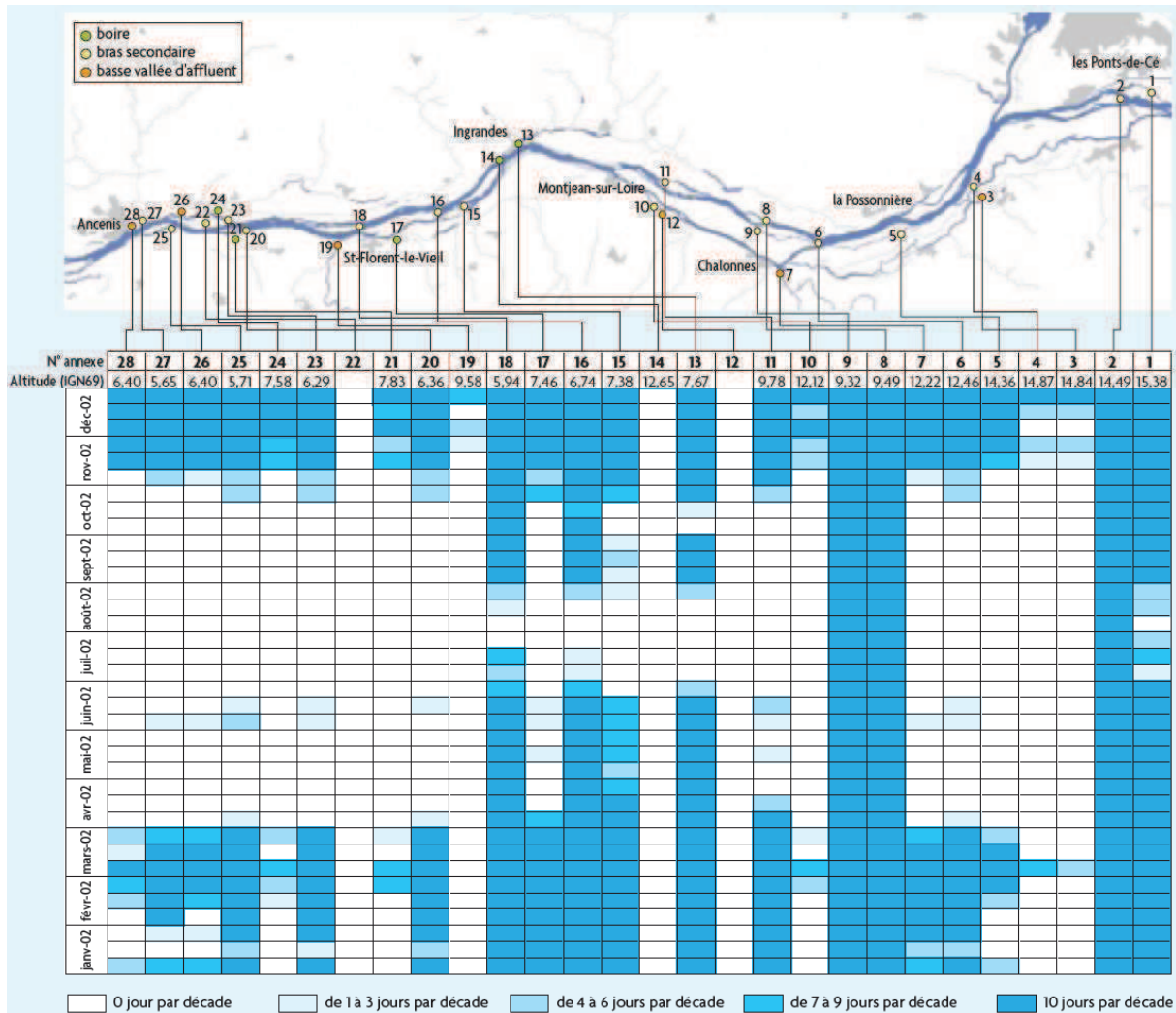


Figure I.21 Chronogramme de mise en eau de quelques annexes hydrauliques pendant une année (GIP Loire Estuaire 2003). A partir du mois d'avril, la majorité des annexes ne sont plus en eau.

La vallée de la Loire reste un milieu relativement préservé. Cependant l'**effondrement des lignes d'eau** (figure I.22) tout au long du siècle a fait suite aux travaux d'aménagement de la voie navigable (construction des épis et creusement du bassin de marée), aux extractions de sable dans le lit mineur (90 millions de mètres cubes depuis 1900 entre Nantes et la Maine), progressivement réduites depuis 1978 puis interdites au début 1993. S'ajoutant aux travaux de protections des berges et de canalisations, la plupart de ces effets et de leurs interactions contribuent à l'**assèchement, l'isolement et la fermeture** de certaines annexes fluviales (Belleudy 2000).

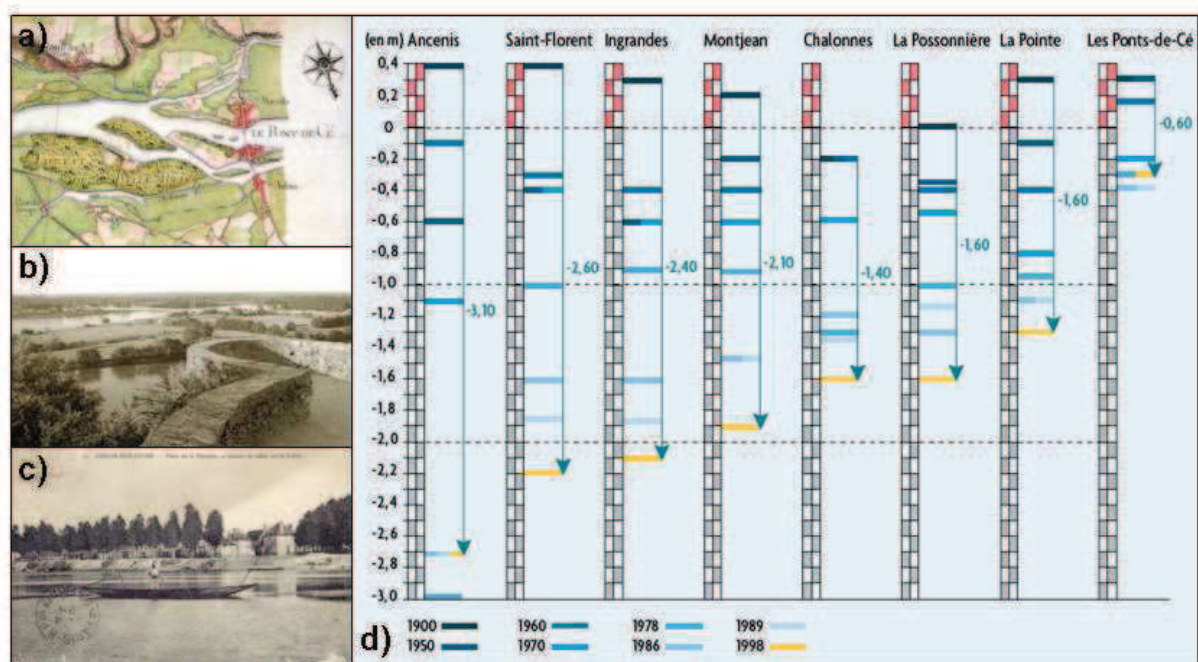


Figure I.22 a) Canal de l'Authion (49) b) Levée de protection à St-Florent-le-Vieil (49) c) Tireurs de sable à Cosne-sur-Loire (58) d) Niveaux atteints par un étiage de 177 m³/s à chaque échelle entre Ancenis et les Ponts-de-Cé, de 1900 à 1998 (GIP Loire Estuaire 2002).

5 - Plan de la thèse

La thèse s'organise en quatre chapitres.

Dans le CHAPITRE II nous présenterons les techniques d'étude qui serviront pour l'ensemble des trois autres chapitres, en particulier, le développement de marqueurs microsatellites (ARTICLE 1).

Dans le CHAPITRE III, par une analyse génétique, nous évaluerons le taux d'**hybridation** et le **flux de gènes** dans les populations naturelles de tritons palmés et ponctués (ARTICLE 2). Ceci nous permettra d'apporter des éléments de discussion sur la **viabilité** et la **fertilité** des hybrides. En parallèle, nous étudierons deux types de signaux pouvant jouer un rôle dans la reconnaissance spécifique et donc l'isolement prézygotiques. D'une part, en étudiant la **morphologie** d'adultes mâles et femelles de tritons palmés, nous chercherons à savoir si un **déplacement de caractère reproducteur** existe en syntopie (ARTICLE 3). D'autre part, par des tests **comportementaux**, nous chercherons à savoir si les **signaux visuels et/ou chimiques** sont évalués par chacun des partenaires lors de la parade sexuelle et quelle est leur importance dans l'isolement reproducteur (ARTICLE 4).

Dans le CHAPITRE IV, nous estimerons le **flux de gènes** et la **structure de population** chez le triton palmé en vallée de la Loire. En particulier, nous testerons l'influence de la **vallée alluviale** comme barrière à la dispersion ou au contraire comme corridor. Ces travaux nous permettront d'apporter des éléments de réponse sur l'importance de la matrice paysagère dans la viabilité des populations naturelles.

Dans le CHAPITRE V, nous évaluerons le flux de gènes entre tritons palmés et ponctués au locus du **complexe majeur d'histocompatibilité** (CMH). Nous étudierons aussi la structure des populations de tritons palmés sur ce marqueur candidat. Nous étendrons notre étude à l'échelle de l'aire de répartition afin de comparer la structure neutre (microsatellite) à cette structure potentiellement sous sélection.

Dans le CHAPITRE VI, nous discuterons de l'ensemble des résultats obtenus lors de la thèse et émettrons des **perspectives** de travail

CHAPITRE II

SITES ET PROTOCOLES D'ETUDE

1 - L'échantillonnage

L'échantillonnage en Vallée de la Loire

Notre zone d'étude se situe entre Montsoreau (49) et Nantes (44). Dans cette région, des sites allotopiques de tritons palmés alternent avec des sites syntopiques de tritons palmés et ponctués.

Afin d'étudier le flux de gènes entre tritons palmés et ponctués, l'échantillonnage a été intensifié dans la vallée alluviale, habitat naturel du triton ponctué (Mourgaud & Pailley 2005). Pour répondre aux questions de génétique du paysage chez le triton palmé, nous avons échantillonné selon des transects transversaux de part et d'autre de la Loire. Pour chaque transect, nous avons essayé d'échantillonner un site en vallée, un site en plateau et, si possible, un site en position intermédiaire. La vallée alluviale a été bornée selon la limite des plus hautes eaux connues (DIREN Centre 2005).

Les tritons palmés colonisent les pièces d'eau pendant plusieurs semaines (de mars à mai) où ils se reproduisent de jour comme de nuit, ce qui permettait un échantillonnage diurne. La capture se faisait à l'aide d'une épuisette passée le long de la rive et au niveau de la végétation aquatique que les tritons utilisent pour se cacher, se nourrir et pondre (Griffiths & Mylotte 1987; Miaud 1995; Norris & Hosie 2005). L'échantillonnage durait de 5 minutes à 2 heures selon les cas. Même si de nombreux points d'eau étaient colonisés par les tritons palmés, il n'y avait souvent que quelques individus, d'où la difficulté de trouver des mares dans lesquelles environ 30 individus étaient présents. Sur les deux saisons de capture (2006 et 2007), 1513 individus des deux espèces ont été échantillonnés. Dans le détail, 1240 tritons palmés et 273 tritons ponctués ont été capturés respectivement dans 41 et 14 sites de reproduction respectivement. L'ensemble des tritons ponctués a été trouvé en syntopie avec le triton palmé. Sur les 41 sites échantillonnés, 20 se situent en vallée alluviale et 21 en plateau. Leur localisation est indiquée sur la figure II.1 et le nombre d'individus est indiqué dans le tableau récapitulatif II.1. L'organisation des transects a été conçue de manière à ce que chaque combinaison de paire de sites (vallée-vallée et plateau-plateau) soit représentée en effectif équivalent par classe de distance géographique (figure II.2). Par un test de Mann-Whitney, nous avons confirmé cette homogénéité ($U = 1,19.10^{-4}$, $p = 0,164$).

Tous les individus ont été ramenés au laboratoire pour les mesures morphométriques. Elles ont été réalisées le jour même ou le lendemain. L'ablation d'une phalange et sa

conservation dans l'éthanol à 75% ont permis les analyses génétiques et les essais de squelettochronologie. Les prélèvements effectués dans la partie membraneuse de la queue (cette partie se résorbe après la période de reproduction) ne permettaient pas d'obtenir assez d'ADN avec la méthode d'extraction utilisée en routine (chelex®, Walsh *et al.* 1991). Tous les individus ont été rapportés dans leur mare d'origine dans les jours qui ont suivi.

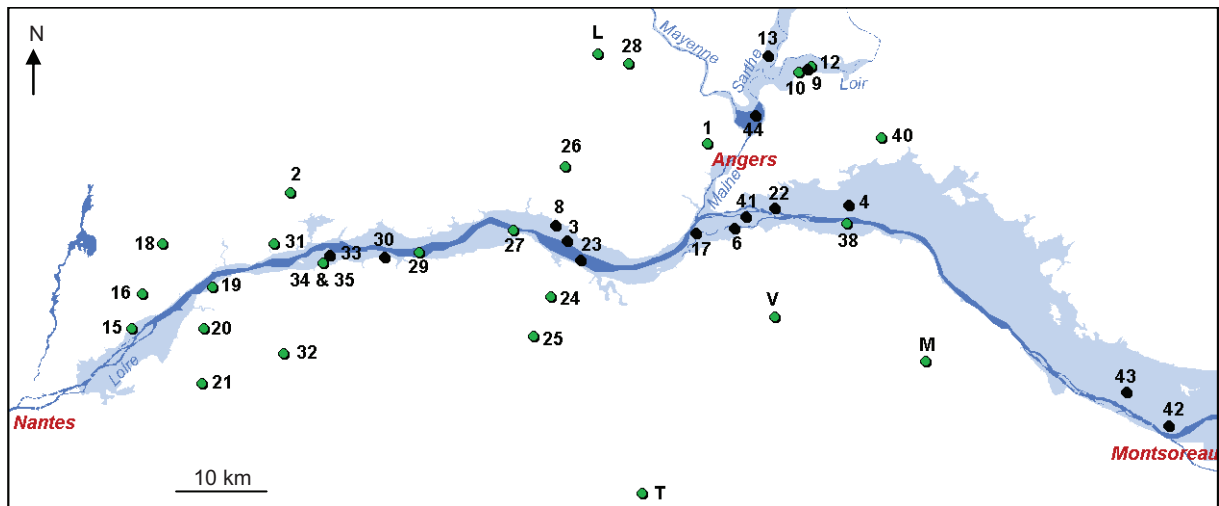


Figure II.1 : Localisation des sites d'étude en Pays-de-Loire. Les sites allotopiques de tritons palmés sont symbolisés par des ronds verts et les sites syntopiques de tritons palmés et ponctués par des ronds noirs. La vallée (bleu clair) est délimitée par la limite des plus hautes eaux connues. Les Basses Vallées Angevines (BVA), regroupent les vallées alluviales de la Mayenne, de la Sarthe, du Loir et de la Maine.

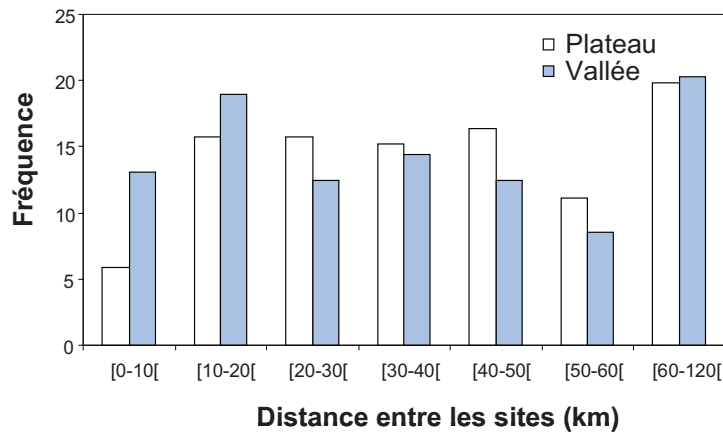


Figure II.2 Distribution des distances entre sites échantillonnés par combinaison de situation.

L'échantillonnage en Europe

Nous avons voulu comparer, d'une part, le taux d'hybridation entre tritons palmés et ponctués en vallée de la Loire par rapport au reste de l'aire de sympatrique. Pour estimer si le flux de gènes sortait de la zone sympatrique, des échantillonnages ont aussi été réalisés dans

l'aire d'allotopie de chacune des deux espèces. D'une part, les échantillonnages de tritons palmés en Europe ont permis de connaître la diversité génétique et la structure de population à l'échelle de l'aire de distribution afin d'interpréter les résultats obtenus à l'échelle régionale, pour les locus neutres (microsatellites) et gènes candidats (CMH).

Pour cela nous avons contacté des chercheurs et naturalistes herpétologues possédant déjà des échantillons ou étant disposés à réaliser les captures. Les échantillons étaient constitués de clivages de phalange ou d'extrémités de queue conservés dans l'éthanol à 70% ou 100%. Leur localisation est indiquée sur la figure II.3 et le nombre d'individus est indiqué dans le tableau récapitulatif II.1).

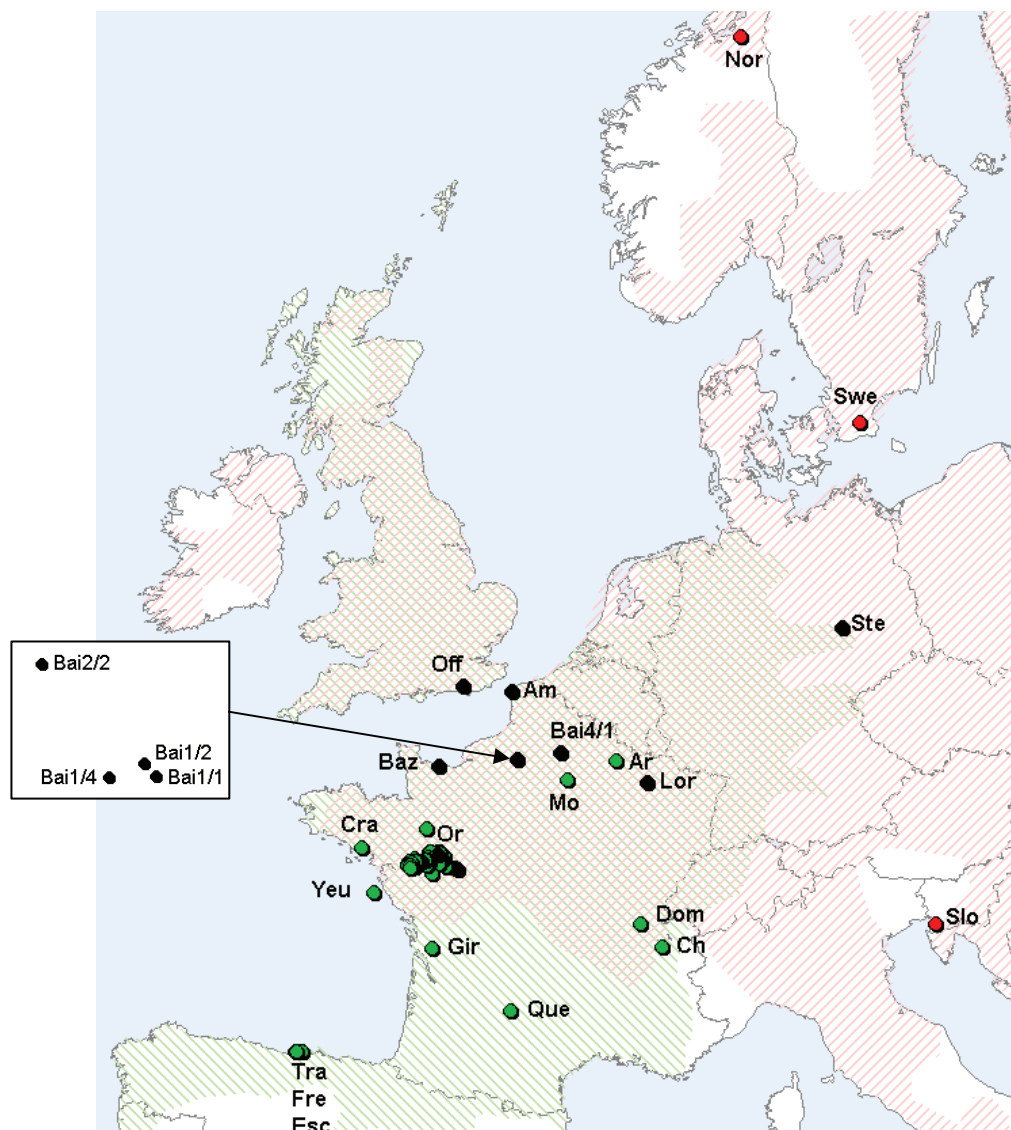


Figure II.3 Localisation des sites d'étude en Europe. L'aire de répartition du triton palmé est hachurée en vert et celle du ponctué en rouge. Les sites allotopiques de palmés sont symbolisés par des ronds verts, ceux de ponctué par des ronds rouges et les sites syntopiques par des ronds noirs.

Tableau II.1 Effectif de triton palmés (n Lh), tritons ponctués (n Lv), position des sites ligériens, situation avec l'espèce hétérosécificque et échantillonneur(s) pour chaque site en Pays-de-Loire ou ailleurs en Europe.

Mare	Localisation	n Lh	n Lv	position	situation allotopie/syntopie	Echantillonneur(s)
PAYS-DE-LOIRE						
1	Étang St Nicolas, Angers, 49	35		plateau	allotopie palmé	A. Johanet
2	Latay, Ancenis, 44	29		plateau	allotopie palmé	C. Lemaire
3	L'oise pelée, St Georges, 49	32	9	Vallée	syntopie	A. Johanet
4	Boire du Saule, La Bohalle, 49	24		Vallée	allotopie palmé	A. Johanet
6	La Jubeaudière, Mûrs-Erigné, 49	19	24	Vallée	syntopie	A. Johanet
8	La Boire blanche, St Georges, 49	44	25	Vallée	syntopie	A. Johanet
9	Chevaux, La Commuèche, Villevêque, 49	22	13	Vallée	syntopie	S. Boyer & S. Caillault
10	TER, La Bretauderie, Villevêque, 49	32		Vallée	allotopie palmé	S. Boyer & S. Caillault
12	Pré2, Touchet, Villevêque, 49	28		Vallée	allotopie palmé	S. Boyer & S. Caillault
13	Vêtements, Communal de Soulaire, Briollay, 49	1	32	Vallée	syntopie	S. Boyer & J. Johanet
15	Boire de Mauve, Mauve sur Loire, 44	30		Vallée	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
16	Le Plessis, 44	33		plateau	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
17	Pont-Jubeau, Pont-de-Cé, 49	30	20	Vallée	syntopie	A. Johanet
18	La Martinière-Chenil, St Mars-du désert, 44	31		plateau	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
19	Les Rivières, la Varenne, 44	30		plateau	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
20	le vieux buttay, la chapelle basse mer, 44	30		plateau	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
21	Le pé Bardou, le loroux botreau, 44	31		plateau	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
22	Les Grolets, Ponts-de-Cé, 49	9	8	plateau	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
23	la croix du jar, île de chalongne, 49	36	1	Vallée	syntopie	A. Johanet
24	La Petite Gourdonnière, St-Laurent-de-la-Plaine, 49	22		plateau	allotopie palmé	A. Johanet
25	Le Planty, Ste-Christine, 49	30		plateau	allotopie palmé	A. Johanet
26	Temps perdu, St Augustin-des-bois, 49	30		plateau	allotopie palmé	A. Johanet
27	La maison neuve, Chalannes, 49	30		Vallée	allotopie palmé	A. Johanet
28	Le Pas au Chat, Longuenée, 49	27		plateau	allotopie palmé	A. Johanet
29	Ile Batailleuse, St Florent-le-Vieil, 49	31		plateau	allotopie palmé	A. Johanet
30	La Rougerie, St Florent-le-Vieil, 49	29	6	plateau	allotopie palmé	C. Lemaire
31	Bois Mouchet, Ancenis, 44	25		plateau	syntopie	A. Johanet & C. Lemaire
32	La Héronnière, St Laurent des Autels, 49	36		plateau	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
33	Boire des Ecoilles, Liré, 49	35	52	Vallée	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
34	Boire Ste Catherine fossé 1, Liré, 49	38		Vallée	syntopie	A. Johanet & C. Lemaire
35	Boire Ste Catherine fossé 2, Liré, 49	38		Vallée	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
38	Bois de l'Épinay, Blaison-Gohier, 49	30		Vallée	allotopie palmé	A. Johanet & C. Lemaire
40	Bois de Briançon, Bauné, 49	31		plateau	allotopie palmé	A. Johanet

41	Bois Bourreau, Mûrs Erigné, 49	56	12	Vallée	syntopie	A. Johanet
42	Rue Murray, Varennes-sur-Loire, 49	57	11	Vallée	syntopie	A. Johanet
43	Le Plongeon, Varennes-sur-Loire, 49	26	26	Vallée	syntopie	A. Johanet
44	Ile St Aubin, Angers, 49	2	34	Vallée	syntopie	Jean Secondi
L	Forêt de Longuenée, La membrolle, 49	60		plateau	allotopie palmé	Jean Secondi
M	Forêt de Milly, Gennes, 49	33		plateau	allotopie palmé	Jean Secondi
T	Tourlandry, Chemillé, 49	24		plateau	allotopie palmé	Jean Secondi & Emeric Hinot
V	Vauchrétien, Brissac-Quincé, 49	24		plateau	allotopie palmé	Jean Secondi & Emeric Hinot
EUROPE						
Allopatric triton palmé						
Esc	Escobedo, Espagne	30			allotopie palmé	Francisco Javier Diego-Rasilla
Fre	Fresnedo, Espagne	25			allotopie palmé	Francisco Javier Diego-Rasilla
Tra	Tramalón, Espagne	33			allotopie palmé	Francisco Javier Diego-Rasilla
Que	PNR des Causses du Quercy, 46	30			allotopie palmé	Pierre Marty & Anaïs Zimmerlin
Gir	Charentes-Maritime, 17	30			allotopie palmé	Alexandre Monguillon
Yeu	île d'Yeu, 85	30			allotopie palmé	Gaël Zannetty
Ch	Châteauneuf, 73	31			allotopie palmé	Claude Miaud
Dom	Dombes, 01	37			allotopie palmé	Pierre Joly
Sympatric						
Cra	KerGoët, Crach, 56	24			allotopie palmé	David Henrio
Or	Orée du bois, Ahuillé, 53	30			allotopie palmé	Aurélien Johanet & Edouard Beslot
Baz	Bazenville, 14	25	4		syntopie	Mickaël Barrioz & Julien Endelin
Bai1/1	St-Germer-de-Fly, Pays de Bray ouest, 60	30	0		allotopie palmé	Jean Secondi & Franck Grossiord
Bai1/2	St-Germer-de-Fly, Pays de Bray ouest, 60	15	36		syntopie	Jean Secondi & Franck Grossiord
Bai1/4	St-Germer-de-Fly, Pays de Bray ouest, 60	23	8		syntopie	Jean Secondi & Franck Grossiord
Bai2/2	St-Germer-de-Fly, Pays de Bray ouest, 60	30	8		syntopie	Jean Secondi & Franck Grossiord
Bai4/1	Brétigny, vallée de l'Oise, 02	2	30		syntopie	Jean Secondi & Franck Grossiord
Mo	Essômes sur Marne, Monneaux, 02	30			allotopie palmé	Christophe Lemaire
Ar	Mare du Rocan, Briquenay, 08	32			allotopie palmé	Cécile Patrelle
Lor	Lorraine, 54	23	6		syntopie	François Oger
Am	Ambleteuse, 62	29			allotopie palmé	Pim Arntzen
Off	Offham Marshes, Sussex, Angleterre	20	19		syntopie	Trevor J.C. Beebee
Ste	Steckby, Dessau, Allemagne	7			allotopie palmé	Dirk Schmeller
Allopatric triton ponctué						
Nor	Norvège		50		allotopie ponctué	Jon Kristian Skei
Slo	Slovénie		30		allotopie ponctué	Martina Lužnik
Swe	Suède		7		allotopie ponctué	Jon Loman

2 - Mise au point de marqueurs moléculaires

Les marqueurs microsatellites

ARTICLE 1 – CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE LOCI IN TWO CLOSELY RELATED *LISSOTRITON* NEWT SPECIES

Les séquences microsatellites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) sont des séquences d'ADN largement distribuées dans le génome des eucaryotes. Ils consistent en des répétitions de motifs di, tri ou tétra-nucléotides et montrent un niveau important de polymorphisme de longueur de fragment, de part leur taux de mutation élevé de 10^{-2} à 5×10^{-6} par locus et par génération (Goldstein & Schlötterer 2000). Ils constituent un outil pertinent largement employé pour estimer la diversité génétique (Garner *et al.* 2003), le mode de dispersion (Newman & Squire 2001), la taille efficace des populations (Rowe & Beebee 2004), pour assigner des individus à leur population d'origine la plus probable (Giordano *et al.* 2007), pour détecter d'anciens goulets d'étranglement (Beebee & Rowe 2001), pour mesurer le flux de gènes interspécifique (Babik *et al.* 2003) ou encore pour réaliser des études phylogéographiques (Rowe *et al.* 1998). Outre leur grande variabilité, les microsatellites ont l'avantage d'être ubiquistes et de pouvoir être utilisés avec de très petites quantités d'ADN, ce qui n'implique pas le sacrifice de l'animal. De fait, ces marqueurs sont couramment utilisés en génétique de la conservation des amphibiens (Jehle & Arntzen 2002).

Afin d'étudier à la fois le flux de gènes entre tritons palmés et ponctués ainsi que la structure génétique du triton palmé en vallée de Loire, nous avons eu recours à ces marqueurs neutres codominants. Nous les avons aussi utilisés pour la comparaison avec les marqueurs sous sélection (CMH). Deux équipes de recherche avaient mis au point des marqueurs microsatellites pour le triton ponctué (Jehle *et al.* Unpublished, Trent Garner com. pers.). Après les tests d'amplification croisée sur le triton palmé, seules quatre amorces sur les 17 amplifiaient des séquences polymorphes pour les deux espèces. Pour compléter ce panel, nous avons mis au point nos propres marqueurs parmi lesquels quatre se sont révélés informatifs.

Tous ces travaux ont fait l'objet d'une publication commune dans le journal « Conservation Genetics ».

ARTICLE 1

**CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE LOCI IN TWO CLOSELY RELATED
LISSOTRITON NEWT SPECIES**

Aurélie Johanet, Damien Picard, Trent Garner, Deborah Dawson,
Ramiro Morales-Hojas, Robert Jehle, Didier Peltier & Christophe Lemaire

publié dans Conservation Genetics

Characterization of microsatellite loci in two closely related *Lissotriton* newt species

Aurélie Johanet · Damien Picard · Trenton W. J. Garner ·
Deborah A. Dawson · Ramiro Morales-Hojas ·
Robert Jehle · Didier Peltier · Christophe Lemaire

Received: 26 January 2009 / Accepted: 4 February 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract We have developed eight di- and tetranucleotide *Lissotriton* microsatellite markers. Eight loci were polymorphic in the palmate newt *Lissotriton helveticus* and six were polymorphic in the smooth newt *L. vulgaris*. Polymorphism detected in 33 and 37 individuals per species ranged from 3 to 15 alleles. These markers are suitable for the investigation of population structure, genetic variation and taxonomic identification in the two focal species,

and may also be of use in other *Lissotriton*–*Triturus* species.

Keywords Amphibian · Cross-species amplification · *Lissotriton helveticus* · *Lissotriton vulgaris* · Microsatellite · Newt

A. Johanet (✉) · D. Picard · C. Lemaire
Laboratoire Paysages et Biodiversité, UFR Sciences,
Université d'Angers, 2 bd Lavoisier, Angers, France
e-mail: aurelie_johanet@hotmail.com

T. W. J. Garner
Institute of Zoology, Zoological Society of London,
Regent's Park, London NW1 4RY, UK

D. A. Dawson · R. Morales-Hojas
Department of Biology, University of Leicester,
Leicester LE1 7RH, UK

D. A. Dawson · R. Jehle
Department of Animal and Plant Sciences,
University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK

R. Morales-Hojas
Laboratório de Evolução Molecular, Instituto de Biologia
Molecular e Celular, Porto, Portugal

R. Jehle
School of Environment and Life Sciences,
University of Salford, Greater Manchester, UK

D. Peltier
UMR GenHort, UFR Sciences,
Université d'Angers, 2 bd Lavoisier, Angers, France

A. Johanet · C. Lemaire
UMR PaVé, INRA, 42 rue Georges Morel, Beaucauzé, France

The palmate newt *Lissotriton helveticus* (Razoumowsky 1789) and the smooth newt *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus 1758) are two closely related species broadly distributed over western, central and northern Europe. Like the other European newts, they are protected by law in all of the countries in which they occur. Despite this protection, some populations seem to be experiencing severe declines (Beebee and Griffiths 2005; Kinne 2006) due to habitat fragmentation and loss. Habitat destruction is the main threats to amphibian populations worldwide (Stuart et al. 2004). The impacts of such changes in landscape ecology require knowledge of population genetic structure at a small geographic scale. Neutral, co-dominant genetic markers such as microsatellites may be used to detect population subdivision and interconnection and can provide useful information for theoretical population biologists and applied conservationists. We present the first microsatellite markers developed for *Lissotriton helveticus helveticus* and *L. vulgaris vulgaris*.

Two different strategies were used to develop microsatellites involving either (1) a direct enrichment hybridisation step following the ligation of the digested DNA to the linkers or (2) a fragment size selection step, performed on agarose gel before the ligation to linkers and the enrichment hybridisation step. The first protocol followed Avenot et al. (2005). Genomic DNA from muscle tissue from one

Table 1 Characterization of eight polymorphic microsatellite loci in two *Lissotriton* newt species

Locus name	Repeat motif of cloned allele	Primer sequence (5'-3')	Ta (°C)	Allele size range (bp)	Na	H _E	H _O	EMBL accession
Th09	(ATCT) ₃₇	F: CGACACTCGCAAA TCAATC R: ATTATTA TTTCCACACACGTAAACAT	55	184–232 122–216	8 14	0.77 0.93	0.13 *** 0.60 ***	FJ502350 FJ502351
Th14	(TAGA) ₁₄	F: CCCACTGGGAATCTGAGAAA R: TGCCATATTTGTTGAGGACCA	55	140–176 102–144	6 9	0.67 0.80	0.83 *** 0.25 ***	FJ502352
Th27	(TCTA) ₃₂	F: CCAACAACAAGCACTTCCAG R: GACAGGCAGACACACAGGAG	62	103–159 107	6 1	0.76 0	0.17 *** 0	FJ502352
ThCa14	(GT) ₇	F: ACCTGCTGACAGTGCAAAATG R: CGATTGATCATGAGGACACGTA	55	154–168 120–176	3 15	0.41 0.83	0.50 *** 0.52 ***	FJ502353
Tv3Ca9	(CA) ₃₀	F: AAATAACTTTGTGATGGGTCAITTT R: TGCATATATACTGTATGTTTACTGCAA	55	102–120 90–122	3 4	0.49 0.59	0.48 0.60	FJ502354
Tv3Ca19	(GT) ₃₇	F: CCTCCACGAGGTTACTGCAC R: GACCAITTCAGACACTCATTACG	55	57–71 57–69	3 3	0.60 0.65	0.66 0.67	FJ502355
Tv12	(GA) ₂₁	F: AACCCGGTACACCTACATCA R: CTCACCTTTGTAATGGCCTCT	59	230–236 222–248	4 3	0.57 0.63	0.17 ** 0.50	AJ535723
Tv16	(GA) ₂₀	F: ACAGGAGAGAATGTCTGTGG R: TTCAATACAGATACATAGCGCAG	55	154–170 174	4 1	0.42 0	0.38 0	AJ535724

Data for palmate newt (*Lissotriton helveticus*) is presented in normal font and data for the smooth newt (*L. vulgaris*) is presented in italics

Ta, annealing temperature

Na, number of alleles observed

H_O, observed heterozygosity

H_E, expected heterozygosity

P < 0.01, *P < 0.001, P-values obtained with Fisher's exact test for difference between H_E and H_O, considering the null hypothesis of heterozygote deficiency

Table 2 Cross-species amplification of six *Lissotriton* microsatellite loci in six other newt taxa

Species	<i>n</i>	Th09	Th14	Th27	ThCa14	Tv3Ca9	Tv3Ca19
<i>Lissotriton italicus</i>	5	5	2	X	2	X	2
<i>Mesotriton alpestris</i>	6	X	4	2	4	X	2
<i>Triturus cristatus</i>	5	X	6	X	3	X	3
<i>T.cristatus</i> x <i>T. marmoratus</i> hybrid	1	X	2	X	X	X	2
<i>T. marmoratus</i>	3	X	3	X	2	X	2
<i>T. carnifex</i>	3	X	3	1	1	X	2

The number of alleles detected is given for each taxa and locus

n number of individuals tested

X no amplification

L. helveticus was salt-extracted (Sunnucks and Hales 1996). Microsatellite enrichment was performed according to the protocol of Fisher and Bachman (1998), using 3'-biotinylated (CA)₁₂ and (GATA)₆ oligonucleotides. Enriched single-stranded DNA fragments were amplified then ligated into a pUC18 vector and transformed into *Escherichia coli* DH10B electrocompetent cells (Gibco BRL). In total, 96 randomly selected recombinant clones (48 from the CA-enriched library and 48 from the GATA library) were sequenced at the automated sequence facility of Ouest-Génopole, France using an ABI 3130 DNA Analyser (Applied Biosystems). Primers were designed on the basis of sequences flanking the repeats using the software Primer version 3 (Rozen and Skaletsky 2000). Primer pairs were developed for ten loci and amplification was successful for four microsatellites (Th09, Th14, Th27, ThCa14). The second protocol followed that of (i) Garner et al. (2000) for loci Tv3Ca9 and Tv3Ca19 or (ii) (Armour et al. 1994) for loci Tv12 and Tv16. Primer sets were designed for a total of eight sequences (Table 1).

PCR amplification was performed using a fluorescent labelled forward primer and 10- μ l reaction volumes containing 10 ng genomic DNA, 0.4 μ M of each primer, 0.1 mM of each dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.2 units *Taq* DNA polymerase (Promega). Reactions were performed in a MJ Research PT200-Tetrad thermal cycler: 4 min at 95°C, 35 cycles consisting of 30 s at 95°C, 30 s at T_m °C (Table 1), 30 s at 72°C, then 5 min at 72°C. PCR products were separated on an ABI Prism 3130xl DNA Analyser. Observed and expected heterozygosities were determined and tests for heterozygote deficiency were performed using GENEPOP (Raymond and Rousset 1995).

Loci were characterized in 33 *L. helveticus* individuals from a population located in the Loire valley near Saumur (France) and in 37 individuals from a population of *L. vulgaris* near Nantes (France). Eight loci were polymorphic in *L. helveticus* and six in *L. vulgaris* (Table 1). No significant linkage disequilibrium was noted after sequential Bonferroni correction. Loci *Tv3Ca9*, *Tv3Ca19* and *Tv16* met expectations of Hardy–Weinberg equilibrium when characterized in both species. Loci *Th09* and

Th27 in *L. helveticus* and loci *Th09*, *Th14*, *ThCa14* and *Tv12* in *L. vulgaris* exhibited a significant excess of homozygotes suggesting the presence of null alleles.

We tested for cross-species amplification using individuals of six other newt taxa (Table 2). Loci *Th14* and *Tv3Ca19* were polymorphic in every taxa tested but cross-utility was quite low for the other loci tested. Low levels of successful cross-species amplification are common in “old” species like amphibians (Primmer and Merila 2002) and has been observed before in Old World newts (Garner et al. 2003). The low frequency of microsatellites in amphibian’s genome (Zane et al. 2002) would in part explain the difficulty for each of our three research teams to isolate microsatellites in the focal species.

The microsatellite markers reported here are currently being utilized for understanding population genetic structure and assessing genetic variations in these species across many levels of scale, from metapopulation to full geographical range. They are also useful for taxonomic identification of larvae and female of the two species and investigations of hybridization. Their use would inform proper management decisions for these protected species.

Acknowledgments Jagroop Pandhal and Mark Sztatecsny kindly tested some loci for polymorphism. We thank Région Bretagne for their financial support for analyses in the Plateforme OUEST Genopole (INRA, Rennes) and Solène Coedel who welcomed us. This study was funded by Région Pays-de-la-Loire, DIREN Pays-de-la-Loire and Angers Loire Métropole.

References

- Armour JAL, Neumann R, Gobert S, Jeffreys AJ (1994) Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Hum Mol Genet* 3:599–605. doi:10.1093/hmg/3.4.599
- Avenot H, Dongo A, Bataillé-Simoneau N, Iacomi-Vasilescu B, Hamon B, Peltier D, Simoneau P (2005) Isolation of 12 polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. *Mol Ecol Notes* 5(4):948–950. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01125.x
- Beebee TJC, Griffiths RA (2005) The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biol Conserv* 125:271–285. doi:10.1016/j.biocon.2005.04.009

- Fisher D, Bachman K (1998) Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *BioTechnique* 24:796–802
- Garner TWJ, Gautschi B, Röthlisberger S, Reyer HU (2000) A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae*. *Mol Ecol* 9(12):2173–2175. doi:10.1046/j.1365-294X.2000.105311.x
- Garner TWJ, Schmidt BR, Hoeck P, Van Buskirk J (2003) Di- and tetranucleotide microsatellite markers for the Alpine newt (*Triturus alpestris*): characterization and cross-priming in five congeners. *Mol Ecol Notes* 3(2):186–188. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00394.x
- Kinne O (2006) Successful re-introduction of the newts *Triturus cristatus* and *T. vulgaris*. *Endanger Species Res* 1:25–40. doi:10.3354/esr001025
- Primmer CR, Merila J (2002) A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conserv Genet* 3(4):445–449. doi:10.1023/A:1020519218836
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *J Hered* 86:248–249
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols*. Humana Press, Totowa, NJ
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306(5702):1783–1786. doi:10.1126/science.1103538
- Sunnucks P, Hales DF (1996) Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I–II in Aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol Biol Evol* 13:510–524
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 11(1):1–16. doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x

Les marqueurs mitochondriaux

La grande majorité des études (> 80 %, Avise 2000) visant à retracer l'histoire des populations au cours de ces deux dernières décennies, s'est basée sur l'analyse des variations de l'ADN mitochondrial (ADNmt). L'ADNmt est apparemment non recombinant chez les vertébrés (Baker 2000). Généralement transmis maternellement (Dawid & Blackler 1972), il permet de déterminer la direction des croisements chez des individus hybrides (Beebee *et al.* 1999). Son taux de mutation est supérieur à celui des séquences nucléaires, permettant l'accumulation de variabilité génétique entre et à l'intérieur des populations dans un temps évolutif relativement court. Néanmoins des régions conservées codant pour des protéines peuvent retenir les signaux phylogénétiques pendant plusieurs dizaines de millions d'années, permettant les inférences phylogénétiques à des temps de divergences plus importants (Baker 2000). L'ADNmt est donc couramment utilisé pour l'étude de la variabilité des populations (Wahbe *et al.* 2005), la phylogéographie intraspécifique (Martínez-Solano *et al.* 2006), la biogéographie (Stock *et al.* 2006), l'hybridation (Babik *et al.* 2003) ou la biologie de la conservation (Moritz 1994).

Les marqueurs mitochondriaux ont été utilisés, d'une part dans l'étude des flux de gènes entre palmés et ponctués afin de confirmer l'identification de certains individus et déterminer la direction des croisements. Nous avons aussi voulu les utiliser dans l'étude de la génétique des populations de tritons palmés à l'échelle des Pays-de-Loire et de l'Europe. La région de contrôle (*i.e.* D-loop) est généralement la partie la plus variable de l'ADNmt (Baker 2000). Trois tentatives d'utilisation de ce marqueur ont été effectuées avec des marqueurs et techniques différentes.

La D-loop en RFLP

Le principe de la technique utilisant le polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) repose sur la comparaison de profils de coupure par enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans une séquence d'ADN. L'ADN est donc digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction et les produits sont ensuite séparés sur gel d'agarose, ce qui en fait une technique très simple, rapide et peu onéreuse (Tagu 2003).

Un fragment de 1010 pb correspondant à la région ND2 de l'ADN mitochondrial a été amplifié grâce aux amorces L3780 et H5018 (Babik *et al.* 2005a). 23 individus de tritons palmés provenant de 19 populations ligériennes et une population de l'Aisne (Tpal Mo) et un individu ligérien de triton ponctué ont été amplifiés suivant le protocole de Babik *et al.*

(2005a). Après séquençage et alignement, seuls cinq sites polymorphes ont été détectés sur les 1010 pb. Sur ces cinq sites, seulement trois pouvaient être reconnus par des enzymes de restriction (AluI et HaeIII) suite à une simulation de restriction sur WEBCUTTER 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>). Vu le peu d'informations fournies par cette technique, celle-ci a été abandonnée.

La D-loop en SSCP

La technique utilisant polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin (SSCP, Fujita & Silver 1994) est fondée sur le comportement électrophorétique d'un fragment d'ADN monocaténaire dans un gel d'acrylamide non dénaturant. En effet, une molécule d'acide nucléique peut former des structures secondaires dues à des appariements de bases au sein de la molécule. Ces structures secondaires dépendent de la séquence propre au brin d'ADN et donnent une conformation particulière à chaque type de molécule monocaténaire (Tagu 2003).

Cent trois séquences de la région contrôle du triton de Bosca *Lissotriton boscai* (Martínez-Solano *et al.* 2006) ont été alignées sur BIOEDIT (Hall 1999). Nous avons ainsi déterminé des amorces pour l'amplification d'une séquence d'environ 314 pb, une taille facilement amplifiable et permettant une révélation par SSCP. Ces amorces (D-loop Trit F : CTGTGATATCAATTCCCCATA et D-loop Trit R GGTCTTTATAGTCTTGGGGTTG) ont été utilisées pour l'amplification par PCR des individus de six populations de tritons palmés et deux populations de tritons ponctués selon le protocole de Martínez-Solano *et al.* (2006) à une température d'hybridation de 52°C. Les produits PCR ont ensuite été séparés sur gel de polyacrylamide non dénaturant pour mettre en évidence le polymorphisme de conformation simple brin. Les produits PCR ont été mélangés à un volume égal de tampon de charge [95% formamide, 20 mM EDTA (pH 8,0), 0,05% xylène cyanol, et 0,05% bleu de bromophénol], dénaturés à 95°C pendant 5 min, et plongés dans la glace pour éviter la renaturation. Dix microlitres du mélange ont été déposés sur un gel non dénaturant à 8% contenant 14 ml de polyacrylamide à 37,5% et de bisacrylamide à 1%, 7 mL de Glycerol 0,5 X, 7 mL of TBE 5 X (450 mM Tris-borate, 10 mM EDTA à pH 8) et 42 mL d'eau ultra pure. La migration électrophorétique a été réalisée à une puissance constante de 8 W pendant 16 heures dans un tampon de TBE 1 X. Les produits ont été révélés par la technique du nitrate d'argent selon Creste (2001). Les gels ont été rincés dans 2 L de solution de fixation (10% ethanol, 1,5% acide acétique) pendant 10 min. Les gels rincés ont été plongés 3 min dans 2 L d'une solution d'acide nitrique à 1,5%, puis rincés et imprégnés d'une solution de nitrate d'argent à 1 g.L⁻¹

pendant 10 min. Les gels ont été rincés rapidement (20 s) puis développés dans une solution de carbonate de calcium à 30 g.L⁻¹ avec du formaldéhyde à 40% jusqu'à ce que les bandes apparaissent avec une intensité suffisante. Toutes les manipulations ont été réalisées dans des solutions réfrigérées (4°C) afin de pouvoir contrôler l'étape ultime de la révélation.

Sur les 169 individus testés, les deux populations de tritons ponctués se sont révélées monomorphes et cinq populations de tritons palmés sur les six étaient monomorphes. Tous ces individus provenaient des Pays-de-Loire. La sixième population de tritons palmés (Tpal Mo, dans l'Aisne) a montré un deuxième haplotype (de fréquence 24%).

Un second couple d'amorces (D-loop boscaiF : CAGCTGGTTATGAATCTATGA et D-loop boscaiR : CTTAGAAAACTAGCTCCGG) a permis l'amplification d'un fragment d'environ 336 pb. Les PCR ont été réalisées sur les mêmes individus, dans les mêmes conditions, et à une température d'hybridation de 51°C. Les fragments obtenus étaient les mêmes que ceux amplifiés avec l'amorce précédente.

Le nouvel haplotype observé sur la population Tpal Mo a encouragé l'utilisation de ce marqueur à l'échelle de l'aire de distribution. Néanmoins, en génotypant quelques populations supplémentaires de tritons palmés en Europe, seul un troisième nouvel haplotype a été détecté (figure II.4).

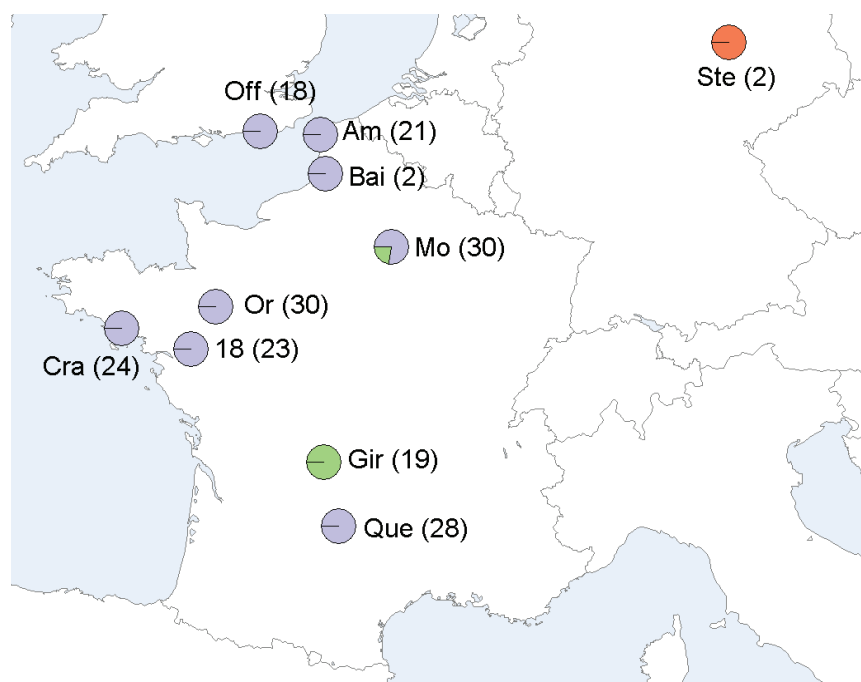


Figure II.4 Proportion de chaque haplotype d'ADN mitochondrial dans les dix populations de tritons palmés testées. La taille de l'échantillon est indiquée entre parenthèses après le code de la population.

Eu égard au faible polymorphisme révélé par ce fragment de la région contrôle de l'ADN mitochondrial, nous n'avons pas utilisé ce marqueur dans notre étude de génétique du paysage. A l'inverse, il se révèle très utile pour la discrimination spécifique entre tritons palmés ponctués. Nous l'avons utilisé à ce titre pour analyser la parenté des hybrides détectés (cf. CHAPITRE III).

3 - Caractérisation du paysage

Le paysage influence d'une part (i) la croissance donc la morphologie des individus (qualités trophiques) (ii) la dispersion et donc les flux de gènes (résistance ou perméabilité de la matrice), et d'autre part (iii) la charge parasitaire donc, potentiellement, la variation aux locus impliqués dans la réponse immunitaire. Les caractéristiques paysagères ont été utilisées dans chacun des trois chapitres suivants.

La caractérisation du paysage a été réalisée à partir de photos aériennes pour chaque mare dans un rayon de 400 m autour du centre de la mare, ce qui correspond à la distance moyenne de migration des tritons (Joly *et al.* 2001). Le logiciel pour systèmes d'informations géographiques MAPINFO v 6.5 (Copyright 2001) a permis la digitalisation et le calcul des surfaces occupées par les prairies, boisements, routes, bâtis, cultures, peupleraies et eaux courantes ou stagnantes (figure II.5).

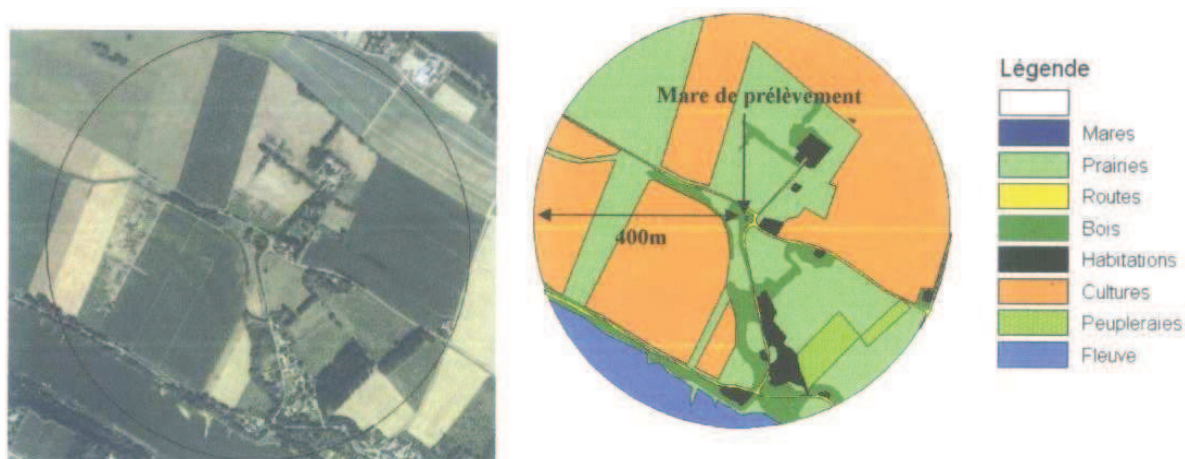


Figure II.5 Digitalisation des surfaces d'occupation du sol dans un rayon de 400 m autour d'une mare (mare Tpal 23) par SIG (MapInfo v. 6.5).

Le critère d'inondabilité de chaque mare a été déterminé par la délimitation des plus hautes eaux connues (PHEC) qui borne la plaine d'inondation ou lit majeur de la Loire, et de la limite des crues décennales. Ces informations ont pu être récupérées sur le site internet de la DIREN Centre qui centralise les informations et coordonne la gestion des risques pour le bassin Loire-Bretagne.

(http://www2.centre.ecologie.gouv.fr/telechargement/acces_donnees.htm)

4 - Mesures morphométriques

La sélection naturelle, la sélection sexuelle, la dérive génétique ainsi que la plasticité phénotypique peuvent être responsables de la différenciation génotypique entre populations. Des mesures morphométriques ont été effectuées sur 1466 individus afin d'étudier (i) l'effet de l'environnement ainsi que (ii) de la syntopie (déplacement de caractère reproducteur) sur les phénotypes. Ces analyses sont présentées dans le CHAPITRE III.

Les mesures morphométriques ont été réalisées le jour même ou le lendemain de la capture des tritons afin de limiter la régression des caractères sexuels. Avant chaque mesure, et pour faciliter celle-ci, les tritons ont été endormis au MS 222 (0,3 g/L). Les mesures ont été réalisées avec un pied à coulisse à affichage électronique avec une précision de 0,01 mm. Pour chaque triton, tous les caractères ont été mesurés deux fois. Si la différence entre deux mesures était supérieure à 0,3 mm, une troisième mesure était effectuée. La largeur de tête, la largeur du cloaque, la hauteur de queue à la base, la hauteur de queue maximum, la longueur de queue, la longueur totale et la distance entre l'extrémité de la tête et la base du cloaque (SVL) ont ainsi été mesurées chez tous les individus. Pour les mâles de tritons palmés, la longueur du filament caudal a également été mesurée (figure II.6).



Figure II.6 Mesures effectuées sur un mâle de triton palmé. Les femelles et les tritons ponctués ne possèdent pas de filament caudal.

CHAPITRE III

ÉTUDE DE L'ISOLEMENT REPRODUCTEUR ENTRE DEUX ESPÈCES SYMPATRIQUES

D'après le concept de l'espèce biologique de Mayr (1942), la preuve de la spéciation est la capacité des formes parentales à rester distinctes en sympatrie. Par extension, le processus de spéciation n'est complet qu'une fois que le flux de gènes entre les espèces sympatriques cesse. Les mécanismes conduisant au développement de l'isolement reproducteur entre espèces sympatriques sont assez mal connus (Coyne & Orr 2004; Ramsey *et al.* 2003). Les zones hybrides représentent des systèmes naturels dans lesquels la spéciation est potentiellement incomplète, ce qui permet des études génétiques, écologiques et comportementales détaillées des mécanismes évolutifs importants dans les processus de spéciation.

L'hybridation a depuis longtemps été étudiée dans des zones de tension (Barton & Hewitt 1985) ou en mosaïque (Harrison 1986; Howard 1986). L'étude de l'hybridation chez des espèces se reproduisant sur de larges zones de sympatrie présente un intérêt récent (Borge *et al.* 2005; Cooley *et al.* 2006; Duvernell *et al.* 2007; Fuller 2008; Höbel & Gerhardt 2003; Jang *et al.* 2009; Roques *et al.* 2001; Turner *et al.* 2005). En effet, si les espèces montrent un large chevauchement écologique, on s'attend à ce que l'hybridation soit peu fréquente et que des barrières reproductives soient assez fortes pour maintenir l'intégrité des espèces. Nous avons étudié l'introgession et certains mécanismes d'isolement reproducteur entre les tritons palmés et ponctués. La répartition de ces deux amphibiens se chevauche sur plus de 1000 km en latitude et en longitude et le recouvrement de leur niche écologique fait que ces espèces sont souvent présentes au même moment dans les mêmes sites de reproduction. Dans ce chapitre, nous avons (i) tenté de détecter des traces d'hybridation et d'introgession entre tritons palmés et ponctués et d'analyser la dynamique de flux de gènes entre ces espèces (ARTICLE 2). En parallèle, nous avons (ii) étudié l'effet de la syntopie et du paysage sur la différenciation morphologique pour des traits potentiellement utilisés dans la reconnaissance spécifique (ARTICLE 3). Par des tests comportementaux nous avons (iii) étudié les bases sensorielles de la reconnaissance spécifique entre les deux espèces et émis des hypothèses sur la robustesse des mécanismes d'isolement prézygotique (ARTICLE 4).

ARTICLE 2

**WIDESPREAD INTROGRESSION DOES NOT LEAK INTO ALLOTOPY IN A BROAD
SYMPATRIC ZONE**

Aurélie Johanet, Jean Secondi & Christophe Lemaire

Soumis à Molecular Ecology

ARTICLE 2 – WIDESPREAD INTROGRESSION DOES NOT LEAK INTO ALLOTOPY IN A BROAD SYMPATRIC ZONE.

L'hybridation chez les animaux a longtemps été considérée comme un événement rare (Darwin 1859; Dobzhansky 1937; Mayr 1942). Cependant des études génétiques récentes ont mis en évidence qu'elle était beaucoup plus répandue que ce qui était supposé (Mallet 2005). Les études menées sur l'hybridation ont longtemps assigné les individus aux espèces parentes sur la base des caractères morphométriques ce qui pouvait biaiser sa détection et son estimation dans les populations naturelles (Naisbit *et al.* 2003). Le développement récent des techniques moléculaires et des analyses statistiques a amélioré la détection des populations (Barton 2000) et des individus hybrides au point de discriminer les F₁, F₂ et rétrocroisements récents des génotypes parentaux (Anderson & Thompson 2002; Pritchard *et al.* 2000).

Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer l'intensité du flux de gènes entre tritons palmés et ponctués. L'échantillonnage s'appuie principalement sur des sites où les deux espèces ont été trouvées en syntopie. Nous avons intensifié notre effort d'échantillonnage sur une zone de l'étude où une espèce domine l'autre numériquement. En effet, en vallée de la Loire, le triton ponctué est à la limite de son aire de répartition, ses effectifs sont réduits, ce qui augmente potentiellement les risques d'hybridation (Hubbs 1955; Randler 2002; Secondi *et al.* 2006). Nous avons testé l'existence de barrières post-zygotiques (Haldane 1922) et d'asymétrie d'introgession. Nous avons utilisé pour cela les marqueurs mitochondriaux et microsatellites précédemment développés pour des analyses de détection d'hybrides sur 1272 individus et des analyses de déséquilibre de liaison inter- et intragénomique sur 37 populations. La zone de contact est caractérisée par une distribution bimodale des traits phénotypiques et génotypiques (1,7 % d'hybrides). Nous avons détecté une asymétrie d'introgession avec cinq fois plus d'hybrides chez le triton ponctué que chez le palmé. Des relations négatives entre degré d'introgession et sex-ratio suggèrent fortement que la loi de Haldane (1922) s'applique à ce système. Un flux de gènes interspécifique significatif a été détecté dans 73 % des sites syntopiques (16/22) mais dans aucun site allotopique (figure III.1). Cette étude met en évidence que l'hybridation est répandue mais reste confinée aux sites de syntopie, ce qui expliquerait pourquoi les espèces restent génétiquement différenciées sur une large zone sympatrique.

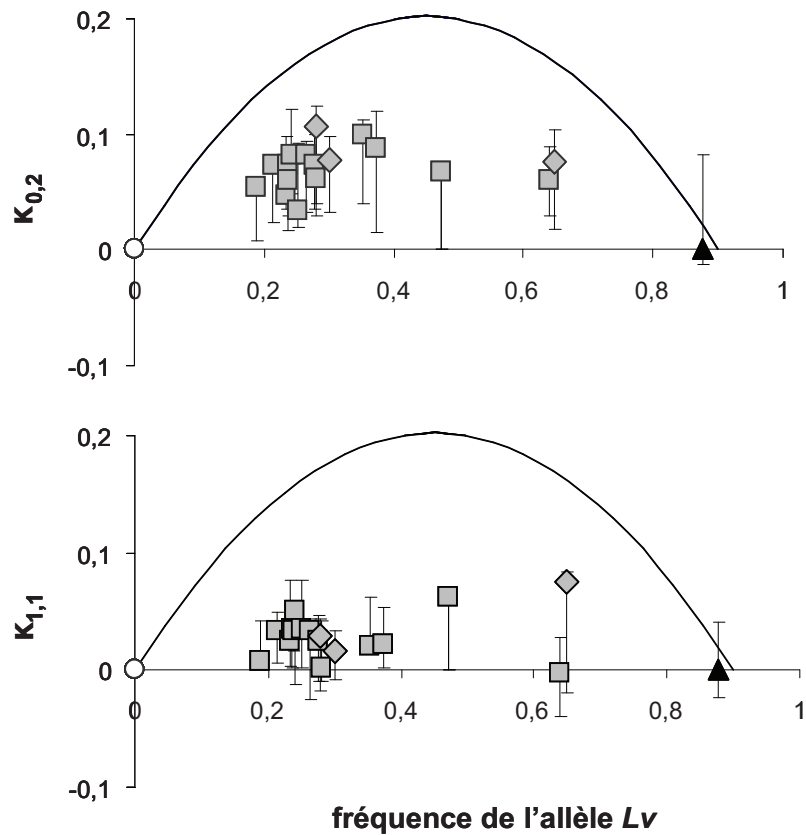


Figure III.1 Associations par paires à l'intérieur des génomes $\kappa_{0,2}$ (correspondant à un déséquilibre de liaison moyen par paire) et entre génomes $\kappa_{1,1}$ (correspondant à un déséquilibre à Hardy-Weinberg moyen), estimées selon la méthode de Barton (2000), en fonction de la fréquence en allèles de tritons ponctués. Les échantillons appartiennent à des populations de tritons palmés en allotopie (○), de tritons ponctués en allotopie (▲) et des populations syntopiques (■). Les barres verticales représentent les intervalles de confiance à 95%. Les valeurs maximales théoriques sont représentées par une courbe. L'écart à ces valeurs maximales témoigne d'un mélange entre les deux espèces.

Cet article fait l'objet d'une soumission dans le journal « Molecular Ecology ».

Widespread introgression does not leak into allotopy in a broad sympatric zone

A. Johanet^{1,2*}, J. Secondi¹ & C. Lemaire^{1,2}

¹ GECCO, LEESA, Faculté des Sciences, Université d'Angers, 2 bd Lavoisier, Angers, France;

² UMR PaVé, INRA, 42 rue Georges Morel, Beaucouzé, France.

Keywords: hybridization, introgression, broad sympatry, Haldane's rule, *Lissotriton helveticus*, *Lissotriton vulgaris*

*Corresponding author: Aurélie Johanet, Address: GECCO, LEESA, Faculté des Sciences, Université d'Angers, 2 bd Lavoisier, Angers, France, Fax: +33 2 41 73 53 52, e-mail: aurelie_johanet@hotmail.com

Running title: Pattern of introgression in broad sympatry

Abstract

Species overlapping over a large part of their range and for their habitat requirements are challenging for the study of speciation and hybridization. To this respect, the study of broadscale introgressive hybridization has raised recent interest. Here we studied hybridization between two closely related amphibians *Lissotriton helveticus* and *L. vulgaris* that overlap over a wide sympatric zone. Interestingly, *L. vulgaris* is nested within *L. helveticus* habitat. We used a mitochondrial marker and six microsatellite loci on 1272 individuals in 37 sites over Europe to detect hybrids at the individual-level and analyse disequilibria at the population-level. Morphological traits showed a strong bimodal distribution. Consistently hybrid frequency was low (1.7%). We found asymmetric introgression with five times more hybrids in *vulgaris* than in *helveticus*, a pattern probably explicated by an unbalanced effective size in a study part where *helveticus* numerically predominate. Negative relationships between introgression level and sex-ratio strongly suggested Haldane's rule. Strikingly, significant levels of introgression were detected in 73% of syntopic sites (16/22). In the six remaining sites and all allotopic sites estimations could not be computed due to the fixation at one locus or more. Our study showed that introgression is widespread but remains confined to syntopy. This pattern may explain why these species remain genetically distinct over a broad sympatric zone.

Introduction

Natural hybridization has long raised the interest of evolutionists as it represents a unique source of information about the mechanisms of reproductive isolation which could lead to speciation (Coyne & Orr 2004); the maintenance of species integrity in the face of gene flow remains a central outcome in evolutionary biology (Baack & Rieseberg 2007; Hey 2006; Petit & Excoffier 2009; Sites & Marshall 2003). Two main models that describe the dynamics of the hybridization process have been proposed, the Tension zone model and the Mosaic zone model, both account for many situations observed in nature.

Barton & Hewitt (e.g. 1985) have championed the concept of Tension zone in which clines are maintained by a balance between parental effective migration and selection against hybrids. The low fitness of hybrids is caused by the disruption of intra-genomic co-adaptation (i.e. endogenous selection). The model does not assume any effect of environmental (i.e. exogenous) factors on migration/selection equilibrium. Stable clines can thus form in homogeneous environments in the absence of spatial gradients of natural selection (Barton & Hewitt 1985; Endler 1977). The Tension zone model performs well in situations of parapatry, and when zone width is small relative to the breeding range of the two taxa. In contrast, the Mosaic zone model (Harrison 1986; Howard 1986) assumes that two species segregate between two habitat types. Differential selection caused by ecological factors (i.e. exogenous selection) maintains species integrity by limiting the possibility of successful dispersal into the other habitat. The distribution of habitat patches is not specified so that this model could theoretically fit any spatial configuration. In the Mosaic zone model, hybrids occur at the ecotone. They can be fitter than parental forms in intermediate habitats (the “Bounded Hybrid Superiority Model”, Moore 1977).

