



**HAL**  
open science

# Génétique de la conservation et du paysage : étude des populations de lagopède alpin et de perdrix grise en France.

Nicolas Bech

► **To cite this version:**

Nicolas Bech. Génétique de la conservation et du paysage : étude des populations de lagopède alpin et de perdrix grise en France.. Sciences de l'environnement. Université de Perpignan, 2010. Français. NNT: . tel-00939356

**HAL Id: tel-00939356**

**<https://theses.hal.science/tel-00939356>**

Submitted on 30 Jan 2014

**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.



ACADEMIE DE MONTPELLIER  
THESE / UNIVERSITE PERPIGNAN VIA DOMITIA

pour obtenir le titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA**  
Biologie – Génétique du Paysage – Génétique de la Conservation  
Spécialité : Génétique des Populations

Ecole Doctorale : Energie et Environnement

**Jacques BLONDEL**  
Directeur de Recherche, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive,  
Montpellier / *Rapporteur*

**Roger PRODON**  
Professeur, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, Montpellier /  
*Rapporteur*

**Isabelle LITRICO**  
Chargé de Recherche, INRA de Lusignan / *Examineur*

**Stéphanie MANEL**  
Professeur, Université d'Aix-Marseille I (de Provence) / *Examineur*

**André THERON**  
Directeur de Recherche, Université de Perpignan, *Directeur de thèse*

**Jérôme BOISSIER**  
Maître de Conférence, Université de Perpignan, *Directeur de thèse*

**Claude NOVOA**  
Chargé de recherche, ONCFS, Prades, *Directeur de thèse*

## Génétique de la Conservation et du Paysage : Etude des Populations de Lagopède alpin et de Perdrix grise en France

Soutenue le 26 novembre 2010

présentée par

**Nicolas BECH**





ACADEMIE DE MONTPELLIER  
UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA  
THESE

pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA  
**Biologie – Génétique du Paysage – Génétique de la Conservation**  
**Spécialité : Génétique des Populations**  
Ecole Doctorale : Energie et Environnement  
présentée par

**Nicolas BECH**

Génétique de la Conservation et du Paysage : Etude des Populations de Lagopède alpin et  
de Perdrix grise en France

Thèse dirigée par André THERON et Jérôme BOISSIER

**Jacques BLONDEL**

Directeur de Recherche, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, Montpellier /  
*Rapporteur*

**Roger PRODON**

Professeur, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, Montpellier / *Rapporteur*

**Isabelle LITRICO**

Chargé de Recherche, INRA de Lusignan / *Examineur*

**Stéphanie MANEL**

Professeur, Université d'Aix-Marseille I (de Provence) / *Examineur*

**André THERON**

Directeur de Recherche, Université de Perpignan, *Directeur de thèse*

**Jérôme BOISSIER**

Maître de Conférence, Université de Perpignan, *Directeur de thèse*

**Claude NOVOA**

Chargé de recherche, ONCFS, Prades, *Directeur de thèse*

Laboratoire de Biologie et d'écologie tropicale  
et méditerranéenne  
UMR 5244 CNRS-UPVD  
52 avenue Paul Alduy 66860 PERPIGNAN

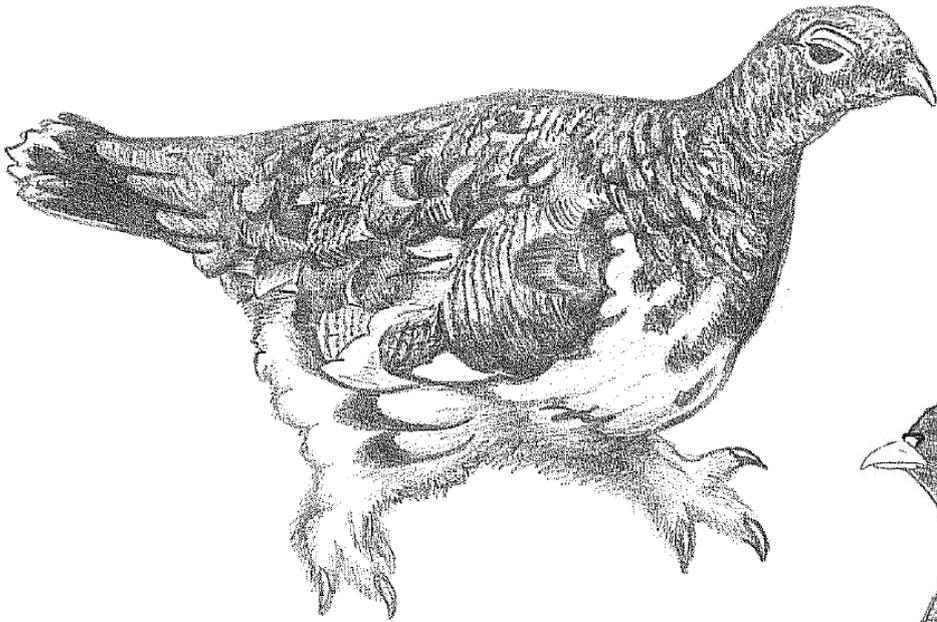


Office Nationale de la Chasse et de la Faune  
Sauvage  
CNERA Faune de Montagne  
Espace Alfred Sauvy. 66500 PRADES



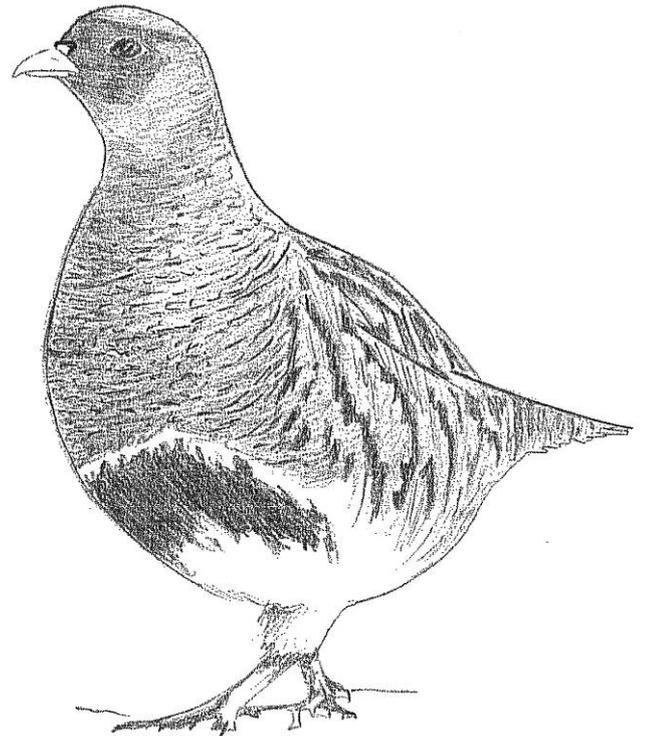
*A mes deux grands pères Adrien et Roger*

---



*“ The line it is drawn  
The curse it is cast  
The slow one now  
Will later be fast  
As the present now  
Will later be past  
The order is rapidly fadin’  
And the first one now will later be last  
For the times they are a-changin’ ”*

Bob Dylan: The Times They Are A-Changin'



## Résumé :

Le lagopède alpin (*Lagopus muta*) et la perdrix grise (*Perdix perdix*) atteignent dans les Pyrénées les limites méridionales de leurs aires de répartition mondiale. Les populations pyrénéennes de ces deux sous-espèces (*Lagopus muta pyrenaica* et *Perdix perdix hispaniensis*) sont donc en situation d'isolat biogéographique. Les deux espèces sont d'excellents bio-indicateurs de l'évolution des milieux ouverts d'altitude. Sous la pression conjuguée des contraintes environnementales et anthropiques, ces milieux connaissent actuellement une évolution sensible, caractérisée par un relèvement altitudinal des étages de végétation et donc un rétrécissement de l'habitat disponible pour les espèces d'altitude. La régression des activités agro-pastorales accentue ce phénomène généralisé de reforestation des milieux. Une conséquence attendue de ces bouleversements est l'augmentation du degré de fragmentation des habitats notamment pour les populations d'altitude. Au-delà de l'influence du paysage sur la structuration des populations, un autre facteur pourrait structurer les populations de perdrix grise : les lâchers d'individus d'élevage dans des populations sauvages. **Dans cette thèse, nous nous intéressons à la structuration génétique du lagopède alpin des Pyrénées et de la perdrix grise en France afin d'aider à la décision des plans de conservation.**

**Mots clés :** Galliformes de montagne, Génétique de la Conservation, Microsatellites, Génétique du Paysage, Sky Island, Introgression Génétique.

## Abstract:

The Rock ptarmigan (*Lagopus muta*) and the Grey partridge (*Perdix perdix*) in the Pyrenees are at the southern limits of the species' range. The Pyrenean populations of these two species (*Lagopus muta pyrenaica* and *Perdix perdix hispaniensis*) are thus isolated in biogeographic island. The two species are excellent biological indicators of the alpine tundra evolution. Under the combined pressure of the environmental and anthropic constraints, these landscapes currently know a significant evolution characterized by an elevation of the vegetation levels and thus by a contracted alpine tundra. The regression of the agro-pastoral activities accentuates this generalized phenomenon of re-forestation of the landscapes. An consequence of these upheavals is the increase in the fragmentation level of the habitats, in particular for the altitude populations. Beyond the influence of the landscape on the population structuring, another factor could be implied in the population structure of Grey partridge: release of captive-bred individuals in wild populations. **In this PhD, we are interested in the genetic structuration of the Rock ptarmigan in the Pyrenees and the Grey partridge in France in order to contribute to the decision of the wildlife conservation plans.**

**Keyword:** Mountain Galliforms, Conservation Genetics, Microsatellites, Landscape Genetics, Sky Island, Genetic Introgression.

---

Mes remerciements s'adressent tout d'abord aux partenaires collaborateurs et financeurs de ce projet : le Bureau des Ressources Génétique, l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique ainsi que le Centre National de la Recherche Scientifique.

Mes remerciements vont ensuite à mes encadrants Jérôme Boissier, Claude Novoa et André Théron pour leurs discussions, leurs soutiens et leur accueil. En espérant pouvoir sauver cet oiseau de tonnerre si cher à tous.

Tous mes remerciements s'adressent également au Laboratoire de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne: Céline, David, Benjamin, Christoph, Juliette, Guillaume, Hélène, Gabi, Betty, Raymonde, Philippe et Olivier mais aussi à Jeff, Rémi, Anne M., Irma, Gaël, Anne R. Bernard et Nathalie.

Bien évidemment je n'oublierai pas ceux qui m'ont supporté dans leur bureau ou en tant qu'encadrant : Matthieu Bl., Benjamin-Marc, Julie, Yves, Guillem, Jérémie, Pauline, Rodrigue, Manu, Anne B., Matthieu Ba., Géraldine mais aussi Corentin, Cécile, Julien, Elsa et Erwan.

Egalement merci au personnel ONCFS : Elizabeth B., Jean R., Gilles C., Gilles B., Jean Pierre A., Vincent Parmain et Emilie D.D. pour leur aide et leur patience sur le terrain pendant les quelques comptages que nous avons partagés.

Merci au Laboratoire d'Ecologie Alpine pour son implication dans ce projet de thèse, particulièrement à Stéphanie Manel.

Un peu plus personnellement, merci à tous ceux qui m'ont épaulé pendant ces dernières années : mes amis : Yannick, David et Aurélie, Antho, l'agneau, Greg, Paul, Guillaume, Anne, Damien, Laure, Marco, Coco, Sandrine, Stéphanie, David et Laura, Julien et Lien, Richard et Fred. Egalement un grand merci à l'équipe loisir de hand ball de Cabestany pour leur aide hebdomadaire dans l'évacuation du stress doctoral. Merci au Groupe Ornithologique du Roussillon pour leur accueil et leur partage ornithologique.

Je ne saurai oublier ma famille qui a su être présente quand il le fallait, mes parents et grands parents, Valérie et Vincent, Corinne et Patrick, Caroline, Tom pouce, Stéphane et Carine mais aussi Sylvie et Christian, Eloi et Kévin. Merci à tous pour votre soutien.

Sophie, ce travail aurait été impossible sans ton aide, ton soutien et ton amour, merci à toi, tu es la boussole de ma vie.

Merci simplement à tous ceux qui ont cru en moi

Nico

---



## SOMMAIRE

PROLOGUE.....	1
INTRODUCTION GENERALE.....	1
IL Y A SATELLITE ET MICROSATELLITE ! .....	2
<b>LES ESPACES D'ALTITUDE, VERITABLES CONSERVATOIRES DE BIODIVERSITE. ....</b>	<b>7</b>
<b>Impact du changement climatique sur les espaces d'altitude (notamment la limite supérieure de la forêt) .....</b>	<b>9</b>
<b>Impact anthropique sur les espaces d'altitude et leur biodiversité associée.....</b>	<b>10</b>
<i>Activités agro-pastorales, modifications des habitats et biodiversité :.....</i>	<i>10</i>
<i>Domaines skiables, modifications des habitats et biodiversité : .....</i>	<i>12</i>
<b>LES GALLIFORMES DE MONTAGNE.....</b>	<b>13</b>
<i>Le lagopède alpin : .....</i>	<i>14</i>
<i>La perdrix grise :.....</i>	<i>17</i>
<b>CHAPITRE I.....</b>	<b>24</b>
<b>ETUDE DE LA STRUCTURATION GENETIQUE DES POPULATIONS DE LAGOPEDE ALPIN (LAGOPUS MUTA PYRENAICA) DANS LES PYRENEES.</b>	<b>24</b>
.....	24
<b>I/ INTRODUCTION.....</b>	<b>25</b>
<b>II/ Zone d'étude et échantillonnage .....</b>	<b>26</b>
<b>III/ Marqueurs microsatellites .....</b>	<b>27</b>
A/ Amplification des marqueurs microsatellites .....	27
B/ Validation des marqueurs microsatellites .....	28
<b>IV/ Distribution de la variabilité génétique.....</b>	<b>29</b>
<b>V/ Structuration génétique.....</b>	<b>32</b>
<b>VI/ Goulot d'étranglement.....</b>	<b>40</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>46</b>
Annexe I1 : Détails des années de prélèvement par site d'échantillonnage.....	46
Annexe I2 : Recensement des marqueurs microsatellites mis en évidence chez les Tétraonidés. ....	47
Annexe I3 : Arbre phylogénétique des oiseaux et détail de l'arbre phylogénétique des Ansériformes et galliformes.....	48
Annexe I4 : Article publié dans <i>Animal Conservation</i> . ....	49
Annexe I5 : Action de translocation de lagopède alpin dans les Pyrénées. ...	58
<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>64</b>
<b>ETUDE DE LA STRUCTURATION GENETIQUE DES POPULATIONS DE PERDRIX GRISE (PERDIX PERDIX) EN FRANCE. ....</b>	<b>64</b>
<b>I/ Introduction : .....</b>	<b>65</b>
<b>II/ Détermination des marqueurs moléculaires : .....</b>	<b>69</b>
A/ Détermination des marqueurs microsatellites .....	69
B/ Détermination du marqueur du sexe chez la perdrix grise.....	70

---

<b>III/ Echantillonnage et méthodes d'analyse:</b> .....	71
A/ Echantillonnage : .....	71
B/ Méthodes d'analyses : .....	73
<b>IV/ Structuration génétique des perdrix grises en France</b> .....	75
<b>V/ Introgression et structuration génétique des populations de perdrix grise des Pyrénées (<i>P. p. hispaniensis</i>) :</b> .....	77
A/ Introgression génétique des populations de perdrix grise sauvages : ...	77
B/ Distribution de l'introgression génétique au sein des populations de perdrix grise des Pyrénées : .....	80
C/ Structuration génétique des populations de perdrix grise sauvages :....	81
<b>VI/ Structuration génétique des populations de perdrix grise du Bassin Parisien (<i>P. p. armoricana</i>)</b> .....	85
<b>VII/ Bilan sur la structuration génétique des perdrix grises en France.</b> ...	87
A/ Impact des lâchers sur la structuration génétique : .....	87
B/ Impact du paysage sur la structuration génétique.....	89
<b>Annexes</b> .....	92
Annexe II1 : Article accepté dans <i>Genetics and Molecular Research</i> .....	92
Annexe II2 : Calcul des chemins de moindre coût .....	101
DISCUSSION GENERALE .....	104
<b>I/ Le lagopède alpin, bilan et perspectives</b> .....	105
A/ Appauvrissement génétique et structuration génétique des populations de lagopède alpin des Pyrénées.....	105
B/ Effet d'une barrière géomorphologique au sein des Pyrénées sur la structuration génétique.....	107
C/ Etude complémentaire de l'impact des infrastructures humaines sur l'avifaune en montagne. ....	109
D/ Bilan et perspectives pour la conservation du lagopède alpin .....	110
<b>II/ La perdrix grise : Bilan et perspectives</b> .....	112
A/ Mise au point de marqueurs moléculaires.....	112
B/ Etude de la structuration génétique : .....	113
C/ Perspectives chez la perdrix grise : .....	115
<b>III/ Histoire des populations de galliformes dans les Pyrénées : passé, présent, futur...</b> .....	116
<i>Perspective à débattre...</i> .....	119
<b>IV/ Conclusions :</b> .....	120
ANNEXES .....	123
Annexe C1 Article soumis dans <i>Conservation Genetics</i> .....	123
Annexe C2 : Article accepté dans <i>Infection, Genetics and Evolution</i> .....	150
BIBLIOGRAPHIE .....	157

---

## LISTE DES LOGICIELS D'ANALYSES UTILISES

Logiciels d'analyse utilisés (en accès libre):

**ALLELE IN SPACE** <http://www.marksgeneticsoftware.net/AISInfo.htm>

Miller MP (2005) Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic information. *Journal of Heredity* 96, 722-724.

**ARLEQUIN** <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: A software for population genetics data analysis. Version 2.001. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

**BAYESSASS** <http://sites.google.com/site/rannalaorg/software>

Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian Inference of Recent Migration Rates Using Multilocus Genotypes. *Genetics* 163, 1177–1191.

**BOTTLENECK** <http://www.ensam.inra.fr/URLB>

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.

**CREATE** <http://www.lsc.usgs.gov/CAFL/Ecology/Software.html>

COOMBS JA, LETCHER BH, NISLOW KH (2008) CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology resources* 8, 578-580.

**DISTRUCT** <http://rosenberglab.bioinformatics.med.umich.edu/distruct.html>

Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4, 137-138.

**DNASP** <http://www.ub.edu/dnasp/>

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.

**FSTAT** <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>

Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html>.

**FORMATOMATIC**

[http://taylor0.biology.ucla.edu/~manoukis/Pub\\_programs/Formatomatic](http://taylor0.biology.ucla.edu/~manoukis/Pub_programs/Formatomatic)

Manoukis NC (2007) FORMATOMATIC: a program for converting diploid allelic data between common formats for population genetic analysis. *Molecular Ecology Notes* 7, 592-593.

**GENALEX 6** <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.

**GENCOUNT** <http://www.ccmr.ualg.pt/maree/index.php?t=falberto>

**GENEPOP ON THE WEB** <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>

Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.

**GENETIX** <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

**GIMLET** <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/Gimlet/gimlet.htm>

Valière N (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2, 377-379.

**GRAPH PAD IN STAT** <http://www.graphpad.com/instat/instat.htm>**HYBRIDLAB** <http://www.dfu.min.dk/ffi/uk/populationgenetic/hybridlab>

Nielsen EE, Bach LA, Kotlicki P (2006) HYBRIDLAB (version 1.0): a program for generating simulated hybrids from population samples. *Molecular Ecology Notes* 6, 971-973.

**IMA** <http://lifesci.rutgers.edu/~heylab/HeylabSoftware.htm#IM>

Hey J, Nielsen R (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167, 747-760.

**INSTRUCT** <http://cbsuapps.tc.cornell.edu/InStruct.aspx>

Gao H, Williamson S, Bustamante CD (2007) An MCMC Approach for Joint Inference of Population Structure and Inbreeding Rates from Multi-Locus Genotype Data. *Genetics* (online).

**MCLEEPS** <http://www.stat.washington.edu/thompson/Genepi/Mcleeps.shtml>

Anderson EC, Williamson EG, Thompson EA (2000) Monte Carlo evaluation of the likelihood for  $N_e$  from temporally spaced samples. *Genetics* 156, 2109-2118.

**MEGA** <http://www.megasoftware.net/mega.html>**MICROCHECKER** <http://www.microchecker.hull.ac.uk/>

Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology* 4, 535-538.

**MSVAR** <http://www.rubic.rdg.ac.uk/~mab/software.html>

Storz JF, Beaumont MA (2002) Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. *Evolution* 56, 154-166.

**PATHMATRIX** <http://cmpg.unibe.ch/software/pathmatrix/>

Ray N (2005) PATHMATRIX: a geographical information system tool to compute effective distances among samples. *Molecular Ecology Notes* 5, 177-180.

**PCAGEN** <http://www2.unil.ch/popgen/software/pcagen.htm>**TESS** <http://membres-timc.imag.fr/Olivier.Francois/tess.html>

Chen C, Durand E, Forbes F, François O (2007) Bayesian Clustering Algorithms Ascertain Spatial Population Structure: A New Computer Program and a Comparison Study. *Molecular Ecology Notes* 7, 747-756.

**STRUCTURE** <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

**SPAGEDI** <http://ebe.ulb.ac.be/ebe/Software.html>

Hardy OJ (2003) Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology* 12.

**Logiciels d'analyse utilisés (Licence):****SPSS****MAPINFO 7.5****ARCGIS 9.2****ARCVIEW 3.2**

## PROLOGUE

Décrite par certain comme la « Science de la crise », la biologie de la conservation est une discipline qui vise à identifier les populations en déclin et celles en danger, à déterminer les causes de leur déclin et à proposer, tester et valider des moyens pour maintenir ou restaurer la biodiversité. La pluridisciplinarité de cette discipline s'est étendue en évoluant vers l'écologie et en s'appuyant sur la biogéographie, l'écologie du paysage, la génétique des populations, la modélisation, la cartographie SIG, mais aussi sur la sociologie, l'économie, la philosophie et les sciences politiques. Il s'agit à la fois de conserver les espèces et leur « décor écologique ».

Les milieux montagnards semblent particulièrement propices à l'étude de la perte de biodiversité et la gestion de son maintien. En effet, la chute de diversité dans ces milieux pourrait trouver son origine à la fois dans les activités anthropiques et dans l'évolution actuelle du climat. Le département des Pyrénées-Orientales possède un patrimoine naturel riche et varié qui s'étage sur près de 4000 mètres de dénivelés allant des bords de la Méditerranée aux hauts sommets des Pyrénées Catalanes. 11 Réserves Naturelles, 4 zones NATURA 2000 et un Parc Naturel Régional en protègent les espaces les plus remarquables. Tous ces éléments font de cette région une zone qui pourrait être considérée comme un « hot spot » de diversité et qui, de ce fait, présente un intérêt particulier pour l'étude et l'évolution de la biodiversité.

Outre l'aspect purement biologique, ce département englobe le pic du Canigou qui, plus qu'un massif, représente une véritable 'montagne sacrée' pour les catalans. Au-delà d'une frontière entre Catalogne Sud et Catalogne Nord, le pic du Canigou représente un véritable point de rendez-vous pour les catalans venus du Nord et du Sud. Connu partout en France, il fait partie du réseau grands sites de France et on peut l'apercevoir de Barcelone à Marseille. A l'image de sa réputation et au-delà d'une zone d'étude, le massif du Canigou et plus largement les Pyrénées représentent une richesse qui allie force de la nature, patrimoine et biodiversité.

Ce travail de thèse est le fruit d'une entente et d'une collaboration étroite entre différents partenaires de la Biologie. Né de la communication entre gestionnaires et chercheurs, ce travail a su allier recherches fondamentales et recherches appliquées, articles à comité de lecture et articles dans la presse locale, séminaires scientifiques et de vulgarisation mais aussi et surtout laboratoire et terrain ; **le tout pour moi indissociable.**





## Introduction Générale



**IL Y A SATELLITE ET MICROSATELLITE !**

*Le texte qui suit fait référence aux deux frises chronologiques en pages 6 et 7.*

**A**près un long débat historique sur l'impact de l'environnement sur les individus, il est maintenant accepté que l'environnement influence au moins la répartition géographique des individus et plus généralement des espèces. En effet, les modifications d'habitat sont connues pour entraîner un changement dans leur distribution (Parmesan 2006; Parmesan & Yohe 2003; Peñuelas & Boada 2003; Walther *et al.* 2002). Intégrer l'évolution du paysage dans lequel vivent les individus est devenu capital pour mieux étudier et comprendre les populations naturelles. Dans cette optique, Manel *et al.* ont proposé en 2003 de combiner l'écologie du paysage avec la génétique des populations : *les flux géniques et les adaptations locales pourraient ainsi être expliqués via des phénomènes d'ordre environnementaux*. Alors qu'aucun outil ne permettait de lier ces deux disciplines aux XIX<sup>ème</sup> et XX<sup>ème</sup> siècles, c'est l'évolution parallèle et progressive de la géo-localisation et de la génétique qui a rendu possible leur rencontre. Une succession d'évènements va rapprocher progressivement ces disciplines pour en générer une nouvelle, appelée 'landscape genetic' (i.e. génétique du paysage). Etudier l'influence du paysage sur la distribution de la variabilité génétique devient alors possible.

'Landscape genetic' : concept développé par Manel *et al.* en 2003 proposant de combiner l'écologie du paysage et la génétique des populations.

Voici brièvement résumé l'histoire de la naissance de la génétique du paysage.

Les années 1950 ont marqué très fortement la génétique et la géo-localisation. En effet, Watson et Crick en 1953 décrivent pour la première fois la structure hélicoïdale de la molécule d'ADN. Crick obtient quelques années plus tard le prix Nobel de médecine (1962). Quatre ans après la découverte de Watson et Crick, en 1957, l'Homme entre dans l'ère spatiale avec les Russes qui envoient pour la première fois un satellite dans l'espace, son nom : Spoutnik (du russe *спутник* signifiant « compagnon de route »).

C'est principalement au cours du XX<sup>ème</sup> siècle que les méthodes de géo-localisation et de génétique ont commencé à se rapprocher.

Plus tard, au début des années 1970, en pleine guerre froide, le département de la défense des Etats-Unis finance un projet strictement militaire visant à géo-localiser un point sur la planète en temps réel, le nom de ce projet : Navstar Global Positioning System (1973). C'est l'acte de naissance de la notion de géo-localisation. Les années 1970 marquent également la génétique avec l'apparition de deux méthodes de séquençage de l'ADN : la méthode de Sanger et celle de Maxam et Gilbert.

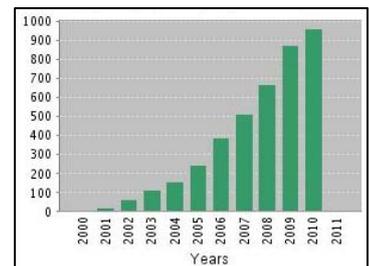
En 1994, la constellation de satellites accueille sa 24<sup>ème</sup> unité qui rend alors possible la géo-localisation d'un point n'importe où sur la planète Terre. Les années 1990 voient également la naissance de logiciels spécialisés dans le

traitement des données génétiques pour l'étude des populations naturelles. C'est ce qui deviendra la première génération de logiciels de génétique. Ces logiciels, munis d'une interface graphique, calculent un grand nombre d'indices génétiques développés au cours du dernier siècle (indice de Nei, de Wright par exemple). En 1993, Tautz définit des classes de petites séquences d'ADN répétées en tandem, c'est l'acte de naissance des microsatellites (Tautz 1993).

A partir de 1995, les progrès s'accroissent et le lien entre géo-localisation et génétique devient de plus en plus étroit. En effet, en 2000, le président des Etats-unis d'Amérique, Bill Clinton, supprime la SA (Selective Availability) qui réservait l'accès à la constellation de satellites uniquement aux forces armées. Ainsi, à partir de 2000, la constellation satellitaire est accessible à tous et des appareils de géo-localisation commencent à apparaître sur les marchés (avec une précision horizontale de l'ordre de 100m). Bien que déjà abordée auparavant, c'est en 2001 que la 3<sup>ème</sup> dimension voit le jour et on passe alors à une précision de 4m horizontalement et de 8m verticalement. Les logiciels permettant de traiter ces informations de géo-localisation évoluent de façon concomitante et ESRI ArcGIS version 8.1 apparaît. Cette nouvelle version du logiciel permet d'intégrer des données en 3 dimensions, on parle alors de 'Modèle Numérique de Terrain'. Ces avancées en informatique favorisent également l'évolution et l'expansion des logiciels de génétique. En effet, au début des années 2000, le développement de l'Internet et l'apparition d'ordinateurs de plus en plus 'puissants' permettent, d'une part, d'accéder plus facilement aux logiciels et d'autre part de lancer plus d'analyses en moins de temps ! Ainsi, la 'première génération' de logiciel de génétique (comme par exemple GENEPOP (Raymond & Rousset 1995), GENETIX (Belkhir *et al.* 1996), BOTTLENECK (Cornuet & Luikart 1996)) est peu à peu remplacée par la 'deuxième génération' essentiellement basée sur les analyses bayésiennes (par exemple: STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) (voir figure ci –contre), BAYESASS (Wilson & Rannala 2003), DISTRUCT (Rosenberg 2004)). Ces analyses bayésiennes apparaissent comme une révolution dans les études de génétique car elles permettent d'incorporer des 'priors' ou *a priori* dans les analyses et de passer d'une échelle populationnelle à une échelle individuelle, permettant des analyses plus fines (Beaumont & Rannala 2004; Shoemaker *et al.* 1999).

Au début des années 2000, la géo-localisation n'est pas aussi accessible qu'aujourd'hui, tant d'un point de vu conceptuel que d'un point de vue financier. Ainsi, ce n'est que depuis 2005 que les appareils de géo-localisation (ou GPS pour Global Positioning System) se répandent dans les collectivités et les foyers. L'année 2004 voit également apparaître Google Earth et WorldWind qui permettent certes de survoler la Terre et de zoomer sur un lieu de son choix mais également d'ajouter ses propres données sur des fonds de cartes disponibles en libre accès. L'accès 'facile' aux appareils GPS et aux fonds de

Les années 2000 voient apparaître les méthodes bayésiennes dans les analyses génétique et la géolocalisation devient accessible à tous.



Citation du logiciel 'STRUCTURE' par année depuis sa parution en 2000.

cartes numériques apporte aux études de terrain, un géo-référencement précis de chaque échantillon collecté. L'échantillon n'est ainsi plus rattaché à une population englobant un nuage de points, mais est considéré comme une entité à part entière, ayant sa propre position géographique (longitude, latitude).

La géo-localisation précise de chaque échantillon et les ressources informatiques grandissantes donne naissance à une troisième génération de logiciels de génétique prenant à la fois en compte les coordonnées géographiques et les caractéristiques génétiques de chaque individu. Parmi cette nouvelle génération de logiciels, nous pouvons citer : ALLELE IN SPACE (Miller 2005), GENALEX (Peakall & Smouse 2006), TESS (Chen *et al.* 2007; Guillot 2009). Ainsi, avec cette nouvelle génération de logiciels, chaque échantillon est considéré comme une entité ayant sa propre histoire et ses propres caractéristiques génétiques et géographiques.

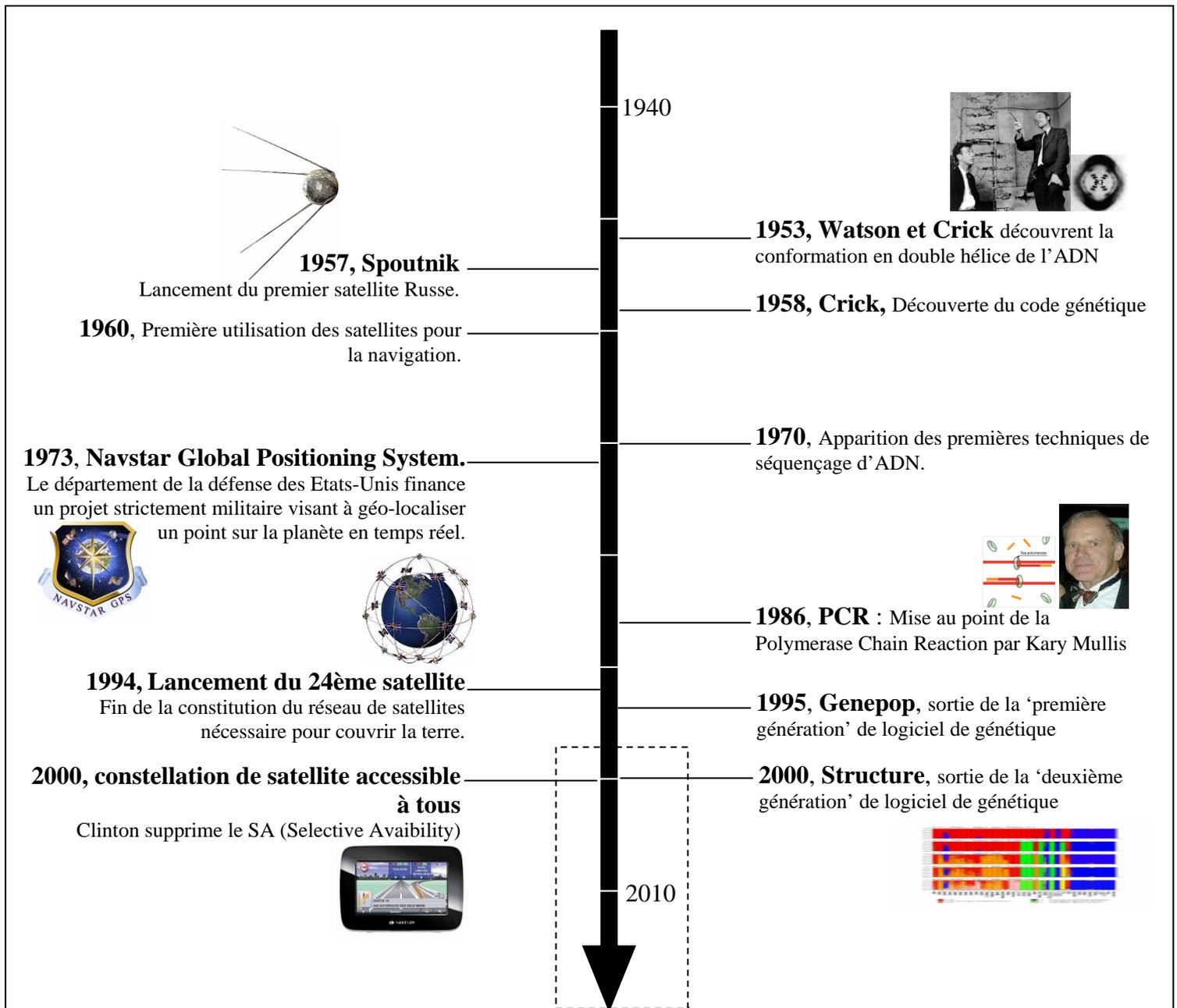
Conséquence directe des progrès du XX<sup>ème</sup> siècle, la succession de découvertes a conduit à la rencontre entre la géo-localisation et la génétique et, par extrapolation, à la jonction entre les méthodes de SIG et celles de génétique des populations. Le fruit de cette association conduira la conception de nouveaux logiciels, qualifiés dans cette thèse, de 'troisième génération'.

Même si les logiciels de génétique et les avancées en informatique ne cessent d'évoluer chaque jour, c'est sans doute la biologie moléculaire qui révolutionnera prochainement les logiciels de génétique en faisant probablement apparaître une quatrième génération de logiciels. En effet, la plupart des logiciels de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> générations utilisent des données basées sur des 'petites' séquences génomiques. Aujourd'hui, nous rentrons dans l'ère de la génomique et le séquençage massif se développe de plus en plus. Pour un coût relativement modeste (2500 €) et en seulement 3 jours, il est possible aujourd'hui de séquencer 100 mégabases. C'est également la 'course aux microsatellites' : si 6 à 7 marqueurs microsatellites suffisaient en 2004 pour valider une étude de génétique ; il faut aujourd'hui, 12-17 marqueurs microsatellites pour être quelque peu 'crédible' et pouvoir prétendre à la publication des résultats. Ces marqueurs microsatellites qui dans le passé avaient remplacé les marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et qui eurent leur apogée en 2006, sont progressivement remplacés par les SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms).

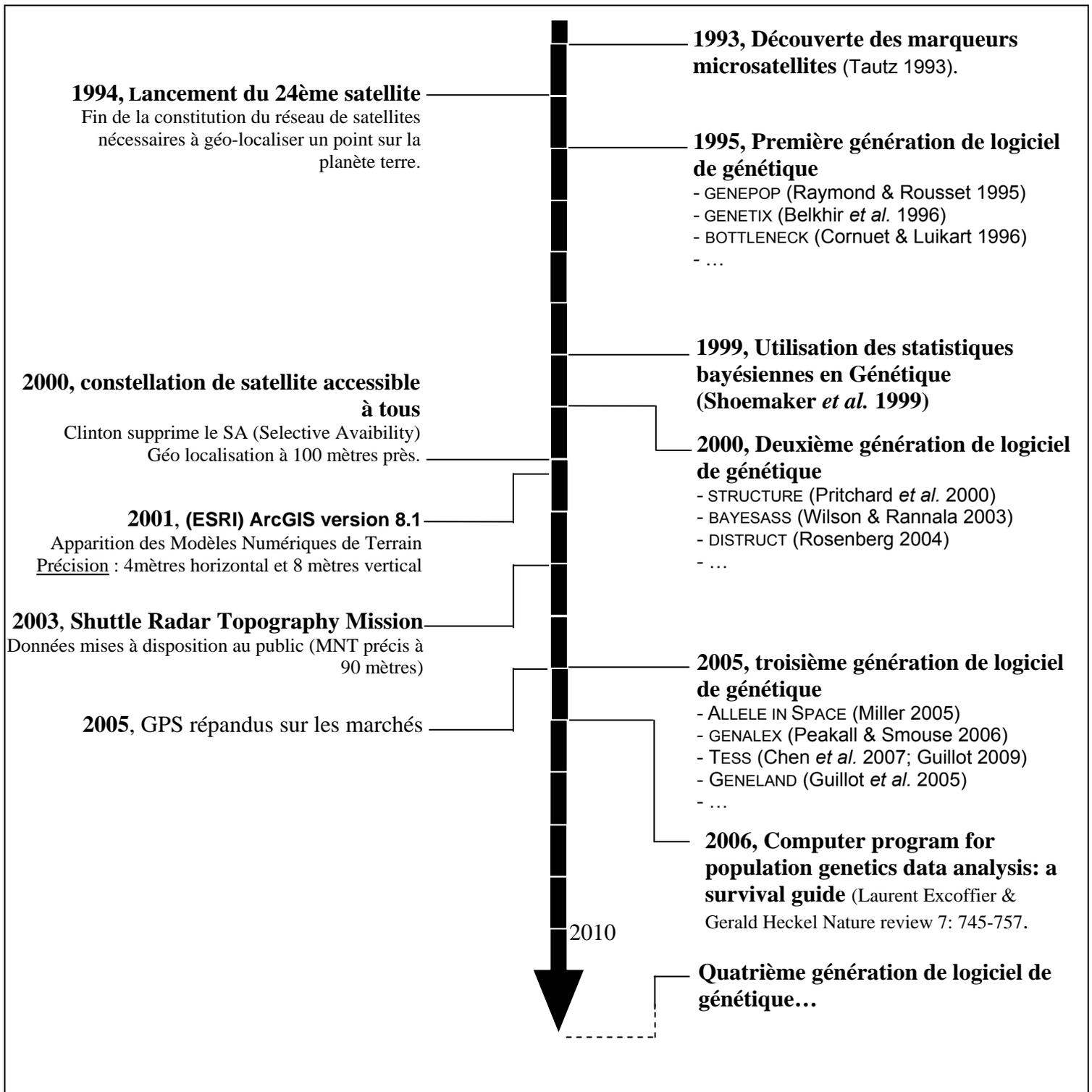
Nous sommes actuellement dans une époque charnière où la biologie moléculaire connaît une progression spectaculaire. Il ne serait donc pas étonnant de voir apparaître d'ici peu des logiciels de 'quatrième génération' intégrant à la fois les données géographiques (longitude, latitude et altitude) et les données massives de génomique. Ces avancées permettront de comparer plus un polymorphisme de séquences mais plutôt un polymorphisme de génome...

Apparition de la troisième génération de logiciel de génétique qui lie à la fois les coordonnées géographiques et les caractéristiques génétiques de chaque individu.

A venir : Une quatrième génération de logiciel de génétique ?



**Frise 1** (1953-2000): Evènements importants ayant participé à la jonction entre des données de géo-localisation et de génétique.



**Frise 2** (2000-2010): Evènements importants ayant participé à la jonction entre des données de géo-localisation et de génétique.

**LES ESPACES D'ALTITUDE, VÉRITABLES CONSERVATOIRES DE BIODIVERSITÉ.**

**E**n 1992, la conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement (Sommet de la Terre) qui se déroule à Rio de Janeiro conduit à l'élaboration d'un programme d'actions pour le XXI<sup>e</sup> siècle, visant à prendre des mesures pour favoriser le développement durable. Ce document, appelé 'Agenda 21', est encore aujourd'hui considéré comme une référence pour tout ce qui concerne le développement durable. Il se compose de différents chapitres, chacun proposant des recommandations dans différents domaines. Parmi ces domaines, le chapitre 13 fait référence aux systèmes montagnards qui nous intéressent plus particulièrement dans ce mémoire de thèse. Voici un extrait de la traduction de ce chapitre (d'après le site des Nations Unies : <http://www.un.org/fr/>).



**13.1.** Les montagnes sont un important réservoir d'eau, d'énergie et de diversité biologique. En outre, elles contiennent des ressources essentielles telles que les minéraux, les produits forestiers et agricoles, et les services récréatifs. En tant que grands écosystèmes au sein de l'écologie complexe de notre planète, les environnements de montagne sont indispensables à la survie de l'écosystème mondial. Toutefois, les écosystèmes de montagne se modifient rapidement. Ils sont exposés à une érosion accélérée du sol, à des glissements de terrain et à une perte rapide de l'habitat et de la diversité génétique. Sur le plan humain, la pauvreté est très répandue parmi les montagnards et les connaissances des populations autochtones se perdent. En conséquence, la plupart des régions montagneuses du globe sont soumises à une dégradation de leur environnement. C'est pourquoi une gestion convenable des ressources des montagnes et un développement socio-économique de leur population justifient une action immédiate. [...]

**13.4.** Les montagnes sont très sensibles à tout déséquilibre écologique provoqué par l'activité humaine ou par la nature. Ce sont les zones les plus sensibles à tous les changements climatiques dans l'atmosphère. Des renseignements particuliers sur l'écologie, le potentiel des ressources naturelles et les activités socio-économiques sont indispensables. Les régions de montagne et de colline possèdent une riche variété de systèmes écologiques. En raison du facteur d'altitude, les montagnes créent des gradients de température, de précipitations et d'ensoleillement. Une pente donnée peut comprendre plusieurs systèmes climatiques - tropical, subtropical, tempéré et alpin - qui correspondent à autant de microcosmes présentant une grande diversité d'habitats. Or, on manque de connaissances sur les écosystèmes de montagne. La création d'une base de données sur les montagnes de la planète est donc indispensable pour lancer des programmes qui contribueraient au développement durable des écosystèmes de montagne.

Il semble aujourd'hui indispensable de mieux comprendre et de mieux gérer les espaces d'altitude, véritables patrimoines naturels aujourd'hui menacés. Plus qu'un réservoir d'écosystèmes variés et de biodiversité associée, ces espaces d'altitude représentent les refuges d'une flore et d'une faune particulières, adaptées au climat froid. Cependant, même si cette biodiversité particulière trouve son origine dans les fluctuations climatiques du quaternaire, ces dernières représentent aussi aujourd'hui une menace pour ces espaces d'altitude. De la même manière, un changement d'usage des terres menace également ces refuges de biodiversité.

Le dernier changement majeur du climat se situe au début de l'holocène (il y a 10 000 ans) et marque la fin de la dernière période glaciaire. Pendant cette période post glaciaire, le retrait des glaces a contraint les espèces adaptées au froid à trouver des habitats répondant à leurs exigences écologiques (McCarty 2001). Même si quelques espèces ont réussi à se maintenir dans des habitats localisés où les conditions climatiques ont peu évolué (Ohlemuller *et al.* 2008), sous les latitudes tempérées, la majorité des espèces adaptées au froid, ont du décaler leur répartition plus au Nord ou plus en altitude, seules régions répondant à leurs exigences écologiques (Bech *et al.* 2009; McCarty 2001; Parmesan & Yohe 2003; Stewart *et al.* 2010; Taberlet *et al.* 1998) (figure 1). Ainsi, un grand nombre d'espèces 'rescapées' sont devenues endémiques des zones d'accueil. Ces zones d'accueil, devenues refuges, sont aujourd'hui considérées comme de véritables conservatoires naturels de biodiversité où l'on peut encore rencontrer les espèces d'autrefois. Ces refuges jouent un rôle majeur dans le maintien de la biodiversité des zones tempérées (moyennes et hautes latitudes) (Willis & Whittaker 2000). Dans les zones tempérées, ces refuges se situent principalement en altitude et les espèces 'rescapées' présentes dans ces refuges se retrouvent aujourd'hui confinées et piégées près des sommets. Ces sommets s'apparentent alors à des îles continentales d'altitude (Blondel 1986; Blondel 1995) qualifiées de 'Sky island' (voir photo ci-contre)



Fig 1:

Principales routes empruntées par les espèces adaptées au froid suite aux dernières périodes de glaciation du quaternaire. Les barres en noir représentent les différentes zones de refuges européennes d'après Taberlet *et al.* 1998.

## Impact du changement climatique sur les espaces d'altitude (notamment la limite supérieure de la forêt)

- Il est maintenant renseigné que les fluctuations successives du quaternaire ont laissé des traces au sein de l'environnement. Aujourd'hui, dans un contexte de changement global, un décalage de biomes en montagne est particulièrement attendu sous la pression du réchauffement climatique (Lenoir *et al.* 2008).

- A une certaine altitude, la forêt de l'étage sub-alpin laisse place aux pelouses d'altitude de l'étage alpin. Cette limite entre forêt et pelouse (i.e. treeline) a été très étudiée car facilement mesurable. L'un des facteurs principaux pouvant influencer la position de cette limite est la température qui jouerait un rôle majeur dans le développement de la 'forêt' (Korner & Paulsen 2004; MacDonald *et al.* 2008).

Au cours des 10 000 dernières années, la limite supérieure de la forêt s'est élevée en altitude au cours de chaque période de réchauffement et s'est abaissée lors des périodes de refroidissement. Ainsi, au cours de l'optimum climatique de l'holocène (5000 à 9000 années BP), la treeline serait remontée de 200 mètres en altitude en Suède et en Norvège (Barnekow 1999; Barnett *et al.* 2001; Torbjoslashrn *et al.* 1996). Au cours de l'optimum climatique médiéval (950 à 1200 années BP), une remontée similaire de la treeline (100-200 mètres) a également été enregistrée dans les Alpes Suisses (Scapozza *et al.* 2010) et dans les montagnes Khibiny en Russie (Kremenetski *et al.* 2004). Aujourd'hui, même si la limite de la forêt a déjà été plus haute dans le passé et notamment au cours de l'holocène (Grace *et al.* 2002), on observe tout de même une remontée de l'étage alpin en altitude suite à l'augmentation des températures (Krajick 2004). Ce phénomène a déjà été enregistré dans le massif Montseny au Nord de l'Espagne (Peñuelas & Boada 2003). Dans cette région, le réchauffement climatique est responsable d'un décalage de biome qui se traduit par une remontée en altitude de la forêt de hêtre. Ce phénomène aurait été accentué par les anomalies climatiques des 50 dernières années qui auraient particulièrement touché les étages montagnards (Bradley *et al.* 2004; Peñuelas & Boada 2003). Cette remontée de biomes a pour conséquence la fermeture et la contraction des milieux d'altitude dits 'ouverts'.

En France, la commune d'Argentière est une bonne illustration de ce phénomène. Située dans le massif du Mont Blanc, cette commune est caractérisée par la présence d'un glacier qui venait lécher le village en 1865. Aujourd'hui, avec l'augmentation des températures, ce glacier a reculé en altitude, laissant place à la végétation qui a totalement reconquis le paysage (voir photos ci-contre).

En montagne les étages de végétation sont limités par la température et traduisent les fluctuations climatiques par une remontée ou une baisse en altitude.



Photos du glacier de la Commune de Argentière (Massif du Mont Blanc) en 1865 et 2005.

Au début de l'holocène, le réchauffement post glaciaire a certes entraîné une contraction d'habitat pour certaines espèces, notamment celles adaptées au froid, mais il a également entraîné une expansion d'habitats pour d'autres espèces vivants plus bas en altitude (étage sub-alpin par exemple). Ainsi, dans certain cas, cette expansion d'habitat pourrait être considérée comme bénéfique au développement de certaines espèces en augmentant leur aire potentielle de répartition et en créant d'éventuels corridors écologiques. Cependant, ces corridors peuvent créer des zones hybrides entre sous-espèces jadis allopatriques et ainsi menacer l'intégrité génétique des espèces (Butlin & Hewitt 1985; Godfrey & Hewitt 2001; Taberlet *et al.* 1998). Suite au retrait des glaces lors du dernier réchauffement post-glaciaire, les Pyrénées sont devenues l'une des grandes zones hybrides en Europe et le massif se voit accueillir des espèces provenant à la fois de la péninsule ibérique (au Sud) mais également du 'reste' de l'Europe (au Nord) (Taberlet *et al.* 1998). Dans tous les cas, que ce soit par contraction ou au contraire par extension d'habitats, l'augmentation des températures post-glaciaire a conduit à la création de 'sky island' et de zones hybrides, menaçant toutes deux la biodiversité actuelle.

L'augmentation des températures lors du dernier réchauffement post glaciaire a conduit à la création de 'Sky island' et de zones hybrides.

### **Impact anthropique sur les espaces d'altitude et leur biodiversité associée**

Dans les Pyrénées, les espaces d'altitude évoluent également sous l'influence d'une pression anthropique qui tend elle aussi à fluctuer des terres entraînant forcément des modifications d'habitats. Par exemple, la déprise agro-pastorale du début du siècle tend à modifier les écosystèmes d'altitude fragiles en offrant notamment de nouveaux espaces à conquérir par des formations buissonnantes ligneuses (landes à genêt, genévrier, rhododendron). De plus, l'essor d'autres activités humaines telles que celles liées aux infrastructures lourdes des stations de ski par exemple tend également à remodeler profondément le paysage.

#### *Activités agro-pastorales, modifications des habitats et biodiversité :*

D'après les données paléo environnementales, archéologiques et polliniques, il est maintenant connu que le paysage des Pyrénées a, depuis toujours, été façonné par la dynamique des activités socioculturelles et économiques (Galop 1989). D'après les données de palynologie, l'apparition des premières céréales ou des plantes associées aux activités agro-pastorales est concomitante avec la néolithisation du bassin Méditerranéen (Galop 1989). Cette période, marquée par la sédentarisation de l'Homme et par une extension de l'élevage et des cultures, a conquis le milieu montagnard pyrénéen entraînant la modification du couvert végétal. Ce n'est qu'à la fin du néolithique qu'on assiste à une véritable anthropisation du milieu montagnard pyrénéen. L'ère suivante, l'âge du Bronze, est marquée par une expansion de la pression des sociétés montagnardes sur

leur environnement. En effet, l'intensification de l'activité métallurgique entraîne une augmentation du déboisement provoquant ainsi une ouverture des milieux en altitude. Cette ouverture est d'autant plus marquée par un renforcement des estives à cette période. Malgré une déprise agro-pastorale à l'âge du Fer liée peut être à une période de refroidissement climatique, les activités agro-pastorales connaissent une expansion à l'Antiquité et au cours du Moyen Age. Ces activités qui s'affirment aux IX<sup>ème</sup> et X<sup>ème</sup> siècles se traduisent par une déforestation généralisée à toutes les altitudes (figure 2) (Galop 1989).

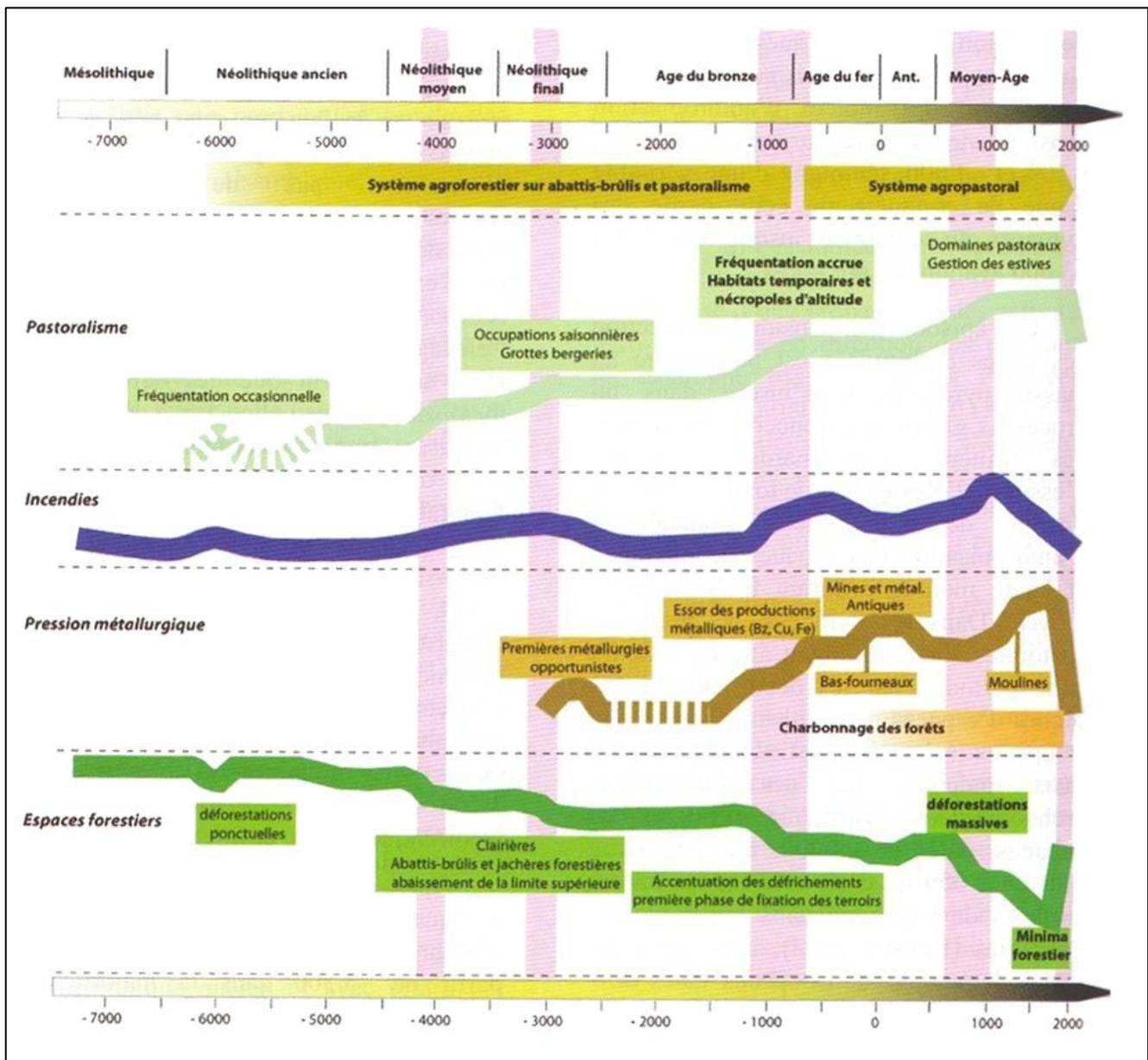


Fig 2 : Evolution des activités humaines et de l'environnement sur le versant nord pyrénéen à partir du Mésolithique, essai de synthèse (document tiré de (Galop *et al.* 2008)).