Although the Tension zone and the Mosaic models describe a wide range of situations encountered in animals and plants, they are not universal and their assumptions are not always

met (Harrison 1993). Predictions about hybridization dynamics become less clear (i) when the zone of sympatry covers a large fraction of the breeding ranges of focal species, and (ii) when species are frequently found in syntopy. In other words, classical models are not suitable to cases where species exhibit broad geographical and ecological overlap. A plausible reason why these situations did not raise strong interest in previous studies is that hybridization is expected to occur at a very low rate between broadly sympatric taxa and that reproductive or other barriers are strong enough to maintain species integrity. Hybridization events can thus be viewed as of no biological significance in those cases. However, a broad zone presents a large interface surface between two species so that even if hybridization events are locally rare, they are not necessarily so at the zone scale. In addition, exogenous selection against hybrids is expected to be negatively related to the degree of ecological overlap between species. The more two species ecologically overlap, the less environmental components of fitness will favour parental forms over hybrids.

Several broad hybrid zones have been studied (Borge *et al.* 2005; Cooley *et al.* 2006; Duvernell *et al.* 2007; Fuller 2008; Höbel & Gerhardt 2003; Jang *et al.* 2009; Roques *et al.* 2001; Turner *et al.* 2005). However, in those studies attention has been largely given to cases of invasion by an allochthonous or clonal species into the distribution of an indigenous/wild species (Duputié *et al.* 2007; Rubidge & Taylor 2004) or a recent range expansion (Martin & Cruzan 1999). Studies investigating cases of ancient contact between autochthonous taxa remain rare, hence this study.

We investigated hybridization and introgression between the palmate newt *Lissotriton helveticus* (Razoumowsky 1789) and the smooth newt *L. vulgaris* (Linnaeus 1758). These closely related taxa diverged approximately 64 MA ago (Steinfartz *et al.* 2007) and the last secondary contact has probably formed after the last glaciation (Spurway & Callan 1960). The zone of sympatry extends over a thousand kilometres in longitude and latitude in Europe

(IUCN 2008) and is broad relative to the breeding range of each species (Fig. 1) (72% of *helveticus* range and 11% of *vulgaris* range is sympatric). The two newts frequently breed in the same water bodies (Arntzen 1986; Griffiths 1987) where extensive overlap in microhabitat selection, diet and breeding period is observed (Chadwick *et al.* 2006; Griffiths 1986; Griffiths 1987). Heterospecific courtship is relatively common in the lab which suggests that pre-zygotic barriers are not strong (Roberts 1990; Secondi unpublished data). Reproductive interactions may be more frequent than initially thought.

Consistently but rarely, hybrids have been found in several locations (Arntzen *et al.* 1998; Beebee *et al.* 1999; Griffiths *et al.* 1987; Schlüpmann *et al.* 1999) (see Fig 1). Laboratory experiments suggested that if hybrids were less viable and fertile than the progeny of homospecific crosses (Cogălniceanu 1994; Spurway & Callan 1960), they could backcross and produce viable offspring (Benazzi 1957). An earlier study detected introgression in three areas of the sympatric zone (Arntzen *et al.* 1998). So far, only hybrid males have been detected in wild adults (Arntzen *et al.* 1998; Beebee *et al.* 1999; Griffiths *et al.* 1987; Schlüpmann *et al.* 1999). The fact is striking as hybrid females are expected to be more viable than hybrid males (Haldane 1922), males being the heterogametic sex in *Lissotriton* (Hillis & Green 1990). Our current knowledge of the hybridization process between the two species may be strongly biased because of the difficulty to identify phenotypic hybrids in one sex. In contrast to males that are readily identified by secondary sexual traits, females look alike, and overlap for several traits like underpart colour pattern (Johanet *et al.* 2009b). Thus, female hybrids would be very difficult to identify and female backcrosses almost impossible to distinguish from parental species (Naisbit *et al.* 2003) by morphological criteria alone.

We conducted a large scale study in order to quantify hybridization between the two newts. We carried out morphometric and genetic analyses at the individual-level and analyses of disequilibria at the population-level. We had three objectives: (i) To test the effect of sex

and species on the genotype-phenotype relationship. (ii) To estimate the hybrid frequency at the scale of the sympatric zone by sampling distant areas over a large part of the sympatric zone. (iii) To analyse introgression dynamics at the local scale. We selected an area where *Lissotriton vulgaris* is always encountered syntopically with *L. helveticus* in floodplain valleys; the latter species is also found in allotopy in valley or plateau sites. The nesting of *vulgaris* habitat within *helveticus* habitat is an extreme case of ecological overlap between two hybridizing species. In this area, located at the southern edge of the sympatric zone, the occurrence ratio is biased towards *helveticus*, a situation that tends to maximize hybridization rate (Hubbs 1955; Randler 2002; Secondi *et al.* 2006). We made use of this particular setup to estimate the potential for introgression by contrasting hybrid frequency in different contexts syntopy, allotopy, and allopatry.

Materials and Methods

Sampling strategy

In order to estimate the overall hybridization rate, we collected DNA samples from 37 ponds. One pond, Liré, was sampled two years in a row (2007 and 2008). Five sites, respectively from 3 and 2 distinct areas for *helveticus* and *vulgaris*, were located in allopatry. In addition, 32 ponds from 10 distinct areas were sampled in the sympatric zone. Among these, 10 ponds were allotopic and 22 were syntopic. In total, 928 *helveticus* and 344 *vulgaris* were sampled (see Fig. 1 & Appendix 1).

In order to analyse genotypic and phenotypic introgression in detail, we increased our sampling effort in one area. For this reason, 20 out of the 32 sympatric ponds were located in the Loire river valley and adjacent plateaus between Saumur and Nantes (see Fig. 1 & Appendix 1).

Genetic analysis

Microsatellite analysis

We analysed DNA from the 928 *helveticus* and 344 *vulgaris*. Individuals were toe- or tailed-clipped according to capture permit delivered for each sampling area. DNA was extracted following Chelex procedures (Walsh *et al.* 1991). We used 6 microsatellite markers to estimate introgression level: Th09, Th14, Th27, ThCa14, Tv3Ca9, Tv3Ca19 (Johanet *et al.* 2009a). PCR amplification were performed using fluorescent-labelled forward primers and 10- μ l reaction volumes containing 10 ng genomic DNA, 0.4 μ M of each primer, 0.1 mM of each dNTP, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 units *Taq* DNA polymerase (Promega). Reactions were performed in a MJ Research PT200-Tetrad thermal cycler: 4 min at 95 °C, 35 cycles consisting of 30 s at 95 °C, 30s at T_m °C (see Johanet *et al.* 2009a), 30 s at 72 °C, then 5 min at 72 °C. PCR products were separated on an ABI Prism 3130xl DNA Analyser.

Genetic differentiation between species was calculated using FST estimates (Weir & Cockerham 1984), and tested by permutation test using GENETIX (Belkhir *et al.* 2004). We ran a Factorial correspondence analysis (FCA) using with GENETIX (Belkhir *et al.* 2004) on ponds with no a priori on species identity. FCA is particularly well-suited for hybridization studies as it generally extracts between-species differentiation on the first axis, and within-species population differentiation on secondary axes (Daguin *et al.* 2001). Interestingly, FCA simultaneously expresses the genetic variation in the dataset and the respective contributions of each allele to the variation.

Hybrid identification

We used two Bayesian-Markov Chain Monte Carlo (MCMC) methods to detect hybrids, NEWHYBRIDS and STRUCTURE. None of them requires *a priori* assignment of alleles to taxonomic entities and uses markers that are not necessarily fixed in either parental species.

NEWHYBRIDS (Anderson & Thompson 2002) estimate the posterior probability that an individual falls into one of the six following categories: pure parental, F1, F2 and backcrosses to one parental species or another. The whole dataset was analysed after 10,000 iterations. We assigned an individual to one of the parental groups when its inferred proportion of genes belonging to the group exceeded 90% (Smulders *et al.* 2008). Otherwise, individuals were considered as hybrids of first or second generation.

STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) was used to estimate the most likely number of populations (i.e. clusters) in the sample and then individual admixture proportions. We thus estimated the proportion of an individual's genotype originating from one or the other of the parental populations (i.e. ancestry estimates). The number of clusters in our dataset was estimated by pooling all samples and calculating the probability that each individual belong to one of K clusters. We assumed that K ranged from one to six clusters. Individual admixture proportions were calculated by assuming an admixture model (i.e. allowing the genetic composition of individuals to be a mixture from different populations), using 10,000 iterations for burn-in and 10,000 iterations for parameter estimation. This was repeated 20 times at each K-value. The most likely K-value was estimated using the method proposed by Evanno *et al.* (2005). We used a threshold of 90%, like for NEWHYBRIDS, to assign an individual to one parental group or another (Duputié *et al.* 2007).

We tested for the effect of species and sex on hybrid frequency using log-linear analyses (StatSoft 2007). This method analyses multifactor cross-tabulations by partitioning the variation in frequency data into the different factors, testing for interactions in a way similar to the analysis of variance (ANOVA).

Mitochondrial analysis of putative hybrids.

We genotyped mitochondrial DNA of putative hybrids to identify their maternal parents. We used BioEdit (Hall 1999) to align sequences from the control region of *Lissotriton boscai* (Martínez-Solano *et al.* 2006) and Primer 3 (Rozen & Skaletsky 2000) to design primers for the amplification of an approximately 300 bp sequence. PCR conditions were the same as for *Lissotriton boscai*, with 0.4 μ M of each primer (DloopboscaiF: CAGCTGGTTATGAATCTATGA, DloopboscaiR: CTTAGAAAACTAGCTCCGG). The annealing temperature was 51°C. PCR products were then separated on a non denaturing polyacrylamide gel to screen single single-strand conformational polymorphism (Fujita & Silver 1994). Amplified fragments were mixed with an equal volume of sample buffer [95% formamide, 20 mM EDTA (pH 8.0), 0.05% xylene cyanol, and 0.05% bromophenol blue], denatured at 95°C for 5 min, and cooled on ice. 10 μ L of the mix were deposited on a 8% non denaturing gel containing 14 ml of 37.5% polyacrylamide-1% bisacrylamide mixture, 7 mL of Glycerol 0.5 X, 7 mL of TBE 5 X (450 mM Tris-borate, 10 mM EDTA at pH 8) and 42 mL of H₂O. Electrophoresis run at a constant voltage of 8 W for 16 hours in 1 X TBE electrophoresis buffer. Silver staining revelation followed Creste (2001). Gels were washed in 2 L cold (4 °C) fixing solution (10% absolute ethanol, 1.5% acetic acid) for 10 min. Washed gels were soaked for 3 min in 2 L cold solution with 1.5% nitric acid, then washed and impregnated for 10 min in a 2 L cold solution of 1 g.L⁻¹AgNO₃. Gels were rinsed quickly (20 s) once with 2 L distilled H₂O and developed in a 30 g.L⁻¹ Na₂CO₃ solution with 40% formaldehyde until the bands appear with a sufficient intensity.

Introggression analysis

Even low hybridization, as expected in *Lissotriton* (Arntzen *et al.* 1998), can lead to substantial introgression (Goodman *et al.* 1999). Here we use a method that is appropriate

when hybridization is rare. It separates the contribution of ancestral polymorphism from current hybridization to apparent introgression, allowing for no strictly diagnostic markers (Barton 2000). Microsatellite alleles at a single locus were clustered in two groups according to their first axis coordinate on the FCA. We defined two species-specific synthetic alleles: *Lh*, characteristic of *helveticus*-like individuals, and *Lv*, characteristic of *vulgaris*-like individuals. They also corresponded to the alleles inferred by STRUCTURE to be characteristic of clusters 1 and 2, respectively when we fixed $K = 2$ clusters. Synthetic alleles were used to compute between-genome deviations from Hardy–Weinberg equilibrium ($\kappa_{1,1}$), and within-genome pairwise associations ($\kappa_{0,2}$, linkage disequilibrium) following the method described by Barton (2000), using MATHEMATICA 5.0 (Wolfram Research 2003). We expect between-genome and within-genome pairwise associations to be at their maximum values when two syntopic taxa do not hybridize. As recommended by Barton (2000), the likelihood of different nested models was estimated. We assumed first that the population is in HWLE, then allowed for pairwise associations between-genomes (Hardy-Weinberg disequilibrium), within-genomes (linkage disequilibrium) or both, and finally for higher-order associations. The same sequence of models was repeated allowing different contributions of each locus to the association. The most appropriate model was chosen using the Akaike information criterion under which model 2 is more likely than model 1 if $\log(L2) - 2n > \log(L1)$, where n is the number of additional parameters used in model 2 relative to model 1. A 95% confidence interval was estimated using a random walk algorithm with parameter T (temperature of the simulated annealing) initially set up to 1 (Barton 2000). This method does not need to use reference populations that represent parental gene pools.

We calculated for each pond the difference between the observed value for Hardy–Weinberg disequilibrium and linkage disequilibrium respectively compared to their theoretical maximum value by the formula $\kappa_{\text{maximum}} - \kappa_{\text{observed}} / \kappa_{\text{maximum}}$. In order to detect an

influence of sex-ratio on interspecific matings, we then tested for a relation between HWLE and sex-ratio in each population using a linear model using R 2.6.1 (R Development Core Team 2007).

Phenotypic analysis

We measured a sample of 560 adults from the Loire river area composed of 389 *helveticus* (181 males and 208 females) and 171 *vulgaris* (59 males and 112 females). Adult newts were caught in ponds from March to May in 2006 and 2007 using dipnets (Capture and release Permit delivered by Préfectures du Maine-et-Loire and Loire-Atlantique). All newts were anaesthetized prior to manipulation by immersion in Tricaine methane sulphonate (0.2 g/l), MS222, for a duration of 5 to 10 minutes. Measurements were taken the same day or the day after capture. Four characters associated with body size and secondary sexual trait development were measured to the nearest 0.01 mm using a digital calliper: snout-to-vent length (SVL), maximum tail height (MTH), cloaca width (CW) and filament length (FIL) (for details on the measurement method, see Secondi *et al.* 2007). Characters were measured twice and the mean value of the two measurements was recorded. We also scored the throat pattern by coding “0” for a clear throat (typical of palmate newts) to “4” for a completely marbled throat (typical of smooth newts). These traits are known or likely to discriminate the two species (Griffiths & Mylotte 1988; Johanet *et al.* 2009b). Individuals were subsequently released to their original capture sites.

Principal component (PCA) and discriminant analyses were performed using STATISTICA (StatSoft 2007) to determine (i) whether morphological clusters could be detected without any *a priori* hypothesis of group membership, (ii) to estimate the relationship between genotype and phenotype. Sexes were treated separately because of sexual dimorphism for all traits.

In order to check for a relationship between genotype and phenotype we tested for relation between individuals scores in PCA (phenotypic score) and FCA (genotypic score) for each sex and species using Linear Mixed-Effects Models with population as a random effect in R 2.6.1 (R Development Core Team 2007).

Results

Genetic analysis

Hybrid identification

Two microsatellite loci, Th27 and Th14, were fully diagnostic. Polymorphism level of the 6 microsatellite markers ranged from 12 to 35 alleles per locus with an average of 25 alleles in both species. The proportion of private alleles was respectively 41% and 39% in *helveticus* and *vulgaris*. Genetic differentiation was significant ($\hat{F}_{ST} = 0.2629$, $p = 0.0000$) between the two taxa. Consistently, Factorial Correspondence Analysis on microsatellite data supported the genetic distinctiveness of *helveticus* and *vulgaris* by separating two clusters along the first axis (Fig. 2). The large eigenvalue (analogous to a partial F_{ST} estimate) of the first axis, 25.13%, was indicative of a strong differentiation among samples. Samples from each species formed a scatterplot. Yet, the two 99% ellipsoids partially overlaid. Six individuals of each species, according to their phenotype, were located on the edge or within the ellipsoid of the other species. These 12 individuals were all captured in syntopic ponds. Interestingly, variation on both axes was much larger in *vulgaris* (x ranging from 0 to 2200 approximately) than in *helveticus* (x ranging from -800 to 0 approximately).

According to our classification criterion, NEWHYBRIDS assigned 98.3% of all individuals (1251/1272) to a parental group, *helveticus* or *vulgaris*, and 1.7% (21/1272) of all individuals to the remaining four groups. We considered these 21 individuals as hybrids. NEWHYBRID

assigned none of these individuals to one of the hybrid class with a high probability. For instance, no F₁ were detected and five individuals were assigned with a probability higher than 30% to the F₂ class, all of them owning private alleles from the two species. Results may reflect the inability for the NEWHYBRID to identify the correct hybrid class, a known weakness of this method when several generations of backcross occur (Anderson & Thompson 2002). Focusing on the two diagnostic loci, five hybrid individuals clearly show two private alleles for one species at one diagnostic locus and one *helveticus* allele plus one *vulgaris* allele for the other diagnostic locus, suggesting that recombination occurred.

STRUCTURE revealed that the most likely number of populations K in our sample was two (See Appendix 2). In agreement with NEWHYBRIDS assignments, 98.1% of all individuals (1248/1272) were classified as *helveticus* or *vulgaris*. The remaining individuals (24/1272) were considered as hybrids. Figure 5 illustrates the distribution of individuals according to their ancestry estimates (posterior probability of belonging to *vulgaris*). It shows a clear segregation of allopatric individuals. All individuals with intermediate genotypes come from the sympatric zone, twenty-one from syntopic and three from allotopic sites.

Outputs given by the two Bayesian clustering methods were congruent. In total 25 hybrids were identified by NEWHYBRIDS or STRUCTURE. Twenty of them were identified by both methods using the same assignment threshold for posterior probabilities. Among the five remaining individuals, four were identified by STRUCTURE only and 1 by NEWHYBRIDS only. These five individuals were detected by both methods when we raised the assignment threshold to 95%.

According to our criterion, hybrid frequency was 5.1 times lower in *helveticus*-like individuals (0.8%) than in *vulgaris*-like individuals (4.1%) basing on NEWHYBRIDS assignments. It was 4.4 times lower in *helveticus*-like individuals (1.0%) than in *vulgaris*-like individuals (4.4%) basing on STRUCTURE assignments. We used these data to compute overall

hybridization rate and its geographical variation. All hybrids were captured in sympatry from 5 distinct areas. Hybridization rate did not vary largely between areas: 2.4% (18/743 in 12 ponds) in Pays-de-la-Loire, 3.4% (1/29 in one pond) in Pas-de-Calais, 1.0% in Oise (1/97 in one pond), 2.6% (1/39 in one pond) in Sussex, 3.8% (1/26 in one pond) in Lorraine. All but three hybrids originated from syntopic ponds. Overall hybridization rate was 1.7%. Note that we excluded from this computation individuals from site Liré 2008 (three hybrids were detected) that is a replicate of Liré 2007 (three other hybrids were detected the year before).

Introgression analysis

Models assuming pairwise associations between genomes (Hardy-Weinberg disequilibrium) and within genomes (linkage disequilibrium) were the most appropriate. Pairwise associations of alleles at a locus between genomes, $\kappa_{1,1}$ and across loci within a genome, $\kappa_{0,2}$ were presented as a function of synthetic *Lv* allele mean frequency in Fig. 6. $\kappa_{1,1}$ and $\kappa_{0,2}$ could not be estimated for all 13 allotopic *helveticus* sites, the Swedish allopatric *vulgaris* site, and 6 syntopic sites because at least one allele was fixed in these sites. Theoretical values for these parameters were used for Fig. 6. No departure from maximum disequilibrium was observed among *vulgaris* from allopatry (Norwegian population). Sixteen sites showed significant deviation both from Hardy-Weinberg, $\kappa_{1,1}$ and linkage, $\kappa_{0,2}$ disequilibrium maximum values, indicating that interspecific gene exchanges occurred. All of them were syntopic. Each sample of the site of Liré (2007 and 2008) was treated as separate populations and both showed significant introgression. Introgression was thus detected in 73% (16/22) of all syntopic sites.

Sex and hybridization

Among the 25 newts identified as hybrids, 9 were *helveticus* (6 males and 3 females) and 16 were *vulgaris* (5 males and 11 females). We based on STRUCTURE assignments to test the effect of species and sex on hybrid frequency using a log-linear model. The full model (model with both effects included) gave a significantly better fit to the data than the reduced model (model with no effect) ($\Delta\text{Log-Likelihood} = 7.8484$, $\chi^2 = 15.6968$, $df = 3$, $p < 0.0013$). We observed more hybrids in *vulgaris*-like than in *helveticus*-like individuals ($\chi^2 = 16.569$, $df = 1$, $p < 0.0001$). No effect of sex ($\chi^2 = 0.325$, $df = 1$, $p = 0.568$) and no interaction between species and sex ($\chi^2 = 0.499$, $df = 1$, $p = 0.478$) were detected. We obtained the same results using NEWHYBRIDS assignments.

Interestingly, we observed contrasting sex ratio values between our main study area (Loire river valley) and the other sites (Fig. 7). Sex ratio in both species was female-biased in the Loire river valley whereas it was balanced or male-biased elsewhere. The difference was particularly strong for *vulgaris*. We tested the relationship between deviations from maximum values of $\kappa_{1,1}$ and $\kappa_{0,2}$, and site sex-ratio. Deviation from $K_{0,2}$ was correlated with sex-ratio in *helveticus* ($F = 5.019$, $p = 0.047$), whereas deviation from $K_{1,1}$ was correlated with sex-ratio in *vulgaris* ($F = 5.440$, $p = 0.042$). According to the coefficient signs (respectively -0.550 and -1.038), the more interspecific gene exchanges occurred in the population (i.e. the more linkage or Hardy-Weinberg disequilibrium decreased), the more sex-ratio was biased to the detriment of males.

Mitochondrial DNA analysis

MtDNA analysis was carried out 168 allopatric individuals and the 25 hybrids. Based on the 168 reference samples, we found two species-specific haplotypes for each species. MtDNA matched phenotype for all allopatric individuals and for most hybrids. Mismatch between

phenotype and mtDNA was observed only in 1 out of 9 *helveticus*-like hybrids, and 1 out of 16 *vulgaris*-like hybrids. These two individuals were males. Mismatch rate did not differ between species (Fisher exact test, $p = 0.581$).

Phenotypic analysis

The Principal component analyses based on morphological traits (Fig. 3) clearly separated males and females of the two species as 99% confidence ellipses did not overlap. Note that species discrimination was supported by Axis 1 for males (47.28% of phenotypic variation) and Axis 2 for females (Axis 1 = 48.96%, Axis 2 = 31.27%). Species discrimination was significant for each sex (males: Wilks' Lambda = 0.0758, $p < 0.0000$; females: Wilks' Lambda = 0.0240 $p < 0.0000$). Discriminant function analysis classified all males and females to the initial group they have been assigned to by observers.

We tested for the relationship between phenotype and genotype using PCA-scores and FCA-scores of individuals on axes responsible for species discrimination (Fig. 4). We observed no significant relationship in male and female *helveticus*, nor in male *vulgaris*. In contrast, we detected a significant positive relationship in female *vulgaris* (coefficient = 225.4640, SE = 72.2812, df = 4, $F = 9.7298$, $p = 0.0024$). This result means that the more genetically intermediate *vulgaris* females were, the more they resembled to *helveticus* females.

Discussion

Hybrid frequency

We used two assignment methods, NEWHYBRIDS and STRUCTURE, that both identified hybrids left undetected by morphometry. No F_1 hybrids were found but different levels of

admixture were observed. Because of the low number of diagnostic loci (Vähä & Primmer 2006) and the limits of the Bayesian models (only recent hybrids can be found, Anderson & Thompson 2002), assignment methods are not expected to detect all hybrids. Nevertheless, results given by NEWHYBRIDS and STRUCTURE were congruent and the same individuals were identified as hybrids provided assignment threshold was slightly elevated for NEWHYBRIDS.

Overall, about 1.7% of adults had probabilities of admixture with each species. Hybrid frequency fluctuated around this value in several areas of the sympatric zone. Sampling effort differed between those areas but it is not likely to explain such low values. Thus, hybridization appears as a widespread phenomenon occurring over a large proportion of species' breeding ranges. Our estimation of hybrid frequency in adults was two to three times higher (1.7%) than the frequency of alien genes (0.07%) observed earlier in larvae (Arntzen *et al.* 1998). The discrepancy between the two studies may reflect either better survival of hybrids to metamorphosis or properties of the markers used (microsatellites *vs* allozymes). The first hypothesis is not confirmed by experimental crossings (Spurway & Callan 1960). The second hypothesis is more plausible. A high variance among markers in levels of differentiation between species is expected when the presence of semi-permeable genetic barriers to gene exchange is suspected (Bierne *et al.* 2003). The small sample size of markers used in both studies (two enzymatic diagnostic markers and six microsatellites) may explain this high variance between markers and then, this apparent discrepancy.

We found no morphological evidence of hybridization between the two newts. Phenotype distribution was strongly bimodal and discriminant analysis classified all individual in the group they have been assigned to in the field. It is often difficult to discriminate introgressed from pure individuals using morphology only so that the estimation of hybrid frequency in the wild by morphology is often underestimated (Naisbit *et al.* 2003; Thomas *et al.* 2008).

Another set of variables may yield higher discrimination power but it seems unlikely that morphology alone would be enough to survey the hybridization process. Results highlight the fact that most hybrids, mostly backcrosses, remain phenotypically undetected. Males' sexual morphology is very differentiated whereas females are very similar. It is thus not surprising that only few male hybrids have been observed by others in the field, even if both species are among the most common newts in Europe.

Species and sex asymmetric introgression

Mitochondrial analysis revealed that both maternal lineage *helveticus* and *vulgaris* occurred in hybrids. Consistently, nuclear gene flow was bidirectional between the two species. However we found a significant asymmetric pattern of nuclear introgression as the proportion of hybrids or introgressed individuals was five times higher in *vulgaris* than in *helveticus*. The range of scores on the first FCA axis was also much larger for *vulgaris* than for *helveticus*, which is consistent with the fact that a larger proportion of *vulgaris* were involved in heterospecific crosses than *helveticus*. Several ecological factors (relative abundance, reproductive phenology) and selective factors could explain this pattern but none of them has been rigorously tested here. Still, we observed that relative abundance was often biased as we caught more *helveticus* than *vulgaris*. Unbalanced abundances facilitate the formation of heterospecific pairs and favour asymmetrical heterospecific mating rates (Arnold *et al.* 1993; Randler 2002). This factor may have a major effect on the dynamics of hybrid zone. We also observed a genotype-phenotype relationship in *vulgaris* females but not in *helveticus* females or males of both species. The rationale for this pattern is not straightforward as it could result from an actual asymmetric relationship, if phenotypes of both species responded differentially to hybridization, or simply reflect a higher frequency of *vulgaris*-like hybrids. In any case, the current situation suggests that hybrid *vulgaris*-like females would more frequently backcross

with *vulgaris* males than with *helveticus* males and contribute to maintain an asymmetrical hybridization pattern.

Although we observed a trend, no effect of sex on introgression level neither in *helveticus* nor in *vulgaris* was significant. The low number of detected hybrids limited the power of statistical tests and strong conclusions cannot be drawn from these tests. However, the negative relationships between disequilibria deviations from their maximum values (κ) and sex-ratio for each of species indicates that in sites where hybridization occurred, sex-ratio was significantly female-biased. However, even if we sampled newts in the middle of the breeding season, we can not be completely sure of the value of sex-ratio from a single sampling (Arntzen 2002). The positive correlation between genotypic and phenotypic scores found in *vulgaris* females and not in males is also suggestive of selection against hybrid males. Haldane's rule could apply here as males are the heterogametic sex in *Lissotriton* (Hillis & Green 1990). Thus, sex-specific postmating barriers may be associated with a decrease in viability and in fitness of hybrid males.

Extent of introgression and demographic consequences of hybridization

Tests for multilocus Hardy-Weinberg and linkage equilibrium provided additional evidence for the existence of mixing between the two taxa. We found significant deviations from theoretical maximum values in about 70% of syntopic sites. Allotopic sites all showed fixations for at least one allele which did not allow us to compute estimations. According to our data, introgression was thus common in syntopy but did not leak out into allotopy. The result is striking since allotopic and syntopic sites in the Loire river study area alternate along the valley on a short geographical scale (Johanet *et al.* 2009b). We may have had not enough power to detect accurately all hybrids as suggested by NEWHYBRIDS and STRUCTURE output. Method for estimating disequilibria is also awkwardly sensitive to allele fixation as only one

fixed allele impairs computation. Thus, we may have underestimated actual hybrid frequency and introgression. Nevertheless, both approaches consistently indicate that introgression is present in sites where the two species physically co-occur. We cannot discard the occurrence of introgression in allotopy but its level is certainly lower than in syntopy. Overall, our results are consistent with the maintenance of species integrity, as observed on phenotypic traits, in spite of recurrent interspecific gene flow.

The higher hybrid frequency in *vulgaris*-like individuals may weaken syntopic *vulgaris* populations as more non introgressed individuals tend to engage in low fitness heterospecific matings. In addition, female-biased sex ratio in *vulgaris* is suggestive of lower male hybrid viability (Haldane 1922). Unbalanced sex ratio causes shortage of sexual partners and is likely to increase the probability of heterospecific matings (Randler 2002). Both asymmetric hybridization and male-biased sex-ratio are expected to affect *vulgaris* populations more strongly than *helveticus* populations, and to increase their extinction risk. To this regard, the Loire river valley is located on the edge of *vulgaris* range. There, sex-ratio are particularly biased to the detriment of males (0.31 ± 0.09 , Fig. 7) compared to other areas (e.g. Chadwick *et al.* 2006). Local surveys suggested that this species currently recedes northwards (Mourgaud & Pailley 2005). Distributional changes could be the consequence of global changes as observed elsewhere (Thomas *et al.* 2004) or other factors. Nevertheless, hybridization could play an important role here and more largely at the borders of the hybrid zone where unbalanced relative abundances are expected. Thus, if hybridization does not seem to strongly affect the genetic characteristics of each species, this process may still have demographic consequences.

Introgression dynamics in broad hybrid zones

Our study shows that a moderate level of hybridization does not imperil genetic integrity of species with broad geographic and ecological overlap. The contact zone between the two newts is not recent and yet both taxa remain well differentiated genetically in the large fraction of the contact zone we sampled. The apparent restriction of hybrids to syntopic sites raises questions about the factors that impede the diffusion of alleles to allotopy and more largely about the dynamics of introgression in broad hybrid zones. Owing to the age of these taxa, it is possible that most neutral or advantageous alleles have already spread into the other species distribution and that markers currently showing some degree of diagnosticity are subjected to selection, directly or via linkage to another gene.

However, one has to consider that introgression in the general context of intraspecific gene flow for each species. In *helveticus*, the number of hybrids detected is small relative to the total population size and allotopic sites are more abundant than syntopic. Thus, genetic drift may wipe out introgressed alleles from allotopic sites. A recent study by Petit and Excoffier (2009) proposes that introgression is impaired when intraspecific gene flow is high. Accordingly, net gene flow from allopatric or allotopic areas is to reduce the frequency of alien alleles that are then more easily lost by chance. Hybrid frequency is not particularly small in the *helveticus-vulgaris* system. Still, hybridization rate does not seem high enough for introgression to spread. Interestingly, the palmate newt is a ubiquitous and relatively abundant species. It tends to occupy a wider niche and more breeding sites than *vulgaris* in a large part of the contact zone. In such a context, the frequency of hybrid effective migrants need to be high enough to counter the homogenizing effect of intraspecific gene flow.

The maintenance of species integrity between broadly sympatric species is usually thought as the result of strong post and pre-zygotic barriers so that the few hybrids produced are

considered as evolutionary dead-ends. However, other processes may prevent introgression without the elevation of particularly strong reproductive barriers. The relative abundance of species and the proportion of syntopic sites over the total number of sites (allotopic and syntopic) are two major factors that may strongly condition the demographic component of broad hybrid zones, and set the upper limit to introgression dynamics. The spatial arrangement of allotopic and syntopic sites will determine net relative intra- and inter-specific gene flow and for this reason is also a parameter to consider. The strength of the effects generated by these different factors may create demographic barriers that impair the diffusion of alien genes outside syntopic sites. Their efficiency is probably reinforced for aquatic species that breeds in discrete habitats such as ponds or lakes. Modelling would certainly shed light on the process of genome interaction between taxa hybridizing in broad hybrid zones. The emphasis should be put on the effects and interactions of drift, relative abundance and relative occurrence on introgression dynamics.

References

- Anderson EC, Thompson EA (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, **160**, 1217-1229.
- Arnold ML, Hamrick JL, Bennett BD (1993) Interspecific pollen competition and reproductive isolation in *Iris*. *Journal of Heredity*, **84**, 13-16.
- Arntzen J, Wijer PD, Jehle R, Smit E, Smit J (1998) Rare hybridization and introgression in smooth and palmate newts (Salamandridae: *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*) *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **36**, 111-122.
- Arntzen JW (1986) Note sur la coexistence d'espèces sympatriques de tritons du genre *Triturus*. *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, **37**, 1-8.

- Arntzen JW (2002) Seasonal variation in sex ratio and asynchronous presence at ponds of male and female *Triturus* newts. *Journal of Herpetology*, **36**, 30-35.
- Baack E, Rieseberg LH (2007) A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current Opinion in Genetics & Development*, **17**, 513-518.
- Barton NH (2000) Estimating multilocus linkage disequilibria. *Heredity*, **84**, 373-389.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of Hybrid zones. *Annual review of ecology and systematics*, **16**, 113-148.
- Beebee TJC, Rowe G, Arntzen JW (1999) Identification of newts (*Triturus* sp.) and their hybrids using molecular methods. *Journal of Zoology, London*, **249**, 43-47.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05. Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Benazzi M (1957) Sulla ibridazione fra *Triturus helveticus* e *Tr. vulgaris*. *Bollettino di Zoologia*, **24**, 235-242.
- Bierne N, Daguin C, Bonhomme F, David P, Borsa P (2003) Direct selection on allozymes is not required to explain heterogeneity among marker loci across a *Mytilus* hybrid zone. *Molecular Ecology*, **12**, 2505-2510.
- Borge T, Lindroos K, Nadvornik P, Syvanen AC, Saetre GP (2005) Amount of introgression in flycatcher hybrid zones reflects regional differences in pre and post-zygotic barriers to gene exchange. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 1416-1424.
- Chadwick EA, Slater FM, Ormerod SJ (2006) Inter- and intraspecific differences in climatically mediated phenological change in coexisting *Triturus* species. *Global Change Biology*, **12**, 1069-1078.
- Cogălniceanu D (1994) Experimental hybridation within the *Triturus vulgaris* species-group (Amphibia, Caudata). *Revue of Romanian Biology*, **39**, 145-150.

- Cooley JR, Marshall DC, Hill KBR, Simon C (2006) Reconstructing asymmetrical reproductive character displacement in a periodical cicada contact zone. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 855-868.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, **19**, 299-306.
- Daguin C, Bonhomme F, Borsa P (2001) The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus mac-1. *Heredity*, **86**, 342-354.
- Duputié A, David P, Debain C, McKey D (2007) Natural hybridization between a clonally propagated crop, cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and a wild relative in French Guiana. *Molecular Ecology*, **16**, 3025-3038.
- Duvernell DD, Schaefer JF, Hancks DC, Fonoti JA, Ravanelli AM (2007) Hybridization and reproductive isolation among syntopic populations of the topminnows *Fundulus notatus* and *F. olivaceus*. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 152-164.
- Endler JA (1977) *Geographic variation, speciation, and clines*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611-2620.
- Fujita K, Silver J (1994) Single-strand Conformational Polymorphism. *Genome Research*, **4**, 137-140.
- Fuller RC (2008) Genetic incompatibilities in killifish and the role of environment. *Evolution*, **62**, 3056-3068.

- Goodman SJ, Barton NH, Swanson G, Abernethy K, Pemberton JM (1999) Introgression through rare hybridization: A genetic study of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*) in Argyll, Scotland. *Genetics*, **152**, 355-371.
- Griffiths RA (1986) Feeding niche overlap and food selection in smooth and palmate newts, *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*, at a pond in mid-Wales. *Journal of Animal Ecology*, **55**, 201-214.
- Griffiths RA (1987) Microhabitat and seasonal niche dynamics of smooth and palmate newts, *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*, at a pond in mid-Wales. *Journal of Animal Ecology*, **56**, 441-451.
- Griffiths RA, Mylotte VJ (1988) Observations on the development of the secondary sexual characters of male newts, *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*. *Journal of Herpetology*, **22**, 476-480.
- Griffiths RA, Roberts JM, Sims S (1987) A natural hybrid newt, *Triturus helveticus* x *T. vulgaris*, from a pond in mid-Wales. *Journal of Zoology, London*, **213**, 133-140.
- Haldane JBS (1922) Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics*, **12**, 101-109.
- Hall TA (1999) BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Harrison RG (1986) Pattern and process in a narrow hybrid zone. *Heredity*, **56**, 337-349.
- Harrison RG (1993) *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press, New York.
- Hey J (2006) Recent advances in assessing gene flow between diverging populations and species. *Current Opinion in Genetics and Development*, **16**, 592-596.
- Hillis DM, Green DM (1990) Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. *Journal of Evolutionary Biology*, **3**, 49-64.

- Höbel G, Gerhardt HC (2003) Reproductive character displacement in the acoustic communication system of green tree frogs (*Hyla cinerea*). *Evolution*, **57**, 894-904.
- Howard DJ (1986) A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution*, **40**, 34-43.
- Hubbs CL (1955) Hybridization between fish species in nature. *Systematic Zoology*, **4**, 1-20.
- IUCN (2008) <http://www.iucnredlist.org>.
- Jang Y, Won YJ, Choe JC (2009) Convergent and divergent patterns of morphological differentiation provide more evidence for reproductive character displacement in a wood cricket *Gryllus fultoni* (Orthoptera: Gryllidae). *BMC Evolutionary Biology*, **9**.
- Johanet A, Picard D, Garner T, Dawson D, Morales-Hojas R, Jehle R, Peltier D, Lemaire C (2009a) Characterization of microsatellite loci in two closely related *Lissotriton* newt species *Conservation genetics*.
- Johanet A, Secondi J, Pays O, Pagano A, Lodé T, Lemaire C (2009b) A case of reproductive character displacement in female palmate newts (*Lissotriton helveticus*). *Comptes Rendus Biologies*, **332**, 548-557.
- Martin L, Cruzan M (1999) Patterns of hybridization in the *Piriqueta caroliniana* complex in central Florida: evidence for an expanding hybrid zone. *Evolution*, **53**, 1037–1049.
- Martínez-Solano I, Teixeira J, Buckley D, García-París M (2006) Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): Evidence for old, multiple refugia in an Iberian endemic. *Molecular Ecology*, **15**, 3375-3388.
- Moore WS (1977) An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quarterly Review of Biology*, **52**, 263-277.
- Mourgaud G, Pailley P (2005) Atlas de répartition des Amphibiens (Urodèles, Anoures) et Reptiles (Chéloniens, Squamates) de Maine-et-Loire (France (1990-2004)). In: *Anjou Nature-Bulletin de l'Association "Les Naturalistes Angevins"*. pp. 5-53, Angers.

- Naisbit RE, Jiggins CD, Mallet J (2003) Mimicry: Developmental genes that contribute to speciation. *Evolution and Development*, **5**, 269-280.
- Petit RJ, Excoffier L (2009) Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**, 386-393.
- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data *Genetics*, **155**, 945-959.
- R Development Core Team (2007) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Randler C (2002) Avian hybridization, mixed pairing and female choice. *Animal Behaviour*, **63**, 103-119.
- Roberts JM (1990) *Reproductive isolation in Smooth and Palmate newts (Triturus vulgaris and T. helveticus)*. PhD Thesis, Open University, Milton Keynes.
- Roques S, Sévigny JM, Bernatchez L (2001) Evidence for broadscale introgressive hybridization between two redfish (genus *Sebastes*) in the north-west atlantic: A rare marine example. *Molecular Ecology*, **10**, 149-165.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics methods and protocols: Methods in Molecular Biology* (eds. Krawetz S, Misener S). Humana Press, Totowa.
- Rubidge EM, Taylor EB (2004) Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*). *Molecular Ecology*, **13**, 3735-3749.
- Schlüpmann M, Weber G, Lipscher E, Veith M (1999) Nachweis eines freilandbastardes von Teichmolch (*Triturus vulgaris*) und Fadenmolch (*Triturus helveticus*). *Zeitschrift für Feldherpetologie*, **6**, 203-217.

- Secondi J, Aumjaud A, Pays O, Boyer S, Montembault D, Violleau D (2007) Water turbidity affects the development of sexual morphology in the palmate newt. *Ethology*, **113**, 711-720.
- Secondi J, Faivre B, Bensch S (2006) Spreading introgression in the wake of a moving contact zone. *Molecular Ecology*, **15**, 2463-2475.
- Sites JWW, Marshall JC (2003) Delimiting species: A Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 462-470.
- Smulders MJM, Beringen R, Volosyanchuk R, Vanden Broeck A, Van Der Schoot J, Arens P, Vosman B (2008) Natural hybridisation between *Populus nigra* L. and *P. x canadensis* Moench. Hybrid offspring competes for niches along the Rhine river in the Netherlands. *Tree Genetics and Genomes*, **4**, 663-675.
- Spurway H, Callan HG (1960) The vigour and male sterility of hybrids between the species *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*. *Journal of Genetics*, **57**, 84-118.
- StatSoft (2007) STATISTICA (data analysis software system), version 8.0.
- Steinfartz S, Vicario S, Arntzen JW, Caccone A (2007) A Bayesian approach on molecules and behavior: Reconsidering phylogenetic and evolutionary patterns of the Salamandridae with emphasis on *Triturus* newts. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, **308**, 139-162.
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC, Erasmus BFN, Ferreira De Siqueira M, Grainger A, Hannah L, Hughes L, Huntley B, Van Jaarsveld AS, Midgley GF, Miles L, Ortega-Huerta MA, Peterson AT, Phillips OL, Williams SE (2004) Extinction risk from climate change. *Nature*, **427**, 145-148.
- Thomas DT, Ahedor AR, Williams CF, DePamphilis C, Crawford DJ, Xiang QY (2008) Genetic analysis of a broad hybrid zone in *Aesculus* (Sapindaceae): Is there evidence of long-distance pollen dispersal? *International Journal of Plant Sciences*, **169**, 647-657.

- Turner TL, Hahn MW, Nuzhdin SV (2005) Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology*, **3**, 1572-1578.
- Vähä JP, Primmer CR (2006) Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*, **15**, 63-72.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, **10**, 506-513.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Wolfram Research (2003) Mathematica, Version 5.0. Wolfram Research, Inc., Champaign.

Acknowledgements

We thank all the researchers and naturalists who provided us with DNA samples (cf Appendix 1 and also C. Miaud, P. Joly, C. Jakob, D. Henrio, F.J. Diego-Rasilla, M. Lužnik and D. Schmeller). We are grateful to J. Dobigeon, T. Duret, R. Robin and E. Beslot for their help in the field and during morphometric measurements and to S. Sourice and V. Hardouineau for technical assistance. We also thank N. Bierne for his help in analysis of cumulants, S. Caillault for computation of breeding range areas, J. Endler and J.W. Arntzen for helpful comments and critical improvements on the manuscript. We thank Région Bretagne for their financial support for analyses in the Plateforme OUEST Genopole (INRA, Rennes) and Solène Coedel who welcomed us. This study was funded by Région Pays-de-la-Loire, DIREN Pays-de-la-Loire and Angers Loire Métropole.

Figure legend

Fig. 1 Sampled sites, distribution of *Lissotriton helveticus* and *L. vulgaris*, and location of the zone of sympatry (from IUCN 2008). The outlet shows the study site where we investigated pattern of introgression at a local scale (BD CARTHAGE ®© IGN-MATE 2005). White circles indicate sampled sites where only *L. helveticus* were found and black triangles sampled sites with only *L. vulgaris*. Grey rectangles indicate syntopic sites. Stars indicate the locations of hybrids as reported in literature (a, Griffiths et al. 1987; b,c, Arntzen et al. 1998; d,e, Beebee et al. 1999; f, Schlüpmann et al. 1999).

Fig. 2 Scatterplot of the two first axes of a factorial correspondence analysis based on multilocus analysis of 927 *Lissotriton helveticus* (white circles) and 343 *L. vulgaris* (black triangles) sampled over the breeding ranges of the two species. Note that dotted and a plain ellipsoid 99% represent confidence intervals for *L. helveticus* and *L. vulgaris* respectively

Fig. 3 Scatterplot of the two first axes of a principal component analysis based on phenotypic traits measured in 240 males (a) and 320 females (b) of *Lissotriton helveticus* (white circles) and *L. vulgaris* (black triangles) sampled in the Loire valley. Note that dotted and a plain ellipsoid 99% represent confidence intervals for *L. helveticus* and *L. vulgaris* respectively.

Fig. 4 Relationship between phenotype (ACP) and genotype (AFC) in males *helveticus* (a) and *vulgaris* (b), and females *helveticus* (c) and *vulgaris* (d). Axes represent synthetic variables responsible for species discrimination. We observed a significant effect of genotype on phenotype in female *vulgaris* only.

Fig. 5 Distribution of ancestry estimates from STRUCTURE analysis (proportion of individual genomes derived from *Lissotriton vulgaris*) in *helveticus* and in *vulgaris* in different ecological contexts.

Fig. 6 Pairwise associations within genomes, $\kappa_{0,2}$ (corresponding to an average pairwise linkage disequilibrium) and between genomes, $\kappa_{1,1}$ (corresponding to an average Hardy-Weinberg disequilibrium) estimated following the method of Barton (2000) organized as a function of *Lissotriton vulgaris* allele frequency. Samples of *L. helveticus* in allotopy are represented by white circles, sample of *L. vulgaris* in allotopy are represented by black triangle. Samples in syntopy are represented by grey rectangulars for sites in Pays-de-Loire and by grey diamonds for sites elsewhere in Europe. Theoretical maximum values of $\kappa_{0,2}$ and $\kappa_{1,1}$ are represented by curves. Vertical bars represent 95% confidence intervals.

Fig. 7 Boxplots of sex-ratio in *Lissotriton helveticus* (*Lh*) and *L. vulgaris* (*Lv*) from different sites (n) in Pays-de-Loire and elsewhere in Europe. Sites not considered in genetic analyses were included.

Fig. 1

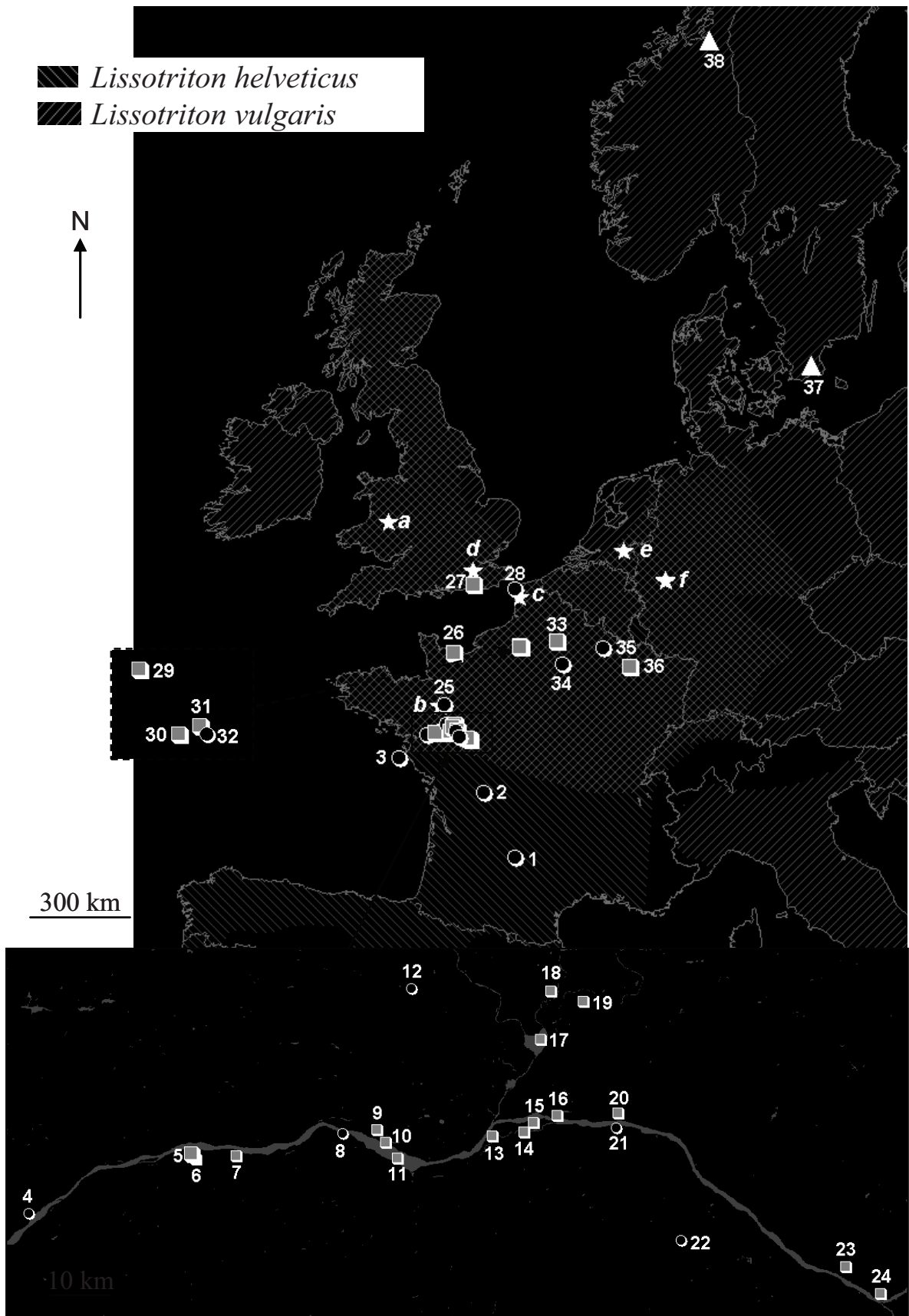


Fig. 2

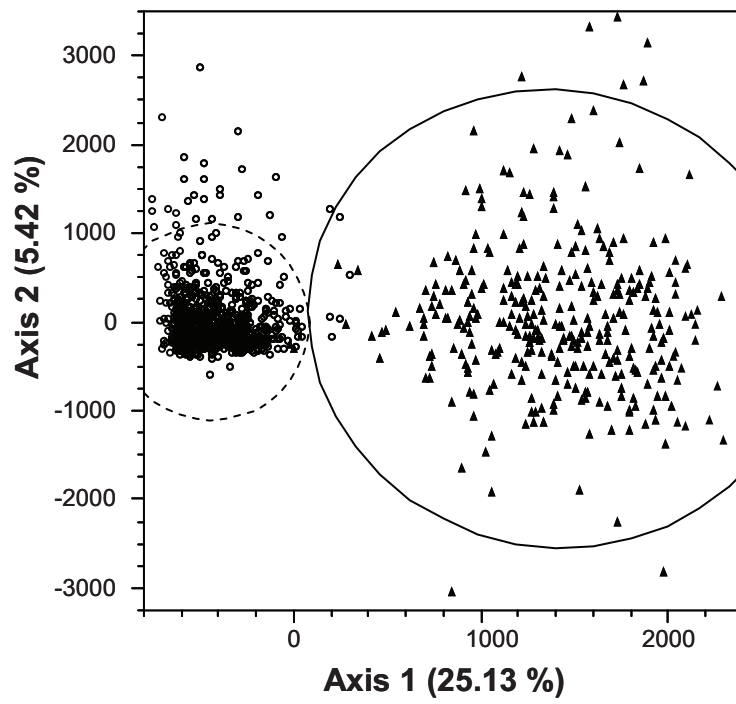


Fig. 3

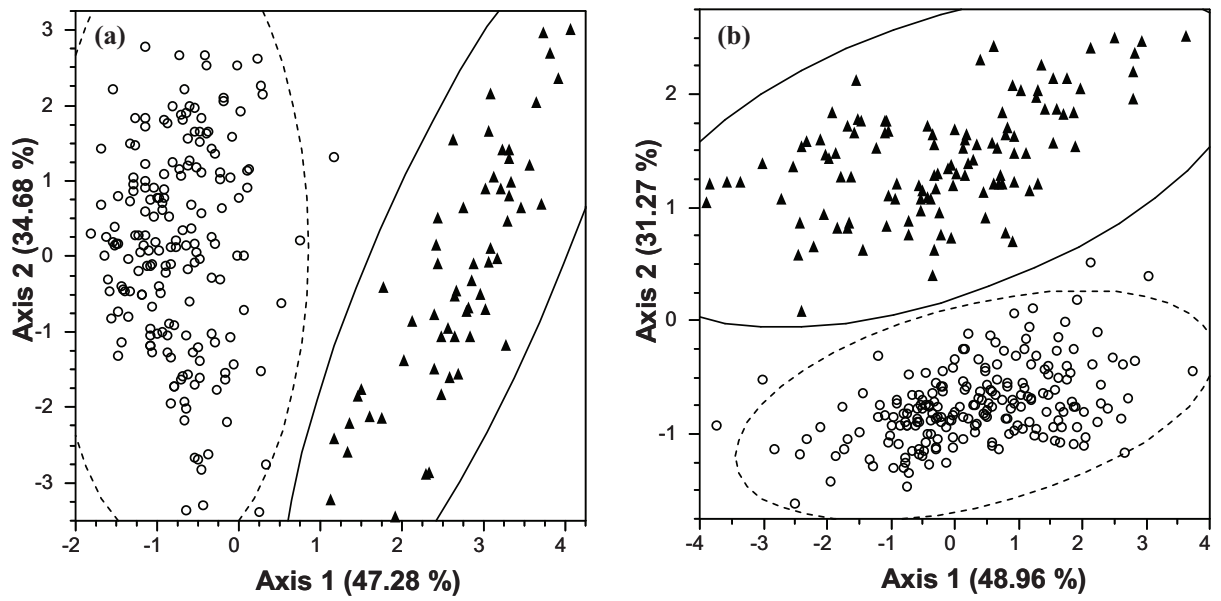


Fig. 4

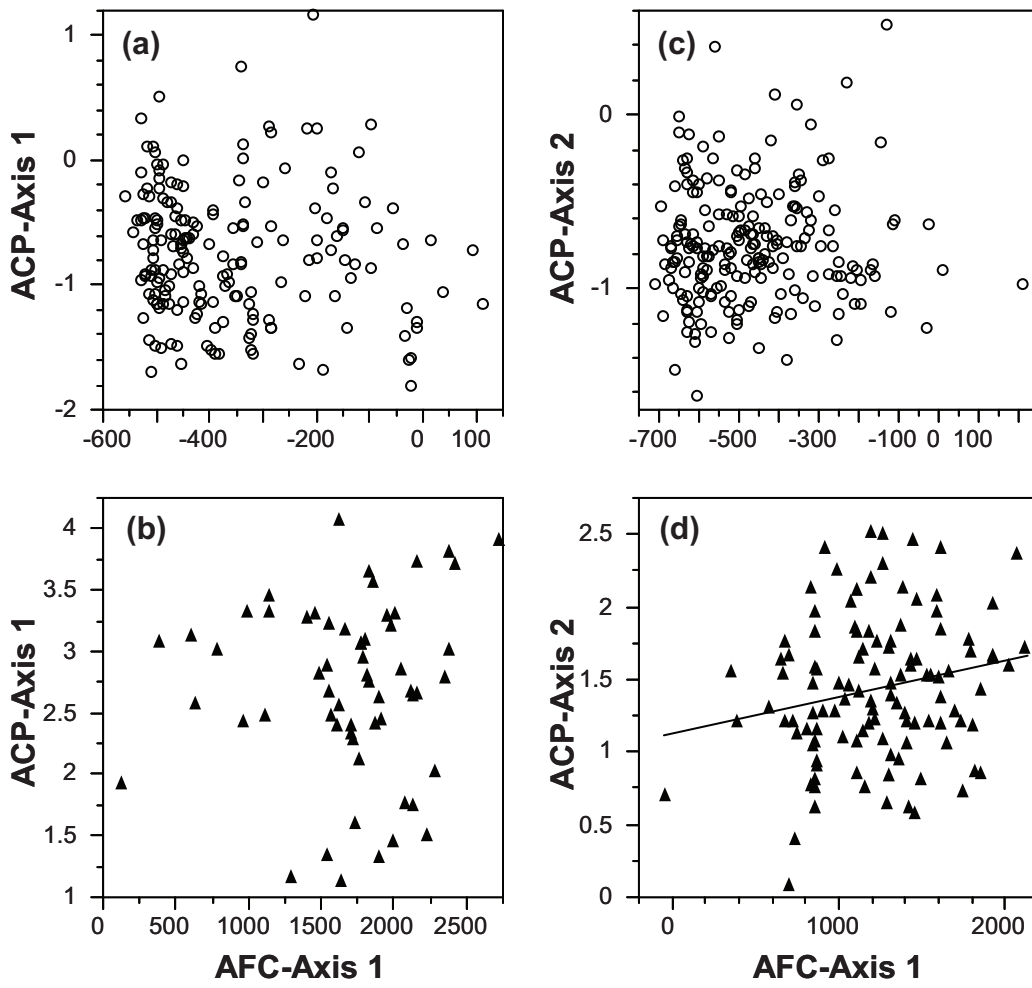


Fig. 5

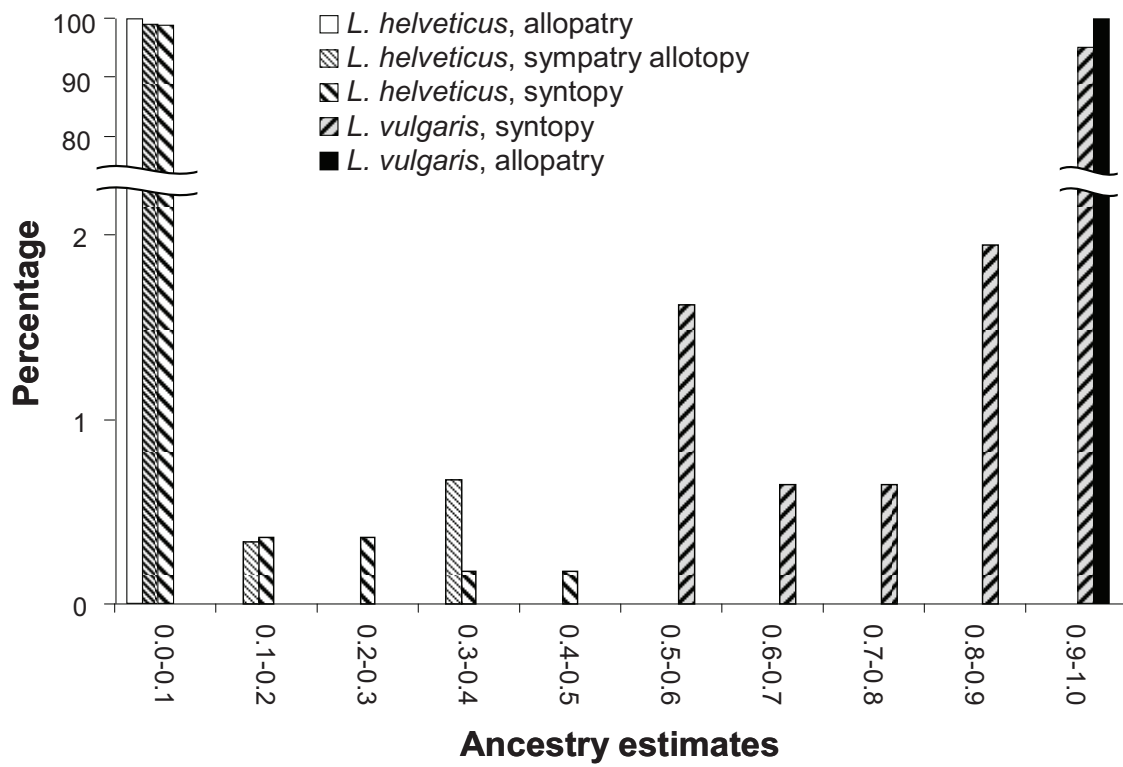


Fig. 6

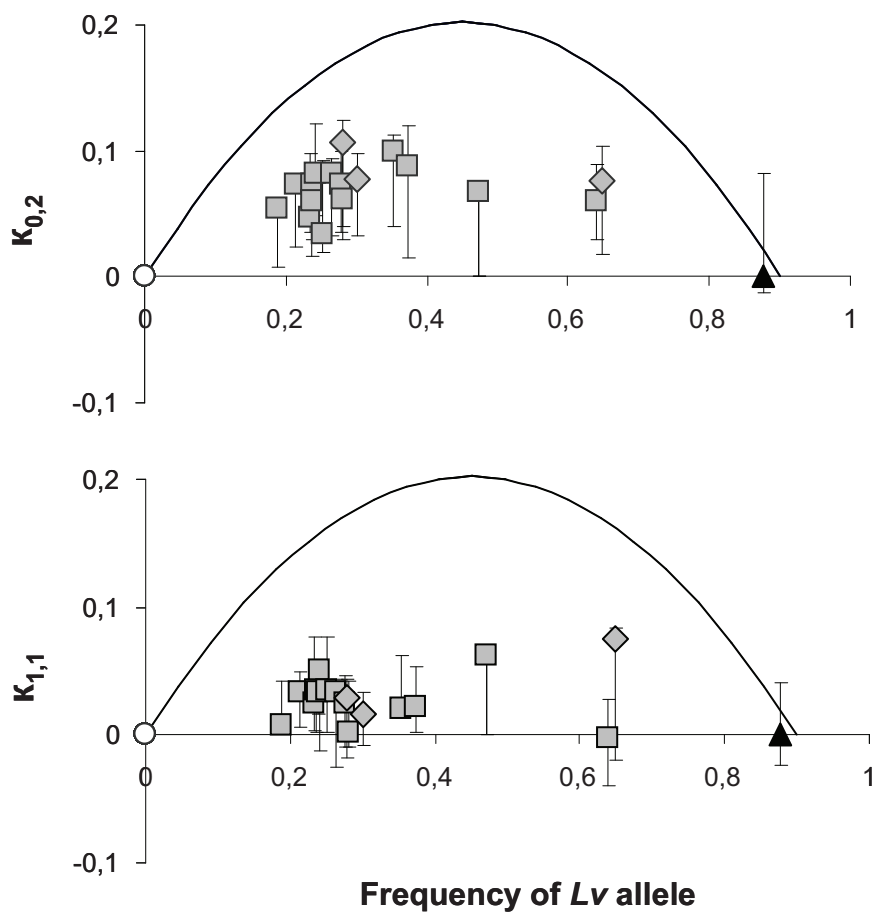
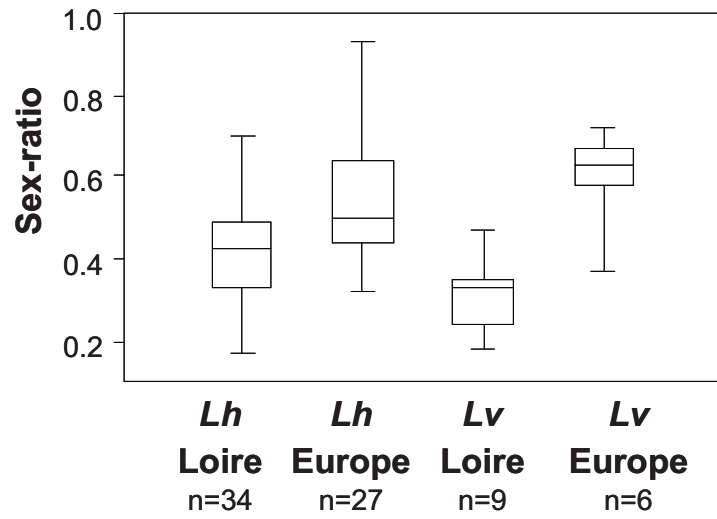


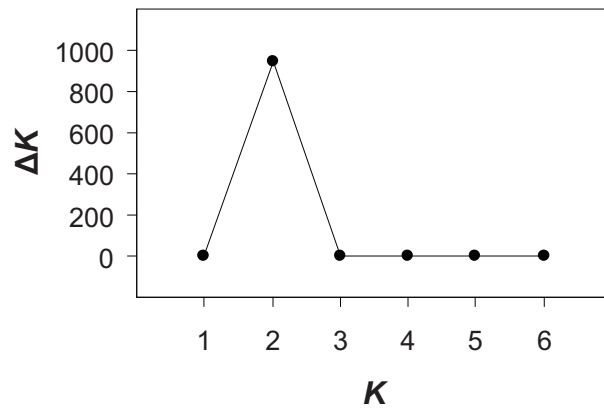
Fig. 7



Appendix 1 Locality, context (S = syntopy, A = allotopy), sample size (n) sex-ratio (SR), observed (H_O) and expected (H_E) unbiased heterozygosities for *Lissotriton helveticus* (*Lh*) and *L. vulgaris* (*Lv*). Data were calculated when population sizes were superior at 10. Asterisk refer to individuals without genotypic data.

pond	S/A	<i>Lissotriton helveticus</i>				<i>Lissotriton vulgaris</i>				Collector
		n	SR	H_O	H_E	n	SR	H_O	H_E	
Allopatry <i>helveticus</i>										
1 Causse du Quercy	A	27		0.61	0.28					Marty P.
2 Dordogne	A	23	0.47	0.61	0.32					Monguillon A.
3 Ile d'Yeu	A	27	0.32	0.63	0.30					Zannetty G.
Sympatry, Loire river valley										
4 Mauve-sur-Loire	A	30	0.47	0.60	0.46					Johanet A.
5 Liré 2007	S	35	0.43	0.71	0.45	22	0.33	0.65	0.21	Lemaire C.
6 Liré 2008	S	50	0.43	0.62	0.39	37	0.33	0.61	0.28	Secondi J.
7 St-Florent-le-Vieil	S	28	0.52	0.64	0.38	6				Lemaire C.
8 Montjean-sur-Loire	A	30	0.30	0.64	0.36					Johanet A.
9 St-Germain-des-Prés	S	43	0.45	0.59	0.40	23	0.24	0.65	0.29	Johanet A.
10 St-Georges-sur-Loire	S	32	0.44	0.62	0.38	5				Johanet A.
11 Chalonnes	A	36	0.36	0.64	0.39	1				Johanet A.
12 Longuenée	A	30		0.67	0.45					Johanet A.
13 St-Jean-de-la-Croix	S	30	0.50	0.59	0.41	19	0.35	0.57	0.35	Johanet A.
14 Mûrs-Erigné	S	19	0.31	0.66	0.41	21	0.47	0.56	0.28	Johanet A.
15 St-Maurille	S	35	0.24	0.65	0.29	9				Johanet A.
16 Ponts-de-Cé	S	8				9				Johanet A.
17 Ile-St-Aubin	S	2				28	0.43	0.60	0.33	Secondi J.
18 Briollay	S	1				31	0.39	0.59	0.36	Boyer S.
19 Villevêque	S	22	0.55	0.66	0.54	13	0.33	0.49	0.26	Caillault S.
20 La Bohalle	S	24	0.42	0.65	0.38	1				Johanet A.
21 Blaison-Gohier	A	29	0.52	0.63	0.33					Johanet A.
22 Milly	A	32		0.59	0.30					Secondi J.
23 Varennes-sur-Loire	S	35	0.46	0.71	0.33	9				Johanet A.
24 Villebernier	S	24	0.50	0.70	0.33	21	0.31	0.61	0.52	Johanet A.
Sympatry, other areas										
25 Mayenne	A	25	0.67	0.69	0.36					Johanet A.
26 Normandie	S	23	0.48	0.31	0.32	1				Barioz M.