*Domaines skiables, modifications des habitats et biodiversité :*

Depuis 1960, les montagnes françaises ont connu un développement rapide des domaines skiables. Aujourd'hui, la France représente le plus vaste domaine skiable de la planète mais ses domaines skiables se situent en altitude sur des zones refuges qui abritent une grande biodiversité (Ménoni *et al.* 2006). Les infrastructures liées à ces domaines skiables se matérialisent la plupart du temps par l'édification de véritables 'rideaux' de câbles liés à la présence des téléskis, des télésièges, des lignes basse et moyenne tension et des câbles de transport d'explosifs installés pour le déclenchement préventif des avalanches (voir photo ci-contre). Ces infrastructures sont connues pour être à l'origine d'une mortalité par collision chez l'avifaune et notamment chez les espèces de taille importante et au vol rapide telles que les rapaces et les galliformes (Ménoni *et al.* 2006). Dans les Pyrénées, la localisation des domaines skiables coïncide tout particulièrement avec l'habitat des galliformes de montagne et notamment avec celui du lagopède alpin en hiver et celui du grand tétras. Afin de limiter l'impact négatif des infrastructures liées aux stations de ski, l'Observatoire des Galliformes de Montagne (OGM) préconise des mesures compensatoires. Parmi ces mesures, on distingue essentiellement une volonté de rendre plus visible les câbles meurtriers (*via* des marqueurs colorés) (figure 3) et une volonté de sensibiliser le grand public *via* des panneaux d'information (figure 4). La sensibilisation du grand public au sein des domaines skiables est primordiale car les pistes de ski attirent beaucoup de passionnés de sports 'nature' qui s'aventurent sur des sentiers de randonnées ou des itinéraires 'hors pistes'. Or ces excursions 'hors pistes' sont connues pour avoir des effets néfastes sur l'écosystème montagnard en général et particulièrement sur les populations de Tétracidés tel que le tétras-lyre (*Tetrao tetrix*) (Arlettaz *et al.* 2007).



Télési du Mont Serrat  
(Station de ski du Puigmal)



Fig.3 : Dispositif envisagé pour rendre les câbles d'acier plus visibles pour l'avifaune. Des flotteurs mais également des spirales de couleur ont été envisagés (document OGM).



Fig. 4 : Panneaux de sensibilisation pouvant être rencontrés dans les domaines skiables mais également au sein des réserves naturelles.

## LES GALLIFORMES DE MONTAGNE

Egalement appelé 'Gallinacés', les galliformes forment un ordre d'oiseaux englobant les Tétrionidés. Même si la recherche sur les Tétrionidés représente une petite part des études de biologie de la conservation, le nombre d'études consacrées à ces oiseaux n'a cessé d'augmenter depuis les années 1930 (Moss *et al.* 2010) (figure 5). En effet, les Tétrionidés sont des oiseaux en voie de raréfaction, voire en voie d'extinction pour certaines espèces. De plus en plus d'espèces de galliformes se voient classées dans la liste rouge des espèces menacées ou inscrites dans les différentes annexes de la directive européenne concernant la conservation des oiseaux sauvages.

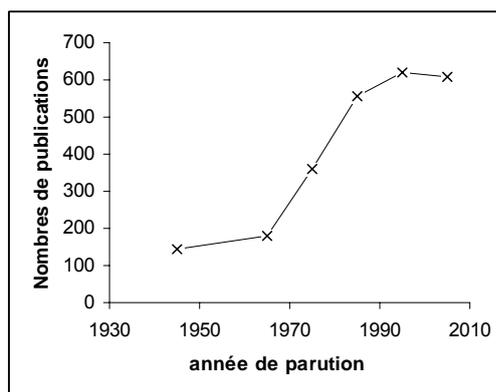


Fig. 5 : Evolution du nombre de publications réalisées sur les Tétrionidés depuis 1930, (Moss *et al.* 2010).

Dans les Pyrénées, on trouve seulement 3 des 6 espèces de galliformes de montagne que l'on compte au niveau national. Parmi ces 3 espèces, le grand tétras (*Tetrao urogallus*) a déjà fait l'objet d'une thèse décrivant la structuration génétique des populations au sein des Pyrénées (Régnaud, 2004). Par conséquent, cette présente thèse s'intéressera aux deux autres espèces de Galliformes des Pyrénées : le lagopède alpin et la perdrix grise.

Au sein de l'avifaune de montagne, les galliformes occupent une position à part. En effet, la plupart sont classés, en France, dans la liste des espèces gibiers et sont devenus au cours du temps des espèces emblématiques caractéristiques des milieux montagnards. Des noms de rue et de pistes de ski, des sculptures rappellent ainsi aussi bien la perdrix grise que le grand tétras ou le lagopède alpin (voir photos ci-contre). Très vite, ces espèces ont gagné en notoriété, ont acquis un statut de plus en plus officiel et sont devenues des espèces d'intérêt écologique et patrimonial (le grand tétras est d'ailleurs l'oiseau emblématique du Parc Naturel Régional des Pyrénées Catalanes). Ainsi, la perdrix grise et le lagopède alpin sont devenus des espèces indicatrices de l'évolution des milieux montagnards alors même que le grand tétras est considéré comme l'espèce parapluie des forêts subalpines (Pakkala *et al.* 2003).



Nom de piste de ski sur la station de ski de Puy Valador



Nom de piste de ski sur la station de ski du Puigmal



Fontaine sur le massif du Canigou

Le lagopède alpin :

Oiseau de tonnerre ou 'Raicho', voilà le nom donné au lagopède alpin (*Lagopus muta*) au Japon. En effet, depuis des décennies ce galliforme de montagne est devenu une véritable légende pour les Japonais. Ceux-ci considèrent qu'il les préserve de la foudre et du feu. Ce mythe serait dû à son cri rauque et à ses fréquentes apparitions dans le brouillard. Cet oiseau mystérieux a également fasciné un bon nombre de chercheurs qui ont entrepris de nombreuses études pour comprendre la biologie de cet animal si énigmatique.

Le lagopède alpin fait partie de la classe des Aves, de l'ordre des Galliformes et de la famille des Tétragnathidae. Relique de l'ère glaciaire, le lagopède alpin (voir photo ci-contre) possède une vaste répartition mondiale. L'essentiel des effectifs se trouvent dans des populations arctiques qui se situent au dessus du 60<sup>ème</sup> parallèle (voir photo ci-contre). On distingue quelques populations méridionales situées sur le Mont Fuji au Japon, et dans les Alpes et les Pyrénées en Europe. Dans les Pyrénées, le lagopède alpin (*Lagopus muta pyrenaica*) atteint la limite méridionale de son aire de répartition européenne et se rencontre à des altitudes supérieures à 1800 mètres, dans la partie occidentale des Pyrénées, et supérieures à 2100 dans la partie orientale. Sur la base de ses exigences écologiques (Gonzalez & Novoa 1989; Novoa & Gonzalez 1988), l'Observatoire des Galliformes de Montagne a déterminé des unités naturelles délimitant une tranche altitudinale potentiellement favorable au lagopède alpin (figure 6).

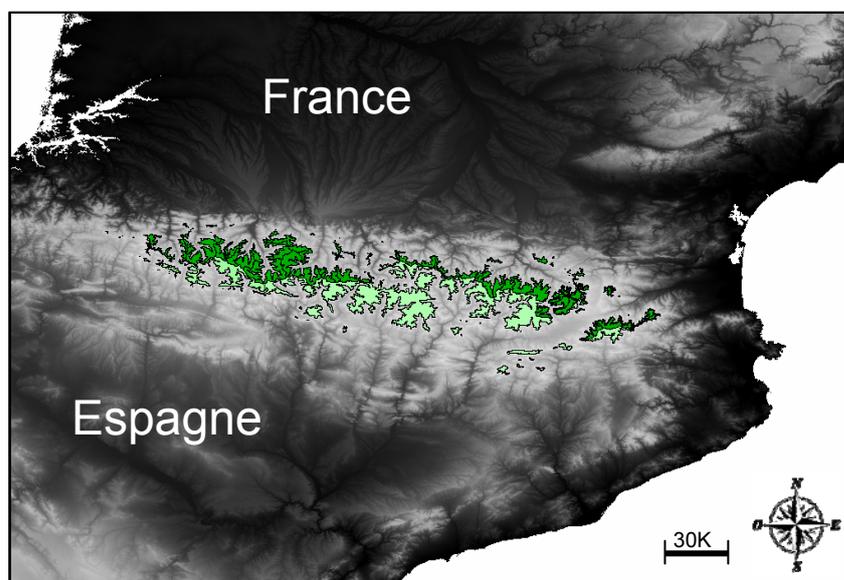
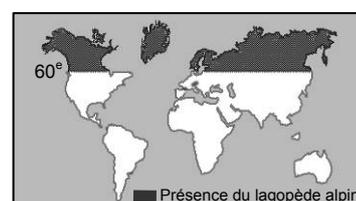


Fig.6 : Aire de répartition potentielle du lagopède alpin dans les Pyrénées.

- Isocline située à 2100 mètres d'altitude.
- Unités naturelles, propices au lagopède alpin, déterminées par l'Observatoire des Galliformes de Montagne

En Europe, le lagopède alpin est inscrit à l'annexe I de la directive européenne concernant la conservation des oiseaux sauvages. En France, l'espèce est soumise à un plan de chasse qui est différent suivant les départements alpins ou

pyrénéens. A noter que sur les Pyrénées, l'espèce est protégée en Andorre et en Espagne.

Le mâle (coq) pèse de 420 grammes à 540 grammes et la femelle (poule) de 350 grammes à 480 grammes (Bernard-Laurent *et al.* 2002). Le coq se distingue de la poule par la présence, de l'automne au printemps, d'un bandeau noir appelé lorum entre la commissure du bec et l'œil. Coqs et poules réalisent tous deux, trois mues dans l'année, ce qui leur confère une bonne homochromie avec le milieu et donc un bon camouflage. Ces mues sont conditionnées par la photopériode. Oiseau déjà présent à l'ère glaciaire, le lagopède alpin possède un certain nombre d'adaptations au froid, parmi lesquelles nous pouvons citer la présence, sur les tarsi et les doigts, de fines plumes (voir photo ci-contre). Celles-ci améliorent son déplacement sur la neige et l'isolation thermique et lui confèrent le terme de lagopède dont l'étymologie signifie : pied de lièvre (du grec lagos : lièvre et pedos : pied). Son régime alimentaire est essentiellement composé de végétaux (rhododendron, myrtille...) et, contrairement aux poussins qui se nourrissent de petits invertébrés très riches en protéines, la part de la nourriture animale chez l'adulte est négligeable. C'est une espèce monogame qui peut se reproduire à partir de l'âge de un an. Les parades nuptiales marquent le début du cycle de reproduction. La couvaison par la femelle ne dure que de 21 à 24 jours et le mâle reste auprès d'elle pour prévenir d'un éventuel danger. La ponte comporte 5,9 œufs en moyenne. A la mi-août, l'indice de réussite de la reproduction peut varier entre 0 et 0,7 jeunes par adulte. La figure 7 représente son cycle de vie.



Fines plumes situées sur les tarsi et les doigts du lagopède alpin

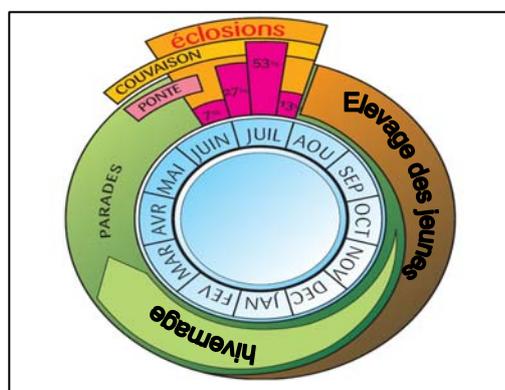


Fig.7 : Cycle de vie du lagopède alpin (*Lagopus muta*). Figure tirée des cahiers thématiques du Parc National des Ecrins : Les Galliformes.

Sensible aux perturbations de son habitat, le lagopède alpin représente un excellent bio-indicateur de l'évolution des milieux ouverts d'altitude et notamment des biocénoses alpines. Ces milieux connaissent actuellement une évolution sensible sous la pression conjuguée des contraintes environnementales et anthropiques. Parmi ces contraintes on distingue notamment, l'élévation de la température moyenne, en particulier en période automne-hiver. Cette tendance à la hausse devrait se traduire par un relèvement altitudinal des étages de végétation, avec pour conséquence un rétrécissement de l'étage alpin et donc de l'habitat disponible pour le lagopède alpin. A ceci vient s'ajouter une déprise agropastorale dont la dynamique ne suffit plus à limiter la remontée des étages

de végétation. Nous assistons donc à une fragmentation et une réduction progressive des milieux ouverts d'altitude isolant/capturant ainsi les espèces, inféodées à ces milieux, dans des 'patches' d'habitat qualifiés de 'sky island' (Bech *et al.* 2009; Jump & Penuelas 2005).

Au sein des populations alpines méridionales, il est intéressant de remarquer que le succès reproducteur est souvent inférieur à ceux enregistrés dans les populations arctiques situées au dessus du 60<sup>ème</sup> parallèle. Ainsi, dans les Alpes françaises et les Pyrénées, la proportion de jeunes dans les populations en août n'excède pas 30% alors qu'elle est en moyenne de 75% en Islande (Novoa *et al.* 2008). Ce faible âge-ratio pourrait trouver son origine auprès d'un certain nombre de facteurs pouvant affecter le succès reproducteur du lagopède alpin. En effet, le succès reproducteur est notamment dépendant de la bonne condition physique de la poule couveuse avant la nidification (Moss & Watson 1984; Steen & Unander 1985). Même si la fréquentation humaine, *via* des dérangements, ne semble pas influencer la réussite des nids, il semblerait tout de même qu'elle modifie les rythmes d'incubation pouvant encore une fois affecter le succès reproducteur du lagopède alpin (Novoa *et al.* 2003; Novoa *et al.* 2005). D'après les auteurs et la bibliographie, les dérangements ne sont pas obligatoirement d'origine anthropique et peuvent être dus aux passages d'ongulés sauvages et/ou domestiques (Miquet & Deana 2002), notamment pour les cas de dérangements nocturnes. En effet, plusieurs observations indiquent un impact du pâturage sur le succès de nidification, que ce soit directement (destruction de nid) ou indirectement (facilitation de la prédation par dérangement) (Novoa *et al.* 2005). De plus, les conditions climatiques peuvent également affecter le succès de la reproduction. En effet, il semblerait que le succès de la reproduction soit étroitement associé à un effet conjugué entre date de déneigement et précipitations au moment des éclosions. En effet, ces deux facteurs détermineraient pour le premier, une grande disponibilité de ressources trophiques pour les poules avant la ponte et, pour le second, la survie des jeunes après éclosion (Novoa *et al.* 2008)

Le faible succès de reproduction constaté dans les isolats montagnards de lagopède alpin serait compensé par un allongement de la 'contribution reproductrice totale' et ce, grâce à des taux de survie relativement élevé (Novoa *et al.* 2008; Novoa *et al.* 2010). Ainsi, faute d'avoir beaucoup de jeunes par saison de reproduction, les lagopèdes alpins des populations méridionales accéderaient à la reproduction un plus grand nombre de fois que leurs homologues des populations arctiques.

Relique de l'aire glaciaire le lagopède alpin se retrouve isolé dans des 'Sky Island'.

La perdrix grise :

La perdrix appartient à la classe des Aves, à l'ordre des Galliformes et à la famille des Phasianidés. A l'échelle mondiale, la perdrix grise (*Perdix perdix*) a été introduite, au début du siècle, en Amérique du Nord et en Nouvelle Zélande. En Europe, on distingue deux écotypes de *Perdix perdix* distincts. Dans la partie sud de l'aire de distribution, on trouve un écotype de montagne inféodé aux moyennes et hautes altitudes (>1000 m) (Lescourret 1988) alors qu'au nord et à l'ouest de l'Europe, on retrouve l'écotype de plaine inféodé aux milieux cultivés de basses altitudes (<500 mètres d'altitude) (O.N.C. 1988). En France, l'écotype de plaine se rattache exclusivement à la sous-espèce *P. p. armoricana*, dont une grande partie des effectifs se situe en Beauce. L'écotype de montagne est rattaché à la sous-espèce *P. p. hispaniensis* pour les populations pyrénéennes et à la sous-espèce *P. p. armoricana* pour les populations situées dans le massif central (Mont Lozère) (Martin *et al.* 2003).

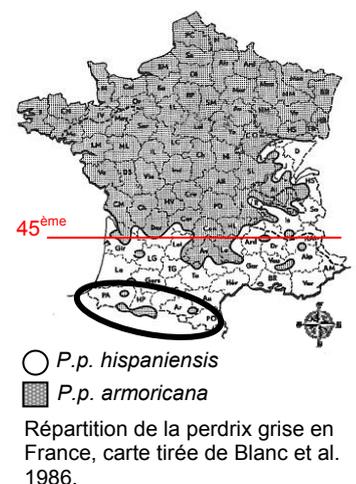


© C. NOVOA

La perdrix grise dite de montagne a des particularités morphologiques la distinguant de la perdrix grise de plaine (Lescourret *et al.* 1987; Lescourret & Catusse 1987). En effet, légèrement plus petite (et plus légère), *P.p. hispaniensis* est également plus sombre, elle présente des taches claires sur le manteau. Le dessin ventral de 'fer à cheval', caractéristique de l'espèce, est plus foncé et souvent incomplet chez le mâle de *P.p.hispaniensis*. Avant d'être décrite par Lescourret en 1987, la perdrix grise de montagne a notamment suscité la curiosité de Louis Bureau (1905) lequel dans un article très détaillé, soulignait déjà les particularités morphologiques et écologiques de la perdrix grise des Pyrénées (Bureau 1905).

Actuellement, les deux sous-espèces sont séparées par un couloir large de 100 kilomètres situé en dessous du 45° parallèle. Des raisons climatiques semblent expliquer cette séparation. En effet, la perdrix grise est bien adaptée au climat tempéré ou continental, mais supporte très peu les climats chauds du sud, évitant ainsi les zones où les températures moyennes des mois les plus chauds excèdent 21°C. Ceci pourrait expliquer l'absence actuelle dans le bassin méditerranéen (Birkan & Jacob 1988) (figure ci-contre). L'origine de la séparation entre les perdrix grises de plaine (*P. p. armoricana*) et les perdrix grises des montagnes pyrénéennes (*P. p. hispaniensis*) ferait suite à la fin de la période de glaciation, il y a 10 000 ans (Lescourret & Catusse 1987). Les ancêtres des perdrix grises actuelles présentes au Pléistocène et ayant survécu à cette glaciation auraient colonisé les moyennes altitudes dans un premier temps, puis, auraient occupé des pelouses et d'autres biotopes de plus en plus élevés.

Quel que soit l'écotype, le dimorphisme sexuel est peu marqué entre le coq et la poule. Les deux écotypes sont monogames et l'investissement paternel est



important : après l'éclosion, le coq aide la poule dans l'élevage des jeunes, le couple et ses jeunes constituent alors une compagnie. La figure 8 représente le cycle de vie de la perdrix grise.

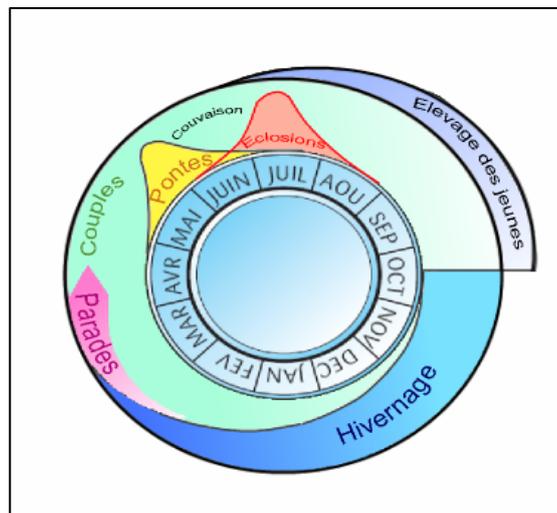


Fig.8 Cycle de vie de la perdrix grise (*Perdix perdix*). Figure tirée des cahiers thématiques du Parc National des Ecrins : Les Galliformes.

#### La perdrix de plaine :

**E**n Europe, l'aire de répartition de la perdrix grise dite de plaine s'étend de l'Irlande au Kazakhstan et de la Finlande à la Grèce. D'après BirdLife International, près de 50% des effectifs de perdrix grise d'Europe se retrouverait en France et en Pologne. Ces effectifs, bien qu'élevés comparativement aux autres populations européennes, n'ont cessé de décliner entre les années 1990 et 2000 (Kuijper *et al.* 2009; Potts & Aebischer 1995). Dans le Bassin parisien, *P.p. armoricana* est ainsi passé d'un effectif estimé à 1.7-2.9 millions de couples en 1989-1990 à 1.1-2.3 millions de couples au début des années 2000 (Bro *et al.* 2006). Ce déclin a été évalué à plus de 30% et serait dû à certaines difficultés rencontrées par l'espèce dans son milieu de vie (Bro *et al.* 2006). En effet, en France, cette chute d'effectif a notamment été mise en parallèle avec une contraction de l'aire de répartition de l'espèce. Ainsi, aujourd'hui, nous ne retrouvons quasiment plus à l'état naturel de perdrix grises dans les régions de Bretagne, Rhône-Alpes, Massif central, Franche-Comté et Lorraine (Bro *et al.* 2006). En France, ces contraintes liées à l'habitat confèrent à la perdrix grise un statut de conservation 'défavorable', d'où son classement en annexe II de la directive européenne concernant la sauvegarde des oiseaux sauvages (Bro *et al.* 2006; Reitz 2009).

Malgré un déclin constaté et la position marginale de la France quant à la distribution géographique de l'espèce, il semblerait que le Bassin Parisien se distingue, du restant de l'Europe, par ses forts effectifs et ses densités élevées de perdrix grises (Bro *et al.* 2006). La France peut ainsi alors être considérée comme l'un des derniers bastions de perdrix grise de plaine en Europe. Ainsi, à la fin des années 1970, un programme national de suivi des populations de

BirdLife International est une alliance mondiale de protection de la nature et des oiseaux représentés dans plus de 100 pays.

perdrix grise [et plus tard de faisan] (Réseau national 'Perdrix-faisan') a été engagé afin d'assurer la gestion locale des populations et d'estimer la tendance et l'évolution des densités d'individus au printemps, de leur succès reproducteur et des tableaux de chasse. Réalisé sur le long terme et à grande échelle, ce suivi de population a notamment permis de mettre en évidence une diminution des effectifs de l'ordre de 20% ces 20 dernières années (1988-2008). De plus, les données historiques de ce réseau national 'Perdrix-Faisan' (70 000 oiseaux répartis dans 22 départements) ont également montré que le succès de la reproduction de la perdrix grise était caractérisé par une certaine cyclicité englobant de bonnes, de moyennes et de mauvaises années de reproduction (figure 9) (Reitz 2009).

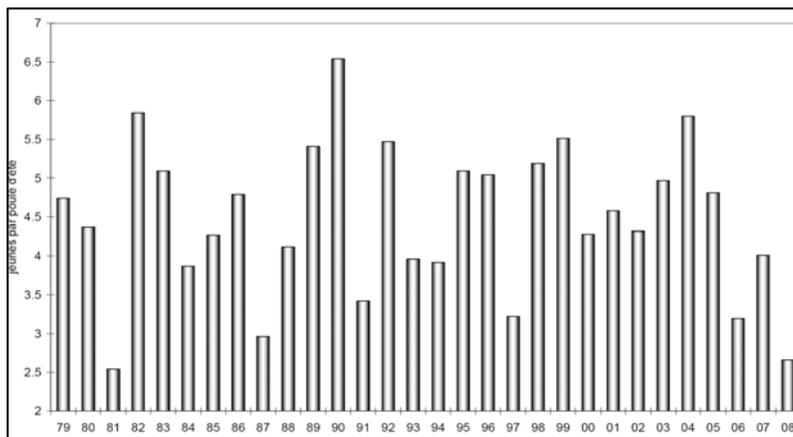


Fig 9 Succès de la reproduction de la perdrix grise dans le centre Nord depuis 1979. Figure tirée de la lettre Perdrix-Faisan info n°16-février 2009.

Le déclin des populations de perdrix grise, constaté dans le Bassin Parisien lors des dernières décennies, serait le résultat d'une succession d'années à faible taux de reproduction (Bro *et al.* 2009; Pépin *et al.* 2008). D'après ces auteurs, la période de reproduction est une période délicate et déterminante pour les densités de perdrix grise. Pendant la période de couvain, les poules couveuses sont particulièrement vulnérables à la prédation et aux pratiques agricoles. En effet, il a été montré que la densité de prédateurs et notamment de busards (busard cendré *Circus pygargus* et busard Saint Martin : *C. cyaneus*) pouvait affecter les effectifs de perdrix grise *via* une augmentation de la prédation des poules couveuses (Bro *et al.* 2001). De la même façon, les renards, pies et corneilles peuvent également avoir un effet sur le succès de la reproduction de l'espèce (Tapper *et al.* 1996). Une étude menée en Pologne démontre que l'augmentation des densités de prédateurs généralistes tel que le renard serait le facteur principal du déclin des populations de perdrix grise (Panek 2005). Cependant, que ce soit étayé par les statistiques (Bro *et al.* 2001; Bro *et al.* 1999) ou seulement par des observations empiriques (Bro *et al.* 2008), il semblerait que la densité de prédateurs soit conditionnée par la structure du paysage. En effet, les busards seraient plus abondants en milieux ouverts et le risque de prédation par les rapaces augmenterait lorsque le milieu deviendrait plus homogène (grande parcelle, faible diversité de cultures). Concernant le

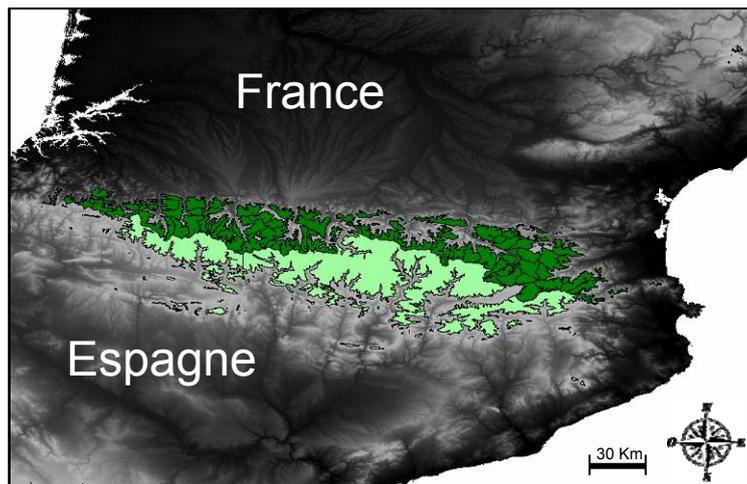
risque de prédation par des carnivores, celui-ci augmenterait également en présence de boisements (Bro *et al.* 2008). Ainsi, selon le type d'habitat (boisé, ouvert...), la perdrix grise doit faire face à différents types de prédateurs en période de couvain.

Même si la prédation semble être une cause récente du déclin de la perdrix grise en Europe, les pratiques agricoles et la structure de l'habitat seraient parmi les causes essentielles qui ont fragilisé les populations bien avant les années 1990 (Bro *et al.* 2001; Bro *et al.* 1999). En effet, l'intensification et la mécanisation des pratiques agricoles des 40 dernières années auraient entraîné un déclin des populations d'oiseaux inféodés aux cultures (Baldi & Farago 2007; Chamberlain *et al.* 2000; Kuijper *et al.* 2009; Potts & Aebischer 1995; Uimaniemi *et al.* 1999). Cette intensification des pratiques agricoles s'est traduite par l'utilisation intensive des produits phytosanitaires (insecticides, herbicides et fongicides) mais également des machines et matériels agricoles, des transformations qui ont impacté les populations de perdrix grise (Bro *et al.* 2009; Kuijper *et al.* 2009; Potts 1970). Les responsables de la surveillance épidémiologique des oiseaux et des mammifères sauvages terrestres (réseau SAGIR ONCFS/FNC/FDC) considèrent l'ingestion de pesticides classés 'toxiques' comme responsable de certains cas de mortalité de perdrix grise attribués à des neurotoxiques semblables aux matières actives présentes par exemple dans les molluscicides (Bro *et al.* 2009). Que ce soit par l'utilisation extensive de ces produits phytosanitaires ou du machinisme agricole, Mayot *et al.* (2004) observent une disparition des sites de nidification, une raréfaction de la nourriture invertébrée nécessaire à la bonne croissance des poussins et une destruction des adultes et des pontes lors de la nidification.

D'autres facteurs pouvant influencer négativement les populations de perdrix grise sont cités dans la littérature. Parmi ceux-ci, nous pouvons distinguer les conditions météorologiques chaotiques, comme par exemple les orages violents de printemps, qui pourraient expliquer les mauvaises années de reproduction. Ces orages pourraient en effet entraîner l'immersion du nid ou encore la noyade des jeunes (Bro *et al.* 2009; Panek 2005). La perdrix grise étant l'un des petits gibiers le plus prisé en plaine, il convient d'aborder la question relative aux activités cynégétiques. En effet, il a été montré en Angleterre que les cas de mortalité dus à la chasse pouvaient être deux fois supérieurs à ceux causés par la prédation (Watson *et al.* 2007). Pour autant la chasse ne doit pas être prise comme le bouc émissaire du déclin de la perdrix grise en Europe car des études réalisées en France et en Pologne démontrent que les activités cynégétiques restent un facteur secondaire après la prédation. Par exemple, en Beauce les prélèvements cynégétiques ne représentent que 5% des effectifs d'automne alors que la mortalité naturelle, estimée sur un an, est d'environ 61% (50 à 73% selon le département) (Bro *et al.* 2006).

La perdrix de montagne (*P.p. hispaniensis*) :

**E**n France, on retrouve la perdrix grise dans le Massif Central et les Pyrénées. Dans le Massif Central, les populations de perdrix grise du Mont Lozère sont relictuelles et sont rattachées à la sous espèce de plaine, *Perdix perdix armoricana* (Martin *et al.* 2003). Les autres populations présentes dans le Massif Central ont toutes été reconstituées à partir d'oiseaux d'élevage. Ainsi, l'écotype de perdrix grise de montagne est seulement représenté par la sous-espèce *P.p. hispaniensis* qui ne se retrouve aujourd'hui qu'au Sud de l'Europe dans les Pyrénées et dans les Monts Cantabriques. Son aire de répartition couvre environ 2.85 millions d'hectares (Lescourret 1986). Pour les Pyrénées Françaises, une enquête a montré que l'espèce était présente sur une superficie de 3 260 km<sup>2</sup>, et que l'aire potentielle de répartition couvrirait 4 916 km<sup>2</sup> (Lescourret 1988). Du côté français, cette aire qui s'étend depuis le Pic d'Anie (Pyrénées-Atlantiques) jusqu'au Pic du Canigou (Pyrénées-Orientales) a été modélisée par l'Observatoire des Galliformes de Montagne selon des tranches altitudinales qui circonscrivent au mieux la quasi-totalité des habitats de l'espèce (figure 10).



**Fig.10** Aire de répartition potentielle de la perdrix grise dans les Pyrénées.

- Isocline située à 1400 mètres d'altitude.
- Unités naturelles, propices à la perdrix grise, déterminées par l'Observatoire des Galliformes de Montagne

*P.p. hispaniensis* se retrouve donc en position d'isolat géographique. La récente disparition dans les Alpes (années 1970) et la forte régression dans le Massif Central témoignent de la vulnérabilité des isolats montagnards de perdrix grise (O.N.C. 1988). Ainsi, *P.p. hispaniensis* est inscrite en annexe I de la directive Européenne concernant la sauvegarde des oiseaux sauvages.

Dans les Pyrénées, la perdrix grise est un oiseau caractéristique des milieux ouverts, principalement situés en exposition sud (Soulane). Elle n'est pas adaptée à survivre dans des lieux où règnent des conditions hivernales trop rudes, en particulier un enneigement prolongé, à l'inverse de certains Tétrionidés comme le lagopède alpin ou le grand tétras qui ont développé un certain nombre d'adaptations au froid. La tranche altitudinale fréquentée varie en fonction de la saison à savoir des altitudes supérieures en été par rapport à l'hiver pour des raisons trophiques et climatiques (Lescourret 1988). Elle diffère

entre les Pyrénées centro-occidentales (1 300 - 2 200 m) et les Pyrénées-Orientales (1 900 – 2 500 m) en raison du climat plus doux sur ce dernier massif (Lescourret 1988). Sur l'ensemble de son aire de répartition, *P. p. hispaniensis* fréquente préférentiellement, toutes saisons confondues, les landes et pelouses des étages montagnards et subalpins, avec une prédilection pour les landes constituées principalement de genêts purgatifs (*Genista purgans*) ou de raisin d'ours (*Arctostaphylos uva-ursi*) (Lescourret 1988). Le choix est d'autant plus sélectif en période de reproduction où le couvert végétal est particulièrement recherché par les oiseaux avec une préférence pour les milieux plus fermés qui fournissent un camouflage aux nids et aux nichées non volantes (Novoa 2002).

En dépit d'une régression en marge de son aire de répartition (Novoa 1998), *P.p. hispaniensis* ne semble pas être en danger et présente des effectifs très fluctuants mais relativement stables. Cependant, comme pour la perdrix de plaine, les effectifs semblent être tributaires d'un certain nombre de facteurs limitants qui rendent d'autant plus vulnérable l'espèce. Une enquête a montré que 76% des personnes interrogées considéraient l'espèce en diminution et évoquaient comme facteurs principaux : la chasse, la diminution des activités pastorales et la sur-fréquentation des milieux (Lescourret 1988). En effet, une étude menée sur un lot de 47 oiseaux suivis par radiopistage a montré que près de 32% des cas de mortalité étaient dus à la prédation par rapaces [aigle royal (*Aquila chrysaetos*) et autour des palombes (*Accipiter gentilis*)], environ 29% étaient dus à la prédation par carnivores [principalement renards (*Vulpes vulpes*)] et près de 13% dus à la chasse. Diverses autres causes de mortalité ont également été énoncées, parmi celles-ci : les collisions contre des infrastructures humaines (téléskis, clôtures) ou encore les intempéries et maladies (Novoa 1998). Cette étude est en accord avec les résultats obtenus par Besnard *et al.* (Besnard *et al.* 2010).

Compte tenu de la courte durée de la période de chasse, les taux de mortalité dus à cette activité restent non négligeables. Concernant la déprise agropastorale et la surfréquentation des milieux montagnards, ceux-ci entraîneraient respectivement une fermeture des milieux, non propice à la perdrix grise et un dérangement potentiel des poules nicheuses contraintes à quitter le nid. De plus, compte tenu des conditions hivernales en montagne, un autre paramètre à prendre en compte est la survie hivernale des oiseaux, en particulier juvéniles (Novoa 1998). L'ajout de cette contrainte semble être compensé, par un accroissement du taux de reproduction. Ainsi, dans les Pyrénées, il n'est pas rare d'observer des taux de reproduction de plus de 8 jeunes par poule (Novoa 1998), alors qu'en plaine le succès reproducteur n'est que de 2.7 jeunes par poule (Reitz 2009).

**E**n parallèle aux études 'directes' menées sur le terrain, l'avancée de la biologie moléculaire est venue compléter avantageusement les études visant à conserver et à protéger la biodiversité. Le concours de ces 2 pôles de compétence a fait naître une discipline appelée la 'génétique de la conservation'. Définie par Frankham *et al*, en 2002, la génétique de la conservation propose d'appliquer les techniques moléculaires à la préservation des espèces considérées alors comme des entités dynamiques capables d'adaptation aux changements de leur environnement. Ainsi, en parallèle aux études réalisées sur le terrain, la génétique de la conservation propose d'identifier les espèces et populations à risque ainsi que leur structuration génétique associée afin d'aider à la définition des unités et des plans de gestion. Dans la mesure où le paysage est devenu une composante importante dans l'étude des populations et étant donné la fragmentation des milieux (notamment en montagne), cette thèse propose d'intégrer les méthodes de génétique du paysage et de génétique de la conservation afin d'étudier les populations de lagopède alpin dans les Pyrénées (chapitre 1) mais aussi les populations de perdrix grise dans les Pyrénées et le Bassin Parisien (chapitre 2). Pour cela nous avons utilisé des logiciels de génétique de première, deuxième et troisième génération couplés à des méthodes de SIG afin d'étudier les populations de lagopèdes alpins et de perdrix grises en France et d'éventuellement aider à la décision des plans de conservation.

La génétique de la conservation applique les techniques de biologie moléculaire à la préservation des espèces face aux changements de leur environnement.



# CHAPITRE I

## ETUDE DE LA STRUCTURATION GENETIQUE DES POPULATIONS DE LAGOPEDE ALPIN (*LAGOPUS MUTA PYRENAICA*) DANS LES PYRENEES.



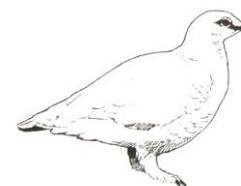
### CHAPITRE 1 :

Ce chapitre se focalise sur l'étude de la structuration génétique du lagopède alpin dans les Pyrénées. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue 'Animal Conservation' (annexe I3). Ce travail ayant été publié en janvier 2009, le présent chapitre est l'occasion d'une mise à jour des analyses (individus et marqueurs microsatellites supplémentaires).

## I/ INTRODUCTION

Il est difficile d'appréhender l'histoire évolutive des espèces sans prendre en considération l'histoire climatique et géologique de la planète Terre (Rowe *et al.* 2004). L'ère quaternaire est marquée par une alternance de période de glaciation et de réchauffement qui s'est traduite par des phases successives d'expansion et de contraction de la surface des glaciers. Ainsi, à la fin du pléistocène, le retrait des glaces a façonné le paysage en laissant place à un paysage glaciaire constitué de vallées en U, cirques et autres curiosités géologiques actuelles.

Face à cette modification drastique de leur habitat et face à des températures croissantes, certaines espèces ont été contraintes à retrouver des habitats répondant à leurs exigences écologiques (Bech *et al.* 2009; McCarty 2001; Parmesan & Yohe 2003; Taberlet *et al.* 1998). Parmi les espèces contraintes à modifier leurs distributions, nous pouvons citer le lagopède alpin (*Lagopus muta*). En effet, le retrait des glaces en Europe aurait poussé les populations à emprunter des voies de colonisation en direction des refuges d'altitude situés au Sud dans les Pyrénées et au centre de l'Europe dans les Alpes (Caizergues *et al.* 2003a; Taberlet *et al.* 1998). Sur le continent Nord Américain et dans les îles Aléoutiennes il semblerait également que les populations actuelles de lagopède alpin aient divergé à partir de multiples refuges polaires déjà présents lors de la glaciation du Wisconsin (Holder *et al.* 2000; Holder *et al.* 1999). Dans une optique de conservation et face à l'histoire évolutive complexe de ces populations devenues endémiques et isolées, des études génétiques ont été menées sur les populations des différentes îles aléoutiennes, du continent Nord Américain, de Norvège et des Alpes (Caizergues *et al.* 2003a; Holder *et al.* 2000; Holder *et al.* 2004; Holder *et al.* 1999; Pruett *et al.* 2010). Parmi celles-ci, une seule s'est intéressée aux populations de lagopède alpin situées dans les Pyrénées (*Lagopus muta pyrenaica*). Basée sur un échantillonnage de 45 individus issus d'une même population (Aston) et 6 marqueurs microsatellites, l'étude de Caizergues *et al.* en 2003 a montré que cette population de lagopède alpin était appauvrie génétiquement par rapport à ses homologues alpines et norvégiennes. Dans cette étude, les auteurs ont également extrapolé une absence de structuration génétique marquée sur l'ensemble de la chaîne des Pyrénées.



Pour tenter de comprendre mieux cette tendance et d'aider ainsi à la mise en oeuvre des plans de conservation de cette espèce endémique des Pyrénées, notre étude propose dans un premier temps d'utiliser des marqueurs microsatellites et mitochondriaux afin d'étudier la structuration génétique et les flux géniques au sein des populations de lagopède alpin des Pyrénées. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés aux facteurs potentiellement impliqués dans cette structuration génétique.

Dans cette partie, nous n'avons pas développé les détails de l'analyse réalisée sur les marqueurs mitochondriaux. Ces détails se trouvent dans l'article publié dans la revue 'Animal Conservation' (annexe I3).

### II/ Zone d'étude et échantillonnage

La zone d'étude s'étend sur la moitié orientale de la chaîne des Pyrénées. A l'intérieur de cet ensemble, 7 sites d'échantillonnage ont été retenus : massif du Canigou (66), massif Carança-Puigmal (66), massif Campcardos (66-catalogne), massif d'Aston (09), massif d'Ustou (09), massif de Melles (31) et massif de Luchon (31) (figure1). Les échantillons, issus des 'banques d'échantillons' de l'ONCFS (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage), ont été récoltés lors des captures d'oiseaux vivants (plumes) ou auprès des chasseurs (ailes (voir photo ci-contre), tissus musculaires et foies). Les analyses génétiques ont porté sur 170 individus. L'année de prélèvement de chaque individu se trouve dans le tablea de l'annexe I1



Aile de lagopède alpin

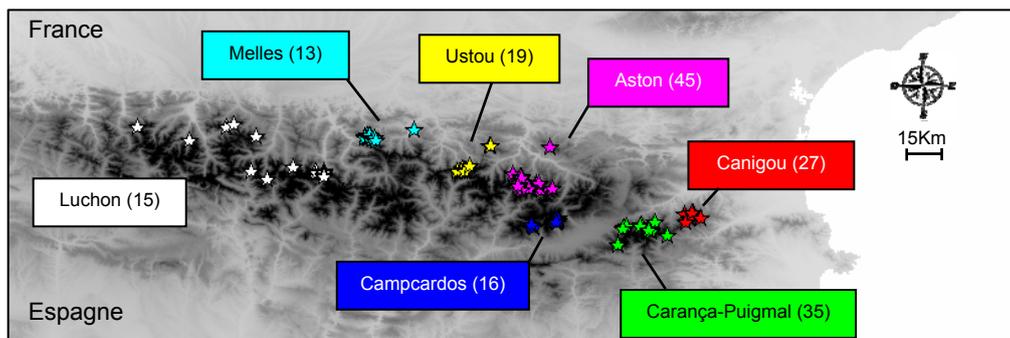


fig. 1 carte de répartition des sites d'échantillonnage avec leurs effectifs respectifs (entre parenthèses). Chaque étoile représente un ou plusieurs individu(s) juxtaposés.

Compte tenu de la rareté des individus et de leurs conditions d'accès difficile, des prélèvements non-invasifs (fèces) ont été réalisés. Les techniques non invasives visent à accéder à de potentielles sources d'ADN sans même toucher ou voir l'animal. Ces méthodes ont déjà été appliquées aux populations de loup dans les Alpes (*Canis lupus*), afin d'en estimer l'effectif (Valière 2002), ou encore à celle de l'ours brun des Pyrénées (*Ursus arctos*) dans le but de déterminer l'effectif et le sex-ratio de cette espèce (Piggott & Taylor 2003). Cependant, l'ADN extrait de fèces peut induire l'amplification de faux allèles ou d'allèles nuls (Taberlet & Waits 1998). Afin de remédier à cet inconvénient, il est nécessaire de réaliser un grand nombre de répliquats : approche dite « multi-tubes » (Goosens *et al.* 2000; Taberlet & Waits 1998). Cette approche étant particulièrement onéreuse, les échantillons de fèces n'ont pas été intégrés dans cette étude mais ont servi notamment à l'élaboration d'une étude pilote située à la base de ce travail (Bech 2005).

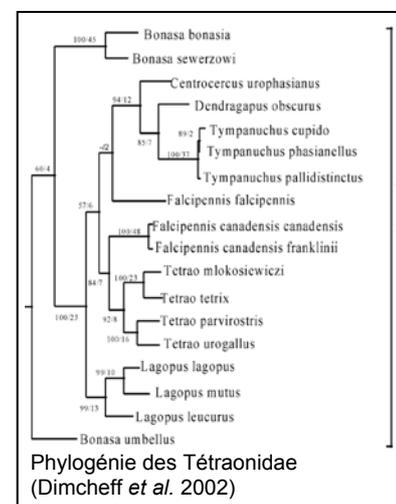
Les échantillons utilisés dans cette étude ont été extraits avec une extraction 'phénol-chloroforme' classique pour les ailes et les foies, et avec le QIAmp® DNA, QIAGEN Mini Kit pour les plumes afin d'obtenir un meilleur rendement.

L'extraction est réalisée sur les extrémités (1cm) du rachis (Wettstein & Schäffer 2000) selon le protocole du fabricant avec quelques modifications : 10µL de protéinase K sont rajoutés après l'étape 2 et l'élution est réalisée avec 2 fois 100µL d'eau ultra stérile filtrée.

### III/ Marqueurs microsatellites

Nous avons analysé les 170 individus à l'aide de différents marqueurs microsatellites. La détermination de ces différents marqueurs a été réalisée par 'cross-species amplification' ou 'amplification croisée' (Bech 2005; Bech *et al.* 2009). Cette approche consiste en l'utilisation de séquences microsatellites déjà définies chez des espèces de Tétraoïdés phylogénétiquement proches du lagopède alpin tel que le grand tétras (*Tetrao urogallus*), le tétras-lyre (*Tetrao tetrix*) et le lagopède d'Écosse (*Lagopus lagopus scotica*) (annexes I2 et I3 + phylogénie ci-contre). Nous avons choisi ces marqueurs en fonction du polymorphisme et de la taille du fragment amplifié chez l'espèce d'origine. Nous avons favorisé les marqueurs amplifiant des répétitions dites tétra-nucléotidiques ce qui tend à minimiser l'apparition de bandes parasites (ou 'stutters') lors du passage au séquenceur. Sur 48 marqueurs microsatellites recensés, 19 ont été testés et seulement 11 (LLSD7, LLST5, LLST7, TTT2, BG6, BG19, BG15, LLSD4, LLST1, BG12, LLSD10) ont été retenus pour les analyses génétiques. Travaillant également sur la perdrix grise, nous avons aussi testé des marqueurs microsatellites conservés et amplifiables à la fois chez la perdrix grise (*Perdix perdix hispaniensis*), chez le dindon (*Meleagris gallopavo*) et chez le poulet (*Gallus gallus* : espèce basale des galliformes). Sur 16 marqueurs testés, 3 marqueurs supplémentaires ont été retenus pour les analyses génétiques (Aru1G4, MNT45 et Aru1F25) (voir annexe I1). Une grosse épuration est souvent effectuée lors du développement de marqueurs microsatellites en 'amplification croisée' car les séquences sur lesquelles s'hybrident les amorces microsatellites peuvent subir des mutations empêchant ainsi l'accroche des amorces et donc l'amplification du fragment d'intérêt. De plus, chez les oiseaux, il a été démontré que, le nombre d'allèles diminuait avec la distance phylogénétique de l'espèce d'origine pour laquelle les marqueurs ont été développés (Ellegren *et al.* 1995; Primmer *et al.* 1996).

Les marqueurs microsatellites ont été développés par 'amplification croisée'.



### A/ Amplification des marqueurs microsatellites

L'amplification des marqueurs microsatellites est réalisée par Polymerase Chain Reaction (PCR). Les conditions d'amplification des marqueurs microsatellites se trouvent dans les tableaux 1 et 2. La lecture des produits amplifiés se fait par l'injection d'un mélange réactionnel dans les capillaires du séquenceur CEQ™ 8000 (Beckman coulter). Le mélange réactionnel est composé de 38µl de SLS (tampon de charge), de 2µl de produits amplifiés et de 0,1875µl d'un marqueur

de taille rouge, 400 paires de bases (CEQ™ DNA Size Standart Kit 400 Beckman coulter).

Produits	Concentration
ADN (tissus ou plumes)	(0,04 %)
Go Taq™ reaction buffer (Promega)	0,5 %
dNTP (Promega)	0,1mM
Go Taq™ DNA Polymerase (Promega)	0,625 U
Primer F	1 μM
R	1 μM
BSA	0,1M
H2O ultra stérile filtrée	/
Volume final	25 μL

tab. 1 Proportion des produits utilisés pour l'amplification des marqueurs microsatellites.

Température (°C)	temps
95	5
95	1
60	30
72	1
72	7
4	10
51	

tab. 2 Cycles d'amplification.

## B/ Validation des marqueurs microsatellites

Avant toutes utilisations et analyses, il est indispensable de vérifier la 'neutralité' des marqueurs utilisés à travers trois analyses : (i) la détection d'éventuels allèles nuls, (ii) l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg et (iii) les déséquilibres de liaison entre deux loci.

La significativité des analyses suivantes a été ajustée avec la correction de Bonferroni (<http://home.clara.net/sisa/bonfer.htm>) approprié aux tests multiples.

La présence d'allèles nuls ou d'éventuelles bandes parasites est testée sur tous les marqueurs microsatellites dans toutes les populations avec le logiciel MICRO-CHECKER (Oosterhout *et al.* 2004). Sur 98 tests, seuls 20 ont révélé, de manière significative, des allèles nuls ( $P=0.0005$ ). Un marqueur, le BG12, présente des allèles nuls dans chaque population, celui-ci a donc été retiré des analyses. Pour les autres tests (présentant significativement des allèles nuls), ceux-ci sont répartis de façon aléatoire dans les populations et ne concernent que très rarement un même microsatellite. Par conséquent, les allèles nuls semblent ne pas être intrinsèques ni aux marqueurs microsatellites ni aux populations. A l'issue de ce premier filtre, nous avons donc conservé 13 marqueurs. Sur ces 13 marqueurs microsatellites, les tests globaux (basés sur la chaîne de Markov, 1000 permutations) implémentés dans le logiciel FSTAT, version 3.4 (Goudet 2001) n'ont pas détecté ni d'écart par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (seuil de significativité :  $P=0.00055$ ) ni de déséquilibre de liaison (seuil de significativité:  $P=0.000092$ ) au sein des différentes populations de notre échantillonnage. En effet, les valeurs de Fis ne sont pas significativement différentes de 0 (seuil de significativité :  $P=0.00055$ ) (tableau 3).

13 Marqueurs microsatellites ont servi aux analyses génétiques sur le lagopède alpin des Pyrénées.

Dans cette étude, nous avons utilisé 13 marqueurs microsatellites afin de caractériser la **distribution de la variabilité génétique** et l'**organisation spatiale des individus/ populations de lagopède alpin dans les Pyrénées**.

#### IV/ Distribution de la variabilité génétique

Nous avons évalué la diversité génétique de chaque population à partir de l'étude du polymorphisme des 13 marqueurs microsatellites. Nous avons utilisé principalement trois indices de diversité génétique : la richesse allélique (An), l'hétérozygotie attendue (He) et le Fis ajusté selon la méthode de Weir et Cockerham (1984); ces trois indices ont été calculés avec le logiciel FSTAT version 2.9.3.2 fev 2002 (Goudet 2001) (tableau 3). L'hétérozygotie observée (Ho) a été calculée avec le logiciel GENEPOP (Raymond & Rousset 1995).

**Définition : Fis** : Mesure de l'écart à la structure de Hardy et Weinberg à l'intérieur d'une population (Henry & Gouyon 2003).

**tab. 3** Caractéristiques des marqueurs microsatellites utilisés. Hétérozygotie attendue (He), hétérozygotie observée (Ho), Richesse allélique (An) et Fis pour chaque microsatellite et chaque population. Les cadres en rouges représentent les valeurs extrêmes.

		Canigou	Carança-Puigmal	Campcardos	Aston	Ustou	Melles	Luchon	All
LLSD7	He	0.635	0.672	0.250	0.653	0.652	0.494	0.607	0.566
	Ho	0.741	0.600	0.267	0.689	0.722	0.385	0.867	0.610
	An	3.823	4.147	3.402	5.561	5.364	2.998	3.733	5.385
	Fis	-0.167	0.107	-0.067	-0.055	-0.108	0.221	-0.427	-0.071
LLST5	He	0.885	0.876	0.879	0.914	0.817	0.932	0.920	0.889
	Ho	0.875	0.688	0.933	0.953	0.722	0.917	0.846	0.848
	An	9.133	8.911	10.404	11.102	8.210	10.736	11.038	11.637
	Fis	0.011	0.215	-0.062	-0.043	0.116	0.016	0.080	0.048
LLST7	He	0.776	0.784	0.588	0.759	0.800	0.765	0.776	0.750
	Ho	0.615	0.759	0.400	0.692	0.737	0.583	0.538	0.618
	An	6.028	6.797	4.855	6.319	5.543	5.750	6.637	6.651
	Fis	0.207	0.033	0.320	0.088	0.079	0.238	0.306	0.182
TTT2	He	0.591	0.614	0.631	0.676	0.608	0.636	0.648	0.629
	Ho	0.481	0.412	0.750	0.500	0.789	0.538	0.667	0.591
	An	3.294	3.460	2.999	3.438	2.991	3.913	3.000	3.313
	Fis	0.186	0.329	-0.188	0.260	-0.298	0.083	-0.029	0.049
BG6	He	0.772	0.849	0.831	0.841	0.795	0.901	0.736	0.818
	Ho	0.704	0.758	1.000	0.822	0.737	0.846	0.500	0.767
	An	5.992	7.102	6.652	6.578	6.064	8.771	6.660	7.060
	Fis	0.089	0.108	-0.203	0.023	0.074	0.060	0.321	0.067
BG19	He	0.704	0.712	0.727	0.614	0.658	0.619	0.621	0.665
	Ho	0.556	0.743	0.438	0.644	0.474	0.462	0.500	0.545
	An	3.931	3.953	4.685	4.077	3.931	3.846	3.746	4.363
	Fis	0.211	-0.044	0.398	-0.049	0.280	0.254	0.195	0.178
BG15	He	0.000	0.379	0.769	0.757	0.760	0.744	0.731	0.591
	Ho	0.000	0.364	0.533	0.773	0.833	0.846	0.308	0.522
	An	1.000	3.037	4.871	4.882	4.609	4.963	4.000	4.664
	Fis	NA	0.040	0.307	-0.020	-0.097	-0.138	0.579	0.112
LLSD4	He	0.722	0.775	0.802	0.852	0.887	0.804	0.764	0.801
	Ho	0.680	0.706	0.813	0.822	0.947	0.692	0.545	0.744
	An	5.290	5.827	6.277	7.987	8.916	4.981	6.000	7.233
	Fis	0.058	0.089	-0.013	0.034	-0.068	0.139	0.286	0.075
LLST1	He	0.260	0.382	0.435	0.458	0.330	0.645	0.500	0.430
	Ho	0.240	0.250	0.375	0.432	0.263	0.545	0.333	0.348
	An	3.404	3.544	4.482	4.585	3.384	6.000	4.830	4.412
	Fis	0.077	0.308	0.139	0.057	0.204	0.155	0.333	0.182
LLSD10	He	0.582	0.534	0.590	0.564	0.605	0.470	0.527	0.553
	Ho	0.560	0.281	0.600	0.405	0.316	0.500	0.455	0.445
	An	2.911	2.573	2.986	3.494	3.909	3.833	4.000	3.420
	Fis	0.037	0.474	-0.016	0.283	-0.130	-0.065	0.138	0.103
Aru1G4	He	0.672	0.761	0.735	0.702	0.680	0.699	0.736	0.712
	Ho	0.577	0.943	0.875	0.667	0.632	0.789	0.714	0.740
	An	3.842	5.084	4.902	4.737	3.579	4.692	6.142	4.815
	Fis	0.141	-0.240	-0.190	0.050	0.071	-0.101	0.030	-0.034
MNT45	He	0.395	0.459	0.371	0.378	0.272	0.327	0.198	0.343
	Ho	0.222	0.314	0.188	0.800	0.316	0.273	0.214	0.332
	An	2.000	2.314	2.687	2.243	1.997	3.000	1.994	2.458
	Fis	0.437	0.315	0.494	-0.176	-0.161	0.167	-0.083	0.142
Aru1F25	He	0.589	0.736	0.798	0.534	0.690	0.599	0.596	0.649
	Ho	0.560	0.531	0.625	0.462	0.500	0.538	0.462	0.525
	An	4.042	4.316	4.970	4.635	3.993	5.520	4.691	4.782
	Fis	0.050	0.279	0.217	0.135	0.275	0.102	0.226	0.183
All	He	0.583	0.656	0.647	0.669	0.658	0.664	0.643	0.646
	Ho	0.524	0.565	0.600	0.666	0.614	0.607	0.535	0.587
	An	4.207	4.697	4.936	5.357	4.807	5.308	5.113	5.399
	Fis	0.102	0.137	0.073	0.046	0.023	0.080	0.169	0.090

Les indices de diversité ont révélé un fort degré de polymorphisme avec une richesse allélique variant de 1 à 11,102 et une hétérozygotie attendue variant de 0 à 0.932. Concernant la distribution spatiale de cette variabilité génétique, bien qu'il n'y ait pas de différence significative dans l'hétérozygotie attendue entre les populations (Friedman test: P=0.421), nous détectons des différences significatives dans la distribution des richesses alléliques (Friedman test: P=0.003). Afin de détecter les différences significatives de richesses alléliques, nous avons également réalisé un test de Wilcoxon par paire de populations

Les marqueurs microsatellites révèlent au sein de notre métapopulation un fort degré de polymorphisme.

(tableau 4). A une exception près (Canigou/Ustou :  $P=0.583$ ), les résultats de ces tests suggèrent que la population du Canigou présente une richesse allélique plus faible que celles observées sur les autres populations. Notons également que le marquer BG15 est fixé sur cette population.

	canigou	Carança-Puigmal	campcardos	Aston	ustou	Melles	luchon
canigou	-	*	*	*	NS	*	*
Carança-Puigmal	0.019	-	NS	NS	NS	NS	NS
campcardos	0.039	0.402	-	NS	NS	NS	NS
Aston	0.001	0.087	0.196	-	*	NS	NS
ustou	0.583	0.861	0.463	0.033	-	NS	NS
Melles	0.016	0.087	0.152	0.753	0.152	-	NS
luchon	0.013	0.249	0.422	0.422	0.422	0.552	-

tab. 4 Significativité du test de Wilcoxon sur les richesses alléliques (estimées par paire de population) (\* : significatif,  $P \leq 0.05$ ).

Le locus BG15, monomorphe sur la population du Canigou, aurait pu être un marqueur diagnostic de cette population, mais le génotype en question se retrouve également dans les autres populations et n'est donc pas propre au massif du canigou.

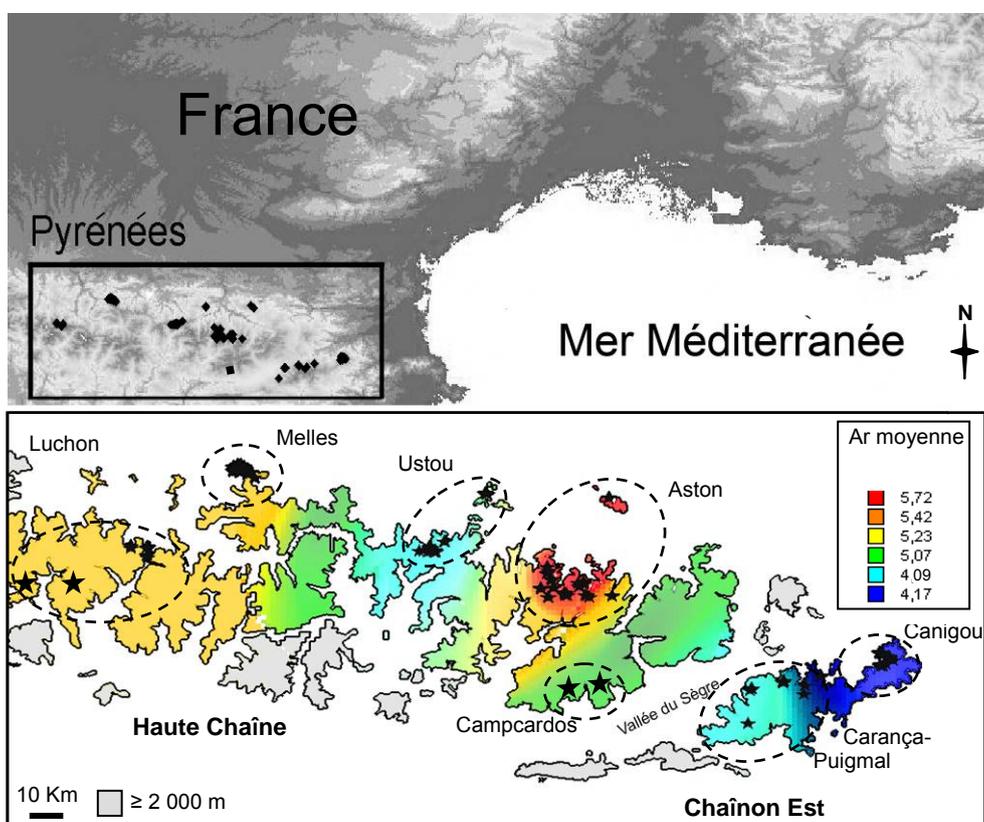


fig. 2 Analyse thématique de la richesse allélique moyenne (Ar). Chaque étoile représente un ou plusieurs individu(s) juxtaposés.

La faible diversité génétique observée sur le Canigou semble se retrouver à un moindre niveau sur le massif Carança-Puigmal. Ces deux massifs se retrouvent sur un chaînon isolé de la haute chaîne des Pyrénées (chaînon Est) et se situe en marge Est et Sud de l'aire de répartition du lagopède alpin. Les populations situées en marge d'aire de répartition sont, la plupart du temps, d'autant plus soumises aux fluctuations environnementales ce qui augmentent le coup de la dispersion et diminuent la qualité de l'habitat (Dytham 2008). Ainsi, il se pourrait que cette perte de diversité génétique soit le résultat d'un 'effet de bord'. Faute

Le chaînon catalan présente des faibles valeurs de diversité génétique.

d'échantillonnage, cet effet bord n'a pas pu être testé du côté Ouest de l'aire de distribution.

Nous avons testé également les effets potentiels de l'altitude et des années de prélèvement sur la diversité génétique. La diversité génétique a été calculée à l'échelle individuelle à l'aide de l'indice d'hétérozygotie (nombre de marqueurs hétérozygotes / nombre de marqueurs amplifiés). A l'aide des coordonnées géographiques individuelles (de chaque échantillon), les altitudes ont été estimées avec un Modèle Numérique de Terrain (SRTM 90m Digital Elevation ; file: srtm\_37\_03) rendu accessible par la NASA depuis sa 'Shuttle radar Topography Mission' et implémenté dans le logiciel MapInfo v.7.5. Nous avons utilisé le système de coordonnées : Universal Transverse Mercator (UTM, Zone 31 nord, WGS84). A l'issue des différents tests, il semble que la diversité génétique ne soit pas influencée ni par l'altitude ni par les années de prélèvement ( $p > 0.05$ ). En revanche, l'altitude semble liée aux années de prélèvement (figure 3 A) et ces années de prélèvement semblent également étroitement liées aux longitudes qui sont de plus en plus orientales au fur et à mesure de l'échantillonnage (figure 3 B). Ces corrélations suggèrent que l'altitude moyenne de l'aire de répartition du lagopède alpin se relève sur la partie orientale de la chaîne. L'une des explications à ce phénomène serait peut-être le climat local. Effectivement, le chaînon Est, situé à proximité de la mer Méditerranée, subit l'influence du climat méditerranéen caractérisé par des températures clémentes. Les lagopèdes alpins seraient alors obligés de monter en altitude afin de trouver des températures correspondant à leurs exigences écologiques. Au contraire, haute-chaîne est plus influencée par un climat de type continental moins clément au niveau température permettant au lagopède alpin de descendre en altitude. Une autre hypothèse concernerait la limite supérieure de la forêt qui se déplacerait plus en altitude à mesure que l'on se déplace à l'Est des Pyrénées.

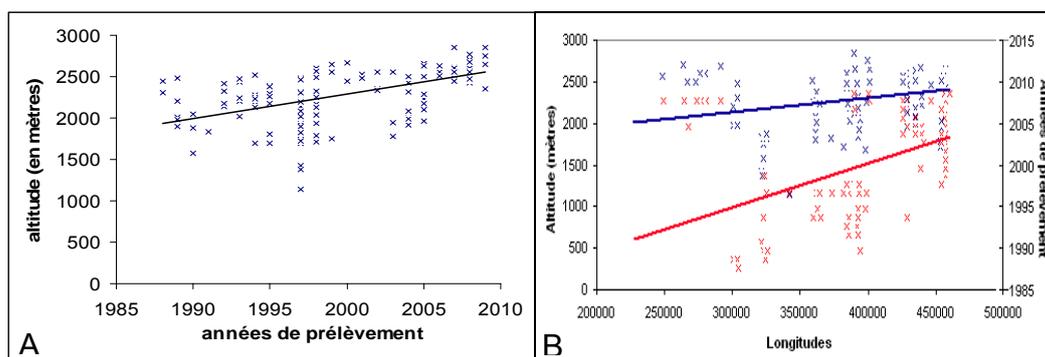


fig. 3 : A : Corrélation entre altitude et année de prélèvement des échantillons ( $r^2=0.3236$  ;  $p < 0.0001$ ). B : Corrélations entre l'altitude des prélèvements (en bleu,  $r^2=0.068$  ;  $p=0.0006$ ) et l'année de prélèvement (en rouge,  $r^2=0.1762$  ;  $p < 0.0001$ ) avec les longitudes des prélèvements.

Il aurait été intéressant d'observer l'évolution de la diversité génétique au cours d'un temps beaucoup plus long. Pour cela, nous avons collecté des échantillons (n=16) dans différents Muséums afin d'avoir accès à de spécimens anciens (antérieurs aux années 1900). Des prélèvements de plumes et de peaux ont été réalisés dans les Muséums de Toulouse, Perpignan et Banyuls (voir photo ci-contre). Cependant, malgré bon nombre de tests, aucune des techniques d'extraction testées (phénol/chloroforme, kelex, Kit Qiagen et Kit Ezna) n'a permis d'extraire de l'ADN amplifiable par PCR. L'échec d'amplification pourrait provenir d'une dégradation de l'ADN trop importante ou de la présence d'un trop grand nombre d'inhibiteurs PCR (liés aux méthodes de naturalisation, l'utilisation d'arsenic par exemple).



Il apparaît d'après ces premiers résultats que le chaînon Est soit marqué par une diversité génétique faible par rapport à la haute chaîne. Compte tenu de ces résultats, il serait maintenant intéressant d'étudier comment cette diversité génétique se structure dans l'espace et s'il y a des différences qualitative entre populations.

### **VI/ Structuration génétique**

Afin de détecter la présence d'une structuration génétique au sein de notre échantillonnage, nous avons calculé, dans un premier temps, la différenciation génétique entre chaque paire de populations. Cette différenciation génétique a été estimée avec les valeurs de Fst, calculés avec le logiciel FSTAT, selon la méthode de Weir et Cockerham (1984) (tableau 5).

	Canigou	Carança-Puigmal	Camcardos	Aston	Ustou	Melles	Luchon
Canigou	-	NS	*	*	*	*	*
Carança-Puigmal	0.0034	-	*	*	*	*	*
Camcardos	0.0823	0.0527	-	NS	*	*	*
Aston	0.0589	0.0421	0.0289	-	*	NS	*
Ustou	0.0733	0.0573	0.0391	0.0207	-	*	*
Melles	0.0755	0.0536	0.0503	0.0126	0.0233	-	NS
Luchon	0.0689	0.0587	0.0565	0.023	0.0158	0.0105	-

tab. 5 Valeurs de Fst (différenciation génétique) estimée entre chaque paire de population (diagonale inférieure). Significativité des Fst (diagonale supérieure), \* désignent les valeurs de Fst significatives (p=0.0024), NS : non significatif.

Avec un Fst moyen de  $0.043 \pm 0.022$ , les résultats révèlent la présence d'une structuration génétique au sein des Pyrénées. Ce résultat préliminaire est confirmé par un test de Mantel qui révèle un isolement par la distance reflétant des flux géniques de proximité (figure 4).

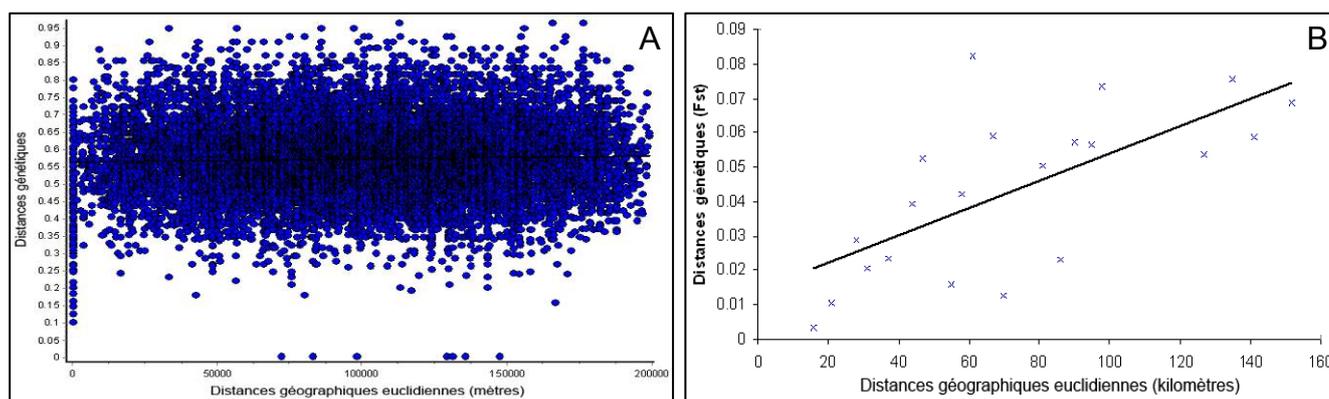


fig 4 : Test de Mantel, régression linéaire entre distances génétiques et distances géographiques euclidiennes.

A/ Corrélation testée avec le logiciel Alleles In Space à l'échelle individuelle ( $r^2= 0.00144$ ;  $P=0.0009$ ).

B/ Corrélation testée avec le logiciel Fstat à l'échelle populationnelle ( $r^2= 0.4605$ ;  $P=0.0007$ ).

La structuration en isolement par la distance est connue chez de nombreux galliformes de montagne (Caizergues *et al.* 2003a; Caizergues *et al.* 2003b; Piertney *et al.* 1998). Cette structuration spatiale dite de 'voisinage' est souvent expliquée par le comportement des oiseaux qui limitent leurs mouvements aux localités proches. Les suivis par radio-pistage du lagopède des Pyrénées semblent valider nos résultats. En effet, il a récemment été montré qu'il existe une fidélité des poules à la fois aux sites d'hivernage et aux sites de nidification (Novoa *et al.* 2005). Un autre comportement qui pourrait conduire à cette structuration spatiale est le caractère phylopatrique des mâles, trait connu chez la plupart des galliformes de montagne (Caizergues *et al.* 2003a; Caizergues *et al.* 2001b).

Nous avons également analysé l'organisation spatiale des individus à l'aide d'une Analyse Factorielle des Correspondances réalisée avec le logiciel GENETIX (Belkhir *et al.* 1996) et basée sur la distribution des génotypes (figure 5).

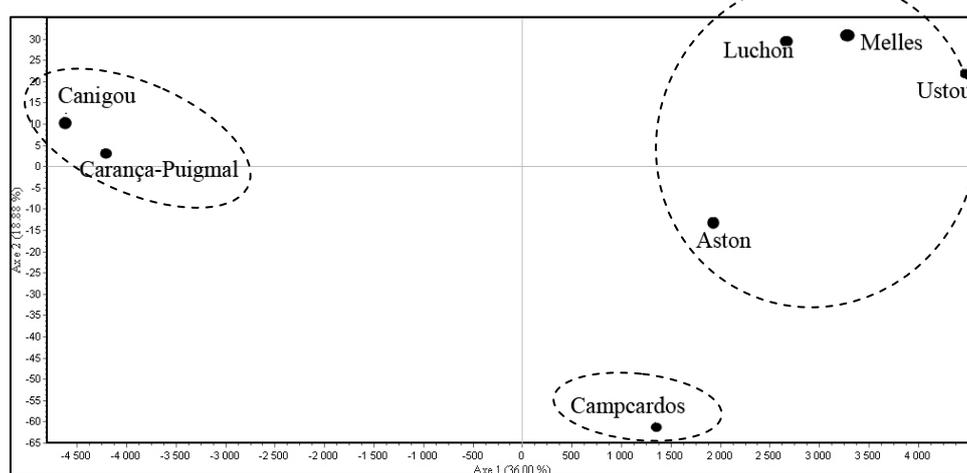
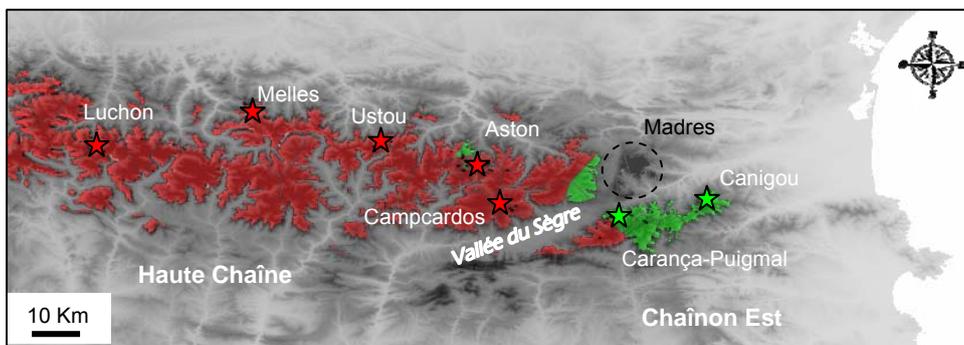
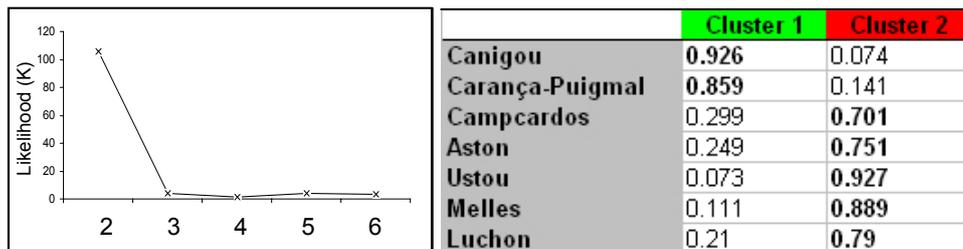


fig. 5 Analyse Factorielle des Correspondances basée sur la distribution des génotypes de tous les échantillons. Les ellipses ont été rajoutés a *posteriori* à l'aide d'une classification hierarchique ascendante.

Basée sur la distribution des génotypes de chaque individu, l'axe 1 de cette AFC (36% de l'inertie totale) semble dissocier les individus appartenant aux populations Canigou et Carança-Puigmal des autres individus appartenant aux autres populations (Campcardos, Aston Ustou, Melles et Luchon). En d'autres

termes, cette AFC distingue les populations situées sur le chaînon Est et les populations situées sur la haute chaîne. Cette nette distinction entre les chaînons est corroborée par les analyses bayésiennes. En effet, le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), révéla la présence de K=2 clusters, le premier situé sur le chaînon Est et le deuxième situé sur la haute chaîne (tableau 6).

Le logiciel STRUCTURE ne prenant pas en compte les informations géographiques (longitude et latitude) des individus, nous avons également utilisé le logiciel TESS qui réalise des analyses spatiales basées sur un modèle bayésien (Chen *et al.* 2007). Là aussi, les résultats convergent vers la présence de 2 clusters d'individus géographiquement distincts l'un de l'autre (figure 6).



La seule hypothèse qui pourrait justifier cette structuration génétique 'dichotomique' semble être la géomorphologie des Pyrénées dont un des traits marquants est la vallée du Sègre. Chez les oiseaux, la géomorphologie peut constituer une barrière aux flux géniques en fonction des capacités de dispersion propres à chaque espèce (Caizergues *et al.* 2001b; Segelbacher & Storch 2002). Ainsi, la vallée du Sègre, d'une largeur de 15/20 km et à une altitude de 1100 m, semble constituer une barrière géomorphologique à la dispersion des lagopèdes alpins. En effet, l'altitude serait trop faible pour réunir les exigences écologiques de l'espèce et sa largeur serait trop importante pour être franchie d'une seule traite. Effectivement, les capacités de dispersion du lagopède sont relativement limitées. Même si le lagopède alpin est capable de franchir de courtes zones d'habitats non favorables, la dispersion maximale observée dépend d'une certaine continuité de l'habitat. Il a été montré, par exemple, que les distances de dispersion du *Lagopus leucurus* ne dépassaient pas 29 kilomètres pour les femelles (Giesen & Braun 1992) et 8 kilomètres pour les mâles (Giesen & Braun 1993). Chez le *Lagopus muta pyrenaica*, ces déplacements peuvent aller jusqu'à 23 kilomètres (maximum observé) entre zone de reproduction et zone

Le logiciel STRUCTURE nous permet d'assigner les individus de notre échantillonnage à un nombre de clusters (K) déterminé par l'utilisateur. La probabilité maximale pour un nombre de cluster K est obtenue en comparant les probabilités de plusieurs valeurs de K, allant, dans notre cas, de 1 à 7.

tab. 6 A: Mode de distribution des probabilités de K. B: valeurs de Q ancestry de chaque massif dans les K=2 clusters définis par le logiciel STRUCTURE (analyses réalisées avec le modèle 'admixture' (100000 itérations et 20 répétitions : recommandé par Evanno *et al.* en 2005).

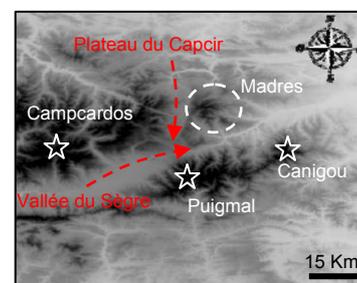
fig. 6 Organisation spatiale (uperposition) des 2 clusters les plus probables, obtenue avec le logiciel TESS.  
■ Cluster 1  
■ Cluster 2

La vallée du Sègre située entre la haute chaîne et le chaînon Est représente une barrière géomorphologique à la dispersion et aux flux géniques pour le lagopède alpin des Pyrénées

d'hivernage, et sur des habitats favorables et continus (Novoa *et al.* 2005). Il est à noter que cela s'avère plutôt exceptionnel sachant que les moyennes de dispersion en milieu favorable pour le *Lagopus muta* sont de 6.2 kilomètres pour les femelles et de 2.6 kilomètres pour les mâles. Ces distances de dispersion post natale sont le résultat d'un suivi télémétrique réalisé sur 7 jeunes femelles et 9 jeunes mâles sur les massifs du Canigou dans les Pyrénées et du Haut Giffre dans les Alpes.

Il aurait été intéressant de confronter les données de dispersion de 'terrain' avec des estimations des capacités de dispersion de l'espèce issues des données génétiques. Cependant, notre échantillonnage ne nous a pas permis de réaliser cette estimation car il est trop étalé géographiquement et nous n'avons pas suffisamment d'individus pour estimer la dispersion à fine échelle.

La vallée du Sègre qui représente au moins 15 kilomètres d'habitat non favorable semble constituer une barrière quasi infranchissable pour le lagopède alpin. La faiblesse de ces mouvements inter-massifs a très certainement empêché la recolonisation du massif du Madres (voir photo ci-contre) depuis la disparition de l'espèce dans cette localité dans les années 1980. Ce massif est séparé de la haute chaîne par le plateau du Capcir, large de seulement 9 kilomètres et à 1450 mètres d'altitude. Il se pourrait donc que la vallée du Sègre soit une barrière à la dispersion pour le lagopède alpin. Ainsi, afin de voir l'influence de la vallée du Sègre sur la dispersion du lagopède alpin, nous avons estimé les flux géniques entre chaque population. Ces flux géniques ont été estimés à l'aide du logiciel BAYESASS (WILSON & RANNALA 2003) qui détermine, dans un premier temps, les caractéristiques 'génétique' de chaque population (en fonction des fréquences alléliques) et estime dans un deuxième temps la proportion d'allèles partagée entre les populations. Les données sont reportées dans le tableau 7.



	Migration dans						
	Chaînon Est		Haute chaîne				
Migration provenant de	Canigou	Carança-Puigmal	Campcardos	Aston	Ustou	Melles	Luchon
Canigou	<b>0.679 (0.667-0.708)</b>	0.025 (0.000-0.077)	0.261 (0.174-0.321)	0.272 (0.202-0.320)	0.277 (0.212-0.326)	0.188 (0.099-0.279)	0.241 (0.131-0.314)
Carança-Puigmal	0.295 (0.250-0.327)	<b>0.959 (0.901-0.996)</b>	0.016 (0.000-0.076)	0.035 (0.000-0.097)	0.007 (0.000-0.033)	0.015 (0.000-0.067)	0.024 (0.000-0.094)
Campcardos	0.005 (0.000-0.029)	0.003 (0.000-0.017)	<b>0.686 (0.667-0.737)</b>	0.004 (0.000-0.019)	0.007 (0.000-0.038)	0.011 (0.000-0.056)	0.009 (0.000-0.051)
Aston	0.005 (0.000-0.028)	0.003 (0.000-0.018)	0.012 (0.000-0.058)	<b>0.679 (0.667-0.714)</b>	0.011 (0.000-0.054)	0.074 (0.016-0.151)	0.011 (0.000-0.060)
Ustou	0.006 (0.000-0.029)	0.003 (0.000-0.017)	0.008 (0.000-0.048)	0.003 (0.000-0.018)	<b>0.683 (0.667-0.727)</b>	0.011 (0.000-0.054)	0.009 (0.000-0.053)
Melles	0.005 (0.000-0.027)	0.003 (0.000-0.018)	0.008 (0.000-0.042)	0.003 (0.000-0.016)	0.007 (0.000-0.037)	<b>0.690 (0.667-0.746)</b>	0.010 (0.000-0.054)
Luchon	0.005 (0.000-0.028)	0.003 (0.000-0.020)	0.008 (0.000-0.043)	0.003 (0.000-0.019)	0.007 (0.000-0.037)	0.011 (0.000-0.050)	<b>0.695 (0.667-0.772)</b>

tab. 7 Taux de migration (intervalle de confiance, 95%) dans chaque population. Les valeurs en gras représentent la proportion des individus assignés à leur propre population. Les valeurs en italiques représentent les taux de migration de part et d'autre de la vallée du Sègre. Les analyses ont été menées à l'aide du logiciel BAYESASS (WILSON & RANNALA 2003).

Nous avons également modélisé l'habitat du lagopède alpin sur un Modèle Numérique de Terrain (MNT). Pour cela nous avons utilisé le modèle numérique de terrain suivant : SRTM 90m Digital Elevation ; file: srtm\_37\_03 ; UTM, Zone 31 nord, WGS84. Ce MNT est modélisé par une grille qui représente le paysage de notre zone d'étude. Au sein de cette grille, nous avons attribué une valeur

(coût écologique) à chaque cellule. Cette valeur de coût écologique représente 'l'effort requis' pour se déplacer ou rester sur la cellule en question. Pour le lagopède alpin, cette carte de coût écologique a été établie en fonction de l'exposition et de l'altitude critères qui semblent déterminer le mieux la distribution de cette espèce (Gonzalez & Novoa 1989; Novoa & Gonzalez 1988). Ainsi, à chaque tranche altitudinale et à chaque exposition correspond une valeur de coût déterminée en fonction de la fréquence des observations relevées dans l'étude de Gonzalez & Novoa en 1989 (tableaux 8 et 9 page suivantes). Une cellule avec un indice de 'coût écologique' de 1 est une cellule appropriée alors qu'une cellule avec un indice de 10 est une cellule où les conditions sont difficiles pour le lagopède alpin. Dans notre cas, l'altitude étant le facteur déterminant principalement la répartition des lagopèdes alpins, nous avons affecté des coûts deux fois plus élevés pour l'altitude que pour l'exposition. Afin de modéliser l'habitat potentiel du lagopède alpin, il suffit de superposer les différentes cartes de coûts (altitude et exposition) et d'additionner les indices de coût de chaque cellule. L'addition des coûts des différentes cellules de la carte donne une 'carte de coût écologique' globale. Afin de visualiser cette carte globale, il suffit d'assigner une couleur à chaque indice de 'coût' et donc à chaque cellule de la grille. Un gradient de couleur allant du bleu au rouge a été utilisé de façon à obtenir des zones dans le rouge pour un habitat favorable au lagopède alpin dans les Pyrénées et des zones dans le bleu/vert pour un habitat non favorable (figure 7, page suivante).

Altitude	Fréquence d'observation		Indice de coût
	>2800	4%	8
2800	2700	3%	8
2700	2600	6%	6
2600	2500	25%	2
2500	2400	36.00%	2
2400	2300	17%	4
2300	2200	9.20%	6
2200	2100	3.00%	8
2100	2000	0%	10
2000	1900	2.0%	8
1900	1800	0%	10
1800	1700	0%	10
1700	1600	0%	10
1600	1500	0%	10
1500	1400	0%	10
1400	<1400	0%	10

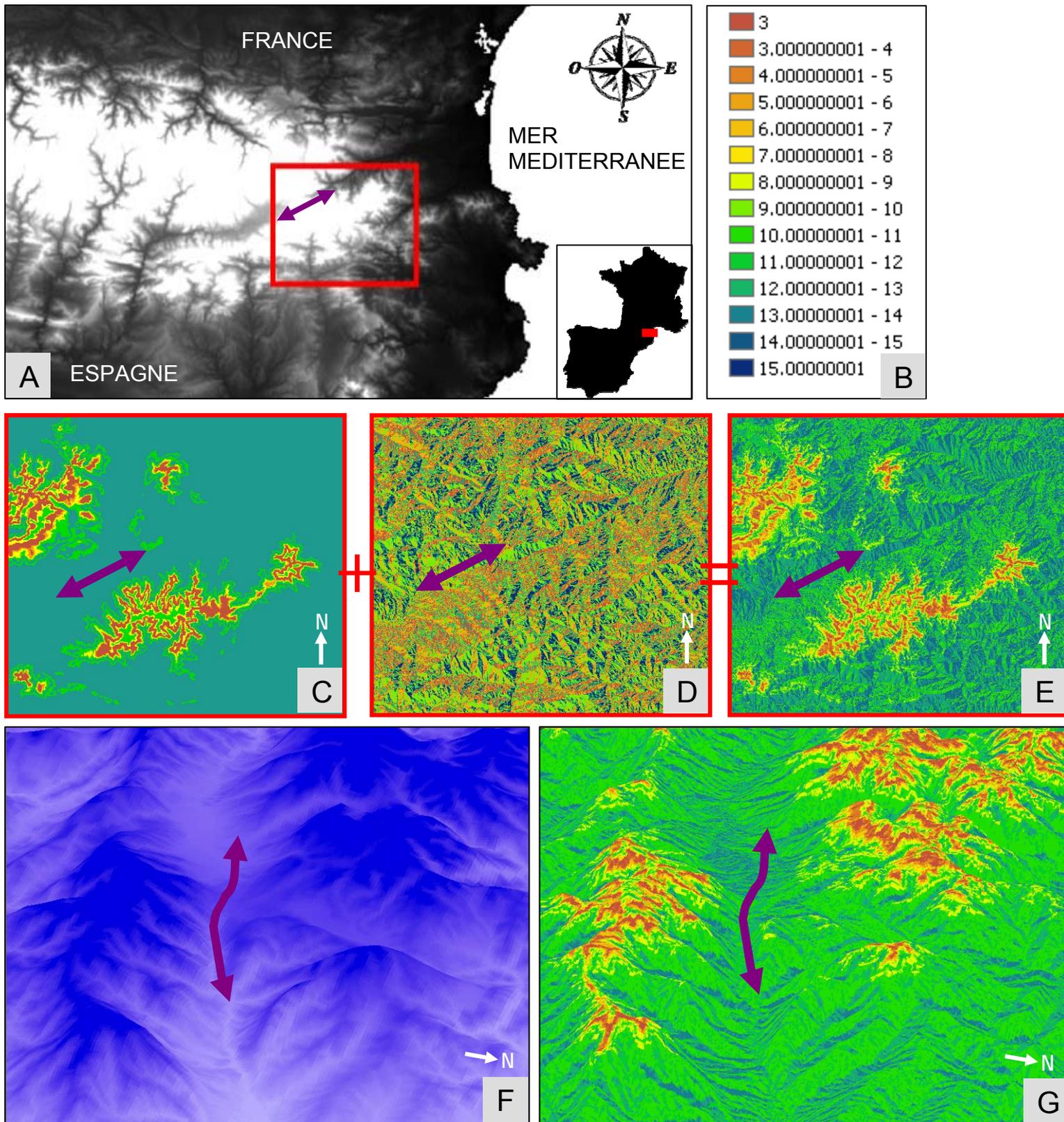
Tab 8: Indices de coût calculés pour chaque tranche altitudinale. Ces indices ont été calculés en fonction de la fréquence d'observation de lagopède enregistrée dans l'étude de Gonzales & Novoa en 1989.

Fréquence d'observation	Indice de cout
0%	10
< 5%	8
5% <> 10%	6
10% <> 20%	4
>20%	2

Exposition	Fréquence d'observation		Indice de coût
N	13%	1	
N-NE	7%	2	
NE	3%	4	
E-NE	5%	3	
E	11%	1	
E-SE	8%	2	
SE	8%	2	
S-SE	5%	3	
S	5%	3	
S-SO	3%	4	
SO	1%	5	
O-SO	2%	5	
O	5%	3	
O-NO	3%	4	
NO	15%	1	
N-NO	7%	2	

Tab 9: Indices de coût calculés pour chaque exposition. Ces indices ont été calculés en fonction de la fréquence d'observation de lagopède enregistrée dans l'étude de Gonzales & Novoa en 1989.

Fréquence d'observation	Indice de cout
< 3%	5
3%	4
5%	3
5% <> 10%	2
>10%	1



Avec des taux de migration proches de zéro, les résultats génétiques des analyses de migrations révèlent que le chaînon Est ne reçoit quasiment aucun migrant provenant de la haute chaîne. Concernant les populations situées sur la haute chaîne, celles-ci se mélangent très peu entre elles mais cette absence de flux génique pourrait provenir de la distance géographique qui sépare chacune des populations de la haute chaîne. Notons que les analyses détectent un fort taux de migration sur la haute chaîne provenant du chaînon Est et notamment du Canigou. En effet, le logiciel BAYESASS se base sur les fréquences alléliques afin de tirer des caractéristiques génétiques pour chaque population. La population installée sur le massif du Canigou révèle un faible nombre d'allèles mais fréquemment représentés, ainsi compte tenu de la forte représentation de certaines combinaisons, celles-ci se retrouvent assimilées au massif du Canigou. Quasiment tous les allèles présents sur le Canigou se retrouvent sur les autres massifs mais en moindre fréquence, ainsi les analyses traduisent ce phénomène par des migrations 'aberrantes' provenant du massif du Canigou. Ainsi, peut-être que la méthode employée atteint ses limites, particulièrement pour cette population isolée installée sur le massif du Canigou

Ces faibles migrations de part et d'autre de la vallée du Sègre semblent être dues aux caractéristiques de l'habitat qui ne semble pas être approprié au lagopède alpin. En effet, la modélisation de l'habitat indique que la vallée du Sègre ne peut pas être fréquentée par le lagopède alpin des Pyrénées, celle-ci ne présentant pas les exigences écologiques de l'espèce à cause notamment de son altitude trop peu élevée. Il apparaît donc que le chaînon Est se retrouve isolé géographiquement de la haute chaîne. Compte tenu de cet isolement, ce chaînon Est peut être considéré comme une île au sens biogéographique du terme (Blondel 1986; Blondel 1995). Au sein de cette 'île continentale', le massif du Canigou situé en marge Est de l'aire de distribution présente une faible diversité génétique. Ainsi, le maintien de la diversité génétique de la population de lagopède alpin située sur ce massif semble être dû à un apport d'oiseaux venus de massifs périphériques. Un raisonnement similaire a été élaboré sur le massif du Puigmal par rapport à la dépression démographique que présentaient les populations de lagopède alpin installées sur ce massif (Rabastens 2008). De plus, basées sur plus d'individus et plus de marqueurs microsatellites par rapport à l'article de l'annexe I4, les nouvelles analyses révèlent un fort taux de migration en provenance de la population Carança-Puigmal vers le massif du Canigou. Il semblerait donc que la population installée dans la vallée de la Carança joue un rôle de population source et que les populations installées sur les massifs Canigou et Puigmal soient des populations pouvant être considérées comme des puits démographiques. D'un point de vue diversité génétique, il est étonnant de voir une population 'puits': le Canigou, avec de faible taux de diversité génétique. En effet, il est généralement admis que les populations 'puits' présentent une



Le chaînon Est peut être considéré comme une île au sens biogéographique du terme.

forte diversité génétique car elles reçoivent des migrants (et donc potentiellement de nouveaux allèles) de toutes les populations 'sources' des alentours (Dias *et al.* 1996). Cependant, dans notre cas, seule la population située sur le massif de la Carança semble jouer le rôle de population 'source'. Ainsi à eux seuls, les migrants provenant du massif de la Carança ne suffiraient pas à augmenter, de façon significative, la diversité génétique de la population située sur le massif du Canigou. Ainsi la diversité génétique des populations 'puits' dépendrait avant tout du nombre de populations 'sources' des alentours.

Compte tenu de la disparition de l'espèce sur les massifs du Madres et de la Tosa d'Alp-Sierra del Cadi en Espagne au début des années 80, il semblerait que le système source-puits considéré ait été plus étendu au cours de l'histoire (figure 8). Il semblerait, en effet, que ce système 'puit-source' paie aujourd'hui les conséquences d'une fragmentation de l'habitat couplé à une dépression démographique généralisée sur l'ensemble des massifs et ayant pour conséquences, une réduction des effectifs, du succès de reproduction et par voie de conséquences des dispersants potentiels. Cependant, ceci ne reste qu'une hypothèse, voir figure 8.

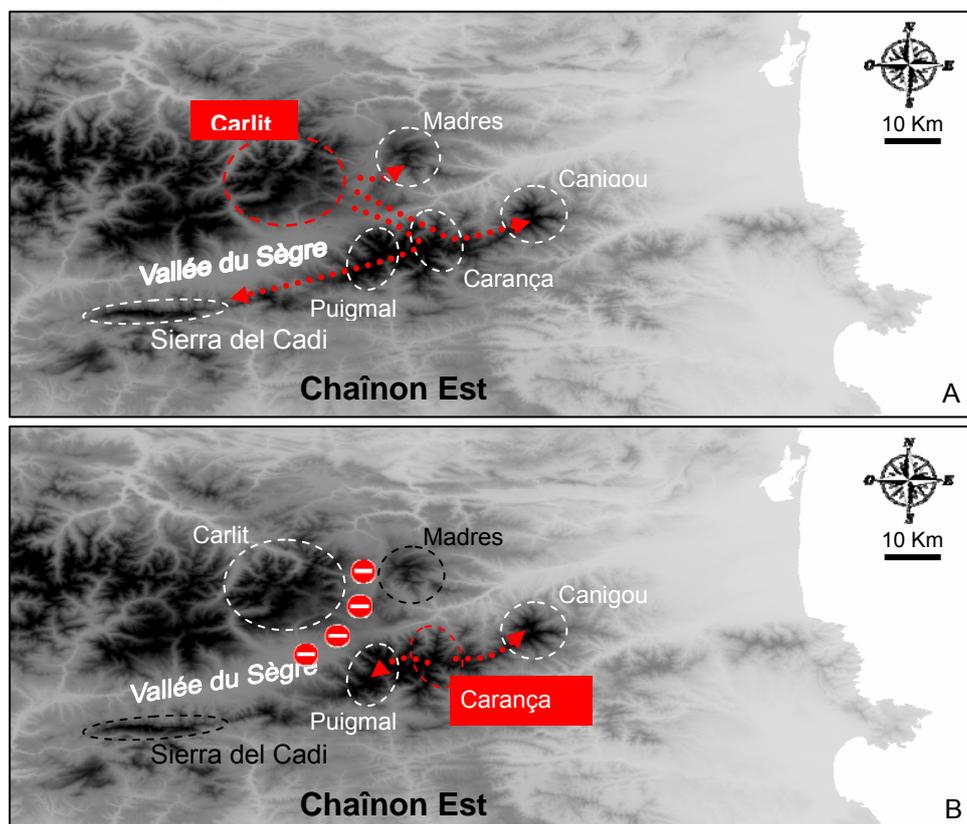


fig. 8 :

A. Système 'Source/Puits' (pour les populations de lagopède alpin) tel qu'il devait être avant la fragmentation du milieu.

B. Système 'Source/Puits' (pour les populations de lagopède alpin) tel qu'il paraît aujourd'hui.

- Populations éteintes.
- ◻ Populations Sources.
- ◻▶ Populations Puits.

Quel que soit le scénario évolutif, il semblerait qu'une connexion ancienne entre la haute chaîne et le chaînon Est ne puisse être rejetée. En effet, malgré des évidences d'une séparation actuelle au niveau de la vallée du Sègre, la structuration génétique en isolement par la distance et la position intermédiaire, dans la distribution de la variabilité génotypique de la population d'Aston (*cf.* analyse Bayésienne et Fst) semblent être le reflet d'une connexion ancienne

entre les deux chaînons, à une époque où la vallée du Sègre constituait un habitat favorable et continu.

## VI/ Goulot d'étranglement

Sur la base des marqueurs microsatellites, nous avons testé un éventuel goulot d'étranglement à l'aide du logiciel BOTTLENECK (Cornuet & Luikart 1996). Ce logiciel se base sur le principe que lors d'un goulot d'étranglement la population en question voit son nombre d'allèle diminuer plus rapidement que son hétérozygotie, entraînant ainsi une différence entre hétérozygotie observée et attendue (Cornuet & Luikart 1996). Nous avons utilisé un test de Wilcoxon (signed ranks test) afin d'observer d'éventuelles différences entre hétérozygotie observée et attendue selon 3 modèles de mutation. Sur les trois modèles, seuls les modèles IAM (Infinite Allele Model) (Kimura & Crow 1964) et TPM (Two Phase Model) (Di Rienzo *et al.* 1994) ont été pris en compte car le modèle SMM (Kimura & Ohta 1978) n'est pas vraiment approprié aux marqueurs microsatellites (Ellegren 2000; Estoup *et al.* 2002) (tableau 8).

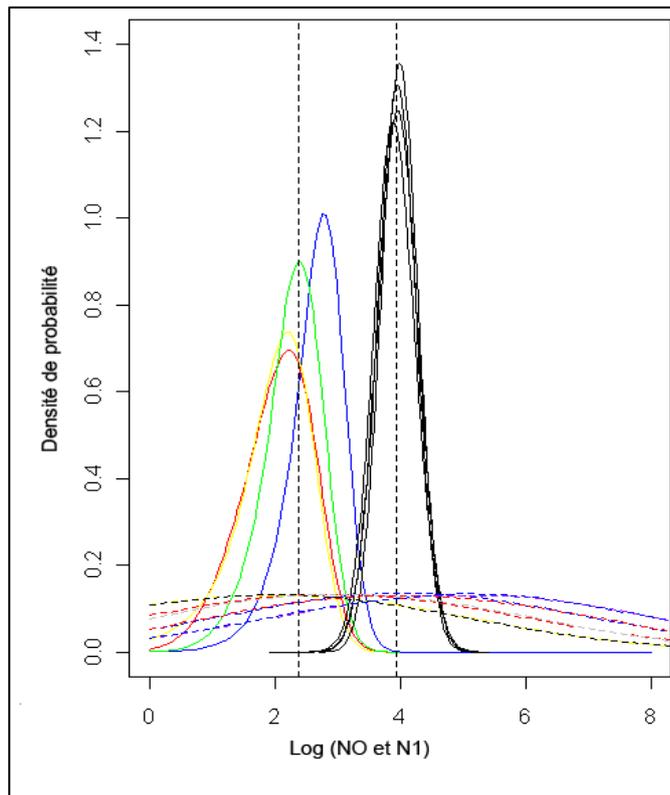
Populations	Probabilités (Wilcoxon Signed ranks)	
	IAM	TPM
<b>Canigou</b>	0.00122	0.00671
<b>Carança-Puigmal</b>	0.00854	0.02148
<b>Campcardos</b>	0.00122	0.00525
<b>Aston</b>	0.02148	0.02148
<b>Ustou</b>	0.00305	0.03271
<b>Melles</b>	0.00024	0.00085
<b>Luchon</b>	0.00037	0.00671

**Tab 8 :** Résultats du logiciel BOTTLENECK pour les tests de Wilcoxon. Ces tests comparent l'hétérozygotie observée avec l'hétérozygotie attendue selon les modèles de mutation IAM et TPM. Avec un seuil de significativité fixé à  $P=0.05$ , les résultats indiquent la présence de goulot d'étranglement pour toutes les populations.

Les résultats indiquent qu'un goulot d'étranglement a eu lieu dans chaque population. Cette réduction d'effectif se retrouve avec le logiciel MSVAR (STORZ & BEAUMONT 2002) et ce, quelque soient les 'priors', les 'hyperpriors' et les 'starting values' (**n=182 runs**) (figure 9). De plus et d'après ce logiciel, ce goulot d'étranglement se serait manifesté par une division d'un facteur 30 du nombre d'individus. D'après les estimations des tailles de populations, il semblerait que les lagopèdes alpins dans les Pyrénées s'organisent actuellement en plusieurs populations différentes (caractérisées par des estimations de taille efficace différentes) alors qu'avant le goulot d'étranglement, ces individus semblaient former une seule grande population (caractérisées par une convergence des estimations pour les tailles efficaces 'ancestrales').

Toutes les populations de lagopède alpin dans les Pyrénées révèlent un goulot d'étranglement.

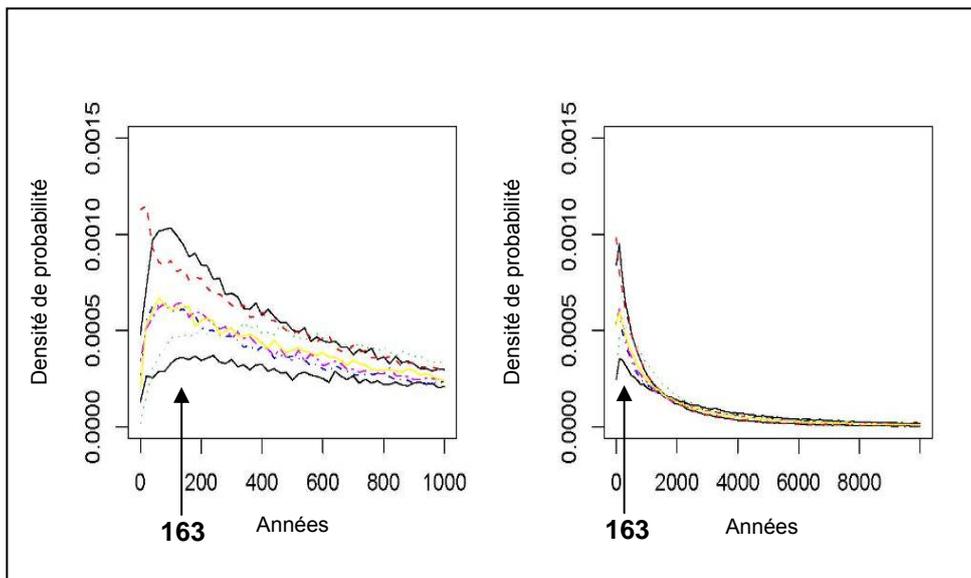
Ces résultats sont très intéressants car en règle générale, les goulots d'étranglement ne sont testés que sur une seule population (Craul *et al.* 2009; Pruett *et al.* 2010; Storz & Beaumont 2002). Dans notre cas, le goulot d'étranglement observé semble avoir touché l'ensemble des populations de lagopède alpin situées sur toute la chaîne des Pyrénées. A notre connaissance, cette approche multipopulationnelle (*via* ce logiciel) est unique, ce qui donne d'autant plus d'importance à la convergence des signaux et à leur robustesse (0.7 de densité de probabilité au minimum). D'un point de vue analytique l'approche multipopulationnelle couplée aux différentes combinaisons de priors et d'hyperpriors laisse entrevoir des répliqués à la fois écologiques et statistiques.



**fig. 9 :** Résultat de MSVAR, la figure montre un facteur ~30 entre la taille de la population actuelle NO (en couleur) et la taille avant le goulot d'étranglement N1 (en noir). On observe une bonne convergence des 7 populations. Les tracés en pointillés représentent la distribution des 'priors'.

Pour tenter de dater ce goulot d'étranglement, nous avons utilisé le logiciel MSVAR (STORZ & BEAUMONT 2002). D'après les résultats, la dernière chute drastique d'effectif aurait eu lieu au cours des 400 dernières années (figure 10). Même si la valeur modale suggère une date très récente à environ 163 ans ( $\pm 125$  ans), le signal est à nuancer car l'écart type reste relativement fort. Cette forte variance (traduite par des courbes plus ou moins 'aplaties') laisse présager que la réduction des effectifs a pu commencer au cours des quatre derniers siècles et pourrait se poursuivre encore aujourd'hui. Ainsi, il est difficile de donner une date précise du dernier goulot d'étranglement des populations de lagopède alpin dans les Pyrénées.

Le goulot d'étranglement des populations de lagopède alpin dans les Pyrénées semble être récent et dater d'il y a 163 ans.