27 Sussex	S	20	0.70	0.59	0.34	19	0.37	0.53	0.17	Beebee T.J.C.
28 Pas-de-Calais	S	29		0.64	0.43					Arntzen P.
29 Oise 2/2	S	31	0.39	0.51	0.26	8*				Secondi J.
30 Oise 1/4	S	24	0.93	0.43	0.31	8*				Secondi J.
31 Oise 1/2	S	12	0.81	0.46	0.33	36*				Secondi J.
32 Oise 1/1	A	30	0.75	0.49	0.24					Secondi J.
33 Aisne	S	1				28	0.72	0.50	0.26	Secondi J.
34 Monneaux	A	29	0.43	0.59	0.23					Lemaire C.
35 Ardennes	A	32	0.44	0.57	0.34					Patrelle C.
36 Lorraine	S	20	0.52	0.56	0.39	6				Oger F.
<i>Allopatry vulgaris</i>										
37 Sweden	A					6				Loman J.
38 Norway	A					29	0.58	0.48	0.27	Skei J.K.



Appendix 2 Graphical representation of ΔK calculated as $\Delta K = m|L''(K)|/s[L(K)]$ for each K value (Evanno *et al.* 2005). The modal value of this distribution is the uppermost level of structure, here two clusters.

ARTICLE 3

**A CASE OF REPRODUCTIVE CHARACTER DISPLACEMENT IN FEMALE PALMATE
NEWTS (*LISSOTRITON HELVETICUS*)**

Aurélie Johanet, Jean Secondi, Olivier Pays, Alain Pagano,
Thierry Lodé & Christophe Lemaire

publié dans les Comptes rendus de Biologie

ARTICLE 3 - A CASE OF REPRODUCTIVE CHARACTER DISPLACEMENT IN FEMALE PALMATE NEWTS (*LISSOTRITON HELVETICUS*)

Dans son ouvrage *Genetics and the Origin of Species*, Dobzhansky (1937) ajoute à la définition de l'espèce biologique l'importance des mécanismes d'isolement reproducteur. Dans son article *Speciation as a Stage in Evolutionary Divergence* (1940), il argumente que ces mécanismes surviennent généralement dans les zones de contact comme conséquence de la sélection contre l'hybridation. Le déplacement de caractère reproducteur se définit généralement comme une divergence phénotypique plus importante entre espèces vivant en sympatrie qu'en allopatrie (Brown & Wilson 1956).

Nous avons ici testé l'existence d'un déplacement de caractère morphologique chez le triton palmé en syntopie avec le ponctué. La plupart des études portant sur le déplacement de caractère comparent des populations sympatriques avec des populations allopatriques. Les gradients environnementaux peuvent masquer ou au contraire confondre un déplacement de caractère dans une étude menée à grande échelle géographique (Adams & Collyer 2007; Goldberg & Lande 2006). Les amphibiens présentent une grande plasticité phénotypique et, récemment, Sotiropoulos *et al.* (2008b) ont mis en évidence que la morphologie externe du triton ponctué varie en relation avec des critères climatiques et des caractéristiques de l'habitat. Compte tenu de la grande aire de contact entre tritons palmés et ponctués, nous avons restreint notre étude dans une zone de 120 km de large, dans la vallée de la Loire, où des sites allotopiques et syntopiques alternent. Nous avons intégré dans nos analyses plusieurs facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la morphologie des individus. En utilisant des modèles linéaires mixtes, nous avons constaté que les femelles de tritons palmés possédaient une queue plus élargie en présence de la seconde espèce, un phénomène concordant avec un déplacement de caractère reproducteur (Figure III.2). Ce phénomène est peu documenté chez les amphibiens et nos résultats suggèrent que l'accouplement interspécifique engage un coût pour les tritons mâles. Notre étude souligne aussi que l'évolution des systèmes de reconnaissance sexuelle peut opérer à très petite échelle.

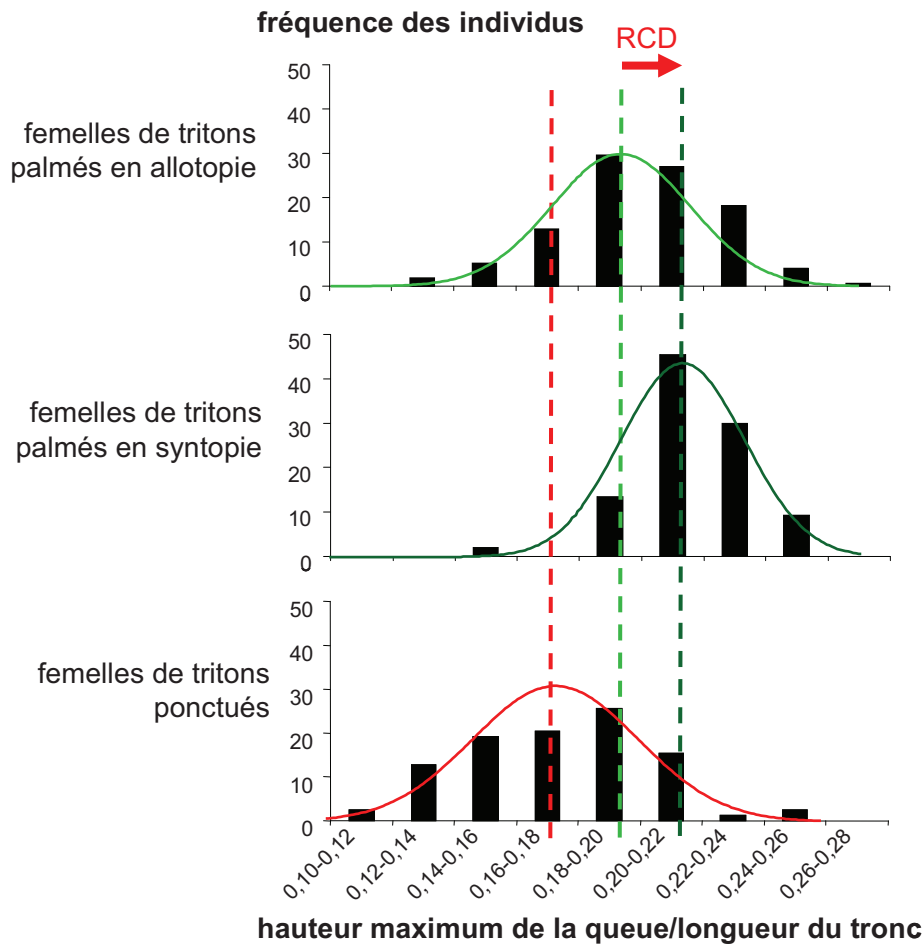


Figure III.2 Distribution des hauteurs de queue maximales relatives chez les femelles de tritons palmés en allotopie, syntopy et femelles de tritons ponctués. L'axe des ordonnées représente la fréquence des individus à l'intérieur de chaque groupe. Une queue plus large chez les femelles de tritons palmés en syntopie suggère un déplacement de caractère reproducteur (RCD)

Cet article a fait l'objet d'une publication dans le journal « Comptes Rendus de Biologie » en 2008.



Ecology / Écologie

A case of reproductive character displacement in female palmate newts (*Lissotriton helveticus*)

Aurélie Johanet^{a,*}, Jean Secondi^a, Olivier Pays^a, Alain Pagano^a, Thierry Lodé^b,
Christophe Lemaire^a

^a Laboratoire paysages et biodiversité, UFR Sciences, Université d'Angers, 2, boulevard Lavoisier, Angers cedex 1, France

^b UMR Ethologie évolution écologie, Université de Rennes 1/CNRS 6552, UFR Sciences de la vie et de l'environnement, avenue du Général-Leclerc, Université de Rennes 1, 35042 Rennes cedex, France

Received 24 November 2008; accepted after revision 2 February 2009

Available online 18 March 2009

Presented by Pierre Buser

Abstract

Reproductive character displacement is commonly described as larger phenotypic differences between species living in sympatry rather than in allopatry. We investigated this phenomenon on two amphibians found in their contact zone where syntopic and allotopic sites alternate. To test the effect of syntopy with *Lissotriton vulgaris* on the *Lissotriton helveticus* phenotype, we studied the morphology of adult males and females while controlling for environmental factors (i.e. land use and flood risk). Using linear mixed-effects models, we found that females of *L. helveticus* expressed a deeper tail when in the presence of the other species, a pattern consistent with reproductive character displacement. This pattern has been rarely observed in Amphibians. It suggests that male newts incur large mating costs when selecting heterospecific partners. Our study also emphasizes that the evolution of mate recognition systems could occur at a microgeographical scale within a sympatric area. **To cite this article: A. Johanet et al., C. R. Biologies 332 (2009).**

© 2009 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Un cas de déplacement de caractère reproducteur chez les femelles de Tritons palmés (*Lissotriton helveticus*). Le déplacement de caractère reproducteur se définit généralement comme une divergence phénotypique plus importante entre espèces vivant en sympatrie qu'en allopatrie. Nous avons étudié ce phénomène chez deux amphibiens à l'intérieur même de leur zone de contact où des sites en syntopie et allotopie alternent. Pour tester l'effet de la syntopie avec *Lissotriton vulgaris* sur la variabilité phénotypique de *Lissotriton helveticus*, nous avons étudié la morphologie des mâles et femelles adultes en contrôlant par certains facteurs environnementaux (i.e. l'occupation du sol et les potentialités d'inondation). En utilisant des modèles linéaires mixtes, nous avons constaté que les femelles de *Lissotriton helveticus* possédaient une queue plus élargie en présence de la seconde espèce, un phénomène concordant avec un déplacement de caractère reproducteur. Ce phénomène est peu documenté chez les amphibiens et nos résultats suggèrent que l'accouplement interspécifique engage un coût pour les tritons mâles. Notre étude souligne aussi que l'évolution des systèmes de reconnaissance sexuelle peut opérer à très petite échelle. **Pour citer cet article : A. Johanet et al., C. R. Biologies 332 (2009).**

* Corresponding author.

E-mail address: aurelie_johanet@hotmail.com (A. Johanet).

© 2009 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Reproductive character displacement; *Lissotriton*; Sympatry; Morphometric measurement; Habitat

Mots-clés : Déplacement de caractère reproducteur ; *Lissotriton* ; Sympatrie ; Mesures morphométriques ; Habitat

1. Introduction

Character displacement refers to the phenomenon where differences among similar species are accentuated where their distributions overlap [1]. This pattern can be caused by ecological or reproductive processes. Ecological character displacement results from evolutionary change driven by competition among species for a limited resource whereas reproductive character displacement (RCD) is the divergence in sympatry of a trait involved in species recognition [2]. In most cases, the latter is expected to increase differences between parental species to avoid hybridization risk and can contribute to reinforcement in cases where gene flow persists between species [3]. RCD can affect mate coloration [4], morphological trait size [5], acoustic signals [6], olfactory signals [7] or mating preference [8].

Most studies of reproductive character displacement have focused on the evolution of either male mating cues or female preference. The fact that females generally appear to be the choosiest sex in most animals may give rise to a bias in evolutionary research [9]. However some recent studies mentioned the occurrence of RCD in male mate preferences [10–13]. Occurrence of male mate choice in species from different taxa (actinopterygians, birds, insects, mammals) and contribution of female sexual traits and male choosiness to specific reproductive isolation [14,15] may indicate that this phenomenon is more common than previously thought.

In amphibians, male mate choice has been documented in some species [16–18]. However, to our knowledge, the only literature available on reproductive character displacement in amphibian concerns male anuran mating calls [6,19–21].

Within the European newts, hybridization is commonly observed in the genus *Lissotriton* [22,23]. In particular, hybrids between the palmate newt *Lissotriton helveticus* (Razoumowsky 1789) and the smooth newt *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus 1758) have been found in several locations within the sympatric zone [24–27] and introgression is documented [26]. The two species co-occur across a broad sympatric area (Fig. 1) extending from western to central and northern Europe over a thousand kilometres in longitude and latitude [28]. The two species frequently breed in the same water bodies [29] even if their ecological requirements are not iden-

tical [30]. Breeding periods broadly overlap too [31], in such a way that male secondary sexual characters are fully expressed at the same period [32]. *L. vulgaris* possesses a denticulate dorsal crest and flaps of skin on the toes of the hind feet. In contrast, *L. helveticus* has a very low straight-edged crest, conspicuous webbing between the toes of the hind feet and a filament at the end of the tail [32]. However, females of the two species look alike, although *L. vulgaris* female is quite slimmer, with a more pronounced ventral coloration and a more speckled throat.

Because of large niche overlap and reduced hybrid fitness [33,34], we expect phenotypic divergence to strengthen the efficiency of specific recognition in syntopic sites. Interestingly, RCD could occur in males and/or females as both sexes contribute to mate choice in newts. On the one hand, females express preferences for particular males [35–38], control fertilization [39], and engage in multiple matings [36,40,41]. On the other hand, males can terminate courtship at early stages and have been shown to express mate preference for female traits [17]. In addition, sperm is probably limiting [42]. RCD in female specific traits is thus expected to limit the cost for males to mismatch.

In Western France (Pays-de-Loire), the smooth newt is almost exclusively found in floodplains and its breeding habitat is entirely nested in the habitat of the palmate newt. Allotopic and syntopic sites alternate according to a mosaic pattern. This particular situation provides an opportunity to test for the occurrence of reproductive character displacement on a small geographical scale. To detect RCD, we took morphological measurements on males and females of the two species reproducing in ponds in this area. We tested whether the presence of *L. vulgaris* in the pond influenced *L. helveticus* morphology. Golberg and Lande [43] pointed out that the majority of studies focusing on character displacement did not include environmental data, which increased the risk of failing to detect divergence. Our earlier study suggested that terrestrial habitat could influence adult morphology [44]. Thus, we integrated relevant environmental co-variables in our models to discriminate between phenotypic differences caused by syntopy and those caused by environmental factors.



Fig. 1. Map showing the distribution of *Lissotriton helveticus* (left hatchings) and *L. vulgaris* (right hatchings) and their overlapping ranges (from [28]). Study area is represented by a rectangle.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and morphometry

We sampled *Lissotriton helveticus* and *L. vulgaris* in Pays-de-Loire (Western France) in the floodplains between Gennes and Nantes and the surrounding plateaus (Fig. 2). Newts were caught in ponds during their aquatic phase from March to May 2006. The elevation of sites ranged from 8 to 110 m. We captured as many sexually mature adult newts as possible from each pond using dipnets (Capture and release Permit delivered by Préfectures du Maine-et-Loire et Loire-Atlantique). On average, thirty individuals per population were caught from twenty-seven ponds. All newts were anaesthetized prior to manipulation by immersion in Tricaine methane sulphonate (0.2 g/l), MS222, for a duration of 5 to

10 minutes. Measurements were taken the same day or the day after capture. Six characteristics associated with size and developments of secondary sexual traits were measured to the nearest 0.01 mm using a digital calliper. We measured the following traits likely to discriminate the two species: snout to vent length (SVL), head width (HW), tail height (TH), maximum tail height (MTH), cloaca width (CW) and male palmate filament length (FIL) (for details on the measurement method, see [44]). Individuals were subsequently released to their original capture sites.

2.2. Habitat characterization

We quantified land characteristics within a 400-m radius centred on each pond. This distance corresponds to the average migration distance in newts (see [45]).

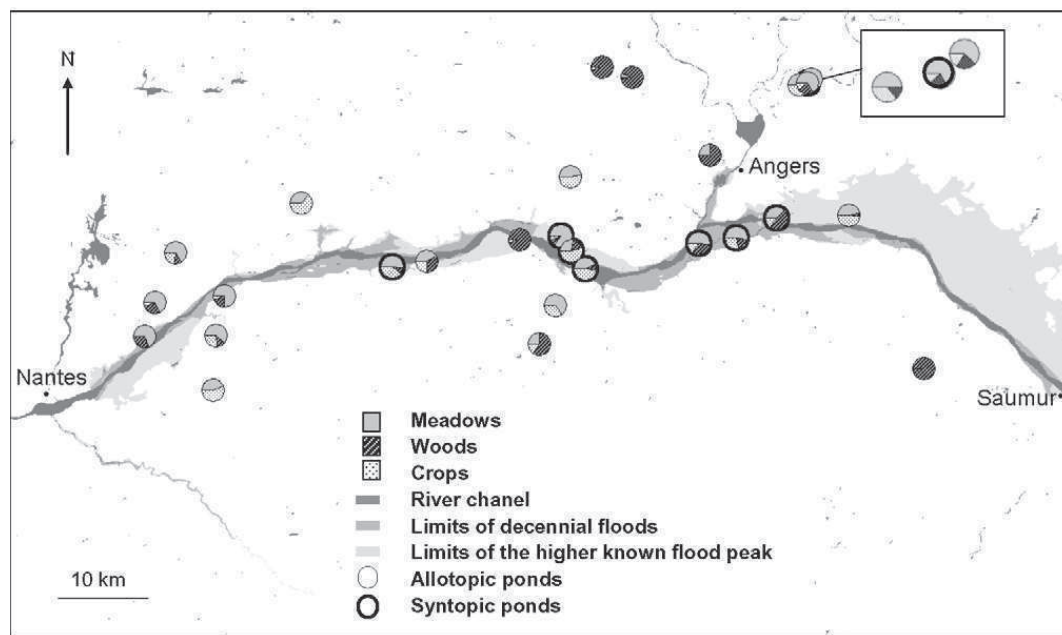


Fig. 2. Localization of the 27 populations of *Lissotriton helveticus* sampled in western France in allotopy and in syntopy with *L. vulgaris* (dark circled pie chart) with emphasis on landscape covered (only the three majority habitats are shown in the pie chart) and flood risk (BD CARTHAGE ©IGN-MATE 2005).

Terrestrial habitat conditions the amount of light as well as water and vegetation characteristics observed in ponds. We thus measured the area covered by meadows, forests, crops, roads, habitations, streams and pools from aerial photography using the Geographic Information System software MapInfo 6.5. Data were given in percentages for each element of landscape cover. We observed that *L. vulgaris* mainly occurred in ponds close to the river channel. Thus, we integrated information about flood risk in our analyses in order to control for the potential effect of this factor. The occurrence of floods has been studied categorizing ponds within three classes using the French national database Carorisque [46]. We determined whether ponds were subjected to decennial floods, or within the limit of the highest known flood peak. Finally, ponds on the plateau were considered as never flooded.

2.3. Statistical analyses

Our procedure is simpler than that of Adams and Collyer [47] because one species does not occur in allotopy within the study area. To investigate the effect of syntopy and environmental variables (percentage of each element of the landscape cover and level of flooding) on *Lissotriton helveticus* morphological variation, we used Linear Mixed-Effects Models with these factors as independent variables. LM present several advantages over classical regression approaches in that

they integrate data from different statistical distributions with the appropriate modelling statistical error. It allows continuous variables (e.g. % of forest) and/or categorical variables (e.g. presence of *L. vulgaris*). It also permits to add random effects which could not be taken into consideration with basic statistics (like t-test, discriminant analysis, ...). Because of the hierarchical structure of the dataset, two nested random effects were included in each model: sampling site nested in the sampling date. Sampling date was included in the models because adult body size increases throughout the aquatic breeding period [32,44], whereas sexual traits grown for the breeding season regress afterwards [32]. As we compared individuals from different ages and because growth is continuous in this species, all morphological traits were converted to relative size measurements by dividing each trait by SVL. Normality assumptions were met for all dependent variables. Each morphological character was tested in a separate model. Each sex was handled independently because of sexual dimorphism. From every complete model, we performed a backward selection, removing, at each step, the least significant factor at the threshold $\alpha = 0.05$. Statistical analyses were computed using R 2.6.1 [48].

3. Results

A total of 446 females and 357 males of *L. helveticus* and 83 females and 43 males of *L. vulgaris* were

Table 1

The effects of environmental variables and syntopic situation on morphological data for male and female palmate newts using Linear Mixed-Effects Models, which includes two nested random effects (sampling site in sampling date). Minimal models were backward selected. denDF: denominator degrees of freedom for F -test.

		Parameter estimate	SE	denDF	F -value	P -value
Female						
Model 1	SVL					
	(Intercept)	34.2637	0.4415	419	6022.33	< 0.0001
	% Forest	0.0217	0.0063	22	11.77	0.0024
Model 2	Head width					
	(Intercept)	0.2119	0.0011	419	24802.55	< 0.0001
	% Forest	−0.0002	0.0000	22	34.31	< 0.0001
Model 4	Tail height					
	(Intercept)	0.1572	0.0023	352	4743.91	< 0.0001
	% Forest	−0.0001	0.0000	18	10.74	0.0042
Model 5	Maximum tail height					
	(Intercept)	0.2145	0.0045	338	4022.596	< 0.0001
	% Forest	−0.0004	0.0001	17	10.397	0.0050
Model 5	Maximum tail height					
	(Intercept)	0.1988	0.0043	338	3315.243	< 0.0001
	Situation[syn]	0.0182	0.0077	20	5.627	0.0278
Male						
Model 6	SVL					
	(Intercept)	29.8614	0.2663	330	12572.00	< 0.0001
	% Forest	0.0159	0.0051	22	9.71	0.0050
Model 7	Head width					
	(Intercept)	0.2150	0.0012	330	29636.04	< 0.0001
	% Forest	−0.0001	0.0000	22	16.53	0.0005
Model 9	Tail height					
	(Intercept)	0.1525	0.0024	284	4128.12	< 0.0001
	% Forest	−0.0001	0.0001	18	6.08	0.0239

sampled in the 27 ponds. Eight ponds were syntopic. As we found no allotopic populations of *Lissotriton vulgaris*, we could only determine the effects of syntopy on *L. helveticus* morphology. We detected a significant effect of population and date on all morphometric traits measured on the palmate newt. Morphological variation was explained both by environmental variables and syntopy with *L. vulgaris*. Table 1 presents the minimal models retained for each morphological trait and each sex. For clarity, non-significant models are not shown.

Males and females responded in the same way for each environmental parameter taken into consideration. According to the coefficients given by Model 1 and Model 6, body size (SVL) increased with forest cover (females: $F = 11.77$, $P = 0.0024$; males: $F = 9.71$, $P = 0.0050$, Fig. 3). On the contrary, relative head width and tail height were negatively correlated with the area of forested cover for both sexes (Models 2, 4, 7 and

9, Fig. 3); however, maximum tail height only showed a significant negative correlation with the area of forested cover for females (Model 5, Fig. 3). We detected no effects from other environmental variables.

We observed a significant effect of syntopy on female morphology. According to the positive coefficient given by Model 5 (value = 0.0182), maximum tail height was larger in syntopy ($F = 5.627$, $p = 0.0278$). Fig. 4 shows the distribution of maximum tail height for *L. helveticus* females in syntopy and allotopy and for *L. vulgaris* female. It outlines the fact that female *L. vulgaris* have shallower tails than female *L. helveticus* and the gap in the distribution between *L. helveticus* indicates that in syntopy, *L. helveticus* maximum tail height is deeper. Although not significant at a 5% threshold, a consistent tendency is observed for female *L. helveticus* tail height (TH) to be larger in syntopy ($p = 0.0915$, not

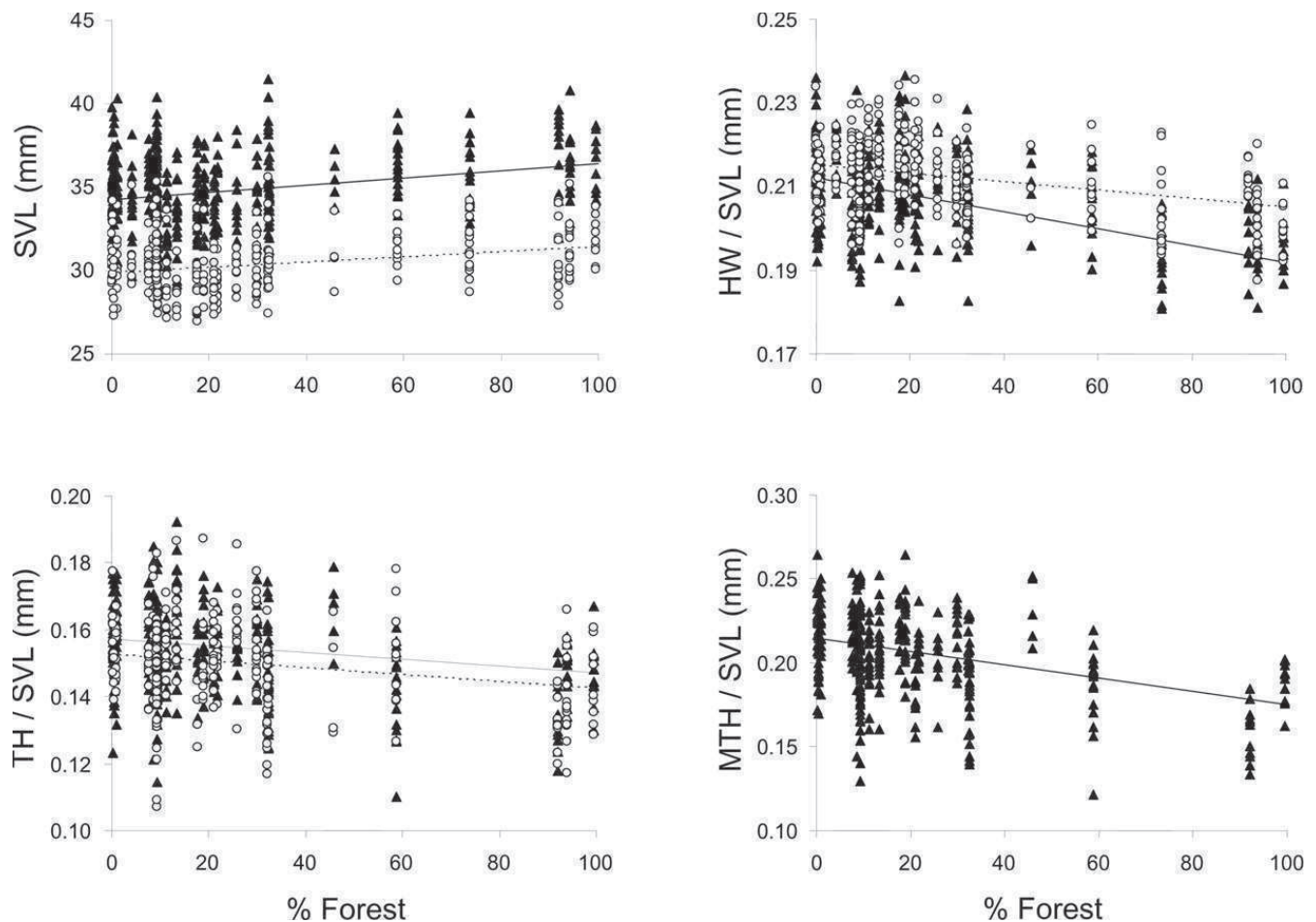


Fig. 3. Relationship between environmental variables and morphological traits found in female (▲) and male (○) *L. helveticus*. The continuous line corresponds to females and the dotted line to males. Linear regressions were calculated from the Linear Mixed-Effects Model including two random nested effects; sampling sites in sampling dates (see Table 1 for statistical results).

shown). No significant effect of syntopy was found for males, neither on size nor on sexual characters.

4. Discussion

Natural selection, sexual selection as well as random genetic drift can cause phenotypic differentiation between populations. Recently, several authors have emphasized the importance to include relevant environmental co-variables when investigating the phenotypic consequences of interspecific relationships [43,47]. The large ecological amplitude of the palmate newt [49] clearly required to follow these guidelines. We thus explicitly integrated spatial variation with environmental factors to test for the occurrence of character displacement.

4.1. Effects of landscape on body size and shape

We detected a significant effect of landscape on the size and shape of both males and females. Snout-to-vent

length was positively correlated with the proportion of forest cover surrounding the pond in both sexes. Body size was larger in forested than in more open habitats, which confirms the trend observed previously on a smaller sample of sites in the same study area [44]. Earlier studies reported effects of terrestrial habitat on *Lissotriton helveticus* morphology [50] and abundance [45] suggesting that habitat quality affects growth and survival. Both are expected to be higher in forested than in open habitats because of better foraging efficiency, higher shelter availability [49,51] and lower water temperature during larval development. Temperature is negatively related to the size at metamorphosis that is a good predictor of adult size [52–54]. Unfortunately, there is no available data to evaluate the relative contribution of these factors to morphological variation.

We also found that body shape was negatively correlated with the percentage of forest cover. Relative head width and tail height for both sexes, as well as maximum tail height for females were smaller in forest.

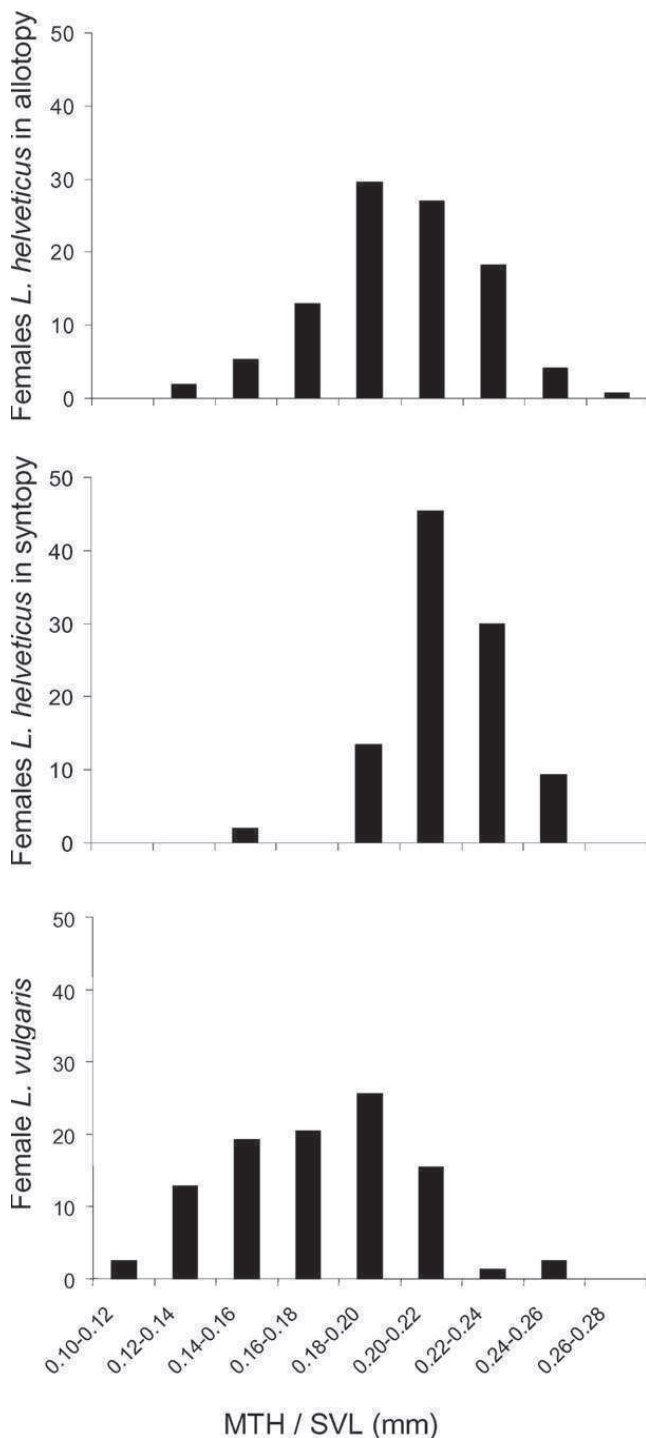


Fig. 4. Distribution of measurements for maximum tail heights (divided by SVL) found in females of *L. helveticus* (in both allotopy and syntopy) and *L. vulgaris*. The Y-axis represents the frequency of individuals inside each group.

Water is commonly darker in forest than in open habitat because of lower light intensity and a higher concentration in organic matter and humic acids [55]. Secondi et al. [44] found that in *Lissotriton helveticus* male sexual traits decreased with water turbidity suggesting that

the expression of visual signals matched the local conditions of signal transmission. We can hypothesize that although shape can be important in species recognition, characters contributing to it like sexual characters would be less developed when visual communication is less efficient.

4.2. Reproductive character displacement

In addition, we detected a significant effect of syntopy on palmate newt morphology. Female *L. helveticus* developed a higher tail when in syntopy with *L. vulgaris*. Since female *L. vulgaris* possesses a slimmer tail than females of the other species, morphological divergence in syntopy is consistent with the hypothesis of character displacement.

Ecological character displacement is considered as the main factor explaining differences in body size [43]. However, it could be discarded here for several reasons. The breeding period of *Lissotriton helveticus* and *L. vulgaris* extensively overlap [31]. The two species also frequently breed in the same water bodies [29] even if their ecological requirements are not identical [30]. Yet, earlier work suggested that competition for food resources is relaxed between aquatic adults of the two species [56]. In general, species of similar body size avoid competition by occupying different geographical regions or different ponds within a region [57], which is not the case for the two species studied here. The large niche overlap of adults suggests that interspecific competition is not important, possibly as a result of resources like food or vegetation stems used for laying are not limiting. In addition, if character displacement is due to competition, it is likely that males would be also affected, as both sexes are usually found in the same area of the pond [29] and have the same diet [56]. We cannot definitively discard the fact that a confounding factor, such as water quality, density of individuals or presence of predators is responsible for morphological variation between syntopic and allotypic ponds, even if this alternative hypothesis does not fully explain why females react and males do not.

In contrast, experimental crossings revealed selection against hybrid *helveticus* x *vulgaris* [33,34,58] and thus a cost to hybridize in these species. Because females are very similar, a divergent change in body shape is likely to enhance species recognition by males. Reproductive character displacement seems therefore the most plausible explanation for the apparent divergence. Even if males develop exaggerated epigamic traits displayed during courtship, they seem to actively select females too. They do not engage automatically in

courtship and often interrupt interactions with females [59]. Roberts [59] consistently suggested that males of palmate newts were more efficient in specific recognition than females when using visual cues only. Consistently, our result suggests that heterospecific matings are costly for male newts, which is possibly caused by the waste of time, energy and gametes in low quality reproduction. This last point may be particularly crucial in a group where sperm is limiting [36]. The smooth and the palmate newt produce complex sequences of courtship display that only show few quantitative differences [60] and interspecific courting is common [59, Secondi unpublished data]. Differences in male specific recognition between syntopy and allotopy could thus contribute to enhance reproductive isolation. Additional data on interspecific courtship behaviour and male response to tail height would thus provide a strong experimental test of the RCD hypothesis.

4.3. The spatial scale of reproductive character displacement

Most reproductive character displacements are found in studies comparing allopatric and sympatric populations. Although conclusive this approach is not informative about the scale at which divergence can occur. We found here a pattern of character displacement inside the area of sympatry, between syntopic and allopatric sites. This would imply that gene flow between adjacent populations is sufficiently low to maintain phenotypic differences under selection. Amphibians, and newts in particular, are known to be highly philopatric [61] and to exhibit relatively poor dispersal ability (see [45]). These characteristics tend to limit gene flow between populations and to generate spatial structure at small geographical scales. To this regard, a significant genetic structure (i.e. *F_{st}*) has been observed from 100 m in *Rana sylvatica* [62], to less than 1 km in *Hyla arborea* [63] or 2.8 km in *Bufo calamita* [64]. Adaptations are more easily fixed when genetic structure is strong [65,66]. Thus, it may be not surprising that examples of local adaptation are described in amphibians even between close breeding sites (e.g. [67–70]). The local divergence of male mating calls of *Hyla cinerea* in ponds where *H. gratiosa* breeds syntopically [6] tends to support this idea. Additionally, cases have been reported where local adaptation in sexual behaviour persisted despite high gene flow [11,71].

5. Conclusion

To conclude, our results suggest that reproductive character displacement can occur within a sympatric zone. Studies of RCD at larger geographical scale can fail to detect character divergence because both environmental and genetic gradients affect phenotypic variation. It may be easier to detect this phenomenon when considering smaller scales for species with limited dispersal abilities. In spite of the likely occurrence of gene flow, our study tends to show that adaptation in small scale mosaic zones occurs in syntopic sites. Studying local adaptation is a fundamental point to determine the relative effect of selection over gene flow and other evolutionary forces i.e. it should help to a better knowledge of forces modelling evolution of species.

Acknowledgements

We thank S. Sourice and V. Hardouineau for technical assistance, J. Dobigeon, T. Duret, R. Robin and E. Beslot for their help in the field and during morphometric measurements. We also thank the Pr. John Endler as well as an anonymous reviewer for helpful comments and critical improvements on the manuscript. We are thankful to Mark Phipps for grammatical corrections on the manuscript. This study was funded by Région Pays-de-la-Loire, DIREN Pays-de-la-Loire and Angers Loire Métropole.

References

- [1] W.L. Brown, E.O. Wilson, Character displacement, *Syst. Zool.* 5 (1956) 49–65.
- [2] J.A. Coyne, H.A. Orr, *Speciation*, Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2004.
- [3] R.K. Butlin, Speciation by reinforcement, *Trends Ecol. Evol.* 2 (1987) 8–13.
- [4] G.P. Sætre, T. Moum, S. Bureš, M. Král, M. Adamjan, J. Moreno, A sexually selected character displacement in flycatchers reinforces premating isolation, *Nature* 387 (1997) 589–592.
- [5] D.R. Uit De Weerd, D.S.J. Groenenberg, M. Schilthuisen, E. Gittenberger, Reproductive character displacement by inversion of coiling in clausiliid snails (*Gastropoda, Pulmonata*), *Biol. J. Lin. Soc.* 88 (2006) 155–164.
- [6] G. Höbel, H.C. Gerhardt, Reproductive character displacement in the acoustic communication system of green tree frogs (*Hyla cinerea*), *Evolution* 57 (2003) 894–904.
- [7] J.S. McElfresh, J.G. Millar, Geographic variation in sex pheromone blend of *Hemileuca electra* from southern California, *J. Chem. Ecol.* 25 (1999) 2505–2525.
- [8] C. Smadja, G. Ganem, Asymmetrical reproductive character displacement in the house mouse, *J. Evol. Biol.* 18 (2005) 1485–1493.
- [9] J.L. Marshall, M.L. Arnold, D.J. Howard, Reinforcement: The road not taken, *Trends Ecol. Evol.* 17 (2002) 558–563.

- [10] A.Y.K. Albert, D. Schluter, Reproductive character displacement of male stickleback mate preference: Reinforcement or direct selection? *Evolution* 58 (2004) 1099–1107.
- [11] C.R. Gabor, M.J. Ryan, D.C. Morizot, Character displacement in sailfin mollies, *Poecilia latipinna*: Allozymes and behavior, *Env. Biol. Fish.* 73 (2005) 75–88.
- [12] M.R. Kronforst, L.G. Young, L.E. Gilbert, Reinforcement of mate preference among hybridizing *Heliconius* butterflies, *J. Evol. Biol.* 20 (2007) 278–285.
- [13] M.A. Peterson, B.M. Honchak, S.E. Locke, T.E. Beeman, J. Mendoza, J. Green, K.J. Buckingham, M.A. White, K.J. Monsen, Relative abundance and the species-specific reinforcement of male mating preference in the *Chrysochus* (Coleoptera: Chrysomelidae) hybrid zone, *Evolution* 59 (2005) 2639–2655.
- [14] R. Shine, B. Phillips, H. Wayne, M. Lemaster, R.T. Mason, Species-isolating mechanisms in a mating system with male mate choice (garter snakes, *Thamnophis* spp.), *Can. J. Zool.* 82 (2004) 1091–1098.
- [15] J.W.E. Cooper, L.J. Vitt, Conspecific odor detection by the male broad-headed skink, *Eumeces laticeps*: effects of sex and site of odor source and of male reproductive condition, *J. Exp. Zool.* 230 (1984) 199–209.
- [16] A. Marco, J.M. Kiesecker, D.P. Chivers, A.R. Blaustein, Sex recognition and mate choice by male western toads, *Bufo boreas*, *Anim. Behav.* 55 (1998) 1631–1635.
- [17] P.A. Verrell, Male discrimination of larger, more fecund females in the smooth newt, *Triturus vulgaris*, *J. Herp.* 20 (1986) 416–422.
- [18] P.A. Verrell, Males choose larger females as mates in the salamander *Desmognathus santeelah*, *Ethology* 99 (1995) 162–171.
- [19] M.J. Smith, W. Osborne, D. Hunter, Geographic variation in the advertisement call structure of *Litoria verreauxii* (Anura: Hylidae), *Copeia* (2003) 750–758.
- [20] J.J. Loftus-Hills, M.J. Littlejohn, Reinforcement and reproductive character displacement in *Gastrophryne carolinensis* and *G. olivacea* (Anura: Microhylidae): a reexamination, *Evolution* 46 (1992) 896–906.
- [21] R. Márquez, J. Bosch, Male advertisement call and female preference in sympatric and allopatric midwife toads, *Anim. Behav.* 54 (1997) 1333–1345.
- [22] W. Babik, J.M. Szymura, J. Rafinski, Nuclear markers, mitochondrial DNA and male secondary sexual traits variation in a newt hybrid zone (*Triturus vulgaris* × *T. montandoni*), *Mol. Ecol.* 12 (2003) 1913–1930.
- [23] J.W. Arntzen, L. Hedlund, Fecundity of the newts *Triturus cristatus*, *T. marmoratus* and their natural hybrids in relation to species coexistence, *Holarct. Ecol.* 13 (1990) 325–332.
- [24] R.A. Griffiths, J.M. Roberts, S. Sims, A natural hybrid newt, *Triturus helveticus* × *T. vulgaris*, from a pond in mid-Wales, *J. Zool. Lond.* 213 (1987) 133–140.
- [25] M. Schlüpmann, G. Weber, E. Lipscher, M. Veith, Nachweis eines freilandbastardes von Teichmolch (*Triturus vulgaris*) und Fadenmolch (*Triturus helveticus*), *Zeitschr. Feldherp.* 6 (1999) 203–217.
- [26] J. Arntzen, P.D. Wijer, R. Jehle, E. Smit, J. Smit, Rare hybridization and introgression in smooth and palmate newts (Salamandridae: *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*), *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 36 (1998) 111–122.
- [27] T.J.C. Beebee, G. Rowe, J.W. Arntzen, Identification of newts (*Triturus* sp.) and their hybrids using molecular methods, *J. Zool. Lond.* 249 (1999) 43–47.
- [28] R. Duguet, F. Melki, Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg, Collection Parthénope, Mèze, 2003.
- [29] R.A. Griffiths, Microhabitat and seasonal niche dynamics of smooth and palmate newts, *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*, at a pond in mid-Wales, *J. An. Ecol.* 56 (1987) 441–451.
- [30] M. Denoël, G.F. Ficetola, Conservation of newt guilds in an agricultural landscape of Belgium: The importance of aquatic and terrestrial habitats, *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosys.* 18 (2008) 714–728.
- [31] E.A. Chadwick, F.M. Slater, S.J. Ormerod, Inter- and intraspecific differences in climatically mediated phenological change in coexisting *Triturus* species, *Glob. Change Biol.* 12 (2006) 1069–1078.
- [32] R.A. Griffiths, V.J. Mylotte, Observations on the development of the secondary sexual characters of male newts, *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*, *J. Herp.* 22 (1988) 476–480.
- [33] H. Spurway, H.G. Callan, The vigour and male sterility of hybrids between the species *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*, *J. Genetics* 57 (1960) 84–118.
- [34] D. Cogălniceanu, Experimental hybridation within the *Triturus vulgaris* species-group (Amphibia, Caudata), *Rev. Roum. Biol.* 39 (1994) 145–150.
- [35] W. Haerty, E. Gentilhomme, J. Secondi, Female preference for a male sexual trait uncorrelated with male body size in the Palmate newt (*Triturus helveticus*), *Behaviour* 144 (2007) 797–814.
- [36] C.R. Gabor, T.R. Halliday, Sequential mate choice by multiply mating smooth newts: Females become more choosy, *Behav. Ecol.* 8 (1997) 162–166.
- [37] R.D. Howard, R.S. Moorman, H.H. Whiteman, Differential effects of mate competition and mate choice on eastern tiger salamanders, *Anim. Behav.* 53 (1997) 1345–1356.
- [38] L. Hedlund, Factors affecting differential mating success in male crested newts, *Triturus cristatus*, *J. Zool.* 220 (1990) 33–40.
- [39] T. Halliday, The courtship of European newts: an evolutionary perspective, in: D.H. Taylor, S.I. Guttman (Eds.), *The Reproductive Biology of Amphibians*, Plenum Press, New York, 1977.
- [40] T.W.J. Garner, B.R. Schmidt, Relatedness, body size and paternity in the alpine newt, *Triturus alpestris*, *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 270 (2003) 619–624.
- [41] A. Osikowski, J. Rafinski, Multiple insemination increases reproductive success of female Montandon's newt (*Triturus montandoni*, Caudata, Salamandridae), *Behav. Ecol. Sociobiol.* 49 (2001) 145–149.
- [42] P.E.A. Hoeck, T.W.J. Garner, Female alpine newts (*Triturus alpestris*) mate initially with males signalling fertility benefits, *Biol. J. Lin. Soc.* 91 (2007) 483–491.
- [43] E.E. Goldberg, R. Lande, Ecological and reproductive character displacement on an environmental gradient, *Evolution* 60 (2006) 1344–1357.
- [44] J. Secondi, A. Aumjaud, O. Pays, S. Boyer, D. Montebault, D. Violleau, Water turbidity affects the development of sexual morphology in the palmate newt, *Ethology* 113 (2007) 711–720.
- [45] P. Joly, C. Miaud, A. Lehmann, O. Grolet, Habitat matrix effects on pond occupancy in Newts, *Cons. Biol.* 15 (2001) 239–248.
- [46] Anonymous, Cartorisque, 2007, <http://cartorisque.prim.net/>.
- [47] D.C. Adams, M.L. Collyer, Analysis of character divergence along environmental gradients and other covariates, *Evolution* 61 (2007) 510–515.
- [48] Copyright, The R Foundation for Statistical Computing, 2007.
- [49] R.A. Griffiths, *Newts and Salamanders of Europe*, T & AD Poyser Natural History, Cambridge, 1996.
- [50] T.J.C. Beebee, Habitat selection by amphibians across an agricultural land-heathland transect in Britain (*Triturus helveticus/vulgaris*), *Biol. Cons.* 27 (1983) 111–124.

- [51] P. Marty, S. Angélibert, N. Giani, P. Joly, Directionality of pre- and post-breeding migrations of a marbled newt population (*Triturus marmoratus*): Implications for buffer zone management, *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosys.* 15 (2005) 215–225.
- [52] M.S. Blouin, S.T. Brown, Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis, *Oecologia* 125 (2000) 358–361.
- [53] D. Alvarez, A.G. Nicieza, Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis, *Funct. Ecol.* 16 (2002) 640–648.
- [54] C.D. Camp, J.L. Marshall, R.M. Austin Jr., The evolution of adult body size in black-bellied salamanders (*Desmognathus quadramaculatus* complex), *Can. J. Zool.* 78 (2000) 1712–1722.
- [55] D. Hongve, Production of dissolved organic carbon in forested catchments, *J. Hydrol.* 224 (1999) 91–99.
- [56] R.A. Griffiths, Feeding niche overlap and food selection in smooth and palmate newts, *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*, at a pond in mid-Wales, *J. An. Ecol.* 55 (1986) 201–214.
- [57] P. Joly, C. Giacoma, Limitation of similarity and feeding habits in three syntopic species of newts (*Triturus*, Amphibia), *Ecography* 15 (1992) 401–411.
- [58] M. Benazzi, Sulla ibridazione fra *Triturus helveticus* e *Tr. vulgaris*, undated.
- [59] J.M. Roberts, Reproductive isolation in Smooth and Palmate newts (*Triturus vulgaris* and *T. helveticus*), PhD Thesis, Open University, Milton Keynes, 1990.
- [60] P. Wambreuse, V.L. Bels, Analyse de la parade sexuelle de *Triturus helveticus* (Urodela, Salamandridae), *Bull. Soc. Herp. Fr.* 36 (1985) 51–52.
- [61] P. Joly, C. Miaud, Fidelity to the breeding site in the alpine newt *Triturus alpestris*, *Behav. Proc.* 19 (1989) 47–56.
- [62] R.A. Newman, T. Squire, Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*), *Mol. Ecol.* 10 (2001) 1087–1100.
- [63] L.W. Andersen, K. Fog, C. Damgaard, Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*), *Proc. R. Soc. Lond. B* 271 (2004) 1293–1302.
- [64] G. Rowe, T.J.C. Beebee, T. Burke, A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, metapopulations, *Oikos* 88 (2000) 641–651.
- [65] T. Lenormand, Gene flow and the limits to natural selection, *Trends Ecol. Evol.* 17 (2002) 183–189.
- [66] J.B.S. Haldane, The theory of a cline, *J. Genetics* 48 (1948) 277–284.
- [67] I. Gomez-Mestre, M. Tejedo, Local adaptation of an anuran amphibian to osmotically stressful environments, *Evolution* 57 (2003) 1889–1899.
- [68] J.U. Palo, R.B. O'Hara, A.T. Laugen, A. Laurila, C.R. Primmer, J. Merilä, Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection: evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data, *Mol. Ecol.* 12 (2003) 1963–1978.
- [69] G.F. Ficetola, F.D. Bernardi, Supplementation or in situ conservation? Evidence of local adaptation in the Italian agile frog *Rana latastei* and consequences for the management of populations, *Anim. Cons.* 8 (2005) 33–40.
- [70] A. Bonin, P. Taberlet, C. Miaud, F. Pompanon, Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*), *Mol. Biol. Evol.* 23 (2006) 773–783.
- [71] J.C. Trexler, Hierarchical organization of genetic variation in the Sailfin Molly, *Poecilia latipinna* (Pisces: Poeciliidae), *Evolution* 42 (1988) 1006–1017.

ARTICLE 4

**ASYMMETRIC SEX AND SPECIES RECOGNITION IN NEWTS, IMPLICATIONS FOR THE
HYBRIDIZATION PROCESS IN A BROAD CONTACT ZONE**

Jean Secondi, Aurélie Johanet, Olivier Pays, Florian Cazimajou,
Zohra Djalout & Christophe Lemaire

Soumis à Ethology

ARTICLE 4 – ASYMETRIC SEX AND SPECIES RECOGNITION IN NEWTS, IMPLICATIONS FOR THE HYBRIDIZATION PROCESS IN A BROAD CONTACT ZONE.

Dans les zones de contact bimodales, les mécanismes d'isolement prézygotiques sont supposés plus efficaces que les mécanismes postzygotiques (Jiggins & Mallet 2000). Toutefois, la reconnaissance spécifique peut être basée sur plusieurs modalités sensorielles. Les individus ne sont pas nécessairement aussi efficaces pour chacun de ces canaux de communication. Des asymétries entre espèces ou entre sexes peuvent exister (Wirtz 1999). En outre, des perturbations environnementales, d'origine naturelle ou non, peuvent altérer les conditions de transmission de l'un ou l'autre des canaux. Il est donc nécessaire de déterminer les capacités de reconnaissance des deux espèces et des deux sexes pour quantifier ces asymétries mais aussi pour déterminer quelles altérations des conditions de transmission sont susceptibles d'augmenter le risque d'hybridation.

Nous avons étudié l'efficacité de la reconnaissance spécifique entre tritons palmés et ponctués, dont les habitats aquatiques sont fréquemment perturbés par divers processus naturels. Nous avons testé la reconnaissance spécifique sur critères visuel et chimique des femelles et mâles des deux espèces. Chaque individu a été présenté à un individu conspécifique et un individu hétérospécifique dans un dispositif expérimental de choix en Y. Parce que la zone de sympatrie est large et que la syntopie est fréquente, nous nous attendions à ce que la reconnaissance spécifique soit efficace pour chacun des canaux de communication. Les résultats ont confirmé nos hypothèses pour les mâles de tritons palmés et les femelles de ponctués mais pas pour les femelles palmés et les mâles ponctués pour lesquels la reconnaissance chimique et /ou visuelle n'était pas systématique (figure III.3). Cela suggère fortement que la probabilité d'hybridation dépend des conditions de transmission du signal. En outre, une seule variable morphométrique influençait la préférence des femelles : la taille des mâles. Les facteurs écologiques modulant les différences interspécifiques de taille des mâles influenceraient la probabilité d'accouplements interspécifiques. Cette étude met en évidence l'importance des facteurs environnementaux influençant la communication dans les processus d'hybridation, même chez les espèces animales possédant des temps de divergence importants et partageant souvent les mêmes sites de reproduction sur une large aire sympatrique.

		femelle t. palmé	
		visuel	chimique
male t. ponctué	visuel	N/Y	-
	chimique	-	N/N

		femelle t. ponctué	
		visuel	chimique
male t. palmé	visuel	Y/Y	-
	chimique	-	Y/Y

Figure III.3 Matrice représentant l'efficacité de la reconnaissance spécifique chez mâles et femelles de tritons palmés et ponctués basée sur des stimuli visuels ou chimiques. Dans chaque cellule, « Y » indique une préférence significative pour le conspécifique pour l'une ou l'autre des modalités mesurées chez les mâles (caractère de gauche) et les femelles (caractère de droite). « N » indique que la préférence pour le conspécifique n'a pas été détectée sur l'une des deux modalités de communication. Ces tables reflètent la faible efficacité de la reconnaissance spécifique dans les paires mâle ponctué x femelle palmé. Une probabilité d'hybridation est attendue plus élevée que pour la paire réciproque mâle palmé x femelle ponctué.

Cet article fait l'objet d'une resoumission dans le journal "Ethology".

Asymmetric sex and species recognition in newts, implications for the hybridization process in a broad contact zone

Secondi J.¹, Johanet A.^{1,2}, Pays O.¹, Cazimajou F.¹, Djalout Z.¹, Lemaire C.^{1,2}

¹LEESA, University of Angers, 2 bd Lavoisier, 49045 Angers cedex, France.

² UMR Pavé, 42, rue Georges Morel, BP 57 49071 Beaucouzé CEDEX.

Corresponding author: Jean Secondi

e-mail: jean.secondi@univ-angers.fr

tel: +33 / 241735030

fax: +33 / 241735352

Running title: Asymmetric species recognition in newts

Abstract word count : 264

ABSTRACT

Species recognition is a crucial mechanism that determines mating patterns between hybridizing taxa. To achieve efficient recognition, animals can resort to various information displayed by potential mates. The Backup hypothesis assumes that signals from different channels carry the same information about the sender. Such a design may be optimal when transmission conditions are variable or signals subject to wear. We tested the Backup hypothesis in two newt species *Lissotriton helveticus* and *L. vulgaris* known. These newts hybridize occasionally and breed in aquatic habitats frequently disturbed by various natural processes. We measured visual and olfactory species recognition in males and females of the two species. Because the sympatric zone is broad and syntopy common, we expected efficient recognition to occur for each sensory channel. Data supported our expectation for *helveticus* males and *vulgaris* females, but not for *helveticus* females and *vulgaris* males for which olfactory recognition was not detected. In addition, one single variable, body size, influenced female preference. The Backup hypothesis is thus only partially supported. The relatively low efficiency of olfactory recognition of female *helveticus* and male *vulgaris* strongly suggest that, even if individuals perform better at species recognition when both olfactory and visual signals are available, hybridization frequency depends on the conditions of transmission of visual signals. In addition, data revealed that ecological factors modulating interspecific difference in male body size may influence the probability of mismating. This study highlights the need to consider more largely environmental factors affecting communication in the hybridization process, even in animal species with a long divergence time and commonly co-occurring in syntopy over a broad area.

KEYWORDS: reproductive isolation, hybridization, multimodal communication, vision, olfaction, *Triturus*

INTRODUCTION

Species recognition is a major component of reproductive isolation in animals where mate choice occurs. This pre-zygotic mechanism determines the frequency of mixed pairs or mating attempts with heterospecifics, but also hybrid frequency when hybrids are viable (Butlin 1987, Liou & Price 1994, Seehausen et al. 1997). For this reason, information transfer and recognition of information about species identity are crucial steps for individual decisions that may have consequences at the population level.

Animal communication studies have shown that many species simultaneously use different sensory channels to ensure information is transferred to receivers (Bradbury & Verhencamp 1998, Badayev et al. 2002, Partan & Marler 2005). The relying of individuals on several channels may have different reasons. The Backup hypothesis assumes that cues from different channels may convey the same information so that redundancy precludes masking by environmental noise of one channel and increases the probability of successful perception by the receiver (Johnstone 1996, Partan & Marler 1999, 2005). Alternatively, signals may carry non redundant information about the sender or help to modulate other signals so that the amount of information transmitted is increased (Johnstone 1996, Partan & Marler 1999, Ay et al. 2007). There is now evidence of the existence of multimodal signalling in various communication contexts such as the recognition of aposematic preys by predators (Ratcliffe & Nydam 2008), or the detection of profitable food sources in nectar feeding animals (Kulahci et al. 2008). Likewise, sexual communication is often based on the assessment of multiple cues that can be expressed on different sensory channels (Hebets & Uetz 1999, Partan & Marler 1999, McLennan 2003, Taylor et al. 2007).

Species recognition is a sensory process based on the discrimination of signals and cues presented by conspecific and heterospecific individuals. Resorting to different sensory channels may prove an efficient strategy to reduce the probability of mismating (Baker & Baker Miller 1990) whenever signal degradation is high and/or different modalities are subjected to different degradation processes in different habitats. In this regard, freshwater species may incur strong constraint on communication processes because of spatial and temporal variations in the properties of the transmission medium. Visual signals depend on the spectrum of available light, that is a combination of the light spectrum transmitted from the surrounding terrestrial habitat, and the spectrum resulting from optical water characteristics like colour or turbidity (Endler 1990, 1991). Similarly, transmission and

reception of olfactory signals depend on chemical water characteristics like pH or humic acid content (Hubbard et al. 2002, Fisher et al. 2006, Heuschele et al. 2007). Visual and olfactory parameters can change over time (Candolin 2007) within a habitats but they can also vary in space (Endler & Théry 1994, Secondi et al. 2007). Thus, environmental conditions may strongly affect the assessment of cues from one or several sensory modality in aquatic habitats. Which sensory channels are used and how the communication process is affected by the variation of transmission properties may largely determines mating patterns and eventually conditions the hybridization process (Seehausen et al. 1997).

We investigated the sensory bases of specific recognition between the Palmate newt *Lissotriton helveticus* and the Smooth newt *L. vulgaris*, two species known to hybridize occasionally. Their sympatric zone is broad and syntopy common (Nöllert & Nöllert 2003). Yet, both species maintain their integrity (Arntzen et al. 1998). Hybrid viability has been demonstrated by experimental crossings (Spurway and Callan 1960) and few field observations (Griffiths et al. 1987, Schlüppman et al. 1999), as well by introgression studies (Arntzen et al. 1998, Johanet A. unpublished data). Hybrids are viable but their fitness relative to both parental forms is unknown (Spurway & Callan 1960). An earlier study suggested that visual and olfactory species recognition may not be strong between the two newts species (Roberts 1990), which is inconsistent with the low hybridization rate observed (Arntzen et al. 1998).

Olfactory communication is used during the mating process in this group (Cogalcieneanu 1994, Secondi et al. 2009) and sex pheromones have been recently identified in *L. vulgaris* (Osikowski et al. 2008). Visual communication is used too. Males of the two species produce an elaborate courtship display that differ for a few details only, like the frequency of fanning that is a rapid wave movement of the tail tip (Halliday 1977, Roberts 1990,). Males can also be identified by a suite of conspicuous secondary sexual traits that differ markedly between species (Halliday 1975, Griffiths 1996). *Helveticus* males display a caudal filament, a smooth caudal crest and hindfoot web whereas *vulgaris* males express a denticulate dorsal and caudal crest, narrow skin extensions on hindfoot toes and no caudal filament. Head, ventral and tail colour patterns are different, *vulgaris* being overall more colourful and contrasting (Griffiths 1996). Females are much more similar than males but they can be identified by several characters like a short caudal filament in *helveticus*, a pointed tail tip and a marbled throat in *vulgaris*.

In the present study, we tested the Backup hypothesis for olfactory and visual signals in species recognition between *vulgaris* and *helveticus*. We carried out preference experiments where information of only one communication channel was available at a time. We chose to test the sensory basis of specific recognition in sympatry because reproductive barriers are often strengthened in areas where species co-occur (Brown 1956, Butlin 1987). We investigated response of both sexes in order to determine whether one crossing type is more likely than the other and assess which type of environmental disturbance, by its action on one particular channel, may increase hybridization risk. Considering both sexes is important in newts. Females have an exclusive control over fertilization (Halliday 1990) so that their ability to perform correct species recognition will determine hybridization rate. However, male are expected to show species recognition too because courtship is time and energy consuming (movements, spermatophore production), and make male more conspicuous for predators. Finally, sperm production in some urodeles, Like *L. vulgaris*, is limiting during the breeding season (Verrell et al. 1986, Takahashi & Parris 2009). All these elements suggest that mating attempts with heterospecific females are costly for males.

We additionally tested whether traits used intraspecifically for mate assessment would influence the outcome of specific recognition (Ryan & Rand 1993). A reduced difference for such traits between conspecific and heterospecific mates is expected to increase the probability of mispairing (Pfennig 1998). Body length is often assessed in Vertebrates. This trait often reflects fecundity in female amphibians (Verrell 1986a, b) and survival, competitive ability, or dominance in males (Friedl & Klump 1997, Mathis & Britzke 1999). The effect of body size on female preference is more controversial in Urodeles than in Anurans (Halliday & Verrell 1986). However, it is subjected to female assessment in *helveticus*. In a previous two-choice experiment we showed that females preferred the smaller male (Haerty et al. 2007). We thus tested the effects of a visual trait, body size, on male and female preference. However, predictions differ for the two sexes. *Vulgaris* is larger than *helveticus*. Thus, we expected female preference for conspecific male to increase as the size difference between conspecific and heterospecific stimulus males, i.e. preference of *helveticus* females should increase as the conspecific male becomes smaller relatively to heterospecific male. In contrast, male preference is expected to be positively correlated with female body size regardless of female species identity.

METHODS

Sampling and housing conditions

We captured 64 Palmate newts and Smooth newts, 16 of each sex and species, on 29/03/2007 for female preference tests and 72 breeding Smooth and Palmate newts, 18 of each sex and each species, on 03/04/2008 for male preference tests. All individuals originated from the same syntopic site, a long pond surrounded by meadows and periodically connected to the Loire River during flood events, located in western France near the village of Liré (Maine-et-Loire, 1°09'57"W, 47°20'32"N).

In 2007, males and females were kept indoor in pairs of the same sex and the same species. They were housed in plastic tanks (length 51.5 cm × width 34 cm × height 32.5 cm) at 18°C, filled up with 4 litres of aged tap water. We added two semi-circular sections of PVC tube that provided a shelter for each individual and water plants (*Elodea* sp). Light was provided by standard fluorescent tubes that we partially covered with plastic sheets in order to dim light. Individuals were fed daily with chironomid larvae. At the end of the experiments all newts were released in their pond. In 2008, all individuals were housed singly in indoor aquaria at a room temperature of 15°C. Females were housed in plastic tanks (length 51.5 cm × width 34 cm × height 32.5 cm), filled up with 8 litres of aged tap water whereas males were housed in aquaria (length 33 cm × width 17.5 cm × height 25 cm) filled up with 3 L of aged tap water.

As a part of a larger research program we surveyed syntopic and allotopic sites in the study area. We show here measurements for 141 males, 89 *T. helveticus* and 52 *T. vulgaris* in 7 syntopic ponds caught between March and May in 2006 and 2007. Individuals have been caught and kept in captivity according to permits delivered by Préfecture de Maine-et-Loire and Loire-Atlantique.

Species assignment and morphological interspecific difference in syntopic sites

All individuals selected for this experiment exhibited characteristics of the species they were assigned to. Males displayed typical secondary sexual traits (crest shape and position and hind foot webbing, presence/absence caudal filament, colour pattern) and females presented the usual criteria (tail and head shape, colour pattern). Females are much more similar than males and thus may be more difficult to identify. We thus additionally recorded body length, tail

height, and cloaca in all females. These three traits differ between species (A. Johanet unpublished data). Methodological details for measurements are given elsewhere (Secondi et al. 2007). We used Discriminant Function Analysis to test the robustness of species assignment.

We analysed spatial variation in morphological differentiation between the two species in the 7 syntopic ponds sampled in this study. We focused our analysis on body length as behavioural experiments showed this trait modulated female response to heterospecific males. We tested interspecific difference in body length using Mann-Whitney test because of low sample sizes in some sites

Chemical and visual species recognition

Experimental design

We tested sexual preference for conspecific visual and chemical stimuli in two test series. Males and female preferences were measured in two separate experiments using the same protocol as described below. We used a linear olfactometer with three compartments, a neutral zone on the distal end of the apparatus and two preference zones on its proximal end (figure 1). The whole apparatus was 15 cm high. The water depth was 4 cm high and a pump kept water flowing at 0.27 L.min⁻¹. For all experiments, we used aged tap water. Subjects could move freely between the neutral and both preference zones. Pairs of stimuli were made randomly by selecting one *helveticus* and one *vulgaris* individual. Each stimulus individual has been used with one pair only

Before starting tests, we habituated subjects to experimental conditions the day before the first test by leaving them in the apparatus for at least 30 minutes without any individual stimulus. During a test, subjects were placed on the distal end of the neutral zone where they were kept for 5 minutes in a mesh cage that allowed them to see or smell both stimuli. After that period, the cage was lifted. For the next 15 minutes, we recorded the time spent in and the latency to enter each preference zone. At the end of that period, the subject was driven back to the cage. The whole apparatus was drained and rinsed and wiped in order to remove chemical cues. Such an operation is unnecessary for visual tests but we carried it out nonetheless for comparison purpose between the two test series. Stimuli position was swapped between the two periods. Once the olfactometer was refilled with water, we started the second period following the same procedure. We checked sexual behaviours during visual tests because they

could bias response but none were observed. The same stimulus individuals was used for a given subject for both the visual test and the chemical tests. In addition, each stimulus pair was tested with one subject of each species. Mean size difference in body length (*vulgaris* – *helveticus*) was $2.01 \text{ mm} \pm 2.83 \text{ mm}$ (min=-4.04; max=6.61) for male pairs and $1.18 \text{ mm} \pm 0.77 \text{ mm}$ for female pairs (min=-0.77, max=3.50 mm). Because of the overall size difference between the two species, the distribution of size contrasts between stimulus pairs was not centred on zero.

For visual tests, each stimulus individual was kept in a transparent plastic box (18 cm length x 12 cm width x 7.5 cm height) in one of the stimulus zones. Black plastic plates ensured that stimulus individuals could not see each other, that subjects had visual contact with only one stimulus once they entered a preference zone, and that they had no access to chemical information. Within a preference zone, water could flow underneath and along the sides of the box. No water exchange between preference zones was possible. The water level inside the box was the same as in the rest of the apparatus. We used a 25 W light tube spanning the range of daylight spectrum (98 CRI, 6700 K, Repti Glo 2.0). Because direct light can disturb newt motor behaviour, we shaded the neutral and preference zones by covering them with a black plastic plate. We also placed the olfactometer in a chamber with black walls so that no spatial cues could alter the subjects response. An observation window on the distal end of the apparatus allowed to record behaviour.