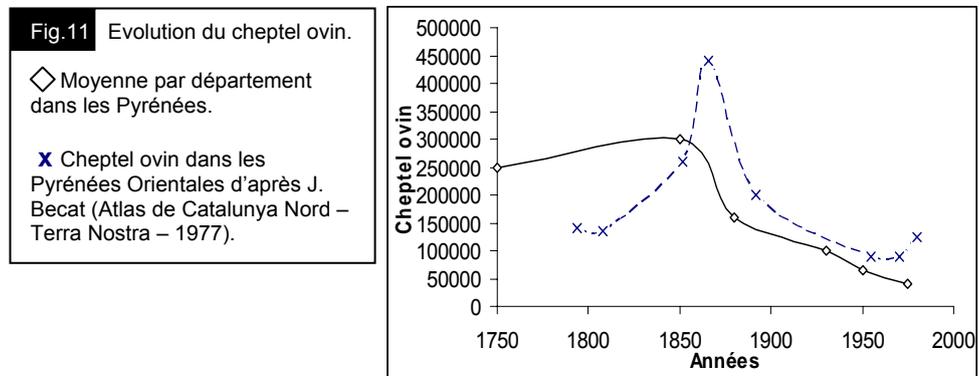
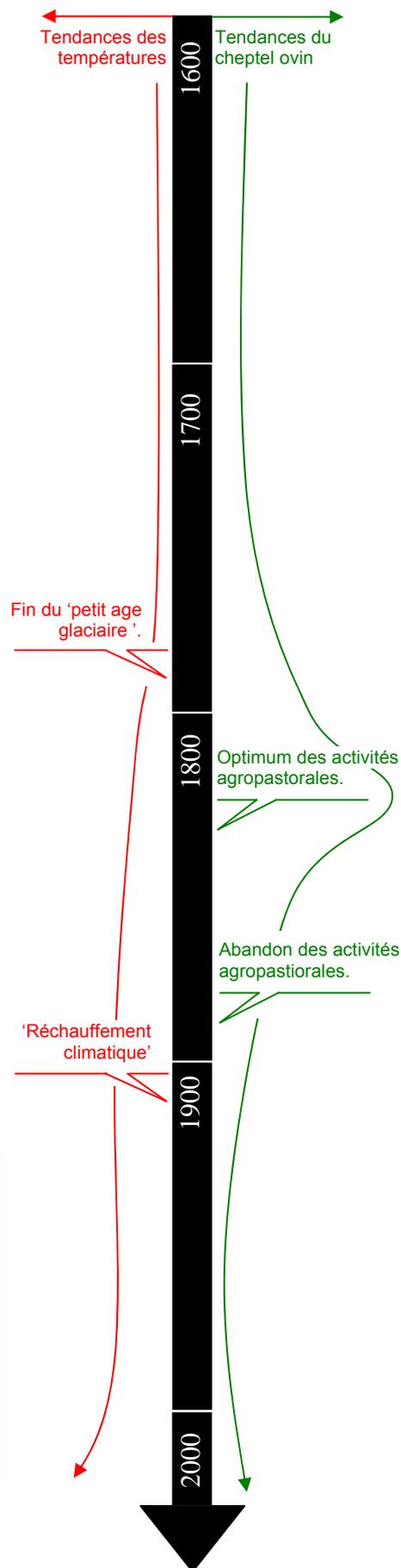
**fig. 10 :** Résultat de MSVAR : la figure montre en quelle année a eu lieu le goulot d'étranglement subi par les populations de lagopède alpin des Pyrénées. Le maximum de densité de probabilité semble indiquer un événement récent : ~150-200 ans ; les différentes couleurs des courbes correspondent aux différentes populations.

↑ : Valeur modale (150 ans).

Si l'on s'intéresse aux 400 dernières années, nous pouvons remarquer qu'au cours de cette période, et à l'image du quaternaire, les Pyrénées ont subi des fluctuations de température (Calvet, Comm. Pers.). Dans l'histoire évolutive des populations de lagopède alpin, ces fluctuations climatiques représentent un facteur important car elles peuvent influencer le maintien et la distribution des populations. En effet, le lagopède alpin est sensible aux variations de températures et son habitat est représenté par les espaces ouverts d'altitude conditionnés par la limite supérieure de la forêt, elle-même dépendante au moins en partie de la température.

**1600-1800** : Parmi les fluctuations climatiques, le 'petit âge glaciaire' fait partie des épisodes climatiques qui pourrait potentiellement avoir eu un impact sur les populations de lagopèdes alpins. En effet, alors que le climat du 'petit âge glaciaire' était propice à l'expansion des populations de lagopède alpin, sa fin au contraire, a pu entraîner un déclin des populations car confrontées à des températures de plus en plus chaudes.

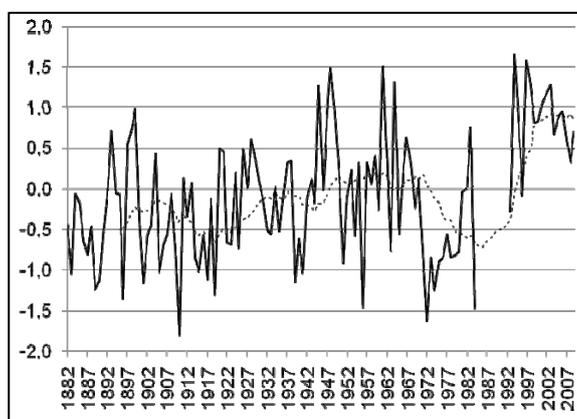
**1800-1850** : Pour palier cette augmentation des températures, les lagopèdes alpins ont pu se réfugier un peu plus en altitude. Cependant, le changement de climat du début des années 1800 a également été accompagné par un changement dans l'utilisation des terres et notamment des espaces ouverts d'altitude. Parmi ces changements, l'expansion des activités agropastorales représente l'un des bouleversements les plus importants au sein des espaces d'altitude. Ainsi, au milieu des années 1800, ces activités connaissent un optimum et les milieux montagnards accueillent des cheptels ovins et bovins locaux mais également transhumants (figure 11). Certes, les activités agropastorales sont connues pour maintenir les milieux ouverts mais celles-ci représentent également une menace pour le succès de la reproduction du lagopède alpin (*via* des piétinements de nid). Ainsi, la fin d'une période climatique favorable suivie d'une expansion des activités agropastorales néfastes pourrait être à l'origine du goulot d'étranglement qui a eut lieu au sein de toutes les populations de lagopède alpin des Pyrénées.



**1850-2000** : A la fin des années 1800, les activités agropastorales diminuent. Cet abandon progressif aurait alors pu permettre une reprise du succès reproducteur

des populations de lagopède alpin mais cette période est également marquée par une augmentation progressive des températures. La limite supérieure de la forêt n'étant plus limitée par la pression pastorale, les étages de végétation sont soumis aux seules variations de température. Ainsi, cette augmentation des températures a pu entraîner une remontée des étages montagnards ayant pour conséquence une fermeture des milieux d'altitude. Cette remontée a pu se traduire par une fragmentation de l'habitat du lagopède alpin se retrouvant alors isolé sur les parties les plus hautes. Dans les Pyrénées, cette hausse des températures s'est traduite par une augmentation de 1°C en 100 ans soit +0.10°C par décennie (figure 12). Ces données locales sont en accord avec l'évolution de la température globale de la Terre (Hansen *et al.* 2006) mais également en accord avec l'évolution de la température mondiale enregistrée dans les espaces d'altitude (Pepin & Seidel 2005; Vuille & Bradley 2000).

Dans les Pyrénées et depuis 1882, les températures ont augmenté de 1°C en 100 ans soit +0.10°C par décennie

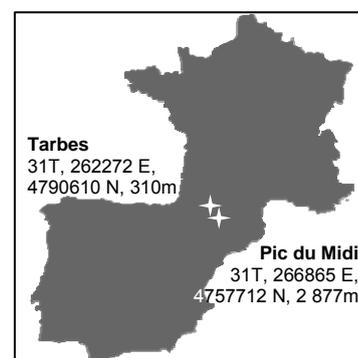


**Fig 12** Evolution de la température moyenne annuelle entre 1882 et 2009 sur la station météorologique du Pic du midi (31T, 266865 E, 4757712 N ; 2 877m d'altitude), données Météo France

Calculé entre 1946 (date de la première température enregistrée sur la station météorologique de Tarbes) et 2009, le gradient thermique adiabatique nous a donné une valeur de  $-0.51 \pm 0.003^\circ\text{C}$  par tranche altitudinale de 100 mètres. Cette valeur est en accord avec la bibliographie de plusieurs sites (Peñuelas & Boada 2003; Walther *et al.* 2002) (voir encadré ci-dessous pour les détails du calcul).

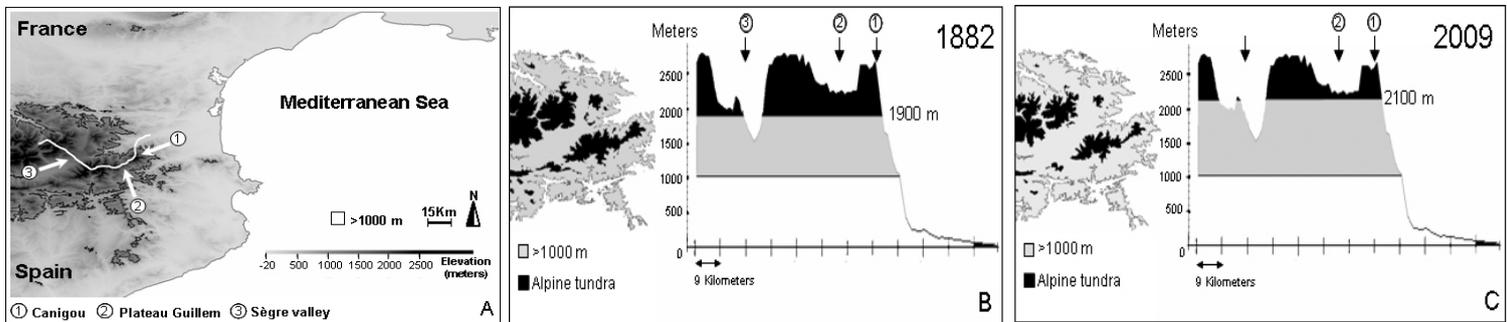
Dans les Pyrénées le gradient adiabatique est de  $-0.5^\circ\text{C}/100\text{m}$ .

**Calcul du gradient thermique adiabatique :** L'une des principales caractéristiques thermiques des milieux montagnards est le gradient thermique adiabatique. En effet, en montagne la température baisse au fur et à mesure que l'on s'élève en altitude. Afin de calculer le gradient thermique adiabatique au sein des Pyrénées, nous avons utilisé les données de température de la station météorologique de Tarbes (310 mètres d'altitude) située au pied du Pic du Midi (2 877 m d'altitude) voir (figure ci-contre). L'estimation du gradient adiabatique altitudinal est obtenue selon la formule ci-dessous.



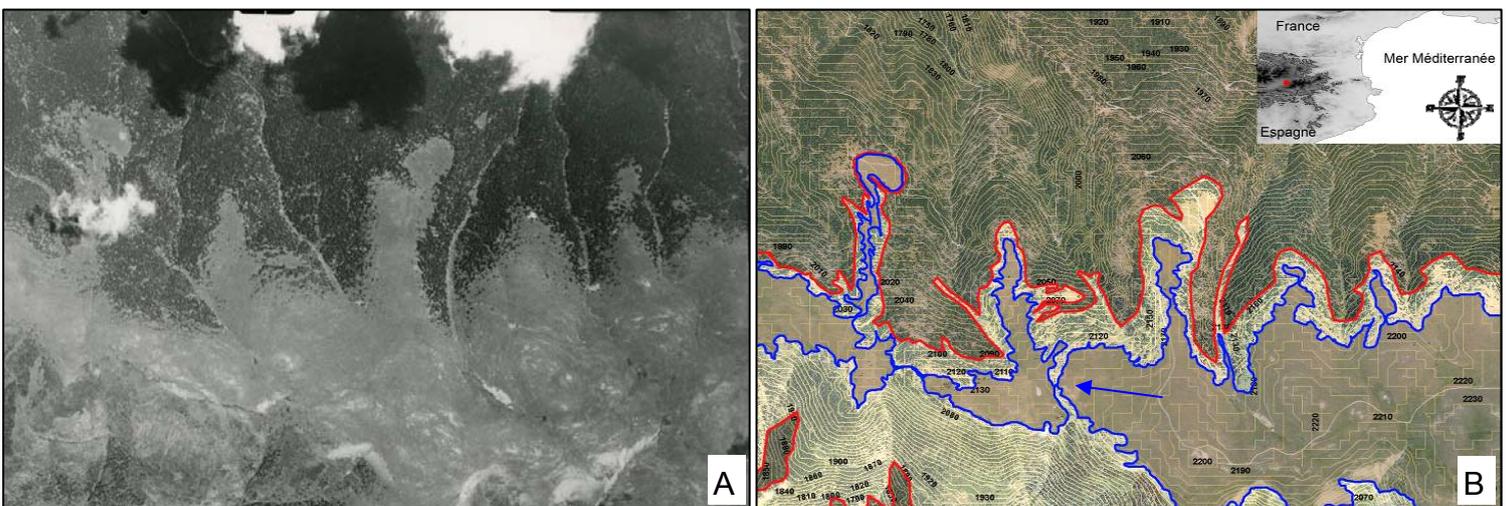
$$\text{Gradient thermique adiabatique} = \frac{\text{T}^\circ\text{C moyenne annuelle de Tarbes} - \text{T}^\circ\text{C moyenne annuelle du pic du Midi}}{\text{Différence d'altitude entre les 2 stations météo (~2570m)}} \times 100 \text{ mètres}$$

Compte tenu du gradient thermal adiabatique ( $-0.5^{\circ}\text{C}/100\text{m}$ ) et de l'augmentation des températures enregistrée dans les Pyrénées ( $1^{\circ}\text{C}$ ), nous proposons que les étages de végétation se soient décalés de 200 mètres en altitude depuis 1882. De telles élévations ont déjà été rencontrées dans d'autre massif dans les Alpes (Lenoir *et al.* 2008; Walther *et al.* 2005) ou encore en Espagne dans les montagnes Montseny (Peñuelas & Boada 2003). Dans les Pyrénées, les limites actuelles de l'étage alpin (espaces ouverts d'altitude), se situent aujourd'hui à 2100 mètres d'altitude (Del Barrio *et al.* 1990). Ainsi, nous pouvons évaluer que ces limites se trouvaient 200 mètres plus bas en 1882, c'est-à-dire à environ 1900 mètres. Calculée avec des méthodes de SIG (MapInfo v.7.5), une telle élévation aurait engendré une réduction de 49% de l'habitat du lagopède alpin. La figure 13 illustre cette élévation dans la partie Est des Pyrénées en fonction de l'évolution des températures locales entre 1882 (figure 13B) et 2009 (figure 13C).



**Fig13 :** A : Carte de la zone d'étude.  
 B : Limites inférieures de l'étage alpin (alpine tundra) en 1882 sur le profil topographique du tracé blanc en 'A' estimée selon nos calculs.  
 C : Limites inférieures de l'étage alpin (alpine tundra) en 2009 sur le profil topographique du tracé blanc en 'A' estimée selon nos calculs.

La comparaison entre des photos aériennes datant de 1954 et de 2004 confirme cette tendance à l'élévation et révèle une progression en altitude de la forêt de pin à crochets : de 30 à 50 mètres de progression sur les versants Nord et de 150 à 200 mètres sur les versants Sud (figure 14, photo-interprétation, Vincent Parmain, Office National des Forêts).



**Fig 14 :** Cartes de la borne frontière 504 en 1954 (A) et en 2004 (B) : zone située à l'extrémité Ouest du massif du Puigmal (2000 mètres). Evolution de la limite supérieure de la forêt. La courbe rouge correspond à la limite supérieure de la forêt en 1954. La courbe bleue correspond à la limite supérieure de la forêt à l'heure actuelle. La partie claire correspond à la surface gagnée par la forêt au cours des 50 dernières années.

Sur la base de nos résultats, il est difficile de déterminer quelle est la cause précise de l'origine du goulot d'étranglement à l'échelle de l'ensemble des Pyrénées. En effet, il est difficile de discerner les effets de l'augmentation de la température des effets du changement d'usages des terres (Popy 2008). Même si les données restent peu précises sur les 400 dernières années (aussi bien sur le nombre et la taille des cheptels ovins et bovins que sur les données de températures), nous pouvons cependant dire que l'origine du goulot d'étranglement pourrait être la forte pression pastorales des années 1750-1850 aggravée par la suite par une élévation progressive de la température au XIX<sup>ème</sup> et XX<sup>ème</sup> siècle.

Sur la base de nos résultats, il semblerait donc que les populations de lagopède alpin situées sur le chaînon Est soient extrêmement menacées par une combinaison de facteurs qui sont : (i) leurs positions en marge d'aire de répartition, (ii) leur isolement géographique par rapport aux autres populations et (iii) leur appauvrissement génétique. Tous ces facteurs combinés laissent présager que les populations de lagopède alpin situées sur le chaînon Est pourront, très difficilement, se 'relever' et risquent aujourd'hui de tomber dans une 'spirale vers l'extinction'. Ainsi, afin de prendre des mesures de gestion adéquates au maintien des populations de lagopède alpin sur ce chaînon Est, un programme INTEREG appelé GALIPYR a été accepté. Ce programme expérimental propose notamment une translocation d'individus de lagopède alpin, de la haute chaîne vers le chaînon Est afin d'assister le flux génique de part et d'autre de la vallée et ainsi peut-être relever le potentiel adaptatif des populations sur ce chaînon isolé.

Le détail du projet se trouve en annexe I5.

l'origine du goulot d'étranglement pourrait être la forte pression pastorales des années 1750-1850 aggravée par la suite par une élévation progressive de la température au XIX<sup>ème</sup> et XX<sup>ème</sup> siècle.



Photo de l'hélicoptère utilisé pour le projet de translocation d'oiseaux

<b>Annexes</b>
----------------

Annexe I1 : Détails des années de prélèvement par site d'échantillonnage.

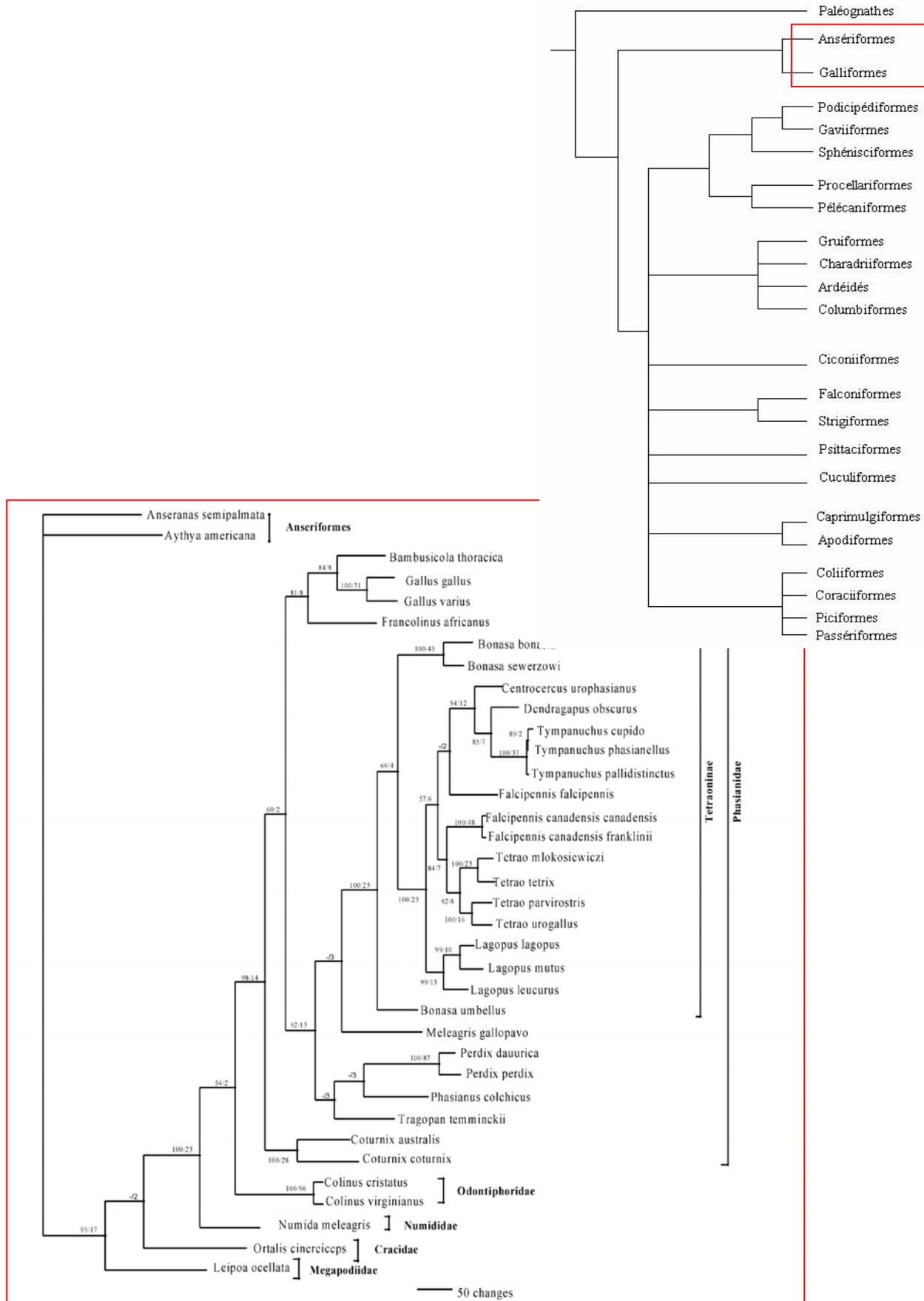
	Luchon	Melles	Ustou	Aston	Campcardos	carança-Puigmal	Canigou	Total
1988	2							0
1989	5	1						0
1990		2		1				1
1991		1						0
1992				5				5
1993				5				5
1994		1	3	6		1		7
1995			7	3				3
1996								0
1997		7	9	19				19
1998				6			5	11
1999		1					2	2
2000						1	1	2
2001							2	2
2002							3	3
2003						1	2	3
2004						5	2	7
2005	1					6	2	8
2006						4	1	5
2007	7				1	9	2	12
2008					4	8	3	15
2009					11		2	13
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>19</b>	<b>45</b>	<b>16</b>	<b>35</b>	<b>27</b>	<b>123</b>

Annexe I2 : Recensement des marqueurs microsatellites mis en évidence chez les Tétrionidés.

En gris : marqueurs testés, en noir : marqueurs retenus et polymorphes chez le lagopède alpin.

Locus	Modele biologique	accession number	MENTES 5'	Amorce F	3' 5'	Amorce R	Taille	Répétition	T-C annealing
LLS11	<i>Lagopus lagopus</i>	X99051	395	AAATCTTTTCTTGATGAG	GTAGGGTTATGACATTAATGAG	3	180	(AA)n n=21	53.1
LLS12	<i>Lagopus lagopus</i>	Y16826	/	TCCTGACAACTCTTTATG	ACAACCTGTGATTTATTAAG	3	180	(CAA)n n=20	/
LLS13	<i>Lagopus lagopus</i>	Y16827	/	CCAAATTTTCTTTCTCATTTG	CCAAATTTTCTTTCTCATTTG	3	260	(CAA)n n=18	/
LLS14	<i>Lagopus lagopus</i>	Y16828	/	CTATTCTTCCAGTCTCTCTAC	GTATATTCAGTCTCTCTCTAC	3	339	(GAA)n n=44	/
LLS15	<i>Lagopus lagopus</i>	Y16829	43737	AAGCAACAGATGAGATGACAG	GTGTCTTTTGGTGAATGATG	3	355	(GAA)n n=47	57.6
LLS16	<i>Lagopus lagopus</i>	Y16829	/	GCTGGTATTATATGATGATG	ATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	3	286	(GAA)n n=25	/
LLS17	<i>Lagopus lagopus</i>	Y16831	43738	TCAGTGAAGAAGTGTGTTGG	GGGCATCCATTAATTTCTTG	3	346	(GAA)n n=18	61.2
LLS18	<i>Lagopus lagopus</i>	X99052	402	TACTGATTTGACACTACTG	CTGGAGAAATGGGTGATGAG	3	110	(AG)n	53.9
LLS19	<i>Lagopus lagopus</i>	X99053	407	TACTGATTTGACACTACTG	ATCCACCAAATGTTCATG	3	130	(TG)n	52.3
LLSD4	<i>Lagopus lagopus</i>	X99054	43744	AGTGGAGCTTAAGCAGATGTTG	ATAGTCAATCTCTCACTGAC	3	200	(TG)n	56.8
LLSD5	<i>Lagopus lagopus</i>	X99055	420	CAATGATTTCTATGATGATG	TTCTGATTTCTGATGATG	3	130	(CA)n	56.6
LLSD6	<i>Lagopus lagopus</i>	X99056	426	AGCCGACCTGTAACACACAGG	TAGTGTCTTTGGGATGATTTG	3	116	(AD)n	61.3
LLSD7	<i>Lagopus lagopus</i>	X99057	43736	CAATGCTTCCAGTACTGTGTC	GTTAGCCATCAACAGTGTCC	3	135	(AG)n	59.3
LLSD8	<i>Lagopus lagopus</i>	X99058	442	ACTGTGAAATACATTTGTGAC	ACCTTGCCAGATCTGAC	3	135	(TG)n	55.7
LLSD9	<i>Lagopus lagopus</i>	X99059	444	CCAGGCACTCAAGTCTCTGG	CCAGTCACTTTTCCACATG	3	145	(CA)n	64.3
LLSD10	<i>Lagopus lagopus</i>	X99060	43747	CCGAGTATGTCAGTAAAGG	ATTCTGAAGTGAAGAAATATCC	3	200	(CA)n/(A)n	56
TTD1	<i>Tetrao tetrix</i>	AF303092	/	AGTGAACCTGACAAACCATC	CTCCAAAGCAAAAGAAATATCC	3	159	(CA)n n=15	/
TTD2	<i>Tetrao tetrix</i>	AF303093	/	AACAGCTTGAATACTGAACTT	ATGTGGTTTTGAGTAACTGAC	3	156	(CA)n n=12	/
TTD3	<i>Tetrao tetrix</i>	AF303094	/	CTGAGGCGACAGTGAATG	TCACAGCTGGCCATCTG	3	138	(CA)n	/
TTD4	<i>Tetrao tetrix</i>	AF303095	/	ACATGTGCTCTTTTGGCC	AGAAACACTACAGCAGCCTT	3	248	(G123)(G)(G)A25	/
TTD5	<i>Tetrao tetrix</i>	AF303096	/	CCTTCCCCATTCAAAAG	GCTTGAAGTTCATTTGGCAG	3	224	(GAT)A8(N)20(TA)14(CA)(TA)8	/
TTD6	<i>Tetrao tetrix</i>	AF303097	/	GGACTGCTTGTGATCTGCT	CATGCAGATGACTTTCAAGCA	3	131	(CA)n n=17	/
TTT1	<i>Tetrao tetrix</i>	AF303098	/	GCAATCCAGCCATTTTCA	TCAGTCTTCCACTAAACCCTT	3	247	(GAT)A11(TAAA)8	/
TTT2	<i>Tetrao tetrix</i>	AF303099	43739	GTTGATGATGATGATGATGAA	GTTCTGCAATGAACTTCTGG	3	179	(GAT)A3(GAT)(GAT)A14	/
BG4	<i>Tetrao tetrix</i>	/	/	AATGATCAAGTGGCTTTGGA	CTCAAGTTTTGGGCTGTATAG	3	178	(GAT)A15	55
BG6	<i>Tetrao tetrix</i>	/	43740	AAAGAGGCGAAGCCTCAATG	CCCTTGGATATGCTTTAAACAAAC	3	185	(GAT)A15	57
BG10	<i>Tetrao tetrix</i>	/	/	ATGTTTACTGCTTCTGGAAATG	ATTGGTATGTAACGCAATAGC	3	225	(GAT)A17	55
BG12	<i>Tetrao tetrix</i>	/	43746	TCTTCTCTAAACCAGCATTTG	TAGTCTTCCACAGAGCAGATTG	3	232	(GAT)A29	55
BG14	<i>Tetrao tetrix</i>	/	/	ATCTACTGAAACAAATATCTG	TATGGAGTGGATGATGAGAG	3	259	(CTAD)D(CCAD)G(CAT)A7	54
BG15	<i>Tetrao tetrix</i>	/	43742	AAATATGTTTCTGAGGCTTAC	TACATTTTCTATTTGCACTTC	3	181	(CTAD)16	54
BG16	<i>Tetrao tetrix</i>	/	/	GTGATATGCTGCTGCTGCTAC	TGCTAGTGGGATGAAATGG	3	161	(CTAD)15	54
BG18	<i>Tetrao tetrix</i>	/	/	CCATTAACCTTAACCTTCACTTTC	GCTATTAACAAATGCTCTGTA	3	168	(CTAD)17	53
BG19	<i>Tetrao tetrix</i>	/	43741	CAAGGCGCAACCTTAAAGATTG	TGATATTTTGGAACTCTGTGTC	3	178	(GAT)A13	59
BG20	<i>Tetrao tetrix</i>	/	/	AAGCACTTACAAATGGTGAAGG	TATGTTTCTTTTTCAGTGGATG	3	147	(GAT)A17	57
TU11	<i>Tetrao tetrix</i>	AF254653	/	GGTCACTATTTGGCTGTGACC	ATATGGCACTCCAGCATATGG	3	217	(CTAD)12	60
TU12	<i>Tetrao tetrix</i>	AF254654	/	CCGTGTCAAAGTCTTCCAAAC	TTCAAAGCTGTGTTCAATAGTTG	3	160	(GAT)A12	60
TU13	<i>Tetrao tetrix</i>	AF254655	/	CAGGAGGCTCTCAACTAATCCAC	CGATGCTGGCAGCAAGATGAC	3	154	(TAT)D11	60
TU14	<i>Tetrao tetrix</i>	AF254656	/	GAGCATTCTCCAGATCTGAC	TGTGAACCCAGCAATCTGAG	3	179	(TAT)D8	60
TU15	<i>Tetrao urogalvus</i>	AF254644	/	ATTTGCCAGGAACTTTGCTC	AACTACTGCTGTTGTTGCTG	3	209	(CA)14	59
TU16	<i>Tetrao urogalvus</i>	AF254645	/	GTGACCACTCAGCCCTGCTC	AAATAAGGGTGGCATTACACC	3	200	(CA)13	59
TU17	<i>Tetrao urogalvus</i>	AF254646	/	TCCAAAGGGAAATATGTTG	TTCTTCCAGCCCTAAGCTTGG	3	192	(TG)12	60
TU18	<i>Tetrao tetrix / T. urogalvus</i>	AF254647	/	TTAGCAACCCGCAATGATGTTG	GCGAAGACTGTGTGAGGAGCC	3	187	(CA)21	60
TU19	<i>Tetrao urogalvus</i>	AF254648	/	GGTGTGACCTGACATTTTCTCC	GGTGTGAGCATTGATGATGAGG	3	193	(G)23	57
TU20	<i>Tetrao urogalvus</i>	AF254649	/	GGTGAGCAAGCCAAATTAAC	GAGGACTGGCAGAAACCCTG	3	210	(CA)21	58
TU21	<i>Tetrao tetrix / T. urogalvus</i>	AF254650	/	TGACACTGGGGTCAATTAAGC	AACTATGGGCGAGGAGGAG	3	200	(CA)11	58
TU22	<i>Tetrao urogalvus</i>	AF254651	/	TGCAGCCCTCTCTAATTTCCG	CTGGACATCAAGCAATCATGC	3	187	(G)15	59
MNT12	<i>Mt. gallopano + P. pendix</i>	AF482371	/	AGGTGTTTTGGGCACTCTC	TGCAAGCAACATCTGCTAAG	3	145-185	(TG)14 imp	58
MNT1412	<i>Mt. gallopano + P. pendix</i>	AY926544	/	CCCATTGAGGCAAGTGAATG	GTCTATCACAGTGGAGGATAG	3	234-272	(CA)23	61.7
ADLD292	<i>G. gallus + P. pendix</i>	G011710	/	CCAAATTCAGGCAAAACTTCT	AAATGGCTTAAGGATGATG	3	98-112	(CA)n	55
MNT1477	<i>Mt. gallopano + P. pendix</i>	AL593755	/	TTCCACCACCGCTATTTCAAG	TCCAAATATGATGATGATGAT	3	227-253	(CA)9	58
ADL142	<i>G. gallus + P. pendix</i>	G011567	/	CAGCCCAATGAGGATTAAGA	CTGTGATATGCAAAAGATGTC	3	208-224	(A)C11(A)Q(A)C7	58
LE131	<i>G. gallus + P. pendix</i>	AY228562	/	CTATGGCAGTGTGTGAGAA	CAATGGAGGCACTGTAGA	3	146-158	(GT)	58
LE1319	<i>G. gallus + P. pendix</i>	AY228562	/	CTGGGGATGATGAGATGTTT	GTTGATATGATGATGATGATG	3	94-104	(CA)n	58
MNT104	<i>Mt. gallopano + P. pendix</i>	AL593651	/	AAACCAGCTGTGGAGATTAAC	GAGCAGTCAAGGCAAACTATCC	3	242-254	(TG)22	61.7
MNT145	<i>Mt. gallopano + P. pendix</i>	AY735058	43750	ACATGAGGCGAAGAACTCTC	TGTCATCTTCTGATGCTTCTC	3	95-112	(TA)4 + (TG)23 + (TA)3	58
MOW 230	<i>G. gallus + P. pendix</i>	/	/	TGCACAGAGCCAAAGCTGTTT	GCAACTTCTGATGAGGCTCA	3	227-243	?	63
LE130	<i>G. gallus + P. pendix</i>	AL593567	/	GAAAGGCAAAATGGGATGAA	GCTTACCGAGGCAAGCAGAC	3	183-207	?	62
MNT1467	<i>Mt. gallopano + P. pendix</i>	AL593567	/	AGTGGCAGTGTGTGATCTTG	TGTGATCTGGCAGGCAATGAG	3	235-239	(CA)50	55
ADLD260	<i>G. gallus + P. pendix</i>	G011680	/	GAGTCTGTGATCCACTCTTG	ATCAGCCATTCACAGATGAG	3	94-114	(CA)n	58
Anu 1F25	<i>Alectoris rufa + P. pendix</i>	EY426645	43751	CCTTAATGCTGTCCACTCTC	GCTTCAACTGTCCAAAGGTTG	3	206-222	(CCAD)18	62
MNT108	<i>Mt. gallopano + P. pendix</i>	AY926543	/	GCTTCTCTGCGACACTCAAC	GGGAAATTTGCTCCACTCTAC	3	223-237	(G)28	55
Anu 1G4	<i>Alectoris rufa</i>	EY448547	43749	CTGGCAGTCCACCAAGGCTAC	AGTGGGTCAAAGGATGAGTGG	3	140-156	(CCAD)13	55

Annexe I3 : Arbre phylogénétique des oiseaux et détail de l'arbre phylogénétique des Anseriformes et galliformes d'après Dimcheff *et al.*, (2002).



## Population genetic structure of rock ptarmigan in the 'sky islands' of French Pyrenees: implications for conservation

N. Bech<sup>1</sup>, J. Boissier<sup>1</sup>, S. Drovetski<sup>2</sup> & C. Novoa<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie et d'Écologie Tropicale et Méditerranéenne, Cedex, France

<sup>2</sup> CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Campus Agrário de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, Crasto, Vairão, Portugal

<sup>3</sup> Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Direction des Etudes et de la Recherche, Espace Alfred Sauvy, Prades, France

### Keywords

rock ptarmigan; sky island population; French Pyrenees; conservation genetics; habitat fragmentation; gene flow.

### Correspondence

J. Boissier, Laboratoire de Biologie et d'Écologie Tropicale et Méditerranéenne, UMR 5244 CNRS-EPHE Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan, Cedex, France. Tel: +33 4 68 66 20 50; Fax: +33 4 68 66 22 81 11 12  
Email: boissier@univ-perp.fr

Received 12 September 2008; accepted 8 December 2008

doi:10.1111/j.1469-1795.2008.00233.x

### Abstract

Expected consequences of global warming include habitat reduction in many cool climate species. Rock ptarmigan is a Holarctic grouse that inhabits arctic and alpine tundra. In Europe, the Pyrenean ptarmigan inhabits the southern edge of the species' range and since the last glacial maximum its habitat has been severely fragmented and is restricted to high-alpine zones or 'sky islands'. A recent study of rock ptarmigan population genetic in Europe found that the Pyrenean ptarmigan had very low genetic diversity compared with that found in the Alps and Scandinavia. Habitat fragmentation and reduced genetic diversity raises concerns about the viability of ptarmigan populations in the Pyrenees. However, information on population structuring and gene flow across the Pyrenees, which is essential for designing a sound management plan, is absent. In this study, we use seven microsatellites and mitochondrial control region sequences to investigate genetic variation and differentiation among five localities across the Pyrenees. Our analyses reveal the presence of genetic differentiation among all five localities and a significant isolation-by-distance effect that is likely the result of short dispersal distances and high natal and breeding philopatry of Pyrenean ptarmigan coupled with severe habitat fragmentation. Furthermore, analysis of molecular variance, principal component analysis and Bayesian analysis of genetic structuring identified the greatest amount of differentiation between the eastern and main parts of the Pyrenean chain separated by the Sègre Valley. Our data also show that the Canigou massif may host an isolated population and requires special conservation attention. We propose a management plan which includes the translocation of birds. If a sky island structure affects genetic divergence in rock ptarmigan, it may also affect the genetic structure of other sky island species having low dispersal abilities.

### Introduction

The evolutionary history of cold-adapted species is strongly influenced by climatic fluctuations which periodically push them to the limits of their ability to survive and reproduce. Following the last glacial retreat (about 10 000–15 000 years ago), many cool-climate species shifted their ranges north or became ice age relics in mountaintop refugia, the only zones which meet their ecological exigencies in temperate latitudes (McCarty, 2001). Through time, mountaintop refugia shrink and become fragmented, turning into small 'sky islands' of suitable habitat. Rapid climatic changes often trap sky island populations outside their favourable habitat (Jump & Penuelas, 2005). Furthermore, sky island isolation resulting in habitat fragmentation should inhibit gene flow and facilitate both genetic drift and local adaptations which, in turn, lead to rapid genetic differentiation. Gene flow

could offset the rapid differentiation of sky island populations but it depends on the distance between populations, species dispersal abilities, and geographic relief (Berthier *et al.*, 2005). Gene flow also affects the spatial distribution of alleles and genetic variability of local populations, possibly improving local adaptive potential. Without gene flow among them, small sky island populations risk inbreeding depression and may become vulnerable or face an 'extinction vortex' (Frankham, Ballou & Briscoe, 2002). Thus, it is critical to analyse spatial genetic structure and gene flow among sky island populations at a fine geographic scale in order to determine management priorities for their conservation.

Cold semi-desert suitable for rock ptarmigan covered most of southern Europe during the last glacial maximum. Over the last 10 000–15 000 years the climate became warmer, driving fragmentation and the disappearance of this

suitable habitat from southern Europe (Caizergues *et al.*, 2003a). The majority of current rock ptarmigan populations reside above 60° northern latitude. In southern Europe, this species has survived only in the alpine zone of the Alps and Pyrenees. However, in these mountains, suitable habitat is distributed in sky island patches at elevations above 2000 m. Several European countries recognize the vulnerability of the small, isolated southern populations of rock ptarmigan and list them in the national Red Data Books (Storch & Segelbacher, 2000). A recent study of the genetic structure of rock ptarmigan at a European scale (Caizergues *et al.*, 2003a) found that the endemic Pyrenean subspecies *Lagopus muta pyrenaica* has low genetic variability compared with that in the Alps and Scandinavia. The low genetic variability of Pyrenean rock ptarmigan could be the result of both the separation and subsequent lack of gene flow between Alpine and Pyrenean populations, and the significant population decline in the Pyrenees (Caizergues *et al.*, 2003a).

Phylogeography and historical biogeography could help to identify populations with distinct genetic and ecological characteristics. This approach was used for Neartic rock ptarmigan (Holder, Mongomerie & Friensen, 2000; Holder, Mongomerie & Friensen, 2004) and, in Europe, for *L. m. pyrenaica* in the Pyrenees and *Lagopus muta helvetica* in the Alps (Caizergues *et al.*, 2003a). In the Alps, populations are relatively large and interconnected via dispersal (Caizergues *et al.*, 2003a) and thus are an unlikely candidates for immediate conservation concern. In contrast, Pyrenean populations are small and have very low genetic diversity (Caizergues *et al.*, 2003a) making them highly vulnerable. Unfortunately, very little is known about the spatial structure of Pyrenean rock ptarmigan populations, which impedes their management and conservation. Available information suggests that population densities of rock ptarmigan are lower and the levels of fragmentation are higher in the Pyrenees than in the Alps (Observatoire des Galliformes de Montagne, 2003). Therefore, more detailed data on population structuring and gene flow between populations of Pyrenean rock ptarmigan are needed to aid in the identification of conservation priorities and in designing a management plan. At the fine geographic scale, several factors such as habitat fragmentation, patterns of natal dispersal and demographic processes (e.g. average survival, proportion of breeders, breeding success) could facilitate population fragmentation and subsequent genetic divergence among populations. For example, the strong natal and breeding philopatry of males rock ptarmigan (Clarke, Saether & Roskaft, 1997; Caizergues & Ellison, 2002) can promote population divergence and inbreeding. Furthermore, population size fluctuations related to changes in demographic parameters such as survival or breeding success could also favour population differentiation. In this study, we use microsatellite loci and mtDNA control region (CR) sequences to assess the population structure of the Pyrenean rock ptarmigan in five different regions of central and eastern Pyrenees. We used these data to: (1) measure the extent of divergence among local rock ptarmigan populations within the Pyrenees; (2) identify possible geographic

barriers to gene flow across the Pyrenees; (3) propose a management plan.

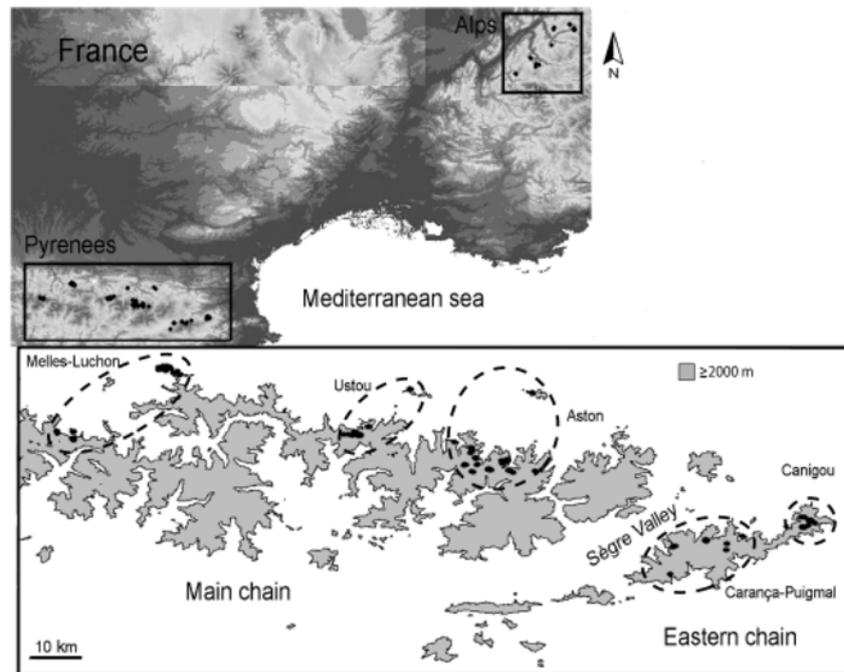
## Materials and methods

### Study area and sampling

Microsatellites were analysed for 117 rock ptarmigan collected in different regions of central and eastern Pyrenees. The sampling area represented more than 50% of the rock ptarmigan distribution range in the French Pyrenees. We grouped individuals into five sampling localities with at least 10 individuals per locality, grouping geographically close samples and each locality corresponding to a recognized geographic unit (Fig. 1). Liver and wings were collected during the hunting season in the main chain in Melles-Luchon ( $n = 19$ ), Ustou ( $n = 20$ ) and Aston ( $n = 45$ ). In the eastern chain, which is a protected area, we collected moult feathers or muscle samples from birds found dead during census or radio-tracking [Carança-Puigmal ( $n = 12$ ) and Canigou ( $n = 21$ )]. The maximum and minimum distances between locality centres were 147 km (Melles-Luchon/Canigou) and 16 km (Carança-Puigmal/Canigou), respectively. Mitochondrial CR sequences were obtained from a subsample of 82 birds from the Pyrenees (9, 17, 25, 10 and 21 from Melles-Luchon, Ustou, Aston, Carança-Puigmal and Canigou, respectively) and 18 from the Alps. Individuals from Alps were sampled in eight localities in the northern Alps (1, 1, 2, 2, 2, 3, 3 and 4 from Saint Jean de Belleville, Albiez Montrond, Beaufort, Vaujany, Saint Colomban Des Villards, Valloire, Haute Luce and Bourg Saint Maurice, respectively). The maximum distance between two individuals was 68 km.

### Laboratory methods

DNA from liver and wings was extracted using the following phenol-chloroform protocol: a 5 mg fragment was incubated for 4–5 h at 50 °C in 400  $\mu$ L of extraction buffer (10 mM tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA), 10  $\mu$ L sodium dodecyl sulphate 10% and 20  $\mu$ L of 10 mg mL<sup>-1</sup> proteinase K. Next, we added 400  $\mu$ L of phenol (Tris-HCl, pH 8 saturated), the solution was gently mixed for 10 min and centrifuged for 2 min at 18928 g. After centrifugation, we added 400  $\mu$ L of chloroform-isoamyl alcohol to the supernatant, slowly mixed it for 10 min, and added 40  $\mu$ L of 3 M sodium acetate, pH 5.2 and 1 mL of 95% ethanol. The solution was vortexed and then incubated at -20 °C for 1 h. After this incubation the solution was centrifuged for 30 min at 18928 g and 4 °C, and the supernatant was taken out and mixed with 1 mL of 70% ethanol. We centrifuged the mix for 10 min at 18928 g and 4 °C, and collected the supernatant which was dried and resuspended in 50  $\mu$ L of 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 1 mM EDTA. DNA from feathers was extracted using silica columns (QIAmp DNA, Qiagen Mini Kit, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol using 10  $\mu$ L of proteinase K. The elution was carried out in 100  $\mu$ L of dnase-free water. All samples were genotyped with seven



**Figure 1** Map of the geographical locations of the sampled populations. Each black point represents one bird. The grey area corresponds to the suitable habitat for the rock ptarmigan *Lagopus muta pyrenaica* above 2000 m elevation.

microsatellite markers, all of which were developed in other avian species: LLS7 (Piertney & Dallas, 1997), LLST5, LLST7 (Piertney *et al.*, 1998), TTT2 (Caizergues *et al.*, 2001), BG6, BG15 and BG19 (Piertney & Höglund, 2001). Polymerase chain reactions (PCRs) were performed in a 25  $\mu$ L volume and contained 1  $\mu$ L of extraction product, 0.04  $\times$  of DNA, 0.5  $\times$  of GoTaq<sup>TM</sup> reaction buffer (Promega), 0.1 mM of dNTPs (Promega, Madison, WI, USA), 0.625 U of GoTaq<sup>TM</sup> DNA Polymerase (Promega), 1  $\mu$ M of each primer and 0.1 M of BSA. Amplifications were performed in a PTC 100 thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA). The initial denaturation of 5 min at 95  $^{\circ}$ C was followed by 40 cycles of 1 min at 95  $^{\circ}$ C, 30 s at the annealing temperature of 57.6  $^{\circ}$ C (for LLST5, LLS7, TTT2, BG6, BG15 and BG19), 61.2  $^{\circ}$ C (for LLST7), and 1 min at 72  $^{\circ}$ C and a final extension of 10 min at 72  $^{\circ}$ C. PCR products were diluted in sample loading solution (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) with red-labeled size standard (CEQ<sup>TM</sup> DNA size standard kit, 400, Beckman Coulter) and electrophoresed on an automatic sequencer (CEQ<sup>TM</sup> 8000, Beckman Coulter). Allele sizes were determined using the fragment analyzer package from Beckman Coulter.

The mtDNA CR (*c.* 1150 bp) was amplified using primers H1255 (CATCTGGCATCTTCAGTGCC) and L16750 (AGGACTACGGCTTGAAAAGC) (Sorenson *et al.*, 1999), using the same profile as above with an annealing temperature of 57  $^{\circ}$ C.

After purification with Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Cleanup System (Promega) PCR products were sequenced directly using two internal primers L537 (CCTCTGGTTCCTC GGTCAG) and H774 (CCATACACGCAAACCGTCTC; both (Sorenson *et al.*, 1999). Editing and alignment of CR sequences were performed using Sequencher v. 4.2 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

## Molecular analyses

We used Micro-checker v. 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004) to detect null alleles. To test for departures from Hardy–Weinberg equilibria and for linkage disequilibria, we used exact tests based on a Markov Chain (1000 permutations) as implemented in Genepop v. 3.4 (Raymond & Rousset, 1995). The level of significance was adjusted for multiple testing using a Bonferroni correction. Polymorphism was estimated over all loci for each location. We computed the number of alleles ( $A$ ), allelic richness ( $A_n$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ) and  $F_{is}$  (Weir & Cockerham, 1984) using FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 2001) with 800 permutations. The heterozygosity ( $H_o$ ) (Weir & Cockerham, 1984) was estimated using Genepop v. 3.4. Friedman tests (Hollander & Wolfe, 1973) were performed with  $H_e$  and  $A_n$  in each of the five populations examined by locus. In this approach each population is ranked according to its  $H_e$  (or  $A_n$ ) at a particular locus, the average rank of each population across all loci is then calculated and the null hypothesis that the ranks do not differ from the expected value is tested using  $\chi^2$ . When a difference is detected by Friedman test, a Wilcoxon test is performed between pairs of populations. These non-parametric tests for paired comparisons were appropriate because homologous loci were used in the different populations.

Mitochondrial variability – number of haplotypes ( $N_h$ ), haplotype diversity ( $H$ ) and nucleotide diversity ( $\pi_n$ ) was calculated using DnaSP v. 4.50.3 (Rozas *et al.*, 2003).  $F_{st}$  values from mtDNA were calculated using Arlequin v. 2.000 (Schneider, Roessli & Excoffier, 2000).

We used FSTAT to calculate pairwise  $F_{st}$  values according to Weir & Cockerham (1984). The global analysis for all five locations was performed using principal component

analysis (PCA) of individual genotypes with the software Genetix v. 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004). Genetic differentiation among groups of populations identified by PCA, was tested using analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier, Smouse & Quattro, 1992) implemented in Arlequin v. 2.000. Finally, population structure was also examined using the Bayesian approach implemented in Structure v. 2.0 (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000). We chose the admixture model and the option of correlated allele frequencies among populations. This software permitted the assignment of individuals to a user-defined number of clusters ( $K$ ). The maximal probability value of  $K$  was obtained by comparing the likelihood of the data for different values of  $K$  from 1 to 5. Each simulation was replicated 20 times as recommended (Evanno, Regnaut & Goudet, 2005). We used Mantel test (10 000 permutations) implemented in Genepop v. 3.4 to test for the presence of isolation-by-distance (IBD) by regressing pairwise estimates of  $F_{st}/(1-F_{st})$  against straight-line distances (in km).

We used Bayesass version 1.2 (Wilson & Rannala, 2003) to estimate migration rates between all rock ptarmigan populations. This program, using a Markov chain Monte Carlo approach, was run for a total of  $30 \times 10^6$  iterations discarding the first  $10^6$  iterations as burn-in. Samples were collected every 2000 iterations. Our final runs used delta values of 0.15, 0.15 and 0.15 for the parameters estimated for allele frequency, migration rate and inbreeding.

## Results

### Distribution of the genetic variability

We detected no evidence for null alleles, linkage disequilibrium or departure from Hardy–Weinberg expectations. After adjusting the significance level for the number of pairwise comparisons of populations and loci, only four of the 105 exact tests for linkage equilibrium remained significant ( $P$ -value threshold after Bonferroni correction,  $P = 0.0005$ ). All of these significant  $P$ -values were randomly distributed across loci and populations, and became non significant at a global level. Two of the 35 population–locus combinations deviated significantly from Hardy–Weinberg expectations ( $P$ -value threshold after Bonferroni correction,  $P = 0.0014$ ). The significant  $P$ -values were observed in two different loci and in two different populations (TTT2 in Aston and BG20 in Melles-Luchon). All microsatellite loci were polymorphic with an allelic richness ( $A_n$ ) ranging from 3.48 to 10.56 and a genetic diversity ( $H_e$ ) ranging from 0.62 to 0.87 over all populations (Table 1). No  $F_{is}$  values were significantly different from 0. Both allelic richness and expected heterozygosity were lowest in Canigou, although the differences were significant only for the allelic richness (Friedman test:  $P = 0.006$ ). Pairwise Wilcoxon's tests revealed that allelic richness was lower in Canigou than in Aston ( $P = 0.01$ ), Ustou ( $P = 0.02$ ), Melles-Luchon ( $P = 0.02$ ) and Carança-Puigmal ( $P = 0.06$ ).

The comparison of mtDNA CR sequences identified a total of nine haplotypes determined by seven polymorphic

sites and no indels. The average number of nucleotide differences between Alps and Pyrenees was 2.701 and a single site distinguished all Pyrenean haplotypes from all Alpine ones (0.09% divergence). Pyrenean ptarmigan (Table 1) had much lower genetic diversity than birds from the Alps. There were only three haplotypes (GenBank accession numbers: EU861049–EU8610450–EU8610451) among 82 individuals in the entire Pyrenean sample with  $H = 0.432 \pm 0.047$  and  $\pi_n = 0.00039 \pm 0.00005$ . The Alpine samples had six haplotypes among 18 individuals with  $H = 0.680 \pm 0.012$  and  $\pi_n = 0.00099 \pm 0.00022$ . Within the Pyrenees, the main chain localities had all three Pyrenean haplotypes, whereas the eastern chain had only one haplotype.

### Population genetic structure and migration

There was significant population subdivision at microsatellite loci. Pairwise  $F_{st}$  values ranged from 0.03 to 0.12 (overall  $F_{st} = 0.05$ ) and all were significant (Table 2) indicating the presence of genetic differentiations among all sampled localities. Another pattern of genetic differentiation among localities emerged from the comparison of pairwise  $F_{st}$  values. The lowest  $F_{st}$  values were found between Canigou and Carança-Puigmal, and among Aston, Ustou and Melles-Luchon representing the eastern and main parts of the Pyrenees, respectively. In contrast, pairwise  $F_{st}$  values between localities from the two different parts of the Pyrenees separated by Sègre Valley (Fig. 1) were much higher.

The differentiation between the main and eastern parts of the Pyrenees was confirmed by both PCA (Fig. 2) and AMOVA. The differences in PC1 values among localities were much smaller within the two parts of Pyrenees than between them. Our AMOVA showed that although differences among individuals accounted for 92.4% ( $P < 0.0001$ ) of variation observed in the data, which is not surprising for hypervariable markers such as microsatellites, the differences between the two parts of the Pyrenees accounted for 5.3% ( $P < 0.0001$ ) of the variation, over twice that accounted for by differences among localities within the two parts (2.3%,  $P < 0.0001$ ).

In concert with the results above, the Bayesian analysis of genetic structuring retrieved the highest posterior probability for two clusters ( $K = 2$ ) that represented the eastern and main Pyrenees. Most individuals from Canigou and Carança-Puigmal were assigned to cluster 1 (mean  $\pm$  SD:  $91 \pm 1.2\%$  and  $75 \pm 0.8\%$ , respectively) while most individuals in Aston, Ustou and Melles-Luchon were assigned to cluster 2 ( $70 \pm 0.9\%$ ,  $90 \pm 1.6\%$  and  $82 \pm 1.4\%$ , respectively). Finally, Mantel testing identified a significant positive correlation between genetic and geographic distances among localities ( $r = 0.61$ ;  $P = 0.05$ ) indicating a strong IBD effect on population differentiation (Fig. 3).

Bayesass detected a low migration rate among most localities and a high proportion of local individuals ( $>71\%$ , Table 3) suggesting that locations were isolated from each other. Migration rates between each side of the

**Table 1** Summary information for the seven microsatellite loci and mtDNA control region sequences (1150bp) for the five sampling localities of *Lagopus muta pyrenaica*

	Main chain			Eastern chain		Overall population
	Melles-Luchon	Ustou	Aston	Carança-Puigmal	Canigou	
<b>LLSD7</b>						
$A/A_n$	5/4.24	6/4.93	8/5.18	5/4.64	4/3.63	8/5.21
$H_e/H_o$	0.55/0.53	0.63/0.68	0.65/0.69	0.70/0.75	0.65/0.76	0.64/0.68
$F_{is}$	0.04	-0.09	-0.05	-0.08	-0.18	-0.07
<b>LLST5</b>						
$A/A_n$	15/10.32	11/7.87	19/10.25	7/6.70	10/7.52	24/10.56
$H_e/H_o$	0.92/0.90	0.83/0.74	0.92/0.95	0.82/0.80	0.86/0.78	0.87/0.83
$F_{is}$	0.03	0.11	-0.04	0.03	0.09	0.05
<b>LLST7</b>						
$A/A_n$	8/5.99	6/5.56	8/5.9	7/7	7/5.34	11/6.57
$H_e/H_o$	0.77/0.56	0.80/0.75	0.76/0.69	0.83/0.89	0.76/0.52	0.78/0.68
$F_{is}$	0.28	0.07	0.09	-0.08	0.31	0.13
<b>TTT2</b>						
$A/A_n$	4/3.39	3/2.98	5/3.72	4/3.89	4/2.86	5/3.48
$H_e/H_o$	0.60/0.56	0.62/0.80	0.69/0.49	0.63/0.67	0.56/0.48	0.62/0.60
$F_{is}$	0.08	-0.30	0.29	-0.05	0.14	0.03
<b>BG6</b>						
$A/A_n$	9/7.59	7/5.91	7/6.34	6/5.64	7/5.20	9/6.42
$H_e/H_o$	0.87/0.68	0.81/0.75	0.84/0.82	0.79/0.83	0.71/0.62	0.80/0.74
$F_{is}$	0.21	0.07	0.02	-0.05	0.13	0.08
<b>BG19</b>						
$A/A_n$	4/3.70	4/3.82	5/3.86	4/3.94	4/3.67	5/4.11
$H_e/H_o$	0.62/0.53	0.65/0.50	0.61/0.64	0.68/0.75	0.69/0.62	0.65/0.61
$F_{is}$	0.16	0.24	-0.05	-0.11	0.10	0.07
<b>BG15</b>						
$A/A_n$	5/4.63	5/4.45	5/4.77	4/3.64	1/1.00	5/4.50
$H_e/H_o$	0.69/0.72	0.75/0.79	0.76/0.77	0.50/0.54	0 (fixed allele)	0.67/0.71
$F_{is}$	-0.04	-0.06	-0.02	-0.09	fixed allele	-0.05
<b>Overall loci</b>						
$A/A_n$	7.14/5.69	6/5.08	8.14/5.72	5.29/5.06	5.29/4.17	9.57/5.84
$H_e/H_o$	0.72/0.64	0.73/0.72	0.75/0.72	0.71/0.75	0.70/0.63	0.72/0.69
$F_{is}$	0.11	0.01	0.04	-0.06	0.10	0.03
<b>mtDNA</b>						
$H_{ap}$	3	2	2	1	1	3
$H$	0.667 ± 0.132	0.533 ± 0.046	0.471 ± 0.063	0	0	0.432 ± 0.047
$\pi_n$	0.00083 ± 0.00070	0.00046 ± 0.00045	0.00040 ± 0.00040			0.00039 ± 0.00005

Number of alleles ( $A$ ), Allelic richness ( $A_n$ ), expected ( $H_e$ ) and observed ( $H_o$ ) heterozygosity,  $F_{is}$  according to Weir & Cockerham (1984), number of haplotypes ( $H_{ap}$ ), haplotype diversity ( $H \pm SD$ ) and nucleotide diversity ( $\pi_n \pm SD$ ).

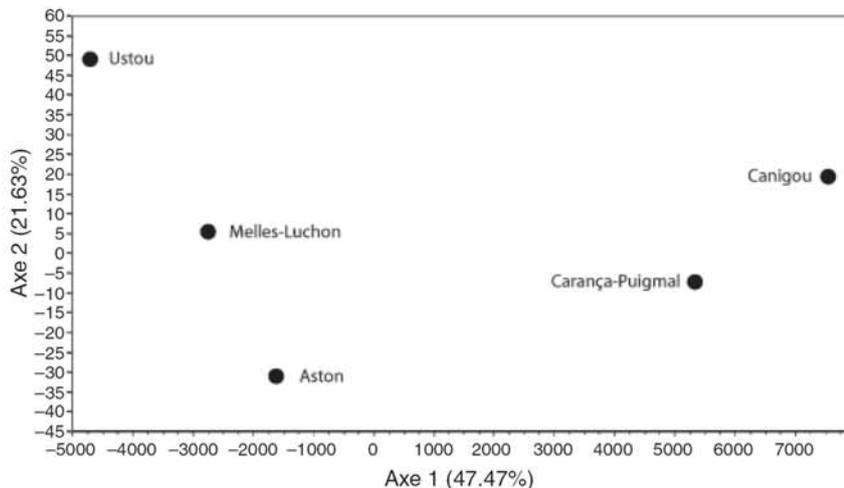
**Table 2**  $F_{st}$  values for each pairwise population comparison (below diagonal) and their significance levels (above diagonal) calculated for microsatellite loci

	Canigou	Carança-Puigmal	Aston	Ustou	Melles-Luchon
Canigou	–	0.021	0.0001	0.0001	0.0001
Carança-Puigmal	0.03	–	0.0001	0.0001	0.0029
Aston	0.09	0.04	–	0.0001	0.0001
Ustou	0.12	0.08	0.03	–	0.0025
Melles-Luchon	0.10	0.04	0.02	0.03	–

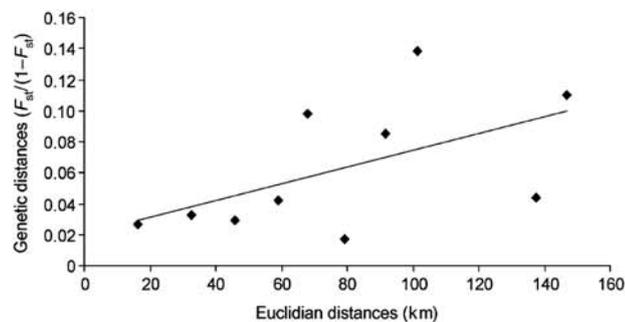
Bonferroni critical  $P$ -value = 0.005.

Sègre Valley (i.e. between main vs. eastern Pyrenees) were low (< 7%). When localities from the main and the eastern Pyrenees are grouped, proportions of immigrants were 4.3% (0.6–9.9) and 3.5% (0.3–8.1), respectively. In the eastern

Pyrenees, gene flow appears to be strongly asymmetrical with many birds migrating from Canigou to Carança-Puigmal 23% (0.13–0.31) but not in the opposite direction 0.005% (0.0–0.03).



**Figure 2** Results of principal component analysis based on microsatellite data for five sampled localities of the rock ptarmigan *Lagopus muta pyrenaica* in the Pyrenees.



**Figure 3** Pairwise genetic differentiation plotted against Euclidian distances between populations.

Unlike microsatellite data, mtDNA CR sequence data identified differentiation only between the main and eastern Pyrenees but not among localities within each part of the range. None of the pairwise  $F_{st}$  values were significantly different from 0 when populations were compared within each part of the range but all were significant for comparison of localities from different parts of the range (Table 4). The only exception to the latter was the  $F_{st}$  value (0.194) for Aston and Carança-Puigmal which was not quite significant ( $P = 0.0631 \pm 0.0237$ ). The AMOVA of CR sequences supported the same pattern of differentiation as microsatellite markers. Differences among individuals within localities accounted for 64.87% ( $P < 0.001$ ) of variance in the dataset, differences among localities within eastern and main Pyrenees accounted for 3.74% ( $P = 0.15 \pm 0.01$ ), and differences between the two parts of Pyrenees accounted for 31.38% ( $P = 0.10 \pm 0.01$ ). The latter proportion, although an order of magnitude greater than the proportion of variance explained by differences among localities within regions, was only marginally significant. We believe that AMOVA of CR sequences results remains informative and that the absence of significance is a reflection of the low CR diversity of Pyrenean ptarmigan (only three haplotypes among 82 birds). A very large number of birds would be required to reject genetic similarity of the regional samples.

## Discussion

Our analyses revealed significant genetic structuring in rock ptarmigan within the Pyrenees. Genetic structuring on such a fine geographic scale has been found in several grouse: the black grouse *Tetrao tetrix* (Caizergues *et al.*, 2003b), capercaillie *Tetrao urogallus* (Segelbacher & Storch, 2002; Segelbacher, Høglund & Storch, 2003), red grouse *Lagopus lagopus scoticus* (Piertney *et al.*, 1998), sage-grouse *Centrocercus urophasianus* (Oyler-McCance, Taylor & Quinn, 2005) and Alpine rock ptarmigan *Lagopus muta helvetica* (Caizergues *et al.*, 2003a). The IBD-driven genetic structuring observed in this study could be associated with short dispersal distances and the philopatric behavior of the birds. The known natal dispersal distances are 0.2 and 5.9 km for two males and 5.2 and 17.7 km for two hens (Novoa *et al.*, 2005). The maximum distance for seasonal movements in the Pyrenees is 24.4 km recorded for an adult hen (J. F. Brenot & C. Novoa, unpubl. data). In all of these cases, rock ptarmigan dispersed within a continuous patch of suitable habitat and did not cross unsuitable areas. In addition to the limited dispersal, male rock ptarmigan exhibit strong philopatric behavior (Caizergues *et al.*, 2003a) and females have strong fidelity to reproductive sites (Novoa *et al.*, 2005). These behaviors may limit gene flow between populations.

Our study also showed that the Sègre Valley, which descends to elevations of 1100–1300 m and is 18 km wide, splits the Pyrenean rock ptarmigan into two distinct units: one in the main chain (Aston, Ustou and Melles-Luchon) and another one in the eastern chain (Carança-Puigmal and Canigou). Habitat fragmentation has been found to be effective in limiting gene flow in some grouse (Caizergues *et al.*, 2003a; Segelbacher *et al.*, 2003; Oyler-McCance *et al.*, 2005). However, all these studies have considered a large sampling area with fairly large distances among sampled localities. In this study, we showed that a narrow, only 18 km wide gap in suitable habitat might constitute a barrier to gene flow in rock ptarmigan. The Sègre Valley could be also a geo-morphological barrier to the gene flow for endemic mountain populations of other galliforms like the

**Table 3** Migration rates among Pyrenean rock ptarmigan localities using the program Bayesass

Migration from	Migration into				
	Main chain			Eastern chain	
	Melles-Luchon	Ustou	Aston	Carança-Puigmal	Canigou
Canigou	<i>0.023 (0.000–0.088)</i>	<i>0.006 (0.000–0.033)</i>	<i>0.071 (0.010–0.144)</i>	0.232 (0.132–0.316)	<b>0.982 (0.938–0.999)</b>
Carança-Puigmal	<i>0.010 (0.000–0.053)</i>	<i>0.008 (0.000–0.041)</i>	<i>0.007 (0.000–0.030)</i>	<b>0.692 (0.667–0.756)</b>	0.005 (0.000–0.030)
Aston	0.025 (0.000–0.122)	0.012 (0.000–0.073)	<b>0.715 (0.667–0.844)</b>	<i>0.018 (0.000–0.076)</i>	<i>0.004 (0.000–0.024)</i>
Ustou	0.195 (0.000–0.317)	<b>0.911 (0.669–0.999)</b>	0.150 (0.001–0.288)	<i>0.036 (0.000–0.136)</i>	<i>0.005 (0.000–0.027)</i>
Melles-Luchon	<b>0.747 (0.667–0.988)</b>	0.063 (0.000–0.314)	0.057 (0.000–0.276)	<i>0.022 (0.000–0.106)</i>	<i>0.005 (0.000–0.026)</i>

Values show the migration rates into each population, and their respective 95% confidence intervals in parentheses. Values in bold represent the proportions of individuals derived from their own population. Values in italic represent migration rates between the main and eastern chains.

**Table 4**  $F_{st}$  values for each pairwise population comparison (below diagonal) and their significance levels (above diagonal) calculated for mitochondrial data

	Canigou	Carança-Puigmal	Aston	Ustou	Melles-Luchon
Canigou	–	0.9910 ± 0.0030	0.0090 ± 0.0091	0	0
Carança-Puigmal	0	–	0.0631 ± 0.0237	0.0180 ± 0.0121	0
Aston	0.27024	0.19393	–	0.2162 ± 0.0454	0.0811 ± 0.0212
Ustou	0.53226	0.42785	0.03961	–	0.4955 ± 0.0390
Melles-Luchon	0.55505	0.41176	0.09623	–0.01009	–

capercaille *Tetrao urogalus aquitanus* which is also characterized by short dispersal distances (Regnaut, 2004).

Finally, our results based on CR agree with previous results based on microsatellite markers (Caizergues *et al.*, 2003a) showing that genetic diversity of Pyrenean rock ptarmigan is much lower than that of Alpine birds. Among Pyrenean populations, the eastern chain displays very low genetic variability with only a single CR haplotype present. Furthermore, Canigou massif had the lowest allelic richness among sampled localities. The barrier to gene flow imposed by the Sègre Valley could not explain this decline in allelic richness because the other east Pyrenean massif Carança-Puigmal had similar allelic richness to that observed in localities to the west of Sègre Valley. It is possible that the reduced allelic richness in Canigou rock ptarmigan resulted from its peripheral location. Indeed, the Canigou represents the eastern limit of the rock ptarmigan range in the Pyrenees (Fig. 1). The predominant gene flow from the peripheral Canigou to Carança-Puigmal, in turn, could explain why genetic diversity on the Canigou massif remains low. Preliminary data on movements of radio-marked rock ptarmigan seem to confirm the asymmetry in migration primarily from Canigou to Carança-Puigmal (Novoa *et al.*, 2005).

Our indirect estimates of migration rates, however, may be erroneous. The Carança-Puigmal and Canigou massifs are connected by a narrow corridor of suitable habitat that may interfere with gene flow between them. In the absence of gene flow, shared alleles will be more frequent in the less diverse, peripheral population than in the more diverse population and an individual harbouring a combination of shared alleles will be identified as migrant from the periph-

eral to the diverse population. Most allele combinations from Canigou should be present in Carança-Puigmal, but not the opposite. Thus, migrations would be identified from Canigou to Carança-Puigmal but not in the opposite direction. Extensive radio tracking of rock ptarmigan in the eastern chain is required to validate the asymmetrical gene flow from Canigou to Carança-Puigmal.

Genetic management units are sets of demographically independent populations with significant divergence of allele frequencies at nuclear or mitochondrial loci, regardless of the phylogenetic distinctiveness of the alleles (Moritz, 1994). The strong genetic differentiation between the eastern and the main Pyrenees seems to argue for recognition of two management units separated by the Sègre Valley. However, a management plan should not be based solely on genetic analysis. It should also consider the ecology and demography of populations (Crandall *et al.*, 2000). An ecological and demographic study of rock ptarmigan in the eastern Pyrenees is currently in progress.

Our data also suggest that the Canigou massif may host a small, isolated population and requires special conservation attention. The importance of the genetic variation for the health and viability of populations has been actively debated. It has been shown that low genetic diversity decreases the fertility and hatching success in several grouse (Bouzat *et al.*, 1998) and increases their susceptibility to infectious diseases (Naugle *et al.*, 2007). One possible solution is the translocation of individuals from more diverse populations to genetically depauperate ones in order to increase their reproductive success and viability. The IBD-driven genetic structuring that was observed among our localities implies

gene flow between neighbouring populations and differentiation among distant ones, increasing the possibility of local adaptation. In such cases, translocations should involve neighbouring rather than distant populations. Such a translocation strategy is used for the restoration of Evermann's rock ptarmigan *Lagopus muta evermanni* in the Aleutian Islands (Kaler, 2007) and should be considered for Pyrenean ptarmigan. However, as stated above, management action such as translocation should also consider ecologic and demographic data which are currently being collected.

Finally, the isolation in multiple European sky island refugia is responsible, at least in part, for genetic divergence in rock ptarmigan. If sky island structure affects genetic divergence in rock ptarmigan it may also influence the genetic structure of other sky island species such as the Pyrenean chamois *Rupicapra rupicapra pyrenaica*, the Big-horn sheep *Ovis canadensis* or the Mexican Jay *Aphelocoma ultramarina* in North America.

## Acknowledgements

This work was funded by the Bureau des Ressources Génétiques (BRG), the Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS), the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). We are grateful to local hunters and wildlife refuge personnel who helped with sample collection. Many thanks also to V. Laurent for statistical advice and J.F. Allienne for molecular technical assistance. J. Langand, A. Théron, A. Caizergues, and S. Regnaut provided helpful comments on the paper.

## References

- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. (2004). Genetix 4.05. <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/intro.htm>
- Berthier, K., Galan, M., Foltête, C., Charbonnel, N. & Cosson, J.F. (2005). Genetic structure of the cyclic fossorial water vole (*Arvicola terrestris*): landscape and demographic influences. *Mol. Ecol.* **14**, 2861–2871.
- Bouzat, J.L., Cheng, H.H., Lewin, H.A., Westemeuer, R.L., Brawn, J.D. & Paige, K.N. (1998). Genetic evaluation of a demographic bottleneck in the greater prairie chicken. *Conserv. Biol.* **12**, 836–843.
- Caizergues, A., Bernard-Laurent, A., Brenot, J.F., Ellison, L. & Rasplus, J.Y. (2003a). Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in northern and western Europe. *Mol. Ecol.* **12**, 2267–2274.
- Caizergues, A., Dubois, S., Loiseau, A., Mondor, G. & Rasplus, J.Y. (2001). Isolation and characterization of microsatellite loci in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Mol. Ecol. Notes* **1**, 36–38.
- Caizergues, A. & Ellison, L.N. (2002). Natal dispersal and its consequences in black grouse *Tetrao tetrix*. *Ibis* **144**, 478–487.
- Caizergues, A., Rätti, O., Helle, P., Rotelis, L., Ellison, L. & Rasplus, J.Y. (2003b). Population genetic structure of male black grouse (*Tetrao tetrix*) in fragmented vs. continuous landscapes. *Mol. Ecol.* **12**, 2297–2305.
- Clarke, A.L., Saether, B.E. & Roskaft, E. (1997). Sex biases in avian dispersal: a reappraisal. *Oikos* **79**, 429–238.
- Crandall, K.A., Binida-Edmonds, O.R.P., Mace, G.M. & Wayne, R.K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol. Evol.* **15**, 290–295.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* **14**, 2611–2620.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotype: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479–491.
- Frankham, R., Ballou, J. & Briscoe, D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Goudet, J. (2001). *Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)*. 2003. Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html>
- Holder, K., Mongomerie, R. & Friensen, V.L. (2000). Glacial vicariance and historical biogeography of rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) in the Bering region. *Mol. Ecol.* **9**, 1265–1278.
- Holder, K., Mongomerie, R. & Friensen, V.L. (2004). Genetic diversity and management of Nearctic rock ptarmigan (*Lagopus mutus*). *Can. J. Zool.* **82**, 564–575.
- Hollander, M. & Wolfe, D.A. (1973). *Nonparametric statistical methods*. New York: John Wiley & Sons.
- Jump, A.S. & Penuelas, J. (2005). Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecol. Lett.* **8**, 1010–1020.
- Kaler, R.S.A. (2007). *Demography, habitat use and movements of a recently reintroduced island population of Evermann's rock ptarmigan*. PhD thesis, Kansas State University.
- McCarty, J.P. (2001). Ecological consequences of recent climate change. *Conserv. Biol.* **15**, 320–331.
- Moritz, C. (1994). Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 373–375.
- Naugle, D.E., Aldridge, C.L., Walker, B.L., Cornish, T.E., Moynahan, B.J., Holloran, M.J., Brown, K., Johnson, G.D., Schmidtman, E.T., Mayer, R.T., Kato, C.Y., Matchett, M.R., Christiansen, T.J., Cook, W.E., Creekmore, T., Falise, R.D., Rinkes, E.T. & Boyce, M.S. (2007). West Nile virus: pending crisis for greater sage-grouse. *Ecol. Lett.* **7**, 704–713.
- Novoa, C., Ellison, L., Desmet, J.F., Miquet, A., Sentilles, J. & Sarrazin, F. (2005). *Lagopède alpin: Démographie et impact des activités humaines*. Etude, 52 pp.
- Observatoire des Galliformes de Montagne. (2003). Rapport annuel, Sevrier, 310 pp.

- Oosterhout, C.V., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P. (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol.* **4**, 535–538.
- Oyler-McCance, S.J., Taylor, S.E. & Quinn, T.W. (2005). A multilocus population genetic survey of the greater sage-grouse across their range. *Mol. Ecol.* **14**, 1293–1310.
- Piertney, S.B. & Dallas, J.F. (1997). Isolation and characterization of hypervariable microsatellites in the red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Mol. Ecol.* **6**, 93–95.
- Piertney, S.B. & Höglund, J. (2001). Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Mol. Ecol.* **1**, 303–304.
- Piertney, S.B., Maccoll, A.D., Bacon, P.J. & Dallas, J.F. (1998). Local genetic structure in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): evidence from microsatellite DNA markers. *Mol. Ecol.* **7**, 1645–1654.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* **86**, 248–249.
- Regnaut, S. (2004). *Population genetics of capercaillie (Tetrao urogallus): a non-invasive approach to avian conservation*. PhD thesis, University of Lausanne.
- Rozas, J., Sánchez-Delbarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003). Dnasp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496–2497.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. (2000). *Arlequin: a software for population genetics data analysis. V. 2.001*. Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Segelbacher, G., Höglund, J. & Storch, I. (2003). From connectivity to isolation; genetic consequences of population fragmentation in capercaillie across Europe. *Mol. Ecol.* **12**, 1773–1780.
- Segelbacher, G. & Storch, I. (2002). Capercaillie in the Alps: genetic evidence of metapopulation structure and population decline. *Mol. Ecol.* **11**, 1669–1677.
- Sorenson, M.D., Ast, J.C., Dimcheff, D.E., Yuri, T. & Mindell, D.P. (1999). Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenet. Evol.* **12**, 105–114.
- Storch, I. & Segelbacher, G. (2000). Genetic correlates of spatial population structure in central European capercaillie *Tetrao urogallus* and black grouse *T. tetrix* a project in progress. *Wildl. Biol.* **6**, 305–310.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358–1370.
- Wilson, G.A. & Rannala, B. (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* **163**, 1177–1191.

(Programme POCTEFA 2007-2013 / Projet GALLIPYR» – Chef de file GEIE FORESPIR)

## Action de translocation de lagopède alpin depuis la Haute-Chaîne des Pyrénées vers le chaînon Puigmal – Canigou

### Note de présentation

Claude Novoa <sup>(a)</sup>, Jean Resseguier <sup>(a)</sup>, Ramon Martinez Vidal <sup>(b)</sup>, Marc Mossoll Torres <sup>(c)</sup>,  
Diego Garcia Ferrer <sup>(b)</sup> & Landry Riba Mandicó <sup>(c)</sup><sup>1</sup>

(a) Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage

(b) Generalitat de Catalunya

(c) Govern d'Andorra

#### *Des populations marginales fragilisées*

Sur la chaîne des Pyrénées, le lagopède alpin est présent de façon continue depuis la haute-vallée de Roncal à l'ouest jusqu'aux montagnes du Capcir et du Donezan à l'est. A côté de ce noyau principal, centré sur la Haute-Chaîne axiale, l'espèce se rencontre également sur quelques massifs périphériques situés aux marges Nord et surtout Est de l'aire de répartition (Montaigu, Trois Seigneurs, Montagne du Tabe, Madres, chaînon Puigmal-Canigou).

L'isolement plus ou moins marqué de ces populations périphériques, ainsi que leur taille souvent réduite, les rendent un peu plus vulnérables aux aléas climatiques et démographiques. La disparition de l'espèce sur le massif du Madres au cours des années 80-90 est un exemple concret de la vulnérabilité de ces isolats. Présente en toute saison sur ce massif jusqu'au début des années 80, l'espèce n'y est plus observée aujourd'hui que de façon occasionnelle. Culminant souvent à des altitudes plus modestes, ces massifs périphériques devraient être les premiers concernés par le recul de l'espèce confrontée au réchauffement climatique et sont donc à ce titre de véritables sentinelles de l'état de santé des populations pyrénéennes de lagopède alpin.

Pour les espèces à faibles capacités de dispersion, l'isolement géographique des populations se traduit souvent par une perte de diversité génétique qui à son tour, peut avoir des conséquences sur la démographie des populations concernées. Un tel enchaînement a été montré chez le tétras des prairies (*Tympanuchus cupido*) en Amérique du Nord (Bouzat et al., 1998). Chez cette espèce, la perte de diversité génétique constatée sur une population isolée a eu pour principale conséquence une baisse du taux d'éclosabilité des œufs et donc de la

<sup>1</sup> Avec la collaboration de : Jérôme Boissier et Nicolas Bech (Université de Perpignan), Pere Isern Ignasi (biològ, Camprodon), Xavier Parellada Viladoms, Jordi Xifra Corominas, Santi Ramos, Daniel Oliveira Aguilà, Jordi Gràcia i Agents Rurals de Cerdanya i Ripolles (GENCAT), Unitat de Suport Aeri del Agents Rurals (GENCAT) et Agents techniques de l'Environnement de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (Pyrénées Orientales).

(Programme POCTEFA 2007-2013 / Projet GALLIPYR» – Chef de file GEIE FORESPIR)

fertilité. A l'échelle européenne, les populations pyrénéennes de lagopède alpin ont une diversité génétique plus faible que leurs homologues des Alpes ou de Scandinavie (Caizergues et al., 2003). Plus récemment, une étude sur la structuration génétique de ces populations pyrénéennes a montré que cet appauvrissement génétique était encore plus marqué sur le massif Canigou-Puigmal, un chaînon oriental isolé de la chaîne axiale par le plateau de Cerdagne (Bech et al., 2009). Ce plateau représente en effet une discontinuité d'environ 20km entre les zones à lagopède du Puigmal et celles du Puigpedros et joue donc le rôle de barrière au flux génique. Une question non résolue dans le cadre de cette dernière étude est de savoir depuis quand cette discontinuité entre la haute chaîne et le noyau oriental est effective. Enfin, on ne sait pas non plus si cette perte de diversité génétique a déjà ou non des conséquences démographiques, même s'il apparaît que le succès de la reproduction est en moyenne meilleur sur les populations d'Andorre-Haute-Ariège que sur le noyau oriental.

#### *Freiner la perte de diversité génétique*

L'idée d'une translocation d'individus depuis les populations de la Haute-Chaîne vers le chaînon oriental Puigmal-Canigou a été proposée à titre expérimental pour tenter de freiner cette perte de diversité génétique. L'action rejoint en cela les préconisations de l'IUCN en matière de réintroduction et de renforcement de populations de tétraonidés, préconisations qui soulignent l'importance future des translocations dans le maintien de la diversité génétique des populations isolées (Storch 2007)<sup>2</sup>. Au-delà du simple objectif de portée locale, l'opération proposée doit permettre également d'acquérir les bases techniques pour la réalisation des opérations de translocation de lagopède alpin, un type d'intervention jamais entreprise en Europe, au moins en ce qui concerne cette espèce.

En Amérique du Nord, la conservation des populations de tétraonidés fait souvent appel aux translocations d'individus sauvages d'une ou plusieurs populations sources vers une population cible (Connelly 1997). Rien que pour le cas du tétras à queue fine (*Tympanuchus phasianellus*), Schroeder *et al.* (2008) ont recensé de 1998 à 2007 aux Etats-Unis, un total de près de 1500 individus déplacés entre différentes populations. Pour revenir au cas du tétras des prairies cité précédemment, la translocation d'individus en provenance d'une population génétiquement plus diversifiée a permis d'améliorer le taux d'éclosabilité et la fertilité de la population cible (Westemeier et al., 1998). Plus récemment, dans l'Archipel des

<sup>2</sup> « ...In the future, translocations are likely to be used more to increase genetic heterogeneity and fertility of small isolated populations... » Grouse action plan 2006-2010.

(Programme POCTEFA 2007-2013 / Projet GALLIPYR» – Chef de file GEIE FORESPIR)

Aleoutiennes, îles proches de l'Alaska, 75 lagopèdes alpins capturés sur l'île d'Attu ont été transférés avec succès sur l'île voisine d'Agattu, d'où l'espèce avait disparu (Kaler 2007).

#### *Les aspects techniques de a translocation*

L'action de translocation d'individus depuis les populations de la Haute-Chaîne vers le noyau oriental Puigmal-Canigou est une des actions retenues dans le cadre du Projet européen « GALLIPYR – Réseau Pyrénéen des Galliformes de Montagne », coordonné par le GEIE FORESPIR. Cette action de translocation réunit 3 des 9 partenaires du Projet GALLIPYR : la Generalitat de Catalunya, le Govern d'Andorra et l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, ce dernier assurant la coordination de l'action.

Populations sources : les captures de lagopèdes auront lieu sur le secteur géographique délimité : au nord et à l'ouest par le Valira, au nord et à l'est par le Carol et au sud par le Sègre. Elles seront réalisées principalement sur les massifs compris entre le Pic dels Pessons et le Puigpedrós.



Localisation géographique de l'action de translocation de lagopède alpin : population source (bleu : massifs Pessons – Puigpedros), population cible (vert : chaînon Puigmal – Canigou). Les zones grisées représentent les altitudes supérieures à 2 000 m soit, à quelques exceptions près, l'aire de présence potentielle du lagopède alpin sur la chaîne des Pyrénées.

La translocation concernera principalement des jeunes oiseaux âgés de 2-3 mois, ce qui est certainement moins préjudiciable pour les populations sources que si l'on avait recours à des translocations d'oiseaux adultes. Le transfert de coq adulte peut être également envisagé, les populations de lagopède alpin présentant souvent un excès de coqs. Pour les oiseaux juvéniles, le transfert depuis la Haute-Chaîne jusqu'au chaînon oriental peut être assimilé à une dispersion « forcée » au-delà du plateau de Cerdagne.

(Programme POCTEFA 2007-2013 / Projet GALLIPYR» – Chef de file GEIE FORESPIR)

Les sites de lâchers devront réunir au moins deux conditions :

- (1) sites propices aux regroupements automnaux : on peut supposer en effet que la présence de groupes automnaux de lagopède à proximité des sites de lâcher, devrait faciliter le cantonnement et l'intégration des oiseaux lâchés dans la population cible.
- (2) possibilité de dépose par hélicoptère : le transfert des oiseaux par hélicoptère permettra de réduire les temps de manipulation, un point essentiel pour la réussite de ce genre d'opération. On peut envisager que les jeunes oiseaux seront relâchés sur le chaînon oriental dans l'heure qui suit leur capture.

A ce jour, les sites du Pic de Bastiments (Vall Ter) et du Barbet (Canigou) réunissent ces deux conditions.

L'objectif initial est de transférer un total de 15-20 oiseaux sur les 2 ans (2009 et 2010), ce qui représenterait une augmentation d'environ 10% de la population cible. Cependant, compte tenu de la faible fécondité de l'espèce, l'objectif de transférer un total de 20 jeunes doit être considéré avec prudence.

#### *Calendrier de l'opération :*

La première phase consistera à rechercher et à capturer des poules adultes accompagnées de jeunes au mois de juillet. Ces poules seront équipées de collier-émetteurs<sup>3</sup>, permettant ainsi le suivi du devenir de la nichée tout au long de l'été. Si la nichée arrive à son terme, les captures de jeunes auront lieu en septembre-octobre, soit juste avant que les nichées ne se dispersent. A cette époque, les oiseaux juvéniles ont atteint leur taille adulte et peuvent être équipés à leur tour d'un collier-émetteur, un point important si l'on souhaite suivre leur devenir après translocation (survie, participation à la reproduction). On envisage de ne transférer qu'une partie de la nichée, certains jeunes restant sur le site de capture. Ces jeunes « non transférés » seront néanmoins équipés d'émetteurs afin de comparer leur devenir avec celui des jeunes transférés.

La capture et le monitoring des oiseaux sur les populations sources seront assurés par les 3 partenaires et, sur les populations cibles, par la Generalitat de Catalunya et de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage. L'objectif est d'avoir une localisation de l'oiseau tous les 15 jours hors période hivernale et une localisation par mois en période

---

<sup>3</sup> marque : Holohil ; poids : 9 g ; durée théorique d'émission : 24 mois.

(Programme POCTEFA 2007-2013 / Projet GALLIPYR» – Chef de file GEIE FORESPIR)

hivernale. Des survols aériens sont également prévus pour localiser les oiseaux lorsque les conditions d'accès aux massifs seront trop risquées.

A moyen terme, le suivi de la diversité génétique de la population cible sera réalisé par l'Université de Perpignan (J. Boissier et N. Bech).

#### *Faisabilité de l'opération*

Les techniques de capture, aussi bien pour les poules en juillet que pour les jeunes en septembre, ont déjà fait leurs preuves sur le massif du Canigou. Pour évaluer la faisabilité du transfert et roder la coordination inter-partenaires, un premier test a été réalisé en 2008. Trois poules ont été capturées en Andorre (Pessons – Alt del Griu) par Marc Mossoll Torres, 3 autres sur le Puigpedrós par les agents de la Generalitat de Catalunya et de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage. Sur les 3 poules capturées en Andorre, 2 ont été prédatées au cours de l'élevage des jeunes, la troisième a mené sa nichée jusqu'à son terme ; cependant, pour des raisons de disponibilité aucun essai de capture n'a été tenté à l'automne sur ces jeunes. Sur le Puigpedrós, deux des trois poules ont mené leur nichée à terme, mais les deux essais de capture de jeunes menés respectivement les 06 et 10 octobre 2008 ont échoué. Le premier, en raison de la difficulté du site de capture, le deuxième en raison d'une date trop tardive (dispersion de la nichée). Lors du deuxième essai, un coq adulte a malgré tout été capturé. Ce coq a été équipé d'un collier émetteur puis transféré sur le chaînon oriental au moyen de l'hélicoptère, mis gracieusement à la disposition de l'action du projet, par l'Unitat de Suport Aeri del Agents Rurals de la Generalitat de Catalunya. L'opération depuis la capture jusqu'au transfert aura duré moins d'une heure.

Cet oiseau, libéré sur le versant sud du Pic de Bastiments, est toujours vivant 8 mois après le lâcher et ce malgré une grande mobilité tout au long de l'hiver. Les contrôles réguliers réalisés tout au long de l'hiver ont montré qu'il exploitait un domaine hivernal d'environ 5 000 ha, compris entre : le Pic de Costabona à l'est, le Pic de la Dona au nord, le Pic du Reco Gros à l'ouest et le Pic de las Borregues au sud. Le 04 juin 2009, l'oiseau a été localisé sur la commune de Setcases au lieu dit « Canals de l'Aigua » (versant nord du Puig de la Pastura), soit à 5km au sud de son point de lâcher. Fait remarquable, l'oiseau était accompagné d'une poule, peut être la première contribution au rétablissement du flux génique entre la haute-chaîne et le chaînon Canigou-Puigmal.

(Programme POCTEFA 2007-2013 / Projet GALLIPYR» – Chef de file GEIE FORESPIR)



Le premier « transfuge »: coq adulte capturé le 10 octobre 2008 sur le Puigpedrós et transféré sur le Pic de Bastiments (Vall Ter) (photo Ramon Martinez Vidal).



Le transfuge, dans les mains de Diego Garcia Ferrer, peu avant son lâcher sur les pentes du Pic de Bastiments. (Photo Claude Novoa).

#### Références citées

Bech, N., Boissier, J., Drovetski, S. and Novoa, C. **2009**. Population genetic structure of rock ptarmigan in the 'sky islands' of French Pyrenees: implications for conservation. *Animal Conservation*, 12: 138-146.

Bouzat, J. L., Cheng, H. H., Lewin, H. A., Westemeier, R. L., Brawn, J. D. and Paige, K. N. **1998**. Genetic evaluation of a demographic bottleneck in the Greater Prairie Chicken. *Conservation Biology*, 12: 836-843.

Caizergues, A., Bernard-Laurent, A., Brenot, J.-F., Ellison, L. and Rasplus, J. Y. **2003**. Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in Northern and Western Europe. *Molecular Ecology*, 12: 2267-2274.

Connelly, J. W. **1997**. Prairie grouse translocations in North America: a viable management alternative? *Grouse News*, 14: 7-11.

Kaler, R. S. A. **2007**. Demography, habitat use and movements of a recently reintroduced island population of Evermann's rock ptarmigan. Master of Science, Kansas State University, Manhattan, Kansas: 67 p.

Schroeder, M.A., Smith, R., Greer, R., Hagen, C., Jury, D., Cope, M., Espinosa, S. Whitney, R., Northrup, R. and Gardner, S.C. 2008. Twenty-two years of Columbian sharp-tailed grouse translocations: have we made a difference? 11<sup>th</sup> International Grouse Symposium. Whitehorse, Yukon., (abstract).

Westemeier, R. L., Brawn, J. D., Simpson, S. A., Esker, T. L., Jansen, R. W., Walk, J. W., Kershner, E. L., Bouzat, J. L. and Paige, K. N. **1998**. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science*, 282: 1695-1698.

## CHAPITRE 2

# ETUDE DE LA STRUCTURATION GENETIQUE DES POPULATIONS DE PERDRIX GRISE (*PERDIX PERDIX*) EN FRANCE.



### CHAPITRE 2 :

Ce chapitre se focalise sur l'étude de la structuration génétique de la perdrix grise en France. Cette étude devrait prochainement faire l'objet de publication(s) mais l'objectif premier de cette étude est de renseigner gestionnaires et éleveurs de l'impact des lâchers à des fins cynégétiques sur l'identité génétique des perdrix sauvages et d'identifier le rôle de la fragmentation de l'habitat sur la structuration génétique des populations de perdrix grise.

Cette étude a été menée en étroite collaboration avec le CNERA petite faune sédentaire de plaine et notamment avec la collaboration d'Elisabeth BRO



## I/ Introduction :

L'étude de l'évolution des publications réalisées sur les espèces de perdrix entre 1990 et 2009 (utilisation du moteur de recherche disponible sur ISI Web of knowledge afin d'obtenir le nombre de publications comprenant le mot clé 'partridge') nous révèle que sur près de 800 publications recensées, seules 66 traitent d'un sujet de génétique (mots clés 'partridge+genetic' dans le moteur de recherche). Ceci montre que peu d'études sur la génétique ont été menées jusqu'à présent sur le modèle perdrix. En affinant les critères de recherche, il apparaît que la plupart des études génétiques sur les perdrix ont été réalisées sur le genre *Alectoris* et plus précisément sur les espèces perdrix rouge (*Alectoris rufa*) et sur la perdrix choukar (*Alectoris chukar*) (Baratti *et al.* 2004; Barilani *et al.* 2007a; Barilani *et al.* 2007b; Ferrero *et al.* 2007; Gonzales *et al.* 2005; Randi 2008; Randi & Bernard-Laurent 1998; Tejedor *et al.* 2008; Tejedor *et al.* 2005). Quelques publications de génétique existent néanmoins sur la perdrix grise (*Perdix perdix*) (figure 1).

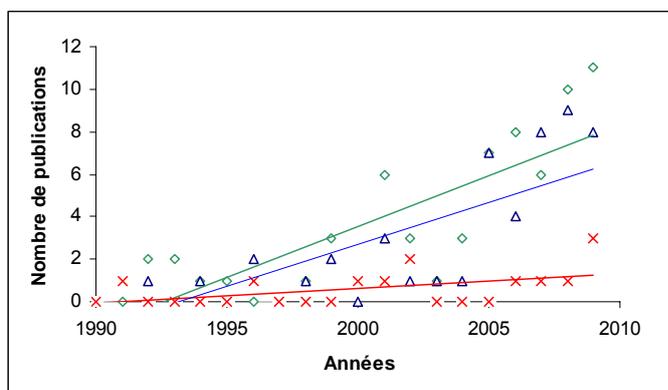


Fig.1 Evolution des publications entre 1990 et 2009 sur les thèmes :  
 Partridge+genetic   
 Alectoris+genetic   
 Perdix+genetic   
 Résultats tirés du moteur de recherché de ISI Web of Knowledge.

En France, en plus de représenter une sous-espèce endémique classée en annexe I de la directive européenne concernant la conservation des oiseaux sauvages, la perdrix grise (*Perdix perdix*) représente l'une des espèces de petits gibiers la plus en France. Pour cette raison, des lâchers de perdrix grise d'élevage ont été entrepris dès le milieu du XX<sup>ème</sup> siècle un peu partout en Europe (Danemark (années 1950), Angleterre (années 1960), France (fin des années 1960) ou encore en ex-Tchécoslovaquie (années 1970)) (Birkan 1971). Ces lâchers à des fins cynégétiques ont été effectués pour renforcer les populations. La plupart des individus lâchés en milieu naturel sont très certainement voués à être tirés au cours de la saison de chasse mais le plus souvent ces individus sont condamnés à mourir pendant la période hivernale à cause d'une mauvaise adaptation au milieu ou de leur incapacité à se nourrir (Guitart & Cassaing 2000). Cependant, il arrive quelque fois que certains individus persistent dans le milieu et arrivent à s'intégrer au sein des populations autochtones sauvages. Apparaissent alors des descendants hybrides, premier signe véritable d'une introgression génétique de perdrix d'élevage dans les populations de perdrix sauvages.

Existence de lâchers de perdrix grise d'élevage à des fins cynégétiques dans les populations sauvages du Bassin Parisien et des Pyrénées.

Les conséquences évolutives de l'introgession génétique par hybridation sont vues de manière contrastée par les biologistes selon que l'on considère le point de vue des botanistes ou des zoologistes (Barilani *et al.* 2007b). En biologie végétale, l'hybridation introgressive est perçue comme un moteur de la diversité génétique favorisant l'adaptation (Barton 2001). En effet, de nombreuses espèces dites allopolyploïdes sont le résultat d'une hybridation interspécifique (Seehausen 2004). On parle d'ailleurs de 'vigueur hybride' qui confère aux individus hybrides une plus grande valeur sélective que leurs parents sur de nombreux caractères. A l'inverse, les zoologistes considèrent plutôt l'hybridation comme un problème. Outre le fait que ce processus crée des difficultés au niveau des reconstitutions d'histoire évolutive (notamment des reconstitutions phylogénétiques), l'hybridation est souvent perçue comme un mécanisme diminuant la valeur sélective des individus au niveau des zones d'hybridation (Barton 2001). Selon les cas, ces hybridations peuvent être naturelles ou d'origine anthropique. Les cas d'hybridation d'origine anthropique sont de plus en plus courants (destruction des habitats et création de zones hybrides, introduction de nouvelles espèces...) (Allendorf *et al.* 2001) et ont inévitablement un impact négatif sur la diversité biologique locale et l'intégrité génétique des espèces. Chez les galliformes, des cas d'hybridation d'origine anthropique sont de plus en plus mis en évidence. En effet, groupe d'oiseaux très prisé par les chasseurs, le problème d'hybridation se pose surtout face à l'introduction d'individus d'élevages dans des populations autochtones sauvages. L'hybridation menace alors la pérennité et l'intégrité génétique de ces taxons (espèces et/ou sous-espèces). Suite à des repeuplements à des fins cynégétiques, une introgression génétique chez la caille des blés (*Coturnix coturnix coturnix*) par la caille japonaise (*C.c. japonica*) a par exemple été mise en évidence (Chazara *et al.* 2006). Cette étude a révélé une modification du comportement des individus hybrides créant ainsi l'apparition de populations sédentaires ou faiblement migratrices qui, sous les latitudes de l'étude, survivent difficilement en hiver. De même, des introgressions génétiques chez la perdrix bartavelle (*Alectoris graeca*) et chez la perdrix rouge (*A. rufa*) par des perdrix choukars (*A. chukar*) ont été observées (Barilani *et al.* 2007a). Une perte des adaptations locales augmentant les risques d'extinction, serait la principale conséquence de cette hybridation. Chez la perdrix grise, une hybridation, suite à des lâchers massifs à but cynégétique, a très certainement conduit à la disparition de la sous espèce *Perdix perdix italica* (Liukkonen-Anttila *et al.* 2002). En Finlande, une étude récente dénonce une introgression génétique des perdrix sauvages autochtones *Perdix perdix lucida* par des perdrix sauvages de France (*Perdix perdix perdix*), et des perdrix d'élevage de Suède (*Perdix perdix perdix*) lâchées à des fins de repeuplement (Uimaniemi *et al.* 1999). En France, des cas d'hybridation entre perdrix sauvages et perdrix d'élevages ont déjà été mis en évidence. En effet,

Chez la perdrix grise, une hybridation, suite à des lâchers massifs à but cynégétique, a très certainement conduit à la disparition de la sous espèce *Perdix perdix italica* (Liukkonen-Anttila *et al.* 2002)

sur la base de marqueurs allozymiques (Blanc *et al.* 1986; Effenberger & Suchentrunk 1999) ou mitochondriaux (Gomez-Moliner 2007; Liukkonen-Anttila *et al.* 2002; Martin *et al.* 2003; Uimaniemi *et al.* 1999), une introgression de gènes de perdrix d'élevage de plaine (*Perdix perdix armoricana*) a été mise en évidence chez les perdrix sauvages des Pyrénées (*Perdix perdix hispaniensis*).

Au début de cette thèse, aucune étude utilisant les marqueurs microsatellites n'avait été réalisée sur la perdrix grise car aucun marqueur n'étant disponible ; seule Selma Mautner avait défini 5 marqueurs microsatellites, dans sa thèse de doctorat à l'Université de Vienne, afin d'étudier la relation entre diversité génétique et fitness chez des perdrix d'élevages (Mautner 2001). Ces marqueurs sont pourtant considérés comme des marqueurs de choix dans l'étude génétique des populations (Frankham *et al.* 2002). En effet, de part leur héritabilité mendélienne par rapport aux marqueurs mitochondriaux (à héritabilité uniquement maternelle), ou par rapport à leur degré de polymorphisme bien supérieur aux marqueurs allozymiques, les microsatellites sont des marqueurs de premier choix pour le suivi d'une introgression génétique. Les marqueurs microsatellites sont également efficaces dans les analyses de structuration génétique des populations naturelles (Frankham *et al.* 2002). En effet, ceux-ci sont suffisamment polymorphes pour évaluer la structuration génétique des populations et leur diversité génétique associée. Ces deux paramètres sont des éléments importants dans la prise de décision concernant la gestion des populations.

D'après Kuijper *et al.* (2009) la qualité de l'habitat qui peut influencer la structuration génétique des populations est un paramètre vital pour la perdrix grise et d'après Effenberger & Suchentrunk (1999) un appauvrissement génétique dû à un régime consanguin serait à l'origine du déclin des populations de perdrix grise en Autriche. Ainsi, chez la perdrix grise, l'étude de la structuration génétique et celle de la diversité génétique des populations sont deux approches intéressantes dans la compréhension de l'évolution des populations. En Europe, des études de structuration génétique ont déjà été effectuées sur la perdrix grise. Sur la base de marqueurs mitochondriaux, une première différenciation génétique a été mise en évidence entre les perdrix grises de l'Est et de l'Ouest européen. Ainsi, les populations de perdrix grise de France, Angleterre, Allemagne, Pologne, Italie et Autriche se différencient génétiquement des perdrix grises se trouvant en Finlande, Bulgarie, Grèce et Irlande (Liukkonen-Anttila *et al.* 2002). En France, il apparaît que les perdrix grises du Bassin Parisien sont génétiquement distinctes de celles des Pyrénées qui révéleraient, de plus, une diversité génétique plus importante (Blanc *et al.* 1986; Martin *et al.* 2003). Enfin, toujours sur la base de marqueurs mitochondriaux, des signes de structuration génétique ont été mises en évidence par Gomez-Moliner (2007) pour les populations de perdrix grises des Pyrénées.

Une introgression de gènes de perdrix d'élevage de plaine a été mise en évidence chez les perdrix sauvages des Pyrénées

Au début de cette thèse, aucune étude utilisant les marqueurs microsatellites n'a été réalisée sur la perdrix grise.

Cependant, aucune étude aussi bien dans les Pyrénées que dans le Bassin Parisien n'a décrit précisément l'organisation spatiale de la variabilité génétique des populations de perdrix grise.

Dans ce chapitre nous avons détaillé dans un premier temps la méthode employée dans le développement des marqueurs microsatellites. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'organisation spatiale de la diversité génétique des perdrix grises des Pyrénées et du Bassin Parisien. Enfin, nous avons estimé l'impact des lâchers d'individus d'élevage sur la structuration génétique des populations sauvages autochtones.

### II/ Détermination des marqueurs moléculaires :

Au sein des galliformes, nombreux ont été les microsatellites mis en évidence. On dispose ainsi de marqueurs microsatellites pour le grand tétras (*Tetrao urogallus*) (Segelbacher & Höglund 2000), le tétras lyre (*Tetrao tetrix*) (Caizergues *et al.* 2001a; Piertney & Höglund 2001), le lagopède alpin (*Lagopus muta*) (Bech *et al.* 2009; Caizergues *et al.* 2003a; Piertney & Dallas 1997), le dindon (*Meleagris gallopavo*) (Reed *et al.* 2003; Reed *et al.* 2000), le poulet (*Gallus gallus*) (Cheng & Crittenden 1994) et la liste n'est pas exhaustive... Ainsi, la mise au point de marqueurs microsatellites spécifiques était un préalable pour l'étude de l'organisation spatiale et de l'introgession génétique des deux sous-espèces de perdrix grise en France. Nous avons également développé un marqueur moléculaire du sexe, spécifique à la perdrix grise, afin de 'sexer' notre échantillonnage et d'évaluer un éventuel biais de dispersion lié au sexe.

#### A/ Détermination des marqueurs microsatellites

La détermination des marqueurs microsatellites a été réalisée par cross-species amplification (ou amplification croisée) qui se substitue à la recherche directe dans le génome par diverses techniques onéreuses tel que le criblage de banque génomique. L'amplification croisée consiste en l'utilisation de séquences microsatellites déjà définies chez des espèces proches du modèle étudié. Chez les galliformes, la plupart des études de cross-species amplification sont basées sur une sélection aléatoire des marqueurs. La méthode employée dans ce travail est novatrice et doit sa singularité dans l'utilisation de données phylogénétiques dans le choix des marqueurs. En effet, l'arbre phylogénétique des galliformes montre que le poulet (*Gallus gallus*) est relativement 'éloigné' de la perdrix grise alors que le dindon (*Meleagris gallopavo*) est son espèce soeur. Il est donc légitime de penser que des séquences identifiées chez le poulet et amplifiables chez le dindon (ou inversement), fonctionneront également sur la perdrix. De plus, il a été démontré chez les oiseaux que le succès d'une cross-species amplification était dépendant de la similarité des séquences du cytochrome b (Primmer *et al.* 2005). Une étude phylogénétique sur ces séquences a montré que le dindon et la perdrix étaient très proches (Kimbal *et al.* 1999), ce qui vient conforter notre démarche. Cette approche bénéficie de l'intérêt économique qui est porté au poulet et au dindon puisque leur génome est séquencé et annoté pour le premier et en cours de séquençage pour le second. Nous avons donc accès à un très grand nombre de marqueurs microsatellites présents chez les deux espèces (> 700).

A partir d'une sélection de 138 marqueurs microsatellites identifiés dans des études antérieures comme étant amplifiables à la fois chez le poulet et le dindon, nous avons pu mettre au point 10 marqueurs polymorphes (MNT12, MNT412, ADL292, MNT477, MNT404, MNT45, MCW230, MNT467, ADL260 et MNT408) chez la perdrix pour les deux sous-espèces de notre étude *P. p. hispaniensis* et

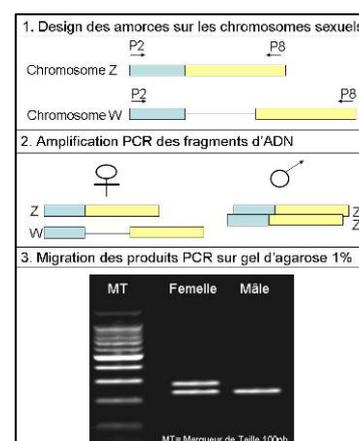
Utilisation de la phylogénie des galliformes dans le choix des marqueurs microsatellites candidats pour la 'cross species amplification'.

*P. p armoricana* (cf. annexe II1) (Bech *et al.* 2010). Le marqueur MCW230 a par la suite été retiré de l'étude pour un mauvais rendement d'amplification PCR. A ces 9 marqueurs, nous avons ajouter 2 marqueurs définis chez perdrix rouge (*Alectoris rufa*) (Aru1F25 et Aru1G4) (Ferrero *et al.* 2007) et un chez le tétras lyre (*Tetrao tetrix*) (BG15) (Piertney & Höglund 2001). Au cours de notre étude, nous avons également testé les 5 marqueurs microsatellites décrits et isolés par Selma Mautner dans son travail de thèse (LEI30, LEI31, LEI319, ADL142 et ADL315) (Mautner 2001). Parmi ces marqueurs, 4 (LEI30, ADL142, LEI31 et LEI319) sont venus compléter notre panel de marqueurs microsatellites. A partir de ces 16 marqueurs, nous avons mis au point 4 multiplex PCR [(1) MNT412+ADL292+BG15+MNT12, (2) MNT477+ADL142+LEI31+LEI319+MNT404 (3) MNT45+LEI30+MNT467 (4) ADL260+Aru1G4+Aru1F25+MNT408]. Cela signifie qu'avec seulement 4 PCR, nous avons déterminé le profil génétique d'un individu sur 16 marqueurs microsatellites.