For chemical tests, we used the same apparatus and the same box model as for visual tests. However, a different set of boxes was used. We allowed water to circulate through the boxes so that chemical cues emitted by the stimulus males were conveyed to the preference and neutral zones. We covered box fronts with black shutters so that subjects had no access to visual cues. All other conditions for visual and chemical tests were similar between the two test series. Each subject was tested in each experiment on two different days. The presentation order of experiments (visual or chemical stimuli) was alternated between subjects.

Statistical analyses

We carried out two distinct analyses to investigate the following questions. (i) Can we detect visual and olfactory specific recognition in males and females? (ii) What factors affect the efficiency of species recognition? Both questions could not be tested using a single statistical procedure. Thus, we first tested female preference for conspecific olfactory and visual stimuli

using Wilcoxon signed-rank tests and STATISTICA 7.1 (Statsoft, Inc.) as the objective was to determine whether subjects preferentially associated with the one stimulus type. Non parametric tests were selected because some variables significantly departed from normality.

Second, we tested whether species identity (*helveticus/vulgaris*) sex and body length affected the strength of female visual and chemical preference for conspecific stimulus using mixed linear models. We considered as response variables the score difference in mean time spent and the difference in mean latency to enter each preference zone between the conspecific and heterospecific stimulus. Differences in responses will be referred to hereafter as contrasts. Contrary to raw variables, contrasts were normally distributed. We considered the difference in body length between the two stimulus males as a covariate. We did not consider other morphological traits as covariates in our models as their biological meaning was less clear. Besides body length is usually correlated with most morphological traits. For a given subject, the same pair of stimuli was used for the chemical and the visual test. Each stimulus pair has also been tested with one subject of each species. Thus, we considered stimulus pair as a random factor in our analyses. For this reason, we decided upon testing visual and chemical preference in two different procedures in order to avoid the crossing of random effects. We also tested sexes separately because predictions about the relationships between size and preference differed for males and females. For selecting the minimal model, we used a backwards selection procedure by removing the effect with the highest p-value and testing the resulting loss in loglikelihood. Analyses have been carried out using R (R Development Core Team 2004). Because predictions about male and female preference regarding body size are different, analyses were carried out independently for each sex.

RESULTS

Species assignment

Experimental males showed all the typical sexual ornaments of one species or the other so that we assigned them unambiguously to one taxon. We additionally tested the robustness of species assignment for females using a discriminant function analysis based on the three morphological traits. We observed a highly significant difference between female types used as subjects in 2007 (Lambda Wilk: 0.463, $F_{\text{approx } 3, 28} = 10.784$, $p < 0.0001$). The classification

matrix confirmed the separation between the species as all individuals but two *helveticus* and 3 *vulgaris*, were correctly assigned to the right species (84.37% correct assignments). Species discrimination was better in stimulus females tested in 2008 (Lambda Wilk: 0.253, $F_{\text{approx } 3, 32} = 31.543$, $p < 0.0001$) as two *vulgaris* females were classified as *helveticus* (94.44% correct assignments). All individuals assigned to the other species by discriminant analysis exhibited traits typical of the species they were visually assigned to, like body colour pattern and shape, that we did not consider in the discriminant analysis. We are thus confident that we tested non hybrid, or only slightly introgressed individuals.

Chemical and visual species recognition

Visual tests

We observed a significant female preference for conspecific over heterospecific visual stimuli in both newt species (figure 2). Females spent significantly more time close to the conspecific male (*helveticus*: 13/16 females, $Z=2.844$, $p=0.004$; *vulgaris*: 15/16 females, $Z=3.361$, $p=0.001$). They also entered earlier in its compartment (*helveticus*: 12/16 females, $Z=2.379$, $p=0.017$; *vulgaris*: 13/16 females, $Z=3.206$, $p<0.001$).

Results on male preference were more complex. *Helveticus* males spent more time close to conspecific females (15/18 males, $Z=2.154$, $p=0.031$) but they did not approach significantly faster (13/18 males, $Z=1.681$, $p=0.093$). *Vulgaris* males did not express preference for conspecific females (time spent: 11/18 males $Z=0.806$, $p=0.420$; 10/18 males, latency: $Z=0.152$, $p=0.879$).

We carried out a backwards model selection procedure on the two response variables, i.e. contrasts for time spent and latency. The maximal model included as explanatory variables species, body length contrast and the interaction. For males, no minimal model was selected (Figure 3). In females, the maximal model was selected for latency. We detected significant effects of body size contrast ($p=0.005$) and the interaction between body size contrast and species ($p=0.0009$) (Table 1). The procedure retained no minimal model for time spent but the overall female response pattern was similar for this variable (Figure 4). This result is explained by the response of *helveticus* and *vulgaris* to the size contrast between the two stimuli. Conspecific preference increased with increasing body size contrast (*helveticus-vulgaris*) in both species (Figures 5). It results that conspecific preference faded as the normal size ratio got smaller. It was even reversed when the size ratio was inverted (figure 4).

Chemical tests

Vulgaris females showed a significant preference for conspecific males, both in time spent and latency (time spent: 13/16 females, $Z=2.198$, $p=0.028$; latency: 12/16 females, $Z=2.327$, $p=0.020$) whereas males did not show any preference for conspecific females (time spent: 8/18 males, $Z=0.327$, $p=0.744$; latency: 10/18 males, $Z=0.152$, $p=0.879$) (figure 2).

In contrast, *helveticus* females did not significantly prefer conspecific males (time spent: 10/16 females, $Z=1.758$, $p=0.079$; latency: 7/16 females, $Z=0.879$, $p=0.379$) but males spent more time close to conspecific females (time spent: 15/18 females, $Z=2.199$, $p=0.028$). Latency was not shorter though (latency: 12/18 females, $Z=0.893$, $p=0.372$).

Interspecific morphological difference in syntopic sites

Figure 5 shows the difference in mean body length between *vulgaris* and *helveticus* males from 7 syntopic sites. Although mean body length difference between the two species was significant for all sites, it greatly varied between syntopic sites, from 2.118 mm to 8.624 mm (Mean 5.80 mm, $sd=2.00$ mm). The size ratio (*helveticus/vulgaris*) varied from 0.78 to 0.94 (Mean 0.84, $sd=0.05$). If males *vulgaris* were in average larger at all sites, overlap in body size was observed at one breeding site.

DISCUSSION

Syntopy between the two newt species is common and breeding periods extensively overlap (Griffiths 1996, Nöllert and Nöllert 1993). In addition, divergence time is relatively long (Steinfartz et al. 2007) and hybridization so far considered as occasional. One would thus expect strong pre-mating isolation caused by efficient species recognition mechanisms in the two species. The observation of repeated courtship towards heterospecific females in the lab (Roberts 1990, Secondi unpublished data) and the detection of hybrids in the wild (Arntzen et al. 1998) challenged this assumption. Behavioural tests may explain why reproductive isolation between these two species can fail.

Species recognition and the Backup hypothesis

The efficiency of species recognition strikingly differed between sexes in *vulgaris*. Females showed strong visual and chemical species recognition as significant preferences were observed for the two behavioural variables measured. In contrast, males expressed no preference, either visual or olfactory. Even if the power of tests may be limited by relatively small sample sizes, hardly any trend can be observed in data. Males seemed unable to perform better than chance, at least when only cues from one single sensory channel was available. A different pattern was observed in *helveticus*. Females expressed specific recognition in visual tests but not in olfactory tests. Even if the difference of time spent close to each male was close to significance, olfactory recognition seemed weaker than visual recognition. In contrast, males did show visual and olfactory specific recognition. They spent more time close to the conspecific female in both tests. However, latency was not significantly shorter which suggests that recognition required close examination of females or that males usually assess all females in their vicinity. Such an explanation is not unlikely in species where male mating preference exists (Verrell 1986a).

Specific recognition is typically a mechanism where inputs from different sensory systems can be important. Resorting to different communication channels increases the probability of correct discrimination of conspecific and heterospecific individuals when transmission conditions are variable or signals are subject to wear. In *vulgaris* females and *helveticus* males, efficient species recognition occurred even when information from a single channel was available at a time. Thus, visual and olfactory cues alone provided enough information for a subject to express a preference for conspecific individuals. The Backup hypothesis is thus supported for these two groups where species recognition can occur even if signal transmission is disrupted on one channel. This is not true for the two other groups. *Helveticus* females did not compensate the loss of visual information and male *vulgaris* failed species recognition using one channel only. Such a result does not imply that errors systematically occur in nature. The combination of information from different channels may be necessary instead. In those two groups, visual and olfactory signals are thus not redundant. They probably carry each a part of the information required to achieve correct identification.

Factors modulating the efficiency of species recognition

Authors have frequently observed that one species, or one sex, performs better than the other at species recognition (Wirtz 1999, Randler 2002). Species or sex asymmetry in recognition ability generates skewed distributions of genotypes and phenotypes (if one crossing is more frequent than the other) and contribute to hybridization and introgression dynamics. Tests confirmed that encounters between males and females of the two species should generally result in the avoidance of heterospecific partners, which is consistent with the low hybridization rate observed in nature (Arntzen et al. 1998). However, we expect this general outcome to be modulated by the species composition of the potential pair and the relative difference in body size between males (Figure 6). *Helveticus* females showed visual recognition only and male *vulgaris* no evidence of discrimination at all. On the contrary, *helveticus* males and *vulgaris* females achieved both visual and olfactory discrimination. Accordingly, this crossing is less likely to occur than the reciprocal crossing. We explain more in detail below how environmental conditions can generate an asymmetric mating pattern.

Alternatively, one crossing type may be more frequent if individuals of one species prefer a trait expressed by the other species or if overlaps in distributions of traits under sexual selection occur (Parsons 1993). The species with the smaller trait is then more likely to seek matings with the species with the larger trait (Pfenning 1998). To this regard, tests revealed the large influence of a single variable, body length contrast, on the efficiency of visual species recognition in females. In both species, conspecific preference decreased with contrast in male body size. Such a drop in recognition efficiency was unexpected because males of the two species differ by the presence and shape of several conspicuous traits (hind foot web, caudal filament, caudal crest shape, colour) that all could be assessed. In spite of this wealth of phenotypic differences, male body size contrast seems to have a major effect on mating preference in both species.

Interestingly, females expressed divergent preferences for body size. *Helveticus* females preferred smaller males and *vulgaris* females larger males. Strictly speaking, our experiment is not a test of female preference for male size as we did not present selected pairs or series of conspecific males to each females but random pairs males of different species instead. Nevertheless, in both species the strength of female preference decreased with male body length contrast and shifted towards the heterospecific male when the relative size order was

reversed, i.e. the male of the normally smaller species was the larger stimulus male. The fact that *helveticus* females preferred the smaller male, unlike *vulgaris* females, is particularly striking as preference for smaller males is more an exception than a rule in sexual selection studies (but see Morrison et al. 2001, De Block & Stock 2006). Yet, the present results confirm earlier observations on *helveticus* from another breeding site (Haerty et al. 2007). Viewed in the context of hybridization, divergent mating preferences for body size make sense as this pattern is consistent with reproductive character displacement. Our data cannot demonstrate this hypothesis but the result is striking. Testing preference of females from distant allopatric sites may shed light on the evolutionary process underlying the divergence in mating preferences.

Environmental variation and hybridization risk

Like any communication process, the efficiency of species recognition is bound to depend on the conditions of signal transmission. In this respect, signal transmission occurs under less optimal visual and chemical conditions in breeding sites than in the laboratory. Habitat irradiance and water absorbance spectra depend on time, shading, aquatic vegetation, water colour and turbidity. The perception of colour patterns, and thus visual species recognition, is thus expected to be modulated by habitat visual characteristics. For chemical signals, transmission can be strongly altered by the presence of particular compounds common in natural environments (Hubbard et al. 2002, Fisher et al. 2006, Heuschele et al. 2007). Their concentration in breeding site is likely to modulate the efficiency of species recognition too. Female *helveticus* achieved efficient visual recognition but poorly discriminated chemical cues of conspecific and heterospecific males. During encounters where visual and olfactory cues are available, species recognition would probably occur and mainly rely on vision. However, visual conditions are not always optimal. Turbidity varies a lot between ponds (Secondi et al. 2007). Runoffs, aquifer surges and floods raise turbidity level in the water column especially during early spring when adults are breeding. Poor visual conditions may not affect the risk of hybridization between *vulgaris* females and *helveticus* males because they efficiently recognise conspecifics using chemical cues. However, according to our results hybridization risk is higher for the reciprocal crossing in which males and females perform poorly at olfactory recognition. It results that the quality of transmission conditions for visual signals may be a key factor in the hybridization process, probably more important than transmission conditions for chemical recognition. Increased hybridization rate as a result of

sudden changes in signalling conditions has been observed in cichlid fishes (Seehausen 1997). In this case, hybridization resulted from recent changes in human activities. This phenomenon may actually be more general and especially relevant to aquatic species breeding in habitats exposed to natural regimes of disturbance.

Ecological factors affect body size in amphibians (Morrison & Hero 2003), which trait is involved in the mate selection process (Verrell 1986a,b, Haerty et al. 2007). In our study area, interspecific difference in body size varied substantially between males of the two species. We could thus expect that hybridization rate depend on the local size distribution of males of the two species. Interestingly, terrestrial habitat may have an indirect effect on the hybridization risk as body size increases with the proportion of wooded area in 400 m buffers around ponds in *helveticus* (Johanet et al. 2009). We do not know if it has an effect on *vulgaris* males but landscape composition may influence the body size ratio in syntopic ponds.

The present study emphasizes the interplay between communication systems, environmental conditions affecting signal transmission, and species interactions. It highlights the fact that environmental factors could be major predictors of hybridization rate. Surprisingly, how environment affect the expression or perception of traits assessed for species recognition are questions that received relatively little attention. Understanding the relationships between proximal factors at the behavioural level and ultimate factors at the genome level is still a necessary step to get further insight into the speciation process. The integration of multimodal signalling theory in the study of hybridization and hybrid zone dynamics is to this regard a promising approach to refine predictions about the relationships between habitat, signal degradation and hybridization rate.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Stéphane Sourice and Viviane Hardouineau for their technical support. We are thankful to Hans Slabbekoorn and John Endler for their comments on early drafts of the manuscript.

REFERENCES

- Arntzen, J. W., de Wijer, P., Jehle, R., Smit, E. & Smit, J. 1998: Rare hybridization and introgression in Smooth and Palmate newts (*Salamandridae: Triturus vulgaris* and *T. helveticus*). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **36**, 111-122.
- Ay, N., Flack, J. & Krakauer, D.C. 2007: Robustness and complexity co-constructed in multimodal signalling networks. *Phil. Trans. R Soc. Lond. B* **362**, 441-447.
- Badayev, A.V. & Hill, G. E. 2002: Species divergence in sexually selected traits: increase in song elaboration is related to decrease in plumage ornamentation in finches. *Evolution* **56**, 412-419.
- Baker, M.C. & Baker Miller, A.E. 1990: Reproductive behavior of female buntings isolating mechanisms in a hybridizing pair of species. *Evolution* **44**, 332-338.
- Bradbury, J.N. & Verhencamp, S.C. 1998: Principles of animal communication. Sinauer, Sunderland, Massachussets.
- Brown, W.L. & Wilson, E.O. 1956: Character displacement, *Syst. Zool.* **5**, 49-65.
- Butlin, R.K. 1987: Speciation by reinforcement. *Trends Ecol. Evol.* **2**, 8-13.
- Candolin, U., Salesto, T. & Evers, M: 2007. Changed environmental conditions weaken sexual selection in sticklebacks. *J. Evol. Biol.* **20**, 233-239.
- Cogalniceanu, D. 1994: The relative importance of vision and olfaction in mate recognition in male newts (genus *Triturus*). *Herpetologica* **50**, 344-349.
- De Block, M. & Stock, R. 2006: Flight-related body morphology shapes mating success in a damselfly. *Anim. Behav.* **74**, 1093-1098.
- Endler, J. A. 1990: On the measurement and classification of colours in studies of animal colour patterns. *Biol. J. Linn. Soc.* **41**, 315-332.
- Endler, J. A. 1991: Variation in the appearance of guppy color patterns to Guppies and their predators under different visual conditions. *Vision Res.* **31**, 587-608.
- Fisher, H.S., Wong, B.B.M. & Rosenthal, G.G. 2006: Alteration of the chemical environment disrupts communication in a freshwater fish. *Proc. R. Soc. Lond. B* **273**, 1187-1193.
- Friedl, T.W.P. & Klump, G.M. 1997: Some aspects of population biology in the European treefrog, *Hyla arborea*. *Herpetologica* **53**, 321-330.
- Griffiths, R. A., Roberts, J. M. & Sims, S. 1987: A natural hybrid newt, *Triturus helveticus* x *T. vulgaris*, from a pond in mid-Wales. *J. Zool. Lond* **213**, 133-140.

- Griffiths, R. A. 1996: Newts and Salamanders of Europe. T & AD Poyser Natural history, Cambridge.
- Haerty, W., Gentilhomme, E. & Secondi, J. 2007: Female preference for a male sexual trait uncorrelated with male body size in the Palmate newt (*Triturus helveticus*). Behaviour **144**, 797-814.
- Halliday, T. R. & Verrell, P. A. 1986: Sexual selection and body size in Amphibians. Herpetol. J. **1**, 86-92.
- Halliday, T. R. 1975: On the biological significance of certain morphological characters in male of the Smooth newt *Triturus vulgaris* and of the Palmate newt *Triturus helveticus* (*Urodela: Salamandridae*). Zool. J. Linn. Soc. **56**, 291-300.
- Halliday, T. R.: 1977: The courtship of European newts: an evolutionary perspective. In: The reproductive biology of amphibians (Taylors, D. H. & Guttman, S. I.). Plenum Press, New York, pp 185-232.
- Halliday, T. R. 1990: The evolution of courtship behavior in Newts and Salamanders. Adv. Stud. Behav. **9**, 137-169.
- Hebets, E.A. & Uetz, G.W. 1999: Female responses to isolated signals from multimodal male courtship displays in the Wolf spider genus *Schizocosa* (*Araneae: Lycosidae*). Anim. Behav. **57**, 854-872.
- Heuschele, J. & Candolin, U. 2007: An increase in pH boosts olfactory communication in sticklebacks. Biol. Lett. **3**, 411–413.
- Hubbard, P. C., Barata, E. N. & Canario, V. M. 2002: Possible disruption of pheromonal communication by humic acid in the Goldfish, *Carassius auratus*. Aquat.Toxicol. **60**, 169-183.
- Johanet A., Secondi J., Pays O., Pagano A., Lodé T., Lemaire L. 2009: A case of reproductive character displacement in female palmate newts (*Lissotriton helveticus*). C.R. Biol. **332**, 548-557.
- Johnstone, R. A: 1996. Multiple displays in animal communication:'backup signals' and 'multiple messages'. Phil. Trans. R. Soc. B Lond. **351**, 329-338.
- Kulahci, I. G., Dornhaus, A. & Papaj, D. R. 2008: Multimodal signals enhance decision making in foraging bumble-bees. Proc. R. Soc. Lond. B **275**, 797-802.
- Liou, L.W. & Price, T.D: 1994. Speciation by reinforcement of premating isolation. Evolution **48**, 1451-1459.

- Mathis, A., Britzke, E. 1999: The roles of body size and experience in agonistic displays of the Ozark zigzag salamander, *Plethodon angusticlavius*. *Herpetologica* **55**, 344-352.
- Morrison, C., Hero, J.-M. & Smith, W. P. 2001: Mate selection in *Litoria chloris* and *Litoria xanthomera*: females prefer smaller males. *Austral Ecol.* **26**, 223-232.
- Morrison, C., Hero, J.-M. 2003. Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *J. Anim. Ecol.* **72**, 270–279.
- McLennan, D. A. 2003: The importance of olfactory signals in the gasterosteid mating system: Sticklebacks go multimodal. *Biol. J. Linn. Soc.* **80**, 555–572.
- Nöllert, A. & Nöllert, C. 2003 : Guides des amphibiens d'Europe. Delachaux et Niestlé, Paris.
- Osikowski, A., Babik, W., Grzmił, P. & Szymura, J. M. 2008: Multiple sex pheromone genes are expressed in the abdominal glands of the Smooth newt (*Lissotriton vulgaris*) and Montandon's newt (*L. montandoni*) (*Salamandridae*). *Zool. Science* **6**, 587-592.
- Parsons, T.J., Olson, S.L. & Braun, M.J: 1993. Unidirectional spread of secondary sexual plumage traits across an avian hybrid zone. *Science* **260**, 1643-1646.
- Partan, S. & Marler, P. 2005: Issues in the classification of multimodal communication signals. *Am. Nat.* **166**, 231-245.
- Partan, S. & Marler, P. 1999: Communication goes multimodal. *Science* **283**, 1272–1273.
- Pfennig, K.S. 1998: The evolution of mate choice and the potential for conflict between species and mate-quality recognition. *Proc. R. Soc. Lond. B* **265**, 1743-1748.
- R Development Core Team. 2004: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. URL: <http://www.R-project.org>
- Randler, C. 2002: Avian hybridization, mixed pairing and female choice. *Anim. Behav.* **63**, 103-119.
- Ratcliffe, J. M. & Nydam, M. L. 2008: Multimodal warning signals for a multiple predator world. *Nature* **455**, 96-100.
- Roberts, J. M. 1990: Reproductive isolation in Smooth and Palmate newts (*Triturus vulgaris* and *T. helveticus*). Milton Keynes: PhD Thesis, Open University.
- Ryan, M. J. & Rand, A. S. 1993: Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution* **47**, 647-657.

- Schlüpmann, M., Weber, G., Lipscher, E. & Veith, M. 1999: Nachweis eines freinlandbastardes von Teichmolch (*Triturus vulgaris*) und Fadenmolch (*Triturus helveticus*). *Z. Feldherp.* **6**, 203-217.
- Secondi, J., Aumjaud, A., Pays, O., Boyer, S., Montembault, D. & Violleau, D. 2007: Water turbidity affects the development of sexual morphology in the Palmate newt. *Ethology* **113**, 711-720.
- Secondi, J., Hinot, E., Djalout, Z., Sourice, S. & Jadas-Hécart, A. 2009: Realistic nitrate concentration alters the expression of sexual traits and olfactory male attractiveness in newts. *Funct. Ecol.* **23**, 800-808.
- Seehausen, O., Van Alphen, J.J.M. & Witte, F. 1997: Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science* **277**, 1808-1811.
- Spurway, H. & Callan, H.G. 1960: The vigour and male sterility of hybrids between the species *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*. *J. Genet.* **57**, 84-118.
- Steinfartz, S., Vicario, S., Arntzen, J. W. & Caccone, A. 2007: A Bayesian approach on molecules and behavior: reconsidering phylogenetic and evolutionary patterns of the *Salamandridae* with emphasis on *Triturus* newts. *J. Exp. Zool. Part B* **308B**, 139-162.
- Takahashi, M. K. & Parris, M. J. 2009: When do the costs of spermatogenesis constrain sperm expenditure? Remarks on the pattern of the spermatogenic cycle. *Ethology* **115**, 96-104.
- Taylor, R.C., Buchanan, B.W. & Doherty, J. L. 2007: Sexual selection in the Squirrel treefrog *Hyla squirella*: the role of multimodal cue assessment in female choice. *Anim. Behav.* **74**, 1753-1763.
- Endler, J.A. & Théry, M. 1996: Interacting effects of lek placement display behavior, ambient light and colour patterns in three neotropical forest-dwelling birds. *Am. Nat.* **148**, 421-452.
- Verrell, P. A., Halliday, T. R. & Griffiths, M. L. 1986: The annual reproductive cycle of the smooth newt (*Triturus vulgaris*) in England. *J. Zool.* **210**, 101-119.
- Verrell, P. A. 1986a: Male discrimination of larger, more fecund females in the smooth newt (*Triturus vulgaris*). *J. Herp.* **20**, 416-422.
- Verrell, P. A. 1986b: Male mate choice for fecund females in a plethodontid salamander. *Anim. Behav.* **38**, 1086-1088

Wirtz, P. 1999: Mother species–father species: unidirectional hybridization in animals with female choice. *Anim. Behav.* **58**, 1-12.

Figure legends

Fig. 1: Schematic representation of the experimental olfactometer. Grey lines indicate water circulation for visual or chemical tests of specific recognition. Observation window was located on the right hand side of the apparatus.

Fig. 2: Difference in time spent in, and latency to enter each preference zone (conspecific-heterospecific) for males and females *Lissotriton helveticus* and *L. vulgaris*. Box plots represent medians and interquartile ranges. P-values for Wilcoxon sign ranked tests are given above each box. Bold characters indicate significant differences at $\alpha=0.05$. Sixteen subject females and 18 subject males of each species have been used in visual and olfactory tests.

Fig. 3: Relationship between contrasts in stimuli size and contrasts in female response (time spent in and latency to enter each preference zone) observed during the visual experiment. Contrasts were computed as the difference conspecific-heterospecific so that a preference for the conspecific stimulus is indicated by a positive value for time spent and a negative value for latency.

Fig. 4: Relationship between contrasts in stimuli size and contrasts in male response (time spent in and latency to enter each preference zone) observed during the visual experiment. Contrasts were computed as the difference conspecific-heterospecific so that a preference for the conspecific stimulus is indicated by a positive value for time spent and a negative value for latency.

Fig. 5: Difference in mean body length between *Lissotriton helveticus* (open bars) and *L. vulgaris* (shaded bars) males observed in 7 syntopic ponds. Box plots represent median and interquartile range. Asterisks indicate significant difference with Mann-Whitney tests at $\alpha=0.05$. Figures below the x-axis give the sample size respectively for each species (*helveticus/vulgaris*).

Fig. 6: Matrix showing the occurrence of species recognition in males and females *Lissotriton helveticus* and *L. vulgaris* for visual and chemical stimuli. In each cell, Y indicate a significant conspecific preference for one or both variables measured in males (left character) and females (right character). N indicates that conspecific preference was not detected on none of the two variables. Tables reveal the low efficiency of species recognition in male *vulgaris* x female *helveticus* pairs. A higher hybridization risk is thus expected than in than in reciprocal pairs male *helveticus* x female *vulgaris*.

Table 1: Results of model selections for visual preference tests in males and females. Only the minimal model is presented. dSVL is the difference in body length between the conspecific and the heterospecific stimulus. Asterisks indicate significant effects at $\alpha=0.05$.

Female preference					
Time spent	No minimal model selected				
Latency					
	Coefficient	SE	df	t	p
intercept	24.303	1.822	28	13.341	0.000
species [TV]	-2.910	2.576	28	-1.130	0.268
dSVL	1.644	0.536	28	3.066	0.005*
species[TV]*dSVL	-2.819	0.758	28	-3.718	0.001*
Male preference					
Time spent	No minimal model selected				
Latency	No minimal model selected				

Fig. 1

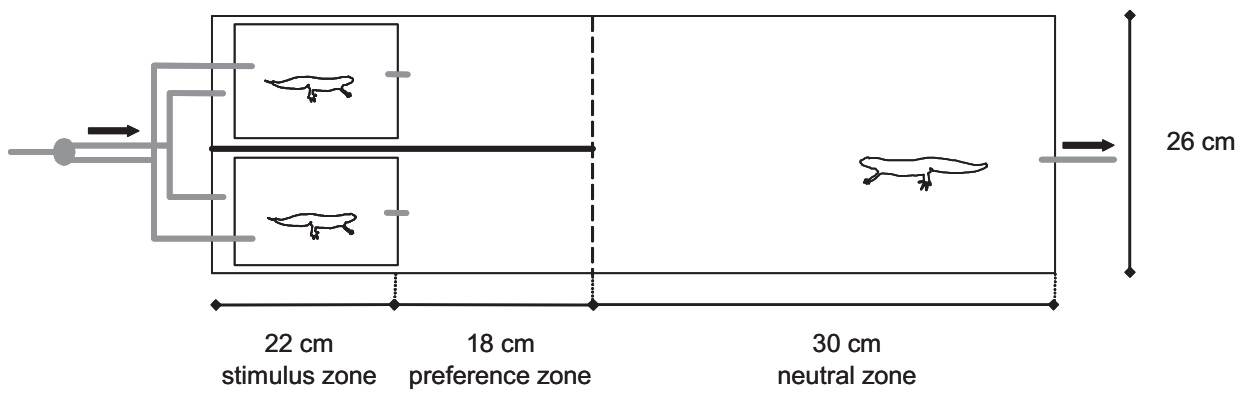


Fig. 2

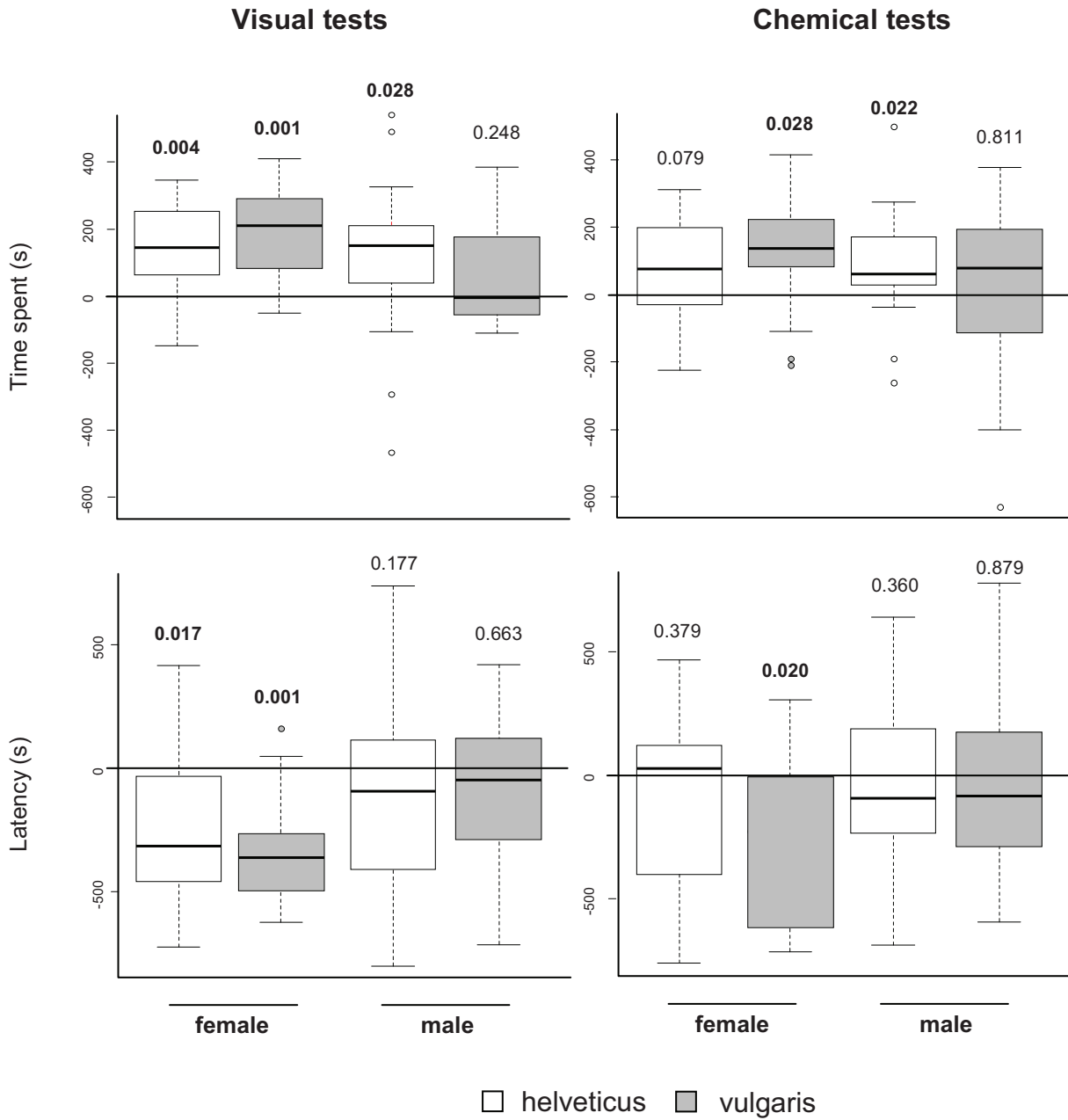


Fig. 3

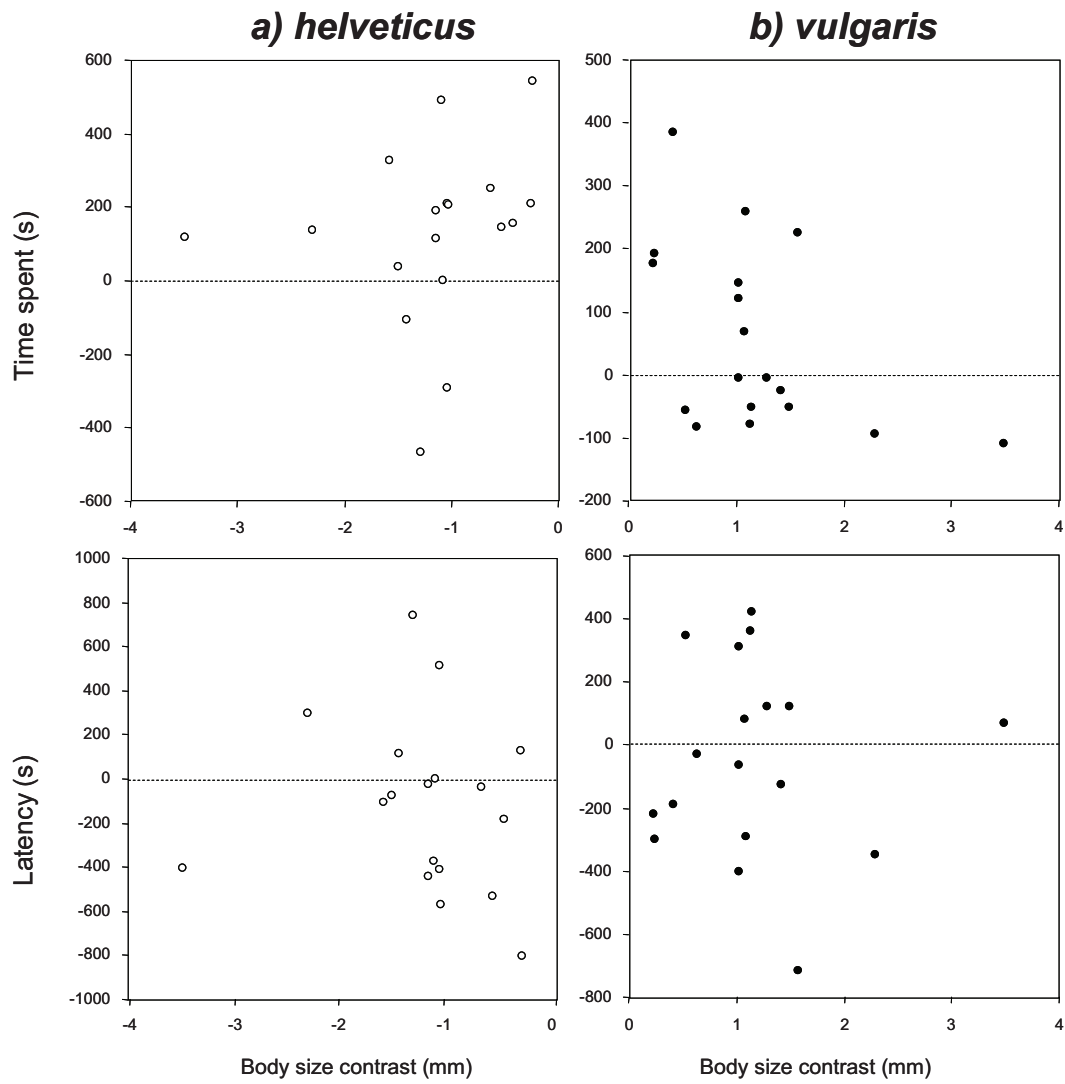


Fig. 4

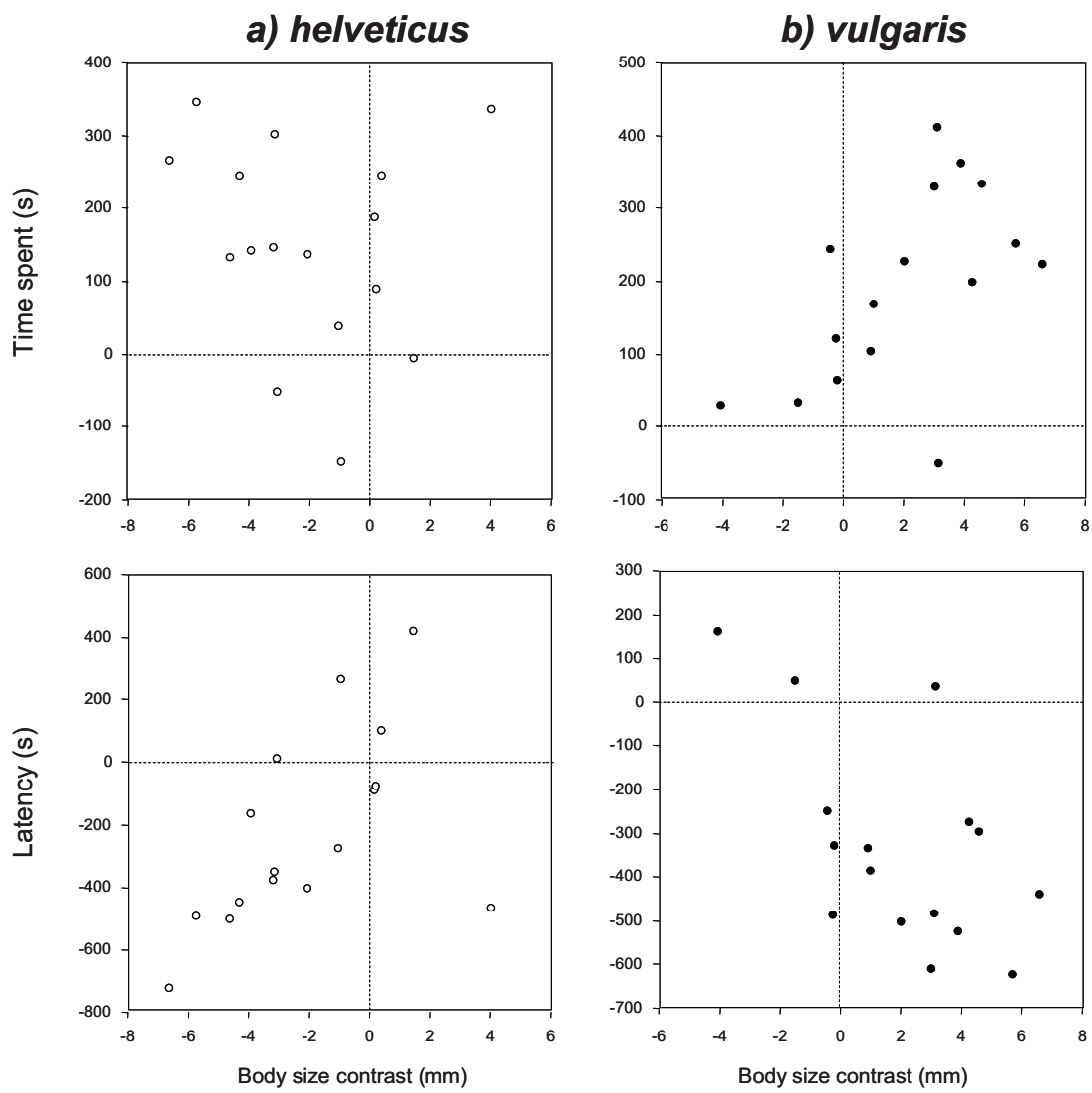


Fig. 5

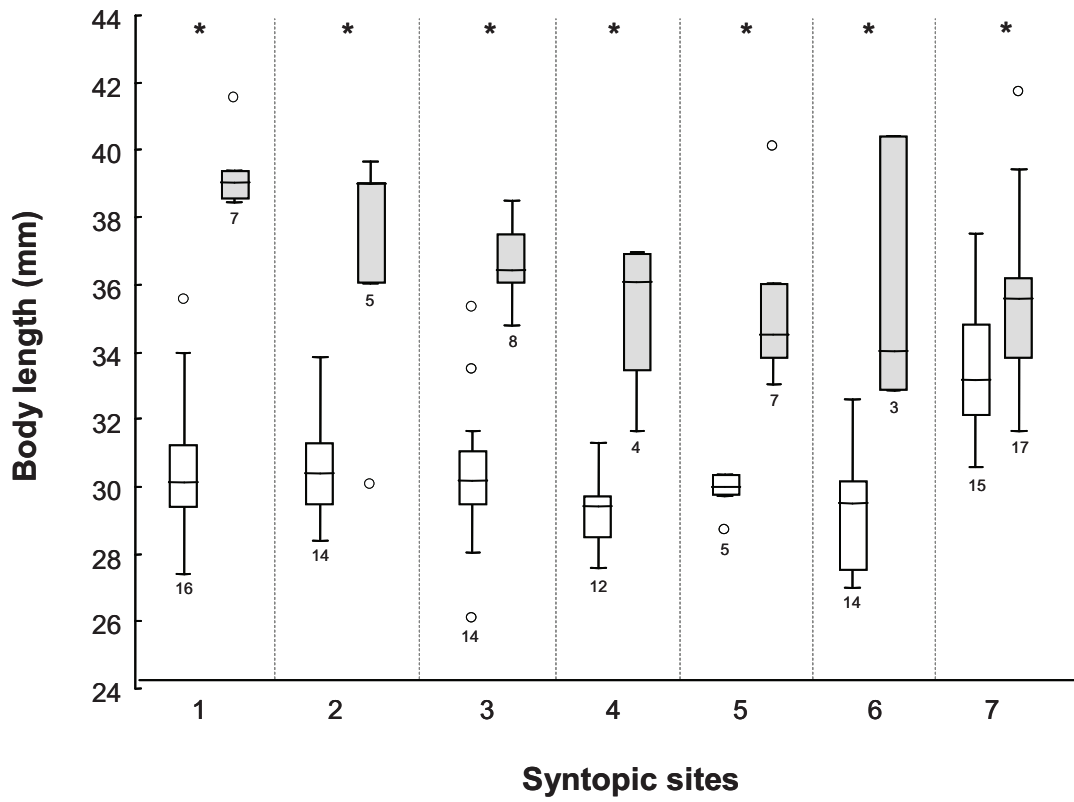


Fig. 6

		female <i>helveticus</i>	
		visual	chemical
male <i>vulgaris</i>	visual	N/Y	-
	chemical	-	N/N

		female <i>vulgaris</i>	
		visual	chemical
male <i>helveticus</i>	visual	Y/Y	-
	chemical	-	Y/Y

CHAPITRE IV

STRUCTURE DES POPULATIONS DE TRITONS PALMES EN VALLEE DE LA LOIRE

Introduction

La **fragmentation** et la **disparition** locale de l'habitat sont les principales causes de l'extinction des espèces (Blaustein *et al.* 1994; Vitousek *et al.* 1997; Young *et al.* 1996). En effet, la fragmentation, par effet démographique, diminue d'une part le nombre de migrants d'une population à une autre (*i.e.* **flux de gènes**), et d'autre part la **taille efficace** des populations d'où le risque d'**isolement** des populations et à terme d'extinction si la **variabilité génétique** ne permet pas l'**adaptation** aux fluctuations de l'environnement (Fahrig 2002; Lindenmayer & Fischer 2006). Il est donc nécessaire de connaître l'influence des **paramètres géographiques** et **environnementaux** qui structurent la variabilité génétique des populations (génétique du paysage, Manel *et al.* 2003).

Les amphibiens sont de bons modèles pour l'étude des interactions entre dispersion et paysage. Ils présentent typiquement une distribution en taches (Joly *et al.* 2001), ils sont physiologiquement dépendants d'un milieu humide et possèdent souvent une grande spécificité d'habitat (Duellman & Trueb 1994). Les espèces se reproduisant dans des habitats aquatiques utilisent pour compléter leur cycle de vie des environnements parfois distincts pour la reproduction, le développement larvaire et la survie des adultes (Pope *et al.* 2000), de nombreux amphibiens montrent une **structure de population à très petite échelle** (Alexandrino *et al.* 2000; Andersen *et al.* 2004; Bradley Shaffer *et al.* 2000; Cabe *et al.* 2007; García-París *et al.* 2000; Hitchings & Beebee 1997; Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005; Lampert *et al.* 2003; Larson *et al.* 1984; Monsen & Blouin 2003; Noël *et al.* 2007; Palo *et al.* 2004), ce qui permet d'étudier de façon précise les relations entre flux de gènes et paysage à l'échelle locale.

Les populations d'amphibiens sont souvent divisées en demeures au niveau des agrégations de reproduction et interconnectées. La plupart des espèces ont un fonctionnement en **métapopulation** à travers la migration des adultes et juvéniles en dehors de la période de reproduction (Dubey *et al.* 2009; Gulve 1994; Hels 2002; Marsh & Treham 2001; Pope *et al.* 2000; Rowe *et al.* 2000; Sinsch 1992; Sjögren 1991). La **connectivité** de l'habitat joue donc un rôle primordial dans la viabilité régionale des populations. Pour des espèces terrestres à faible capacité dispersive la connectivité dépend de la distance entre les taches d'habitats favorables et de la résistance relative de la matrice paysagère entre les taches (Bennett 1990). On peut donc s'attendre à ce que la dispersion soit cruciale pour la persistance des

(méta)populations (Semlitsch 2002) et que la structure du paysage affecte le comportement locomoteur des individus et donc les taux de dispersion dans le paysage. Beaucoup d'études montrent que la dispersion est altérée dans les paysages **anthropisés** (Gibbs 1998b; Hitchings & Beebee 1997; Lesbarrères *et al.* 2003; Stevens *et al.* 2006b; Vos & Chardon 1998). Les amphibiens sont à ce titre particulièrement touchés par la **destruction et la fragmentation de leur habitat** (Cushman 2006), et représentent le phylum de vertébrés **le plus menacé d'extinction** (Beebee & Griffiths 2005). Actuellement, les espèces de montagne néotropicale et celles **inféodées aux cours d'eau** sont les plus menacées (Beebee & Griffiths 2005).

Les connexions hydrologiques dans les **vallées alluviales** sont reliées au régime hydraulique qui crée des patrons d'inondation naturels. Ainsi, les vallées alluviales sont le **corridor naturel** de nombreuses espèces qui profitent de la grande connectivité de ces pièces d'eau (Evanno *et al.* 2006; Frisch *et al.* 2005; Hernandez-Martich *et al.* 1995; Jackson *et al.* 1999; Thomas *et al.* 2006). Néanmoins, aux patrons d'inondations s'intercalent des patrons d'assèchement des pièces d'eau qui dépendent directement ou indirectement du régime du fleuve. Ainsi, certaines pièces d'eau peuvent être partiellement ou totalement asséchées au cours de l'année ou d'une année sur l'autre. Cette **fragmentation** naturelle (Ward 1998) est amplifiée par l'impact des aménagements humains tels que la régulation du flux, la canalisation et la stabilisation des berges qui perturbent le régime naturel du fleuve, simplifient la morphologie du chenal, isolent la plaine d'inondation et les aquifères contigus du chenal et changent la physionomie de la plaine d'inondation (Ward 1998). En Europe par exemple, les travaux massifs de canalisation des fleuves achevés avant le 20^{ème} siècle ont été couplés, avec la régulation des flux, au drainage des zones humides et à la mise en culture ou en bâti des plaines d'inondation (Arntzen 1981; 1994; Duellman & Trueb 1994). Les écosystèmes fluviaux sont donc devenus particulièrement **sensibles à la fragmentation et à la perte d'habitat** causées par les activités humaines.

Les effets des inondations sur les amphibiens de plaines alluviales peuvent être séparés en effets directs et indirects dont les conséquences sont positives ou négatives. Dans certains cas, les **nombreuses pièces d'eau** créées par les inondations saisonnières connectent les populations, favorisant le flux de gènes (Giordano *et al.* 2007; Wallis & Arntzen 1989). L'humidité du **corridor riparien** favorise la migration de ces organismes sujets à une évaporation élevée à cause de leur peau perméable (Arntzen 1981; 1994; Duellman & Trueb 1994). En particulier, l'utilisation des corridors ripariens maintiendrait la connectivité entre régions montagneuses (Purrenhage *et al.* 2009; Zhan *et al.* 2009). D'autre part, en période de crue, le courant participe à la **dispersion passive** des individus, en particulier des larves

(Arntzen 1981; 1994; Bruce 1986; Hayes *et al.* 2006; Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005; Measey *et al.* 2007; Méndez *et al.* 2004; Thiesmeier 1994).. Au contraire, les perturbations causées par les forts courants d'inondations du fleuve peuvent causer la **mortalité** des adultes (Ellinger & Jehle 1997). Les crues peuvent également favoriser la colonisation par des **prédateurs** des amphibiens, tels que les poissons, des pièces d'eau qui ne sont pas habituellement connectées au cours d'eau (Bradford 1991; Morand & Joly 1995). A l'inverse, les inondations trop peu fréquentes de certaines pièces d'eau diminuent la **longévité de leurs habitants** (Cogălniceanu & Miaud 2003; Nobili & Accordi 1997). A l'effet de la vallée alluviale peut s'ajouter l'effet direct du **cours d'eau** lui-même sur la dispersion, qui peut structurer les populations de part et d'autre (Alexandrino *et al.* 2000; Lampert *et al.* 2003; Marsh *et al.* 2007; Wagner *et al.* 2005; mais voir Gascon *et al.* 1998; Lougheed *et al.* 1999; Matsui *et al.* 2006).

Dans ce chapitre nous présentons l'étude de la génétique des populations d'un petit amphibien assez commun et ubiquiste se reproduisant en milieu aquatique, le triton palmé, dans la vallée alluviale d'un des plus grands fleuves d'Europe et l'un des plus préservés : la vallée de Loire. Les objectifs de ce chapitre sont (1) de comprendre comment s'organisent les populations de tritons palmés en vallée de la Loire, (2) de tester l'existence d'une **structure** et évaluer l'influence éventuelle de grandes structures du **paysage** sur celle-ci, et enfin (3) d'estimer l'importance de la **vallée alluviale** dans les flux de gènes entre populations. En particulier, pour savoir (1) si le triton palmé répondait à un système en métapopulations, nous avons estimé les **taux de migration** entre populations selon deux techniques bayésiennes et testé la **différenciation génétique** entre populations. Nous avons estimé la **taille efficace** des populations et l'occurrence d'événements d'**extinction**. En effet, si la vallée alluviale est un environnement perturbé par l'irrégularité des mises en eau, nous nous attendons à ce que les tailles de populations fluctuent au point que la population puisse disparaître les années où la mare n'est pas mise en eau. (2) La structure de population a été testée selon trois méthodes bayésiennes. Nous avons testé l'hypothèse d'un **isolement par la distance** et estimé la distance sur laquelle il pouvait opérer. Pour tester l'influence des petits et grands **cours d'eau** et de la vallée alluviale sur la structure des populations, nous avons émis six hypothèses et estimé l'effet du découpage selon ces barrières potentielles sur la variabilité totale. Enfin, (3) nous avons comparé l'importance des **flux de gènes dans la vallée**, corridor potentiel, par rapport au plateau.

Matériel et Méthodes

Echantillonnage

Nous avons échantillonné les individus selon des transects transversaux de part et d'autre de la Loire. Ces transects ont été réalisés de la vallée alluviale, zone présumée favorable aux flux de gènes vers la zone de plateau, plus fragmentée. Pour chaque transect, nous avons essayé d'échantillonner un site en vallée, un site en plateau et, si possible, un site en position intermédiaire. La vallée alluviale a été bornée selon la limite des plus hautes eaux connues (DIREN Centre 2005). Les tritons palmés restent à l'eau pendant plusieurs semaines (de mars à mai) où ils se reproduisent de jour comme de nuit, ce qui a permis un échantillonnage diurne. La capture se faisait à l'aide d'une épuisette passée le long de la rive et au niveau de la végétation aquatique que les tritons utilisent pour se cacher, se nourrir et pondre (Norris & Hosie 2005). L'échantillonnage durait de cinq minutes à deux heures selon les cas. Même si de nombreux points d'eau étaient colonisés par les tritons palmés, il n'y avait souvent que quelques individus, d'où la difficulté de trouver des mares dans lesquelles environ 30 individus étaient présents. Sur les deux saisons de capture (2006 et 2007), 1102 individus ont été capturés sur 37 sites de reproduction. Dix-huit sites ont été échantillonnés en vallée alluviale et 19 en plateau. Leur localisation est indiquée sur la figure IV.1 et le nombre d'individus est indiqué dans le tableau IV.3—partie résultats). L'ablation d'une phalange et sa conservation dans l'éthanol à 75% ont permis les analyses génétiques.

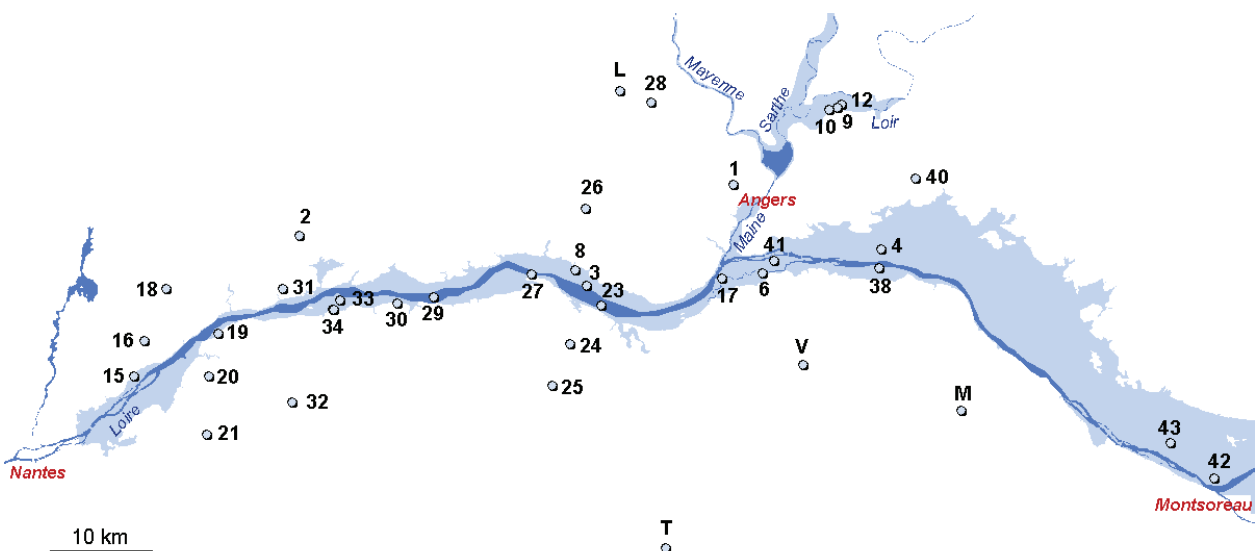


Figure IV.1 Localisation des 37 sites d'échantillonnage. La vallée alluviale (bleu clair) correspond à la limite des plus hautes eaux connues.

Génotypage

Afin d'estimer la structure génétique neutre, l'ADN des 1102 individus a été extrait et génotypé sur six marqueurs microsatellites tels que décrits dans Johanet *et al.* (soumis; Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008). Ces marqueurs neutres permettent l'estimation des paramètres classiques de génétique des populations tels que l'hétérozygotie, l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg ou encore la structure entre populations. Les individus de tritons palmés utilisés dans l'étude de l'introgession avec le triton ponctué (CHAPITRE III) ont été utilisés dans cette étude car nous avons mis en évidence que l'hybridation était un phénomène rare et que l'introgession impliquait d'avantage les tritons ponctués que les palmés.

Analyse des données

Analyses de la diversité génétique intra-population

Les fréquences alléliques, les **hétérozygoties observées et attendues** ainsi que les écarts à l'équilibre de **Hardy-Weinberg** ont été analysés pour chaque locus et sur l'ensemble des locus en utilisant les logiciels GENETIX v 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004) et GENEPOP v 4.0.7 (Belkhir *et al.* 2004). La significativité de l'estimateur \hat{f} du F_{IS} (Weir & Cockerham 1984) a été testée en utilisant la procédure de permutation des allèles à l'intérieur de chaque population à l'aide du logiciel GENETIX (1000 permutations). La présence d'**allèles nuls** a été testée à l'aide du logiciel MICRO-CHECKER v 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). L'occurrence de **déséquilibres de liaison** a été testée avec GENETIX après application de la correction de Bonferroni pour les tests multiples.

En vallée, l'irrégularité du régime hydraulique peut provoquer d'importantes fluctuations de la taille des populations de tritons. En effet, la présence, la surface ou encore la persistance dans le temps des sites de reproduction dans les vallées alluviales sont très dépendantes du régime du fleuve. Il est alors attendu que les fluctuations démographiques diminuent la taille efficace des populations (Whitlock & Barton 1997). Nous pouvons donc attendre des tailles efficaces plus faibles en vallées alluviales, zones perturbées, qu'en plateaux, supposés plus stables. Nous avons utilisé ici deux approches permettant de mettre en évidence d'éventuelles signatures génétiques des variations démographiques. Premièrement, la **taille efficace** des

populations peut être estimée par la méthode du déséquilibre de liaison (Hill 1981). La méthode repose sur le fait que dans un système où les gamètes sont distribués au hasard parmi un petit nombre de zygotes, il y aura un écart aux fréquences génotypiques attendues, et un écart aux fréquences gamétiques attendues, chacun d'eux pouvant être utilisé pour estimer la taille efficace. Nous avons estimé les tailles efficaces de chacune des populations échantillonnées grâce à cette méthode implémentée dans le logiciel NEESTIMATOR v 1.3 (Peel *et al.* 2004). Les tailles efficaces des populations de vallées ont été comparées à celles de plateaux avec le test de Mann-Whitney sur STATISTICA v 8.0 (StatSoft 2007). Dans la seconde approche, pour détecter des réductions récentes de tailles efficaces (*i.e.* **goulet d'étranglement**) nous avons utilisé le logiciel BOTTLENECK v 1.2.0.2 (Piry *et al.* 1999). Ce programme teste si l'hétérozygotie observée est plus importante que l'hétérozygotie attendue compte tenu du nombre d'allèles au locus sous l'hypothèse d'un équilibre mutation-dérive (*i.e.*, la taille efficace est restée constante au cours des dernières années). Pour déterminer si une population présente un nombre significatif de locus avec un excès de diversité génétique, nous avons utilisé le test de Wilcoxon, test relativement puissant qui peut être utilisé avec peu de locus (Cornuet & Luikart 1996).. Pour chacune des populations, nous avons testé l'hypothèse d'un excès de diversité génétique sur l'ensemble des locus évoluant sous un modèle de mutation en *stepwise* (SMM) et sous un modèle de mutation intermédiaire (TMM avec 70% SMM) tel que conseillé par les auteurs. Le nombre de populations ayant subi un goulet d'étranglement en vallée et en plateau a été comparé par une analyse Log-linéaire sur STATISTICA v 8.0 (StatSoft 2007).

Analyse de la diversité génétique entre populations

Plusieurs approches ont permis une étude globale de la structure de population sur la zone d'étude. En effet, rien ne permet de penser que les populations de tritons palmés fonctionnent à l'équilibre migration/dérive. Pourtant, cet équilibre est pré-supposé dans bon nombre de méthodes dites paramétriques. C'est pourquoi notre analyse utilisera différentes approches basées ou non sur des modèles biologiques.

Tout d'abord, la **structure génétique** globale et par paires de sites a été estimée à l'aide de l'estimateur $\hat{\theta}$ du F_{ST} (Weir & Cockerham 1984) et a été testée par permutation globale des individus à l'aide du logiciel GENETIX (1000 permutations). Cependant, le F_{ST} ne peut être traduit directement en flux génique (Whitlock & McCauley 1999). Il est donc nécessaire d'utiliser des approches complémentaires afin de pouvoir estimer le nombre de migrants entre sites. Deux méthodes bayésiennes ont donc été utilisées. Premièrement, les probabilités

d'**assignation des individus à leur population de capture** ont été calculées selon la méthode de Rannala & Mountain (1997). Nous avons utilisé l'algorithme de Paetkau *et al.* (2004) pour la **détection de migrants de première génération** à un seuil de 0,05 suite à un rééchantillonnage de 1000 individus. Ces calculs ont été effectués par chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC) grâce au logiciel GENECLASS v 2.0 (Piry *et al.* 2004). Deuxièmement, le logiciel BAYESASS v 1.3 (Wilson & Rannala 2003) a aussi permis l'estimation de **taux de migration récents** entre populations (et l'intervalle de confiance) en utilisant une MCMC. Le logiciel ne permettant pas de traiter plus de 19 populations, nous avons effectué l'analyse sur un sous-échantillonnage correspondant à l'ensemble des 19 populations au sud de la Loire. Nous avons réalisé trois millions d'itérations, dont un million ont servi au préchauffage, et avons échantillonné la chaîne toutes les 2000 itérations. Tous les autres paramètres ont été pris par défaut. Les analyses réalisées sur GENECLASS et BAYESASS ont été répétées cinq fois pour contrôler les résultats.

Afin d'évaluer le type de structure sur l'ensemble de la zone d'étude, nous avons réalisé une **analyse en composantes principales spatialisée** (ACPs). L'ACPs permet d'étudier la variabilité génétique spatiale en utilisant les fréquences alléliques sur les individus ou les populations, sans forcément répondre au critère d'équilibre à Hardy-Weinberg (Jombart *et al.* 2008). Les scores résument à la fois la variabilité génétique et la structure spatiale entre individus ou populations. L'analyse réalisée grâce au package ADEGENET (Jombart 2008) sous R v 2.8.1 (R Development Core Team 2007) a permis de tester statistiquement la présence d'une structure globale (taches, clines et intermédiaires), locale (fortes différences génétiques entre voisins) ou d'un bruit de fond.

Cependant les populations de tritons palmés ne se conforment pas forcément au modèle en îles et il peut être intéressant d'étudier la différenciation sous des modèles alternatifs tels que l'admixture, par exemple. C'est pourquoi nous avons utilisé une autre méthode basée sur l'approche bayésienne permettant donc d'étudier la structure génétique des populations lorsque celle-ci semble cryptique. Cette approche est basée sur la probabilité *a posteriori* que les individus soient assignés à K populations, $Pr(X/K)$ où X est le génotype des individus échantillonnés. Le programme STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) utilise cette méthode pour **détecter des unités populationnelles**. Cependant, ce programme ne tient pas compte de la localisation géographique des individus contrairement aux logiciels BAPS (Corander & Marttinen 2006) et GENELAND (Guillot *et al.* 2005) qui détectent des unités correspondant aux populations dans l'espace en assignant également les individus à des groupes selon la méthode bayésienne. Ces trois logiciels ont été utilisés de façon concomitante pour déterminer

si la zone d'étude se fractionnait en unités géographiques particulières. L'utilisation de STRUCTURE v 2.2 a permis la détermination du nombre de clusters pouvant composer notre aire d'étude en regroupant tous les individus et en calculant pour chaque cluster (K) la probabilité d'appartenance de chaque individu, K variant de 1 à 37 (nombre total de sites échantillonnés). Les probabilités individuelles ont été calculées selon un modèle d'admixture (la composition génétique des individus pouvant résulter d'un mélange provenant de différentes populations) sur des séries de 10 000 itérations suivant une période préliminaire de 10 000 itérations pour l'estimation des paramètres. Ceci a été répété 10 fois pour chacune des 37 valeurs de K . La valeur la plus probable de K a été estimée en utilisant la méthode proposée par Evanno *et al.* (2005). De la même façon, GENELAND 2.0.1 a été utilisé en faisant varier K de 1 à 37 suivant un modèle de fréquences alléliques corrélées, sur une série de 100000 itérations. Pour tester l'occurrence d'une admixture entre les entités pouvant potentiellement structurer la zone d'étude, le logiciel BAPS v 4.14 a été utilisé. Les résultats se sont basés sur 50 simulations à partir des fréquences alléliques *a posteriori*.

L'**isolement par la distance** (IBD) a été testé par le test de Mantel (1967) implémenté par GENETIX après 1000 permutations aléatoires de l'ordre des populations dans la matrice génétique ($\hat{\theta}/(1-\hat{\theta})$). Pour connaître la distance à laquelle un IBD pouvait opérer, nous avons étudié les **autocorrélations spatiales** au niveau individuel. Le coefficient de parenté F_{ij} a été estimé selon la formule suivante : $F_{ij}=(Q_{ij}-Q_m)/(1-Q_m)$, où Q_{ij} est la probabilité que deux gènes, i et j , tirés aléatoirement soient identiques par état et Q_m est la probabilité moyenne que les gènes soient identiques par état chez les individus tirés aléatoirement au sein des sites échantillonnés (Vekemans & Hardy 2004). Le coefficient de parenté de Ritland (1996) a été utilisé car il n'implique pas que les populations soient à l'équilibre d'Hardy-Weinberg et s'accommodent de petites tailles d'échantillons. Relativement peu sensible aux variances d'échantillonnage il s'avère puissant pour détecter les structures de populations (Hardy & Vekemans 2002). L'hypothèse d'isolement par la distance a été testée par régression de la matrice des F_{ij} par rapport à la matrice des distances géographiques logarithmiques. La significativité de la pente de régression a été évaluée suite à 1000 permutations aléatoires des localisations spatiales entre individus effectuées sur le logiciel SPAGEDi (Hardy & Vekemans 2002).

Effet des cours d'eau et de la topographie sur la structure de population

Si les cours d'eau représentent une barrière à la dispersion et donc au flux de gènes (Alexandrino *et al.* 2000; Lampert *et al.* 2003; Marsh *et al.* 2007; Wagner *et al.* 2005), nous nous attendons à ce que chaque entité géographique délimitée par ces éléments du paysage forme une région génétiquement distincte des autres. Si la Loire, pouvant atteindre 150 m de large, forme une barrière géographique, elle séparera génétiquement les populations du Nord (N) et du Sud (S). Si les cours d'eau plus étroits des Basses Vallées Angevines (Maine, Mayenne, Sarthe et Loir - maximum 80 m de large) forment eux aussi une barrière géographique, ils isoleront les populations à l'Est (NE) et à l'Ouest (NO). De même, si la topographie structure les populations de Vallée (V) et celles de Plateau (P) (Giordano *et al.* 2007), celles-ci seront génétiquement différenciées. Cela nous conduit à formuler six hypothèses (figure IV.2) :

H0 : il n'y a pas de barrières à la dispersion dans le site d'étude

H1 : la Loire structure la zone d'étude

H2 : la Loire et les autres cours d'eau structurent la zone d'étude

H0b : la topographie structure la zone d'étude

H1b : la topographie et la Loire structurent la zone d'étude

H2b : la topographie, la Loire et les autres cours d'eau structurent la zone d'étude

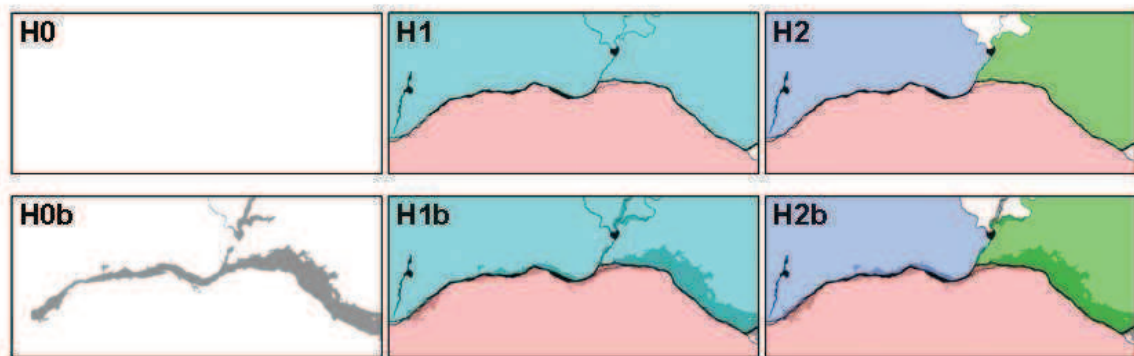


Figure IV.2 Représentation des six hypothèses d'étude utilisées pour l'AMOVA.