#### B/ Détermination du marqueur du sexe chez la perdrix grise

Chez les oiseaux, le sexe peut être déterminé en fonction du dimorphisme sexuel qui dévoile, la plupart du temps, des différences de couleurs, de plumage, de taille..., entre les deux sexes. Cependant, chez beaucoup d'espèces, dont la perdrix grise, le dimorphisme est peu marqué et la détermination du sexe, chez les jeunes et chez certains adultes, est difficile sur des critères morphologiques (Griffiths *et al.* 1998). C'est pourquoi des études moléculaires ont tenté de déterminer le sexe à l'aide des chromosomes sexuels ou hétérosomes. Chez les oiseaux, ce sont les femelles qui sont hétérogamétiques ZW alors que les mâles sont homogamétiques ZZ.

Chez les oiseaux, les hétérosomes comprennent une région très conservée codant pour une protéine importante dans l'architecture de la chromatine, c'est la chromo-helicase DNA binding 1 (CHD1) (Griffiths & Korn 1997). La particularité de cette région codante est d'englober une région exonique sur le chromosome Z et une région intronique supplémentaire sur le chromosome W. Basé sur ce dimorphisme gonosomal un couple d'amorce a été dessiné afin d'amplifier les deux régions homologues sur les deux hétérosomes. Ce couple d'amorces, appelé P2P8, s'hybrident sur la partie exonique du gène (donc extrêmement conservée) et amplifie l'intron sur le chromosome W. Ainsi deux fragments de tailles différentes sont attendus chez les femelles ( $Z^{\text{exon}} + W^{\text{exon+intron}}$ ) contre une seule taille de fragments pour les mâles ( $Z^{\text{exon}} + Z^{\text{exon}}$ ) (Griffiths *et al.* 1998) (voir figure ci-contre). Basé sur une région hyper conservée, ce couple d'amorces est applicable chez de nombreuses espèces d'oiseaux. Bien que très utilisé, le couple d'amorces P2P8, développé par Griffith et al en 1998, ne fonctionne pas sur toutes les espèces d'oiseaux (Dawson *et al.* 2001). Par conséquent, en 1999, d'autres couples d'amorces ont été dessinés autour de la même partie intronique du gène : CHD1. On distingue ainsi le couple d'amorces 1237L et 1272H ou



encore 2550F et 2718R (Fridolfsson & Ellegren 1999). Plus récemment, Ong & Vellayan (2008) ont démontré que ce dernier couple d'amorces (2550F/2718R) était utilisable pour sexer bien plus d'espèces d'oiseaux que le couple de référence P2P8 de Griffith. Cependant en 2008, Bantock, Prys-Jones & Lee montrèrent que ce couple d'amorces ne fonctionnait pas sur de l'ADN de muséum ou sur de l'ADN dégradé car la taille du fragment à amplifier était trop grande pour être conservée sur de l'ADN dégradé (Bantock *et al.* 2008).

Le couple d'amorces P2P8 n'a pas été efficace sur tous les ADNs de perdrix grise de notre échantillonnage. Compte tenu de la conservation des échantillons et de la dégradation potentielle de l'ADN, nous avons dessiné nous même un couple d'amorces moléculaires spécifique de la perdrix grise capable de sexer notre échantillonnage. Pour cela, nous avons aligné les séquences du gène chromo-helicase DNA binding 1 (CHD1) issues de différentes espèces (*Bonasa umbellus*, *Gallus gallus*, *Phasianus colchicus*, *Acryllium vulturinum*, *Anas platyrhynchos* et *Tetrao tetrix*) avec cinq séquences issues de l'amplification d'ADN de perdrix à partir du couple d'amorces P2P8. Sur la base de ce travail, nous avons gardé l'amorce 'reverse' P8 et nous avons mis en évidence une nouvelle amorce 'forward' appelée P2-3 (ACTRTCAGATCCAGARTATCT). Ce nouveau couple d'amorces nous a permis d'amplifier des fragments de plus petites tailles : 250 paires de bases (pb) pour le chromosome Z et 288 pb pour le chromosome W (contre des fragments de 298 pb et 377pb amplifiés respectivement sur les chromosomes Z et W avec le couple d'amorce P2 P8 (Griffiths *et al.* 1998)) et de sexer les deux sous-espèces de perdrix grise en France.

### III/ Echantillonnage et méthodes d'analyse:

#### A/ Echantillonnage :

**A** fin d'étudier la structuration des perdrix en France nous avons extrait l'ADN de 739 ailes de perdrix grises (voir photo ci-contre), 134 provenant du Bassin parisien et appartenant à la sous espèce *P. p. armoricana* et 605 provenant des Pyrénées et appartenant à la sous espèce *P. p. hispaniensis*. Ces 739 individus sauvages se répartissaient en 22 populations, dont 5 situées dans le Bassin Parisien et 17 dans les Pyrénées (voir figure 2 et 3). Nous avons fait en sorte de grouper au moins 10 individus par population, chaque population étant définie à dire d'experts sur une localité correspondant à des unités géographiques propices à la perdrix grise (cf. unités naturelles, page 22).

Cette thèse s'intéressant également à l'introggression génétique de gènes de perdrix d'élevage dans les populations sauvages, nous avons également échantillonné 134 individus provenant d'élevages. Les élevages échantillonnés sont connus pour avoir fourni des oiseaux pour renforcer les populations



Aile de perdrix

sauvages des Pyrénées (Elevages : d'Estერი d'Aneu, d'Andorre et de France, n= 98) et du Bassin Parisien (Elevages du Bassin Parisien n= 36) (tableau 1).

Catégorie	Origine géographique	Département	N
Montagne - sauvage	France	09	109
" "	France	31	41
" "	France	64	26
" "	France	65	36
" "	France	66	291
" "	Andorre		22
" "	Espagne	Alta Ribagorça	8
" "	Espagne	Pallars Sobirà	26
" "	Espagne	Cerdagne	46
<b>Total</b>			<b>605</b>

Catégorie	Origine géographique	Département	N
Plaine - sauvage	France	08	8
" "	France	02	11
" "	France	10	28
" "	France	27	10
" "	France	28	19
" "	France	41	18
" "	France	45	2
" "	France	51	4
" "	France	60	9
" "	France	62	7
" "	France	76	9
" "	France	80	9
<b>Total</b>			<b>134</b>

Catégorie	Origine géographique	Département	N
Montagne - élevage	Espagne	Estერი d'Aneu	57
" "	Andorre		14
" "	France	64 et 66	27
Plaine - élevage	France	Bassin Parisien	36
<b>Total</b>			<b>134</b>

Tab 1 : Répartition de l'échantillonnage de perdrix grises pour l'étude de structuration génétique en France.

- BP1, N=39
- BP2, N=37
- BP3, N=18
- BP4, N=8
- BP5, N=32

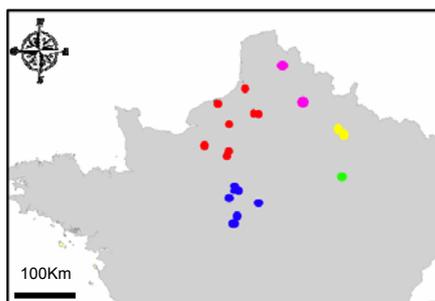


Fig 2 : Répartition des 5 populations de perdrix grise dans le Bassin Parisien. La zone couvre un érimètre de 140 kilomètres de rayon.

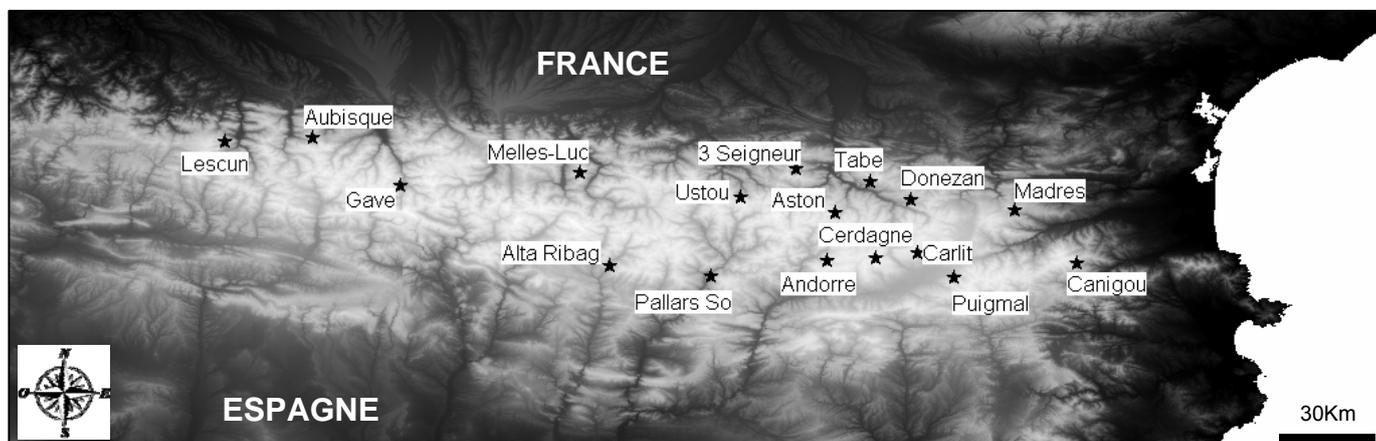


fig. 3 Répartition des 17 populations de perdrix grise dans les Pyrénées. La zone d'échantillonnage couvre 270 kilomètres d'Est en Ouest.

Nous avons également prélevé des échantillons de plumes et de tissus sur des spécimens anciens de muséums (dans les muséums d'histoires naturelles de Toulouse, Perpignan et Banyuls sur Mer) afin d'avoir l'identité génétique des perdrix grises pyrénéennes avant les lâchers (n=10) Cependant, malgré bon nombre de tests, aucune des techniques d'extraction testées n'a permis d'extraire de l'ADN amplifiable par PCR.



---

### B/ Méthodes d'analyses :

Nous avons testé l'équilibre de Hardy Weinberg avec le logiciel GENALEX (PEAKALL & SMOUSE 2006) au sein de toutes les populations et pour chaque marqueur. Les éventuels déséquilibres de liaison ont été testés avec le logiciel FSTAT (GOUDET 2001) pour chaque paire de marqueurs. La significativité des valeurs a été corrigée avec l'approche du q-value (Storey 2002). La présence d'allèles nuls ou de faux allèles a également été testée avec le logiciel MICROCHECKER (Oosterhout *et al.* 2004). Sur 16 marqueurs développés précédemment, seuls 12 ont été retenus pour notre étude : MNT412, BG15, MNT12, MNT477, ADL142, LEI31, LEI319, MNT404, MNT467, Aru1G4, Aru1F25 et MNT408. L'amplification de ces marqueurs a été réalisée selon le protocole du kit multiplex QIAGEN dans un volume final de 10 $\mu$ L et à une température d'hybridation de 57°C.

Suite au génotypage nous avons estimé, dans un premier temps, la diversité et la différenciation génétique des différentes populations de perdrix grise afin de déterminer la distribution et l'organisation spatiale de la variabilité génétique. Dans un deuxième temps nous avons estimé des taux d'introgession de gènes de perdrix d'élevages dans les populations sauvages des Pyrénées et du Bassin Parisien.

La diversité génétique des populations a été estimée à l'aide deux paramètres : la richesse allélique (AR) et l'hétérozygotie attendue (He). Tout comme le Fis, ces paramètres ont été calculés à l'aide du logiciel FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 2001). Ce logiciel nous a également permis d'évaluer les premiers signes de structuration génétique *via* des taux de différenciation génétique entre les populations (Fst). Cette différenciation génétique a été estimée selon la méthode de Weir et Cockerham (1984). Les seuils de significativité de ces Fst ont été évalués avec la correction de Bonferroni (<http://www.Quantitativeskills.com/sisa/calculations/bonfer.htm>).

La différenciation et la structuration génétique des différentes populations ont également été appréhendées à l'aide d'Analyses Factorielle des Correspondances (AFC) basées sur la distribution des génotypes de chaque individu. Ces AFCs ont été réalisées à l'aide du logiciel genetix (Belkhir *et al.* 1996). La structuration génétique des populations à proprement dite a également été évaluée à l'aide du logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000). En effet, utilisant une méthode de classification basée sur les analyses bayésiennes, ce logiciel permet d'assigner chaque individu de l'échantillonnage à un nombre (K) de clusters déterminé par l'utilisateur. La probabilité maximale pour un nombre de cluster K est obtenue en comparant les probabilités de plusieurs valeurs de K allant, la plupart du temps dans cette étude, de 1 à 10. Les analyses, utilisant STRUCTURE, ont été effectuées avec le modèle 'Admixture model', 10000

itérations et répliquées 15 fois comme recommandé par Evanno *et al.* (2005). Les graphiques en sortie de ce logiciel STRUCTURE ont été représentés à l'aide du logiciel DISTRUCT (Rosenberg 2004). La structuration génétique a également été appréhendée avec un test d'isolement par la distance réalisé à l'échelle individuelle avec le logiciel ALLELE IN SPACE (Miller 2005).

L'une des parties traitant des problèmes d'hybridation entre populations sauvages et d'élevages, il a été nécessaire de distinguer les individus introgressés des individus sauvages et d'élevages. Pour cela nous avons utilisé le logiciel HYBRIDLAB V1.0 (Nielsen *et al.* 2006) afin de créer des hybrides virtuels et mieux connaître leur génétique. Par combinaison des logiciels STRUCTURE et HYBRIDLAB, nous avons pu distinguer les individus d'élevages, des individus sauvages et des individus introgressés, ce qui nous a permis de calculer un taux d'introgession génétique au sein de chaque population sauvage.

**IV/ Structuration génétique des perdrix grises en France**

Les premières analyses ont été menées à l'échelle nationale entre les deux sous-espèces. Pour cela, nous avons groupé dans deux populations différentes, les individus provenant des Pyrénées (n=605) et les individus provenant du Bassin Parisien (n=134). Les indices de diversité ont révélé un fort degré de polymorphisme au sein de chacune des deux populations avec une richesse allélique (AR) variant de 2.922 à 19.981 et une hétérozygotie (He) variant de 0.452 à 0.889 (tableau 2). Les tests statistiques n'ont révélé aucune différence significative entre les deux sous-espèces quelque soit l'indice de diversité : AR [test T (t=0.4613; ddl=22; F=1.073; P=0.9096)], He [test T (t=0.1073; ddl=22; F=1.046; P=0.9413)].

Pas de différence de diversité génétique entre les deux écotypes de perdrix grise

		MNT412	BG15	MNT12	MNT477	ADL142	LEI31	LEI319	MNT404	MNT467	Aru1G4	Aru1F2	MNT408
Pyrénées	He	0.889	0.624	0.848	0.852	0.737	0.630	0.723	0.496	0.478	0.672	0.671	0.537
	AR	13.714	11.942	18.421	18.682	7.549	5.946	6.000	2.922	2.959	4.999	6.446	7.498
Bassin Parisien	He	0.870	0.726	0.868	0.788	0.748	0.452	0.606	0.504	0.505	0.686	0.709	0.768
	AR	14.000	18.000	19.981	14.928	9.928	3.999	6.999	2.982	3.929	5.994	10.976	8.000
Toutes pop	He	0.880	0.675	0.858	0.820	0.743	0.541	0.665	0.500	0.492	0.679	0.690	0.653
	AR	14.809	14.092	19.395	18.356	7.984	5.887	6.377	3.066	3.332	5.214	8.452	7.853

tab. 2 Diversité génétique des marqueurs microsatellites utilisés. Hétérozygotie attendue (He) et richesse allélique (AR) pour chaque microsatellite et chaque population.

Concernant la structuration et la différenciation génétique des populations :

Avec une valeur de Fst de 0.045, la différence génétique entre les deux sous-espèces est significative (P=0.05). La différence entre les sous-espèces peut être visualisée sur l'Analyse Factorielle des Correspondances (figure 4). En effet, l'axe 1 de cette AFC (22,36% de l'inertie totale) sépare les perdrix grises des Pyrénées des perdrix grises du Bassin Parisien.

Différenciation génétique significative (Fst=0.045) entre les deux sous-espèces de perdrix grise.

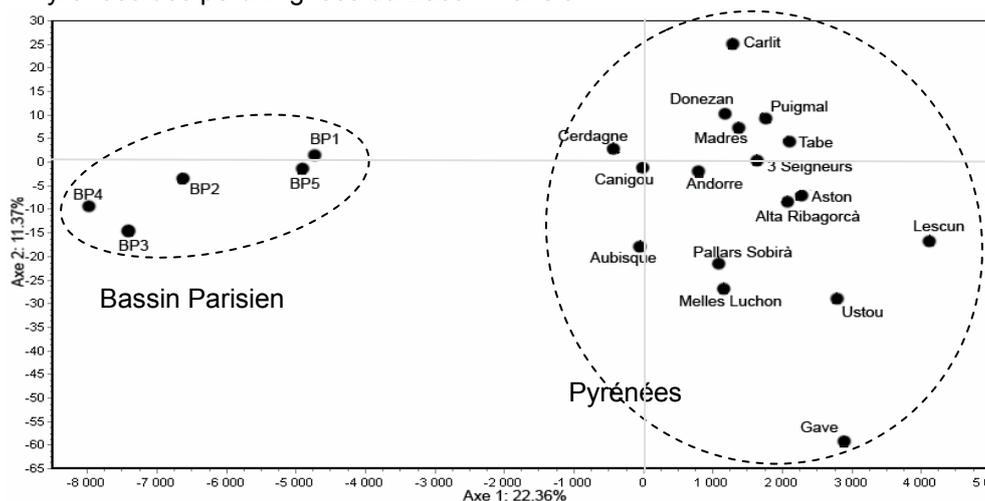


fig. 4 Analyse Factorielle des Correspondances basée sur la distribution des génotypes de tous les échantillons considérés comme sauvages. Les ellipses ont été rajoutées a posteriori à l'aide d'une classification hiérarchique ascendante.

Cette nette distinction entre les deux sous-espèces est corroborée par les analyses bayésiennes du logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). En effet, ces analyses ont révélé une structuration génétique organisée en 2 clusters, le premier englobant les individus du Bassin Parisien (avec un taux d'assignation

moyen de  $0.90 \pm 0.01$ ) et le deuxième englobant les individus des Pyrénées (avec un taux d'assignation moyen de  $0.74 \pm 0.25$ ) (figure 5).

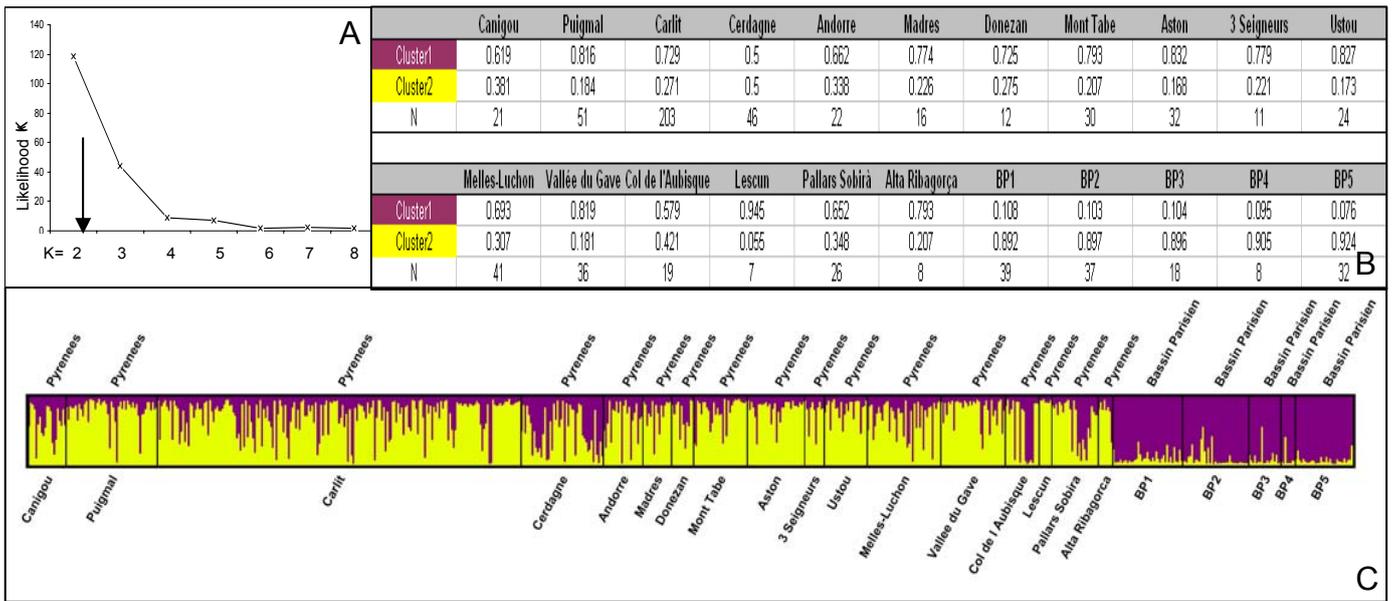


fig.5 : A : Mode de la distribution des probabilités de K. B : valeurs des Q ancestry de chaque population dans les K=2 clusters définis avec la méthode bayésienne. C : Histogramme représentant les valeurs de Q ancestry de chaque individu à chaque cluster.

Compte tenu de la distinction génétique entre les deux sous-espèces de perdrix grise, les analyses de structuration génétique ont été appréhendées à une échelle plus fine, c'est à dire celle de la sous espèce. *Perdix perdix hispaniensis* dans un premier temps et *P. p. armoricana* dans un deuxième temps.

---

**VI/ Introgression et structuration génétique des populations de perdrix grise des Pyrénées (*P. p. hispaniensis*) :**


---

Dans les Pyrénées, la sous-espèce *P.p. hispaniensis* a fait l'objet de repeuplements réguliers à des fins cynégétiques. Ces repeuplements ont créé une introgression de gènes de perdrix d'élevage au sein des populations sauvages. Dans le cadre d'une étude de structuration génétique des populations de perdrix grises des Pyrénées, il est primordial de s'affranchir des individus introgressés qui peuvent modifier le signal génétique des populations 'sauvages'. Cette première partie va donc s'intéresser à l'estimation de l'introgression génétique des perdrix grises des Pyrénées afin de retirer les individus introgressés et pouvoir étudier, dans un deuxième temps, la structuration génétique des perdrix grises sauvages des Pyrénées.

---

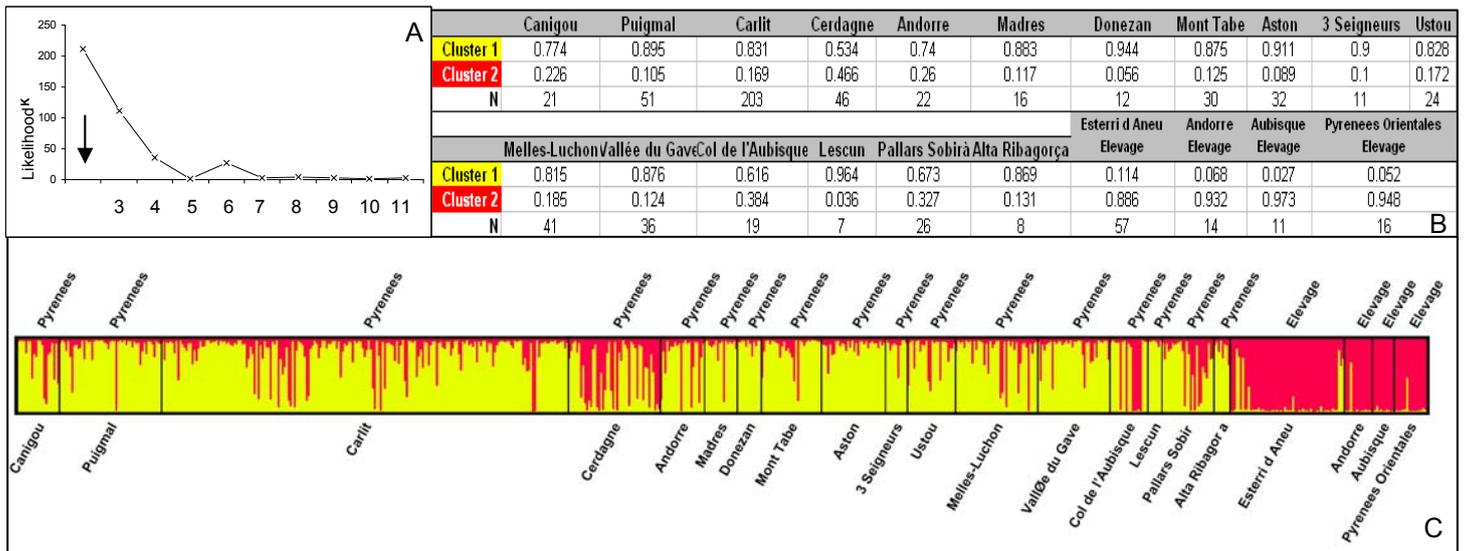
**A/ Introgression génétique des populations de perdrix grise sauvages :**


---

L'analyse de la structuration et de l'introgression génétique des perdrix grises des Pyrénées a été réalisée sur un total de n=605 perdrix pyrénéennes, répartis en 17 populations (massif du Canigou, massif du Puigmal, massif du Carlit, Cerdagne (Espagne), Andorre, massif du Madres, Donezan, Mont Tabe, Aston, massif des 3 Seigneurs, Ustou, Melles-Luchon, vallée du Gave de Pau, col de l'Aubisque, Lescun, Pallars Sobira et Alta Ribagorça) et 98 perdrix issues d'élevages. Ces perdrix d'élevages proviennent de deux élevages différents utilisés pour repeupler les populations sauvages des Pyrénées. On distingue ainsi plusieurs élevages potentiels en France (ayant servi à repeupler les populations d'Andorre, du col de l'Aubisque et des Pyrénées Orientales) (photo ci-contre) et un élevage en Espagne situé à Esterrí d'Aneu.

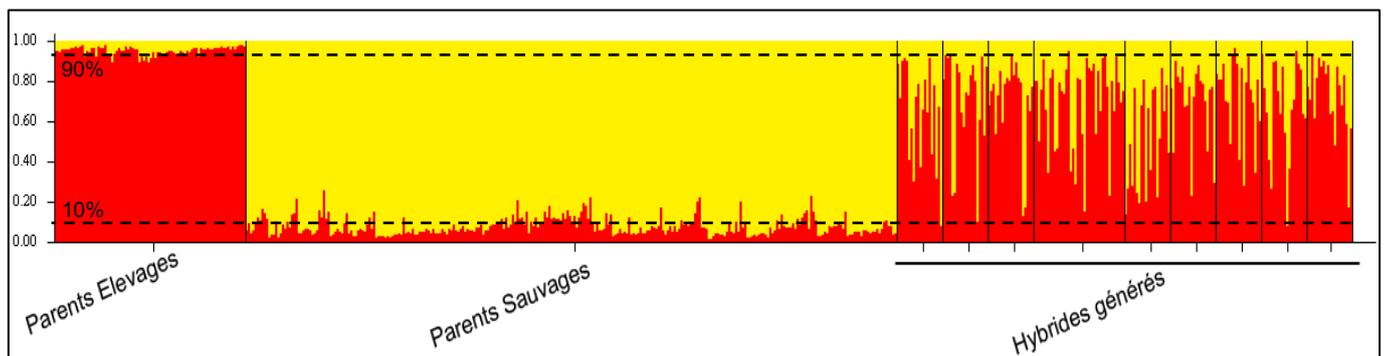
D'après nos analyses, les populations pyrénéennes et d'élevages semblent constituer chacune un cluster. En effet, les populations pyrénéennes sont assignées à 82%  $\pm$  11 au premier cluster ou cluster 'sauvage' (jaune) et les populations d'élevage sont assignées à 93%  $\pm$  3 au deuxième cluster ou cluster 'élevage' (rouge) (figure 6). En effet, même s'il n'y a pas de différences significatives de diversité génétique entre les populations sauvages et d'élevages [He (Friedman, N=11 ; ddl=2; P=0.717), AR (Friedman N=12 ; ddl=2; P=0.067)], la différenciation génétique entre perdrix sauvages et perdrix d'élevages est significative (Fst= 0.0625, P= 0.017).

Il est à noter que certaines perdrix pyrénéennes sont fortement assignées au cluster 'élevage' (rouge). Ces assignations pourraient être une conséquence d'une introgression génétique de gènes de perdrix d'élevage dans les populations sauvages des Pyrénées.



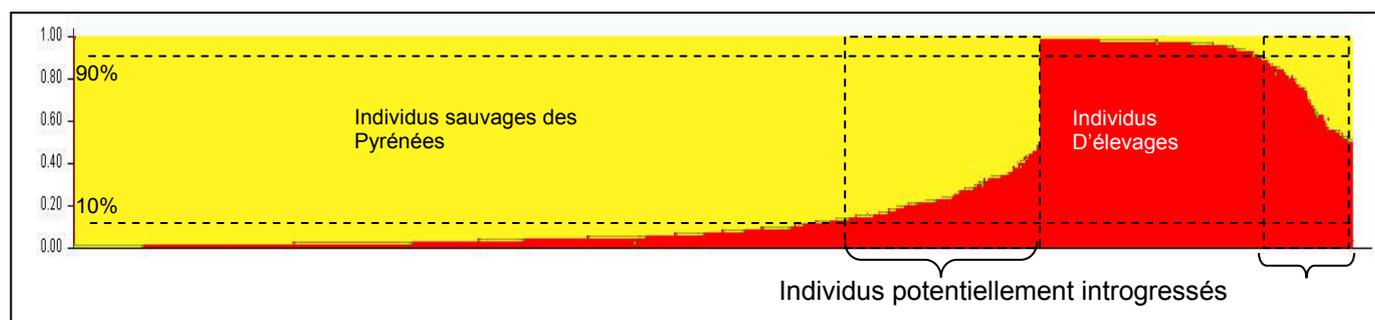
**Fig. 6 :** A : Mode de la distribution des probabilités de K. B : Valeurs de Q ancestry de chaque population pyrénéenne (sauvage et élevage) dans les K=2 clusters définis avec la méthode bayésienne du logiciel STRUCTURE. C : Histogramme représentant les valeurs de Q ancestry de chaque individu pour chaque cluster.

Afin de pouvoir évaluer une éventuelle introgression de gènes de perdrix d'élevage dans les populations sauvages de perdrix grise des Pyrénées, il est important d'isoler les individus potentiellement introgressés au sein des populations sauvages. Pour cela, et comme suggéré dans la littérature (Barilani *et al.* 2007a; Barilani *et al.* 2007b; Randi 2008; Randi & Bernard-Laurent 1998; Roberts *et al.* 2010) nous avons utilisé les valeurs de Q ancestry obtenues à partir du logiciel STRUCTURE pour chaque individu analysé. Afin de séparer variabilité génétique commune aux perdrix sauvages et d'élevages et introgression génétique, nous avons déterminé une valeur seuil de Q ancestry qui nous a permis de considérer statistiquement si un individu était sauvage, d'élevages ou introgressé. Pour déterminer cette valeur seuil nous avons généré virtuellement des hybrides de première génération à partir de parents sauvages (N=286) et d'élevages (N=84). Les parents ont été choisis à partir de la figure 6 avec des valeurs de Q ancestry >95% à chacun des deux clusters. Tous les hybrides générés par le logiciel (N=100) sont détectés par le logiciel STRUCTURE pour des valeurs de Q ancestry comprises entre 90 et 10% quelque soit le cluster (figure 7).



**Fig.7** Q ancestry des individus hybrides, générés avec le logiciel HYBRIDLAB, aux clusters 'sauvages' et 'élevage' des Pyrénées

Nous pouvons donc déterminer que les individus ayant des valeurs de Q ancestry compris entre 90 et 10% sont potentiellement des individus introgressés et donc issus de croisements entre individus sauvages et individus d'élevages. Les individus avec des valeurs de Q ancestry supérieures ou égale à 90% au cluster 'sauvages' peuvent être considérés comme sauvages alors que les individus ayant des valeurs de Q ancestry inférieures à 10% peuvent être considérés comme provenant d'élevage (figure 8)



**Fig 8** Coefficient Q ancestry obtenu à partir du logiciel STRUCTURE. L'histogramme est classé en fonction des valeurs de Q ancestry de chaque individu pour chacun des clusters 'élevage' en rouge et 'sauvage' en jaune.

Les individus potentiellement introgressés (n=229) se retrouvent dans toutes les populations sauvages en plus ou moins grand nombre. Ainsi, près de 38% des perdrix grises des pyrénées échantillonnées dans cette étude présenteraient des signes d'introgession génétique.

B/ Distribution de l'introgession génétique au sein des populations de perdrix grise des Pyrénées :

Les valeurs de Fst démontrent qu'il y a une différenciation génétique significative entre les populations d'élevages espagnols et français (Fst moyen = 0.04±0.02 \*, P=0.008). Comme mentionné précédemment ces deux élevages sont connus pour avoir été utilisés pour des repeuplements au sein des populations de perdrix grise des Pyrénées. Ainsi nous avons représenté la part de chacun des deux élevages (français ou espagnol) dans chaque population sauvage des Pyrénées. La distribution de cette introgession est illustrée par la figure 9.

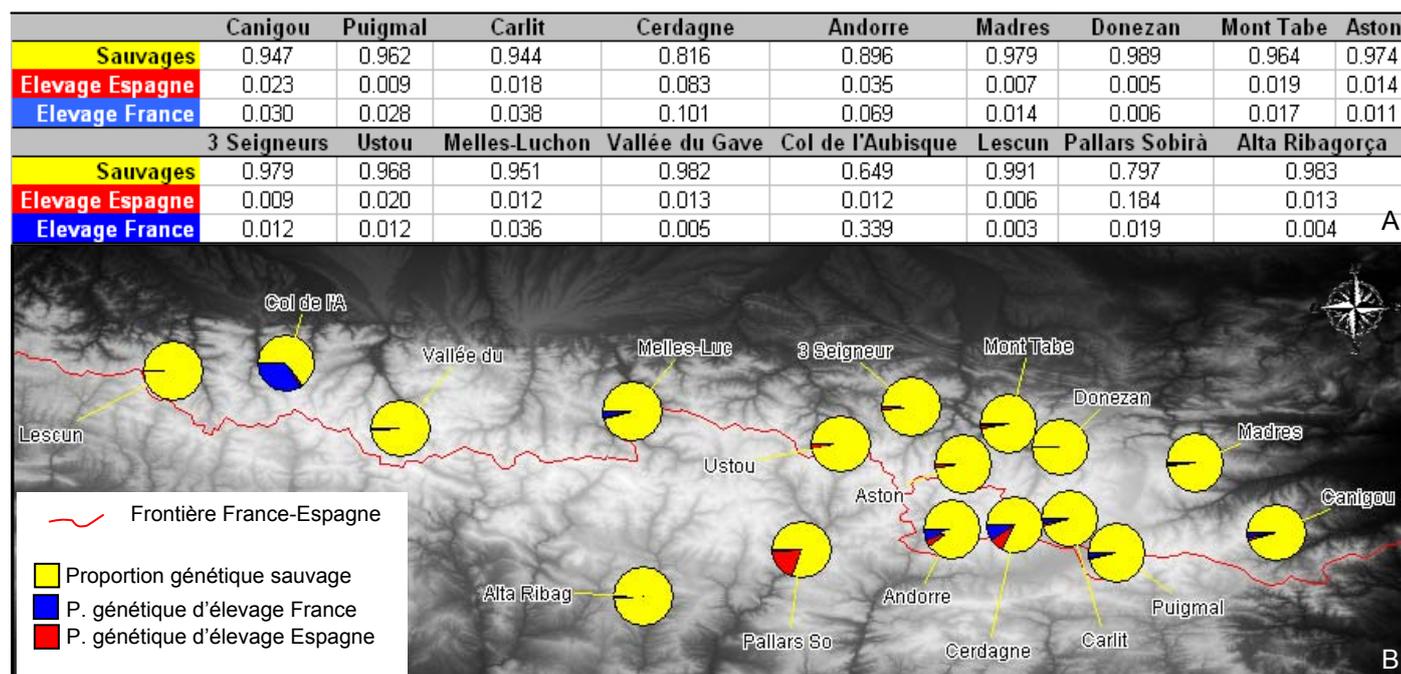


fig.9 : A : Distribution de l'introgession génétique au sein des populations de perdrix grise des Pyrénées.  
 B : Représentation sur carte de ces proportions

L’empreinte génétique des perdrix élevages (et donc potentiellement d’une introgession génétique) se retrouve principalement dans les populations de Pallars Sobirà, Cerdagne, Andorre et sur le Col de l’Aubisque. Ces résultats sont concordants avec les pratiques de lâchers largement répandues jusqu’à récemment sur ces populations. Notons également que les populations situées en Andorre et en Cerdagne révèlent une introgession génétique venant à la fois des élevages espagnols et Français. Compte tenu de leur position géographique cela ne semble pas étonnant mais mérite une attention particulière quant à la coordination des gestionnaires franco-espagnols et andorrans.

L’étude suivante propose donc, l’analyse de la structuration génétique des individus sauvages des Pyrénées (n=376) sans tenir compte des individus introgessés (n=229).

C/ Structuration génétique des populations de perdrix grise sauvages :

Sans tenir compte des individus introgressés, les premières analyses de diversité génétique indiquent qu'il n'y a pas de différence significative dans la distribution de la diversité génétique au sein des populations pyrénéennes (He, test de Friedman, N=12, ddl=16, P=0.493), (AR, test de Friedman, N=12, ddl=16, P=0.452) (tableau 3). En revanche, les analyses de structuration génétique révèlent des différenciations génétiques significatives entre certaines populations (Fst moyen de 0.041±0.029) (tableau 4). Ces différenciations significatives montrent un premier signe de structuration génétique des perdrix grises des Pyrénées.

	Canigou	Puigmal	Carlit	Cerdagne	Andorre	Madres	Donezan	Mont Tabe	Aston	3 Seigneurs	Ustou	Melles-Luchon	Vallée du Gave	Col de l'Aubisque	Lescun	Pallars Sobirà	Alta Ribagorça	toutes pop
AR	2.381	2.416	2.482	2.562	2.509	2.319	2.386	2.458	2.485	2.474	2.441	2.444	2.447	2.408	2.341	2.414	2.276	2.511
He	0.609	0.629	0.666	0.687	0.673	0.609	0.620	0.647	0.664	0.652	0.631	0.635	0.637	0.613	0.604	0.628	0.590	0.634

Tab.3 Diversité génétique (He) et Richesse allélique (AR) moyen pour chaque population de perdrix grise des Pyrénées sauvages.

	Canigou	Puigmal	Carlit	Cerdagne	Andorre	Madres	Donezan	Mont Tabe	Aston	3 Seigneurs	Ustou	MellesLuchon	ValléeGave	ColAubisque	Lescun	PallarsSobirà	AltaRibagorça
Canigou	0	NS	*	NS	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS	*	*	*	NS	NS
Puigmal	0.0161	0	*	NS	*	*	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	NA	NS
Carlit	0.0264	0.0128	0	NS	NS	*	*	*	*	NS	NS	*	*	*	*	NA	NS
Cerdagne	0.044	0.0171	0.0031	0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NA	NS
Andorre	0.0473	0.0222	0.0069	-0.0066	0	NS	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NA	NS
Madres	0.0362	0.0185	0.0122	0.0136	0.0095	0	*	*	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	NA	NS
Donezan	0.0961	0.0425	0.0324	0.0118	0.0209	0.0524	0	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NA	NS
Mont Tabe	0.0567	0.0229	0.0192	0.0205	0.0267	0.0238	0.0354	0	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	NA	NS
Aston	0.0494	0.0413	0.0259	0.0215	0.0095	0.023	0.05	0.0235	0	NS	NS	NS	*	NS	NS	NA	NS
3 Seigneurs	0.0095	0.0125	0.0069	0.0261	0.0179	0.0162	0.0558	0.0222	0.0069	0	NS	NS	*	NS	NS	NA	NS
Ustou	0.0239	0.0101	0.0291	0.0214	0.0399	0.0255	0.0599	0.0206	0.0457	0.0072	0	NS	NS	NS	NS	NA	NS
MellesLuchon	0.0019	0.0171	0.0215	0.0288	0.031	0.0215	0.0817	0.0361	0.0286	-0.0014	0.0184	0	*	*	NS	NA	NS
ValléeGave	0.0563	0.0457	0.0454	0.043	0.0533	0.0502	0.092	0.0427	0.0562	0.0506	0.0076	0.0354	0	*	NS	NA	NS
ColAubisque	0.0771	0.0497	0.0675	0.0545	0.077	0.0786	0.0908	0.0764	0.0717	0.0571	0.0122	0.0628	0.0408	0	NS	NA	NS
Lescun	0.09	0.0461	0.0612	0.0473	0.0636	0.0639	0.1082	0.0561	0.0682	0.0695	0.0092	0.07	0.0407	0.0399	0	NA	NS
PallarsSobirà	0.0154	0.0095	0.0069	0.0171	0.0111	0.0004	0.0751	0.0215	0.0252	0.0076	0.0023	0.0037	0.013	0.0724	0.0462	0	NA
AltaRibagorça	0.1323	0.0747	0.071	0.0409	0.0567	0.1016	0.1005	0.0744	0.0563	0.0562	0.094	0.0864	0.0717	0.1338	0.1026	0.082	0

Tab.4 Valeurs de Fst (différenciation génétique) estimées entre chaque paire de population (diagonale inférieure). La diagonale supérieure représente la significativité des valeurs et Fst, \* désignent les valeurs de Fst significatives (p=0.000368 après correction de Bonferroni), NS : non significatif, NA : non disponible.

De plus, ces distances génétiques (Fst) sont positivement corrélées avec les distances géographiques euclidiennes révélant un isolement par la distance (figure 10).

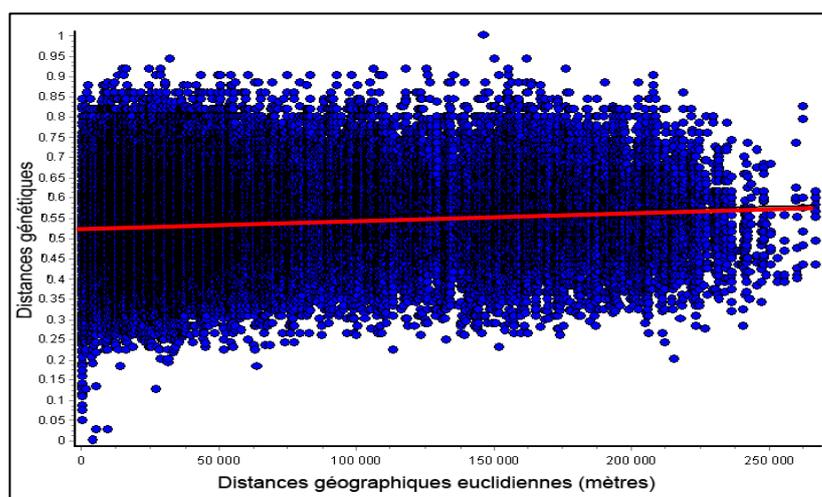


Fig 10 : Test de Mantel, régression linéaire entre distances génétiques par paire d'individus et distances géographiques euclidiennes. (r²= 0.0091; p=0.0009).

D'après les analyses bayésiennes, cette structuration génétique est caractérisée par la présence de 3 clusters d'individus (figure 11).

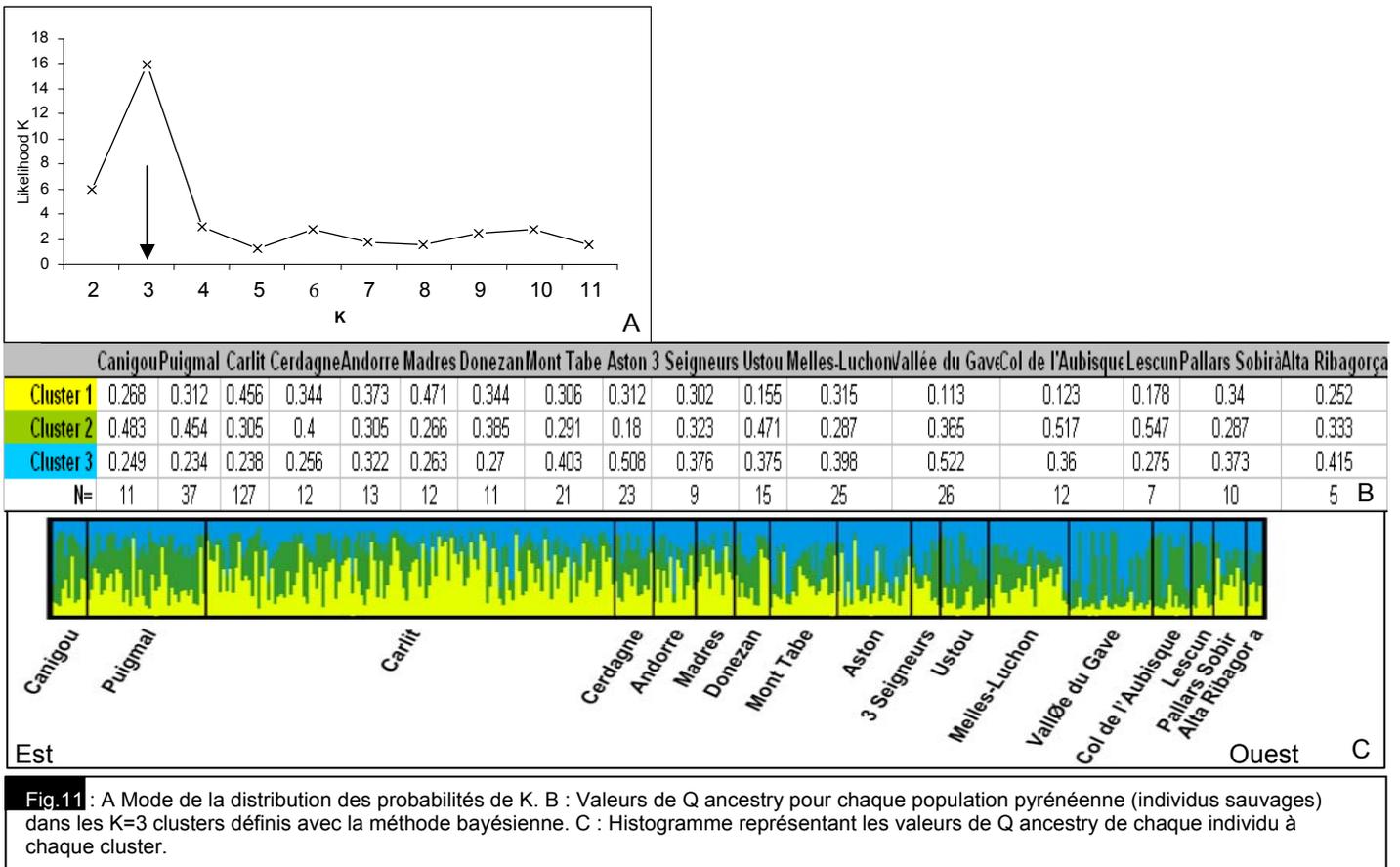


Fig. 11 : A Mode de la distribution des probabilités de K. B : Valeurs de Q ancestry pour chaque population pyrénéenne (individus sauvages) dans les K=3 clusters définis avec la méthode bayésienne. C : Histogramme représentant les valeurs de Q ancestry de chaque individu à chaque cluster.

La structuration génétique déduite de la figure 11 n'est pas très marquée ; ceci pourrait être dû au fait que le logiciel STRUCTURE ne réagit pas très bien face à des structurations génétiques organisées en isolement par la distance. Une autre représentation de la structuration génétique des Pyrénées a été obtenue à l'aide d'une AFC (figure 12). Cette AFC (29% de l'inertie totale) distingue 3 groupes de populations : un premier composé uniquement de la population située sur la vallée du Gave de Pau, un deuxième englobant la population du Canigou et le troisième englobant les autres populations pyrénéennes (figure 12).

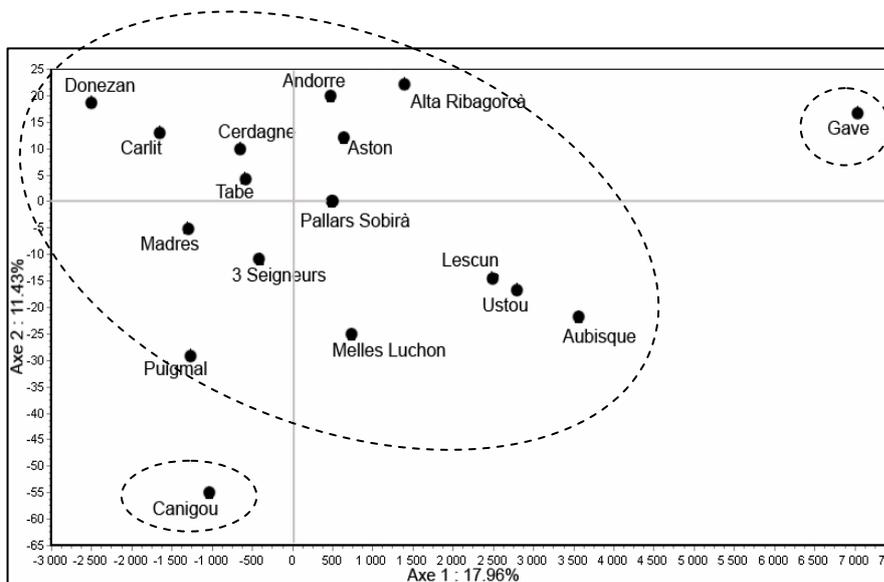
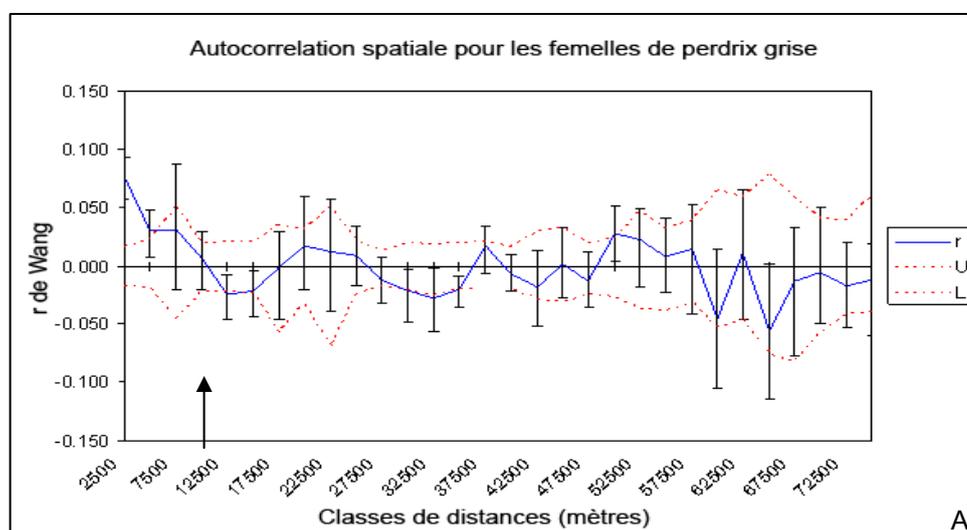


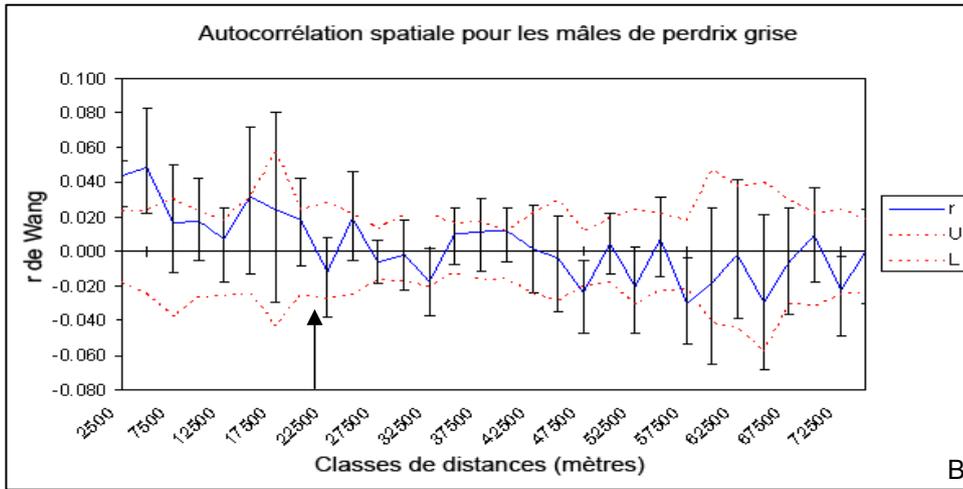
fig. 12 Analyse Factorielle des Correspondances basée sur la distribution des génotypes de tous les individus sauvages des Pyrénées. Les ellipses ont été déterminées a posteriori à l'aide d'une classification hiérarchique ascendante.

L'isolement par la distance est connue chez de nombreux galliformes. Cette structuration génétique spatiale (dite de 'voisinage'), caractérisée par des flux géniques de proximité est souvent expliquée par le comportement des oiseaux qui limitent leurs mouvements aux localités proches. L'estimation des capacités de dispersion de l'espèce à l'aide de l'outil génétique semble confirmer ce résultat. En effet, une autocorrélation spatiale réalisée à l'aide du logiciel GENALEX (Peakall & Smouse 2006) a révélé des capacités de dispersion relativement faibles (figure 13). Cette analyse, basée sur 263 individus (115 femelles et 148 mâles) répartis sur 1900 km<sup>2</sup>, a révélé que les perdrix ne dispersent pas au-delà de 23 kilomètres pour les mâles et 12 kilomètres pour les femelles. Ces distances de dispersion sont estimées en distances dites de 'moindre coût', c'est-à-dire des distances calculées en fonction de la géomorphologie du paysage et des exigences écologiques de la perdrix grise des Pyrénées (annexe II2). Ces distances de moindre coût sont positivement corrélées avec les distances euclidiennes. En effet les distances de moindre coût sont 4 fois supérieure en moyenne aux distances linéaires euclidiennes. Ainsi les mâles et les femelles disperseraient à environ 6 et 3 kilomètres en distances linéaires/euclidiennes. Dans les deux cas, sur la base des résultats génétiques, il semblerait que la tendance aille vers un biais de dispersion sexuel en faveur des mâles de perdrix grise. Ce biais de dispersion sexuel est surprenant pour une espèce de galliformes. En effet, ceux-ci sont connus pour avoir un biais de dispersion en faveur des femelles, les mâles étant plus phylopatriques (Caizergues *et al.* 2003a). Même si ces résultats ne semblent pas être soutenus par les analyses du module 'biased dispersal' du logiciel FSTAT, les études directes de télémétrie semblent confirmer ces estimations avec des distances moyennes de dispersion post-natales ne dépassant pas les 4 km (Novoa 1998) et un biais de dispersion en faveur des mâles. En effet, sur le massif du Carlit (Pyrénées Orientales), les distances de dispersion post-natales de 4 jeunes femelles ont été respectivement de 0.4, 0.5, 0.8 et 1 km contre 3.5 et 10.6 kilomètres pour deux jeunes mâles (Novoa, données non publiées).