Afin de tester ces hypothèses, nous avons réalisé des **analyses de variance moléculaire** (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) pour chacune de ces situations à l'aide du logiciel GENETICSTUDIO v0.1 (disponible gratuitement à partir de : <http://dyerlab.bio.vcu.edu/>). L'AMOVA attribue la part de diversité génétique entre les régions, entre les sites d'une même région et entre les individus d'un même site.

Les sites de reproduction dans les différentes régions peuvent faire partie d'une seule population panmictique, d'un ensemble de dèmes totalement isolés ou de composants partiellement interconnectés d'une métapopulation (Rowe *et al.* 2000). Chacune de ces situations présente différents attendus en termes de structure génétique. Dans le premier cas les individus regroupés devraient former un ensemble à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Dans le second, chaque population sera à l'équilibre mais le regroupement des individus ne le sera plus. Les métapopulations s'intercalent entre ces deux extrêmes. Nous avons donc calculé pour chacune de ces régions, l'estimation et la significativité des estimateurs \hat{f} de F_{IS} à l'aide des quatre locus ne portant pas d'allèles nuls.

Enfin, une **analyse factorielle des correspondances** (AFC) a été menée sur GENETIX pour illustrer les différences entre régions.

Le rôle des vallées alluviales dans les flux de gènes

Si les flux de gènes sont accélérés en vallée alluviale, nous nous attendons à ce que la différenciation génétique entre deux sites de vallée soit plus faible qu'entre deux sites de plateau. Ceci serait trivial si les échanges entre strates (plateau, vallée) n'existaient pas. Or une mutation apparue en plateau peut se propager en vallée, diffuser plus rapidement, et réapparaître en plateau, à grande distance de son origine. Ceci aurait pour effet de brouiller l'isolement par la distance au sein de chaque strate et de rapprocher génétiquement des populations éloignées. Afin de tester cette hypothèse, nous avons **simulé** le comportement d'un locus microsatellite dans un paysage divisé en trois strates (figure IV.3). Chaque strate est de dimension 50 x 14 dèmes. Les effets de bord sont limités par la présence d'une bordure de 5 dèmes de large. Comme le F_{ST} est dépendant du produit entre N_e , la taille efficace, et m , le taux de migration chaque strate est caractérisé par une valeur de $N_e.m$, encore appelé flux génique. Dans notre modèle nous avons testé six situations différentes en fonction des valeurs de $N_e.m$ dans chacune des strates. A chaque fois, nous avons choisi la valeur la plus faible de flux génique pour la strate la plus au nord censée représenter la strate dite de plateau, et la valeur la plus forte pour la strate la plus au sud représentant la vallée alluviale. On affecte à la strate du milieu (strate dite du lit majeur) une valeur intermédiaire et constante sur tous les scénarios ($N_e=500$). Le tableau IV.1 illustre les différents scénarios (*i.e.* valeurs de N_e affectées à chaque strate) utilisés dans les simulations. Pour chaque série de six scénarios, une valeur de m a été utilisée. Nous avons testé ici deux valeurs de m : 0,1 et 0,001. Les simulations ont été réalisées à l'aide du logiciel SPLATCHE 1.1 (Currat *et al.* 2004). Au départ

de chaque simulation, chaque pixel est déjà à son maximum démographique, c'est à dire aux valeurs de N_e spécifiées plus haut. Le taux de croissance de chaque dème est de 0,01. La migration à partir d'un dème se fait dans les quatre directions Nord, Sud, Est et Ouest. Un nombre de migrants égal pour chaque direction a été choisi pour plus de simplicité. Chaque simulation consiste en une simulation démographique et en cent simulations de coalescence d'un marqueur microsatellite ce qui permet d'obtenir une évaluation de la variation génétique à partir de cent locus. Un taux de mutation de 10^{-3} a été choisi, et le microsatellite suit un modèle de mutation *stepwise* non contraint sur le nombre de motifs. Chaque simulation a été menée sur 2000 générations afin de s'assurer de l'équilibre migration/dérive. Les génotypes microsatellites (30 individus diploïdes) ont été échantillonnés sur quatre transects comprenant chacun un dème de vallée, un du lit majeur et un de plateau. Ce schéma d'échantillonnage est censé représenter la stratégie adoptée dans cette étude pour les tritons palmés. Chaque dème échantillonné est distant de douze dèmes d'un autre dème échantillonné, aussi bien en direction verticale qu'horizontale. Ceci permet d'éviter les confusions entre effets de distance et différence de flux génique entre strates. A l'issue de chaque simulation, les F_{ST} par paires sont estimés grâce au logiciel ARLEQUIN (Excoffier *et al.* 2005). Les différenciations moyennes entre dèmes adjacents au sein de chaque strate sont alors estimées et comparées.

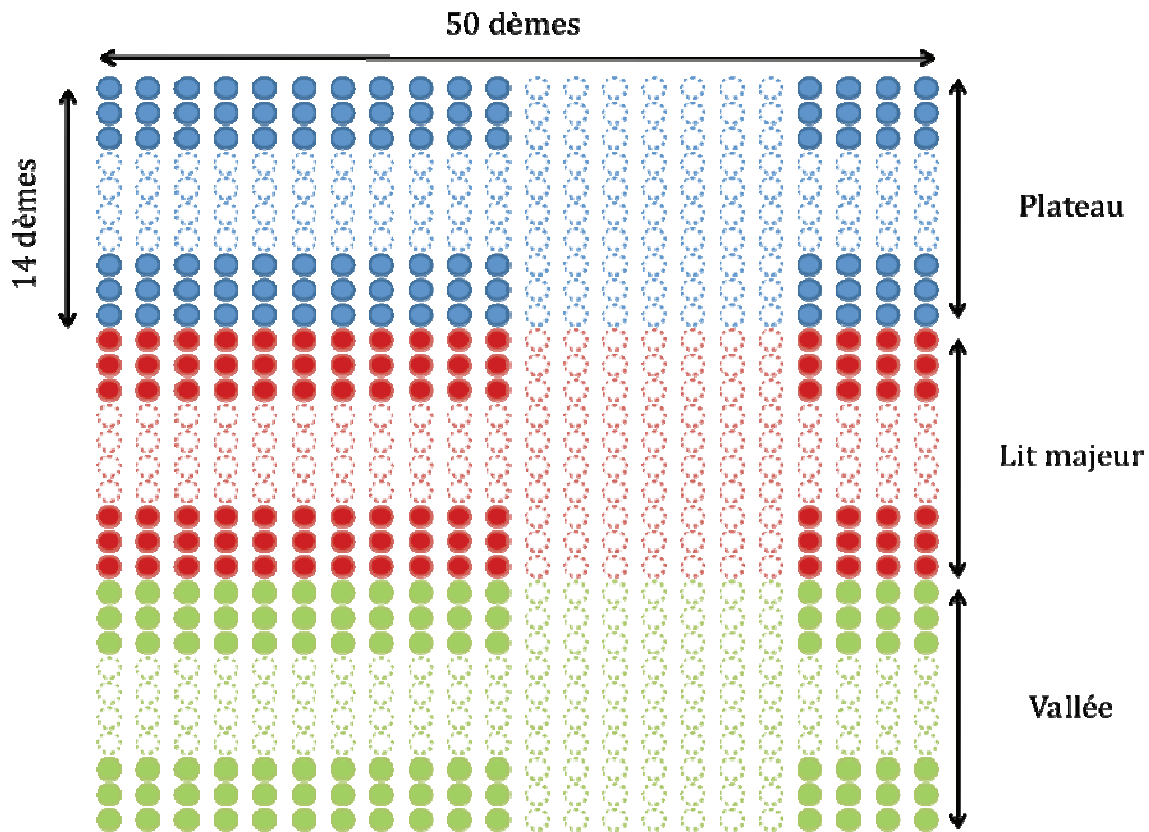


Figure IV.3 Représentation du paysage modélisé en trois strates de 50 dèmes sur 14.

Tableau IV.1 Description des six scénarios de simulations. Les valeurs numériques représentent les tailles de dème dans chacune des strates.

Scénario	Vallée	Strate Lit majeur	Plateau
1	950	500	50
2	900	500	100
3	800	500	200
4	700	500	300
5	600	500	400
6	500	500	500

Afin de tester une différence de flux génique entre sites de vallée et sites de plateau sur nos données génétiques, nous avons réalisé un **test de Mantel avec hypothèse** (Lemaire *et al.* 2000; Livshits *et al.* 1991). Pour ce faire, nous avons construit une matrice dans laquelle le même coefficient était attribué pour deux sites positionnés en vallée (« 1 »), pour un site en vallée et l'autre en plateau (« 2 ») et pour deux sites positionnés en plateau (« 3 ») (figure IV.4). Le test de Mantel partiel mesure et teste la corrélation linéaire entre deux matrices tout en tenant compte de la corrélation linéaire avec une troisième matrice. Nous avons testé la corrélation partielle entre la distance génétique et les trois combinaisons de sites en tenant compte de la distance géographique par un test de Mantel partiel réalisé sur XLSTAT (Addinsoft 2009).

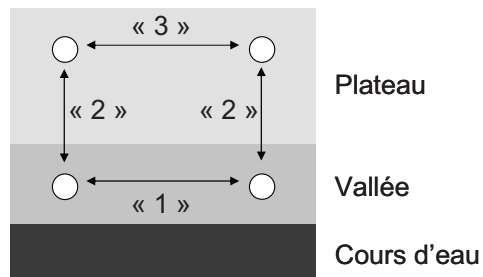


Figure IV.4 Schématisation du modèle utilisé pour le test de Mantel avec hypothèses.

Il n'y a pas de différence significative dans la distribution des combinaisons par paires de sites (Plateau-Plateau et Vallée-Vallée) selon la distance ; selon le test de Mann-Whitney réalisé plus haut (CHAPITRE II, $U = 1,19.10^{-4}$, $p = 0,164$) chaque combinaison est équitablement représentée. Nous avons donc comparé la distribution des estimations de F_{ST} par paires de sites selon chacune des deux combinaisons par un test de Mann-Whitney.

Résultats

Analyse de la diversité génétique intra-population

Les six microsatellites utilisés ont montré un polymorphisme de 6 à 27 allèles par locus, avec une moyenne de 16 allèles par locus. Aucun déséquilibre de liaison n'a été détecté. Les valeurs moyennes d'hétérozygoties observées et attendues non biaisées (Nei, 1972) et les estimations de F_{IS} sont indiqués dans le tableau IV.2. La présence d'allèles nuls pour les locus th27 et th09 a été détectée au seuil de 5% avec le logiciel MICRO-CHECKER.

Tableau IV.2 Nombre maximum d'allèles par locus (na), hétérozygoties observées et attendues non biaisée (H_O et H_E), estimations de F_{IS} (\hat{f}) et pourcentages de populations montrant un déséquilibre significatif à Hardy-Weinberg (% pop).

	na	H_O	H_E	\hat{f}	% pop
tv3ca9	12	0,38	0,49	0,22	40
th09	25	0,23	0,86	0,73	100
Tv3Ca19	6	0,61	0,61	-0,02	54
Th14	20	0,66	0,75	0,12	38
th27	27	0,17	0,82	0,80	100
thca14	7	0,29	0,35	0,16	46

L'estimation de la variabilité pour chaque population est reportée dans le tableau IV.3. Le déficit en hétérozygotes est extrêmement significatif pour toutes les populations sur l'ensemble des six locus, très probablement dû à la présence d'allèles nuls. Lorsque l'estimateur de F_{IS} est calculé sans les locus th27 et th09, l'hétérozygotie observée s'échelonne de 0,47 à 0,71 avec une moyenne de 0,58. Seules dix populations s'écartent de l'équilibre d'Hardy-Weinberg.

Tableau IV.3 Estimation, pour chacune des 37 populations de taille n , de l'hétérozygotie observée et attendue non biaisée (H_O et H_E), du déficit en hétérozygotes (\hat{f}) et seuils de significativité pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,1$ (**) et $p < 0,01$ (***) calculés sur l'ensemble des six locus microsatellites et sur les quatre locus sans allèles nuls.

Population	n	6 locus			4 locus		
		H_O	H_E	\hat{f}	H_O	H_E	\hat{f}
Tpal 1	34	0,35	0,58	0,40***	0,58	0,59	0,01
Tpal 2	29	0,37	0,60	0,40***	0,58	0,57	-0,02
Tpal 3	32	0,38	0,62	0,39***	0,61	0,54	-0,13
Tpal 4	24	0,38	0,65	0,42***	0,59	0,57	-0,05
Tpal 6	19	0,41	0,66	0,39***	0,60	0,63	0,05
Tpal 8	43	0,40	0,59	0,33***	0,58	0,55	-0,05
Tpal 9	22	0,54	0,66	0,19***	0,71	0,62	-0,15
Tpal 10	32	0,43	0,59	0,28***	0,62	0,54	-0,16
Tpal 12	28	0,37	0,64	0,43***	0,60	0,57	-0,04
Tpal 15	30	0,46	0,60	0,25***	0,65	0,53	-0,23
Tpal 16	32	0,46	0,61	0,26***	0,70	0,58	-0,22
Tpal 17	30	0,41	0,59	0,32***	0,62	0,52	-0,21
Tpal 18	29	0,31	0,58	0,49***	0,55	0,56	0,01
Tpal 19	30	0,41	0,64	0,36***	0,63	0,59	-0,06
Tpal 20	30	0,43	0,64	0,33***	0,60	0,55	-0,09
Tpal 21	30	0,41	0,67	0,41***	0,61	0,60	-0,01
Tpal 23	36	0,39	0,64	0,38***	0,58	0,54	-0,07
Tpal 24	22	0,37	0,68	0,47***	0,58	0,63	0,09
Tpal 25	29	0,34	0,63	0,47***	0,55	0,54	-0,03
Tpal 26	28	0,45	0,66	0,32***	0,59	0,58	-0,01
Tpal 27	30	0,36	0,64	0,45***	0,56	0,58	0,04
Tpal 28	27	0,40	0,65	0,39***	0,63	0,60	-0,04
Tpal 29	31	0,46	0,67	0,32***	0,64	0,60	-0,06
Tpal 30	28	0,38	0,64	0,41***	0,59	0,56	-0,07
Tpal 31	25	0,34	0,65	0,48***	0,54	0,60	0,11*
Tpal 32	35	0,41	0,66	0,39***	0,52	0,60	0,13**
Tpal 33	35	0,45	0,71	0,37***	0,59	0,65	0,09*
Tpal 34	38	0,45	0,70	0,36***	0,54	0,63	0,15***
Tpal 38	29	0,33	0,63	0,49***	0,53	0,56	0,05
Tpal 40	31	0,40	0,71	0,44***	0,57	0,65	0,12**
Tpal 41	35	0,29	0,65	0,56***	0,47	0,57	0,18**
Tpal 42	35	0,33	0,71	0,54***	0,52	0,66	0,22***
Tpal 43	24	0,33	0,70	0,53***	0,47	0,67	0,31***
Tpal L	30	0,45	0,67	0,33***	0,64	0,62	-0,03
Tpal M	32	0,30	0,59	0,49***	0,49	0,49	-0,02
Tpal T	24	0,32	0,64	0,50***	0,50	0,56	0,11*
Tpal V	24	0,36	0,72	0,51***	0,60	0,68	0,11*

Les tailles efficaces par populations échantillonnées, estimées selon la méthode des déséquilibres de liaison (Hill 1981) varient de quatre individus à une taille infinie (figure IV.5). Théoriquement, les populations de taille infinie correspondent à des populations de taille tellement importante que la méthode ne peut distinguer entre une taille infinie et une grande taille de population (Peel *et al.* 2004). Les forts écarts-types s'expliquent par les limites de la méthode lorsque l'échantillonnage des individus ou le nombre de marqueurs est faible ou lorsque les conditions s'écartent des postulats de la méthode (*i.e.* population stable, panmictique, sans sélection ni migration, ni mutation) (England *et al.* 2006). Les tailles efficaces des populations de vallée et de plateau sont équivalentes (une valeur de 1000 individus a remplacé la valeur infinie, $U = 157, p = 0,682$).

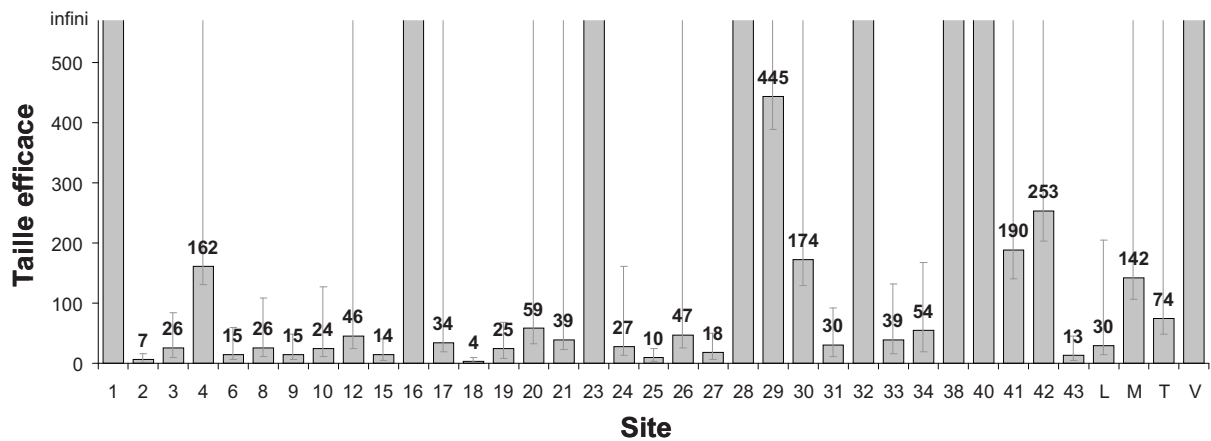


Figure IV.5 Estimation des tailles efficaces des 37 populations selon la méthode des déséquilibres de liaison (Hill 1981) implémentée par NEESTIMATOR.

Quatre populations témoignent d'une réduction de taille efficace récente d'après les analyses effectuées sur BOTTLENECK. Toutes sont situées en vallée (Tpal 3, 8, 19 et 43), une différence significative avec le plateau ($\chi^2 = 6,279, ddl = 1, p = 0,012$).

Analyse de la structure génétique entre populations

Une AMOVA effectuée en séparant les sites syntopiques des sites allotopiques a confirmé que ce critère n'était pas discriminatoire ($F = 2,869$, $ddl = 1$ et 1065 , $p = 0,091$; 0,2 % de la variation est expliqué par le fait que la deuxième espèce occupe ou non le site de reproduction).

L'étude génétique réalisée à l'aide des six marqueurs microsatellites indique une structure de population faible mais extrêmement significative sur l'ensemble des sites échantillonnés en vallée de la Loire ($\hat{\theta} = 0,027$, $p < 0,000$). La figure IV.6 illustre le niveau de structure génétique global et par marqueur sur la zone étudiée.

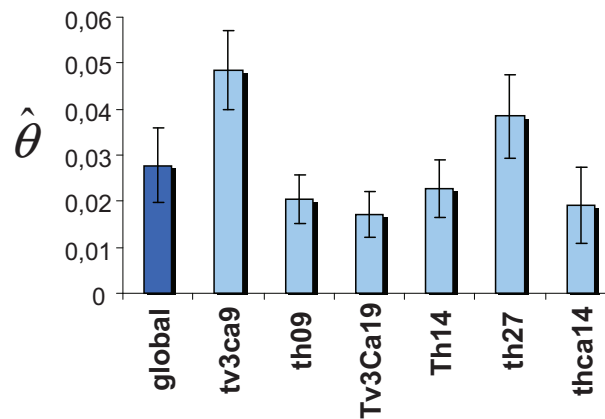


Figure IV.6 Estimation des F_{ST} global et par marqueur. L'estimation de l'intervalle de confiance à 95% a été réalisée par 1000 bootstraps sur les locus pour l'estimation du F_{ST} global, et par Jackknife sur les populations pour les estimations de F_{ST} par locus.

L'estimation des F_{ST} par paires s'échelonne de -0,015 ($p = 0,960$) à 0,095 ($p < 0,000$) et indique des différenciations significatives pour de nombreuses paires de sites (tableau IV.4). 24% des estimations de F_{ST} par paires indiquent une structure génétique à un seuil de 5%, 22% à un seuil de 1% et 18% à un seuil de 0,1%.

Tableau IV.4 Valeurs des estimations de F_{ST} par paires de sites et seuils de significativité pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,1$ (**), $p < 0,01$ (***)

	2	3	4	6	8	9	10	12	15	16	17	18	19	20	21	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	38	40	41	42	43	L	M	T	V			
1	0,00	0,03*	0,05**	0,02	0,01	0,06**	0,03*	0,04**	0,05**	0,08***	0,01	0,01	0,02*	0,04***	0,08***	0,03*	0,03*	0,03*	0,03*	0,02	0,02*	0,02*	0,06**	0,05**	0,04***	0,07***	0,06***	0,07***	0,09***	0,04**	0,08***	0,09***	0,04	0,08***	0,09***	0,04			
2		0,01	0,03*	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,04*	0,05**	0,00	0,00	0,03*	0,02*	0,04*	0,01	0,08***	0,03*	0,01	0,01	0,00	0,00	0,05***	0,03*	0,05***	0,04**	0,03**	0,04**	0,06**	0,03**	0,05***	0,02	0,04**	0,08***	0,08***	0,03			
3			0,00	0,02	0,01	0,03**	0,02*	0,00	0,02*	0,04**	0,00	0,02	0,01	0,00	0,03**	-0,01	0,06***	0,01	0,01	0,01	0,02	0,00	0,02	0,02*	0,04**	0,02*	0,02*	0,03*	0,03**	0,04**	0,02*	0,03*	0,02*	0,03*	0,02*	0,03			
4				0,02	0,03*	0,02*	0,04*	0,02*	0,02*	0,05***	0,00	0,04*	0,01	-0,01	0,00	0,00	0,02*	0,00	0,00	0,01	0,02*	-0,01	0,03**	0,02*	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,02*	0,02*	0,00	0,01	0,01	0,01			
6					0,03*	0,04*	0,03*	0,03*	0,04**	0,03*	0,02	0,05*	0,03*	0,03*	0,03*	0,02*	0,01	0,05***	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03*	0,02	0,04**	0,03*	0,03*	0,04**	0,05**	0,04**	0,02	0,05**	0,03*	0,06***	0,01			
8						0,02	0,01	0,01	0,02*	0,05*	0,01	-0,01	0,02*	0,02*	0,04**	0,02	0,09***	0,04**	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02*	0,05***	0,03**	0,03**	0,04**	0,05***	0,04**	0,04**	0,04**	0,04**	0,02*	0,06***	0,06**	0,04			
9							0,02	0,00	0,03*	0,05**	0,04***	0,03	0,05***	0,02	0,00	0,03*	0,06***	0,03*	0,01	0,01	0,03*	0,02	0,03**	0,05***	0,02	0,03**	0,04**	0,04**	0,04**	0,04**	0,02*	0,05***	0,03**	0,02	0,06***	0,06**	0,04		
10								0,01	0,03*	0,03*	0,04**	0,03*	0,04**	0,03*	0,04**	0,02**	0,08***	0,05***	0,01	0,02	0,02	0,02*	0,04***	0,02*	0,03***	0,04**	0,04**	0,04**	0,04**	0,05**	0,05***	0,04**	0,04**	0,06**	0,07***	0,04			
12									0,03**	0,04**	0,02*	0,00	0,04**	0,01	0,01	0,01	0,06***	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03**	0,04**	0,03**	0,02*	0,04**	0,02*	0,05***	0,03**	0,03**	0,01	0,04***	0,05***	0,03			
15										0,02*	0,02	0,03	0,04**	0,02*	0,01	0,02*	0,05***	0,04**	0,00	0,02*	0,02	0,02	0,01	0,02*	0,03*	0,03**	0,04**	0,04**	0,02*	0,03**	0,04***	0,05***	0,03**	0,05**	0,05***	0,03			
16											0,06**	0,05**	0,07***	0,05***	0,03*	0,05***	0,09***	0,05***	0,03*	0,06***	0,02	0,04***	0,06***	0,04**	0,06***	0,07***	0,06***	0,05***	0,06***	0,05***	0,07***	0,05***	0,07***	0,07***	0,05***	0,05***			
17												0,02	0,01	0,01	0,04**	0,01	0,05***	0,03*	0,02	0,02*	0,02	0,00	0,02*	0,04**	0,04***	0,03*	0,01*	0,03*	0,04**	0,03*	0,03*	0,07***	0,05**	0,02	0,04**	0,01			
18													0,04**	0,02	0,04*	0,03**	0,08***	0,06**	0,00	0,02	0,01	0,02*	0,06**	0,05***	0,05**	0,05***	0,05**	0,06***	0,05***	0,06**	0,06**	0,00	0,06**	0,07***	0,05				
19														0,02*	0,04***	0,00	0,06***	0,03*	0,01	0,03*	0,04**	0,01	0,02*	0,02*	0,04***	0,03**	0,02*	0,04**	0,02*	0,03***	0,05***	0,03**	0,03*	0,05***	0,01				
20															0,00	0,00	0,04**	0,00	0,00	0,00	0,02*	0,00	0,04**	0,01	0,03**	0,01	0,01	0,02*	0,02*	0,03**	0,02*	0,01	-0,01	0,02*	0,02				
21																0,02*	0,04**	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04**	0,02*	0,03**	0,02**	0,04**	0,01	0,03*	0,02*	0,02	0,01	0,02	0,04***	0,02			
23																	0,05***	0,01	0,00	0,01	0,02*	-0,01	0,01	0,02*	0,03***	0,03**	0,02*	0,02**	0,02**	0,03**	0,03***	0,02**	0,02*	0,03**	0,02*	0,02			
24																		0,03*	0,02*	0,02*	0,06***	0,04**	0,02	0,07***	0,04***	0,05***	0,04**	0,05***	0,03**	0,05***	0,04***	0,06***	0,06***	0,04**	0,05***	0,01			
25																			0,01	0,04**	0,04**	0,03**	0,02*	0,01	0,04**	0,04**	0,03**	0,02*	0,01	0,02*	0,03**	0,03*	0,02	0,03**	0,01	0,02*	0,03		
26																				-0,01	0,01	-0,01	0,00	0,02*	0,01	0,02*	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,00	0,01	0,03**	0,00			
27																					0,02*	0,00	0,00	0,05**	0,02*	0,03**	0,03**	0,02*	0,02*	0,04**	0,03**	0,02*	0,01	0,03*	0,05***	0,01			
28																						0,01	0,04**	0,02	0,05***	0,03**	0,02**	0,06***	0,03**	0,05***	0,03**	0,05**	0,02	0,05**	0,06***	0,02			
29																							0,01	0,02*	0,03***	0,03**	0,01*	0,02*	0,01	0,02*	0,02*	0,03**	0,01	0,01	0,04***	0,01			
30																								0,04***	0,01	0,02*	0,01*	0,02*	0,02	0,01	0,03**	0,03*	0,03**	0,01	0,01	0,04***	0,01		
31																									0,05*	0,02*	0,03**	0,01	0,02*	0,02	0,01	0,03**	0,03*	0,03**	0,01	0,01	0,01	0,01	
32																									0,01	0,01	0,02*	0,02**	0,01	0,02*	0,02*	0,03*	0,05**	0,06***	0,05**	0,02	0,02		
33																										0,01	0,01	0,02*	0,02**	0,01	0,02*	0,02	0,04***	0,03**	0,02*	0,02	0,02	0,02	
34																											-0,01	0,02*	0,00	0,00	-0,01	0,01	0,04***	0,05***	0,01	0,00	0,00	0,00	
38																											0,02*	0,02*	0,00	0,00	0,02*	0,04***	0,02*	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	
40																												0,03**	0,01	0,02*	0,02	0,05***	0,03**	0,02*	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
41																																							
42																																							
43																																							
L																																							
M																																							
T																																							

Les tests d'assignation réalisés sur GENECLASS révèlent qu'en moyenne 80% des individus sont assignés à leur population de capture. Les estimations sont comparables d'une population à l'autre ($\sigma = 0,05\%$). L'estimation du nombre de migrants potentiels dans les populations échantillonnées en fonction de la population de provenance est présentée dans le tableau IV.5. Chaque population a au moins une fois reçu un migrant d'une autre population et envoyé un migrant dans une autre population. Certaines populations se comportent plutôt comme des populations sources (Tpal 16) et d'autres comme des populations puits (Tpal 31 et Tpal 42). L'analyse du taux de migration effectuée sur les populations du Sud de la Loire grâce au logiciel BAYESASS indique de façon cohérente que 77% ($\sigma = 0,09\%$) des individus retourneraient se reproduire dans leur population d'origine (tableau IV.6). Aucun taux de migration significatif ($> 0,05\%$) n'a été détecté entre les différentes populations échantillonnées.

Tableau IV.5 Estimation du nombre de migrants potentiels, au seuil de 95%, dans les populations échantillonnées (en ligne) en fonction de la population de provenance (en colonne) d'après la méthode de Peatkau *et al.* (2004) implémentée dans GENECLASS2.

	1	2	3	4	6	8	9	10	12	15	16	17	18	19	20	21	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	38	40	41	42	43	L	M	T	V					
1																1																										
2											1								1																							
3							1			1																																
4							1		1																																	
6				1			1																																			
8							1																																			
9																																										
10											2																															
12											1																															
15					1						1																															
16					1						1																															
17											1																															
18											1																															
19				1																																						
20											1																															
21												1																														
23				1																																						
24																																										
25																																										
26																																										
27																																										
28																																										
29																																										
30																																										
31																																										
32																																										
33																																										
34																																										
38																																										
40																																										
41																																										
42																																										
43																																										
L																																										
M																																										
T																																										
V																																										

Tableau IV.6 Estimation bayésienne d'admixtion récente entre les populations de tritons palmés du Sud de la Loire à partir du programme BAYESASS v 1.3 (Wilson & Rannala 2003). Les populations sources sont indiquées dans la première ligne ; les populations recevant les immigrants sont indiquées dans la première colonne. Chaque cellule contient le taux moyen de migration pour une paire de population. Les taux d'auto-assignation sont indiqués en italique en italique le long de la diagonale. La plupart des taux de migration sont faibles, nous n'avons indiqué que ceux supérieurs à 0,05.

	6	17	19	20	21	23	24	25	27	29	30	32	33	34	38	41	M	T	V		
6	0,74																				
17		0,68																			
19			0,68																		
20				0,71																	
21					0,81																
23						0,86															
24							0,98														
25								0,75													
27									0,68												
29										0,80											
30											0,68										
32												0,86									
33													0,76								
34														0,69							
38															0,85						
41																0,84					
M																	0,80				
T																		0,86			
V																			0,86		0,68

L'analyse en composantes principales spatialisée (ACPs) effectuée sur les individus grâce au package ADEGENET sous R est présentée en (figure IV.7). Seul le premier axe (coloré en noir) est significativement informatif (figure IV.7 a). Le score positif indique une corrélation spatiale positive, révélant que la zone d'étude ligérienne est structurée globalement. Cette structure globale peut signifier la présence de deux entités géographiques ou bien d'un gradient entre deux groupes de populations différenciées (Jombart *et al.* 2008). En particulier d'après la figure IV.7 b) les scores très positifs (*i.e.* blancs) dans le Nord de la zone d'étude s'opposent aux scores très négatifs (*i.e.* foncés) dans le Sud et l'Est. Les zones noires encerclées par la ligne de niveau de valeur « 1 » correspondent à des zones « fantômes » dues à l'absence de données dans ces secteurs, limitant les possibilités d'interpolation (Jombart *et al.* 2008).

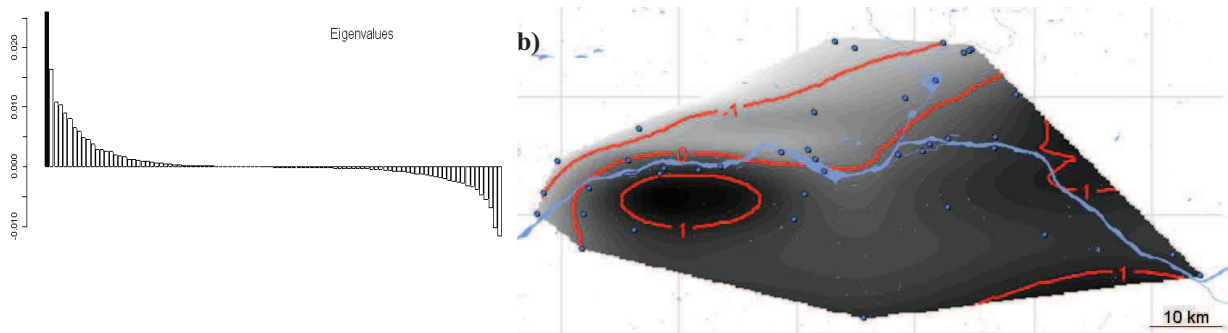


Figure IV.7 a) Synthèse des scores de l'ACPs, seul le premier axe (coloré en noir) est significativement informatif. b) Représentation des entités des scores dans l'espace par interpolation utilisant des niveaux de gris et des lignes de contour. Plus les lignes sont proches, plus la différenciation génétique est abrupte. Plus les zones sont claires plus les scores sont positifs, plus elles sont foncées, plus les scores sont négatifs.

Corrélativement, l'isolement par la distance a été testé. Le test de Mantel effectué sur GENETIX a révélé une corrélation extrêmement significative entre la distance géographique et la distance génétique ($Z = 56, p = 0,007$), indiquant un isolement par la distance sur la zone d'étude (figure IV.8). Ceci confirme la structure globale d'autocorrélation positive.

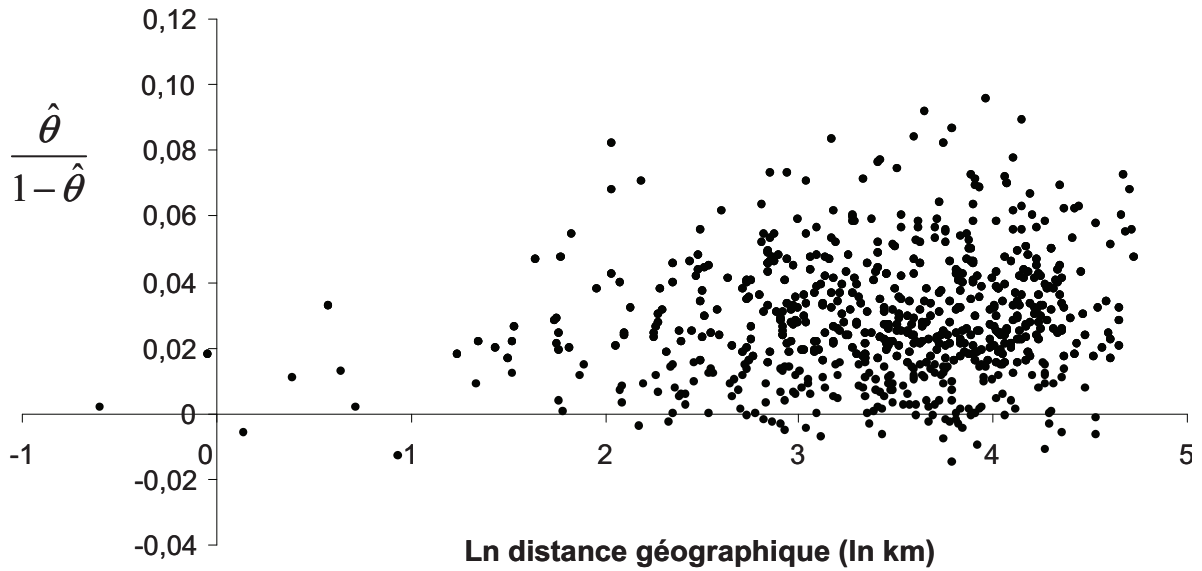


Figure IV.8 Représentation de la distance géographique en fonction de la distance génétique.

Les analyses menées au niveau individuel par le logiciel SPAGEDI confirment cet isolement par la distance, la pente de la droite de régression étant significative (tableau IV.7 et figure IV.9). L'estimation moyenne des F_{ij} sur les paires d'individus à l'intérieur d'un intervalle de distance diminue avec la distance et montre une rapide et significative réduction de la pente en deçà de 10 km. Le système semble montrer un équilibre migration-dérive (IBD) jusqu'à un seuil de 10 voire 30 km. La majorité de la dispersion se ferait donc sur de courtes distances, D'après le manque de structure à des distances plus longues, l'équilibre ne semble pas atteint pour de plus grandes échelles spatiales.

Tableau IV.7 Estimations des coefficients de parenté (Ritland 1996) F_{ij} sur les paires d'individus par intervalle de distance et valeur de la pente de la régression sur l'ensemble de la zone. Les seuils de significativité sont atteints pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,1$ (**) et $p < 0,01$ (***)

	0]0-10]]10-20]]20-30]]30-40]]40-50]]50-60]]60-120]	Pente de la régression (avec \ln_{distance})
F_{ij}	0,0126***	0,0009**	-0,0006	-0,0028***	-0,0017	-0,0009	-0,0002	-0,0015	-0,0008**

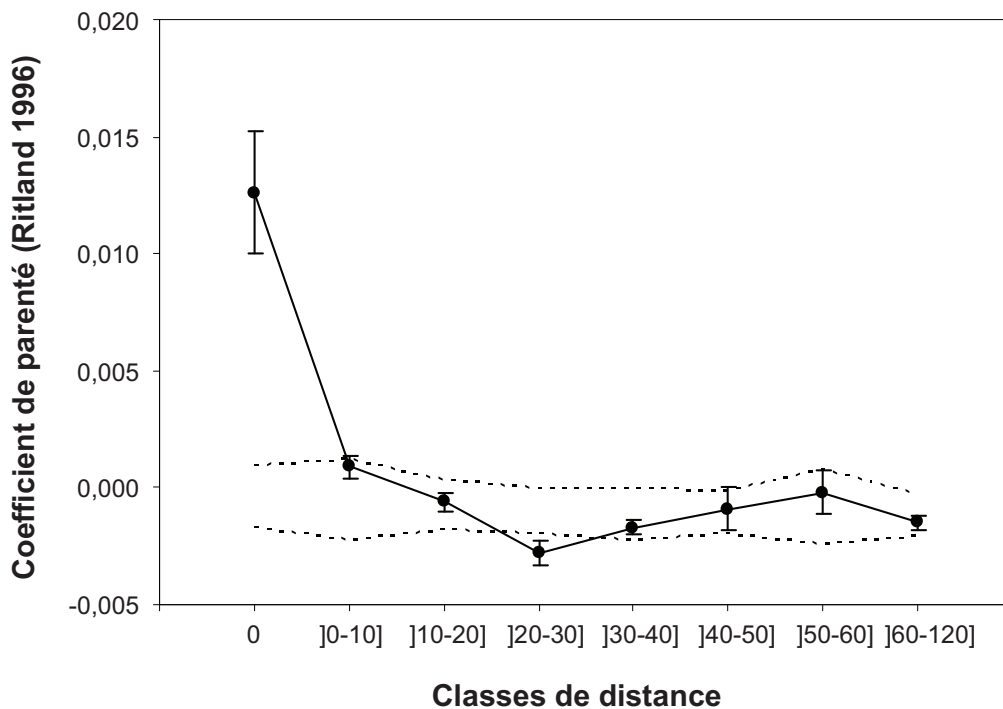


Figure IV.9 Corrélogramme des coefficients de parenté (Ritland 1996) en fonction des classes de distance effectué sur SPAGEDI. L'enveloppe en pointillés correspond à l'intervalle de confiance à 95% autour des valeurs.

Estimation bayésienne de la structure de population

L'utilisation du logiciel GENELAND n'a pas permis de détecter de regroupement à l'intérieur de la zone d'étude. Le nombre de populations le plus probable était de 1. Ce résultat peut être attendu dans le cas d'un isolement par la distance. En revanche, l'analyse réalisée avec le logiciel STRUCTURE 2.2 sur la totalité des échantillons suggère deux entités génétiques distinctes à partir de la méthode d'Evanno *et al.* (2005) (figure IV.10). Néanmoins, il existe une grande variabilité individuelle et seulement 58% des individus étaient assignés à un cluster ou à l'autre à un seuil de 90% (figure IV.11).

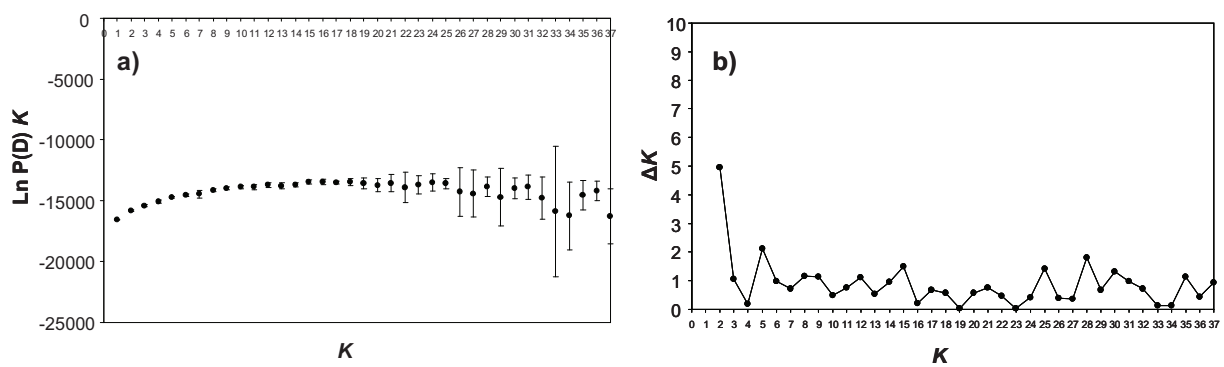


Figure IV.10 Résultat de la méthode d'assignation par clustering. a) Moyennes des vraisemblances ($\ln P(D)$) obtenues après 20 runs pour chaque valeur de K (où K représente le nombre de populations testées), les barres verticales représentant les écarts-types. C) La méthode d'Evanno *et al.* (2005) suggère que $K=2$ est le modèle qui correspond le mieux aux données pour une situation en admixtion.

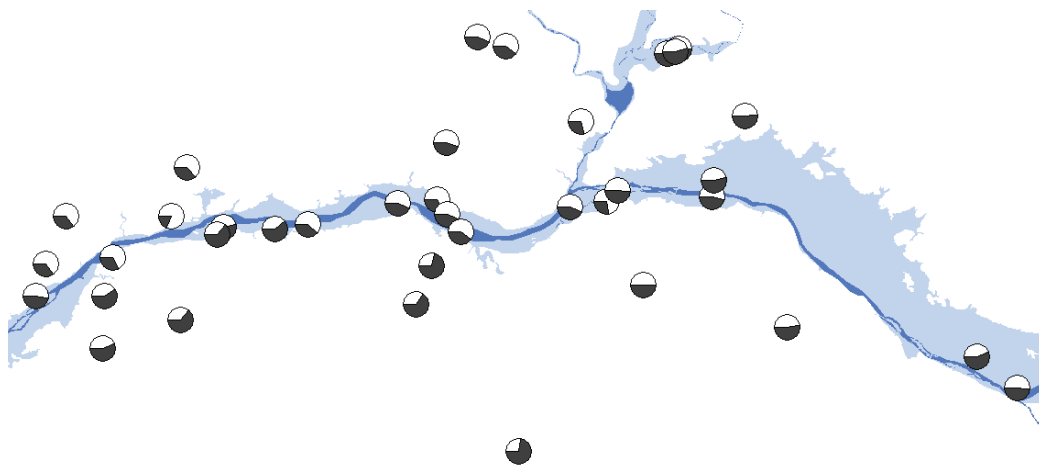






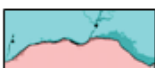
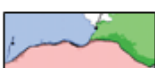
Figure IV.11 Distribution géographique des populations échantillonnées selon les probabilités d'assignation à chacun des deux groupes (symbolisés par les couleurs blanches et noires) identifiés par STRUCTURE 2.2.

Le logiciel BAPS regroupe aussi le jeu de données en deux clusters. La comparaison des probabilités individuelles obtenues avec STRUCTURE et avec BAPS selon le test pour données appariées de Wilcoxon a permis de corroborer les résultats obtenus avec ces deux méthodes ($Z = 1,653, p = 0,098$).

Effet des cours d'eau et de la topographie sur la structure de population

Les analyses de variance moléculaire effectuées sur GENETICSTUDIO pour chacune des six hypothèses sont présentées dans le tableau IV.8. Sans aucune barrière à la dispersion (H0), 97,5% de la variation est expliqué par des différences entre individus à l'intérieur des populations. Seul 2,5% est expliqué par des différences entre populations. Les AMOVA correspondant aux deux hypothèses suivantes (H1 et H2) mettent en évidence un effet du regroupement des sites par des régions qui seraient délimitées par la Loire et les BVA. Néanmoins, seuls 0,8% de la variation totale observée s'expliquerait par ces regroupements. Il est probable que l'effet de régionalisation observé soit confondu avec l'isolement par la distance mis en évidence précédemment. La topographie ne met pas en évidence de structure de population entre les sites de vallée et ceux de plateau (H0b). De fait, la significativité des AMOVA H2b et H3b s'explique sans doute par l'isolement par la distance.

Tableau IV.8 Résultat de l'AMOVA hiérarchique comparant la variance entre régions, à l'intérieur des sites de reproduction entre régions, et à l'intérieur des sites de reproduction, selon les six hypothèses testées. La significativité a été testée contre une distribution nulle de 999 permutations aléatoires.

	Source de variation	ddl	SE	Indices de fixation	Pourcentage de variation	P value
	HO					
	Entre pop	36	120,16		2,5 %	
	A l'intérieur des pop	1065	2012,25	$\Phi_{ST} = 0,025$	97,5 %	p < 0,001
	H1					
	Entre régions	1	11,21	$\Phi_{RT} = 0,008$	0,8 %	p < 0,001
	Entre pop à l'intérieur des régions	35	108,95	$\Phi_{SR} = 0,021$	2,1 %	p < 0,001
	A l'intérieur des pop	1065	2012,25	$\Phi_{ST} = 0,029$	97,1 %	p < 0,001
	H2					
	Entre régions	2	17,10	$\Phi_{RT} = 0,008$	0,8 %	p < 0,001
	Entre pop à l'intérieur des régions	34	103,06	$\Phi_{SR} = 0,020$	2,0 %	p < 0,001
	A l'intérieur des pop	1065	2012,25	$\Phi_{ST} = 0,028$	97,2 %	p < 0,001
	H0b					
	Entre régions	1	4,08	$\Phi_{RT} = 0,001$	0,1 %	NS
	Entre pop à l'intérieur des régions	35	116,08	$\Phi_{SR} = 0,025$	2,5 %	p < 0,001
	A l'intérieur des pop	1065	2012,25	$\Phi_{ST} = 0,025$	97,5 %	p < 0,001
	H1b					
	Entre régions	3	18,49	$\Phi_{RT} = 0,006$	0,6 %	p < 0,001
	Entre pop à l'intérieur des régions	33	101,67	$\Phi_{SR} = 0,021$	2,1 %	p < 0,001
	A l'intérieur des pop	1065	2012,25	$\Phi_{ST} = 0,026$	97,4 %	p < 0,001
	H2b					
	Entre régions	5	27,37	$\Phi_{RT} = 0,007$	0,7 %	p < 0,001
	Entre pop à l'intérieur des régions	31	92,80	$\Phi_{SR} = 0,019$	1,9 %	p < 0,001
	A l'intérieur des pop	1065	2012,25	$\Phi_{ST} = 0,026$	97,4 %	p < 0,001

D'après les estimations de F_{IS} (tableau IV.9), aucune de ces régions ne correspond à un regroupement panmictique. Contrairement à l'analyse au niveau du site de reproduction (*cf.* tableau IV.3), aucun de ces regroupements ne montre d'équilibre à Hardy- Weinberg.

Tableau IV.9 Estimation du déséquilibre à Hardy-Weinberg et seuils de significativité pour $p < 0,05$ (*) et $p < 0,01$ (*) , selon le regroupement des individus dans les différentes régions délimitées par les cours d'eau et/ou la vallée. Les F_{IS} ont été estimés pour toute la zone d'étude, le Sud de la Loire (S), le Nord de la Loire (N), le Nord de la Loire à l'Est et à l'Ouest (NO) du complexe des BVA (NE), la Vallée (V) et le Plateau (P) dans chacune de ces régions.**

Région	\hat{f}
Total	0,13***
S	0,14***
N	0,11***
NE	0,09***
NO	0,08***
V	0,11***
VN	0,05*
VNE	0,18***
VNO	0,15***
VS	0,14***
P	0,15***
PN	0,18***
PNE	0,33***
PNO	0,09***
PS	0,15***

L'analyse factorielle des correspondances réalisée sur les fréquences alléliques de l'ensemble des individus ne permet pas non plus d'isoler de façon évidente chacune des entités géographiques (figure IV.12).

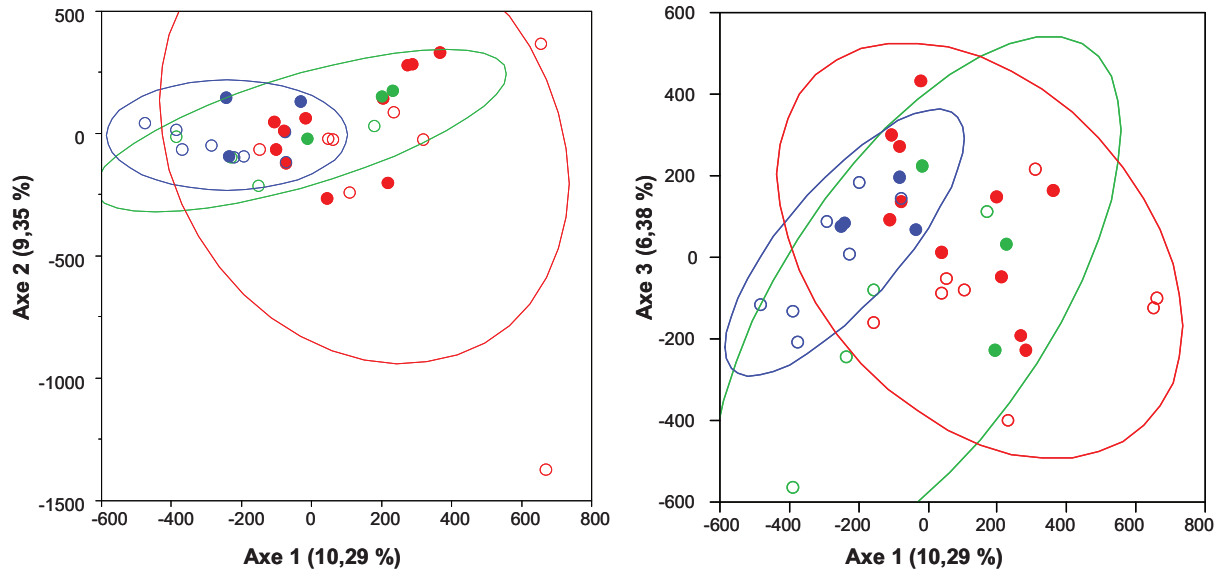


Figure IV.12 AFC réalisée sur les 37 populations échantillonnées dans le Nord-Ouest de la Loire (●), le Nord-Est (●) et le Sud (●). Les disques pleins indiquent les sites de vallée et les cercles de sites de plateau. Les Ellipses à 95% entourent chacun de trois groupements géographiques suivant le même code couleur.

Ainsi, la forte variabilité génétique des individus au sein des populations ne permet pas de discerner de façon claire une structure de populations. Un gradient de fréquence est suggéré par l'analyse en composante principale spatialisée et deux des trois méthodes d'assignation bayésiennes. Néanmoins, la position des sites selon les trois grandes régions géographiques (Sud, Nord-Est, Nord-Ouest de la Loire) n'explique qu'une infime proportion de la variabilité (0,8%). L'isolement par la distance semble être le facteur qui structure de façon prépondérante les populations de tritons sur la zone d'étude.

Rôle de la vallée dans le flux de gènes

Les résultats des simulations sont illustrés en figure IV.13. Il apparaît clairement que si le flux génique est moins important en plateau qu'en vallée, il est alors attendu que le F_{ST} en vallée soit plus faible.

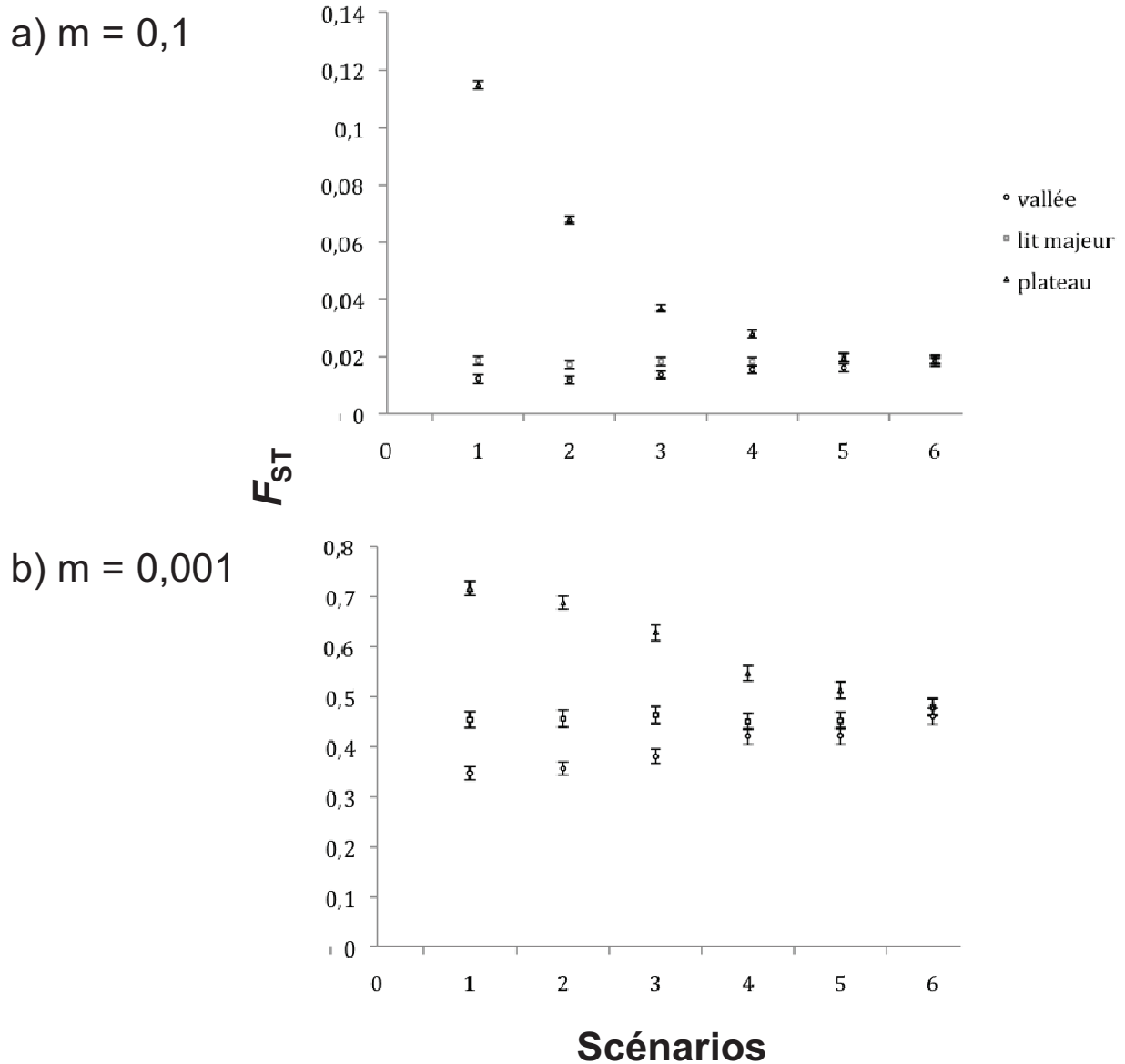


Figure IV.13 Simulations des F_{ST} entre sites de chaque strate (plateau, lit majeur et vallée) selon différents scénarios (valeurs de taille efficace, cf. tableau IV.1 et taux de migration (m)). Les simulations ont été réalisées sous SPLATCHE 1.1 (Currat *et al.* 2004)

Le test de Mantel avec hypothèse a indiqué une corrélation significative entre la distance génétique et les trois combinaisons de sites (Plateau-Plateau, Vallée-Plateau et Vallée-Vallée) en tenant compte de la distance géographique ($r = 0,211$, $p < 0,001$). Le test de Mann-Whitney réalisé sur l'estimation des F_{ST} suivant les deux types de combinaisons par paires de sites (Plateau-Plateau et Vallée-Vallée) s'est révélé extrêmement significatif ($U = 9347$, $p = 9,14 \cdot 10^{-6}$). La différenciation génétique entre deux sites de plateau est en moyenne significativement plus élevée par rapport à deux sites en vallée (figure IV.14).

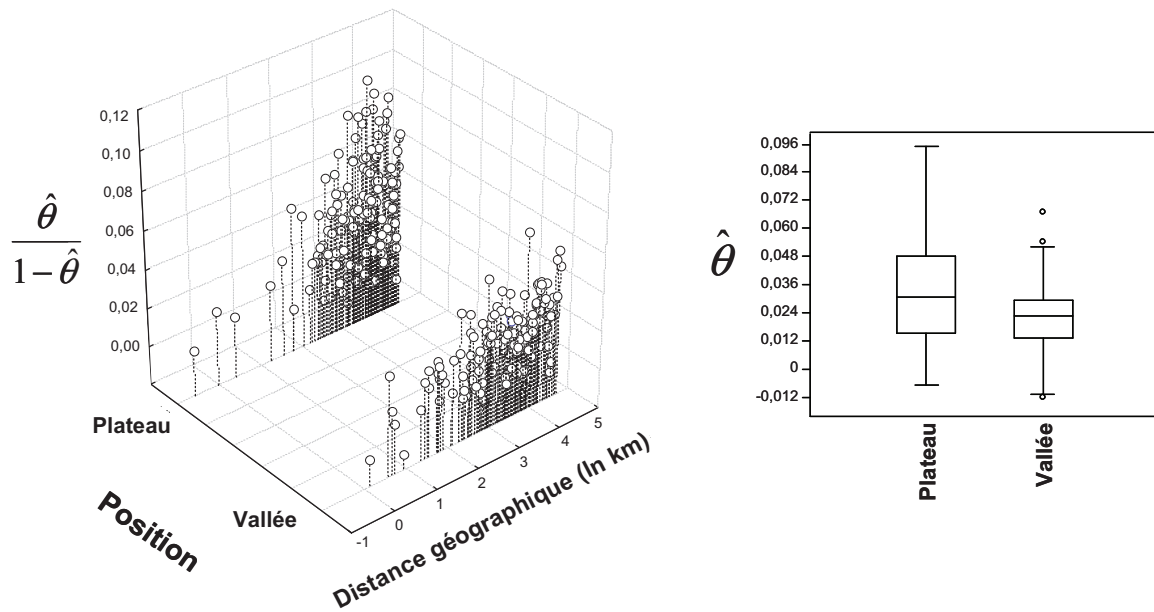


Figure IV.14 a) Estimation des F_{ST} en fonction de la position et de la distance géographique entre sites. b) Boîtes à moustache des estimations de F_{ST} suivant la position des sites.

Discussion

Les objectifs de cette étude étaient de comprendre comment s'organisaient les populations de tritons palmés à une échelle régionale, de tester l'existence d'une **structure** et d'évaluer l'influence éventuelle de grandes structures du **paysage** sur celle-ci. En particulier, nous avons voulu évaluer l'influence d'un paysage particulier, la **vallée alluviale**, sur le flux de gènes.

Un patron d'isolement par la distance et un fonctionnement en métapopulation

La structure génétique du triton palmé en vallée de la Loire semble être gouvernée par un patron global d'**isolement par la distance**. Ce patron est fréquemment rencontré dans l'étude des populations d'amphibiens chez lesquels la restriction géographique de la dispersion provoque l'accumulation de divergences génétiques entre populations (Knopp & Merilä 2009; Kuchta & Tan 2006; Rowe *et al.* 2000; Tallmon *et al.* 2000; Vos *et al.* 2001; Zamudio & Wiczorek 2007). La plupart des sites échantillonnés montrent un équilibre à Hardy-Weinberg sur les locus sans allèles nuls. Dans notre étude, chaque site de reproduction semble donc correspondre à un **dème**. En dépit de nombreuses différenciations génétiques (F_{ST}) par paires de sites, chacun reçoit ou envoie quelques migrants de ou dans les autres populations. Certaines populations se révèlent particulièrement actives, se comportant comme des populations sources, d'autres plutôt comme des populations puits. Les tailles efficaces sont très variables d'une population à une autre et quelques populations ont montré les signes d'un goulet d'étranglement récent, rendant compte de leur probabilité d'extinction. Ainsi, les populations de tritons palmés des Pays-de-Loire forment un ensemble de sites de reproductions partiellement isolés, connectés par des migrants occasionnels, avec des probabilités d'extinction substantielles, typiques d'un fonctionnement en **métapopulation**. De nombreux amphibiens, souvent peu dispersants, très philopatrics et utilisant des habitats de reproduction spatialement disjoints, présentent un fonctionnement en métapopulation (Jehle *et al.* 2005; Kinkead *et al.* 2007; Rowe *et al.* 2000; Zamudio & Wiczorek 2007 ; voir cependant Smith & Green 2005). Afin de préciser les dynamiques source-puits, la détermination de l'âge des individus a été expérimentées par squelettochronologie. Néanmoins, la modernisation de la technique n'a pas permis d'accéder à ces informations (*cf.* Annexe I),

conformément aux conclusions Miaud (1990) sur les limites de l'utilisation de la méthode chez le triton palmé.

Un flux génique relativement important

Les deux techniques d'assignation bayésienne assignent environ 77 à 80% des individus à leur population de capture, suggérant une **philopatrie** relativement importante. La grande variance à l'intérieur des populations (97,5% de la variance totale) était largement supérieure à la variance entre populations, suggérant que le flux de gènes des tritons palmés **diffuse** facilement dans la zone d'étude. La difficulté de conclure à partir des trois méthodes d'assignation bayésiennes (STRUCTURE, BAPS et GENELAND) indique que la zone d'étude est peu structurée pour cette espèce. La **valeur très faible des estimateurs de F_{ST}** est plutôt surprenante pour une espèce réputée pour avoir des capacités dispersives limitées (voir Smith & Green 2005). Le F_{ST} sur la zone d'étude (environ 120 km de long de Nantes à Montsoreau) est estimé à 0,027. Peu de données génétiques sont disponibles pour les espèces habitant cette région. Le triton ponctué *Lissotriton vulgaris* possède lui aussi une structure génétique globale très faible sur la zone d'étude ($\hat{\theta} = 0,028$, étude réalisée avec les mêmes marqueurs microsatellites) sur une zone de 90 km de long allant de Montsoreau à Liré. Au contraire, une étude génétique menée chez la grenouille agile *Rana dalmatina* a indiqué que deux sites de plateau éloignés de 13 km dans la même zone d'étude (au Nord de Saint-Georges-sur-Loire) montraient une différenciation génétique extrêmement significative estimée à 0,079 (Johanet 2005). Ce résultat est surprenant pour un amphibien, la plupart des études génétiques montrant de forts indices de différenciation à petite échelle (Alexandrino *et al.* 2000; Andersen *et al.* 2004; Bradley Shaffer *et al.* 2000; Cabe *et al.* 2007; García-París *et al.* 2000; Hitchings & Beebee 1997; Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005; Lampert *et al.* 2003; Larson *et al.* 1984; Monsen & Blouin 2003; Noël *et al.* 2007; Palo *et al.* 2004). En particulier les urodèles possèdent des capacités dispersives très limitées (voir la synthèse réalisée par Smith & Green 2005), les tritons palmés échantillonnés sur l'aire d'étude sont parmi ceux présentant les plus petites valeurs de différenciation génétique (figure IV.15).

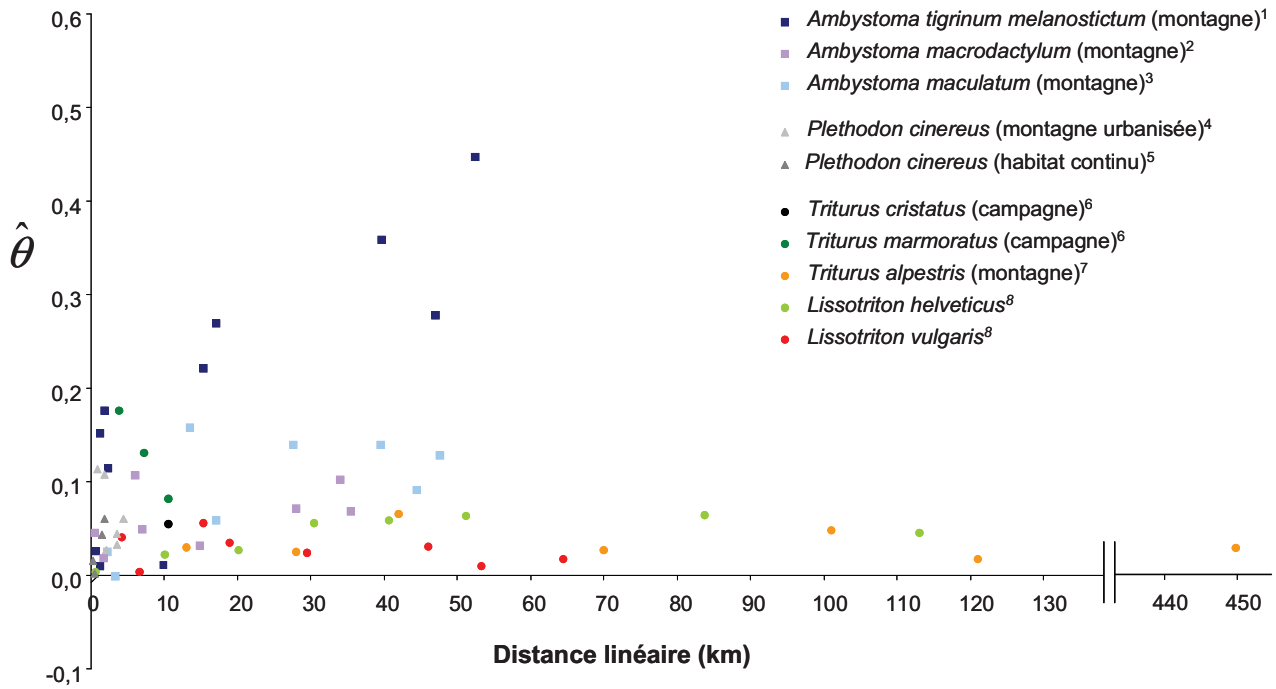


Figure IV.15 Estimations de F_{ST} par paires pour quelques espèces d'urodèles. ¹Spear *et al.* 2005; ²Giordano *et al.* 2007; ³Zamudio & Wiercivorek 2007; ⁴Noël *et al.* 2007; ⁵Cabe *et al.* 2007; ⁶Jehle *et al.* 2001; ⁷Pabijan & Babik 2006 ; ⁸présente étude

Par les techniques d'assignation bayésiennes, des migrations se sont révélées significatives entre des sites de tritons palmés distants de plusieurs dizaines de kilomètres. Outre le manque d'exactitude de GENECLASS pour détecter les migrants de première génération (Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005), il est peu probable que ces migrations récentes soient le fruit d'un seul individu. Ces ressemblances d'un site à un autre s'expliqueraient de façon plus rationnelle par le caractère aléatoire de la dérive génétique. En revanche, l'analyse des coefficients de parenté sur SPAGEDI indique que l'isolement par la distance est significatif pour des distances **inférieures à dix kilomètres**, suggérant un modèle de migration de **proche en proche**. De façon cohérente, Smith & Green (2005) suggèrent que pour les Urodèles et les Anoures, la différenciation entre populations n'apparaît probablement qu'au-delà de 10 km. Le triton palmé est une espèce particulièrement ubiquiste que l'on retrouve dans une très grande diversité d'habitats et de paysages (Denoël & Ficetola 2008; Denoël & Lehmann 2006; Duguet & Melki 2003; Jakob *et al.* 2003; Thorn & Raffaelli 2001). Ainsi nous pouvons facilement imaginer qu'il profite **des petits fossés et flaques pour la colonisation** dans une région bien drainée comme celle des Pays-de-Loire. En effet, il n'est pas rare de retrouver des individus de cette espèce en très petits effectifs dans n'importe quel site aquatique. En particulier, certains habitats aquatiques ne sont pas choisis par les adultes et seuls des juvéniles, potentiellement dispersants, sont retrouvés (A. Johanet observation personnelle).

Dans une comparaison entre deux anoues sympatriques au Royaume-Uni, Brede & Beebee (2004) ont montré qu'une augmentation de la connectivité entre populations chez la grenouille rousse *Rana temporaria* allait de paire avec une différenciation génétique significativement plus faible chez cette espèce par comparaison avec le crapaud commun *Bufo bufo*. Ceci s'expliquerait par la tendance de *R. temporaria* à se reproduire dans de nombreux petits sites plutôt qu'en grands effectifs dans quelques étangs seulement comme observé chez *B. bufo*. Une même tendance a été observée chez la salamandre marbrée *Ambystoma opacum* et la salamandre mole *Ambystoma talpoideum* chez lesquelles seulement 66.2% et 27.8% respectivement des individus avaient été assignés à leur population de capture (Kinkead *et al.* 2007). En dépit de faibles mouvements individuels (moins de 150 m), la grande variabilité à l'intérieur des populations (88,4% et 93,5% respectivement) suggère l'utilisation de nombreuses petites pièces d'eau pour la colonisation et l'homogénéisation du flux de gènes dans la Baie de Carolina. Comme proposé par ces derniers auteurs, chez des espèces philopatrides, sous certaines conditions ou avec des **dispersions de petite ampleur entre de nombreux sites**, les mouvements exercés à petite échelle (même quelques individus par génération) peuvent suffire à homogénéiser la population à l'échelle régionale.

Pas de barrières paysagères évidentes à la dispersion

Une structure globale explique la zone d'étude (ADEGENET). Un gradient de fréquence allélique est suggéré par l'analyse en composante principale spatialisée et deux des trois méthodes d'assignation bayésiennes (STRUCTURE et BAPS). Néanmoins, la position des sites selon les trois grandes régions géographiques (Sud, Nord-Est, Nord-Ouest de la Loire) n'explique qu'une infime proportion de la variabilité (0,8%). Ce découpage n'est d'ailleurs pas détecté par l'utilisation de la troisième méthode d'assignation bayésiennes (GENELAND).

Les **cours d'eau ne semblent donc pas structurer** de façon évidente les populations. Ce résultat est étonnant sachant la barrière à la dispersion que représentent souvent les cours d'eau (Alexandrino *et al.* 2000; Lampert *et al.* 2003; Marsh *et al.* 2007; Wagner *et al.* 2005). Marsh *et al.* (2005) ont étudié un cours d'eau ne faisant pas barrière à la dispersion des salamandres rayées *Plethodon cinereus*. Néanmoins, il était étroit (2 à 3 m de large) et était parsemé de végétation émergente au niveau de laquelle les salamandres pouvaient traverser sans faire face au courant. Pour un cours d'eau d'ordre 2 (5 à 7 mètres), 61% des salamandres réussissaient à le traverser à la nage suite à une expérience contrôlée de déplacement des individus. Cela suggérerait que le cours d'eau est plus une barrière comportementale que

physique. Les cours d'eau sillonnant la zone d'étude sont beaucoup plus larges. Néanmoins la largeur très variable (en particulier au niveau des bras) se réduit considérablement en période d'**étiage**, le faible débit et la colonisation par les végétaux émergés (lentilles, jussie) rendant l'hypothèse d'une traversée probable l'été. A l'inverse, la traversée du cours d'eau peut aussi avoir lieu en période de **crue**. Les inondations peuvent emporter les larves ou les œufs attachés à la végétation des pièces d'eau connectées au fleuve (Arntzen 1981; 1994; Bruce 1986; Hayes *et al.* 2006; Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005; Measey *et al.* 2007; Méndez *et al.* 2004; Thiesmeier 1994). Dans la vallée de la Loire, des organismes comme la jussie, plantes de milieu lentique, ont montré que le fleuve amplifiait les potentialités de colonisation (Ruaux *et al.* 2009).

Alors que chez les salamandre à longs doigts *Ambystoma macrodactylum* (Giordano *et al.* 2007), les salamandres tigrées *Ambystoma tigrinum melanostictum* (Spear *et al.* 2005) et les grenouilles tachetées de Colombie *Rana luteiventris* (Funk *et al.* 2005) les populations de plaine et celles de plateau étaient structurées, nous ne trouvons pas de telle différenciation chez les tritons palmés. Même si la topographie peut changer brusquement, principalement rive gauche (ex : 30 m de dénivelé sur 100 m de distance vers Gennes), les dénivelés ne sont pas aussi importants que ceux des montagnes du Montana ou du Wyoming. Le coût énergétique pour gravir les plateaux est sans doute négligeable à l'échelle des Pays-de-Loire.

Il est aussi possible que la vision actuelle que nous avons du flux de gènes chez cette espèce **ne reflète pas** encore le paysage actuel. En effet, la vallée de la Loire a fortement évolué depuis le siècle dernier (Dion 1934).

Les flux de gènes en vallée alluviale

Notre étude génétique indique que le **flux génique est facilité** entre les sites de reproduction situés dans la vallée alluviale par rapport à ceux situés sur le plateau. Ces différences sont observables malgré les faibles dénivelés par rapport à des études menées en contexte plus vallonné (Giordano *et al.* 2007; Tallmon *et al.* 2000). Les crues printanières de la Loire inondant les plaines adjacentes facilitant probablement les flux **passifs** de gènes (Arntzen 1981; 1994; Bruce 1986; Hayes *et al.* 2006; Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005; Measey *et al.* 2007; Méndez *et al.* 2004; Thiesmeier 1994). La dispersion peut aussi être facilitée par la **proximité des points d'eau** résultant du retrait des crues ou encore des dépressions où la nappe phréatique affleure dans le lit majeur du fleuve. Les petites zones humides (fossés, microtalwegs) le long des corridors ripariens augmentent le nombre de sources pour les

colonisateurs potentiels et offrent des refuges pour ces animaux, sensibles aux fluctuations de température et d'humidité (Duellman & Trueb 1994; Semlitsch & Bodie 1998). Ainsi, Arntzen (1981; 1994) a montré que les salamandres *Chioglossa lusitanica* peuvent effectuer de longues distances de migration parallèlement aux cours d'eau le long des berges humides. En outre, la **matrice paysagère** paraît plus favorable en vallée (prairies inondables) que sur les plateaux (champs cultivés, bâti). Le succès de migration dépend d'un habitat terrestre adéquat (Rothermel 2004). Ainsi, Joly *et al.* (2001) ont trouvé que l'abondance en tritons (*Triturus sp*) était positivement corrélée avec la superficie de secteurs non cultivés entre la mare et la forêt la plus proche dans un rayon de 400 m autour de la mare.

Les connexions dans la vallée alluviale semblent donc profiter à cette espèce amphibie pour le fonctionnement en métapopulation, la colonisation de nouveaux habitats et la recolonisation. En effet, quatre sites en vallée alluviale ont montré une recolonisation après un phénomène de réduction drastique des effectifs, sans doute lié au caractère imprévisible de la mise en eau de ces sites. Même si le triton palmé ne semble pas souffrir d'isolement en dehors de la vallée, le corridor naturel formé par la vallée alluviale peut profiter à de nombreuses espèces. Ainsi le triton crêté *Triturus cristatus*, espèce protégée par NATURA 2000, est très souvent retrouvé dans les chapelets de mare le long de la Loire (e.g. Boire de la Cireterie vers Montjean-sur-Loire, boires en pied de levée entre la Daguinière et Saint-Mathurin-sur-Loire). Ces considérations indiquent que les connexions naturelles doivent être conservées dans le lit majeur de la Loire pour permettre le fonctionnement en métapopulation et donc la persistance régionale des populations (Blaustein *et al.* 1994; Curtis & Taylor 2004; Gonzalez *et al.* 1998; Sjögren 1991).

Conclusion

L'isolement partiel des sites de reproduction, la petite taille de certaines populations, leur connectivité par des individus dispersants occasionnels et leur probabilité d'extinction/recolonisation indiquent l'existence d'une structure en **métapopulation** chez cet urodèle. La dispersion est influencée par le comportement de l'espèce et les caractéristiques paysagères. Les populations de tritons palmés sont caractérisées par une variabilité importante, des différenciations génétiques significatives mais peu fortes. Il semblerait que l'espèce, très ubiquiste, puisse **profiter de divers points d'eau** pour sa dispersion. En particulier, en **vallée alluviale**, les nombreuses pièces d'eau offrent de nombreux sites de

reproduction (mares) et corridors pour assurer la dispersion entre habitats terrestres et aquatiques (fossés, microtalwegs humides...). Dans le contexte particulier de la vallée alluviale, les populations sont directement soumises au risque d'extinction car la probabilité d'assèchement du site de reproduction est directement ou indirectement liée au régime du fleuve. Ces considérations soulèvent l'importance du fonctionnement en métapopulation pour la persistance régionale des populations et donc de l'importance de conserver des corridors dans la matrice paysagère ligérienne.

CHAPITRE V

FLUX DE GENES ET ADAPTATIONS

Introduction

La détermination de la contribution relative des différents processus évolutifs stochastiques et déterministes dans la maintenance de la diversité génétique des populations naturelles est une problématique majeure en biologie de la conservation depuis quelques dizaines d'années (Eldredge 1989; Mauricio 2005). De nombreuses études sur les conséquences génétiques de la sélection naturelle ont concentré leur attention sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Bernatchez & Landry 2003; Sommer 2005). Le CMH est un groupe de gènes connus pour être directement impliqués dans la **réponse immunitaire** chez les vertébrés, et la variation aux locus du CMH a été liée à la résistance et à la vulnérabilité aux maladies (Briles *et al.* 1977; Teacher *et al.* 2009). Chez la plupart des vertébrés, le CMH se compose de plusieurs locus qui se répartissent en quatre sous-groupes : classes I, II, III et IV (Gruen & Weissman 2001; Hughes & Yeager 1998). Les protéines codées par les locus du CMH de classe I et II forment des complexes avec des peptides antigéniques et les présentent à la surface des cellules aux récepteurs antigéniques des cellules T. Le CMH de classe I est principalement impliqué dans la présentation des antigènes de synthèse **endogène** comme les protéines virales, alors que le CMH de classe II est principalement impliqué dans la présentation des antigènes **exogènes**, tels que les bactéries (Bernatchez & Landry 2003).

L'expression des locus du CMH présente généralement de très hauts niveaux de **diversité** (Piertney & Oliver 2006). La grande diversité dans les locus du CMH pourrait procurer un avantage direct en permettant l'identification d'un plus grand nombre d'antigènes, et ainsi permettre à l'organisme de faire face à un plus large éventail d'agents pathogènes. Il a donc été proposé que la grande diversité aux locus du CMH soit maintenue par **sélection équilibrante** probablement causée par la coévolution entre hôtes et agents pathogènes. Une forme possible de sélection balancée est la **superdominance** (i.e. l'avantage hétérozygote), selon laquelle les hétérozygotes ont un avantage car ils peuvent faire face à un plus large éventail d'antigènes (Doherty & Zinkernagel 1975). Une autre hypothèse suggère que le polymorphisme serait maintenu par **sélection négative fréquence-dépendante**, dans laquelle les individus porteurs d'un nouvel allèle rare ont un avantage sélectif, car les agents pathogènes n'ont pas évolué de façon à échapper à leur surveillance (Clarke & Kirby 1966). Bien que la superdominance et la sélection négative fréquence-dépendante soient les modes de sélection les plus souvent proposés pour le CMH, il en existe d'autres. Par exemple, Jensen *et al.* (2008) ont mis en évidence une **sélection fluctuante** aux gènes du TAP (Transporteur associé à la maturation

antigénique) chez des populations de truite *Salmo trutta* au Danemark. La sélection fluctuante se produit quand un environnement hétérogène génère la sélection de différents allèles dans le temps et/ou dans l'espace (Hedrick 2002). La sélection fluctuante pourrait intervenir si un agent pathogène évolue rapidement, ou si différentes souches apparaissent dans différentes populations. La **sélection directionnelle** peut également s'appliquer au CMH. Dans ce cas, la propagation d'un allèle avantageux (i.e. sélection positive) devrait conduire à une perte de variabilité génétique. De même, la sélection contre les allèles délétères (i.e. sélection négative ou purifiante) devrait aussi conduire à une perte de diversité. La sélection directionnelle semble plus probable quand un agent pathogène unique impose une proportion importante de la sélection sur une espèce hôte particulière (Teacher *et al.* 2009).

En outre, les préférences d'**accouplement hétérogame** au CMH (Penn 2002), ainsi que la sélection prénatale chez les mammifères (Ober 1999) contribuent à maintenir des niveaux extrêmes de polymorphisme. Grâce à ces mécanismes, la diversité au CMH est souvent élevée, même chez les espèces ou populations où les marqueurs neutres indiquent une perte de variation génétique due à la dérive génétique (Aguilar *et al.* 2004; Van Oosterhout *et al.* 2006).

En raison de leur importance dans l'immunité et la valeur adaptative (i.e. *fitness*), les gènes du CMH font partie des régions du génome les plus étudiées chez les vertébrés (Horton *et al.* 2004). Cependant des recherches se sont portées principalement sur les mammifères (Kundu & Faulkes 2004; Wan *et al.* 2006), les oiseaux (Aguilar *et al.* 2005) et les poissons (Aguilar & Garza 2006). Chez les amphibiens, les études ont depuis longtemps mis l'accent sur des espèces modèles : Les xénopes (Kaufman *et al.* 1985; Ohta *et al.* 2006) et les ambystomes (Bos & DeWoody 2005; Laurens *et al.* 2001; Sammut *et al.* 1999; Sammut *et al.* 1997). De très récentes études de génétiques des populations (Babik *et al.* 2009; Babik *et al.* 2008; Bos *et al.* 2008; Hauswaldt *et al.* 2007; Teacher *et al.* 2009) mettent en évidence le rôle du CMH dans l'évolution des populations naturelles. En particulier, les amphibiens sont les vertébrés les plus menacés (Beebee & Griffiths 2005) et sont gravement affectés par les **pathogènes transportés par les espèces exotiques** (Picco & Collins 2008). Les changements climatiques aggravent ce risque en favorisant les maladies infectieuses (Pounds *et al.* 2006). Également menacées par la destruction et la fragmentation de leur habitat (Cushman 2006), les populations d'amphibiens pâtissent de la **réduction des tailles efficaces**. Parce que les petites populations sont en général essentiellement influencées par la dérive génétique, il devient intéressant d'étudier les potentialités de sélection chez ces types d'organismes (Lande 1988).

L'isolement des populations (conséquences de la philopatrie et de capacité de dispersion limitées) offrent des opportunités pour l'adaptation. Par conséquent, il est intéressant de tester le lien entre les flux de gènes et de l'adaptation dans ce phylum.

Le triton palmé *Lissotriton helveticus* (Razoumowsky 1789) est une espèce largement distribuée en Europe occidentale et est localement abondante. Très **ubiquiste**, il se reproduit dans une large gamme de milieux d'eau stagnante et parfois courante, incluant fossés, mares, étangs, marais, canaux, mares de pâture ou de terre agricole, mares de forêts, de lande et même dans les lacs de montagne et les milieux côtiers (Denoël & Ficetola 2008; Denoël & Lehmann 2006; Duguet & Melki 2003; Jakob *et al.* 2003; Thorn & Raffaelli 2001). Comme la majorité des amphibiens, il passe une grande partie du reste de l'année en milieu terrestre, dans des prairies, des bois ou des landes (Denoël & Ficetola 2008; Duguet & Melki 2003). La diversité des paysages qu'il occupe l'expose à une diversité d'agents pathogènes. Le triton palmé **s'hybride** parfois avec le triton ponctué *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus 1758) l'introgession entre les deux espèces a été détectée en utilisant des allozymes (Arntzen *et al.* 1998) et des microsatellites (CHAPITRE III).

Nous avons étudié ici les potentialités de sélection dans les populations naturelles de tritons palmés à un gène du **CMH de classe II**. Nous nous sommes intéressés à la variabilité du second exon du CMH de classe II (que nous appellerons par la suite CMH-*DAB*) qui code pour la synthèse des acides aminés impliqués dans la présentation antigénique. Cette région est la plus polymorphe du CMH de classe II (Babik 2008; 2009). Il est nécessaire avant tout d'étudier les potentialités d'introgession avec le triton ponctué. Les objectifs de cette étude étaient (ia) de comparer la diversité et la structure au locus CMH-*DAB* avec celles aux locus microsatellites (*i.e.* locus neutres) dans les populations naturelles de tritons palmés et (ib) d'identifier les potentialités de sélection. Cette étude est encore en cours puisque le séquençage des allèles n'est pas achevé. Nous présentons dans ce chapitre les résultats préliminaires obtenus avec l'étude des fréquences alléliques.

Matériel et méthodes

Echantillonnage

Les individus utilisés dans cette étude sous un sous-échantillonnage de ceux génotypés précédemment avec les microsatellites (CHAPITRE III et IV). Nous avons analysé 21 sites de prélèvement de tritons palmés (8 échantillonnés en Pays-de-Loire et 13 échantillonnés ailleurs en Europe) et quatre sites de tritons ponctués (2 échantillonnés en Pays-de-Loire et 2 échantillonnés ailleurs en Europe) (figure V.1). Les effectifs utilisés sont indiqués dans le tableau V.1. Les procédés d'échantillonnage, d'extraction d'ADN et de génotypage des microsatellites ont été précédemment détaillés (CHAPITRE II et III).

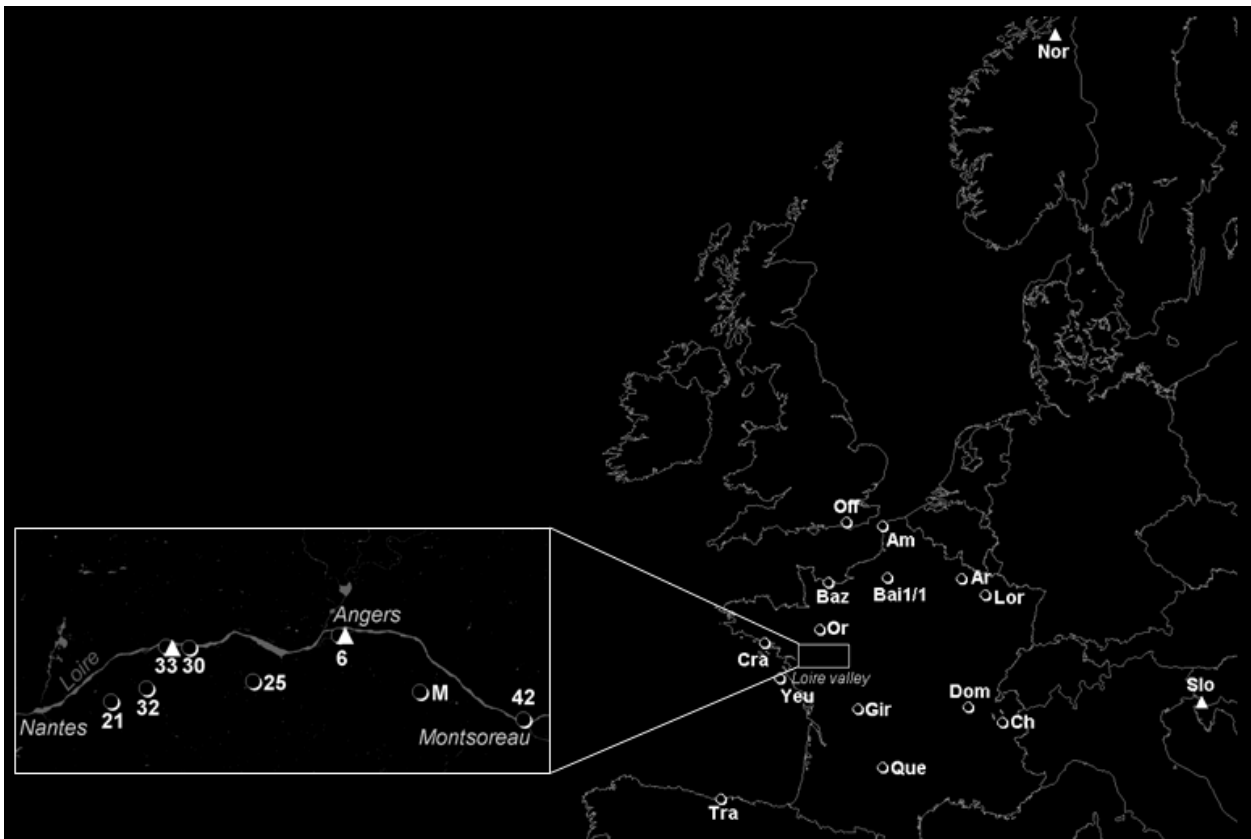


Figure V.1 Localisation des sites échantillonnés de tritons palmés (ronds blancs) et tritons ponctués (triangles noirs) en Pays-de-Loire et en Europe.

Analyses génétiques

Nous avons testé toutes les paires d'amorces développées pour amplifier un gène de l'exon 2 du CMH de classe II (que nous appellerons par la suite CMH-DAB) pour le triton alpestre *Mesotriton alpestris* (Babik *et al.* 2008). TrCMHIII1F et TrCMHIII1R (séquences) ont été sélectionnées car elles amplifiaient toutes les espèces de tritons testés. Les séquences ont été amplifiées sur les individus échantillonnés de tritons palmés et ponctués selon Babik *et al.* (2008) à une température d'hybridation de 58°C.

Le polymorphisme de conformation simple brin a été mis en évidence par électrophorèse capillaire non dénaturante (SSCP) avec amorces fluorescentes. Deux microlitres du produit de PCR dilué 20 fois ont été mélangés avec 0,2 mL de marqueur de taille GeneScan Liz 500 (ABI), 0,2 mL d'hydroxyde de sodium 3N et 8,7 mL de formamide, dénaturés à 95° C pendant 3 min, refroidis sur la glace pendant 2 min et séparés sur séquenceur capillaire ABI Prism 3100. Nous avons utilisé le polymère non dénaturant GeneScan (ABI) à 5% avec 10% (w/v) de glycérol et un tampon électrophorétique 1X avec EDTA (ABI). Les échantillons ont été injectés pendant 15 s. L'électrophorèse a été réalisée à 15 kV et 20° C. Le logiciel GeneMapper 3.7 (ABI) a été utilisé pour la lecture des haplotypes. Tous les allèles différents ont été séquencés. Pour les allèles qui ne se retrouvaient qu'à l'état hétérozygote, les deux allèles ont été séparés sur un gel non dénaturant de polyacrylamide puis révélés au nitrate d'argent selon les mêmes procédures que pour la migration et la révélation de l'ADN mitochondrial (cf. CHAPITRE II). Le séquençage a ensuite été effectué à la plate-forme de séquence OUEST-génopole de la faculté de médecine de Nantes en utilisant un séquenceur capillaire ABI 3130 (Applied Biosystems).

Analyses du polymorphisme au locus du CMH-DAB

Les séquences des allèles identifiés ont été corrigées sous BioEdit (Hall 1999). Elles ont ensuite été alignées par la procédure ClustalW (Thompson *et al.* 1994) avec des séquences d'urodèles disponibles sur la banque mondiale de séquences génétiques NCBI (*Mesotriton alpestris* EU512175, EU512177, EU512209 à EU512211, EU512213 ; *Triturus cristatus* FJ448022 à FJ448026, FJ448028 ; *Ambystoma mexicanum* EF585228 à EF585232 ; *Ambystoma tigrinum* DQ071905, DQ071911, DQ071912, DQ125478 à DQ125480). L'alignement a ensuite été importé sous PAUP* 4.10 (Swofford 1998) pour analyses phylogénétiques suivant la méthode de maximum de vraisemblance après test du modèle sous

Modeltest (Posada & Crandall 1998). La robustesse des nœuds a été testée par bootstrap (100 répétitions).

Cependant, le séquençage n'a pu être réalisé que sur six individus homozygotes choisis dans un premier test pour identification du locus amplifié. Les autres haplotypes identifiés par SSCP n'ont pu pour l'instant être séquencés. Ainsi les analyses de polymorphisme moléculaire n'ont donc pas été possibles au moment de la rédaction du présent manuscrit. Un séquençage est en cours actuellement ce qui devrait permettre une analyse plus approfondie de la variation moléculaire à ce locus. Les prochaines analyses ne sont donc basées que sur les variations de fréquences alléliques des haplotypes identifiés par SSCP.

Les hétérozygoties observées et attendues des allèles identifiés par SSCP ainsi que les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été analysés en utilisant le logiciel GENETIX v 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). La significativité des estimateurs f' de F_{IS} (Weir & Cockerham 1984) a été testée en utilisant la procédure de permutation des allèles à l'intérieur de chaque population à l'aide du logiciel GENETIX (1000 permutations). La richesse allélique R_S , qui permet les comparaisons lorsque les tailles de populations varient, a été calculée en utilisant FSTAT (Goudet 2001).

La structure génétique de population a été estimée, d'une part sur l'ensemble de la zone étudiée, et d'autre part site par site, à l'aide de l'estimateur $\hat{\theta}$ du F_{ST} (Weir & Cockerham 1984) et a été testée par permutation globale des individus à l'aide du logiciel GENETIX (1000 permutations). Une analyse factorielle a été réalisée sur GENETIX. L'isolement par la distance été testé par le test de Mantel (1967) implémenté par XLSTAT v 4.03 (Addinsoft 2009) après 1000 permutations aléatoires de l'ordre des populations dans la matrice génétique ($\hat{\theta} / 1 - \hat{\theta}$) ou géographique (\ln_{distance}). Une analyse factorielle a été réalisée sur GENETIX. L'illustration des fréquences alléliques par site a été réalisée sous GSTUDIO (<http://dylab.bio.vcu.edu>).

Pour tester la neutralité multiallélique au locus du CMH-DAB, le test de Raufaste-Bonhomme, tel que décrit dans Arnaud-Haond *et al.* (2003) a été utilisé grâce au programme NEUTRALLEX (<http://www.genetix.univ-montp2.fr/neutrallex.htm>). Ce test est basé sur la comparaison de deux estimateurs du F_{ST} : le $\hat{\theta}_{WC}$ de Weir et Cockerham (1984) et le $\hat{\theta}_{RH}$ de Robertson et Hill (1984). Cette comparaison est résumée dans le paramètre $\Delta = \hat{\theta}_{WC} - \hat{\theta}_{RH}$. En effet, la sélection à un locus est censée modifier la distribution de ses allèles par rapport à un attendu neutre (Raufaste & Bonhomme 2000). Or les deux estimateurs du F_{ST} ne pondèrent

pas les allèles rares de la même manière. Ainsi la différence entre ces deux estimateurs est-elle censée s'éloigner de l'attendu neutre en cas de sélection. La distribution de Δ est simulée sous un modèle de pas japonais. Mille simulations ont été effectuées.

Afin d'identifier le type de sélection au locus du CMH-*DAB*, l'approche utilisée est celle proposée par Beaumont et Nichols (1996) implémentée dans FDIST2 (<http://www.rubic.rdg.ac.uk/~mab/software.html>). Chacune des 20 000 simulations incluait 38 individus par population, 21 populations, 7 locus et un F_{ST} attendu de 0,131. Cette méthode met en évidence la sélection équilibrante ou directionnelle selon la présence d'outliers possédant des valeurs de F_{ST} respectivement plus faibles ou plus fortes qu'attendues en contrôlant par l'hétérozygotie.

Le programme GESTE (Foll & Gaggiotti 2006) a été utilisé pour identifier les facteurs environnementaux influençant potentiellement la structure génétique des populations. Ce programme utilise une méthode Bayésienne pour évaluer l'effet des facteurs biotiques et abiotiques (distances géographiques, occupation du sol, inondabilité, altitude) sur la structure génétique des populations.

Résultats

Phylogénie des séquences de CMH-DAB

L'analyse des modèles de substitution nucléotidique au sein des séquences de l'exon 2 d'un gène codant pour le CMH classe II a permis de retenir le modèle de Felsenstein (1981) avec distribution gamma de paramètre $k = 0,444$. La reconstruction phylogénétique par maximum de vraisemblance avec 100 rééchantillonnages par bootstrap est illustrée en figure V.2. Les séquences issues du triton palmé (Am1, Ch1 et Ch31) ne forment pas un groupe monophylétique, pas plus que celles provenant des *Ambystoma*. Les valeurs de bootstrap aux nœuds comportant les séquences de tritons palmés sont toujours très faibles.

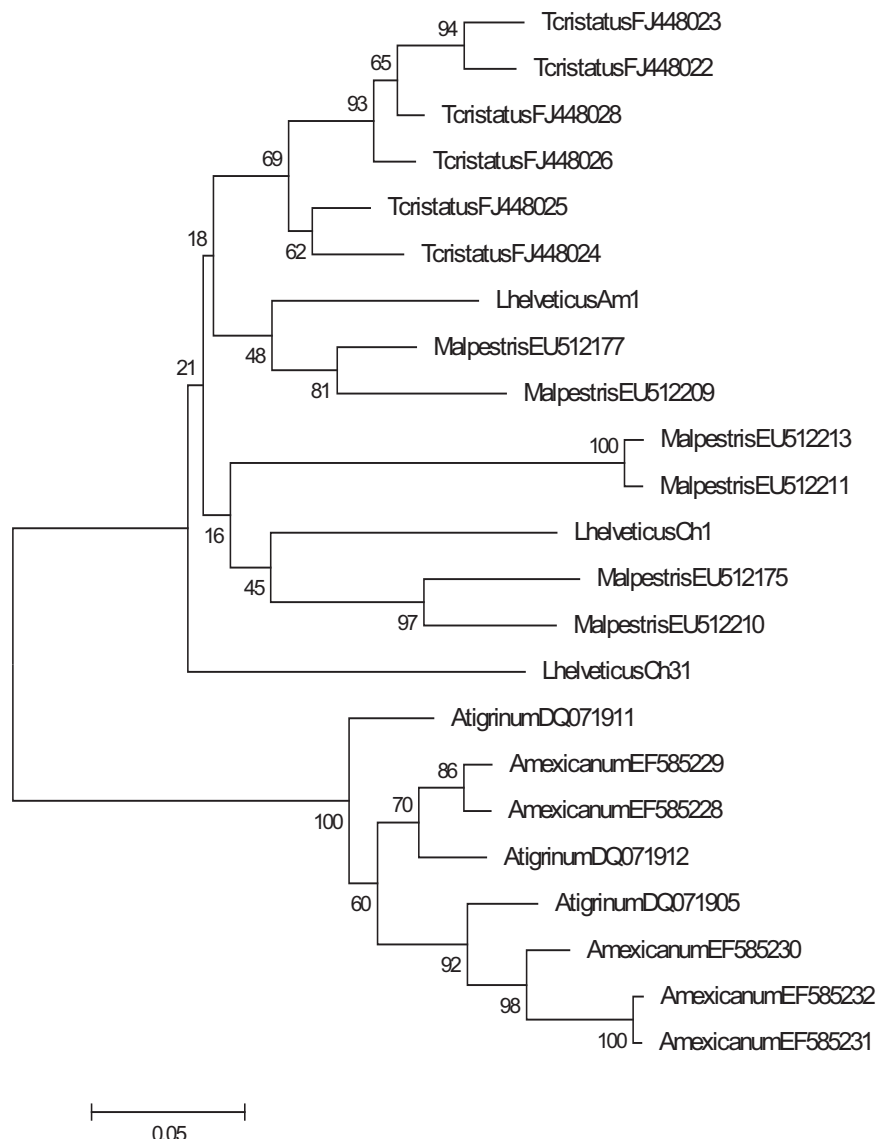


Figure V.2 : Arbre de maximum de vraisemblance de l'exon 2 du gène codant pour le CMH classe II chez les urodèles. Les valeurs de bootstrap indiquées aux nœuds ont été réalisées à partir de 100 rééchantillonnages.

Diversité au locus du CMH-DAB

Sur les 521 individus de tritons palmés *Lissotriton helveticus* échantillonnés dans les 21 populations, 29 allèles différents ont été détectés au locus du deuxième exon du CMH de classe II (CMH-DAB). Trente-trois allèles ont été détectés sur les 94 individus de tritons ponctués échantillonnés sur les quatre populations (deux populations en Pays-de-Loire, une en Suède, une en Slovénie). Néanmoins, aucun allèle n'a été trouvé en commun entre les deux espèces.

Chez le triton palmé, la richesse allélique est environ de six allèles par population (écart-type = 2) (tableau V.1). Un déficit en hétérozygotes a été détecté ($H_O = 0,21$ en moyenne ; écart-type = 0,63) pour les 21 populations qui s'écartent toutes de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Tableau V.1 Taille de l'échantillon (N), hétérozygoties observées et attendues (H_E , H_O), estimation de l'écart à Hardy-Weinberg (F_{IS}) et richesse allélique (R_S) pour le locus du CMH-DAB de classe II dans les populations de tritons palmés (Lh) et ponctués (Lv). Dans la dernière colonne, les valeurs moyennes calculées pour les six locus microsatellites sont présentées pour les mêmes individus.

Pop	Location	sp	N	CMH				Microsatellites				Echantillonneur
				H_O	H_E	\hat{f}	R_S	H_O	H_E	\hat{f}	R_S	
6	St-Maurille	<i>Lh</i>	16	0,06	0,44	0,86	5,7	0,39	0,65	0,41	3,7	Johanet A.
21	le Loroux Botreau	<i>Lh</i>	26	0,15	0,34	0,56	4,3	0,38	0,67	0,44	4,1	Johanet A.
25	Ste-Christine	<i>Lh</i>	25	0,16	0,55	0,72	6,4	0,37	0,64	0,43	4,1	Johanet A.
30	St-Florent-le-Vieil	<i>Lh</i>	21	0,05	0,64	0,93	4,0	0,38	0,65	0,43	4,6	Johanet A.
32	St-Laurent-des-Autels	<i>Lh</i>	29	0,07	0,50	0,86	4,0	0,40	0,67	0,40	4,4	Johanet A.
33	Liré	<i>Lh</i>	27	0,00	0,38	1,00	3,5	0,46	0,71	0,36	4,4	Lemaire C.
42	Varennnes-sur-Loire	<i>Lh</i>	21	0,10	0,57	0,84	5,4	0,34	0,73	0,55	4,6	Johanet A.
Am	Pas-de-Calais	<i>Lh</i>	23	0,22	0,70	0,70	5,7	0,43	0,62	0,30	3,6	Arntzen P.
Ar	Ardennes	<i>Lh</i>	25	0,40	0,83	0,53	8,3	0,34	0,56	0,40	3,7	Patrelle C.
Bai	Oise	<i>Lh</i>	26	0,12	0,69	0,84	4,4	0,23	0,49	0,54	3,3	Grossiord F.
Ch	Châteauneuf	<i>Lh</i>	27	0,11	0,53	0,79	4,5	0,27	0,50	0,47	3,5	Miaud C.
Cra	Crach	<i>Lh</i>	20	0,25	0,72	0,66	6,8	0,28	0,53	0,48	3,8	Henrio D.
Dom	Dombes	<i>Lh</i>	35	0,14	0,52	0,73	4,9	0,34	0,61	0,44	3,3	Joly P.
Gir	Dordogne	<i>Lh</i>	28	0,18	0,57	0,69	5,0	0,32	0,63	0,50	3,3	Monguillon A.
Lor	Lorraine	<i>Lh</i>	21	0,57	0,73	0,22	9,1	0,43	0,57	0,26	4,3	Oger F.
M	Milly	<i>Lh</i>	30	0,20	0,61	0,68	5,9	0,30	0,59	0,50	3,1	Secondi J.
Off	Sussex	<i>Lh</i>	16	0,25	0,65	0,63	5,7	0,37	0,58	0,39	3,3	Beebee T.J.C.
Or	Mayenne	<i>Lh</i>	24	0,25	0,78	0,68	7,0	0,35	0,70	0,51	4,3	Johanet A.
Que	Causses du Quercy	<i>Lh</i>	26	0,15	0,54	0,72	4,6	0,29	0,62	0,54	3,7	Marty P.
Tra	Tramalón. Spain	<i>Lh</i>	30	0,13	0,38	0,65	4,6	0,24	0,54	0,57	3,3	Diego-Rasilla F.J.
Yeu	Ile d'Yeu	<i>Lh</i>	25	0,40	0,75	0,47	5,3	0,30	0,65	0,56	3,0	Zannetty G.
6	St-Maurille	<i>Lv</i>	14	0,36	0,87	0,60	9,0	0,27	0,56	0,52	4,2	Johanet A.
33	Liré	<i>Lv</i>	22	0,68	0,85	0,20	9,7	0,17	0,61	0,73	4,1	Lemaire C.
Nor	Norway	<i>Lv</i>	31	0,16	0,62	0,74	5,6	0,24	0,49	0,53	3,3	Skei J.K.
Slo	Sloveny	<i>Lv</i>	27	0,15	0,90	0,84	11,7	0,28	0,57	0,53	4,8	Lužnik M.

Au niveau de l'aire de répartition, le locus du CMH-*DAB* est aussi polymorphe que les locus microsatellites les plus polymorphes, contrairement à un niveau plus régional (figure V.3 a et b). L'hétérozygotie observée est toujours plus basse au locus du CMH-*DAB* qu'aux locus microsatellites quelque soit l'échelle étudiée (figure V.3 c et d).

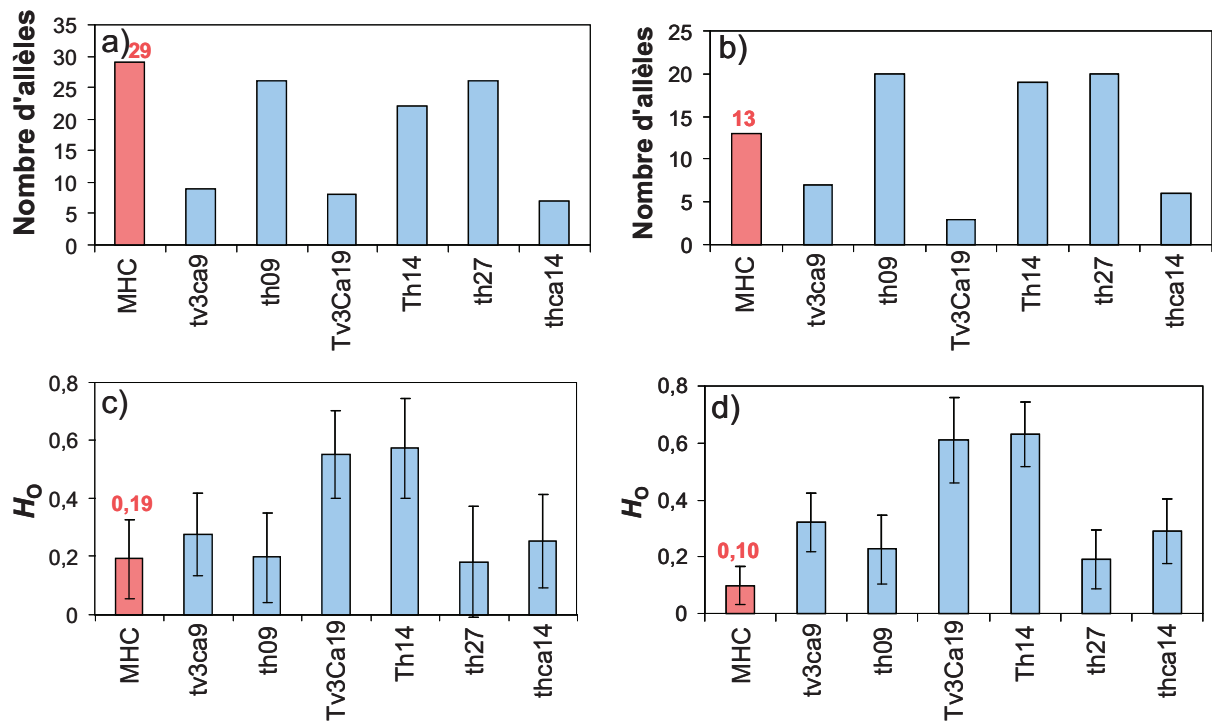


Figure V.3 Richesse allélique et hétérozygoties observées aux locus CMH-*DAB* et microsatellites sur la totalité des sites en Europe (a et c) et sur les sites ligériens (b et d).

Structure génétique au locus du CMH-DAB

L'analyse factorielle des correspondances (AFC) regroupe d'une part les populations du sud de l'aire de répartition (en bleu turquoise sur la figure V.4) et d'autre part les populations les plus nordiques (en rouge). La population insulaire de l'île d'Yeu (orange) se retrouve seule au centre de l'AFC.

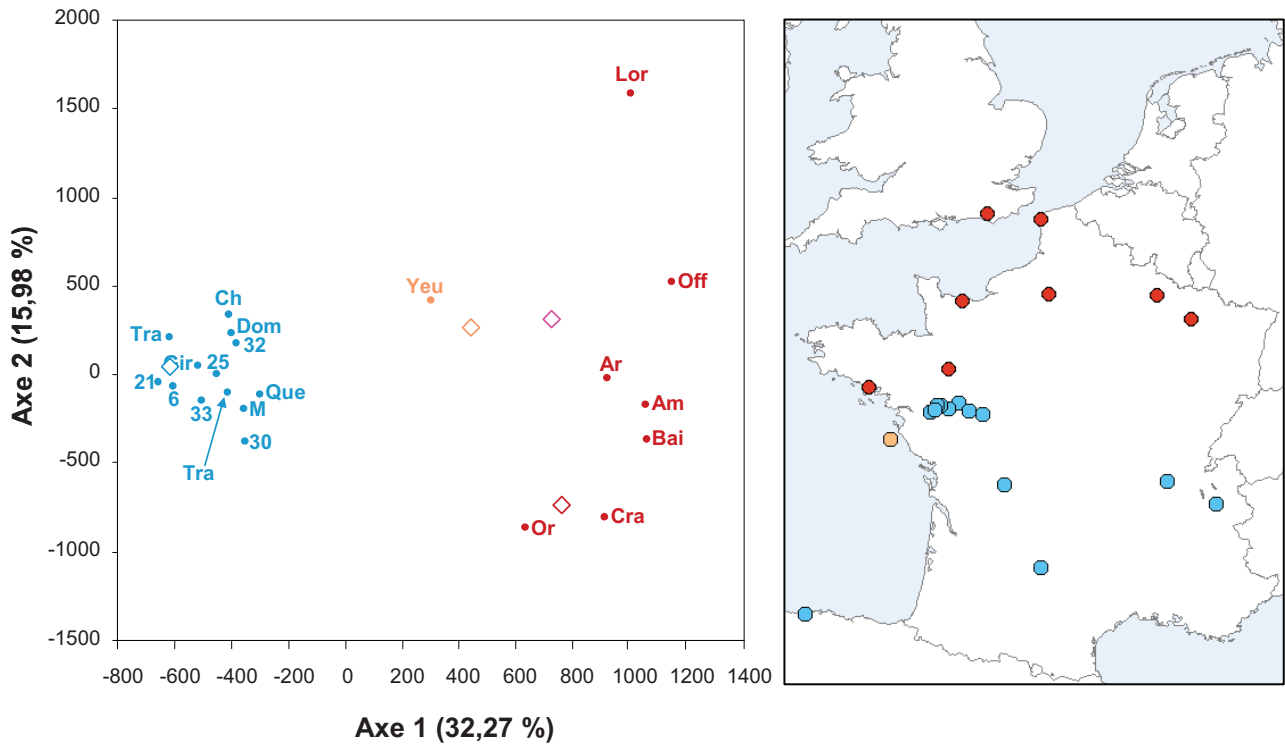


Figure V.4 Analyse factorielle des correspondances sur le locus CMH-DAB (les diamants représentent la position des quatre allèles majoritaires décrits plus bas) et cartographie des sites selon les couleurs utilisées dans l'AFC.

La répartition des fréquences alléliques est illustrée dans la figure V.5. Quatre allèles sont majoritairement représentés : l'allèle 100 (rouge sur le graphique) et l'allèle 125 (rose foncé) caractérisent plutôt les populations du Nord de l'aire de répartition. L'allèle 110 (bleu turquoise) est plutôt retrouvé dans les populations du Sud. L'allèle 101 (orange) est faiblement représenté sur l'aire de répartition, à part dans la population insulaire de l'île d'Yeu où il atteint 26%.

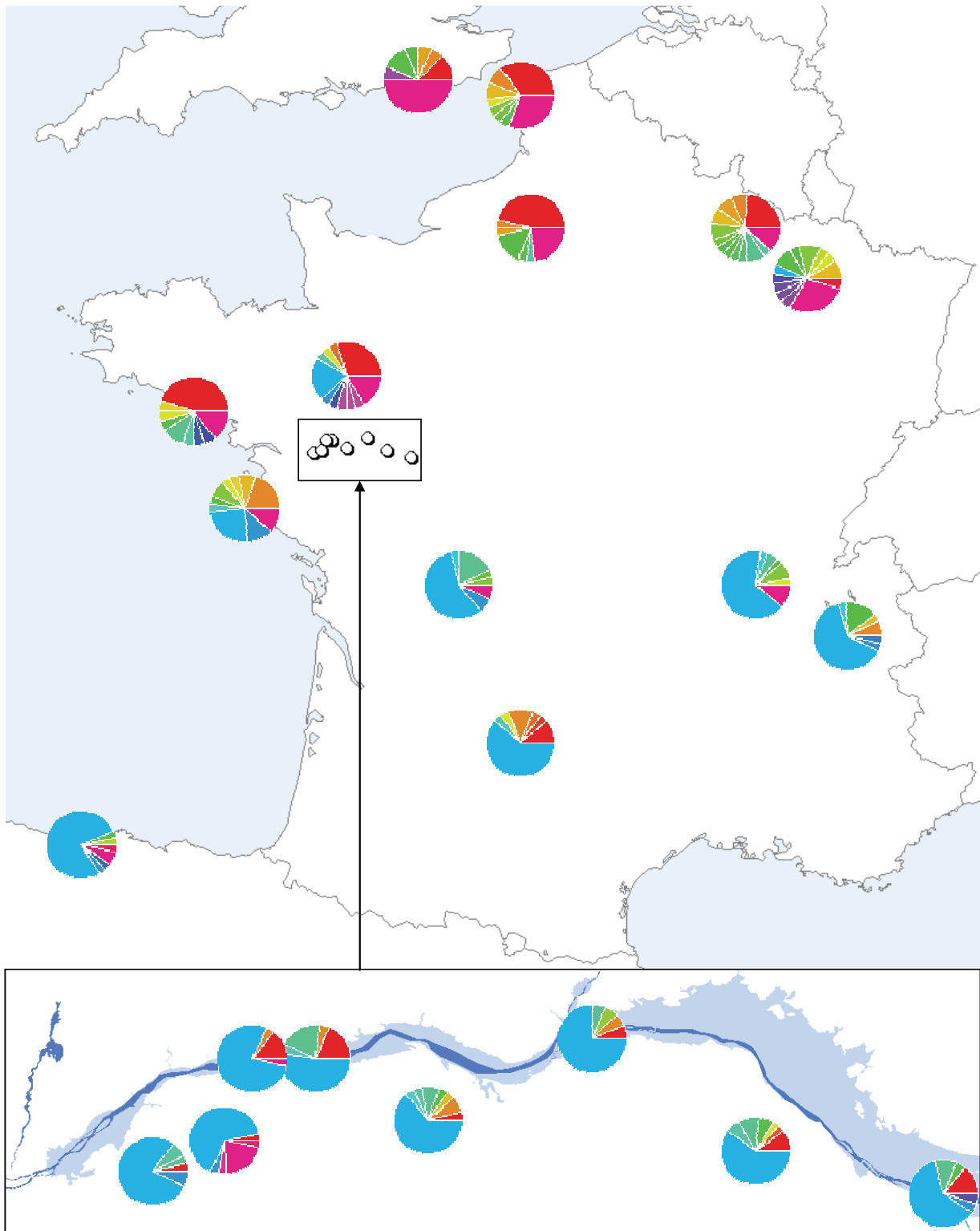


Figure V.5 Fréquences des 29 allèles au locus du CMH-DAB par population de tritons palmés.

Les estimations de F_{ST} par paires de sites sont représentées dans le tableau V.2. Elles varient de -0,03 à 0,08 en Pays-de-loire et jusqu'à 0,49 dans le reste de l'aire de répartition. 65% des valeurs entre sites montrent une différenciation significative. Globalement, le CMH-*DAB* montre plus de structure à l'échelle de l'aire de répartition ($\hat{\theta} = 0,18$) qu'avec les locus neutres (figure V.6 a). Au contraire, à l'échelle régionale (figure V.6 b) la structure au locus CMH-*DAB* est plus faible ($\hat{\theta} = 0,01$) que celle calculée sur l'ensemble des locus microsatellites. Tout comme avec les marqueurs microsatellites, la structure au locus CMH-*DAB* répond à un modèle d'isolement par la distance à l'échelle de l'aire de répartition (Test de Mantel $Z = 589,65$, $p=0,005$) (figure V.6 c). Cependant contrairement à ce qu'on observe aux locus microsatellites, une telle relation n'est pas détectable à l'échelle régionale (Test de Mantel $Z = 1,464$, $p = 0,909$).

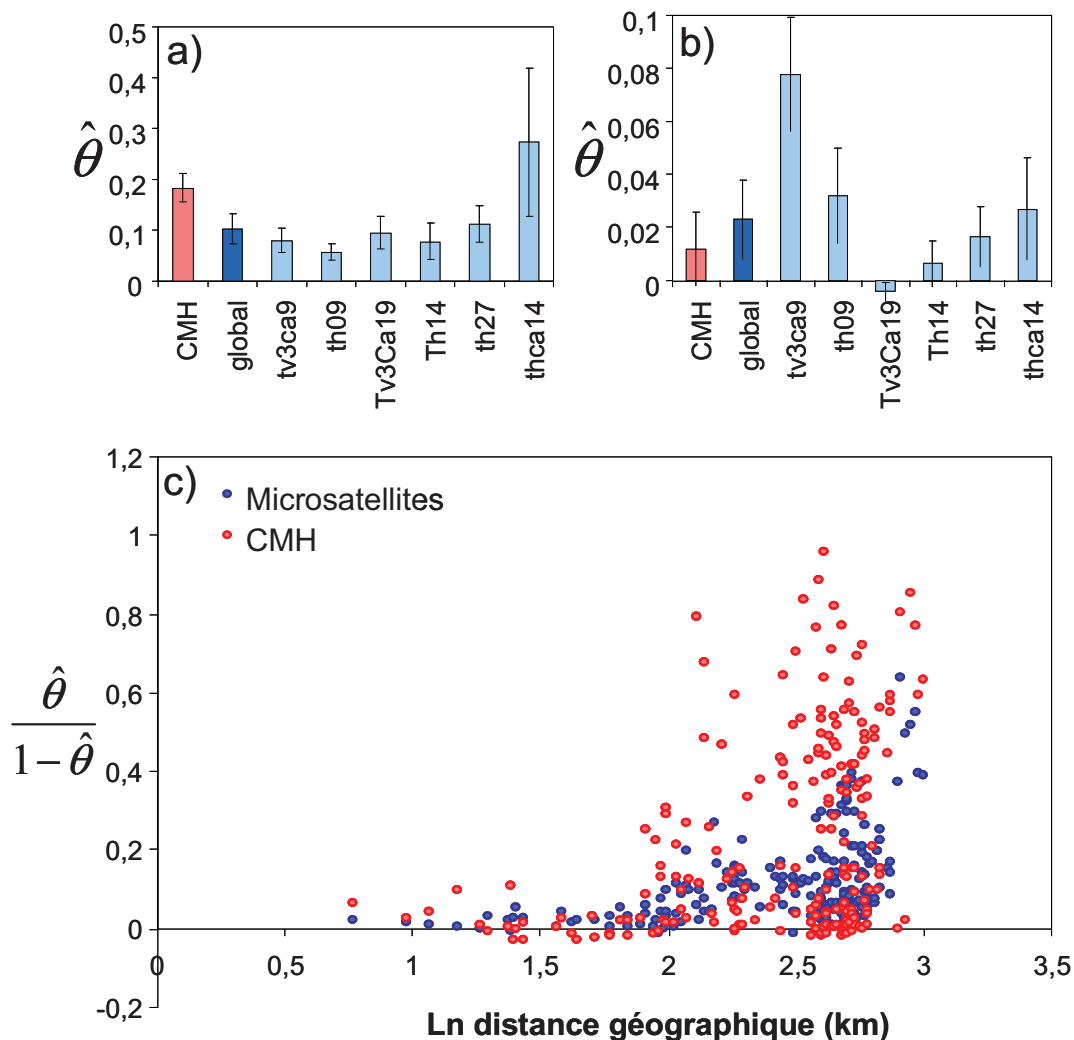


Figure V.6 Structure globale de population à l'échelle de l'aire de répartition (a) et à l'échelle des Pays-de-Loire (b) au locus du CMH-*DAB*, sur l'ensemble des locus microsatellites et par locus microsatellite. L'estimation de l'intervalle de confiance à 95% a été réalisée par 1000 bootstraps sur les locus pour l'estimation du F_{ST} global, et par Jackknife sur les populations pour les estimations de F_{ST} par locus. (c) Représentation de la distance génétique aux locus microsatellites (ronds bleus) et CMH-*DAB* (ronds rouges) en fonction de la distance géographique.

Tableau V.2 Estimations des F_{ST} par paires de sites et seuils de significativité pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,1$ (**), $p < 0,01$ (***).

	6	21	25	30	32	33	42	Am	Ar	Bai1/1	Ch	Cra	Dom	Gir	Lor	M	Off	Or	Que	Tra	Yeu
6		-0,02	-0,03	0,01	0,03	-0,03	-0,02	0,39***	0,32**	0,39***	0,00	0,38***	0,01	0,01	0,36***	0,00	0,43***	0,21**	-0,02	0,00	0,18**
21			0,01	0,08*	0,03	-0,01	0,01	0,45***	0,39***	0,46***	0,04	0,45***	0,01	0,03	0,41***	0,03	0,49***	0,26***	0,04	-0,02	0,23***
25				0,00	0,02	0,00	-0,02	0,33***	0,26***	0,34***	0,00	0,33***	0,00	-0,01	0,29***	-0,01	0,36***	0,16**	-0,01	0,01	0,11**
30					0,08*	0,05	-0,02	0,26***	0,19***	0,26***	0,06	0,23***	0,06	0,02	0,28***	-0,01	0,32***	0,1**	0,01	0,10*	0,13**
32						0,04	0,02	0,32***	0,28***	0,35***	0,04	0,33***	-0,01	0,02	0,26***	0,02	0,33***	0,15**	0,05	0,01	0,12*
33							-0,01	0,41***	0,36***	0,41***	0,04	0,41***	0,03	0,05	0,41***	0,02	0,47***	0,22***	-0,01	0,01	0,22***
42								0,30***	0,24***	0,3***	0,02	0,28***	0,01	0,00	0,29***	-0,03	0,35***	0,12**	-0,01	0,03	0,14**
Am									0,00	0,01	0,36***	0,00	0,34***	0,32***	0,07*	0,28***	0,02	0,03	0,32***	0,44***	0,12**
Ar										0,02	0,28***	0,02	0,28***	0,25***	0,05*	0,22***	0,03	0,04*	0,26***	0,37***	0,08***
Bai											0,35***	0,00	0,36***	0,34***	0,14**	0,28***	0,09*	0,05	0,32***	0,44***	0,2***
Ch												0,36***	0,02	0,03	0,3***	0,02	0,37***	0,01	0,02	0,02	0,14**
Cra													0,35***	0,31***	0,14**	0,26***	0,11*	0,03	0,31***	0,44***	0,18***
Dom														-0,01	0,27***	0,00	0,35***	0,17**	0,04	0,00	0,13**
Gir															0,27***	-0,01	0,33***	0,16**	0,04	0,03	0,12**
Lor																0,26***	-0,01	0,1**	0,32***	0,38***	0,08**
M																	0,31***	0,11**	0,00	0,03	0,12**
Off																		0,1*	0,37***	0,46***	0,12**
Or																			0,15**	0,25**	0,08**
Que																				0,04	0,13**
Tra																					0,21**
Yeu																					

Détection de la sélection au locus du CMH-DAB

La structure au locus du deuxième exon du CMH de classe II ne suit pas celle aux locus microsatellites (figure V.7). Il n'y a pas de corrélation entre structure génétique aux locus microsatellites et au locus CMH-DAB (Test de Mantel, $Z = 13,26$, $p = 0,260$), indiquant en première instance que ces locus ne sont sans doute pas soumis aux mêmes forces évolutives.

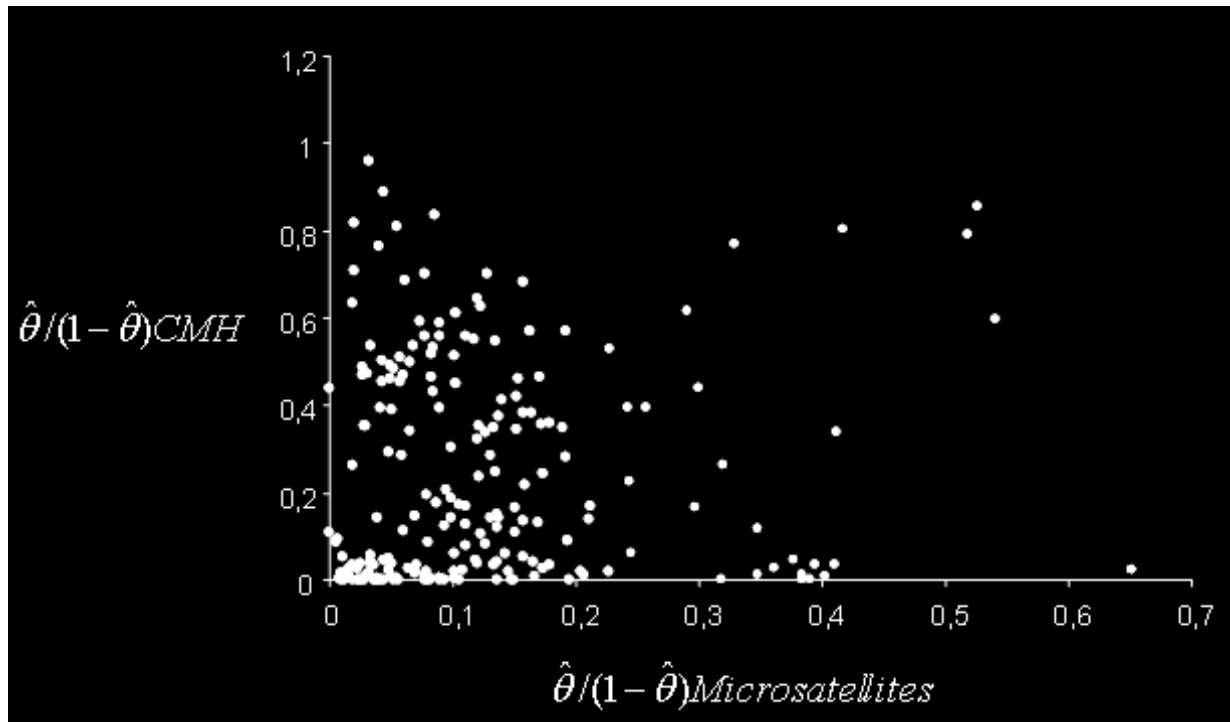


Figure V.7 Corrélation entre distance génétique mesurée au locus du CMH-DAB et aux locus microsatellites.

Le test de neutralité effectué sur NEUTRALLEX indique que le locus CMH-DAB est potentiellement sous sélection à l'échelle de l'aire de répartition ($\Delta = 0,161$, $p = 0,000$). L'hypothèse de neutralité ne peut cependant pas être rejetée pour expliquer la variabilité du CMH-DAB à un niveau régional ($\Delta = 0,002$, $p = 0,335$ sur les huit populations des Pays-de-Loire). Le test de Beaumont et Nichols (1996) réalisé sur FDIST2 indique que le locus du CMH-DAB est rejeté de l'enveloppe à 95% de la distribution neutre des F_{ST} , suggérant une sélection positive à ce locus ($p = 1,00$) à l'échelle de l'aire de répartition (figure V.8). Néanmoins lorsque l'analyse est réalisée sur les huit populations des Pays-de-Loire, l'estimation du F_{ST} au locus du CMH-DAB est comprise dans la distribution des F_{ST} neutres, tout comme cinq microsatellites sur les six.

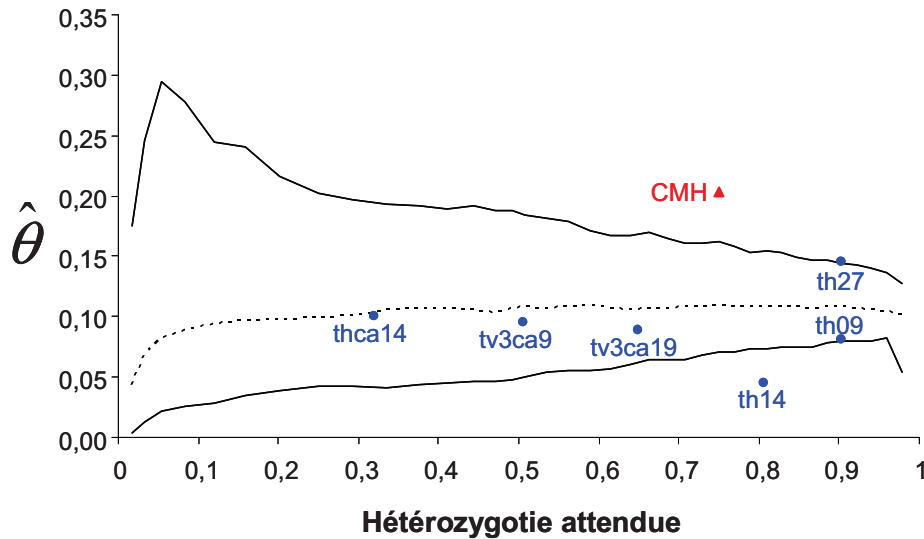


Figure V.8 Distribution des estimateurs de F_{ST} en fonction des hétérozygoties intra-population pour les six marqueurs microsatellites et le marqueur du CMH-DAB. L'enveloppe correspond aux valeurs attendues sous l'hypothèse de neutralité dans un modèle en stepwise construit selon la méthode de Beaumont et Nichols (1996), avec un intervalle de confiance de 95%.

Les facteurs environnementaux pris en compte ne semblent pas expliquer directement ou indirectement la variabilité génétique au locus du CMH-DAB à l'échelle des Pays-de-Loire (GESTE, $p = 0,262$ pour le modèle présentant la plus grande probabilité). Néanmoins, une corrélation négative a été mise en évidence entre le pourcentage d'occupation du sol par les prairies et la diversité génétique au locus du CMH-DAB ($r = -0,761$, $p = 0,0284$), contrairement à ce qui est observé aux locus microsatellites (corrélation positive, $r = 0,716$, $p = 0,046$) (figure V.9). De façon cohérente, une relation négative est suggérée entre le pourcentage d'occupation du sol par les boisements et la diversité génétique au locus du CMH-DAB ($r = 0,665$, $p = 0,0720$), contrairement à ce qui est observé aux locus microsatellites (corrélation négative, $r = -0,670$, $p = 0,069$).

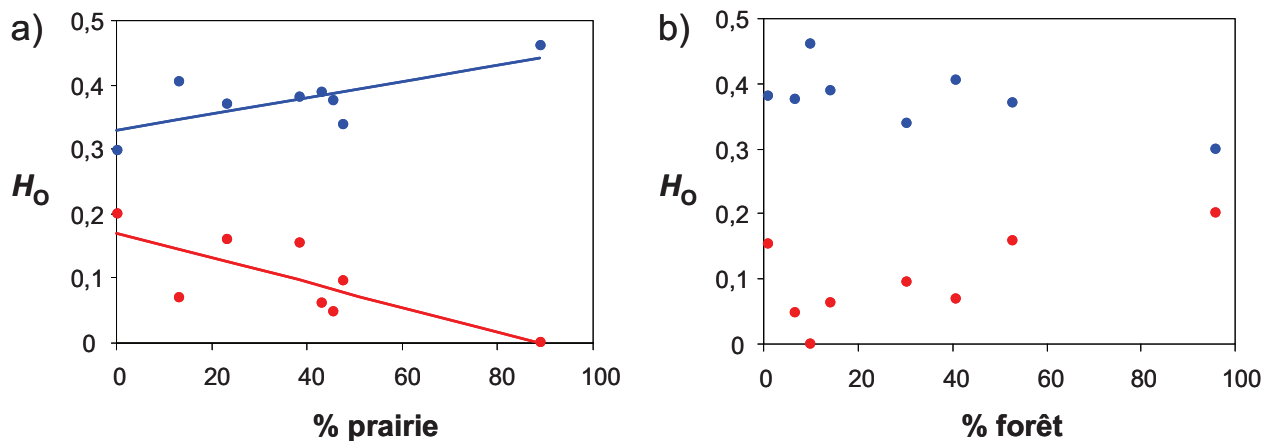


Figure V.9 Diversité génétique au locus du CMH-DAB (en rouge) et aux locus microsatellites (en bleu) en fonction (a) du pourcentage de prairie et (b) du pourcentage de forêt dans un rayon de 400 m autour de la mare. La droite indique une corrélation significative.

Discussion

Le complexe majeur d'histocompatibilité représente le meilleur système chez les vertébrés pour étudier comment la sélection naturelle génère l'adaptation locale face à l'action de la migration et de la dérive génétique (Bernatchez & Landry 2003). Nos résultats préliminaires montrent que le deuxième exon du CMH de classe II (CMH-DAB) chez les tritons palmés est caractérisé par une hétérozygotie modérée ($H_O = 0,21$ en moyenne; écart-type = 0,63), une richesse allélique importante avec quelques allèles majoritaires probablement maintenus par sélection positive.