Les faibles capacités de dispersion (6 kilomètres) entraînent une structuration des populations de perdrix grise des Pyrénées organisées en isolement par la distance



**Fig 13 :** Autocorrélations spatiales chez les femelles (A) et les mâles (B) de perdrix grise des Pyrénées. En abscisse, les distances géographiques de 'moindre coût'. En ordonnées, le r de Wang : indice de distance génétique calculé par paire d'individu (si  $r > 0$  alors individus génétiquement proches si  $r < 0$  alors individus génétiquement différents). La courbe bleue représente l'évolution du r avec la distance géographique. Les courbes en pointillés rouges représentent les limites de l'intervalle de confiance à 95 % pour l'hypothèse nulle selon laquelle il n'y a aucune structuration génétique ( $r=0$ ). La flèche indique la distance de dispersion pour le sexe en question.



**VI/ Structuration génétique des populations de perdrix grise du Bassin Parisien (*P. p. armoricana*)**

L'analyse de la structuration génétique des perdrix grises du Bassin Parisien a été réalisée sur un total de 134 individus répartis en 5 populations (BP1, BP2, BP3, BP4, BP5), 25 individus d'élevage (BP6) et 11 individus issus d'un conservatoire (BP7) (définition : encadré ci-contre).

Un conservatoire est une structure qui consiste à élever en élevage des perdrix grises de souche sauvage.

Dans un premier temps, nos analyses montrent qu'il n'y a pas de différence significative de diversité génétique entre les populations sauvages, d'élevages et du conservatoire (He, test de Friedman, N=12, ddl=6, P=0.072), (AR, test de Friedman, N=12, ddl=6, P=0.399) (tableau 5). En revanche, les analyses de structuration génétique révèlent des différenciations génétiques significatives entre certaines populations (Fst moyen de 0.041±0.029) (tableau 6).

	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6	BP7	Toutes pop
AR	4.272	4.417	4.758	4.260	4.227	4.550	4.343	4.601
He	0.665	0.676	0.711	0.624	0.670	0.688	0.669	0.672

tab. 5 Valeurs de diversité génétique (He) et de richesse allélique (AR) pour chacune des populations sauvages et élevages du Bassin

	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6	BP7
BP1	0	*	NS	NS	*	*	*
BP2	0.0068	0	*	NS	*	*	NS
BP3	0.0024	0.0137	0	NS	*	*	NS
BP4	0.0111	0.0167	0.0368	0	*	NS	NS
BP5	0.0219	0.0153	0.0204	0.0418	0	*	*
BP6	0.035	0.0203	0.0277	0.0347	0.0146	0	NS
BP7	0.0256	0.0172	0.0174	0.0374	0.0275	0.0313	0

tab. 6 Valeurs de Fst estimées entre chaque paire de population (diagonale inférieure). Significativité des Fst (diagonale supérieure), \* désignent les valeurs de Fst significatives (p= 0.0024 après correction de Bonferroni), NS : non significatif.

Malgré certaines différences significatives entre populations (Fst moyen : 0.023±0.01), les analyses bayésiennes du logiciel STRUCTURE, ne semblent pas détecter de structuration génétique marquée au sein de notre échantillonnage (K=1). De la même manière, un test de Mantel ne révèle pas d'isolement par la distance au sein du Bassin Parisien (figure 14). En effet, il n'y a pas de corrélation entre distances génétiques et distances géographiques euclidiennes (r<sup>2</sup>= 0.006;P= 0.98) et de 'moindre coût écologique' (r<sup>2</sup>= 0.0000017, P=0.2511). Les distances ont été calculées dans un habitat auquel nous avons attribué de forts coûts écologiques aux couverts urbain et forestier (figure 15 et annexe II2).

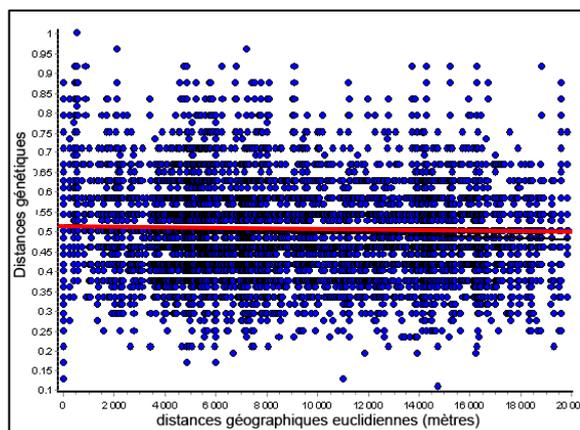


Fig 14: Test de Mantel, régression linéaire entre distances génétiques et distances géographiques euclidiennes. Corrélation testée avec le logiciel Alleles In Space (Miller 2005) à l'échelle individuelle (r<sup>2</sup>= 0.006;P= 0.98).

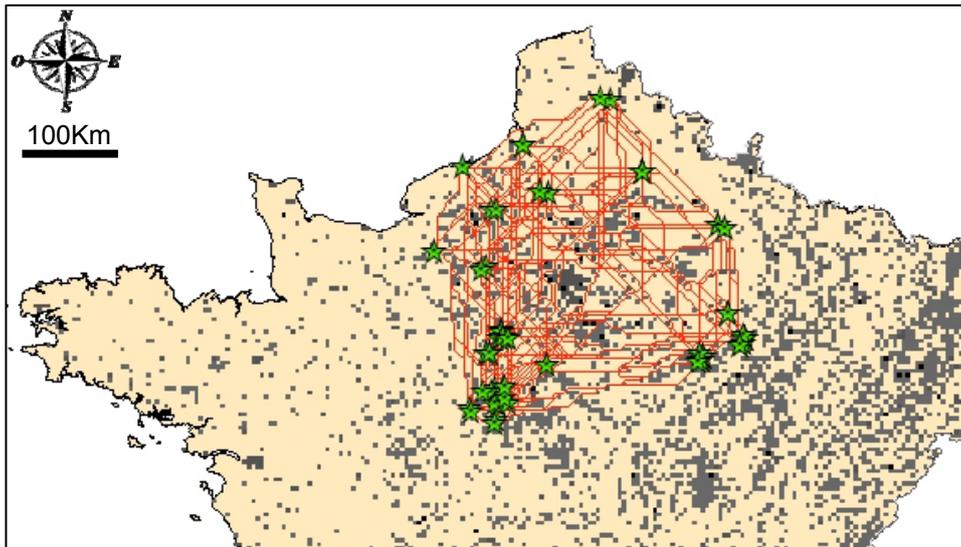


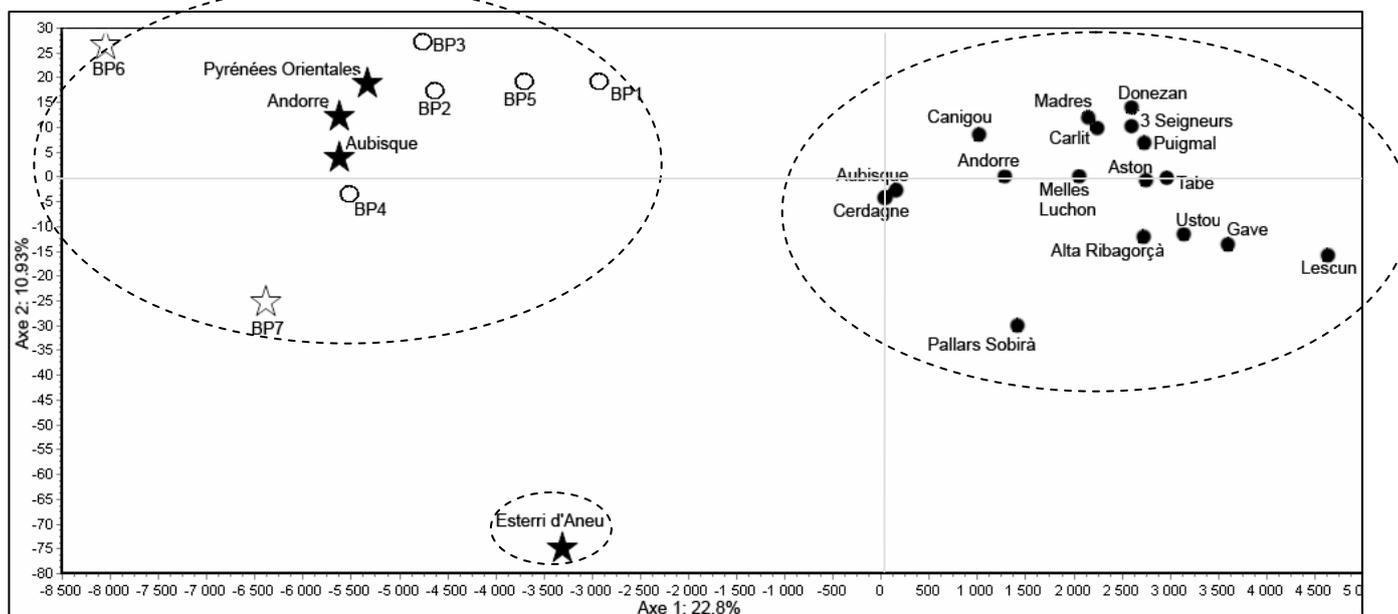
fig. 15 Distances de moindre coût écologique évaluées entre chaque paire d'individus (étoiles vertes). Les zones grisées représentent l'habitat non favorable à la perdrix grise de plaine (couverts urbain et forestier).

N'ayant pas de structuration génétique au sein du Bassin Parisien, nous n'avons pas pu obtenir d'estimation de la distance de dispersion avec l'outil génétique.

**VI/ Bilan sur la structuration génétique des perdrix grises en France.**

A/ Impact des lâchers sur la structuration génétique :

Une Analyse Factorielle des Correspondances a été réalisée sur l'ensemble de notre échantillonnage afin d'observer d'éventuel rapprochement de populations (figure 16).



**Fig 16 :** Analyse Factorielle des Correspondances basée sur la distribution des génotypes de tout notre échantillonnage. Les ellipses ont été rajoutées *a posteriori* à l'aide d'une classification hiérarchique ascendante.

Cette AFC permet de distinguer trois ensembles de populations : les perdrix des Pyrénées, celles du Bassin Parisien + l'ensemble des élevages à l'exception de celui d'Estèrri d'Aneu et enfin les perdrix d'élevages d'estèrri d'Aneu.

**Dans les Pyrénées :**

D'après la figure 17, force est de constater que les lâchers dans les Pyrénées ont été réalisés à partir de perdrix provenant de deux élevages différents : (i) un élevage 'français' se rapprochant génétiquement des perdrix du Bassin Parisien et (ii) un élevage espagnol (situé à Estèrri d'Aneu). Il est donc logique de constater que ces lâchers sont un facteur génétiquement structurant des populations sauvages de perdrix grise. Ainsi des populations telles que celles situées sur le col de l'Aubisque ou encore du côté espagnol en Cerdagne et au Pallars Sobirà se retrouvent légèrement détachées du noyau pyrénéen. Ce mélange de sous-espèces différentes en milieu naturel semble inquiétant pour l'intégrité génétique des perdrix grises sauvages des Pyrénées. En effet, le fait d'être en captivité, et notamment en l'absence de parents, confère aux oiseaux d'élevages des modifications tant phénotypiques que comportementales (Guitart & Cassaing 2000). Parmi ces modifications, nous pouvons souligner l'absence

La position marginale des populations d'élevages aussi bien dans le Bassin Parisien que celle d'Estèrri d'Aneu pourrait s'expliquer par une dérive génétique intrinsèque aux élevages. Une autre hypothèse serait un biais d'échantillonnage qui n'engloberait que des individus proches génétiquement (de la même famille par exemple).

d'apprentissage de l'alimentation et de la nutrition ainsi que l'absence d'un comportement inné de fuite face à un prédateur. Ceci confère une moins bonne adaptation aux individus d'élevage lorsqu'ils sont lâchés en milieu naturel (Guitart & Cassaing 2000). Ainsi, comme c'est le cas chez la caille des blés (Chazara *et al.* 2006), une hybridation entre perdrix sauvages et perdrix d'élevages pourrait conférer une moins bonne adaptation au milieu pour les descendants hybrides et donc une contrainte pour la pérennité de la perdrix grise des Pyrénées.

Il est vrai que l'hybridation peut être le moteur d'une diversification génétique entraînant une meilleure valeur adaptative (Randi & Bernard-Laurent 1998). Cependant, pour la perdrix grise des Pyrénées, outre le fait que les individus lâchés proviennent d'élevages, les deux sous-espèces sont allopatriques et possèdent chacune des habitats particuliers et donc une écologie bien différente. Par conséquent, il est difficile d'envisager cette hybridation comme un moteur d'évolution adaptative.

Il semblerait que la distribution géographique de l'introgression génétique se cantonne aux populations repeuplées (col de l'Aubisque, Andorre, Pallars Sobira et Cerdagne). Une explication de la faible proportion d'individus introgressés dans les autres populations serait la faible dispersion des perdrix grises qui limitent ainsi la propagation des gènes d'élevage dans le milieu. De plus, la contribution des oiseaux d'élevage à l'introgression génétique des populations sauvages dépend surtout de la quantité d'oiseaux lâchés, car ces derniers ont un faible taux de survie post-lâchers (Claude NOVOA Comm. Pers.). Ceci pourrait expliquer les taux d'introgression élevés que l'on trouve au niveau des populations de l'Aubisque, Andorre, Cerdagne et Pallars Sobira, populations qui sont connues pour faire l'objet de lâchers réguliers.

### **Dans le Bassin Parisien**

Dans le bassin Parisien, les individus d'élevages lâchés en milieu naturel ne sont pas un facteur génétiquement structurant des populations sauvages. Ceci peut être expliqué par le fait que, contrairement aux Pyrénées, les individus lâchés dans le Bassin Parisien appartiennent *a priori* à la même sous espèce : *P.p. armoricana* (d'après l'AFC de la figure 17).

L'absence de différence de diversité génétique entre populations sauvages et d'élevage, pourrait provenir du fait que les individus lâchés étaient issus de plusieurs populations d'élevage et donc potentiellement de plusieurs origines. Ceci aurait pour conséquence une augmentation des indices de diversité génétique et notamment une augmentation des valeurs de richesse allélique.

### En France

Ayant une origine se rapprochant génétiquement des perdrix sauvages du Bassin Parisien, les lâchers de perdrix grise d'élevage dans les Pyrénées pourraient homogénéiser les populations en France et ainsi abaisser la valeur de différenciation génétique ( $F_{st}$ ) entre les deux sous-espèces (Pyrénées et Bassin Parisien). Nous avons donc reconsidéré, sans les individus introgressés, la différenciation génétique entre les deux sous-espèces. Les nouvelles analyses ont révélé une plus grande valeur de différenciation génétique entre les populations du Bassin Parisien et les populations des Pyrénées ( $F_{st}=0.061^*$ ,  $P=0.05$  sans les individus introgressés contre  $F_{st}=0.045^*$ ,  $P=0.05$  avec les individus introgressés).

$F_{st}=0.061^*$ ,  $P=0.05$  sans les individus introgressés contre  $F_{st}=0.045^*$ ,  $P=0.05$  avec les individus introgressés

### B/ Impact du paysage sur la structuration génétique

Au sein des Pyrénées, nous pouvons remarquer que les perdrix sauvages révèlent un patron en isolement par la distance à la différence de celle du Bassin Parisien. L'une des hypothèses pouvant expliquer cette différence de structuration pourrait être la structure de l'habitat, fragmenté dans les Pyrénées et beaucoup plus homogène dans le Bassin Parisien. Nous pouvons donc supposer que les échanges, entre les noyaux de populations, se font beaucoup plus facilement dans le Bassin Parisien que dans les Pyrénées.

Lorsque l'on enlève les couverts forestier et urbain dans le Bassin Parisien et que l'on calcule, en fonction de l'altitude et de l'exposition (annexe II2), une fraction d'habitat favorable de la perdrix grise dans les Pyrénées, il apparaît que l'habitat de la perdrix grise est beaucoup plus homogène dans le Bassin Parisien que dans les Pyrénées (figure 17 + encadré ci-dessous). Les perdrix grises auraient donc besoin d'habitats favorables (corridors écologiques) entre les 'patches' d'habitats favorables.

Avec les techniques de SIG il a été possible de calculer une proportion d'habitat favorable dans un périmètre donné. Sur une zone de 26 569.5 Km<sup>2</sup>, le calcul révèle une proportion d'habitat favorable d'environ 88% dans le Bassin Parisien contre seulement 21% dans les Pyrénées.

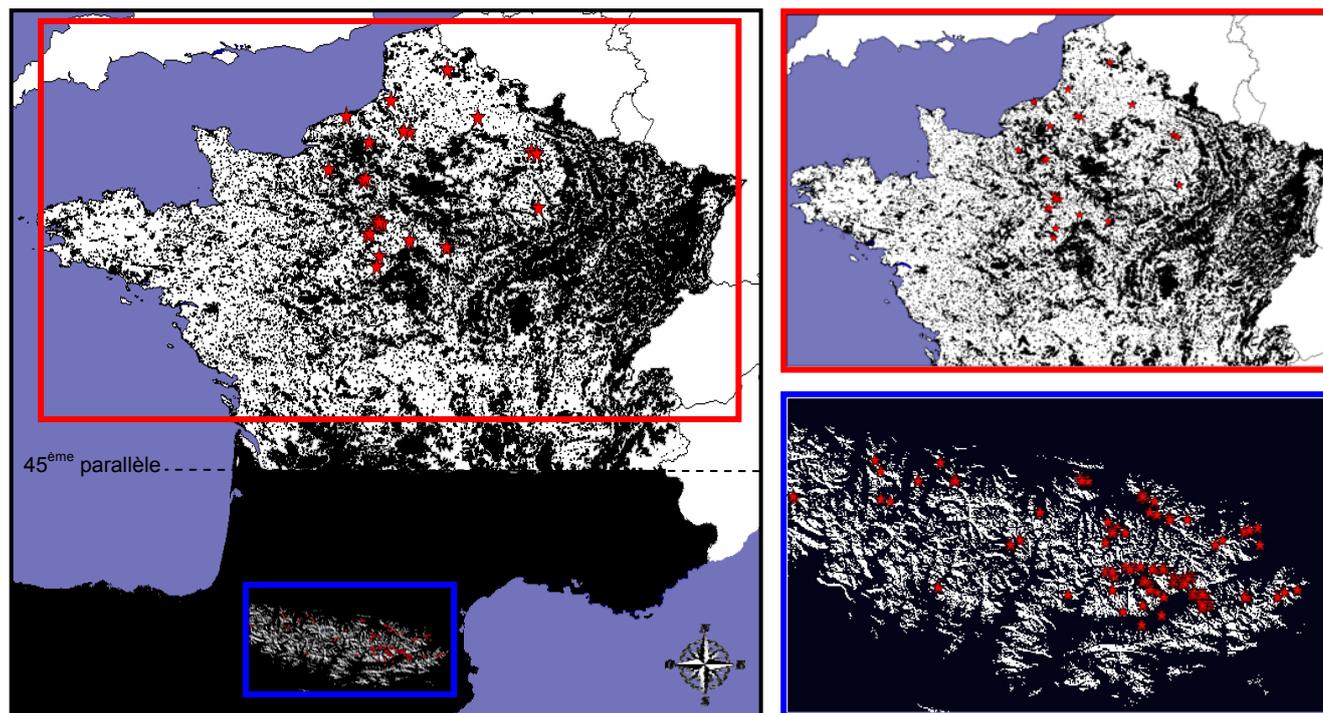


Fig 17 : Habitat de la perdrix grise en France. Cadre bleu : habitat de l'écotype de montagne (*P.p. hispaniensis*). Cadre Rouge : habitat de l'écotype de plaine (*P.p. armoricana*).

□ Habitat potentiel  
 ■ Habitat non favorable à la perdrix grise

Ainsi, la faible fragmentation du milieu au niveau du Bassin Parisien ne semble pas influencer la structuration génétique des populations de perdrix grise. Cependant, même si nous pouvons imaginer une grande population de perdrix grise, génétiquement homogène dans le Bassin Parisien, il n'en reste pas moins que, comme dans les Pyrénées, il existe des barrières à la dispersion et aux flux géniques. En effet, nous avons utilisé le logiciel ALLELE IN SPACE (Miller 2005) afin de construire un réseau de distances génétiques entre nos différents échantillons. Ce réseau dessine des connexions entre les échantillons génétiquement les plus proches. En cas de distances génétiques similaires (entre deux paires d'individus), le réseau dessine une deuxième connexion reliant alors la deuxième paire d'individus. Ce réseau est représenté sur la figure 18. Nous pouvons remarquer que peu de diagonales (voire aucune) coupent la l'agglomération Parisienne et que les 'connexions génétiques' entre les individus semblent s'organiser en anneau autour de cette agglomération. Ainsi, même s'il ne semble pas y avoir de structuration génétique vraiment marquée, l'agglomération Parisienne représente un obstacle infranchissable pour les perdrix grises. Cette barrière à la dispersion pourrait expliquer la significativité des valeurs de  $F_{st}$  entre certaines populations situées de part et d'autre de l'agglomération.

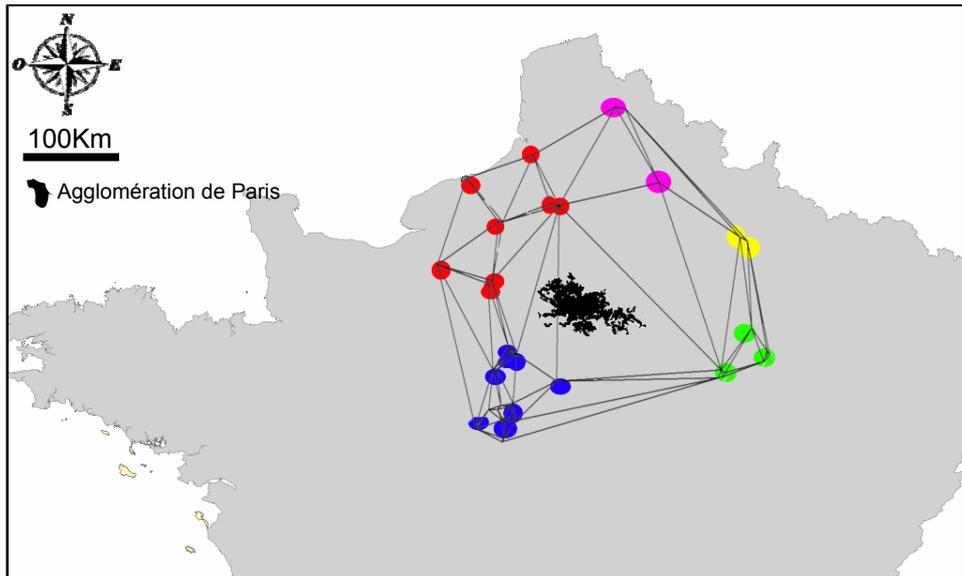


fig.18 Réseau de distance génétique entre les différents échantillons. Ce réseau représente les connections entre les échantillons génétiquement les plus proches. Réseau réalisé avec le logiciel ALLELE IN SPACE.

- BP1, N=39
- BP2, N=37
- BP3, N=18
- BP4, N=8
- BP5, N=32



## Transferability of microsatellite markers among economically and ecologically important galliform birds

N. Bech<sup>1</sup>, C. Novoa<sup>2</sup>, J.F. Allienne<sup>1</sup> and J. Boissier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie et d'Écologie Tropicale et Méditerranéenne,  
Centre National de la Recherche Scientifique,  
Université de Perpignan, Perpignan Cedex, France  
<sup>2</sup>Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage,  
Direction des Etudes et de la Recherche, Prades, France

Corresponding author: N. Bech  
E-mail: nicolas.bech@univ-perp.fr

Genet. Mol. Res. 9 (2): 1121-1129 (2010)  
Received January 8, 2010  
Accepted March 20, 2010  
Published June 15, 2010  
DOI 10.4238/vol9-2gmr760

**ABSTRACT.** We used the partially sequenced genomes of the turkey and chicken to find a large number of microsatellite markers. We then characterized 10 polymorphic microsatellite markers developed by cross-species amplification from economically and ecologically important birds to various European subspecies of the grey partridge. Even though we used cross-species amplification, a high degree of polymorphism was conserved in all microsatellite markers. Cross-species amplification from

birds of economic and ecological interest, such as chicken and turkey, could be an attractive approach to develop microsatellite markers and to use these to manage wild and captive populations of other galliforms, such as the grey partridge.

**Key words:** Grey partridge; Turkey; Chicken; Microsatellite markers; Cross-species amplification

## INTRODUCTION

Among galliforms, the chicken (*Gallus gallus*) and turkey (*Meleagris gallopavo*) are of particular economic interest, and their genomes are respectively entirely and partially sequenced. Several hundred primer pairs have already been defined to amplify microsatellite markers in these two species. In this study, we proposed to test the transferability of these markers to the grey partridge (*Perdix perdix*), another galliform species of ecological and economic interest. Considering that the galliform phylogenetic tree shows that the chicken is basal and that the turkey is a sister taxon of the grey partridge (Dimcheff et al., 2002; Kimball et al., 1999), we hypothesized that primer pairs identified in chicken and conserved in turkey (or conversely) should also be conserved in grey partridge. The grey partridge is represented by 8 allopatric sub-species occurring in Eurasia. Like other galliforms, such as Capercaillie (Segelbacher and Storch, 2002) or rock ptarmigan (Bech et al., 2009), global warming would cause the loss of suitable habitat and would thus increase population fragmentation of the grey partridge. In France, this habitat fragmentation would lead to the geographical isolation of two sub-species, *Perdix perdix hispaniensis* (included in the red data book of threatened species) in the Pyrenees and *Perdix perdix armoricana* in the north of France. Moreover, *P. p. hispaniensis* and *P. p. armoricana* represent important small game species, and because they are depleted by hunting, they are regularly restocked. Because restocking involves individuals originating from distinct European sub-species, wild populations display a risk of genetic introgression (Martin et al., 2003).

Microsatellite markers are a very useful tool for both ecological monitoring of wild populations and stock management and enhancement of captive-bred individuals. In this paper, we present the characterization of microsatellite markers usable for the European grey partridge.

## MATERIAL AND METHODS

### Cross-species amplification

In this study, we tested 138 microsatellite primer pairs (see Supporting Information Online; Supplementary Material) on the grey partridge, which have been successfully amplified in both chicken and turkey. Three other criteria were also considered: i) primer pairs would show high annealing temperature in source species; ii) the microsatellite loci would be polymorphic in their source species, and iii) the microsatellite loci would be located on different chicken chromosomes in order to avoid potential linkage disequilibrium. Sampling included liver and feather samples,

which were collected during the hunting season ( $N = 82$ ). Main samples came from two distinct wild sub-species (*P. p. hispaniensis* and *P. p. armoricana*). Some other samples came from stockbreeding with an imprecise geographical origin. Genomic DNA was extracted using silica columns (e.Z.N.A from OMEGA BIO-TEK), according to the manufacturer protocol. Polymerase chain reaction was performed using the QIAGEN multiplex kit. Multiplexes were carried out according to the manufacturer standard microsatellite amplification protocol in a final volume of 10  $\mu$ L and at 57°C for annealing temperature.

### Statistical analysis

Departures from Hardy-Weinberg expectations and linkage disequilibria were assessed for each specific microsatellite markers using the exact tests (1000 permutations) implemented in GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 1995). Polymorphism of microsatellite markers, which gave us a specific amplification, was estimated with the number of alleles ( $A$ ), and expected heterozygosity ( $H_e$ ) (Weir and Cockerham, 1984) using FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2001) with 800 permutations.

## RESULTS

Among 138 loci tested, 76 gave amplification with only one specific product (see Supporting Information Online; Supplementary Material). Of these, 10 microsatellite markers were polymorphic (Table 1). Among these, no evidence of linkage disequilibrium was detected ( $P < 0.001$ , significance threshold adjusted with the Bonferroni's procedure, for 45 tests). After Bonferroni's correction for multiple comparison ( $P < 0.005$ ), only two loci showed significant deviation from Hardy-Weinberg expectations: MNT412 and MNT45 ( $F_{15} > 0$ ). This heterozygosity deficit could be interpreted as the result of a Wahlund effect because our sampling included several samples from different geographical regions but not real field populations, which are not yet determined. Concerning polymorphism, the number of alleles per locus ranged from 3 to 19 and gene diversity ranged from 0.51 to 0.89 (Table 1).

## DISCUSSION

This study shows that genomic sequence databases of economically important animals are useful tools to identify conserved genetic markers. Because there are not many microsatellites in avian species (Primmer et al., 1997), cross-species amplification from birds of economic interest could be an attractive approach to manage wild and captive populations of other birds such as the grey partridge. In birds, it has been shown that the polymorphism rate of microsatellite markers decreases with the increase in genetic distance from the species from which they have developed (Ellegren et al., 1995; Primmer et al., 1996). With the use of cross-species amplification, a high polymorphism was conserved in our microsatellite markers, which is very promising in terms of usefulness. Studies based on these markers are now underway.

Table 1. Characteristics of 10 polymorphic microsatellite loci developed by cross-species amplification for the grey partridge.

Species name	Origin species				<i>Perdix perdix</i> (N = 82)							
	Marker name	Number of alleles	GenBank accession No.	Fragment size	Position on chromosome	Primer sequences (5'-3')	T (°C)	Fragment size	Multiplex (Dye number)	A	H <sub>e</sub>	F <sub>is</sub>
<i>M. gallopavo</i>	MNT12	1	AF482371	147	4	F: AGGTGTTTTGGGAGTCTC R: TGCAAGCACCACTCTGCTAAG	59.5	145-185	2 (D4)	19	0.822	+0.139
<i>M. gallopavo</i>	MNT412	3	AL592829	162-166	19	F: CCCATGTGACAGTGAATTG R: GTCATCACAGTGGAGGATCG	61.7	234-272	2 (D2)	14	0.889	+0.131*
<i>G. gallus</i>	ADL0292	2	G01710	126	5	F: CCAAATCAGGCAAACTTCT R: AAATGGCTAAAGGATGAGGA	61.7	98-112	3 (D4)	3	0.444	+0.049
<i>M. gallopavo</i>	MNT477	1	AL593755	230	5	F: TTCACACCGCTATTCAAAG R: TCCAAAATGTGACTAGATGATAAAGTG	56.5	227-263	3 (D4)	17	0.811	+0.071
<i>M. gallopavo</i>	MNT404	3	AL593651	283-297	13	F: AACCAAGCTCTGGAGATACCG R: GGACTGCAAGGACAACATCC	61.7	242-254	2 (D3)	4	0.510	-0.040
<i>M. gallopavo</i>	MNT45	?	AY235058	140	3	F: AGATGGAGGACAGAACCTC R: TGTCAGCCTGAATGTTTCCTC	59.5	95-112	2 (D3)	7	0.686	+0.292*
<i>G. gallus</i>	MCW230	?	G32001	281-298	11	F: TGCACAGCCCAAGCTGCTTC R: GCAACTTCTGCAGGCTCA †	61.7	227-243	1 (D2)	5	0.746	+0.263
<i>M. gallopavo</i>	MNT467	4	AL593567	232	7	F: AGTGGAGTGTGGATCTTG R: TCGTACTGGCAGGCATGTAG	61.7	235-239	1 (D4)	3	0.510	-0.145
<i>G. gallus</i>	ADL0260	2	G01680	129	4	F: GGAGCTGTCATCCACTCTTG R: ATCAGCCCAATCCCAGTATCG	56.5	94-114	1 (D3)	4	0.574	+0.001
<i>M. gallopavo</i>	MNT408	3	AY926543	230	1	F: GTGTCCCTGCCACACTACAG R: GGGAAITTGCTCCAACCTGAC	56.5	223-237	3 (D3)	6	0.727	-0.061

Origin species of the marker; Marker name; Number of alleles in the origin species; GenBank accession number; Fragment size in the origin species; Position of the marker on the chicken chromosomes; Primer sequences (F: forward, R: reverse); Ta: annealing temperature in the grey partridge (°C); fragment size in grey partridge; multiplex and dye number according to Beckman Coulter codes; A: number of alleles; H<sub>e</sub>: expected heterozygosity; F<sub>is</sub>: significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni's correction for multiple comparison (P < 0.005). † Reverse primer sequence of MCW230 (G32001) has been redesigned in order to have a better specificity.

## ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Bureau des Ressources Génétiques, Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique and Centre National de la Recherche Scientifique (all in France). Equally, we would like to thank especially David Ripoll and Mathieu Blanchard who contributed equally to this project.

## REFERENCES

- Bech N, Boissier J, Drovetski S and Novoa C (2009). Population genetic structure of rock ptarmigan in the 'sky islands' of French Pyrenees: implications for conservation. *Anim. Conserv.* 12: 138-146.
- Dimcheff DE, Drovetski SV and Mindell DP (2002). Phylogeny of Tetraoninae and other galliform birds using mitochondrial 12S and ND2 genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24: 203-215.
- Ellegren H, Primmer CR and Sheldon BC (1995). Microsatellite 'evolution': directionality or bias? *Nat. Genet.* 11: 360-362.
- Goudet J (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at [<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstathml>]. Accessed May 31, 2010.
- Kimball RT, Braun EL, Zwartjes PW, Crowe TM, et al. (1999). A molecular phylogeny of the Pheasants and Partridges suggests that these lineages are not monophyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11: 38-54.
- Martin JF, Novoa C, Blanc-Manel S and Taberlet P (2003). Les populations de perdrix grise des Pyrénées (*Perdix perdix hispaniensis*) ont-elles subi une introgression génétique à partir d'individus d'élevage? Analyse du polymorphisme de l'ADN mitochondria. *Les Actes du BRG 4*: 115-126.
- Primmer CR, Moller AP and Ellegren H (1996). A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Mol. Ecol.* 5: 365-378.
- Primmer CR, Raudsepp T, Chowdhary BP, Moller AP, et al. (1997). Low frequency of microsatellites in the Avian genome. *Genome Res.* 7: 471-482.
- Raymond M and Rousset F (1995). Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Segelbacher G and Storch I (2002). Capercaillie in the Alps: genetic evidence of metapopulation structure and population decline. *Mol. Ecol.* 11: 1669-1677.
- Weir BS and Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370

## Supplementary material.

Supporting Information Online. List of microsatellite markers tested but not selected.			
Origin species	Marker name	GenBank accession No.	Reference
<i>G. gallus</i>	ADL0019	L23887	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0039	L23917	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0044	L23909	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0102	G01547	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0106	G01550	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0114	G01726	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0127	G01736	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0132	G01740	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0136	G01561	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0138	G01563	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0143	G01568	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0146	G01571	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0147	G01572	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0149	G01574	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0150	G01575	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0155	G01742	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0158	G01582	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0160	G01584	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0171	G01593	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0172	G01594	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0176	G01598	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0179	G01601	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0181	G01603	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0230	G01650	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0234	G01654	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0254	G01674	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0262	G01682	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0266	G01686	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0267	G01687	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0268	G01688	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0272	G01692	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0279	G01699	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0306	G01721	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	ADL0315	G16117	(Pang et al., 1999)
<i>G. gallus</i>	ADL210	G01630	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	HUJ0005A	L10231	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	HUJ0006A	L10294	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	LEI0089	X83239	(Gibbs et al., 1997)
<i>G. gallus</i>	LEI0098	X82860	(Gibbs et al., 1997)
<i>G. gallus</i>	LEI0100	X82859	(Gibbs et al., 1997)
<i>G. gallus</i>	LEI0101	X82805	(Gibbs et al., 1997)
<i>G. gallus</i>	LEI0103	X82796	(Gibbs et al., 1997)
<i>G. gallus</i>	LEI0106	X82854	(Gibbs et al., 1997)
<i>G. gallus</i>	LEI0107	X83253	(Gibbs et al., 1997)
<i>G. gallus</i>	LEI0108	X85517	(Gibbs et al., 1997)
<i>G. gallus</i>	LEI0112	X82789	(Gibbs et al., 1997)

Continued on next page

## Microsatellite markers for the grey partridge

1127

Continued.

Origin species	Marker name	GenBank accession No.	Reference
<i>G. gallus</i>	LEI0147	X83256	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	LEI126	X82799	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	LEI132	X82856	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	LEI161	X85524	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	LEI169	X85535	(Gibbs et al., 1997)
<i>G. gallus</i>	MCW0005	-	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	MCW0023	-	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	MCW0080	-	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	MCW0169	-	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	MCW0228	-	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	MCW0246	-	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	MCW0300	-	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	MCW0331	-	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	MCW211	G31988	(Reed et al., 2000a)
<i>G. gallus</i>	UMA1.019	-	(Reed et al., 2000a)
<i>M. gallopavo</i>	MNT001	AF176506	(Reed et al., 2000b)
<i>M. gallopavo</i>	MNT003	AF176508	(Reed et al., 2000b)
<i>M. gallopavo</i>	MNT005	AF176510	(Reed et al., 2000b)
<i>M. gallopavo</i>	MNT006	AF176511	(Reed et al., 2000b)
<i>M. gallopavo</i>	MNT007	AF176512	(Reed et al., 2000b)
<i>M. gallopavo</i>	MNT011	AF482370	(Reed et al., 2002)
<i>M. gallopavo</i>	MNT019	AF482378	(Reed et al., 2002)
<i>M. gallopavo</i>	MNT020	AF482379	(Reed et al., 2002)
<i>M. gallopavo</i>	MNT021	AY235034	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT041	AY235054	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT043	AY235056	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT044	AY235057	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT049	AY235062	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT058	AY235071	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT061	AY235074	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT118	AF540421	(Dranchak et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT127	AY235106	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT129	AF540431	(Dranchak et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT130	AF540432	(Dranchak et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT131	AY235107	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT139	AY235115	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT141	AF540433	(Dranchak et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT160	AY235129	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT171	AY235139	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT181	AY235149	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT188	AY235156	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT201	AY235168	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT204	AY235171	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT211	AY235176	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT215	AY235180	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT219	AY235184	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT220	AY235185	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT221	AY235186	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT222	AY235187	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	MNT224	AY235189	(Reed et al., 2003)

Continued on next page

Continued.

Origin species	Marker name	GenBank accession No.	Reference
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT226</b>	AY235191	(Reed et al., 2003)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT249</b>	AY552821	(Knutson et al., 2004)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT250</b>	AY552822	(Knutson et al., 2004)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT275</b>	AY552847	(Knutson et al., 2004)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT276</b>	AY552848	(Knutson et al., 2004)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT291</b>	AY552863	(Knutson et al., 2004)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT399</b>	AY926537	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT400</b>	AY926538	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT401</b>	AY926539	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT402</b>	AL592658	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT405</b>	AY926540	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT407</b>	AY926542	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT409</b>	AL593356	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT410</b>	AL592718	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT411</b>	AY926544	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT414</b>	AY926546	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT416</b>	AY926548	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT427</b>	AL592640	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT429</b>	AL592644	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT433</b>	AL592677	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT436</b>	AL592829	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT437</b>	AL593814	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT442</b>	AL593052	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT443</b>	AL593060	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT448</b>	AL593178	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT450</b>	AL593308	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT453</b>	AL593364	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT454</b>	AL593401	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT456</b>	AL593466	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT458</b>	AL593487	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT466</b>	AL593563	(Chaves et al., 2006)
<i>M. gallopavo</i>	<b>MNT406</b>	AY926541	(Chaves et al., 2006)

Origin species of the marker; Marker name; GenBank accession number; Article reference. In bold, specific but not polymorphic markers in grey partridge.

## REFERENCES (Supplementary material)

- Chaves LD, Knutson TP, Krueh SB and Reed KM (2006). Using the chicken genome sequence in the development and mapping of genetic markers in the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Anim. Genet.* 37: 130-138.
- Dranchak PK, Chaves LD, Rowe JA and Reed KM (2003). Turkey microsatellite loci from an embryonic cDNA library. *Poult. Sci.* 82: 526-531.
- Gibbs M, Dawson DA, McCamley C, Wardle AF, et al. (1997). Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched for simple tandem repeats. *Anim. Genet.* 28: 401-417.
- Knutson TP, Chaves LD, Hall MK and Reed KM (2004). One hundred fifty-four genetic markers for the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Genome* 47: 1015-1028.
- Pang SW, Ritland C, Carlson JE and Cheng KM (1999). Japanese quail microsatellite loci amplified with chicken-specific primers. *Anim. Genet.* 30: 195-199.
- Reed KM, Mendoza KM and Beattie CW (2000a). Comparative analysis of microsatellite loci in chicken and turkey. *Genome* 43: 796-802.

## Microsatellite markers for the grey partridge

1129

- Reed KM, Roberts MC, Murtaugh J, Beattie CW, et al. (2000b). Eight new dinucleotide microsatellite loci in turkey (*Meleagris gallopavo*). *Anim. Genet.* 31: 140.
- Reed KM, Chaves LD and Rowe JA (2002). Twelve new turkey microsatellite loci. *Poult. Sci.* 81: 1789-1791.
- Reed KM, Chaves LD, Hall MK, Knutson TP, et al. (2003). Microsatellite loci for genetic mapping in the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Anim. Biotechnol.* 14: 119-131.

## Annexe II2 : Calcul des chemins de moindre coût

Pour cette étude, nous avons calculé les chemins dits de 'moindre coût' pour la perdrix grise dans les Pyrénées. Ces chemins de moindre coût ont pour objectif de modéliser des déplacements d'animaux dans un patchwork d'habitat plus ou moins favorables. Ce chemin de moindre coût est calculé à travers une grille. Chaque cellule de la grille est marquée par une valeur de coût écologique représentant par exemple la demande énergétique requise pour se déplacer à travers la cellule (la résistance aux déplacements, les risques de mortalité associés, la nourriture...).

Dans un premier temps, nous avons utilisé un Modèle Numérique de Terrain (SRTM 90m Digital Elevation ; file: srtm\_37\_03) rendu accessible par la NASA depuis sa 'Shuttle radar Topography Mission' et implémenté dans le logiciel ArcGis. Nous avons utilisé le système de coordonnées : Universal Transverse Mercator (UTM, Zone 31 nord, WGS84). Sur la base de la bibliographie et des exigences écologiques de la perdrix grise des Pyrénées, nous avons réalisé des cartes de coût en fonction de l'exposition et de l'altitude (tableaux A et B ci-dessous). En effet, la perdrix grise des Pyrénées affectionne particulièrement les versants allant de Sud-est à Sud-ouest et la tranche altitudinale comprise entre 1800 et 2300 mètres (Gonzalez & Novoa 1989; Novoa & Gonzalez 1988). Ainsi, nous avons attribué un indice de coût à chaque versant et à chaque tranche altitudinale en fonction des préférences de la perdrix. L'altitude étant le facteur principal déterminant la répartition des perdrix grises, nous avons affecté des coûts deux fois plus élevés que pour l'exposition. Un habitat avec un indice de 1 est un habitat approprié alors qu'un habitat avec un indice de 10 est un habitat où les conditions sont difficiles pour la perdrix grise. Afin de visualiser les 'cartes de coût', il suffit d'assigner une couleur à chaque indice de coût. Un gradient de couleur allant du bleu (défavorable) au rouge (favorable) a été assigné à chaque indice de coût (figure I). L'addition des différentes cartes de coût donne la carte de coût bilan. Cette carte de coût bilan est ensuite implémentée dans le logiciel ArcView 3.2 de façon à pouvoir utiliser l'extension informatique PATHMATRIX qui permet de calculer les distances de moindre coût par paire d'individus (Ray 2005).

Altitude	Fréquence d'observation	Indice de coût
>2800	0%	10
2800	2700	0%
2700	2600	0%
2600	2500	4%
2500	2400	7.50%
2400	2300	4%
2300	2200	11.50%
2200	2100	10%
2100	2000	15.00%
2000	1900	26%
1900	1800	6.15%
1800	1700	8.50%
1700	1600	6.15%
1600	1500	0%
1500	1400	1.50%
1400	<1400	0%

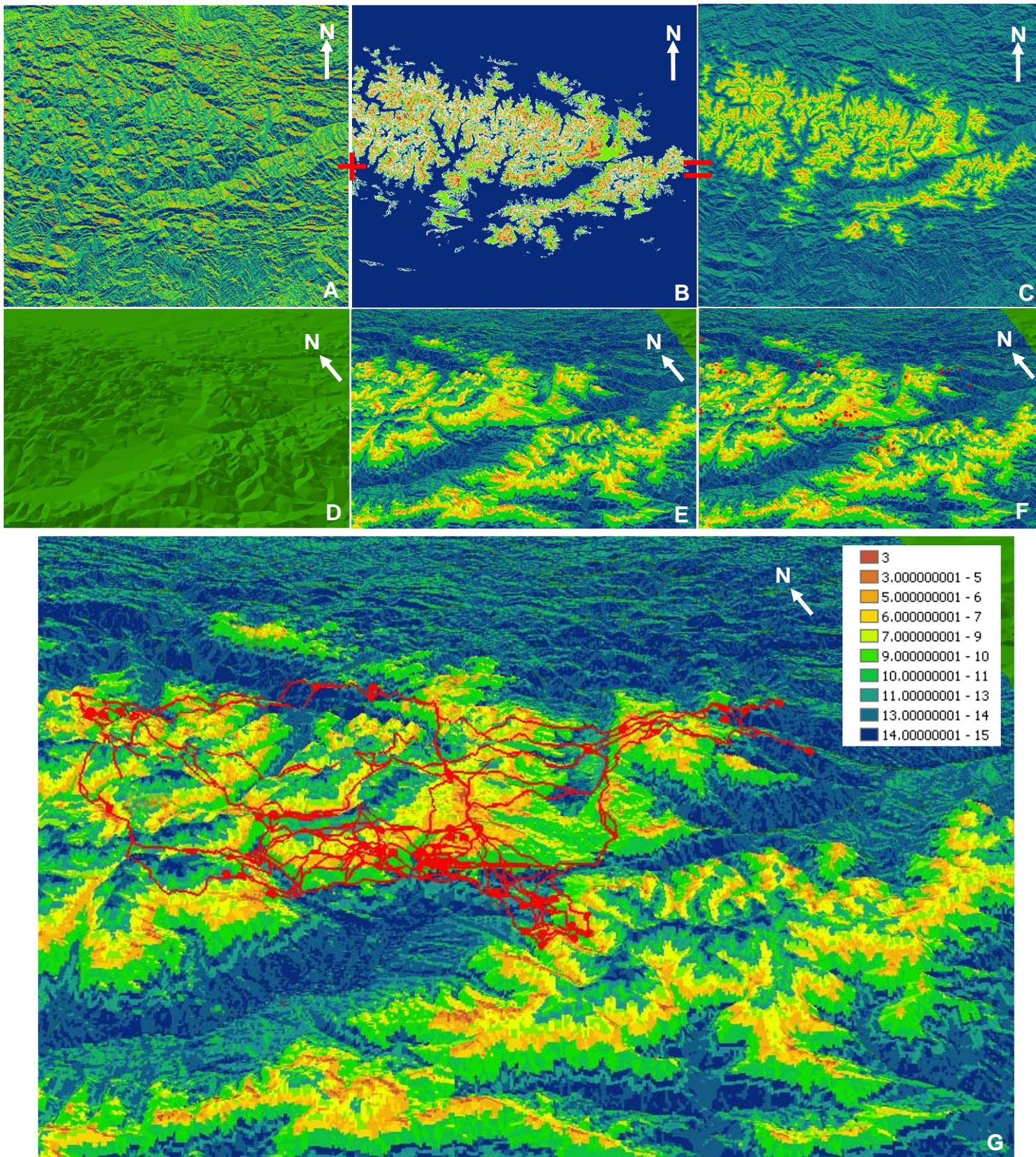
**Tab A:** Indices de coût calculés pour chaque tranche altitudinale. Ces indices ont été calculés en fonction de la fréquence d'observation de lagopède enregistrée dans l'étude de Gonzalez & Novoa en 1989.

Fréquence d'observation	Indice de cout
0%	10
5% <	8
10% <> 5%	6
15% <> 10%	4
26% <> 15%	2

Exposition	Fréquence d'observation	Indice de coût
N	2%	5
N-NE	2%	5
NE	3%	4
E-NE	3%	4
E	3%	4
E-SE	4%	4
SE	6%	3
S-SE	8%	3
S	22%	1
S-SO	20%	1
SO	14%	2
O-SO	5%	4
O	3%	4
O-NO	3%	4
NO	3%	4
N-NO	2%	5

**Tab B:** Indices de coût calculés pour chaque exposition. Ces indices ont été calculés en fonction de la fréquence d'observation de lagopède enregistrée dans l'étude de Gonzalez & Novoa en 1989.

Fréquence d'observation	Indice de cout
< 2%	5
5% <> 2%	4
10% <> 5%	3
15% <> 10%	2
22% <> 15%	1



**Fig. 1** A : indices de coût accordé à chaque tranche altitudinale et (B) chaque versant en fonction des exigences écologiques de la perdrix grise des Pyrénées (d'après (Gonzalez & Novoa 1989)). C : Carte bilan des indices de coût. D : Modèle Numérique de Terrain (en 3D) sur lequel on va projeter la carte bilan de coût. E : carte de coût 'perdrix grise' projetée sur le modèle numérique de terrain (E). F : Projection des individus de notre échantillonnage. G : Distances de moindre coût modélisées sur la carte.



## DISCUSSION GENERALE



## DISCUSSION GENERALE

Comme son nom l'indique, la génétique de la conservation se place dans l'ère de la pluridisciplinarité et confronte à la fois terrain et laboratoire, gestionnaires et chercheurs, ainsi qu'écologie et génétique. Dans un milieu où les avancées technologiques ne cessent de progresser le biologiste de la conservation peut se retrouver face à un certain nombre de problèmes liés à l'évolution rapide de la technologie dans chacun des domaines de la génétique de la conservation.

Les outils génétiques ne cessent d'évoluer depuis leur apparition au début des années 1950 (confère introduction). Cependant, les avancées scientifiques et technologiques qui tendaient, à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, à rapprocher différentes disciplines, tendent aujourd'hui à les marginaliser en ne les rendant accessibles qu'à un public averti voire élitiste. Que ce soit en biologie moléculaire ou en informatique, les avancées ont été telles, ces dernières années, qu'elles ont favorisé la formation de différentes branches à l'intérieur des différentes disciplines. A l'heure du séquençage massif et des méthodes moléculaires poussées de protéomique, génomique et transcriptomique, l'écologue, le naturaliste ou le taxonomiste pourraient se voir marginalisés par ces avancées technologiques qui tendent à devenir des disciplines propres et pourraient faire oublier les principes profonds de l'Ecologie.

En parallèle, les logiciels informatiques d'analyse génétique ne cessent de se développer. On voit ainsi apparaître depuis quelques années des logiciels destinés non seulement à un public averti (sans interface graphique) mais également à un public muni de ressources/clusters informatiques. Selon moi, ces logiciels pourraient s'assimiler à des adolescents. En effet, à l'image des adolescents, des logiciels comme par exemple MSVAR (Storz & Beaumont 2002) ou encore IMA (Hey & Nielsen 2004) montrent beaucoup d'ambition et un énorme potentiel. Cependant, comme des adolescents, ces logiciels aussi prometteurs que capricieux, demandent autant de ressources informatiques que d'attention et de temps à l'utilisateur. Les résultats crédibles et interprétables ne sont obtenus qu'après l'exploration de différentes possibilités de paramètres *a priori* (les 'PRIORS'). Il faut parfois des mois pour obtenir un résultat...

A la vue des problèmes engendrés par les avancées technologiques, moléculaires comme informatiques, nous pouvons craindre un fossé entre les différentes branches des différentes disciplines : entre biologistes moléculaires et écologistes, entre généticiens des populations et 'SIGistes', chacun devant faire face à la fois aux concepts et techniques passés et aux avancées technologiques actuelles...

A l'heure de la pluridisciplinarité, des personnes à l'interface sont indispensables entre les différentes disciplines que seul le manque de communication -et non les avancées technologiques tend à séparer.

## I/ Le lagopède alpin, bilan et perspectives

### A/ Appauvrissement génétique et structuration génétique des populations de lagopède alpin des Pyrénées

**A**u cours de notre étude, menée sur le lagopède alpin des Pyrénées, nous avons développé par amplification croisée (cross-species amplification) de nouveaux marqueurs microsatellites amplifiables chez cette espèce (tableau 1). Bien que certains d'entre eux aient déjà été utilisés sur d'autres espèces de lagopède (*Lagopus lagopus scoticus*, par exemple), d'autres en revanche proviennent d'autres espèces de galliformes et viennent donc alimenter la liste de marqueurs disponibles pour le lagopède alpin. Ces marqueurs ont tous été enregistrés dans la base de données de 'Molecular Ecology Ressources'.

Marker names	GenBank accession no	MENotes Database ID
LLSD7	X99057	43736
LLST5	Y16830	43737
LLST7	Y16831	43738
TTT2	AF303099	43739
BG6	-	43740
BG19	AF381552	43741
BG15	AF381549	43742
LLSD4	X99054	43744
LLST1	X99051	43745
BG12	AF381547	43746
LLSD10	X99060	43747
Aru1G4	EF546647	43749
MNT45	AY235058	43750
Aru1F25	EF546645	43751

**tab 1 :** Liste des marqueurs microsatellites développés par amplification croisée chez le lagopède alpin. Noms des marqueurs, numéro d'accèsion GenBank et numéro MENotes.

Sur ces 14 marqueurs microsatellites, seuls 13 nous ont permis d'appréhender (i) la distribution de la variabilité et (ii) la structuration génétique des populations de lagopède alpin dans les Pyrénées.