Phylogénie des séquences de CMH-DAB et potentialités d'introgression avec le triton ponctué

La phylogénie présentée en figure V.2 indique que le gène de l'exon 2 du CMH de classe II chez le triton palmé ne représente pas une unité monophylétique. C'est aussi visiblement le cas chez les tritons alpestres et les salamandres. Le tri incomplet des lignées est une caractéristique communément observée aux différents locus du CMH (Bernatchez & Landry 2003). Ceci est une conséquence de la **sélection équilibrante** qui contrecarre les effets de la dérive. Ainsi le polymorphisme ancestral est-il en grande partie conservé ce qui a pour tendance d'augmenter les temps de coalescence (Fan *et al.* 1989; Figueroa *et al.* 1988; Lawlor *et al.* 1988; Mayer *et al.* 1988; Orr 2005).

Sur les 62 allèles détectés chez les 521 tritons palmés et 94 tritons ponctués (29 et 33 allèles respectivement), **aucun** n'a été retrouvé en commun chez les deux espèces. Au contraire, au niveau des six marqueurs microsatellites, 35% des allèles étaient partagés entre les deux espèces. La divergence adaptative face à un flux de gènes interspécifique a été mise en évidence chez différentes espèces (Coluzzi 1982; Noor *et al.* 2001; Rieseberg 2001). Les gènes de spéciation évoluent généralement rapidement, et souvent par sélection darwinienne positive (Orr 2005). Ce locus immunitaire semble donc agir comme un **gène verrou** dans le maintien de l'isolement reproducteur entre tritons palmés et ponctués. Nous ne pouvons néanmoins conclure de façon certaine sans l'analyse des séquences alléliques. La création de coalescent permettra par exemple la recherche d'une rétention de polymorphisme ancestral (Fan *et al.* 1989; Figueroa *et al.* 1988; Lawlor *et al.* 1988; Mayer *et al.* 1988).

Une sélection positive à l'échelle européenne

A l'échelle de l'**aire de répartition**, vingt-neuf allèles ont été détectés au locus étudié. Cette **forte variabilité** contraste avec celle observée aux locus microsatellites et dans d'autres parties du génome (e.g. ADN mitochondrial, nombreux gènes candidats testés). La plupart des études menées sur le CMH montrent une grande variabilité en dépit de faible variation génétique dans d'autres parties du génome, indiquant une rétention sélective de variabilité à ce locus (Aguilar *et al.* 2004; Jarvi *et al.* 2004).. Une grande variabilité au locus du CMH procure un avantage direct en permettant l'identification d'un plus grand nombre d'antigènes, et ainsi permettre à l'organisme de faire face à un plus large éventail d'agents pathogènes. La plupart des allèles (25/29) sont cependant rares et sont retrouvés à des fréquences très faibles (< 5%). Plus de la moitié d'entre eux sont des allèles **privés** (*i.e.* échantillonnés dans un seul site). Les **quatre allèles majoritaires** se distribuent géographiquement de façon distincte entre le **Sud** (allèle 110) et le **Nord** de l'aire de répartition (allèles 100 et/ou 125). La population de l'**île d'Yeu** est caractérisée par la présence de l'allèle 101 (26% de la richesse allélique). Les différenciations entre populations sont beaucoup plus fortes au locus du CMH par rapport aux locus neutres (microsatellites). Muirhead (2001) propose que de fortes valeurs de F_{ST} au CMH sont atteintes si les populations ont des pressions sélectives environnementales différentes. La présence de groupes d'allèles localement favorisés et ayant un succès moindre dans d'autres environnements suggère la présence d'**adaptations locales** (Aguilar & Garza 2006; Ekblom *et al.* 2007; Landry & Bernatchez 2001). En complément des résultats de NEUTRALLEX, l'analyse réalisée sur FDIST2 indique, malgré le faible nombre de marqueurs impliqués, une **sélection directionnelle positive**. Comme cela a été observé dans notre étude, la sélection directionnelle tend à réduire la diversité génétique à l'intérieur des populations et à accroître la différenciation entre populations. Au contraire, les modèles de sélection équilibrante, plus souvent rencontrés pour décrire la variation au CMH (pour une revue voir Piertney & Oliver 2006), prédisent que les génotypes hétérozygotes sont plus adaptés que les génotypes homozygotes compte tenu du fait que deux variants alléliques vont identifier une gamme plus large de pathogènes (Doherty & Zinkernagel 1975). Dans notre étude, toutes les populations montrent un déficit significatif en hétérozygotes, avec une contribution importante de chacun des quatre allèles majoritaires (selon la région géographique) au F_{IS} . Cela renforcerait l'idée d'une sélection dirigée sur un allèle (voire deux pour les populations septentrionales) certainement liée à la localisation géographique de ces populations. Cependant, il existe peut-être une autre explication aux déficits en hétérozygotes

observés dans chacun des sites. Nous ne pouvons pas exclure la présence d'allèles nuls dans notre jeu de données. En effet, de par sa fonction, l'exon 2 du MHC de classe II est très variable. Il se peut donc que nous n'ayons pas amplifié l'ensemble des allèles présents à ce locus, même si le polymorphisme en termes de nombre d'allèles est déjà très important (29 allèles chez les tritons palmés et 33 chez les tritons ponctués). Par exemple Babik *et al.* (2008, 2009) ainsi que Teacher *et al.* (2009) utilisent plusieurs combinaisons d'amorces afin d'amplifier tous les allèles de certains gènes du MHC de classe II et classe I respectivement, chez des amphibiens. La mise en place d'une telle stratégie permettrait peut-être de diminuer les déficits en hétérozygotes

De nombreuses études génétiques menées chez divers organismes ont mis en évidence la relation entre **un haplotype ou un groupement d'haplotypes et la résistance à un pathogène** précis, que ce soit pour le CMH de classe I (Kaufman & Wallny 1996; Miller *et al.* 2004) ou de classe II (Babik *et al.* 2005b; Harf & Sommer 2005; Hill 1998; Hill *et al.* 1991). Par exemple, chez la grenouille rousse *Rana temporaria*, certains supertypes de CMH de Classe I sont associés à la résistance à l'infection virale provoquée par le *Ranavirus* (Teacher *et al.* 2009). Paterson (1998) et Langefors *et al.* (2001) ont mis en évidence que dans le cas des moutons de Soay et des saumons atlantiques respectivement, la survie est davantage liée à la **présence d'allèles particuliers qu'à l'hétérozygotie** au locus considéré.

Les populations naturelles de tritons sont exposées à une diversité de pathogènes extracellulaires tels que des bactéries, des champignons, des parasites (protozoaires, helminthes, annélides, arthropodes) (Duellman & Trueb 1994). La **charge parasitaire** (morphotypes, espèces ou communautés), directement ou indirectement liée au climat (température et photopériode) est susceptible de varier **géographiquement**. Ceci pourrait expliquer la sélection d'allèles spécifiques d'une part dans le sud de l'aire de répartition et, d'autre part, dans le nord de l'aire de répartition. La présence de l'allèle 101 en fréquence importante dans la population insulaire de l'île d'Yeu peut s'expliquer par sélection directionnelle due à la présence de **pathogènes particuliers en contexte insulaire** ou simplement par **dérive génétique**. La répartition plus équilibrée des fréquences alléliques dans cette population peut indiquer une **plus grande diversité** en parasites dans cette mare insulaire (Wegner *et al.* 2003).

Les études menées sur d'autres urodèles indiquent que la sélection joue un rôle important dans le maintien de la diversité au deuxième exon du CMH de classe II (*DAB*), même si la dérive génétique est aussi présente. Ainsi, dans les populations de tritons alpestres *Mesotriton alpestris* des aires d'expansion post-glaciales un polymorphisme important a été retrouvé (37

allèles sur 149 individus échantillonnés dans sept populations), témoignant d'un événement encore récent de sélection positive (Babik *et al.* 2008). Une récente étude menée chez l'axolotl *Ambystoma mexicanum*, une espèce à répartition géographique restreinte et longtemps présumée immunodéficiente, a mis en évidence une forte variation allélique à ce même locus et une sélection positive historique (Richman *et al.* 2007). Un signal de sélection positive et une grande variabilité ont aussi été détectés chez des populations de tritons crêtés *triturus cristatus* situés dans d'anciens refuges glaciaires (Babik *et al.* 2009).

Variation au locus du CMH-DAB à l'échelle régionale

A l'échelle régionale, il n'y a **pas d'évidence de sélection** d'après les résultats obtenus par NEUTRALLEX et FDIST2. L'absence de différence dans le degré de structure entre le deuxième exon du CMH de classe II et les marqueurs microsatellites suggère que la **dérive génétique** et le **flux de gènes** sont les facteurs prédominants à cette échelle déterminant la différenciation de chaque classe de marqueur. De nombreux exemples de corrélation entre variation neutre et au CMH indiquent que la dérive génétique affecte de façon conséquente la variation au locus CMH, au moins à de petites échelles (Boyce *et al.* 1997; Campos *et al.* 2006; Hedrick *et al.* 2001; Landry & Bernatchez 2001; Seddon & Ellegren 2004).

Il existe néanmoins une corrélation entre le niveau d'hétérozygotie et le type de paysage. Plus le contexte paysager est boisé, plus le locus montre d'hétérozygotie. Cela suggérerait que les espèces sont confrontées à davantage de pathogènes en milieu forestier.

Conclusion

La diversité au locus du complexe majeur d'histocompatibilité serait donc façonnée par des forces sélectives à l'échelle européenne et stochastiques à l'échelle régionale. La sélection directionnelle opérant à l'échelle de l'aire de répartition pourrait être corrélée à la présence de pathogène(s) caractéristique(s) des populations méridionales d'une part, et septentrionales d'autre part. L'influence du **changement climatique** sur le risque d'émergence de maladies vectorielles, en particulier, est devenue un thème préoccupant. On peut supposer que le réchauffement climatique aura des répercussions sur la distribution latitudinale et altitudinale des vecteurs (De Toni *et al.* 2009; Dobson 2009; Patz *et al.* 1996; Tylianakis *et al.* 2008) et donc sur la rapidité de l'émergence d'**adaptations locales**.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis d'estimer le flux de gènes interspécifique neutre et sous sélection sur une large zone de sympatrie et de mieux définir les barrières d'isolement reproducteur chez deux taxons s'introgressant occasionnellement dans un contexte de fort chevauchement écologique et géographique. L'analyse de la structure génétique neutre à l'échelle de l'aire de répartition d'une des deux espèces a permis de comprendre comment la sélection opérait à un locus du complexe majeur d'histocompatibilité. En focalisant sur une échelle régionale, nous avons pu étudier l'influence d'éléments paysagers sur la structure des populations d'une espèce commune et ubiquiste.

Flux de gènes interspécifiques : hybridation et isolement reproducteur chez deux espèces largement sympatriques

Les zones hybrides représentent des systèmes naturels dans lesquels la spéciation est potentiellement incomplète, ce qui permet des études génétiques, écologiques et comportementales détaillées des mécanismes évolutifs importants dans les processus de spéciation. Alors que l'hybridation a longtemps été étudiée dans des zones de tension (Barton & Hewitt 1985) ou en mosaïque (Harrison 1986; Howard 1986), peu d'études ont abordé le cas des espèces montrant un large chevauchement géographique et écologique. Dans ce système, il est attendu que l'hybridation soit peu fréquente et que des barrières reproductives soient assez fortes pour maintenir l'intégrité des espèces.

Nous avons observé que l'hybridation et l'introgression entre tritons palmés et ponctués, étaient manifestes à plusieurs endroits de leur aire de répartition. Ainsi, sur l'analyse génétique des sites échantillonnés en Europe, 1,7 % des individus ont une origine hybride et 73 % des sites syntopiques témoignent d'un flux de gènes significatif entre les deux espèces. Ces résultats posent la question de l'efficacité des barrières au flux génique interspécifique et de leur persistance à l'échelle évolutive.

Les barrières prézygotiques et l'influence de l'environnement

Comme nous l'avons vu précédemment (CHAPITRE I), les barrières écologiques (Griffiths 1986; 1987), temporelles (Chadwick *et al.* 2006; Smith 1969) et mécaniques (Halliday 1977) chez ces deux espèces largement sympatriques sont pratiquement inexistantes.

Halliday (1972) et Wambreuse (1984) suggéraient que les différences dans la parade des mâles des deux espèces participent à l'isolement reproducteur. Roberts (1990) avait conclu, par des tests comportementaux sur quelques individus, que le choix d'un partenaire conspécifique n'était pas systématique ; ni les femelles ni les mâles de tritons ponctués n'étaient visuellement attirés par le partenaire conspécifique. Dans notre étude comportementale (ARTICLE 4), nous avons mis en évidence que les femelles des deux espèces et les mâles palmés choisissaient en moyenne le partenaire conspécifique plutôt que l'hétérosécifique. Néanmoins ce choix n'est pas systématique lorsque les femelles palmées ont seulement accès à l'information chimique. Aucune préférence n'a été notée chez le mâle de triton ponctué. Ainsi, **lorsque ces espèces ont accès aux deux signaux informatifs** (*i.e.* visuel et chimique) **la reconnaissance spécifique est sans doute efficace**. Même si elle ne l'est pas (au moins en condition expérimentale) pour les mâles de tritons ponctués, au moins l'est-elle pour la femelle conspécifique qui, au final, accepte ou non de s'impliquer jusqu'au bout de la parade et de prélever le spermatophore de son partenaire. Néanmoins, lorsque la qualité d'un des deux signaux est entravée, nous pouvons nous demander dans quelle mesure le choix de partenaire conspécifique est assuré. Comme nous l'avons vu dans le CHAPITRE I, **l'environnement** joue un rôle direct ou indirect dans la **qualité de la transmission du signal**. Ainsi, dans les eaux turbides d'une vallée alluviale, on peut s'attendre à ce que les sédiments fluviaux diminuent la visibilité, augmentant donc le risque d'accouplement hétérosécifique (Bradbury & Verhencamp 1998; Seehausen *et al.* 1997). En outre, Wambreuse (1984) concluait que, pour les deux espèces, les femelles paraded préférentiellement avec les mâles dont les **caractères sexuels secondaires** sont les plus développés. Précisément, ces mâles sont optiquement très distincts. Secondi *et al.* (2007) ont montré que les caractères sexuels secondaires régressaient dans les eaux turbides. La probabilité d'accouplement hétérosécifique pourrait donc varier avec les caractéristiques visuelles du milieu aquatique.

Les tests de préférence sexuelle montrent que les femelles utilisent largement les **contrastes de taille** entre mâles (ARTICLE 4). Cette considération suggère que le risque d'hybridation varie géographiquement selon le *ratio* de taille entre tritons palmés et ponctués.

Les amphibiens en particulier possèdent une grande plasticité phénotypique (Alvarez & Nieceza 2002; Beebe 1983; Miaud *et al.* 2001; Van Buskirk & Schmidt 2000). A ce titre, nous avons observé que la taille des individus de tritons palmés est positivement corrélée au couvert forestier (ARTICLE 3). Chez le triton ponctué, Sotiropoulos *et al.* (2008b) ont mis en évidence en Grèce un fort polymorphisme phénotypique corrélé à la fois aux facteurs climatique et d'habitat. De plus, dans des environnements à variabilité chaotique, comme le sont les vallées alluviales, certains amphibiens montrent une certaine plasticité développementale (Laurila & Kujasalo 1999). La reconnaissance spécifique par les femelles dépend donc des facteurs complexes jouant directement ou indirectement sur la taille des individus et l'expression des caractères sexuels d'une population syntopique.

Dans l'ARTICLE 2, nous mettons en évidence une corrélation négative entre *sex-ratio* et flux de gènes interspécifique dans les populations naturelles. Plus les mâles sont rares, plus le flux de gènes est élevé (ou inversement, voir plus bas). La rareté d'un partenaire sexuel explique les occasions d'accouplement hétérospécifique (Wirtz 1999). Le *sex-ratio* en vallée de la Loire est particulièrement biaisé et contribue sans doute à amplifier cette observation. Un biais de *sex-ratio* dans certaines populations de tritons s'explique souvent par une moins bonne survie des mâles (Bell 1977). Dans un contexte syntopique, la compétition est probablement accrue et l'intensité des parades pourrait augmenter le risque de prédation des mâles.

La fréquence d'accouplements hétérospécifiques liée à la rareté d'un partenaire conspécifique s'explique aussi par un **biais d'abondance spécifique** (Hubbs 1955; Randler 2002; Secondi *et al.* 2006). Dans les mares syntopiques de la vallée de la Loire, les tritons palmés étaient bien souvent en excès par rapport aux ponctués (en moyenne six fois plus nombreux et seules deux mares syntopiques sur les 16 présentaient une abondance relative de ponctués). Le taux d'hybridation dans cette partie de l'aire de répartition (2,4 %) était similaire à celui retrouvé ailleurs. Néanmoins, l'échantillonnage trop partiel à l'échelle de l'aire de répartition ne nous permet pas vraiment de comparer rigoureusement le taux d'hybridation dans la zone de la Loire avec les autres régions.

Les barrières postzygotiques

Les croisements expérimentaux effectués par Spurway & Callan (1960) ont indiqué, comme pour beaucoup d'amphibiens (voir CHAPITRE I), qu'il y avait peu de sélection endogène. Selon les croisements expérimentaux, 67 à 87 % des hybrides étaient viables.

L'existence de 25 individus classés comme hybrides d'après les méthodes bayésiennes indiquent que les hybrides sont aussi **viables *in situ***. Les techniques bayésiennes ne nous permettent pas vraiment de conclure sur la classe hybride de ces individus. Néanmoins aucun individu n'est hétérozygote à tous les locus diagnostics, indiquant qu'il ne s'agit pas d'hybrides de première génération (F₁) mais plutôt d'individus issus de rétrocroisements. Le flux de gènes interspécifique mesuré dans 16 mares syntopiques sur les 22 indique aussi que les hybrides peuvent se **reproduire en milieu naturel**. Cela suggère qu'ils peuvent eux aussi être « choisis » par un parent pur (ou un hybride). En effet, dans un système où la production d'hybrides F₁ est rare, si une partie est viable et fertile, la probabilité de rétrocroisement devient plus importante (Naisbit *et al.* 2003). Les gènes introgressés au cours de ces événements peuvent perdurer dans les génomes hétérospécifiques pendant plusieurs générations. Ainsi, la présence de génomes introgressés dans nos échantillons peut être compatible avec de rares événements d'hybridations. Environ cinq fois plus de tritons ponctués sont issus de rétrocroisements. Sachant que les capacités de discrimination des mâles ponctués sont faibles (Roberts 1990 et notre ARTICLE 4), peut-être s'accouplent-ils de façon indifférente avec les individus hybrides ou rétrocroisés dont le succès reproducteur est peut-être plus faible. L'intensité de sélection contre l'hybridation diffère généralement entre espèces (Pfennig & Simovich 2002). La contre sélection des hybrides est peut-être moins forte chez les tritons ponctués ; les hybrides ou rétrocroisements pouvant « profiter » d'allèles du génome de triton palmé, au moins dans certaines conditions environnementales.

Dans l'ARTICLE 2, nous mettons en évidence une corrélation négative entre *sex-ratio* et flux de gènes interspécifique dans les populations naturelles. Le biais de *sex-ratio* peut être la cause (voir plus haut) ou la conséquence de l'hybridation. Selon la **loi de Haldane** (1922), lorsque dans la progéniture de deux espèces un sexe est absent, rare, ou stérile, il s'agit du sexe hétérogamétique. Les mâles étant le sexe hétérogamétique chez les tritons (Hillis & Green 1990), on s'attendrait, de façon cohérente avec ce résultat, à observer un *sex-ratio* déséquilibré au détriment des mâles. Néanmoins, parmi les 25 individus il n'y a pas significativement plus de femelles viables que de mâles. Etant donnée la taille de l'échantillon, nous ne concluerons pas de façon définitive sur cette hypothèse.

Conséquences de l'hybridation

L'hybridation introgressive suggère souvent que les hybrides les plus adaptés confèrent un avantage sélectif à au moins un des deux parents, dans un environnement souvent particulier

(Arnold & Hodges 1995; Parris 1999; Pfennig & Simovich 2002). L'hybridation peut donc représenter une force évolutive conséquente. Dans un contexte global de réchauffement climatique et de perturbation de ses habitats de reproduction en vallée alluviale (*i.e.* déconnexion et atterrissement des mares), nous pouvons imaginer qu'une espèce septentrionale telle que le triton ponctué, dont l'aire de répartition se réduit au sud (Mourgau & Pailley 2005), « profite » des adaptations acquises par une espèce à plus large amplitude. Néanmoins, les taux d'hybridation seraient sans doute plus élevés que ceux observés. En outre, l'introgression **ne dépasse pas la limite du site syntopique**. Aucun hybride (sauf un) n'a été trouvé en allotopie et lorsque des flux de gènes ont été détectés dans les populations, cela ne concernait aucune population allotopique. La fréquence des événements d'hybridation ne permet sans doute pas de compenser la perte de gènes hétérosécifiques par **dérive génétique** d'une population à l'autre (Petit & Excoffier 2009).

Rundle (2000) a montré que les populations évoluant indépendamment sous des conditions écologiques similaires, comme c'est le cas des tritons palmés et ponctués (Chadwick *et al.* 2006; Griffiths 1986; 1987) manquaient d'isolement reproducteur. Beaucoup d'exemples montrent que l'évolution de l'isolement reproducteur peut se faire malgré la persistance d'un flux de gènes, même longtemps après la divergence (Mallet 2005). L'isolement reproducteur entre tritons palmés et ponctués est une issue probable. Le déplacement de caractère reproducteur mis en évidence à l'échelle de la vallée de la Loire (ARTICLE 3) argumente en ce sens.

Perspectives dans l'étude de l'hybridation et de l'isolement reproducteur

Améliorer la détection de l'hybridation

Les méthodes bayésiennes d'identification d'individus hybrides (NEWHYBRIDS, STRUCTURE) requièrent, dans l'absolu, l'utilisation de nombreux marqueurs génétiques, si possible discriminants (Vähä & Primmer 2006). Une quinzaine de **marqueurs microsatellites supplémentaires** aurait sans doute permis une meilleure détection des individus hybrides, voire la détermination de leur classe (F_1 , F_2 ou rétrocroisements). Une publication récente de Sotiropoulos *et al.* (2008a) fait état de huit nouveaux marqueurs microsatellites polymorphes pour le triton ponctué grec *Lissotriton vulgaris graecus*. Cinq

microsatellites polymorphes pour le triton palmé ont aussi été identifiés cette année (Gillian Murraydickson, Université d'Aberdeen, communication personnelle), ce qui permettrait d'augmenter la robustesse de l'information apportée par les marqueurs et éventuellement d'améliorer la discrimination entre les deux espèces et de manière plus générale entre les populations.

Les microsatellites, du fait de leur grande homoplasie ne représentent pas toujours de bons marqueurs dans l'étude de l'hybridation (d'autant plus s'ils sont très polymorphes). L'utilisation des **SNP** (Polymorphisme d'un Seul Nucléotide), dont la plupart se trouvent dans les parties non codantes du génome (Tagu 2003), serait une méthode alternative pour la détection d'hybridation (Andrew & Kohn 2009).

Séquencer le CMH et améliorer la couverture du génome

La perméabilité aux allèles hétérosécifiques varie selon les différentes portions du génome (*i.e.* introgression différentielle). L'étude du flux de gènes potentiellement sous sélection au locus du **complexe majeur d'histocompatibilité** a révélé qu'aucun allèle n'était partagé entre les deux espèces, alors que 35 % des allèles microsatellites étaient communs. Ceci suggère que le gène de l'exon 2 du CMH de classe II agit comme un **gène verrou** de la spéciation. A partir de l'analyse des séquences, la réalisation d'une coalescence permettra d'apporter davantage d'informations sur l'existence d'un polymorphisme ancestral (Figueroa *et al.* 1988) et de dater la divergence à ce locus (Fan *et al.* 1989; Lawlor *et al.* 1988; Mayer *et al.* 1988). Le *ratio* de temps de coalescence à l'intérieur des lignées par rapport à la longueur des généalogies pourra être quantifié et la significativité de sa déviation par rapport à la distribution neutre sera testée par simulation (Richman 2000; Richman & Kohn 1999). Nous pourrions tester l'hypothèse selon laquelle l'acquisition de l'isolement reproducteur serait en partie promue par la sélection aux locus immunitaires (Eizaguirre *et al.* 2009).

D'autres gènes pourraient être étudiés (par l'utilisation de SNP par exemple, Fitzpatrick *et al.* 2009) afin de couvrir le génome à la recherche de régions présentant une diversité de situations d'introgression allant de l'isolement complet à un flux de gènes apparemment non-restreint. La comparaison des généalogies de polymorphismes codants et non-codants permettra de tester les différentes hypothèses à la présence ou non de sélection à ces locus, ainsi que d'éventuels effets d'autostop (Faure *et al.* 2008). Par exemple, des allèles de tritons palmés avantageux pour le ponctué pourraient peut-être permettre d'expliquer l'asymétrie d'introgression observée (Fitzpatrick *et al.* 2009; Parris *et al.* 1999; Pfennig & Simovich 2002).

Envisager le rôle du déplacement de caractère reproducteur dans le renforcement

Le déplacement de caractère reproducteur détecté chez les femelles de tritons palmés (ARTICLE 3) suggère une sélection pour le **maintien des caractéristiques phénotypiques spécifiques**. Une étude comportementale est nécessaire pour préciser son rôle dans le renforcement de l'isolement reproducteur. Dans un dispositif de choix en Y, nous pourrions tester la préférence du mâle par rapport à des femelles de largeur de queue variable. Nous pourrions aussi tester l'efficacité de discrimination du mâle par rapport à sa mare d'origine (syntopie vs allotopie).

Analyser la valeur sélective des hybrides

Le croisement artificiel interspécifique pourrait permettre l'estimation de la valeur sélective des hybrides (viabilité et fertilité) et la réalisation d'expériences de choix sexuel. Ainsi, la préférence pour le partenaire conspécifique pourrait être testée par rapport à la préférence pour l'hétérospécifique, l'hybride F₁ voire les individus issus de rétrocroisements. Il serait en effet intéressant de savoir si les hybrides F₁ croisés avec l'espèce *L. vulgaris* ont une meilleure valeur sélective que ceux croisés avec *L. helveticus*. Ceci pourrait expliquer l'asymétrie d'introgession observée en milieu naturel. Si on suppose que la valeur sélective d'un hybride dépend de l'habitat, ces manipulations pourraient être effectuées dans des conditions environnementales variables (température, densité...). Le maintien d'une ou plusieurs générations d'hybrides demandent néanmoins un grand investissement sur le long terme ; un individu n'est sexuellement mature qu'à partir de deux à trois ans (Bell 1977; Cogălniceanu & Miaud 2003; Guyétant *et al.* 1991; Marnell 1998b).

Conclusion

Ces études montrent que l'isolement entre deux espèces à grand chevauchement écologique et géographique n'est pas complet malgré un temps de divergence important (40 MA, Steinfartz *et al.* 2007). Dans les zones de contact bimodales, les mécanismes d'isolement prézygotiques sont souvent plus importants que les mécanismes postzygotiques (Alexandrino *et al.* 2005; Jiggins & Mallet 2000; Rubidge & Taylor 2004). Ainsi nous avons pu démontrer que la **reconnaissance spécifique des partenaires sexuels** est sans doute la barrière qui participe le plus à l'isolement reproducteur (en rouge hachuré sur la Figure VI.1) lorsque les

signaux visuels et chimiques se complètent. La **viabilité** de l'hybride et sa **fertilité** sont confirmées par l'existence d'individus hybrides et/ou rétrocroisés et l'existence de flux de gènes interspécifiques dans certaines populations naturelles (vert clair sur la figure VI.1). Nous suggérons que la loi de **Haldane** s'applique ici mais nous n'avons pas pu le démontrer de façon définitive (hachuré vert). Des facteurs **exogènes** influençant le *sex-ratio*, le *ratio* de taille ou la transmission du signal de reconnaissance spécifique pourraient affecter la probabilité de choisir un partenaire hétérospécifique chez ces tritons et donc la probabilité d'hybridation. Cependant, ces introgressions ne semblent pas diffuser hors des sites syntopiques. En effet, la fréquence trop faible des événements d'introgression ne permet probablement pas l'observation d'allèles hétérospécifiques dans les régions allotopiques. En effet, on peut supposer que la faible fraction de ces allèles arrivés par migration est facilement éliminée par la dérive génétique (Petit & Excoffier 2009). Cette barrière démographique permettrait le maintien de l'intégrité des deux espèces sur une large zone de sympatrie.

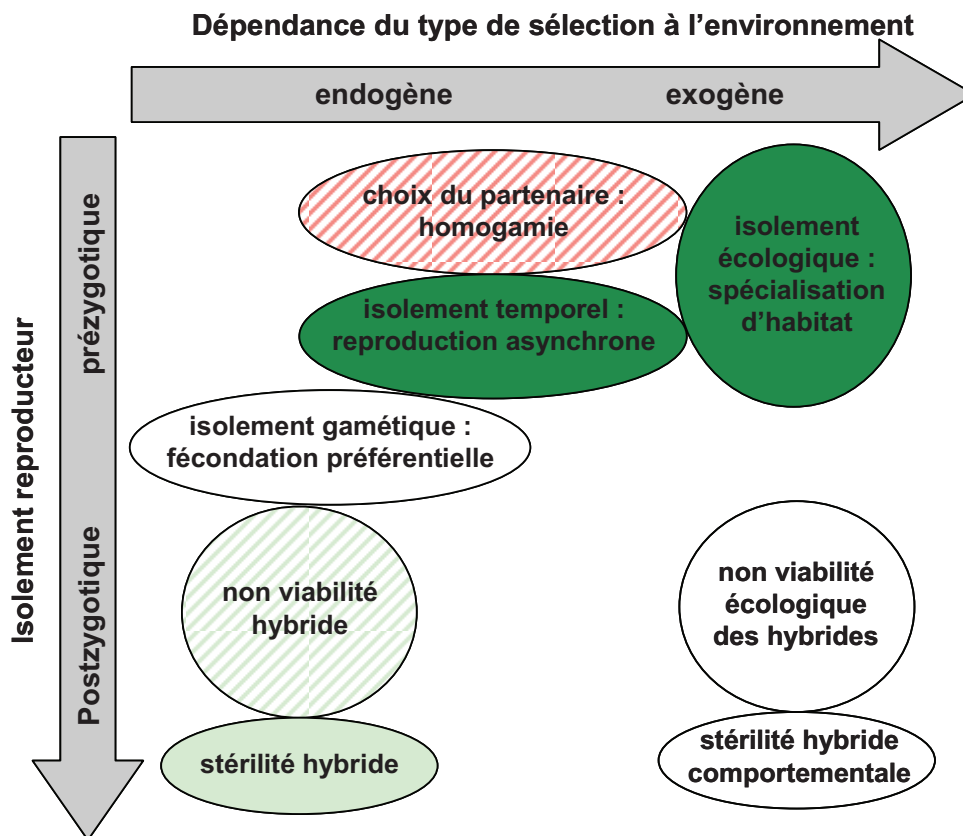


Figure VI.1 Mécanismes d'isolement reproducteur, classés selon le moment de leur efficacité (avant ou après la formation du zygote) et la nature des pressions sélectives (dépendante ou indépendante de l'environnement) (d'après Bierne 2001). Les différences avec la Figure I.15 du Chapitre I résident dans les disques de couleur rouge (hachuré) indiquant une barrière perméable selon les conditions du milieu (ARTICLE 4) ; vert clair indiquant des barrières très perméables, voire perméables selon les sexes (hachuré) (ARTICLE 2). Les disques vert foncé indiquent toujours une absence évidente de barrière (Chadwick *et al.* 2006; Griffiths 1986; 1987); blanc des barrières non testées.

Flux de gènes interspécifiques: Flux de gènes neutres et sous sélection chez une espèce ubiquiste

Rappel des principaux résultats

Nous avons mis en évidence une structure en **métapopulation** chez le triton palmé en Pays-de-Loire. L'**isolement partiel** des sites de reproduction, la **petite taille** de certaines populations, leur connectivité par des individus **dispersants occasionnels** et leur probabilité d'**extinction/recolonisation** sont en effet typiques d'une structure en métapopulation. Malgré des prédictions sur les faibles capacités dispersives de l'espèce, la structure globale est faible sur la zone d'étude ($\hat{\theta} = 0,027$) par rapport aux valeurs de structure génétique souvent reportées chez les amphibiens (Alexandrino *et al.* 2000; Andersen *et al.* 2004; Bradley Shaffer *et al.* 2000; Cabe *et al.* 2007; García-Paris *et al.* 2000; Hitchings & Beebe 1997; Kraaijeveld-Smit *et al.* 2005; Lampert *et al.* 2003; Larson *et al.* 1984; Monsen & Blouin 2003; Noël *et al.* 2007; Palo *et al.* 2004). La **grande variabilité génétique** à l'intérieur des populations ne permet pas vraiment d'observer les éléments qui structureraient les populations à cette échelle. L'effet des cours d'eau sur la structure est très faible (0,8% de la variabilité totale). L'homogénéisation génétique à cette échelle régionale pourrait s'expliquer par le fait que l'espèce, très ubiquiste, puisse profiter de divers sites aquatiques pour sa dispersion. En particulier, en **vallée alluviale**, les sites aquatiques offrent de nombreux sites de reproduction (mares) et corridors qui assurent la dispersion entre sites terrestre et aquatique (fossés, microtalwegs humides...).

Chez cette espèce ubiquiste et commune sur la zone d'étude, les **tailles de populations** sont sans doute plus importantes que ce que l'on pouvait présupposer, du fait de la connexion des habitats aquatiques. Une grande taille efficace permet la fixation d'adaptations locales si la variabilité génétique le permet. La **diversité génétique** trouvée dans les populations de tritons palmés (0,47 à 0,71) est du même ordre que celle reportée pour d'autres amphibiens (0,31 à 0,77, cf. Newman & Squire 2001 et références dans l'article). Au niveau de l'exon 2 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, nous avons détecté une **sélection diversifiante à l'échelle de l'aire de répartition** qui s'explique probablement par

des variations Nord-Sud de communautés de pathogènes extracellulaires. Toutefois, nous n'avons **pas observé de signal de sélection à l'échelle régionale**. La pression de sélection que pourraient exercer les différents pathogènes d'un habitat à l'autre n'est apparemment pas suffisante pour permettre l'existence d'adaptations qui seraient imposées par la variabilité des milieux.

Le **déplacement de caractère reproducteur** détecté dans certaines populations de tritons palmés (ARTICLE 3) suggère, au contraire, que, dans les sites syntopiques, la contre-sélection des hybrides est une force suffisamment importante pour permettre le maintien de cette adaptation.

A l'inverse, dans les populations de **petite taille efficace**, l'intensité de la **dérive génétique aléatoire** limite la possibilité de fixation des allèles par sélection naturelle (Kimura 1983). Pour la population Tpal 19 située dans la vallée de la Loire au Sud-Est de Nantes, la taille efficace a été estimée à 25 individus (Intervalle de confiance à 95 % [17-43]). Dans cette population, un **goulet d'étranglement** a été détecté, supposant une diminution importante des effectifs suivie d'une recolonisation. McCauley (1988) a démontré qu'un type de recolonisation par quelques individus d'une ou de quelques populations sources suite à des extinctions locales favorise la différenciation génétique entre population par dérive. Dans cette population en particulier, nous avons retrouvé de nombreux individus présentant des **inflammations** (figure VI.2). Sans pouvoir toutefois la tester, nous émettons l'hypothèse qu'un manque de variabilité génétique suite au goulet d'étranglement ne permet pas l'**adaptation** aux fluctuations de l'environnement (Fahrig 2002; Lindenmayer & Fischer 2006).

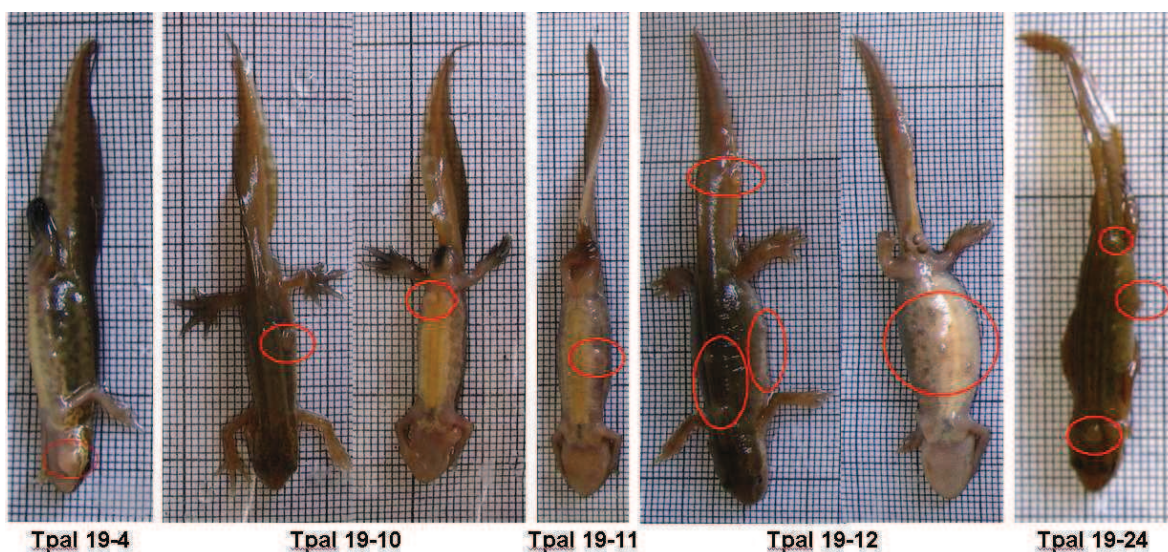


Figure VI.2 quelques individus de la mare Tpal 19 présentant des inflammations.

Perspectives dans l'étude de la génétique du paysage

Persévérer dans l'utilisation de marqueurs neutres

Bien que les marqueurs génétiques utilisés aient globalement montré les mêmes patrons de structure, beaucoup d'analyses (notamment les analyses bayésiennes) nécessitent l'utilisation d'un nombre important de marqueurs (England *et al.* 2006; Vähä & Primmer 2006). L'utilisation des **marqueurs microsatellites** récemment développés (voir plus haut) pourrait améliorer la qualité des analyses réalisées sur notre premier panel de marqueurs.

Pour résoudre le problème de l'homoplasie des marqueurs microsatellites (ex : Anmarkrud *et al.* 2008; Maes *et al.* 2006; O'Reilly *et al.* 2004), l'utilisation des **SNP** pourrait permettre de façon plus précise l'estimation de la structure de population (Coates *et al.* 2009), des paramètres démographiques (Wakeley *et al.* 2001), des déséquilibres de liaison (Group 2001) et améliorer la qualité des analyses bayésiennes pour inférer une structure de population (Liu *et al.* 2005; voir cependant Rosenberg *et al.* 2003).

Approfondir les techniques d'analyse paysagère

Afin de perfectionner l'étude de génétique du paysage, une analyse **plus fine de la structure paysagère** aurait pu être prise en compte. La zone d'étude peut se résumer en une matrice paysagère où des taches d'habitats potentiellement favorables pour les amphibiens telles que les forêts (Stevens *et al.* 2006b), prairies, mares (Rowe *et al.* 2000) alternent avec des taches d'habitat potentiellement défavorables tels que les bâtis (Hitchings & Beebee 1997; Rowe *et al.* 2000), champs cultivés (Stevens *et al.* 2006b), routes, chemins de fer, fleuves et estuaires (Rowe *et al.* 2000). La topographie peut aussi jouer un rôle dans le sens de dispersion (Lowe *et al.* 2008). Des méthodes d'analyses récentes utilisant les systèmes d'informations géographiques (SIG) permettent d'inclure l'influence de nombreux paramètres écologiques et géographiques. Par exemple, certaines méthodes telles que celle implémentée dans le logiciel PATHMATRIX (Ray 2005) permettent à partir de la création de cartes de friction, la réalisation de matrices de distances géographiques efficaces entre échantillons. Plusieurs cartes de friction sont réalisées en faisant varier des coefficients de friction selon les éléments du paysage (liés au coût énergétique et au risque de mortalité). A partir de chacune de ces cartes, un algorithme du chemin de moindre coût calcule une matrice de distance géographique effective entre sites. Ces matrices peuvent ensuite être comparées à la matrice génétique selon un test de Mantel. Le meilleur modèle correspondra à celui pour lequel les

coefficients de friction de la matrice se rapprochent le plus de la réalité. Ainsi, Stevens *et al.* (2006b) ont paramétré leurs modèles en utilisant les résultats d'une étude comportementale menée chez le crapaud calamite *Bufo calamita*, dont l'efficacité des mouvements était mesurée sur différents composants du paysage (forêts, cultures, pâtures, habitats du crapaud calamite, routes). Ainsi, les modèles basés sur les chemins de moindre coût expliquaient mieux la structure génétique que le modèle basé sur les distances géographiques euclidiennes.

Néanmoins dans notre jeu de données, la différenciation globale observée sur l'aire d'étude est très faible ($\hat{\theta} = 0,027$, $p < 0,000$). Il est donc très probable que les effets de ces éléments paysagers disséminés sur la structure génétique du triton palmé soient noyés par l'effet de l'isolement par la distance. Toutefois, il peut être intéressant d'utiliser des marqueurs génétiques plus discriminants (ex : variation allélique au gène de l'Adh en lien avec le niveau d'oxygénation, Carter *et al.* 2000) pour étudier les adaptations locales en lien avec la matrice paysagère et leur maintien face aux migrations *via* les corridors.

Perspectives dans l'étude de la sélection au CMH

Séquencer les différents allèles

A l'aide des séquences nucléotidiques, il sera possible de réaliser la généalogie des différents allèles de l'exon 2 du CMH classe II. Il serait intéressant de replacer cette généalogie dans le contexte plus large des séquences obtenues sur les autres tritons. En effet, nous n'avons pas de monophylie pour les séquences de tritons palmés. Ceci semble indiquer une persistance importante des allèles présents dans cette espèce. Nous pourrions tester les hypothèses de sélection par l'estimation des *ratios* de substitutions non-synonymes et substitutions synonymes (McDonald & Kreitman 1991). Les mutations synonymes étant essentiellement neutres car elles ne génèrent pas le changement d'acides aminés, le taux de mutations synonymes (K_s) équivaut au taux de mutation. Les mutations non synonymes (K_a) qui résultent de la modification d'acides aminés sont plus susceptibles d'être sous l'effet de la sélection. Donc, dans le cas où les mutations sont délétères, le *ratio* K_a/K_s est censé être < 1 et refléter l'effet de la sélection purifiante. Au contraire, si les mutations non synonymes sont maintenues dans les populations par sélection positive le *ratio* dn/ds est censé être > 1 .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams DC, Collyer ML (2007) Analysis of character divergence along environmental gradients and other covariates. *Evolution*, **61**, 510-515.
- Addinsoft C (2009) XLSTAT Version 2009.4.03.
- Aguilar A, Garza JC (2006) A comparison of variability and population structure for major histocompatibility complex and microsatellite loci in California coastal steelhead (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Molecular Ecology*, **15**, 923-937.
- Aguilar A, Roemer G, Debenham S, Binns M, Garcelon D, Wayne RK (2004) High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 3490-3494.
- Aguilar A, Smith TB, Wayne RK (2005) A comparison of variation between a MHC pseudogene and microsatellite loci of the little greenbul (*Andropadus virens*). *BMC Evolutionary Biology*, **5**.
- Alexandrino J, Baird SJE, Lawson L, Macey JR, Moritz C, Wake DB (2005) Strong selection against hybrids at a hybrid zone in the *Ensatina* ring species complex and its evolutionary implications. *Evolution*, **59**, 1334-1347.
- Alexandrino J, Froufe E, Arntzen JW, Ferrand N (2000) Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology*, **9**, 771-781.
- Alvarez D, Nicieza AG (2002) Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology*, **16**, 640-648.
- Andersen LW, Fog K, Damgaard C (2004) Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceeding of the Royal Society of London Serie B*, **271**, 1293-1302.
- Anderson E, Hubricht L (1938) Hybridization in Tradescantia. III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany*, **25**, 396-402.
- Anderson EC, Thompson EA (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, **160**, 1217-1229.
- Andrew M, Kohn LM (2009) Single nucleotide polymorphism-based diagnostic system for crop-associated *Sclerotinia* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 5600-5606.
- Anmarkrud JA, Kleven O, Bachmann L, Lifjeld JT (2008) Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasmy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evolutionary Biology*, **8**.
- Antolin MF, Savage LT, Eisen RJ (2006) Landscape features influence genetic structure of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Landscape Ecology*, **21**, 867-875.
- Arnaud-Haond S, Bonhomme F, Blanc F (2003) Large discrepancies in differentiation of allozymes, nuclear and mitochondrial DNA loci in recently founded Pacific populations of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 388-398.
- Arnold ML (1997) *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, New York.
- Arnold ML, Hodges SA (1995) Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution*, **10**, 67-71.
- Arntzen J, Wijer PD, Jehle R, Smit E, Smit J (1998) Rare hybridization and introgression in smooth and palmate newts (Salamandridae: *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*) *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **36**, 111-122.

- Arntzen JW (1981) Ecological observations on *Chioglossa lusitanica* (Caudata, Salamandridae). *Amphibia-Reptilia*, **1**, 187–203.
- Arntzen JW (1986) Note sur la coexistence d'espèces sympatriques de tritons du genre *Triturus*. *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, **37**, 1-8.
- Arntzen JW (1994) Speedy salamanders: sedentariness and migration of *Chioglossa lusitanica*. *Revista Española de Herpetologia*, **8**, 81–86.
- Arntzen JW, Jehle R, Bardakci F, Burke T, Wallis GP (2009) Asymmetric viability of reciprocal-cross hybrids between crested and marbled newts (*Triturus cristatus* and *T. marmoratus*). *Evolution*, **63**, 1191-1202.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avice JC, Walker D, Johns GC (1998) Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **265**, 1707-1712.
- Baber MJ, Fleishman E, Babbitt KJ, Tarr TL (2004) The relationship between wetland hydroperiod and nestedness patterns in assemblages of larval amphibians and predatory macroinvertebrates. *Oikos*, **107**, 16-24.
- Babik W, Branicki W, Crnobrnja-Isailović J, Cogalniceanu D, Sas I, Olgun K, Poyarkov NA, Garcia-Paris M, Arntzen JW (2005a) Phylogeography of two European newt species — discordance between mtDNA and morphology. *Molecular Ecology*, **14**, 2475–2491.
- Babik W, Durka W, Radwan J (2005b) Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). *Molecular Ecology*, **14**, 4249-4257.
- Babik W, Pabijan M, Arntzen JW, Cogalniceanu D, Durka W, Radwan J (2009) Long-term survival of a urodele amphibian despite depleted major histocompatibility complex variation. *Molecular Ecology*, **18**, 769-781.
- Babik W, Pabijan M, Radwan J (2008) Contrasting patterns of variation in MHC loci in the Alpine newt. *Molecular Ecology*, **17**, 2339-2355.
- Babik W, Szymura JM, Rafinski J (2003) Nuclear markers, mitochondrial DNA and male secondary sexual traits variation in a newt hybrid zone (*Triturus vulgaris* × *T. montandoni*). *Molecular Ecology*, **12**, 1913-1930.
- Baker AJ (2000) *Molecular methods in ecology*. Blackwell Science, Oxford.
- Barton NH (2000) Estimating multilocus linkage disequilibria. *Heredity*, **84**, 373-389.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of Hybrid zones. *Annual review of ecology and systematics*, **16**, 113-148.
- Beachy CK (1996) Reduced courtship success between parapatric populations of the plethodontid salamander, *Gyrinophilus porphyriticus*. *Copeia*, **1996**, 199–203.
- Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **263**, 1619-1626.
- Beebee TJC (1983) Habitat selection by amphibians across an agricultural land-heathland transect in Britain (*Triturus helveticus/vulgaris*). *Biological Conservation*, **27**, 111-124.
- Beebee TJC, Griffiths RA (2005) The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, **125**, 271-285.
- Beebee TJC, Rowe G (2000) Microsatellite analysis of natterjack toad *Bufo calamita* Laurenti populations: Consequences of dispersal from a Pleistocene refugium. *Biological Journal of the Linnean Society*, **69**, 367-381.
- Beebee TJC, Rowe G (2001) Application of genetic bottleneck testing to the investigation of amphibian declines: a case study with natterjack toads. *Conservation Biology*, **15**, 266-270.

- Beebee TJC, Rowe G, Arntzen JW (1999) Identification of newts (*Triturus sp.*) and their hybrids using molecular methods. *Journal of Zoology, London*, **249**, 43-47.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05. Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bell G (1977) The life of the smooth newt (*Triturus vulgaris*) after metamorphosis. *Ecological Monographs*, **47**, 279-299.
- Belleudy P (2000) Restoring flow capacity in the Loire River bed. *Hydrological processes*, **14**, 2331-2344.
- Benazzi M (1957) Sulla ibridazione fra *Triturus helveticus* e *Tr. vulgaris*. *Bollettino di Zoologia*, **24**, 235-242.
- Bennett AF (1990) Habitat corridors and the conservation of small mammals in a fragmented forest environment. *Landscape Ecology*, **4**, 109-122.
- Bernatchez L, Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 363-377.
- Berven KA (1982) The Genetic Basis of Altitudinal Variation in the Wood Frog *Rana sylvatica* II. An Experimental Analysis of Larval Development. *Oecologia*, **52**, 360-369.
- Berven KA (1987) The heritable basis of variation in larval developmental patterns within populations of the wood frog (*Rana sylvatica*) *Evolution*, **41**, 1088-1097.
- Bierne N (2001) *Barrières au flux génique en milieu marin : Sélection et dispersion larvaire dans la zone d'hybridation des moules côtières Mytilus edulis et M. galloprovincialis*. Rapport de thèse, Université des Montpellier 2.
- Blaustein AR, Bancroft BA (2007) Amphibian population declines: Evolutionary considerations. *BioScience*, **57**, 437-444.
- Blaustein AR, Wake DB, Sousa WP (1994) Amphibian declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology*, **8**, 60-71.
- Bleeker W, Hurka H (2001) Introgressive hybridization in *Rorippa* (Brassicaceae): Gene flow and its consequences in natural and anthropogenic habitats. *Molecular Ecology*, **10**, 2013-2022.
- Borge T, Lindroos K, Nadvornik P, Syvanen AC, Saetre GP (2005) Amount of introgression in flycatcher hybrid zones reflects regional differences in pre and post-zygotic barriers to gene exchange. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 1416-1424.
- Bos DH, DeWoody JA (2005) Molecular characterization of major histocompatibility complex class II alleles in wild tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Immunogenetics*, **57**, 775-781.
- Bos DH, Gopurenko D, Williams RN, Dewoody JA (2008) Inferring population history and demography using microsatellites, mitochondrial DNA, and major histocompatibility complex (MHC) genes. *Evolution*, **62**, 1458-1468.
- Bouchardy C (2002) *La Loire*. Paris.
- Bouton N (1986) Données sur la migration de *Triturus cristatus* et *T. marmoratus* (Urodela, Salamandridae) dans le Département de la Mayenne (France). *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, **40**, 43-51.
- Boyce WM, Hedrick PW, Muggli-Cockett NE, Kalinowski S, Penedo MCT, Ramey Ii RR (1997) Genetic variation of major histocompatibility complex and microsatellite loci: A comparison in bighorn sheep. *Genetics*, **145**, 421-433.
- Braaksma HE (1948) Hybridization in *Triturus* - I. Description of a method by which reciprocal hybrids from *Triturus taeniatus* and *Triturus alpestris* can be obtained *Journal of Genetics*, **48**, 219-222.

- Bradbury JN, Verhencamp SC (1998) *Principles of animal communication*. Sinauer, Sunderland Massachusetts.
- Bradford DF (1991) Mass mortality and extinction in a high elevation population of *Rana muscosa*. *Journal of Herpetology*, **25**, 174-177.
- Bradley Shaffer H, Fellers GM, Magee A, Randal Voss S (2000) The genetics of amphibian declines: Population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo canorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*, **9**, 245-257.
- Brede EG, Beebee TJC (2004) Contrasting population structures in two sympatric anurans: Implications for species conservation. *Heredity*, **92**, 110-117.
- Brede EG, Beebee TJC (2006) Large variations in the ratio of effective breeding and census population sizes between two species of pond-breeding anurans. *Biological Journal of the Linnean Society*, **89**, 365-372.
- Briles W, Stone H, Cole R (1977) Marek's disease: effects of B histocompatibility alloalleles in resistant and susceptible chickens. *Sciences*, **195**, 193-195.
- Brown JH (1984) On the relationship between abundance and distribution of species. *American Naturalist*, **124**, 255-279.
- Brown JH, Mehlman DW, Stevens GC (1995) Spatial variation in abundance. *Ecology*, **76**, 2028-2043.
- Bruce RC (1986) Upstream and downstream movements of *Eurycea bislineata* and other salamanders in a southern Appalachian stream. *Herpetologica*, **42**, 149-155.
- Bull V, Beltran M, Jiggins C, McMillan W, Bermingham E, Mallet J (2006) Polyphyly and gene flow between non-sibling *Heliconius* species. *BMC Biol*, **4**, 4-11.
- Burke JM, Arnold ML (2001) Genetics and the fitness of hybrids. Dans: *Annual Review of Genetics*, pp. 31-52.
- Burkey TV, Reed DH (2006) The effects of habitat fragmentation on extinction risk: Mechanisms and synthesis. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, **28**, 9-37.
- Burns EL, Eldridge MDB, Houlden BA (2004) Microsatellite variation and population structure in a declining Australian Hylid *Litoria aurea*. *Molecular Ecology*, **13**.
- Burridge C, Craw D, Waters J (2006) River capture, range expansion, and cladogenesis: the genetic signature of freshwater vicariance. *Evolution*, **60**, 1038-1049.
- Cabe PR, Page RB, Hanlon TJ, Aldrich ME, Connors L, Marsh DM (2007) Fine-scale population differentiation and gene flow in a terrestrial salamander (*Plethodon cinereus*) living in continuous habitat. *Heredity*, **98**, 53-60.
- Cadena CD, López-Lanús B, Bates JM, Krabbe N, Rice NH, Stiles FG, Palacio JD, Salaman P (2007) A rare case of interspecific hybridization in the tracheophone suboscines: Chestnut-naped Antpitta *Grallaria nuchalis* x Chestnut-crowned Antpitta *G. ruficapilla* in a fragmented Andean landscape. *Ibis*, **149**, 814-825.
- Campos JL, Posada D, Morán P (2006) Genetic variation at MHC, mitochondrial and microsatellite loci in isolated populations of Brown trout (*Salmo trutta*). *Conservation Genetics*, **7**, 515-530.
- Cano JM, Laurila A, Palo J, Merilä J (2004) Population differentiation in G matrix structure due to natural selection in *Rana temporaria*. *Evolution*, **58**, 2013-2020.
- Carter PA, Mitton JB, Kocher TD, Coehlo JR (2000) Maintenance of the alcohol dehydrogenase polymorphism in Tiger Salamanders, II. Differences in biochemical function among allozymes. *Functional Ecology*, **14**, 70-76.
- Castanet J (1982) *Recherches sur la croissance du tissu osseux des reptiles. Application : la méthode squelettochronologique*. Rapport de thèse, Université de Paris 7.

- Castanet J, Meunier FJ, Ricqles A (1977) L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les vertébrés poikilothermes : données comparatives et essais de synthèse. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique*, **111**, 183-202.
- Chadwick EA, Slater FM, Ormerod SJ (2006) Inter- and intraspecific differences in climatically mediated phenological change in coexisting *Triturus* species. *Global Change Biology*, **12**, 1069-1078.
- Chan-McLeod ACA (2003) Factors affecting the permeability of clearcuts to red-legged frogs. *Journal of Wildlife Management*, **67**, 663-671.
- Chan LM, Zamudio KR (2009) Population differentiation of temperate amphibians in unpredictable environments. *Molecular Ecology*, **18**, 3185-3200.
- Clarke B, Kirby DRS (1966) Maintenance of histocompatibility polymorphisms. *Nature*, **211**, 999-1000.
- Coates BS, Sumerford DV, Miller NJ, Kim KS, Sappington TW, Siegfried BD, Lewis LC (2009) Comparative performance of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for population genetic analysis. *Journal of Heredity*, **100**, 556-564.
- Cogălniceanu D (1994) Experimental hybridization within the *Triturus vulgaris* species-group (Amphibia, Caudata). *Revue of Romanian Biology*, **39**, 145-150.
- Cogălniceanu D, Miaud C (2003) Population age structure and growth in four syntopic amphibian species inhabiting a large river floodplain. *Canadian Journal of Zoology*, **81**, 1096-1106.
- Coluzzi M (1982) Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in Anopheline mosquitoes. *Progress in clinical and biological research*, **96**, 143-153.
- Cooley JR, Marshall DC, Hill KBR, Simon C (2006) Reconstructing asymmetrical reproductive character displacement in a periodical cicada contact zone. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 855-868.
- Copyright (2001) MapInfo Professional Version 6.5.
- Corander J, Marttinen P (2006) Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Molecular Ecology*, **15**, 2833-2843.
- Cordero PJ, Summers-Smith JD (1993) Hybridization between house sparrow and tree sparrow (*Passer domesticus*, *Passer montanus*). *Journal für Ornithologie*, **134**, 69-77.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- Coulon A, Cosson JF, Angibault JM, Cargnelutti B, Galan M, Morellet N, Petit E, Aulagnier S, Hewison AJM (2004) Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach *Molecular Ecology*, **13**, 2841-2850.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORR, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 290-295.
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, **19**, 299-306.
- Currat M, Ray N, Excoffier L (2004) SPLATCHE: a program to simulate genetic diversity taking into account environmental heterogeneity. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 139-142.
- Curtis JMR, Taylor EB (2004) The genetic structure of coastal giant salamanders (*Dicamptodon tenebrosus*) in a managed forest. *Biological Conservation*, **115**, 45-54.
- Cushman SA (2006) Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation*, **128**, 231-240.
- Darwin C (1859) *On the Origin of the Species by Means of Natural Selection*. Flammarion, Paris.

- Dawid IB, Blackler AW (1972) Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Developmental Biology*, **29**, 152-161.
- De Toni A, Touron-Bodilis A, Wallet F (2009) Impact of climate change on pathogenic aquatic microorganisms: Some examples. *Environnement, Risques & Santé*, **8**, 311-321.
- DeMaynadier PG, Hunter Jr ML (2000) Road effects on amphibian movements in a forested landscape. *Natural Areas Journal*, **20**, 56-65.
- Den Nijs JCM (1999) Plant evolution in disturbed habitats: an introduction. *Folia Geobotanica*, **34**, 399-403.
- Denoël M (2006) Seasonal variation of morph ratio in facultatively paedomorphic populations of the palmate newt *Triturus helveticus*. *Acta Oecologica*, **29**, 165-170.
- Denoël M, Ficetola GF (2008) Conservation of newt guilds in an agricultural landscape of Belgium: The importance of aquatic and terrestrial habitats. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **18**, 714-728.
- Denoël M, Lehmann A (2006) Multi-scale effect of landscape processes and habitat quality on newt abundance: Implications for conservation. *Biological Conservation*, **130**, 495-504.
- Dieckmann U, Doebeli M (1999) On the origin of species by sympatric speciation. *Nature*, **400**, 354-357.
- Dion R (1934) *Le val de Loire : Etude de géographie régionale*. Rapport de thèse, Université de Tours.
- DIREN Centre (2005) Atlas des zones inondables de la vallée de la Loire. <http://www2.centre.ecologie.gouv.fr/azil/index.htm>.
- Dobson A (2009) Climate variability, global change, immunity, and the dynamics of infectious diseases. *Ecology*, **90**, 920-927.
- Dobzhansky T (1940) Speciation as a stage in evolutionary divergence. *American Naturalist*, **74**, 312-321.
- Dobzhansky TG (1937) *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Doherty PC, Zinkernagel RM (1975) Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature*, **256**, 50-52.
- Dubey S, Ursenbacher S, Pellet J, Fumagalli L (2009) Genetic differentiation in two European tree frog (*Hyla arborea*) metapopulations in contrasted landscapes of western Switzerland. *Amphibia Reptilia*, **30**, 127-133.
- Duellman WE, Trueb L (1994) *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Duguet R, Melki F (2003) *Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg*. Collection Parthénope, Mèze.
- Duvernell DD, Schaefer JF, Hancks DC, Fonoti JA, Ravanelli AM (2007) Hybridization and reproductive isolation among syntopic populations of the topminnows *Fundulus notatus* and *F. olivaceus*. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 152-164.
- Edmunds S (1999) Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution*, **53**, 1757-1768.
- Eizaguirre C, Lenz TL, Traulsen A, Milinski M (2009) Speciation accelerated and stabilized by pleiotropic major histocompatibility complex immunogenes. *Ecology Letters*, **12**, 5-12.
- Eklom R, Sæther SA, Jacobsson P, Fiske P, Sahlman T, Grahn M, Kålås JA, Höglund J (2007) Spatial pattern of MHC class II variation in the great snipe (*Gallinago media*). *Molecular Ecology*, **16**, 1439-1451.
- Eldredge N (1989) *Macroevolutionary Dynamics: Species, Niches, and Adaptive Peaks*. McGraw-Hill, New York.

- Ellinger N, Jehle R (1997) Struktur und Dynamik einer Donaukammolch-population (*Triturus dobrogicus*) am Endelteich bei Wien : ein Überblick über neun Untersuchungsjahre. *Stapfia*, **51**, 133-150.
- Endler JA (1977) *Geographic variation, speciation, and clines*. Princeton University Press, Princeton.
- Endler JA (1990) On the measurement and classification of colours in studies of animal colour patterns. *Biological Journal of the Linnean Society*, **41**, 315-332.
- Endler JA (1991) Variation in the appearance of guppy color patterns to guppies and their predators under different visual conditions. *Vision Research*, **31**, 587-608.
- England PR, Cornuet J-M, Berthier P, Tallmon D, Luikart G (2006) Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias in small samples. *Conservation Genetics*, **7**, 303-308.
- Evanno G, Castella E, Goudet J (2006) Evolutionary aspects of population structure for molecular and quantitative traits in the freshwater snail *Radix balthica*. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 1071-1082.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Fahrig L (2002) Effect of habitat fragmentation on the extinction threshold: A synthesis. *Ecological Applications*, **12**, 346-353.
- Fan W, Kasahara M, Gutknecht J, Klein D, Mayer WE, Jonker M, Klein J (1989) Shared class II MHC polymorphisms between humans and chimpanzees. *Human Immunology*, **26**, 107-121.
- Faure M, David P, Bonhomme F, Bierne N (2008) Genetic hitchhiking in a subdivided population of *Mytilus edulis*. *BMC Evolutionary Biology*, **8**, 164.
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, **17**, 368-376.
- Ficetola GF, Bernardi FD (2005) Supplementation or in situ conservation? Evidence of local adaptation in the Italian agile frog *Rana latastei* and consequences for the management of populations. *Animal Conservation*, **8**, 33-40.
- Figueroa F, Gunther E, Klein J (1988) MHC polymorphism pre-dating speciation. *Nature*, **335**, 265-267.
- Fisher HS, Wong BBM, Rosenthal GG (2006) Alteration of the chemical environment disrupts communication in a freshwater fish. *Proceedings of the Royal Society London B*, **273**, 1187-1193.
- Fitzpatrick BM, Johnson JR, Kump DK, Shaffer HB, Smith JJ, Voss SR (2009) Rapid fixation of non-native alleles revealed by genome-wide SNP analysis of hybrid tiger salamanders. *BMC Evolutionary Biology*, **9**.
- Fitzpatrick BM, Shaffer HB (2004) Environment-dependent admixture dynamics in a tiger salamander hybrid zone. *Evolution*, **58**, 1282-1293.
- Foll M, Gaggiotti OE (2006) Identifying the environmental factors that determine the genetic structure of Populations. *Genetics*, **174**, 875-891.
- Francillon-Viellot H (1987) *La croissance des os longs chez les amphibiens. Son utilisation comme critère d'âge*. Rapport de Thèse, Université Paris 7.
- Freidenburg LK, Skelly DK (2004) Microgeographical variation in thermal preference by an amphibian. *Ecology Letters*, **7**, 369-373.

- Frisch D, Libman BS, D'Surney SJ, Threlkeld ST (2005) Diversity of floodplain copepods (Crustacea) modified by flooding: species richness, diapause strategies and population genetics. *Archive Hydrobiology*, **162**, 1-17.
- Fujita K, Silver J (1994) Single-strand Conformational Polymorphism. *Genome Research*, **4**, 137-140.
- Fuller RC (2008) Genetic incompatibilities in killifish and the role of environment. *Evolution*, **62**, 3056-3068.
- Funk WC, Blouin MS, Corn PS, Maxell BA, Pilliod DS, Amish S, Allendorf FW (2005) Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Molecular Ecology*, **14**, 483-496.
- Gabor CR, Halliday TR (1997) Sequential mate choice by multiply mating smooth newts: Females become more choosy. *Behavioral Ecology*, **8**, 162-166.
- Gamble LR, McGarigal K, Compton BW (2007) Fidelity and dispersal in the pond-breeding amphibian, *Ambystoma opacum*: Implications for spatio-temporal population dynamics and conservation. *Biological Conservation*, **139**, 247-257.
- García-París M, Good DA, Parra-Olea G, Wake DB (2000) Biodiversity of Costa Rican salamanders: Implications of high levels of genetic differentiation and phylogeographic structure for species formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 1640-1647.
- Garner TWJ, Angelone S, Pearman PB (2003) Genetic depletion in Swiss populations of *Rana latastei*: conservation implications. *Biological Conservation*, **114**, 371-376.
- Garner TWJ, Schmidt BR (2003) Relatedness, body size and paternity in the alpine newt, *Triturus alpestris*. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, **270**, 619-624.
- Gascon C, Loughheed SC, Bogart JP (1998) Patterns of genetic population differentiation in four species of Amazonian frogs: A test of the riverine barrier hypothesis. *Biotropica*, **30**, 104-119.
- Gibbs JP (1998a) Distribution of woodland amphibians along a forest fragmentation gradient. *Landscape Ecology*, **13**, 263-268.
- Gibbs JP (1998b) Genetic structure of redback salamander *Plethodon cinereus* populations in continuous and fragmented forests. *Biological Conservation*, **86**, 77-81.
- Giordano AR, Ridenhour BJ, Storfer A (2007) The influence of altitude and topography on genetic structure in the long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*). *Molecular Ecology*, **16**, 1625-1637.
- GIP Loire Estuaire (2002) Les lignes d'eau du fleuve. *Cahier indicateurs*, **1**.
- GIP Loire Estuaire (2003) Mise en eau des annexes hydrauliques. *Cahier indicateurs*, **1**.
- Goldberg EE, Lande R (2006) Ecological and reproductive character displacement on an environmental gradient. *Evolution*, **60**, 1344-1357.
- Goldstein DB, Schlötterer C (2000) *Microsatellites. Evolution and applications*. Oxford university press, New York.
- Gomez-Mestre I, Tejedo M (2003) Local adaptation of an anuran amphibian to osmotically stressful environments. *Evolution*, **57**, 1889-1899.
- Gomez-Mestre I, Tejedo M (2004) Contrasting patterns of quantitative and neutral genetic variation in locally adapted populations of the natterjack toad, *Bufo calamita*. *Evolution*, **58**, 2343-2352.
- Gonzalez A, Lawton JH, Gilbert FS, Blackburn TM, Evans-Freke I (1998) Metapopulation dynamics, abundance, and distribution in a microecosystem. *Science*, **281**, 2045-2047.
- Goodman SJ, Barton NH, Swanson G, Abernethy K, Pemberton JM (1999) Introgression through rare hybridization: A genetic study of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*) in Argyll, Scotland. *Genetics*, **152**, 355-371.

- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- Green DM, Parent C (2003) Variable and asymmetric introgression in a hybrid zone in the toads, *Bufo americanus* and *Bufo fowleri*. *Copeia*, 34-43.
- Griffiths RA (1986) Feeding niche overlap and food selection in smooth and palmate newts, *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*, at a pond in mid-Wales. *Journal of Animal Ecology*, **55**, 201-214.
- Griffiths RA (1987) Microhabitat and seasonal niche dynamics of smooth and palmate newts, *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*, at a pond in mid-Wales. *Journal of Animal Ecology*, **56**, 441-451.
- Griffiths RA (1996) *Newts and Salamanders of Europe*. T & AD Poyser Natural history, Cambridge.
- Griffiths RA, Mylotte VJ (1987) Microhabitat selection and feeding relations of smooth and warty newts, *Triturus vulgaris* and *T. cristatus*, at an upland pond in mid-Wales. *Holarctic ecology*, **10**, 1-7.
- Griffiths RA, Mylotte VJ (1988) Observations on the development of the secondary sexual characters of male newts, *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*. *Journal of Herpetology*, **22**, 476-480.
- Griffiths RA, Roberts JM, Sims S (1987) A natural hybrid newt, *Triturus helveticus* x *T. vulgaris*, from a pond in mid-Wales. *Journal of Zoology, London*, **213**, 133-140.
- Group ISMW (2001) A map of the human genome sequence variation contains 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, **409**, 928-933.
- Gruen JR, Weissman SM (2001) Human MHC class III and IV genes and disease associations. *Front Biosci*, **6**.
- Guerry AD, Hunter Jr ML (2002) Amphibian distributions in a landscape of forests and agriculture: An examination of landscape composition and configuration. *Conservation Biology*, **16**, 745-754.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 712-715.
- Gulve PS (1994) Distribution and extinction patterns within a northern metapopulation of the pool frog, *Rana lessonae*. *Ecology*, **75**, 1357-1367.
- Guyetant R, Pinston H, Herold J, Rougeot J (1991) Etude de populations de Tritons : *Triturus alpestris* et *T. helveticus* dans une mare temporaire d'altitude (est de la France - Massif du Jura). Dans: *Tissus dur et âge individuel des vertébrés. Colloque national, Bondy, France, 4-6 mars*. (eds. Baglinière J, Castanet J, Conand F, Meunier J), pp. 355-362. Colloques et Séminaires, ORSTOM-INRA.
- Haldane JBS (1922) Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics*, **12**, 101-109.
- Hall TA (1999) BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Halliday TR (1972) *A study of the behavior of Newts*. Ph.D. Thesis, Oxford.
- Halliday TR (1977) The courtship of European newts. An evolutionary perspective. Dans: *The reproductive biology of amphibians*. (eds. Taylor DH, Guttman SI). Plenum, New York.
- Halliday TR, Verrel P (1988) Body size and age in amphibians and reptiles. *Journal of Herpetology*, **223**, 253-265.
- Hamer AJ, McDonnell MJ (2008) Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: A review. *Biological Conservation*, **141**, 2432-2449.
- Hanski I, Gaggiotti OE (2004) *Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulations*. Elsevier Academic Press, Burlington.

- Hanski I, Simberloff D (1997) The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. Dans: *Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution*. (eds. Hanski I, Gilpin ME), pp. 5-26. Academic Press, San Diego.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, **2**.
- Harf R, Sommer S (2005) Association between major histocompatibility complex class II DRB alleles and parasite load in the hairy-footed gerbil, *Gerbillurus paeba*, in the southern Kalahari. *Molecular Ecology*, **14**, 85-91.
- Harrison RG (1986) Pattern and process in a narrow hybrid zone. *Heredity*, **56**, 337-349.
- Hauswaldt JS, Stuckas H, Pfautsch S, Tiedemann R (2007) Molecular characterization of MHC class II in a nonmodel anuran species, the fire-bellied toad *Bombina bombina*. *Immunogenetics*, **59**, 479-491.
- Hayes M, Quinn T, Dugger DJ, Hickx TL, Melchior MA, Runde DE (2006) Dispersion of Coastal Tailed Frog (*Ascaphus truei*): An Hypothesis Relating Occurrence of Frogs in Non-Fish-Bearing Headwater Basins to Their Seasonal Movements. *Journal of Herpetology*, **40**, 531-543.
- Hedlund L (1990) Factors affecting differential mating success in male crested newts, *Triturus cristatus*. *Journal of Zoology*, **220**, 33-40.
- Hedrick PW (1999) Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, **53**, 313-318.
- Hedrick PW (2002) Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution*, **56**, 1902-1908.
- Hedrick PW, Kim TJ, Parker KM (2001) Parasite resistance and genetic variation in the endangered Gila topminnow. *Animal Conservation*, **4**, 103-109.
- Hellberg ME (1994) Relationships between inferred levels of gene flow and geographic distance in a philopatric coral *Balanophyllia elegans*. *Evolution*, **48**, 1829-1854.
- Hels T (2002) Population dynamics in a Danish metapopulation of spadefoot toads *Pelobates fuscus*. *Ecography*, **25**, 303-313.
- Hels T, Buchwald E (2001) The effect of road kills on amphibian populations. *Biological Conservation*, **99**, 331-340.
- Hernandez-Martich JD, Novak JM, Smith MH, Johns PE (1995) Genetic structure of mosquitofish populations in the Altamaha and Ogeechee drainages of Georgia: Reporting an undescribed form in the Ocmulgee River. *Biochemical Systematics and Ecology*, **23**, 617-625.
- Heuschele J, Candolin U (2007) An increase in pH boosts olfactory communication in sticklebacks. *Biology Letters*, **3**, 411-413.
- Highton R (1977) Comparisons of microgeographic variation in morphological and electrophoretic traits. *Evolutionary Biology*, **10**, 397-436.
- Hill AVS (1998) The immunogenetics of human infectious diseases. Dans: *Annual Review of Immunology*, pp. 593-617.
- Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM (1991) Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, **352**, 595-600.
- Hill WG (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetic Research*, **38**, 209-216.
- Hillis DM, Green DM (1990) Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. *Journal of Evolutionary Biology*, **3**, 49-64.
- Hitchings SP, Beebe TJ (1997) Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations: Implications for biodiversity conservation. *Heredity*, **79**, 117-127.

- Hitchings SP, Beebee TJG (1996) Persistence of British natterjack toad *Bufo calamita* Laurenti (Anura: Bufonidae) populations despite low genetic diversity. *Biological Journal of the Linnean Society*, **57**, 69-80.
- Hoban SM, McCleary TS, Schlarbaum SE, Romero-Severson J (2009) Geographically extensive hybridization between the forest American butternut and Japanese walnut. *Conservation Biology*, **5**, 324-327.
- Höbel G, Gerhardt HC (2003) Reproductive character displacement in the acoustic communication system of green tree frogs (*Hyla cinerea*). *Evolution*, **57**, 894-904.
- Hoek PEA, Garner TWJ (2007) Female alpine newts (*Triturus alpestris*) mate initially with males signalling fertility benefits. *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**, 483-491.
- Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot Jr CC, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S (2004) Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*, **5**, 889-899.
- Howard DJ (1986) A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution*, **40**, 34-43.
- Howard RD, Moorman RS, Whiteman HH (1997) Differential effects of mate competition and mate choice on eastern tiger salamanders. *Animal Behaviour*, **53**, 1345-1356.
- Hubbard PC, Barata EN, Canario VM (2002) Possible disruption of pheromonal communication by humic acid in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, **60**, 169-183.
- Hubbs CL (1955) Hybridization between fish species in nature. *Systematic Zoology*, **4**, 1-20.
- Hughes AL, Yeager M (1998) Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. In: *Annual Review of Genetics*, pp. 415-435.
- Islam MM, Kurose N, Khan MR, Nishizawa T, Kuramoto M, Alam MS, Hasan M, Kurniawan N, Nishioka M, Sumida M (2008) Genetic Divergence and Reproductive Isolation in the Genus *Fejervarya* (Amphibia: Anura) from Bangladesh Inferred from Morphological Observations, Crossing Experiments, and Molecular Analyses. *Zoological Science*, **25**, 1084-1105.
- IUCN (2008) <http://www.iucnredlist.org>.
- Jackson JK, McElravy EP, Resh VH (1999) Long-term movements of self-marked caddisfly larvae (Trichoptera: Sericostomatidae) in a California coastal mountain stream. *Freshwater Biology*, **42**, 525-536.
- Jakob C, Poizat G, Veith M, Seitz A, Crivelli AJ (2003) Breeding phenology and larval distribution of amphibians in a Mediterranean pond network with unpredictable hydrology. *Hydrobiologia*, **499**.
- Jakob C, Seitz A, Crivelli AJ, Miaud C (2002) Growth cycle of the marbled newt (*Triturus marmoratus*) in the Mediterranean region assessed by skeletochronology. *Amphibia-Reptilia*, **23**, 407-418.
- Jang Y, Won YJ, Choe JC (2009) Convergent and divergent patterns of morphological differentiation provide more evidence for reproductive character displacement in a wood cricket *Gryllus fultoni* (Orthoptera: Gryllidae). *BMC Evolutionary Biology*, **9**.
- Jarvi SI, Tarr CL, McIntosh CE, Atkinson CT, Fleischer RC (2004) Natural selection of the major histocompatibility complex (Mhc) in Hawaiian honeycreepers (Drepanidinae). *Molecular Ecology*, **13**, 2157-2168.
- Jehle R, Arntzen JW (2002) Review: Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Herpetological journal*, **12**, 1-9.
- Jehle R, Dawson DA, Morales-Hojas R, Sztatecsny M, Pandhal J, Burke T (Unpublished) Microsatellite loci in the common newt, *Triturus vulgaris*.

- Jehle R, Wilson GA, Arntzen JW, Burke T (2005) Contemporary gene flow and the spatio-temporal genetic structure of subdivided newt populations (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*). *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 619-628.
- Jensen LF, Hansen MM, Mensberg KLD, Loeschcke V (2008) Spatially and temporally fluctuating selection at non-MHC immune genes: Evidence from TAP polymorphism in populations of brown trout (*Salmo trutta*, L.). *Heredity*, **100**, 79-91.
- Jiggins CD, Mallet J (2000) Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 250-255.
- Johanet A (2005) *Polyandrie et diversité génétique chez la Grenouille agile Rana dalmatina*. Rapport de D.E.A., Université d'Angers.
- Johanet A, Secondi J, Lemaire C (soumis) Widespread introgression does not leak into allotopy in a broad sympatric zone.
- Johanet A, Secondi J, Pays O, Pagano A, Lodé T, Lemaire C (2009) A case of reproductive character displacement in female palmate newts (*Lissotriton helveticus*). *Comptes Rendus Biologies*, **332**, 548-557.
- Johansson M, Primmer CR, Merilä J (2007) Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology*, **16**, 2693-2700.
- Johansson M, Räsänen K, Merilä J (2001) Comparison of nitrate tolerance between different populations of the common frog, *Rana temporaria*. *Aquatic Toxicology*, **54**, 1-14.
- Joly P, Miaud C, Lehmann A, Grolet O (2001) Habitat matrix effects on pond occupancy in Newts. *Conservation Biology*, **15**, 239-248.
- Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, **24**, 1403-1405.
- Jombart T, Devillard S, Dufour A-B, Pontier D (2008) Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity*, **101**, 92-103.
- Jones MT, Voss SR, Ptacek MB, Weisrock DW, Tonkyn DW (2006) River drainages and phylogeography: An evolutionary significant lineage of shovel-nosed salamander (*Desmognathus marmoratus*) in the southern Appalachians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **38**, 280-287.
- Kaufman J, Wallny HJ (1996) Chicken MHC molecules, disease resistance and the evolutionary origin of birds. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **212**, 129-141.
- Kaufman JF, Flajnik MF, Du Pasquier L (1985) *Xenopus* MHC class II molecules. II. Polymorphism as determined by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Immunology*, **134**, 3258-3264.
- Kimura M (1953) "Stepping-stone" model of population. Dans: *Population Genetics, Molecular Evolution, and the Neutral Theory: Selected Papers*. (ed. Kimura M). University of Chicago Press, Chicago.
- Kimura M (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kinkead KE, Abbott AG, Otis DL (2007) Genetic variation among *Ambystoma* breeding populations on the Savannah River Site. *Conservation Genetics*, **8**, 281-292.
- Kishida O, Trussell GC, Nishimura K (2007) Geographic variation in a predator-induced defense and its genetic basis. *Ecology*, **88**, 1948-1954.
- Knopp T, Merilä J (2009) Microsatellite variation and population structure of the moor frog (*Rana arvalis*) in scandinavia. *Molecular Ecology*, **18**, 2996-3005.
- Knutson MG, Sauer JR, Olsen DA, Mossman MJ, Hemesath LM, Lannoo MJ (1999) Effects of landscape composition and wetland fragmentation on frog and toad abundance and species richness in Iowa and Wisconsin, U.S.A. *Conservation Biology*, **13**, 1437-1446.

- Kondrashov AS, Kondrashov FA (1999) Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation. *Nature*, **400**, 351-354.
- Kraaijeveld-Smit FJL, Beebee TJC, Griffiths RA, Moore RD, Schley L (2005) Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. *Molecular Ecology*, **14**, 3307-3315.
- Kuchta SR, Tan A (2005) Isolation by distance and post-glacial range expansion in the rough-skinned newt, *Taricha granulosa*. *Molecular Ecology*, **14**, 225-244.
- Kuchta SR, Tan AM (2006) Lineage diversification on an evolving landscape: Phylogeography of the California newt, *Taricha torosa* (Caudata: Salamandridae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **89**, 213-239.
- Kundu S, Faulkes CG (2004) Patterns of MHC selection in African mole-rats, family Bathyergidae: The effects of sociality and habitat. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, **271**, 273-278.
- Lacy R (1987) Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology*, **1**, 143-158.
- Lamont BB, He T, Enright NJ, Krauss SL, Miller BP (2003) Anthropogenic disturbance promotes hybridization between *Banksia* species by altering their biology. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 551-557.
- Lampert KP, Rand AS, Mueller UG, Ryan MJ (2003) Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology*, **12**, 3325-3334.
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science*, **241**, 1455-1460.
- Landry C, Bernatchez L (2001) Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology*, **10**, 2525-2539.
- Langefors A, Lohm J, Grahn M, Andersen O, Von Schantz T (2001) Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **268**, 479-485.
- Larson A, Wake DB, Yanev KP (1984) Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics*, **106**, 293-308.
- Laugen AT, Laurila A, Räsänen K, Merilä J (2003) Latitudinal countergradient variation in the common frog (*Rana temporaria*) development rates - Evidence for local adaptation. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 996-1005.
- Laurens V, Chapusot C, del Rosario Ordonez M, Bentrari F, Padros MR, Tournefier A (2001) Axolotl MHC class II β chain: Predominance of one allele and alternative splicing of the β 1 domain. *European Journal of Immunology*, **31**, 506-515.
- Laurila A, Kujasalo J (1999) Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Journal of Animal Ecology*, **68**, 1123-1132.
- Lawlor DA, Ward FE, Ennis PD, Jackson AP, Parham P (1988) HLA-A and B polymorphisms predate the divergence of humans and chimpanzees. *Nature*, **335**, 268-271.
- Le réseau Natura 2000 (2009) *Triturus cristatus*, Le Triton crêté. *Cahiers d'habitat*, **Tome 7**.
- Lemaire C, Allegrucci G, Naciri M, Bahri-Sfar L, Kara H, Bonhomme F (2000) Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Molecular Ecology*, **9**, 457-467.

- Lenormand T (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 183-189.
- Lesbarrères D, Pagano A, Lode T (2003) Inbreeding and road effect zone in a Ranidae: The case of Agile frog, *Rana dalmatina* bonaparte, 1840. *Comptes Rendus - Biologies*, **326**, 68-72.
- Lind MI, Johansson F (2007) The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 1288-1297.
- Lindenmayer D, Fischer J (2006) *Habitat fragmentation and landscape change*. Island Press, Washington.
- Liu N, Chen L, Wang S, Oh C, Zhao H (2005) Comparison of single-nucleotide polymorphisms and microsatellites in inference of population structure. *BMC Genetics*, **6**.
- Livshits G, Sokal RR, Kobylianky E (1991) Genetic affinities of Jewish populations. *American Journal of Human Genetics*, **49**, 131-146.
- Loman J (1999) Early metamorphosis in common frog *Rana temporaria* tadpoles at risk of drying: An experimental demonstration *Amphibia Reptilia*, **20**, 421-430.
- Lougheed SC, Gascon C, Jones DA, Bogart JP, Boag PT (1999) Ridges and rivers: A test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epiplatys femoralis*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **266**, 1829-1835.
- Lowe WH, McPeck MA, Likens GE, Cosentino BJ (2008) Linking movement behaviour to dispersal and divergence in plethodontid salamanders. *Molecular Ecology*, **17**, 4459-4469.
- Machado C, Haselkorn T, Noor M (2007) Evaluation of the genomic extent of effects of fixed inversion differences on intraspecific variation and interspecific gene flow in *Drosophila pseudoobscura* and *D-persimilis*. *Genetics*, **175**, 1289-1306.
- Maes GE, Pujolar JM, Raeymaekers JAM, Dannewitz J, Volckaert FAM (2006) Microsatellite conservation and Bayesian individual assignment in four *Anguilla* species. *Marine Ecology Progress Series*, **319**, 251-261.
- Malavoi JR, Souchon Y (1996) Dynamique fluviale et dynamique écologique. *La Houille Blanche*, **6**, 98-107.
- Malécot G (1948) *Les mathématiques de l'hérédité*. Masson, Paris.
- Malécot G (1950) Quelques schémas probabilistes sur la variabilité des populations naturelles. *Annales de l'Université de Lyon*, **A13**, 37-60.
- Maletzky A, Mikulíček P, Franzen M, Goldschmid A, Gruber HJ, Horák A, Kyek M (2008) Hybridization and introgression between two species of crested newts (*Triturus cristatus* and *T. carnifex*) along contact zones in Germany and Austria: Morphological and molecular data. *Herpetological Journal*, **18**, 1-15.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, **20**, 229-237.
- Malone JH, Fontenot BE (2008) Patterns of reproductive isolation in toads. *PLoS ONE*, **3**.
- Mancino G, Raghianti M, Bucci-Innocenti S (1978) Experimental hybridization within the genus *Triturus* (Urodela: Salamandridae). I. Spermatogenesis of F1 species hybrids, *Triturus cristatus carnifex* female x *T. vulgaris meridionalis* male. *Chromosoma*, **69**, 27-46.
- Mancino G, Raghianti M, Bucci-Innocenti S (1979) Experimental hybridization within the genus *Triturus* (Urodela: Salamandridae). III. Evidence for crossing-over, true chiasmata and chromosomal homologies in the spermatogenesis of F1 species hybrids, *T. cristatus carnifex* X *T. marmoratus*. *Chromosoma*, **73**, 207-226.

- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **18**, 189-197.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220.
- Marnell F (1998a) Discriminant analysis of the terrestrial and aquatic habitat determinants of the smooth newt (*Triturus vulgaris*) and the common frog (*Rana temporaria*) in Ireland. *Journal of Zoology, London*, **244**, 1-6.
- Marnell F (1998b) A skeletochronological investigation of the population biology of smooth newts *Triturus vulgaris* L. at a pond in Dublin, Ireland. *Proceedings of the Royal Irish Academy*, **98B**, 31-36.
- Marquis O, Miaud C (2008) Variation in UV sensitivity among common frog *Rana temporaria* populations along an altitudinal gradient. *Zoology*, **111**, 309-317.
- Marsh DM, Milam GS, Gorham NP, Beckman NG (2005) Forest roads as partial barriers to terrestrial salamander movement. *Conservation Biology*, **19**, 2004-2008.
- Marsh DM, Page RB, Hanlon TJ, Bareke H, Corritone R, Jetter N, Beckman NG, Gardner K, Seifert DE, Cabe PR (2007) Ecological and genetic evidence that low-order streams inhibit dispersal by red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). *Canadian Journal of Zoology*, **85**, 319-327.
- Marsh DM, Thakur KA, Bulka KC, Clarke LB (2004) Dispersal and colonization through open fields by a terrestrial, woodland salamander. *Ecology*, **85**, 3396-3405.
- Marsh DM, Treham PC (2001) Metapopulation dynamics and amphibian conservation. *Conservation Biology*, **15**, 40-49.
- Martin AP, Palumbi SR (1993) Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 4087-4091.
- Martin NH, Bouck AC, Arnold ML (2006) Detecting adaptive trait introgression between *Iris fulva* and *I. brevicaulis* in highly selective field conditions. *Genetics*, **172**, 2481-2489.
- Martínez-Solano I, Teixeira J, Buckley D, García-París M (2006) Mitochondrial DNA phylogeography of *Lissotriton boscai* (Caudata, Salamandridae): Evidence for old, multiple refugia in an Iberian endemic. *Molecular Ecology*, **15**, 3375-3388.
- Martinsen G, Whitham T, Turek R, Keim P (2001) Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution*, **55**, 1325-1335.
- Matsuda BM, Richardson JS (2005) Movement patterns and relative abundance of coastal tailed frogs in clearcuts and mature forest stands. *Canadian Journal of Forest Research*, **35**, 1131-1138.
- Matsui M, Nishikawa K, Utsunomiya T, Tanabe S (2006) Geographic allozyme variation in the Japanese clouded salamander, *Hynobius nebulosus* (Amphibia: Urodela). *Biological Journal of the Linnean Society*, **89**, 311-330.
- Mauricio R (2005) *Genetics of Adaptation*
- Mayer WE, Jonker M, Klein D, Ivanyi P, van Seventer G, Klein J (1988) Nucleotide sequences of chimpanzee MHC class I alleles: evidence for trans-species mode of evolution. *EMBO Journal*, **7**, 2765-2774.
- Mayr E (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Mayr E (1963) *Animal Species and Evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- McDonald JH, Kreitman M (1991) Neutral mutation hypothesis test. *Nature*, **354**, 116.
- McDonough C, Paton PWC (2007) Salamander dispersal across a forested landscape fragmented by a golf course. *Journal of Wildlife Management*, **71**, 1163-1169.

- Measey GJ, Galbusera P, Breyne P, Matthysen E (2007) Gene flow in a direct-developing, leaf litter frog between isolated mountains in the Taita Hills, Kenya. *Conservation Genetics*, **8**, 1177-1188.
- Méndez MA, Soto ER, Correa C, Veloso A, Vergara E, Sallaberry M, Iturra P (2004) Morphological and genetic differentiation among Chilean populations of *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, **77**, 559-567.
- Merilä J, Laurila A, Timenes LA, Räsänen K, Pakkala M (2000) Plasticity in age and size at metamorphosis in *Rana temporaria* - Comparison of high and low latitude populations *Ecography*, **23**, 457-465.
- Miaud C (1990) *La dynamique des populations subdivisées : étude comparative chez trois Amphibiens Urodèles (Triturus alpestris, T. helveticus et T. cristatus)*. Rapport de thèse, Université de Lyon.
- Miaud C (1995) Oviposition site selection in three species of European Newts (Salamandridae) genus *Triturus*. *Amphibia Reptilia*, **16**, 265-272.
- Miaud C, Andreone F, Ribéron A, De Michelis S, Clima V, Castanet J, Francillon-Vieillot H, Guyétant R (2001) Variations in age, size at maturity and gestation duration among two neighbouring populations of the alpine salamander (*Salamandra lanzai*). *Journal of Zoology*, **254**, 251-260.
- Miaud C, Muratet J (2004) *Identifier les oeufs et les larves des amphibiens de France*. Inra Editions, Paris.
- Mikulíček P, Kautman J, Zavadil V, Piálek J (2004) Natural hybridization and limited introgression between the crested newts *Triturus cristatus* and *T. dobrogicus* (Caudata: Salamandridae) in Slovakia. *Biologia - Section Zoology*, **59**, 211-218.
- Miller KM, Winton JR, Schulze AD, Purcell MK, Ming TJ (2004) Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus. *Environmental Biology of Fishes*, **69**, 307-316.
- Monk WA, P J Wood, Hannah DM, Wilson DA (2008) Macroinvertebrate community response to interannual and regional river flow regime dynamics. *River Research and Applications*, **24**.
- Monsen KJ, Blouin MS (2003) Genetic structure in a montane ranid frog: Restricted gene flow and nuclear-mitochondrial discordance. *Molecular Ecology*, **12**, 3275-3286.
- Morand A, Joly P (1995) Habitat variability and space utilization by the amphibian communities of the French upper-Rhône floodplain. *Hydrobiologia*, **300**, 249-257.
- Moritz C (1994) Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: A critical review. *Molecular Ecology*, **3**, 401-411.
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, **51**, 238-254.
- Mourgaud G, Pailley P (2005) Atlas de répartition des Amphibiens (Urodèles, Anoures) et Reptiles (Chéloniens, Squamates) de Maine-et-Loire (France (1990-2004)). Dans: *Anjou Nature-Bulletin de l'Association "Les Naturalistes Angevins"*. pp. 5-53, Angers.
- Muirhead CA (2001) Consequences of population structure on genes under balancing selection. *Evolution*, **55**, 1532-1541.
- Naisbit RE, Jiggins CD, Mallet J (2003) Mimicry: Developmental genes that contribute to speciation. *Evolution and Development*, **5**, 269-280.
- Neuffer B, Auge H, Mesch H, Amarell U, Brandl R (1999) Spread of violets in polluted pine forests: Morphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization. *Molecular Ecology*, **8**, 365-377.
- Newman RA, Squire T (2001) Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology*, **10**, 1087-1100.

- Nobili G, Accordi F (1997) Body size, age and fecundity variation in different populations of the smooth newt *Triturus vulgaris meridionalis* in central Italy. *Italian Journal of Zoology*, **64**, 313-318.
- Noël S, Ouellet M, Galois P, Lapointe FJ (2007) Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. *Conservation Genetics*, **8**, 599-606.
- Noor MAF, Gratos KL, Bertucci LA, Reiland J (2001) Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 12084-12088.
- Norris KM, Hosie CA (2005) A quantified ethogram for oviposition in *Triturus* newts: Description and comparison of *T. helveticus* and *T. vulgaris*. *Ethology*, **111**, 357-366.
- O'Reilly PT, Canino MF, Bailey KM, Bentzen P (2004) Inverse relationship between F_{ST} and microsatellite polymorphism in the marine fish, walleye pollock (*Theragra chalcogramma*): Implications for resolving weak population structure. *Molecular Ecology*, **13**, 1799-1814.
- Ober C (1999) studies of HLA, fertility and mate choice in a human isolate. *Human Reproduction Update*, **5**, 103-107.
- Ohta Y, Goetz W, Hossain M, Nonaka M, Flajnik MF (2006) Ancestral organization of the MHC revealed in the amphibian *Xenopus*. *Journal of Immunology*, **176**, 3674-3685.
- Orr HA (2005) The genetic basis of reproductive isolation: Insights from *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 6522-6526.
- Osikowski A, Babik W, Grzmil P, Szymura JM (2008) Multiple sex pheromone genes are expressed in the abdominal glands of the smooth newt (*Lissotriton vulgaris*) and montandon's newt (*L. montandoni*) (Salamandridae). *Zoological Science*, **25**, 587-592.
- Osikowski A, Rafinski J (2001) Multiple insemination increases reproductive success of female Montandon's newt (*Triturus montandoni*, Caudata, Salamandridae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **49**, 145-149.
- Pabijan M, Babik W (2006) Genetic structure in northeastern populations of the Alpine newt (*Triturus alpestris*): Evidence for post-Pleistocene differentiation. *Molecular Ecology*, **15**, 2397-2407.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Direct, real-time estimation of migration rate using assignment methods: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, **13**, 55-65.
- Pagano A, Crochet PA, Graf JD, Joly P, Lodé T (2001) Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. *Global Ecology and Biogeography*, **10**, 433-441.
- Palmer CA, Watts RA, Gregg RG, McCall MA, Houck LD, Highton R, Arnold SJ (2005) Lineage-specific differences in evolutionary mode in a salamander courtship pheromone. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 2243-2256.
- Palo JU, O'Hara RB, Laugen AT, Laurila A, Primmer CR, Merilä J (2003) Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection: evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. *Molecular Ecology*, **12**, 1963-1978.
- Palo JU, Schmeller DS, Laurila A, Primmer CR, Kuzmin SL, Merilä J (2004) High degree of population subdivision in a widespread amphibian. *Molecular Ecology*, **13**, 2631-2644.
- Panfili J (1992) Analyse chimique des zones de croissance des otolithes de poissons. dans: *Tissus dur et âge individuel des vertébrés. Colloque national, Bondy, France, 4-6 mars.* (eds. Baglinière J, Castanet J, Conand F, Meunier J), pp. 355-362. Colloques et Séminaires, ORSTOM-INRA.
- Parris MJ (1999) Hybridization in leopard frogs (*Rana pipiens* complex): Larval fitness components in single-genotype populations and mixtures. *Evolution*, **53**, 1872-1883.

- Parris MJ, Semlitsch RD, Sage RD (1999) Experimental analysis of the evolutionary potential of hybridization in leopard frogs (Anura : Ranidae). *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 662-671.
- Paterson S (1998) Evidence for balancing selection at the major histocompatibility complex in a free-living ruminant. *Journal of Heredity*, **89**, 289-294.
- Patz JA, Epstein PR, Burke TA, Balbus JM (1996) Global climate change and emerging infectious diseases. *Journal of the American Medical Association*, **275**, 217-223.
- Payseur B, Krenz J, Nachman M (2004) Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution*, **58**, 2064-2078.
- Peel D, Ovenden JR, Peel SL (2004) NeEstimator: software for estimating effective population size, Version 1.3. *Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries*.
- Penn DJ (2002) The scent of genetic compatibility: Sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology*, **108**, 1-21.
- Persson M, Räsänen K, Laurila A, Merilä J (2007) Maternally determined adaptation to acidity in *Rana arvalis*: Are laboratory and field estimates of embryonic stress tolerance congruent? *Canadian Journal of Zoology*, **85**, 832-838.
- Petit RJ, Excoffier L (2009) Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**, 386-393.
- Pfennig KS, Simovich MA (2002) Differential selection to avoid hybridization in two toad species. *Evolution*, **56**, 1840-1848.
- Picco AM, Collins JP (2008) Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conservation Biology*, **22**, 1582-1589.
- Piertney SB, Oliver MK (2006) The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*, **96**, 7-21.
- Pigliucci M (2001) *Phenotypic Plasticity. Beyond Nature and Nurture*. The John Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, **95**, 536-539.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in effective population size from allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.
- Pope SE, Fahrig L, Merriam HG (2000) Landscape complementation and metapopulation effects on leopard frog populations. *Ecology*, **81**, 2498-2508.
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817-818.
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sánchez-Azofeifa GA, Still CJ, Young BE (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, **439**, 161-167.
- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data *Genetics*, **155**, 945-959.
- Purrenhege JL, Niewiarowski PH, Moore FBG (2009) Population structure of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*) in a fragmented landscape. *Molecular Ecology*, **18**, 235-247.
- R Development Core Team (2007) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

- Ragghianti M, Bucci-Innocenti S, Mancino G (1980) Chromosome polymorphism in the Italian newt, *Triturus italicus*. *Chromosoma*, **77**, 333-345.
- Rajchard J (2005) Sex pheromones in amphibians: A review. *Veterinarni Medicina*, **50**, 385-389.
- Ramsey J, Bradshaw H, Schemske D (2003) Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M-cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution*, **57**, 1520-1534
- Randler C (2002) Avian hybridization, mixed pairing and female choice. *Animal Behaviour*, **63**, 103-119.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9197-9201.
- Rannap R, Lõhmus A, Briggs L (2009) Niche position, but not niche breadth, differs in two coexisting amphibians having contrasting trends in Europe. *Diversity and Distributions*, **15**, 692-700.
- Räsänen K, Laurila A, Merilä J (2005) Maternal investment in egg size: environment- and population-specific effects on offspring performance. *Oecologia*, **142**, 546-553.
- Raufaste N, Bonhomme F (2000) Properties of bias and variance of two multiallelic estimators of F_{ST} . *Theoretical Population Biology*, **57**, 285-296.
- Ray N (2005) PATHMATRIX: a GIS tool to compute effective distances among samples. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 177-180.
- Raybould AF, Gray AJ (1994) Will hybrids of genetically modified crops invade natural communities? *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 85-89.
- Raymond M, Rousset F (1995) genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Reed DH, Frankham R (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution*, **55**, 1095-1103.
- Relyea RA (2002) Local population differences in phenotypic plasticity: predator-induced changes in wood frog tadpoles. *Ecological Monographs*, **72**, 77-93.
- Richman A (2000) Evolution of balanced genetic polymorphism. *Molecular Ecology*, **9**, 1953-1963.
- Richman AD, Herrera G, Reynoso VH, Méndez G, Zambrano L (2007) Evidence for balancing selection at the DAB locus in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *International Journal of Immunogenetics*, **34**, 475-478.
- Richman AD, Kohn JR (1999) Self-incompatibility alleles from *Physalis*: Implications for historical inference from balanced genetic polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 168-172.
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 351-358.
- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, Durphy JL, Schwarzbach AE, Donovan LA, Lexer C (2003) Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, **301**, 1211-1216.
- Rieseberg LH, Wendel J (1993) Introgression and its consequences in plants. Dans: *Hybrid zones and the evolutionary process*. (ed. Harrison R), pp. 70-109. Oxford University Press, New York.
- Ritland K (1996) Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetic Research*, **67**, 175-185.
- Roberts JM (1990) *Reproductive isolation in Smooth and Palmate newts (Triturus vulgaris and T. helveticus)*. PhD Thesis, Open University, Milton Keynes.

- Robertson A, Hill WG (1984) Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics*, **107**, 703-718.
- Roques S, Sévigny JM, Bernatchez L (2001) Evidence for broadscale introgressive hybridization between two redfish (genus *sebastes*) in the north-west atlantic: A rare marine example. *Molecular Ecology*, **10**, 149-165.
- Rosenberg N, Li L, Ward R, Pritchard J (2003) Informativeness of genetic markers for inference of ancestry. *American Journal of Human Genetics*, **73**, 1402-1422.
- Rothermel BB (2004) Migratory success of juveniles: A potential constraint on connectivity for pond-breeding amphibians. *Ecological Applications*, **14**, 1535-1546.
- Rothermel BB, Semlitsch RD (2002) An experimental investigation of landscape resistance of forest versus old-field habitats to emigrating juvenile amphibians. *Conservation Biology*, **16**, 1324-1332.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103-106.
- Rowe G, Beebee TJC (2004) Reconciling genetic and demographic estimators of effective population size in the anuran amphibian *Bufo calamita*. *Conservation Genetics*, **5**, 287-298.
- Rowe G, Beebee TJC, Burke T (1998) Phylogeography of the natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: Genetic differentiation of native and translocated populations. *Molecular Ecology*, **7**, 751-760.
- Rowe G, Beebee TJC, Burke T (2000) A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, metapopulations. *Oikos*, **88**, 641-651.
- Ruau B, Greulich S, Haury J, Berton JP (2009) Sexual reproduction of two alien invasive *Ludwigia* (Onagraceae) on the middle Loire River, France. *Aquatic Botany*, **90**, 143-148.
- Rubidge EM, Taylor EB (2004) Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*). *Molecular Ecology*, **13**, 3735-3749.
- Sabo JL, Sponseller R, Dixon M, Gade K, Harms T, Heffernan J, Jani A, Katz G, Soykan C, Watts J, Welter J (2005) Riparian zones increase regional species richness by harboring different, not more, species. *Ecology*, **86**, 56-62.
- Sammut B, Du Pasquier L, Ducoroy P, Laurens V, Marcuz A, Tournefier A (1999) Axolotl MHC architecture and polymorphism. *European Journal of Immunology*, **29**, 2897-2907.
- Sammut B, Laurens V, Tournefier A (1997) Isolation of Mhc class I cDNAs from the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Immunogenetics*, **45**, 285-294.
- Scharsack JP, Kalbe M, Harrod C, Rauch G (2007) Habitat-specific adaptation of immune responses of stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) lake and river ecotypes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **274**, 1523-1532.
- Schlüpmann M, Weber G, Lipscher E, Veith M (1999) Nachweis eines freilandbastardes von Teichmolch (*Triturus vulgaris*) und Fadenmolch (*Triturus helveticus*). *Zeitschrift für Feldherpetologie*, **6**, 203-217.
- Schmeller DS, Merilä J (2007) Demographic and genetic estimates of effective population and breeding size in the amphibian *Rana temporaria*. *Conservation Biology*, **21**, 142-151.
- Schoorl J, Zuiderwijk A (1981) Ecological isolation in *Triturus cristatus* and *Triturus marmoratus* (Amphibia: Salamandridae). *Amphibia-Reptilia*, **3/4**, 235-252.
- Scotti-Saintagne C, Mariette S, Porth I, Goicoechea P, Barreneche T, Bodenes K, Burg K, Kremer A (2004) Genome scanning for interspecific differentiation between two closely related oak species [*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.]. *Genetics*, **168**, 1615-1626.

- Secondi J, Aumjaud A, Pays O, Boyer S, Montembault D, Violleau D (2007) Water turbidity affects the development of sexual morphology in the palmate newt. *Ethology*, **113**, 711-720.
- Secondi J, Faivre B, Bensch S (2006) Spreading introgression in the wake of a moving contact zone. *Molecular Ecology*, **15**, 2463-2475.
- Seddon JM, Ellegren H (2004) A temporal analysis shows major histocompatibility complex loci in the Scandinavian wolf population are consistent with neutral evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **271**, 2283-2291.
- Seehausen O, Van Alphen JJM, Witte F (1997) Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science*, **277**, 1808-1811.
- Semlitsch RD (2002) Critical elements for biologically based recovery plans of aquatic-breeding amphibians. *Conservation Biology*, **16**, 619-629.
- Semlitsch RD, Bodie JR (1998) Are small, isolated wetlands expendable. *Conservation Biology*, **12**, 1129-1133.
- Shields WM (1993) The natural and unnatural history of inbreeding and outbreeding. Dans: *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding*. (ed. Thornhill NW). The University of Chicago Press, Chicago.
- Sillero N (2008) Amphibian mortality levels on Spanish country roads: Descriptive and spatial analysis. *Amphibia Reptilia*, **29**, 337-347.
- Sinsch U (1990) Migration and orientation in anuran amphibians. *Ethology Ecology & Evolution*, **2**, 65-79.
- Sinsch U (1992) Structure and dynamic of a natterjack toad metapopulation (*Bufo calamita*). *Oecologia*, **90**, 489-499.
- Sjögren P (1991) Extinction and isolation gradients in metapopulations: the case of the pool frog (*Rana lessonae*). *Biological Journal of the Linnean Society*, **42**, 135-147.
- Skelly DK (2004) Microgeographic countergradient variation in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Evolution*, **58**, 160-165.
- Skelly DK, Freidenburg LK (2000) Effects of beaver on the thermal biology of an amphibian. *Ecology Letters* **3**, **3**, 483-486.
- Sköld M, Wing SR, Mladenov PV (2003) Genetic subdivision of a sea star with high dispersal capability in relation to physical barriers in a fjordic seascape. *Marine ecology*, **250**, 163-174.
- Smith MA (1969) *The British amphibians and reptiles*. Collins, London.
- Smith MA, Green DM (2005) Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: Are all amphibian populations metapopulations? *Ecography*, **28**, 110-128.
- Sommer S (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*, **2**.
- Sork VL, Nason J, Campbell DR, Fernandez JF (1999) Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 219-224.
- Sotiropoulos K, Eleftherakos K, Tsaparis D, Kasapidis P, Magoulas A, Legakis A (2008a) New polymorphic microsatellite loci for the Greek smooth newt, *Lissotriton vulgaris graecus*, and their utility in the nominotypical subspecies. *Molecular Ecology Resources*.
- Sotiropoulos K, Legakis A, Polymeni RM (2008b) Patterns of morphometric variation in the smooth newt (*Lissotriton vulgaris*) from Greece: Environmental correlates. *Journal of Natural History*, **42**, 435-450.
- Sparreboom M (1986) Note préliminaire sur le comportement sexuel du triton crêté (*Triturus cristatus*) et du triton marbré (*Triturus marmoratus*) dans des conditions expérimentales. *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, **40**, 36-42.

- Spear SF, Peterson CR, Matocq MD, Storfer A (2005) Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology*, **14**, 2553-2564.
- Spurway H, Callan HG (1960) The vigour and male sterility of hybrids between the species *Triturus vulgaris* and *T. helveticus*. *Journal of Genetics*, **57**, 84-118.
- StatSoft (2007) STATISTICA (data analysis software system), version 8.0.
- Stebbins GL (1950) *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- Steinfartz S, Vicario S, Arntzen JW, Caccone A (2007) A Bayesian approach on molecules and behavior: Reconsidering phylogenetic and evolutionary patterns of the Salamandridae with emphasis on *Triturus* newts. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, **308**, 139-162.
- Stevens VM, Leboullengé E, Wesselingh RA, Baguette M (2006a) Quantifying functional connectivity: experimental assessment of boundary permeability for the natterjack toad (*Bufo calamita*). *Oecologia*, **150**, 161-171.
- Stevens VM, Verkenne C, Vandewoestijne S, Wesselingh RA, Baguette M (2006b) Gene flow and functional connectivity in the natterjack toad. *Molecular Ecology*, **15**, 2333-2344.
- Stock M, Moritz C, Hickerson M, Frynta D, Dujsebayaeva T, Eremchenko V, Macey JR, Papenfuss TJ, Wake DB (2006) Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 663-689.
- Storfer A (1999) Gene flow and local adaptation in a sunfish-salamander system. *Behavior Ecology Sociobiology*, **46**, 273-279.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, **306**, 1783-1786.
- Swihart RK, Gehring TM, Kolozsvary MB, Nupp TE (2003) Responses of "resistant" vertebrates to habitat loss and fragmentation: the importance of niche breadth and range boundaries. *Diversity and Distributions*, **9**, 1-18.
- Swofford DL (1998) *PAUP* 4.0: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453-464.
- Tagu U (2003) *Principes des techniques de biologie moléculaire*. INRA éditions, Paris.
- Tallmon DA, Funk WC, Dunlap WW, Allendorf FW (2000) Genetic differentiation among long-toed Salamander (*Ambystoma macrodactylum*) populations. *Copeia*, 27-35.
- Teacher AGF, Garner TWJ, Nichols RA (2009) Evidence for directional selection at a novel major histocompatibility class I marker in wild common frogs (*Rana temporaria*) exposed to a viral pathogen (*Ranavirus*). *PLoS ONE*, **4**.
- Thiesmeier B (1994) Trophische Beziehungen und Habitatpräferenzen sympatrisch lebender *Salamandra salamandra*- und *Chioglossa lusitanica*-Larven. *Abhandlungen und Berichte für Naturkunde*, **17**, 119-126.
- Thomas JR, Middleton B, Gibson DJ (2006) A landscape perspective of the stream corridor invasion and habitat characteristics of an exotic (*Dioscorea oppositifolia*) in a pristine watershed in Illinois. *Biological Invasions*, **8**, 1103-1113.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Thorn R, Raffaelli J (2001) *Les salamandres de l'ancien monde*. Boubée, Paris.

- Tockner K, Schiemer F, Baumgartner C, Kum G, Weigand E, Zweimüller, Ward JV (1999) The Danube restoration project: species diversity patterns across connectivity gradients in the floodplain system. *Regulated Rivers Research Management*, **15**, 245-258.
- Trenham PC, Koenig WD, Bradley Shaffer H (2001) Spatially autocorrelated demography and interpond dispersal in the salamander *Ambystoma californiense*. *Ecology*, **82**, 3519-3530.
- Turner TL, Hahn MW, Nuzhdin SV (2005) Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology*, **3**, 1572-1578.
- Twitty VC, Grant D, Anderson O (1967) Long distance homing in the newt, *Taricha rivularis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **50**, 51-58.
- Tylianakis JM, Didham RK, Bascompte J, Wardle DA (2008) Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, **11**, 1351-1363.
- Urban MC (2008) Salamander evolution across a latitudinal cline in gape-limited predation risk. *Oikos*, **117**, 1037-1049.
- Vähä JP, Primmer CR (2006) Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*, **15**, 63-72.
- Van Buskirk J, Schmidt BR (2000) Predator-induced phenotypic plasticity in larval newts: Trade-offs, selection, and variation in nature. *Ecology*, **81**, 3009-3028.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.
- Van Oosterhout C, Joyce DA, Cummings SM, Blais J, Barson NJ, Ramnarine IW, Mohammed RS, Persad N, Cable J (2006) Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution*, **60**, 2562-2574.
- Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, **13**, 921-935.
- Verrell PA (1985) Male mate choice for large, fecund females in the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*: how is size assessed? *Herpetologica*, **41**, 382-386.
- Verrell PA (1986) Male discrimination of larger, more fecund females in the smooth newt, *Triturus vulgaris*. *Journal of Herpetology*, **20**, 416-422.
- Vines TH, Köhler SC, Thiel M, Ghira I, Sands TR, MacCallum CJ, Barton NH, Nürnberger B (2003) The maintenance of reproductive isolation in a mosaic hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. Variegata*. *Evolution*, **57**, 1876-1888.
- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997) Human domination of earth's ecosystems. *Science*, **277**, 494-499.
- Vos CC, Antonisse-De Jong AG, Goedhart PW, Smulders MJM (2001) Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity*, **86**, 598-608.
- Vos CC, Chardon JP (1998) Effects of habitat fragmentation and road density on the distribution pattern of the moor frog *Rana arvalis*. *Journal of Applied Ecology*, **35**, 44-56.
- Wade MJ, McCauley DE (1988) Extinction and recolonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution*, **42**, 995-1005.
- Wagner RS, Miller MP, Crisafulli CM, Haig SM (2005) Geographic variation, genetic structure, and conservation unit designation in the Larch Mountain salamander (*Plethodon larselli*). *Canadian Journal of Zoology*, **83**, 396-406.
- Wahbe TR, Ritland C, Bunnell FL, Ritland K (2005) Population genetic structure of tailed frogs (*Ascaphus truei*) in clearcut and old-growth stream habitats in south coastal British Columbia. *Canadian Journal of Zoology*, **83**, 1460-1468.

- Wakeley J, Nielsen R, Liu-Cordero SN, Ardlie K (2001) The discovery of single-nucleotide polymorphisms - And inferences about human demographic history. *American Journal of Human Genetics*, **69**, 1332-1347.
- Wallis GP, Arntzen JW (1989) Mitochondrial-DNA variation in the crested newt superspecies: limited cytoplasmic gene flow among species. *Evolution*, **43**, 88-104.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, **10**, 506-513.
- Wambreuse P (1984) *Etude de la parade sexuelle en tant que mécanisme d'isolement des espèces Triturus helveticus (Razoumowsky 1789) et Triturus vulgaris (Linne 1758) (Urodela: Salamandridae)*. Mémoire en vue de l'obtention du grade de licencié, Université de Liège.
- Wan QH, Zhu L, Wu H, Fang SG (2006) Major histocompatibility complex class II variation in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Molecular Ecology*, **15**, 2441-2450.
- Ward JV (1998) Riverine landscapes: Biodiversity patterns, disturbance regimes, and aquatic conservation. *Biological Conservation*, **83**, 269-278.
- Ward JV, Tockner K, Arscott DB, Claret C (2002) Riverine landscape diversity. *Freshwater Biology*, **47**, 517-539.
- Ward JV, Tockner K, Schiemer F (1999) Biodiversity of floodplain river ecosystems: Ecotones and connectivity. *Regulated rivers: research and management*, **15**, 125-139.
- Ward JV, Wiens JA (2001) Ecotones of riverine ecosystems: role and typology, spatio-temporal dynamics and river regulation. *Ecohydrology and Hydrobiology*, **1**, 25-36.
- Ward RD, Skibinski DOF, Woodwark M (1992) Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. *Evolutionary Biology*, **26**, 73-159.
- Ward RD, Woodwark M, skibinski DOF (2005) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, **44**, 213-232.
- Warwick T (1949) The colonization of bomb-crater ponds at Marlow, Buckinghamshire. *Journal of Animal Ecology*, **18**, 137-141.
- Waser NM, Price MV (1989) Optimal outcrossing in *Ipomopsis aggregata* – seed set and offspring fitness. *Evolution*, **43**, 1097-1109.
- Wegner KM, Reusch TBH, Kalbe M (2003) Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 224-232.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- White MM, Vallejo F, Reilly SR (2000) Fine-scale genetic differentiation in the Carolina Mountain Dusky salamander, *Desmognathus carolinensis*. *Journal of Herpetology*, **34**, 298-302.
- Whitlock MC, Barton NH (1997) The effective size of subdivided population. *Genetics*, **146**, 427-441.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm + 1)$. *Heredity*, **82**, 117-125.
- Wilson AC, Maxson LR, Sarich VM (1974) Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71**, 2843-2847.
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, **163**, 1177-1191.
- Wirtz P (1999) Mother species – father species: unidirectional hybridization in animals with female choice. *Animal Behaviour*, **58**, 1-12.

- Wooten JA, Camp CD, Rissler LJ (2009) Genetic diversity in a narrowly endemic, recently described dusky salamander, *Desmognathus folkertsi*, from the southern Appalachian Mountains. *Conservation Genetics*, 1-20.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97-159.
- Wright S (1969) *Evolution and the genetics of populations*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations: Vol. 4, Variability within and among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Yanchukov A, Hofman S, Szymura JM, Mezhzherin SV, Morozov-Leonov SY, Barton NH, Nürnberger B (2006) Hybridization of *Bombina bombina* and *B. variegata* (Anura, Discoglossidae) at a sharp ecotone in western Ukraine: Comparisons across transects and over time. *Evolution*, **60**, 583-600.
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 413-418.
- Zamudio KR, Wiczorek AM (2007) Fine-scale spatial genetic structure and dispersal among spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) breeding populations. *Molecular Ecology*, **16**, 257-274.
- Zhan A, Li C, Fu J (2009) Big mountains but small barriers: Population genetic structure of the Chinese wood frog (*Rana chensinensis*) in the Tsinling and Daba Mountain region of northern China. *BMC Genetics*, **10**.
- Zuiderwijk A (1990) Sexual strategies in the newts *Triturus cristatus* and *Triturus marmoratus*. *Bijdragen Tot De Dierkunde*, **60**, 51-64.

ANNEXE I

LA SQUELETTICHOLOGIE

ANNEXE I – LA SQUELETTOCHRONOLOGIE

Dans l'étude des populations de tritons de vallée alluviale, nous avons recouru à une technique de détection de l'âge des individus. Nos objectifs étaient (i) d'évaluer la dynamique source-puits des populations dans notre site d'étude. En comparant ces données avec les mesures morphométriques effectuées sur chaque individu, (ii) nous pourrions déterminer si les individus migrants ont une morphologie particulière (Swihart *et al.* 2003). En comparant avec les données génétiques, (iii) nous pourrions estimer si les migrants correspondent à une certaine tranche d'âge (ex : juvéniles, Rothermel 2004). Nous chercherons aussi à savoir si (iv) dans les environnements imprévisibles comme le sont les vallées alluviales, la perturbation causée par les inondations induit la mortalité ou la dispersion des tritons vers le plateau (Cogălniceanu & Miaud 2003). (v) La comparaison des mesures morphologiques avec l'âge des individus pourra éventuellement révéler que les sites alluviaux sont représentés par des individus particulièrement petits (la croissance peut être altérée par le caractère imprévisible de l'environnement) ou particulièrement grand (profitant de la richesse trophique des milieux alluviaux régulièrement régénérés par les sédiments du fleuve).

Chez les ectothermes, l'hypothèse d'une croissance continue est à la base de nombreuses méthodes d'estimation de l'âge des différents individus d'une population. Chez les amphibiens cependant, la relation entre la taille corporelle et l'âge est beaucoup trop variable pour que cette relation soit directement utilisée. En effet, la croissance et donc la taille des individus sont fortement influencées par les conditions abiotiques (variables environnementales) dans lesquelles l'organisme se développe. Si l'on exclut le suivi individuel dans la nature d'animaux marqués (méthode contraignante qui nécessite plusieurs années avant d'avoir accès à la structure en âge de la population), la **squelettochronologie** (terminologie dans Castanet *et al.* 1977) constitue actuellement la seule méthode crédible de détermination de l'âge chez les amphibiens (Halliday & Verrel 1988). Cette technique est basée sur le dénombrement des marques histologiques enregistrées dans les tissus squelettiques en croissance. Dans l'os, l'action de la couche la plus externe (périoste) entraîne une augmentation du diamètre de la diaphyse (partie centrale d'un os) par dépôt de tissu osseux nouveau (Francillon-Viellot 1987). Les **lignes d'arrêt de croissance** (LAC) sont associées à la période où l'animal a un métabolisme réduit. Même si le déterminisme de ces LAC est génétique pour des animaux vivants dans le milieu naturel, le rythme endogène des LAC apparaît synchronisé avec le rythme des saisons (Castanet 1982; Castanet *et al.* 1977).

L'inconvénient majeur de cette méthode réside dans la nécessité de prélever un os assez gros et calcifié tel qu'un humérus ou un fémur ce qui impose le sacrifice des animaux. Prélever un grand nombre d'individus d'une population pour en connaître la structure d'âge n'est pas concevable dans le cas du suivi de la dynamique de cette population d'espèce protégée. Ce problème peut être résolu par l'utilisation d'une pièce osseuse dont le prélèvement n'implique pas la mort de l'individu. L'ablation d'une phalange est apparemment bien tolérée par les animaux (Miaud 1990). Le choix de cet os beaucoup plus petit que l'humérus ou le fémur rend cependant plus difficile la tâche de préparation et de lecture des coupes histologiques et sur la précision de la détermination des âges individuels. Le développement de l'utilisation de la squelettochronologie à partir de phalange a permis de connaître les structures d'âge dans des populations de différentes espèces d'urodèles telles que le triton ponctué *Lissotriton vulgaris* (Cogălniceanu & Miaud 2003; Marnell 1998b), le triton alpestre *Mesotriton alpestris* (Miaud 1990), le triton marbré *Triturus marmoratus* (Jakob *et al.* 2002), le triton crêté *Triturus cristatus* (Miaud 1990), ou encore le triton crêté du Danube *Triturus dobrogicus* (Cogălniceanu & Miaud 2003). Bien que Miaud (1990) signale les difficultés pour obtenir des sections interprétables au niveau des phalanges chez *Lissotriton helveticus*, l'espèce la plus petite du genre, Guyetant *et al.* (1990) sont parvenus à des résultats corrects.

Nous avons testé la méthode squelettochronologique sur des phalanges de tritons palmés. Nous avons utilisé concomitamment des os longs (humérus, cubitus, fémur et tibia) (figure 1) afin d'évaluer l'exactitude des lectures sur la phalange (Miaud 1990). Les animaux utilisés correspondaient à des individus ayant trouvé la mort en captivité.

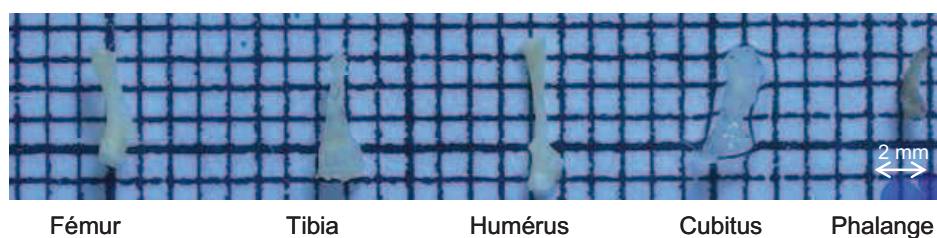


Figure 1 Os d'un triton utilisés pour la squelettochronologie

Méthode de la coloration

Les os ont été décalcifiés dans une solution aqueuse constituée de 10% d'acide formique et de 4% de formaline (décontamination d'éventuelles bactéries). La décalcification permettait d'éviter des différences de résistance lors de la coupe des pièces osseuses. Les os ont été

maintenus dans cette solution durant une nuit sous agitation constante à température ambiante. Ils ont ensuite été rincés à l'eau pendant une dizaine de minutes puis conservés dans de l'eau distillée avant d'être coupés. Après inclusion, plusieurs coupes ont été réalisées de différentes épaisseurs (de 8 μm à 15 μm) à l'aide d'un microcryotome (Cryostat Leica CM3050S) à -45°C . Les préparations ont ensuite été colorées sous la loupe binoculaire. Deux colorants ont été testés : l'hématoxyline d'Ehrlich et le crésyl violet (0,05%). L'hématoxyline d'Ehrlich a été rincée à l'eau distillée après 30 secondes ; le crésyl violet a, quant à lui, été rincé après trois minutes. Le rinçage a été effectué de la même manière que la mise en contact des préparations avec le colorant. Les lames ont ensuite été débarrassées de l'eau par absorption de mèches de papier absorbant. La préparation a finalement été fixée par application d'une solution de montage et d'une lamelle. Les lames ont été visualisées par microscopie optique. La lecture des lignes d'arrêt de croissance a été exploitable sur les os les plus ossifiés : le tibia et l'humérus (figure 2). Les meilleurs résultats ont été obtenus sur des coupes de doigts décalcifiés colorées au crésyl violet. Au contraire, l'observation des lignes d'arrêt de croissance sur les os spongieux que sont les fémurs, cubitus et phalange (figure 2) a été beaucoup plus délicate, confirmant les conclusions dressées par Miaud (1990).

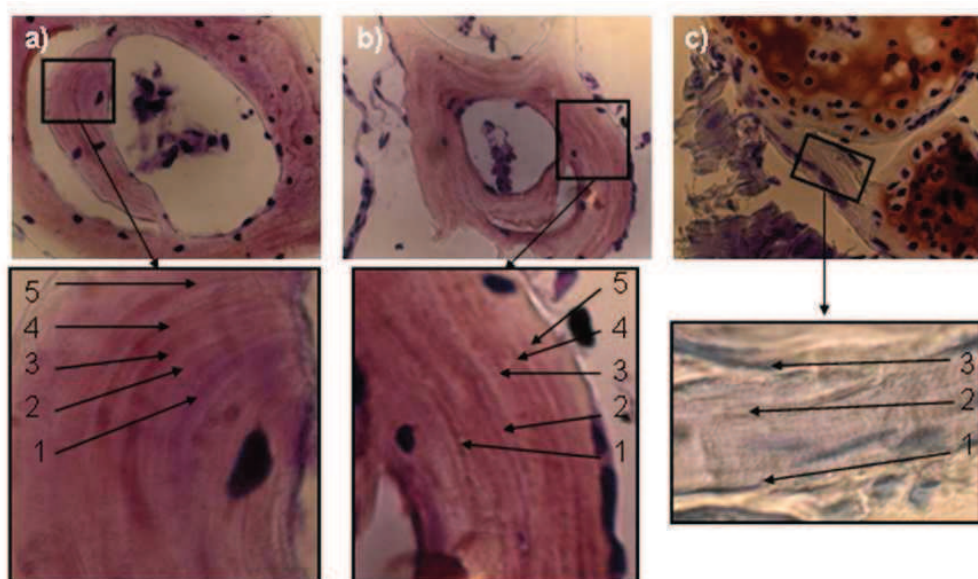


Figure 2 Coupes colorées au crésyl violet d'un tibia (a), d'un humérus (b) et d'une phalange (c) décalcifiées d'un même individu de triton palmé, observées au microscope optique. Grâce à la lecture des LAC sur les coupes de tibia et d'humérus, nous estimons l'âge de l'individu à 5 ans. Seuls trois LAC sont discernables sur la coupe transversale de phalange.

Méthode de la microscopie électronique à balayage

La résolution de la méthode de squelettochronologie a été modernisée grâce à l'utilisation de la microscopie électronique à balayage (utilisées depuis longtemps sur les otolithes de poissons, Panfili 1992). Des essais ont été effectués grâce à l'aide de Robert Filmon et Sonia Georgault du service commun d'imagerie et d'analyse microscopiques (SCIAM) de la Faculté de médecine d'Angers.

Les phalanges conservées dans une solution de glutaraldéhyde dans du tampon de phosphate ont été fixées au tétr oxyde d'osmium 2% pendant 2 h puis rincées trois fois à l'eau déminéralisée pendant 10 min. La déshydratation a été effectuée par des bains d'éthanol de degré croissant (20 min à 50°, 20 min à 70°, 20 min à 95° puis 3 fois 20 min à 100°) puis dans deux bains successifs d'une solution d'oxyde de propylène pendant 15 min. Un résidu synthétique, l'épon, a été rajouté et l'incubation a duré 18 h. Le lendemain, la préparation a été plongée 4 h dans l'épon avant d'être incluse dans un moule. Des cycles d'incubations de 24 h à 37°C, 24 h à 45°C et 48 h à 60°C ont permis la polymérisation. Des coupes ultrafines (50 nm) effectuées avec un ultramicrotome (REICHERT) ont été montées sur des grilles de cuivre pour l'observation grâce à un microscope électronique à balayage (6301F, JEOL). L'observation par microscopie électronique à balayage (6301F, JEOL) n'a apporté aucune résolution supplémentaire (figure 3).

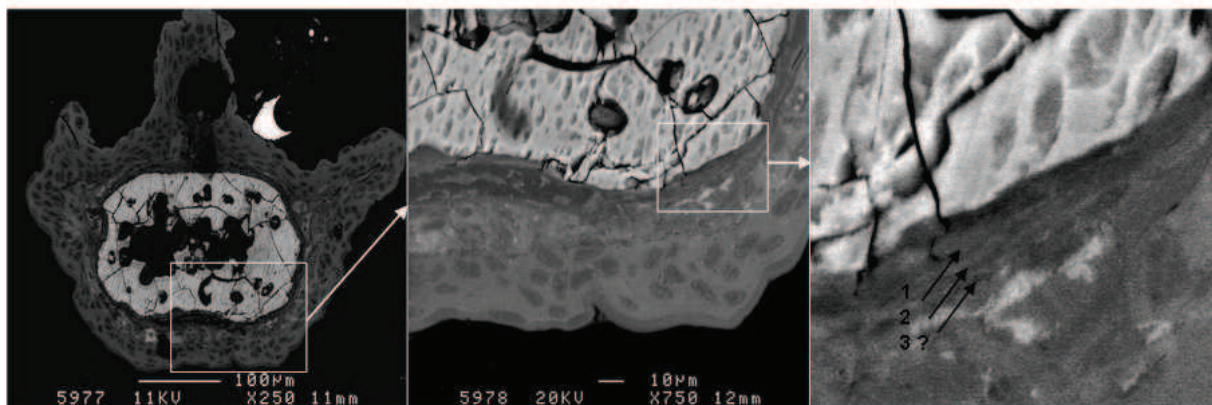


Figure 3 Coupe de phalange d'un triton palmé observée au microscope électronique à balayage. Trois lignes d'arrêt de croissance sont difficilement discernables.

À l'heure actuelle, les différentes méthodes ne permettent pas d'avoir accès à l'âge des individus sans l'utilisation d'os longs tels que le tibia ou l'humérus et donc le sacrifice de l'animal. Nous n'avons malheureusement pas donné suite à ce travail.

Résumé : Les modalités de flux de gènes à différentes échelles taxonomiques et spatiales représentent une des questions-clé en biologie évolutive. En effet, l'analyse des flux géniques entre espèces ou entre populations permet de mieux comprendre la mise en place des barrières intrinsèques mais également environnementales responsables de la divergence ou de la différenciation entre groupes. Nous avons étudié les barrières au flux de gènes à l'échelle macro- et microévolutive chez deux espèces d'amphibiens : le triton palmé *Lissotriton helveticus* et le triton ponctué *L. vulgaris*. Les amphibiens sont en effet un objet de choix à la fois pour l'étude des mécanismes de spéciation et de différenciation neutre ou adaptative.

Premièrement, nous avons étudié ici l'introgression et le maintien de l'intégrité de ces deux espèces largement sympatriques. Malgré un taux d'hybridation faible, la majorité des populations témoignent d'événements d'introgression. Nous avons mis en évidence un déplacement de caractère reproducteur et démontré que la reconnaissance des partenaires sexuels est sans doute la barrière qui participe le plus à l'isolement reproducteur. Des facteurs exogènes influençant le *sex-ratio*, le ratio de taille ou la transmission du signal de reconnaissance spécifique pourraient cependant affecter la probabilité de choisir un partenaire hétérospecific et donc la probabilité d'hybridation. Toutefois, la fréquence des événements d'hybridation ne permet sans doute pas de compenser la perte de gènes hétérospecifics par dérive génétique d'une population à l'autre.

Deuxièmement, à l'échelle intraspecific, l'étude de la structure des populations du triton palmé a permis de mettre en évidence une différenciation globale faible aux locus microsatellites mais significative sur une région fortement drainée : la vallée de la Loire. Cette structure en métapopulation est façonnée par certains éléments paysagers jouant le rôle de barrière (cours d'eau) ou de corridor de dispersion (vallée alluviale). La structure et la variabilité des populations influencent directement les potentialités d'adaptation locale. Pour étudier les potentialités d'adaptation chez le triton palmé, nous avons étudié le polymorphisme à l'exon 2 d'un gène du CMH classe II. L'analyse du flux de gènes à l'échelle régionale n'a pas permis la détection d'un signal de sélection à ce locus. Cependant, à l'échelle européenne, une sélection positive à ce locus indique fortement que des communautés de pathogènes différentes structurent les populations méridionales, d'une part, et septentrionales, d'autre part, de l'aire de répartition.

Mots-clé : *Lissotriton helveticus*, *Lissotriton vulgaris*, hybridation, isolement reproducteur, génétique du paysage, complexe majeur d'histocompatibilité, adaptation

Gene flow at the intra- and interspecific level in floodplain species: the case of palmate and smooth newts in the Loire valley.

Abstract: Patterns of gene flow at different spatial and taxonomic scales represent a key question in evolutionary biology. Analysis of gene flow between species or populations provides a better understanding of the development of intrinsic and environmental barriers which are responsible for divergence or differentiation between groups. We studied barriers to gene flow at the inter- and intraspecific levels in two amphibian species: the palmate newt *Lissotriton helveticus* and the smooth newt *L. vulgaris*.

First, we studied introgression and maintenance of integrity in these two broadly sympatric species. Despite a low hybridization rate, most populations show introgression events. We highlighted a reproductive character displacement and showed that specific recognition is probably the most powerful reason for reproductive isolation. However, exogenous factors influencing *sex-ratio*, *ratio* of size or signal transmission for specific recognition may improve mismatching and thus the likelihood of hybridization. Yet, the frequency of hybridization events probably does not compensate for the loss of heterospecific genes by genetic drift from one population to another.

Secondly, at the intraspecific level, the study of polymorphism variation on the palmate newts in the Loire valley highlighted a low but significant structure at microsatellite locus. This metapopulation structure is shaped by some landscape features acting as barriers (rivers) or dispersal corridor (floodplain). Population structure and variability directly affect the potential for local adaptation. We studied in these populations the polymorphism at second exon of MHC class II. Analysis of gene flow at regional level did not detect a signal of selection. However, at the European level, positive selection at this locus strongly indicates that different pathogenic communities structure southern range populations from northern ones.

Keywords: *Lissotriton helveticus*, *Lissotriton vulgaris*, hybridization, reproductive isolation, landscape genetics, major histocompatibility complex, adaptation