(i) En Europe, une première étude réalisée par Caizergues *et al.* (2003a), a mis en évidence, chez le lagopède alpin, une absence de structuration et un appauvrissement génétique des populations pyrénéennes par rapport aux populations alpines et scandinaves. L'une des hypothèses avancées dans ce travail pour expliquer la séparation géographique entre les populations de lagopède alpin des Alpes et des Pyrénées propose une remontée en altitude de l'espèce suite au retrait des glaces de la dernière glaciation (Caizergues *et al.* 2003a). Cet isolement post-glaciaire aurait limité le nombre d'individus fondateurs des populations pyrénéennes. Ainsi, ce goulot d'étranglement aurait eut pour conséquence un appauvrissement génétique des populations pyrénéennes. Cet effondrement des effectifs aurait été compensé, dans les Alpes, par un habitat favorable et des effectifs globalement plus grands. Cependant, compte tenu de la persistance des populations de lagopède alpin dans les Pyrénées, nous pouvons supposer que ce goulot d'étranglement, survenu il y a près de 10 000 ans, se soit traduit par une disparition du fardeau

génétique (purge des allèles délétères, généralement récessifs). En effet, comme cela a été le cas pour les populations de guépards en Afrique (Menotti-Raymond & O'Brien 1993), les populations de lagopède alpin dans les Pyrénées se seraient alors maintenues avec un niveau modéré de diversité génétique qui aurait persisté au sein de la population. Cependant, même si ce goulot d'étranglement pourrait expliquer l'appauvrissement génétique général des populations de lagopède alpin dans les Pyrénées, ce goulot d'étranglement ancien ne peut pas expliquer à lui seul la forte perte de diversité génétique des populations installées sur le chaînon Est. En effet, si cette perte de diversité génétique était le résultat d'un goulot d'étranglement aussi ancien, les populations de lagopède alpin auraient sans doute déjà disparues de ce chaînon Est. Ainsi, il se pourrait que les populations de lagopède alpin dans les Pyrénées aient connu ou connaissent actuellement un 'deuxième' goulot d'étranglement beaucoup plus récent. L'hypothèse d'un goulot d'étranglement récent est confirmée par les analyses génétiques qui détectent un effondrement des effectifs au cours des 400 dernières années. La méthodologie utilisée ne détectant que le dernier goulot d'étranglement il se pourrait donc que le signal d'un effondrement ancien des populations soit masqué par celui plus récent (voire qu'il n'ait pas eu lieu). Au début de l'holocène, les Alpes et les Pyrénées ont constitué deux refuges différents pour les espèces adaptées au froid (Taberlet *et al.* 1998). Ainsi, il se pourrait que l'histoire évolutive des populations de lagopède alpin dans les Pyrénées et dans les Alpes ne soit pas la même. Dans cet optique, l'hypothèse avancée sur un goulot d'étranglement ancien (début de l'holocène) pourrait ne pas être adaptée aux populations de lagopède alpin des Pyrénées.

(ii) Concernant la structuration génétique intrinsèque aux Pyrénées, nos résultats nuancent ceux de Caizergues *et al.*, en 2003. En effet, basés sur une seule population des Pyrénées (Aston), ces auteurs ne décelaient pas de structuration génétique dans les Pyrénées alors que nos résultats révèlent notamment un isolement par la distance. La structuration en isolement par la distance est connue chez de nombreux galliformes de montagne (Caizergues *et al.* 2003a; Caizergues *et al.* 2003b; Piertney *et al.* 1998). Cette structuration spatiale dite de 'voisinage' est souvent expliquée par le comportement des oiseaux qui limitent leurs mouvements aux localités proches. Les suivis par radio-pistage du lagopède alpin tant dans les Alpes que dans les Pyrénées semblent valider ces faibles capacités de dispersion. Il a récemment été montré qu'il existe une fidélité des individus à la fois aux sites d'hivernage et aux sites de nidification (Novoa *et al.* 2005). Cette étude a montré que trois poules ont passé deux hivers consécutifs dans des sites éloignés de seulement quelques centaines de mètres et qu'une autre poule a niché à quatre reprises dans une zone comprise dans un

La structuration génétique des populations de lagopèdes alpins dans les Pyrénées est marquée par un isolement par la distance.

rayon d'environ 100 mètres. Même si l'outil génétique de cette thèse n'a pas révélé de biais de dispersion entre les mâles et les femelles de lagopède alpin, il est avéré que les jeunes mâles de cette espèce révèlent un caractère phylopatrique (Caizergues *et al.* 2003a). Ce comportement, mis en évidence chez la plupart des galliformes de montagne, peut générer des fixations d'allèles alors homozygotes (Caizergues & Ellison 2002). Certes, cette fixation peut être le résultat d'une adaptation et peuvent donc être localement avantageux (Shields 1982), mais chez le lagopède d'Ecosse (*Lagopus lagopus scoticus*), un tel comportement engendre une dépression de consanguinité empêchant la panmixie dans la population mâle (Piertney *et al.* 1998). Chez le lagopède alpin, un taux élevé de dispersion des femelles adultes (Caizergues *et al.* 2003a) semble compenser cette perte de variabilité génétique couvrant ainsi les effets délétères d'un régime consanguin. Globalement, la phylopatrie des mâles et la forte dispersion des femelles induiraient un biais de dispersion génétique entre les deux sexes : les mâles étant plus apparentés entre eux que les femelles entre elles (Caizergues *et al.* 2003a). Malheureusement, notre échantillonnage, non approprié, ne nous a pas permis de tester cette hypothèse. En effet, afin d'estimer, par la génétique, un biais de dispersion potentiel entre les sexes, il est recommandé d'avoir un gros échantillonnage sur un nombre restreint de populations, sur une petite zone géographique, en fonction des capacités de dispersion de l'espèce en question. Ceci permet de s'assurer d'avoir des individus dispersants dans le pool d'individus échantillonnés et d'avoir une bonne estimation des fréquences alléliques dans chaque population (Jérôme Goudet, Comm. Pers.). Cependant, il est difficile d'envisager un tel échantillonnage pour le lagopède alpin compte tenu des difficultés d'échantillonnage de l'espèce sur nos massifs, difficultés liées à la rareté de l'espèce et aux conditions de terrain. La question d'un biais de dispersion entre les sexes chez le lagopède alpin devra donc être plutôt abordée par le marquage (télémétrie ou autre méthode de marquage).

#### B/ Effet d'une barrière géomorphologique au sein des Pyrénées sur la structuration génétique

La structuration génétique des populations de lagopède alpin dans les Pyrénées est marquée par la présence d'une barrière à la dispersion : la vallée du Sègre ou 'fosse de Cerdagne'. Cette barrière constitue un obstacle pour les flux génétiques et empêche les migrations de lagopèdes de part et d'autre de la vallée. Chez les galliformes, groupe généralement caractérisé par de faibles capacités de dispersion, la géomorphologie peut constituer une barrière aux flux génétiques en fonction des exigences écologiques des espèces. Par exemple, chez le grand tétras (*Tetrao urogalus*) et le tétras lyre (*Tetrao tetrix*), les crêtes rocheuses élevées constituent des obstacles à la migration et

La vallée du Sègre représente un obstacle aux flux génétique pour les populations de lagopède alpin.

limitent ainsi les flux géniques (Caizergues *et al.* 2001b; Segelbacher & Storch 2002). Ceci n'est pas le cas chez le lagopède alpin, capable de traverser ces crêtes rocheuses. A l'inverse, les vallées peuvent être un facteur structurant des populations de lagopède (Cassar 2007; Shepard & Burbrink 2008). Dans notre étude, la vallée du Sègre, d'une largeur de 15 km et haute de 1100 m, constitue une barrière géomorphologique à la dispersion. En effet, l'altitude est trop faible pour réunir les conditions écologiques favorables à l'espèce (température, nourriture...) et la vallée semble trop large pour être franchie par le vol d'un lagopède alpin. Effectivement, les capacités de dispersion du lagopède sont relativement limitées (moyennes de dispersion post-natale pour le *Lagopus muta*: 6.2 kilomètres pour les femelles et 2.6 kilomètres pour les mâles) (Desmet *et al.* 2005). De plus, en haute Savoie, les suivis d'oiseaux équipés d'émetteurs ont permis de mettre en évidence que les lagopèdes étaient capables de franchir de courtes zones d'habitats non favorables (une femelle a franchi la vallée de l'Arve large de 6 kilomètres et d'altitude 500 mètres (Desmet *et al.* 2005)). L'une des conséquences directes de cette barrière à la dispersion est sans aucun doute l'isolement géographique du chaînon se situant à l'Est de la vallée. Cet isolement géographique pourrait être une conséquence d'un décalage de biome en altitude. En effet, conditionnés par la température, les étages de végétations grimpent en altitude au rythme du réchauffement climatique (Korner & Paulsen 2004). Dans un contexte d'augmentation des températures depuis la fin du petit âge glaciaire, nous pouvons imaginer que la forêt (notamment de pins à crochets) a peu à peu envahi la vallée pour finalement former une barrière infranchissable par les lagopèdes alpins. Cette progression en altitude des étages de végétation aurait pu être limitée par les activités agropastorales capables de compenser cette élévation, mais ces activités ont diminué au moment où les températures commençaient à augmenter. En plus de la perte de la diversité des cultures en montagne, deux conséquences principales ont découlées rapidement de l'abandon des activités agropastorales. Après une fermeture des milieux *via* une colonisation de plantes opportunistes, la prairie a laissé rapidement place à l'industrie forestière. La seconde conséquence concerne le développement du tourisme hivernal *via* l'expansion des stations touristiques. Ces deux conséquences ont conduit respectivement à la fermeture des milieux, à l'augmentation des densités de prédateurs généralistes et à l'intrusion massive de l'homme au sein des territoires autrefois favorables aux galliformes de montagne.

Quel que soit le scénario retenu, nos analyses indiquent que la vallée du Sègre représente une barrière aux flux géniques et que le chaînon Est peut être considéré comme une île au sens biogéographique du terme (Blondel 1986; Blondel 1995). Conséquence de cet isolement géographique, les populations de lagopède alpin installées sur ce chaînon révèlent un appauvrissement génétique

plus marqué. Compte tenu de l'estimation de la date du dernier goulot d'étranglement (récent) et de la rapidité de la perte de diversité génétique, il est à prévoir que prochainement, ces populations se retrouvent piégées dans un vortex d'extinction, d'autant plus que le succès de reproduction dans les populations de lagopède alpin des Pyrénées est en moyenne meilleur sur les populations de la Haute-chaîne (Andorre et d'Aston) que sur le chaînon Est (Claude Novoa, Comm. Pers.).

C/ Etude complémentaire de l'impact des infrastructures humaines sur l'avifaune en montagne.

**S**ur la base des marqueurs microsatellites, développés pour le lagopède alpin, une autre étude est en cours de valorisation (annexe C1). Le polymorphisme du panel de marqueurs microsatellites est tel qu'il nous a permis l'identification génétique d'un individu et donc la possibilité de réaliser du suivi moléculaire (molecular tracking). Dans cette étude, nous proposons d'emprunter les méthodes d'enquête utilisées par la police scientifique afin de mieux évaluer l'impact des infrastructures humaines sur la mortalité de l'avifaune de montagne.

Cette étude est actuellement soumise à la revue 'Conservation genetics' (annexe C1).

Le polymorphisme du panel de marqueurs microsatellites est tel que la probabilité d'avoir deux individus avec le même profil génotypique est proche de 0% (PI unbiased=1.216E-12 ; estimation réalisée avec le logiciel GIMLET v.1.3.2 (Valière 2002))

L'avifaune est confrontée à un certain nombre d'infrastructures qui peuvent avoir des effets négatifs sur le comportement et/ou la démographie des populations. Parmi ces infrastructures, nous pouvons distinguer les éoliennes (Barrios & Rodriguez 2004; Desholm 2009; Johnson *et al.* 2002) ou encore les lignes à haute tensions (Bevanger & Broseth 2001). En montagne, ce sont principalement les infrastructures liées aux stations de ski qui posent problème (Arlettaz *et al.* 2007; Negro *et al.* 2009; OGM 2006; Patthey *et al.* 2008; Rolando *et al.* 2007; Thiel *et al.* 2008; Watson & Moss 2004). En France, le réseau de stations de ski est le plus grand de la planète et coïncide dans les Pyrénées avec l'habitat du lagopède alpin, de la perdrix grise et du grand tétras (Ménoni *et al.* 2006). Caractérisés par de véritables rideaux de câbles, les téléskis représentent une véritable menace pour l'avifaune de montagne et notamment pour ces galliformes. Certaines stations de ski prennent des mesures compensatoires en essayant de rendre plus visible les câbles les plus dangereux à l'aide d'un dispositif de couleur, d'un bandeau rouge (voir photo ci-contre). Cependant, toutes les stations n'adoptent pas ces mesures et tous les câbles de télési ne sont pas systématiquement marqués.

Le 10 juin 2008, sur la station de ski du Puigmal (Pyrénées Orientales), une poule de lagopède alpin est retrouvée gisant sur le sol (31T, 425238 E, 4692134 N). A 650 mètres de là, se trouve le télési du Mont Serrat connu pour sa dangerosité sur l'avifaune. *A priori* le télési n'est pas le responsable de la mort



de la poule. En effet, l'estimation des taux de mortalité suite à des collisions avec des câbles de téléski n'est évaluée que d'après le nombre d'oiseaux retrouvés morts à l'aplomb du câble. Ce principe part de l'hypothèse qu'un oiseau blessé ne peut pas parcourir de grandes distances après une collision. Cependant, 3 jours plus tard, quelques plumes de lagopède alpin sont retrouvées à l'aplomb du téléski (figure 2).

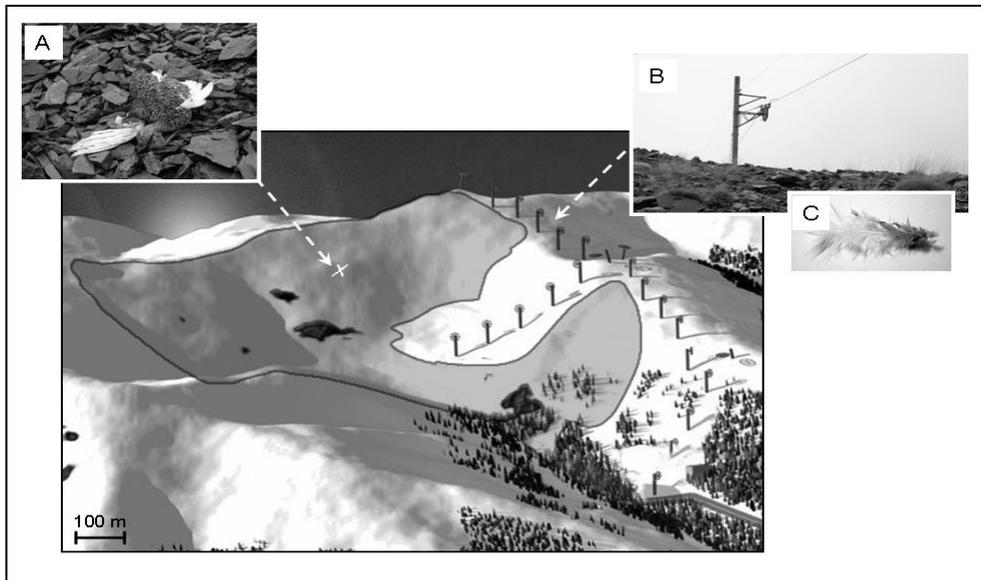


Fig. 1. Station de ski du Puigmal

A. Place et photo de la poule de lagopède alpin retrouvée morte (31T, 425238 E, 4692134 N).

B. Photo du téléski 'Mont Serrat' connu pour être dangereux pour l'avifaune car situé en crête.

C. Photo d'une plume retrouvée à l'aplomb du téléski

La représentation schématique de la station de ski a été modifiée à partir de [OHhttp://www.puigmal.fr/](http://www.puigmal.fr/)

 : Zone FreeRide de la station

Sur la base de l'outil moléculaire, nous avons comparé le sexe et le profil génotypique de la poule retrouvée morte et des plumes retrouvées sous les câbles de téléski. Les résultats nous ont formellement indiqué que les plumes et la poule possédaient le même sexe et le même profil génotypique. Ainsi, il semblerait que cet oiseau ait parcouru une distance d'au moins 650 mètres après la collision. Les estimations des taux de mortalité dues aux infrastructures pourraient donc être sous-estimées car basées seulement sur les individus retrouvés mort à l'aplomb de la structure.

#### D/ Bilan et perspectives pour la conservation du lagopède alpin

**E**n Amérique du Nord, l'isolement géographique d'une population de tétras de prairie (*Tympanuchus cupido*) a conduit à une perte de diversité génétique constatée qui s'est traduite par une baisse du taux d'éclosabilité des oeufs et donc une baisse de la fertilité (Bouzat *et al.* 1998). La translocation d'individus en provenance d'une population génétiquement plus diversifiée a permis d'améliorer le taux d'éclosabilité et la fertilité de la population cible (Westemeier *et al.* 1998).

Plus récemment, dans l'archipel des îles Aléoutiennes, 75 lagopèdes alpins capturés sur l'île d'Attu ont été transférés avec succès sur l'île voisine d'Agattu, où l'espèce avait disparu (Kaler 2007). Quatre ans après les premières

translocations, un suivi montre une bonne persistance de la population réintroduite (Kaler *et al.* 2010). Même si en Amérique du Nord, la conservation des populations de Tétrionidés fait souvent appel aux translocations d'individus sauvages d'une ou plusieurs populations sources vers une population cible (Connelly 1997), en Europe, ces méthodes n'avaient jamais été entreprises, au moins en ce qui concerne le lagopède alpin. A la suite de nos résultats, l'ONCFS a proposé un projet expérimental de translocation de lagopède alpin de part et d'autre de la vallée du Sègre. Ces translocations permettraient ainsi d'assister le flux génique de part et d'autre de cette vallée. A terme, le but de ces translocations serait de freiner la perte de diversité génétique des populations de lagopède alpin situées sur ce chaînon Est et ainsi d'assurer le maintien de leur potentiel adaptatif.

L'action de translocation d'individus depuis les populations de la Haute-Chaîne vers le noyau oriental Puigmal-Canigou a été une des actions retenues dans le cadre du Projet européen « GALLIPYR – Réseau Pyrénéen des Galliformes de Montagne », coordonné par le GEIE FORESPIR. Cette action de translocation réunit 3 des 9 partenaires du Projet GALLIPYR : la Généralité de Catalogne (Espagne), le Gouvernement d'Andorre et l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, ce dernier assurant la coordination de l'action.

A l'heure actuelle, onze oiseaux ont été transférés. Après quelques mouvements erratiques, tous se sont bien installés dans le milieu et certains ont même participé à la reproduction dès la saison suivant la translocation. Sur chaque oiseau transloqué, un prélèvement de plume a été réalisé. Ces prélèvements ouvrent des perspectives quant aux suivis génétiques des individus transloqués. En effet, il sera maintenant intéressant de suivre l'évolution du succès de ces translocations à travers l'évolution du succès reproducteur et l'évolution de la diversité génétique des populations de lagopède alpin installées sur ce chaînon Est. Une augmentation de l'échantillonnage permettrait de peut-être confirmer cet éventuel biais de dispersion.

Un projet INTEREG, nommé GALLIPYR, propose de transloquer des lagopèdes alpins de part et d'autre de la vallée du Sègre afin de réhabiliter la diversité génétique sur le chaînon Est isolé.

## II/ La perdrix grise : Bilan et perspectives

### A/ Mise au point de marqueurs moléculaires

**D**ans un contexte où des lâchers d'individus d'élevages étaient réalisés pour repeupler les populations de perdrix grise sauvages, Blanc et al., (1986) ont réalisé la première étude génétique sur la perdrix grise des Pyrénées. Cette étude, basée sur des allozymes, a révélé une hybridation potentielle entre les perdrix sauvages des Pyrénées et des perdrix d'élevage. Plus tard en 2003, Martin et al., ont tenté d'évaluer cette hybridation génétique à l'aide de marqueurs mitochondriaux. Cependant, ces marqueurs n'étant transmis que par la mère, si l'individu introduit est un mâle, il nous est impossible de suivre une hybridation sur la base de marqueurs mitochondriaux. Ces marqueurs permettent uniquement un suivi de l'hybridation génétique sur les lignées femelles.

Le premier résultat de notre étude a été l'identification, par cross-species amplification, de 12 marqueurs microsatellites amplifiables sur le genre *Perdix* (tableau 2).

Marker names	GenBank accession no	MENotes Database ID
BG15	AF381549.1	44477
MNT12	AF482371	44478
MNT412	AY926544	44479
MNT477	AL593755	44481
ADL142	G01567	44486
LEI31	AY228562	44487
LEI319	-	44488
MNT404	AL593651	44482
MNT467	AL593567	44483
Aru 1F25	EF546645	44489
MNT408	AY926543	44485
Aru 1G4	EF546647	44490

**tab 2:** Liste des marqueurs microsatellites développés par amplification croisée chez le lagopède alpin. Noms des marqueurs, numéro d'accession GenBank et numereau MENotes.

Plus polymorphes que les marqueurs mitochondriaux et mieux adaptés à une étude de génétique de la conservation, ces marqueurs microsatellites nous ont permis d'appréhender la structuration génétique des populations de perdrix grise dans le Bassin Parisien et dans les Pyrénées et de tenter d'évaluer l'introgression génétique au sein des populations sauvages. En effet, les marqueurs microsatellites, transmissibles à la descendance par les 2 parents, fournissent un bon moyen d'évaluer et de suivre l'introgression génétique de perdrix d'élevage au cours des générations successives de perdrix sauvages.

Un autre couple d'amorce a également été mis au point afin de sexer les échantillons de perdrix grise. Ce couple d'amorce a permis également le sexage d'individus de lagopède alpin et pourrait potentiellement être appliqué à d'autres espèces, augmentant ainsi le panel d'espèces d'oiseaux 'sexables' par l'outil moléculaire.

Jusqu'à présent l'étude de référence en terme de structuration génétique concernant la perdrix grise en France était celle de Martin *et al.* (2003). Cette étude avait mis en évidence quatre points importants, à savoir :

- (i) la sous-espèce *P. p. hispaniensis* représente une entité génétique à part entière, ce qui est en accord avec son phénotype et son écologie.
- (ii) Les Pyrénées sont la zone où la diversité génétique est la plus forte avec un ratio quatre fois supérieur à celui de plaine. Ce résultat avait également été obtenu par Blanc *et al.* (en 1986).
- (iii) L'introgression de gènes de perdrix grise de plaine (*P. p. armoricana* et/ou *P. p. perdix*) issue des lâchers d'oiseaux d'élevage, à des fins cynégétiques, pourrait à terme menacer l'identité, la diversité génétique et les potentialités évolutives et adaptatives de la sous-espèce *P. p. hispaniensis*.
- (iv) Avec une distribution haplotypique aléatoire, il n'y aurait pas de structuration génétique à l'échelle des Pyrénées.

#### *Analyses présentées dans cette thèse.*

(i) Comme l'ont montré Martin *et al.*, en 2003 et compte tenu de nos valeurs de  $F_{st}$  significatives, les deux sous-espèces de plaine et de montagne représentent bien des entités génétiques distinctes. A la vue de leurs exigences écologiques et de leurs phénotypes respectifs, ce résultat est cohérent.

(ii) Concernant la diversité génétique, les statistiques descriptives qui découlent de notre étude viennent nuancer certains résultats avancés précédemment par Martin *et al.* (op.cit.). D'après nos analyses il n'y a effectivement, pas de différence significative de diversité génétique entre les deux sous-espèces. L'absence de différence au niveau des diversités génétiques représente cependant un point positif pour les populations de perdrix grise des Pyrénées qui présentent des densités de populations bien inférieures à celles enregistrées sur les populations de perdrix grise du Bassin Parisien (Claude Novoa, Comm. Pers.). En effet, dans le Bassin Parisien nous sommes en présence de populations à fortes densités, parfois plus de 40 couples aux 100 hectares alors que dans les Pyrénées, les populations de perdrix grise présentent des densités généralement inférieures à 5 couples aux 100 hectares.

→ Martin *et al.* (2003) mais également Novoa *et al.* en 2005 émettaient déjà des réserves quant à leurs résultats et soupçonnaient un biais dans leur échantillonnage beaucoup plus important dans les Pyrénées que dans le Bassin Parisien.

(iii) Dans leur étude Martin *et al.* (op. cit.), soupçonnaient la présence d'une hybridation entre perdrix d'élevage et perdrix sauvages des Pyrénées.

Les deux écotypes de plaine et de montagne représentent bien des entités génétiques à part entière.

il n'y a pas de différence de diversité génétique entre les deux écotypes.

Avec près de 38% d'individus introgressés au sein de notre échantillonnage, nos résultats viennent confirmer la présence de génotypes d'individus d'élevage au sein de certaines populations sauvages. Les lâchers d'individus d'élevage deviennent un facteur de structuration génétique pour les populations de perdrix grise des Pyrénées et peuvent donc potentiellement le devenir dans le Bassin Parisien. Dans les Pyrénées, cette structuration génétique due aux individus lâchés est plus ou moins attendue compte tenu de la distance génétique qui existe entre les individus sauvages et ceux d'élevages. En effet, d'un point de vue génétique, les perdrix utilisées pour repeupler les Pyrénées sont apparentées à la sous-espèce *P.p. armoricana* que de *P.p. hispaniensis*.

Il existe bien une introgression génétique de perdrix d'élevage au sein des populations de perdrix sauvages.

(iv) dans les Pyrénées, le retrait des individus introgressés a permis de mettre en évidence une structuration génétique organisée en isolement par la distance (IBD) mais pas au sein de celles du Bassin Parisien. Trois hypothèses non exclusives pourraient expliquer cette différence de structuration génétique entre les deux sous-espèces : (i) la fragmentation du paysage, (ii) la démographie des populations et/ou (iii) une homogénéisation des perdrix grises du Bassin Parisien. En effet, cette différence de structuration pourrait être mise en relation avec la différence de fragmentation des deux habitats, plus importante dans les Pyrénées. Il est dommage de ne pas connaître les distances de dispersion de la perdrix grise dans le Bassin Parisien car nous aurions pu les comparer avec les estimations réalisées dans les Pyrénées. Cette comparaison nous aurait permis de savoir si l'absence de structuration génétique dans le Bassin Parisien est due à de plus importantes capacités de dispersion intrinsèques à la sous espèce de plaine ou plutôt à l'homogénéité du milieu qui pourrait être un facteur compensateur des faibles capacités de dispersion caractéristiques des galliformes.

Il existe une structuration génétique au sein des populations de perdrix sauvages des Pyrénées (IBD). Cette structuration génétique ne se retrouve cependant pas chez les populations sauvages du Bassin Parisien

Une autre explication à cette différence de structuration génétique entre les perdrix grises du Bassin Parisien et celles des Pyrénées pourrait être d'ordre démographique. En effet, les fortes densités rencontrées dans les populations du Bassin Parisien pourraient favoriser un brassage et donc une homogénéisation génétique plus importante que dans les Pyrénées. Au contraire, les populations pyrénéennes sont connues à la fois pour leurs faibles densités et pour leurs fluctuations d'abondance très marquées (Novoa 1998). Ainsi, on pourrait avancer que, sur un massif donné, la reconstitution d'une population qui suit l'effondrement local de ses effectifs se fait à partir d'un petit noyau d'oiseaux fondateurs favorisant ainsi une structuration génétique des populations de perdrix grise des Pyrénées (C. Novoa, Comm. Pers.).

Enfin, une dernière hypothèse propose une homogénéisation génétique des perdrix du Bassin Parisien suite à la banalisation des lâchers de perdrix d'élevages. Ces dernières joueraient alors le rôle d'homogénéisateurs génétiques entre les différentes populations.

## C/ Perspectives chez la perdrix grise :

La première perspective pour la gestion des perdrix grises en France concerne la gestion des lâchers d'individus d'élevage au sein des populations sauvages. En effet, dans un contexte de sauvegarde de l'identité génétique des sous-espèces il serait judicieux de mieux raisonner la pratique de l'élevage et des lâchers.

Concernant la pratique des lâchers dans les Pyrénées, la réglementation a évolué au cours de ces dernières années interdisant sur les 6 départements pyrénéens les lâchers de perdrix grises d'élevages. Ainsi il serait judicieux de coordonner les réglementations concernant les lâchers au sein des différents pays et principautés car les lâchers sont encore autorisés sur l'Andorre et la Catalogne espagnole.

Concernant les élevages, l'une des solutions déjà envisagée par les éleveurs et responsables cynégétiques, est de réaliser non pas des élevages au sens classique du terme mais plutôt des 'conservatoires de souches'. Pour palier à la régression des populations naturelles de perdrix, de nombreuses associations cynégétiques ont eu recours aux lâchers de perdrix d'élevages d'origines, la plupart du temps, méconnues. L'impact possible de l'introggression des populations naturelles par ces génotypes allochtones a conduit certains responsables à faire évoluer la notion classique d'élevage vers la notion de 'conservatoires de souches'. Ces conservatoires désignent des élevages créés à partir d'individus sauvages et locaux, le plus souvent par la récupération de pontes d'oiseaux sauvages abandonnées ou de jeunes individus capturés en nature. Pour la perdrix grise, de tels conservatoires existent déjà en Catalogne sur la commune d'Esterrri d'Aneu pour la sous-espèce *P. p. hispaniensis* et dans le Bassin Parisien pour la sous-espèce *P.p. armoricana*. L'intérêt de ces conservatoires serait de pouvoir reconstituer des populations éteintes ou de renforcer des populations marginales à l'aide de génotypes d'origine locale. Ainsi, les politiques de gestion de ces conservatoires répondraient plus à un souci de conservation et de gestion des populations sauvages plutôt que de production d'oiseaux destinés à être lâchés à des fins cynégétiques. De plus, ces conservatoires viendraient alors supprimer le problème d'introggression génétique engendrée par les lâchers actuels. Cependant, un suivi génétique au cours des générations reste nécessaire dans les conservatoires. En effet, dans les conservatoires et selon le succès de la reproduction, des goulots d'étranglement pourraient apparaître à chaque génération. Ces goulots d'étranglement pourraient être responsables d'une perte de diversité génétique pouvant entraîner une modification de certains traits de vie (Blanc *et al.* 1986).

Des conservatoires de souches pour renforcer les populations marginales et atténuer les fluctuations démographiques des populations.

J'ai contribué à une étude mêlant suivi de diversité génétique et de traits de vie au cours des générations d'une souche de parasite de laboratoire. Cette étude a révélé une perte de diversité génétique au cours du temps, liée à des goulots d'étranglement successifs et associée dans le passage en laboratoire, à une modification du trait de vie mesuré, le parasite étudié infestant moins son hôte (annexe C2).

### III/ Histoire des populations de galliformes dans les Pyrénées : passé, présent, futur...

Il y a 10 000 ans, au début de l'holocène, le retrait des glaces (suite à la période glaciaire) a contraint les espèces adaptées au froid à rechercher des habitats répondant à leurs exigences écologiques. Ainsi, ces espèces ont trouvé refuge à des latitudes plus nordiques ou dans des refuges d'altitude (Bech *et al.* 2009; McCarty 2001; Parmesan & Yohe 2003; Taberlet *et al.* 1998). Les galliformes des Pyrénées, pour la plupart présents à l'ère glaciaire, n'ont pas échappé à cette règle et ont emprunté plusieurs voies de colonisation dans le but de retrouver des habitats favorables. Ces voies de colonisation ont été à l'origine de la création de sous-espèces géographiquement distinctes. Pour le lagopède alpin et le grand tétras, on distingue ainsi des populations d'altitude et des populations de zones peu élevées (situées pour la plupart en Scandinavie). Pour la perdrix grise, espèce moins adaptée aux froids extrêmes, les populations d'altitude et de plaine se distinguent aussi l'une de l'autre, mais la distance séparant les deux écotypes est plus petite (entre les Pyrénées et le 45<sup>ème</sup> parallèle) que pour les deux autres galliformes.

Aujourd'hui, les Pyrénées représentent la limite sud des aires de distribution européenne des galliformes de montagne ; ces espèces se trouvent ainsi confrontées à un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques. Ces facteurs peuvent influencer la distribution et la structuration génétique des espèces. Parmi ces facteurs la fragmentation du paysage (et donc de l'habitat) semble être à l'origine des structurations génétiques organisées en isolement par la distance chez la perdrix grise (*Perdix perdix hispaniensis*), le grand tétras (*Tetrao urogallus*) (Regnaut 2004) et le lagopède alpin (*Lagopus muta pyrenaica*) (Bech *et al.* 2009). Ces structurations génétiques trouveraient également leurs origines dans une succession de goulots d'étranglement historiques ayant entraîné des variations de flux géniques entre les différents noyaux de populations. Les résultats de Sébastien Régnaut (2004) sur la structuration génétique des populations de grand tétras pyrénéennes, suggère l'existence d'un goulot d'étranglement responsable d'un effondrement des effectifs de grand tétras dans les Pyrénées (Regnaut 2004). Ce goulot d'étranglement trouverait

Un passé, un présent et un avenir commun pour les populations de galliformes dans les Pyrénées.

son origine, en 1850, dans l'exploitation anthropique des milieux d'altitude et plus précisément dans la déforestation massive due essentiellement aux activités pastorales et à l'industrie métallurgique. Concernant ces activités pastorales, celles-ci auraient également impacté les populations de lagopède alpin et potentiellement de perdrix grise présentes sur l'étage alpin ou sur la 'zone de combat' (écotone entre l'étage sub-alpin et l'étage alpin). Cependant, au début des années 1900, ces pratiques ont de plus en plus régressé laissant place à la reconquête des versants par la forêt. Bien que cette reforestation des milieux ait favorisé l'expansion des populations de grand tétras dans les Pyrénées, celle-ci a également été accompagnée par la colonisation des milieux d'altitude par des plantes opportunistes telles que le rhododendron (*Rhododendron ferrugineum*). Cette fermeture des landes d'altitude s'est traduite localement par une baisse de la qualité des habitats de reproduction favorables aux galliformes de montagne. A ceci, s'est ajouté un réchauffement des températures qui a également favorisé l'élévation des étages de végétation et donc la fermeture des milieux en altitude. De nos jours, malgré la volonté de redynamiser le pastoralisme, les activités agro-pastorales peinent à contenir la dynamique végétale et la température ne cesse d'augmenter. Les populations de lagopède alpin et de perdrix grise voient leurs habitats respectifs régresser et se fragmenter de plus en plus. Le grand tétras, quant à lui, connaît, depuis son apogée dans les années 1960, un deuxième déclin qui semble s'être accentué au cours des années 1990 en dépit d'une augmentation de son habitat potentiel. Ce déclin serait dû à un autre secteur d'activité anthropique lié au tourisme. En effet, de nombreuses études citées dans cette thèse démontrent notamment l'impact des infrastructures des stations de ski sur l'avifaune montagnarde (voir annexe C1). Ces aménagements touchent également les hautes altitudes et pourraient être responsables en partie d'un déclin de certaines populations isolées de lagopède alpin.

Dans un futur proche, si les activités anthropiques (reprise des activités agropastorales, aménagement des stations de ski...) n'évoluent pas, alors l'élévation des étages de végétation sera uniquement conditionnée par le climat. D'après les données prédictives de différents services météorologiques, il semblerait que la température continuera d'augmenter au cours des 100 prochaines années. En effet, d'après les différents scénarios de changement climatique, modéré ou intensif, de météo France, la température devrait continuer à se réchauffer et pourrait augmenter de +1.41°C à +1.93°C en 2055 et de +2.15°C à +3.32°C en 2085 respectivement. Ce scénario de réchauffement (0.23°C à 0.37°C par décennie) est ainsi deux fois supérieur à celui enregistré au cours du XX<sup>ème</sup> siècle. Ces projections de températures enregistrées par Météo France sur l'est des Pyrénées sont en accord avec les projections envisagées dans les zones montagneuses (Nogués-Bravo *et al.* 2008; Nogués-Bravo *et al.* 2007). Une telle augmentation des températures devrait se traduire pour la

perdrix grise par une augmentation des zones séparant les populations de plaines et les populations de montagnes. De plus cette augmentation de température devrait s'accompagner d'un relèvement des étages de végétation en altitude. D'après le gradient thermique adiabatique ( $-0.5^{\circ}\text{C}/100$  mètres) et en considérant ces prévisions de réchauffement, la limite entre l'étage alpin et l'étage subalpin devrait se situer en 2055 à une altitude d'environ 2400 mètres (si l'on considère le scénario modéré) (figure 2).

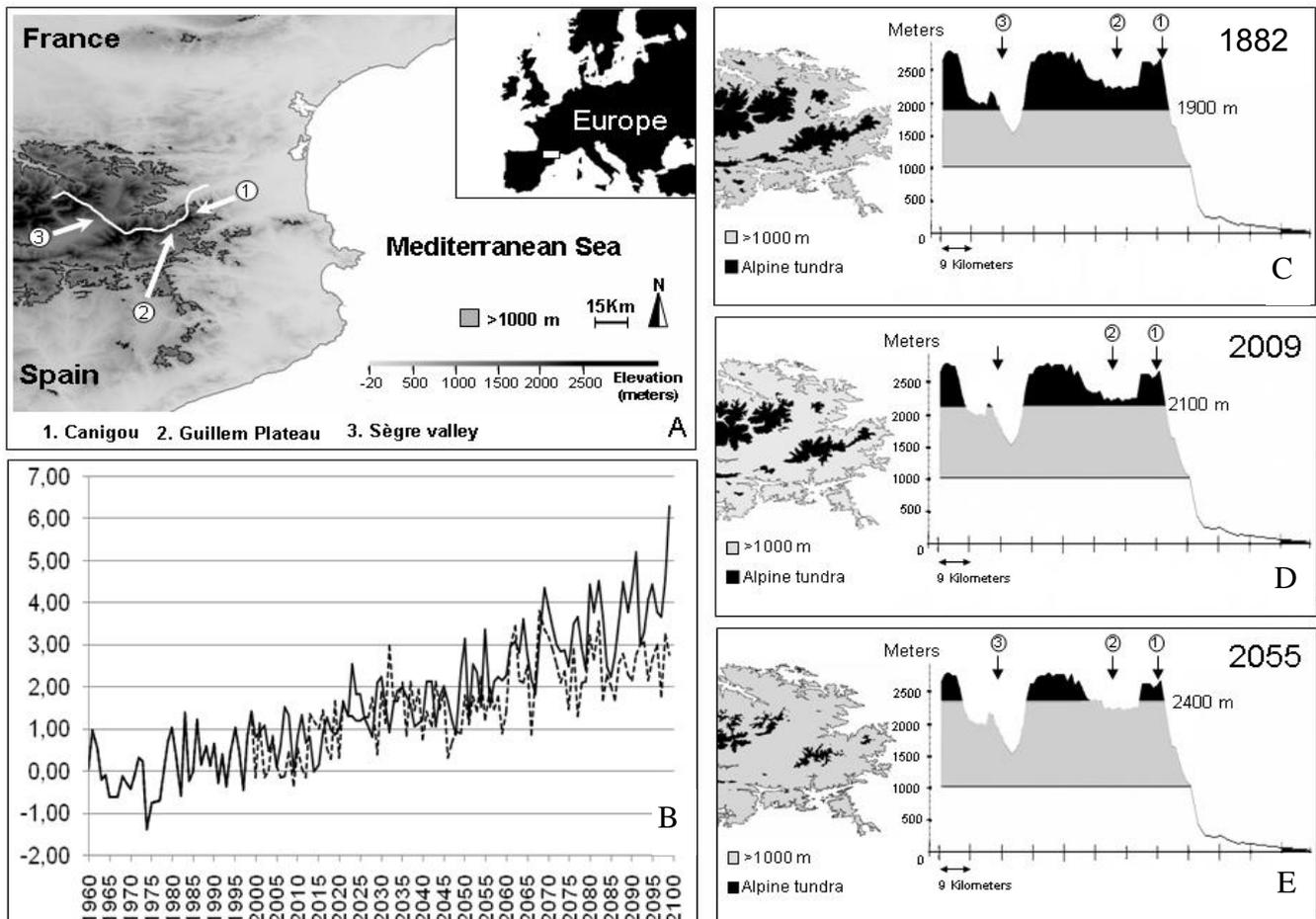


Fig. 2 :

A : Carte de la zone d'étude.

B : Prédiction de l'évolution des températures sur la partie Est des Pyrénées selon le scénario modéré de Météo France.

C : Limite inférieure de l'étage alpin (alpine tundra) en 1882 sur le profil topographique du tracé blanc en 'A'.

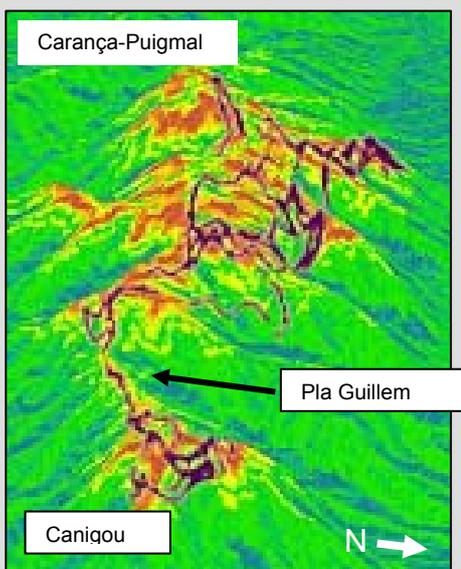
D : Limite inférieure de l'étage alpin (alpine tundra) en 2009 sur le profil topographique du tracé blanc en 'A'.

E : Limite inférieure de l'étage alpin (alpine tundra) en 2055 sur le profil topographique du tracé blanc en 'A'.

## Perspective à débattre...

D'après les données prédictives de météo France sur l'évolution des températures futures, il semblerait que l'élévation de la limite supérieure de la forêt soit telle qu'elle dépasserait la hauteur du Pla Guillem (~2300 mètres) en 2055.

Vaste pla d'altitude caractéristique des Pyrénées Orientales, le Pla Guillem sépare le massif du Canigou du massif Carança-Puigmal. Pour le lagopède alpin, particulièrement inféodé aux espaces ouverts d'altitude, ce Pla Guillem correspond à un véritable corridor écologique naturel permettant le passage entre les massifs du Canigou et de Carança-Puigmal (figure ci dessous).



Distances de moindre coût (tracés violets) tracées entre chaque paire d'individus en fonction de la géomorphologie du milieu, voir figure 8 du chapitre 1.

A l'heure actuelle, il est intéressant d'observer une perte de richesse allélique significative ( $P=0.019$ ) pour la population installée sur le massif du Canigou par rapport à celle située sur le massif de Carança-Puigmal. En effet, cette perte de richesse allélique n'étant pas associée à une perte d'hétérozygotie (voir tableau 4 du chapitre 1 et *Bech et al*, 2009), celle-ci laisse présager un goulot d'étranglement

dans un avenir proche au niveau de la population du Canigou (Cornuet & Luikart 1996). Ce goulot d'étranglement n'étant pas décelé par la méthode Cornuet & Luikart 1996 (logiciel BOTTLENECK), nous pouvons imaginer que le goulot d'étranglement n'est pas encore détectable au sein de la population du Canigou. Une extrapolation nous pousserait même à dire que la future fragmentation du paysage commence à se faire ressentir au sein des populations de lagopède alpin situées sur le massif du canigou. Ceci vient confirmer la position du lagopède en tant qu'espèce indicatrice (espèce sentinelle) de l'évolution des milieux montagnards. Il semblerait donc judicieux d'étudier la génétique (notamment les indices de diversité génétique tel que la richesse allélique et l'hétérozygotie) des espèces sentinelles et de s'en servir d'outil de prédiction de l'évolution de leur habitat.

Aujourd'hui, nous faisons appel à l'écologie du paysage pour aider à comprendre et à expliquer des processus micro-évolutifs (flux de gène, différenciation génétique entre populations...). Peut-être que demain, l'interprétation des données de génétique et des micro-processus évolutifs associés nous servira à prédire les phénomènes macro-évolutifs intervenant à l'échelle des paysages...

---

**IV/ Conclusions :**

## **U**ne première menace au maintien des populations : l'isolement géographique

Le premier ennemi du maintien des populations naturelles est l'isolement géographique. En effet empêchant les flux géniques de circuler librement, cet isolement laisse la population en question génétiquement autonome. Cette autonomie génétique peut entraîner une dépression de consanguinité menaçant ainsi la population qui tendrait à tomber dans un vortex d'extinction.

**Pourquoi tenter alors de maintenir une population de lagopède alpin installée sur un chaînon isolé et qui montre déjà des signes d'appauvrissement génétique?**

Avant de répondre à cette question, il est important de revenir sur la définition première du terme 'biodiversité', trop longtemps galvaudé et amalgamé à la richesse spécifique à un moment 'T'.

D'après le professeur Pierre Henry Gouyon, la biodiversité n'est pas un chiffre mais plutôt un processus (comm. Orale ECOLOGIE 2010) au cours duquel certaines étapes peuvent se perdre et/ou disparaître et au cours duquel l'échec de certaines étapes peut recentrer l'intérêt sur d'autres. A l'image d'un processus, et en écologie évolutive, la disparition d'une espèce devenue, ici et maintenant, mal adaptée à son milieu peut permettre le développement d'autres espèces via l'exploitation des niches laissées vacantes. De cette façon, après chacune des 5 grandes crises que la biodiversité ait connues depuis la création de la Terre, le nombre d'espèces s'est toujours rétabli.

La biodiversité ne représente donc pas un état ou encore une image instantanée du processus mais bien plutôt le processus lui-même. Comme tout processus, la biodiversité possède sa propre vitesse d'évolution et c'est bien là le centre de toutes les préoccupations. Effectivement, ce n'est pas l'état actuel du processus biodiversité qui est préoccupant mais plutôt son évolution et plus précisément la rapidité avec laquelle le nombre d'espèces en danger augmente.

Par conséquent, pourquoi aujourd'hui investir dans le maintien d'une population génétiquement isolée et géographiquement perdue ? En d'autres termes : **pourquoi un projet de translocation de lagopède alpin ?**

Bien que traitant d'une espèce endémique, cette question doit être appréhendée à une échelle plus large que le contexte dans lequel elle se trouve. En effet, bien que prenant des mesures de gestion qui semblent être espèce-centrées, cette démarche de translocation a pour but de freiner et donc de ralentir tout le processus d'extinction d'espèces. Cette décélération aurait pour objectifs le

maintien du fonctionnement de l'écosystème et par voie de conséquence le maintien des services écosystémiques qui façonnent notre quotidien. Ainsi, un projet de translocation serait favorable à la biodiversité (au sens processus du terme).

Un second argument en faveur de la translocation de lagopèdes dans les Pyrénées est le 'principe de précaution', principe décisionnel selon lequel « *l'absence de certitude, compte tenu des connaissances scientifiques et techniques du moment, ne doit pas retarder l'adoption de mesures effectives et proportionnées visant à prévenir un risque de dommages graves et irréversibles à l'environnement à un coût économiquement acceptable* » (Loi Barnier en 1995). Un troisième et dernier argument en faveur d'un projet de translocation concernant le lagopède alpin, est que cette espèce est une espèce indicatrice de l'évolution des milieux montagnards. Maintenir cette espèce permettra donc une meilleure visibilité et compréhension de l'évolution de ce type de milieux.

### **Un deuxième menace au maintien des populations : l'homogénéité génétique...**

Le deuxième ennemi du maintien des populations naturelles est l'homogénéité génétique. L'homogénéité peut être une conséquence d'adaptations locales ayant conduit à des fixations d'allèles dans la population. Même si ces complexes peuvent être localement avantageux à un moment T, il se pourrait, qu'au moment T+1, ces mêmes complexes deviennent 'mal adaptés' et représentent un frein à l'évolution des individus. Dans ce sens, l'homogénéité génétique représentant une menace au maintien des populations naturelles, le maintien de la diversité génétique apparaît comme nécessaire.

En 1914, l'effet hétérosis ou vigueur hybride apparaît avec le scientifique George Harrison Shull (1874-1954) qui dénote des avantages physiologiques dûs à l'état hétérozygote. Plus précisément, ces avantages physiologiques seraient liés à la disparition du fardeau génétique. Ainsi, afin d'éviter une homogénéité génétique, les individus de chaque espèce se sont adaptés. Chez les oiseaux, et notamment chez le lagopède alpin, les biais de dispersion sexuel ainsi que les caractères phylopatriques empêcheraient la consanguinité. Chez la rousserole des Seychelles (*Acrocephalus sechellensis*), la femelle choisira de changer de partenaire pour un mâle ayant une plus forte diversité de Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) que son mâle initial (Richardson *et al.* 2005). La dissimilarité génétique entre les partenaires sexuels et non la simple diversité génétique d'un des individus du couple peut également être importante et maximise la diversité génétique de la descendance (Foerster *et al.* 2003). Chez un parasite (*Schistosoma mansoni*), la femelle change de partenaire pour un

mâle génétiquement plus dissimilaire à elle que ne l'est le partenaire initial, favorisant ainsi la diversité génétique de sa descendance (Beltran *et al.* 2008).

Cependant, trop de dissimilarité génétique peut entraîner une incompatibilité. Le croisement de certaines lignées entre elles peut, de temps en temps, entraîner des coûts dûs à une dépression 'd'outbreeding'. En effet, par recombinaison, cette dépression 'd'outbreeding' peut rompre des complexes alléliques localement adaptées ou encore rompre des complexes de gènes co-adaptés. Ainsi, cette recombinaison hasardeuse rendrait périlleuse toute hybridation non raisonnée.

Dans notre cas, la perdrix présente un risque d'homogénéité génétique en élevage et de dépression 'd'outbreeding' dans les Pyrénées *via* les lâchers de perdrix d'élevages (aujourd'hui réglementé voire interdit).

En élevage, le risque est de créer des lignées consanguines accumulant un certain fardeau génétique. Pour les perdrix grises, ces individus d'élevage sont voués à être lâchés en nature. Il est donc important de faire attention à la fois au maintien de la diversité génétique en élevage et à la quantité de lâchers effectués en nature. En effet, des lâchers massifs d'oiseaux d'élevages en nature peuvent entraîner, par introgression génétique, une homogénéité des populations naturelles qui serait néfaste à leur maintien. C'est la raison pour laquelle de plus en plus d'éleveurs 'retrempent' (selon leur expression) leurs stocks avec des individus sauvages afin de maintenir une certaine diversité génétique au sein de l'élevage.

Un autre problème, cependant, pour la perdrix des Pyrénées, réside dans le fait que les populations de perdrix servant aux élevages et aux lâchers sont de sous-espèce différente de celle des Pyrénées (excepté pour l'élevage d'Estერი d'Aneu). Ceci ne serait pas grave si les deux sous espèces ne pouvaient pas se reproduire (incompatibilité entre les deux sous espèces). Ça l'est davantage si les deux sous-espèces arrivent à s'hybrider. Deux conséquences peuvent apparaître alors. La première est que l'intégrité génétique de la population de perdrix grise de montagne pourrait être perdue avec tout ce que cela implique en terme d'adaptation aux milieux montagnards. Une seconde conséquence serait une homogénéisation des populations de plaine et des Pyrénées à plus long terme. Les conservatoires de souches pourraient à l'avenir pallier ces deux problèmes...

## ANNEXES

Annexe C1 Article soumis dans *Conservation Genetics*

Editorial Manager(tm) for Conservation Genetics

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: UNDERESTIMATION OF BIRD MORTALITY RATE RELATED TO SKI-LIFT WIRES: A FORENSIC APPROACH

Article Type: Short Communication

Keywords: bird collision; human disturbance; forensic DNA; rock ptarmigan; ski-lift.

Corresponding Author: Nicolas Bech

Corresponding Author's Institution:

First Author: Nicolas Bech

Order of Authors: Nicolas Bech;Sophie Beltran;Jérôme Boissier;Jean-François Allienne;Jean Resseguier;Claude Novoa

Abstract: Ski-lifts represent an important cause of alpine birds' mortality but this parameter is often underestimated because it is estimated only by the number of bird found dead underneath the ski lift wires. We use non invasive samples and genetic data to carry out molecular tracking on a bird species. Our study, focused on French Pyrenees ski resort, shows that individuals can travel several hundred meters after a fatal collision with human installations. We then show that the use of forensic approach would provide a better estimate of the crippling bias and thus would help to better define the collision mortality rate

1           **UNDERESTIMATION OF BIRD MORTALITY RATE RELATED TO SKI-LIFT**

2                           **WIRES: A FORENSIC APPROACH**

3  
4                   Bech N<sup>a\*</sup>, Beltran S<sup>a\*</sup>, Boissier J<sup>a</sup>, Allienne JF<sup>a</sup>, Resseguier J<sup>b</sup>, Novoa C<sup>b</sup>

5  
6    \* co-first-authors, have contributed equally.

7    *Authors' affiliation :*

8    <sup>a</sup> Laboratoire de Biologie et d'Écologie Tropicale et Méditerranéenne, UMR 5244 CNRS-  
9    Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66 860 Perpignan Cedex, France

10   <sup>b</sup> Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Direction des Etudes et de la Recherche,  
11   Espace Alfred Sauvy, 66 500 Prades, France.

12  
13   \* *Corresponding authors:* Nicolas Bech, Sophie Beltran:

14           Current address: Laboratoire de Biologie et d'Écologie Tropicale et  
15                           Méditerranéenne, UMR 5244 CNRS-Université de  
16                           Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66 860 Perpignan  
17                           Cedex, France

18    E-mail: [nicolas.bech@univ-perp.fr](mailto:nicolas.bech@univ-perp.fr)

19                   [beltran.sophie@hotmail.fr](mailto:beltran.sophie@hotmail.fr)

20                   Tel: +33 4 68 66 20 50

21                   Fax: +33 4 68 66 22 81

1

2 **Abstract**

3 Ski-lifts represent an important cause of alpine birds' mortality but this parameter is often  
4 underestimated because it is estimated only by the number of bird found dead underneath the ski  
5 lift wires. We use non invasive samples and genetic data to carry out molecular tracking on a bird  
6 species. Our study, focused on French Pyrenees ski resort, shows that individuals can travel  
7 several hundred meters after a fatal collision with human installations. We then show that the use  
8 of forensic approach would provide a better estimate of the crippling bias and thus would help to  
9 better define the collision mortality rate.

10

11 **Key-words:** bird collision, human disturbance, forensic DNA, rock ptarmigan, ski-lift.

2

## Introduction

Wild animals have to cope not only with characteristics of their environment such as seasonal changes in climate or resource availability, but also with a variety of human disturbances. Evaluate the impact of human installations is necessary in a sustainable development context, to allow conservation action plans to preserve both biodiversity and human activities. A variety of wild animal parameters could be measured to estimate the effect of human infrastructures: concentration of stress hormone in droppings (Arlettaz et al. 2007; Thiel et al. 2008), abundance (Negro et al. 2009; Patthey et al. 2008; Watson and Moss 2004), species richness and/or diversity (Negro et al. 2009; Rolando et al. 2007), breeding success (Watson and Moss 2004) and mortality rate (Bevanger and Brøseth 2001; Watson and Moss 2004). Generally the estimation of mortality resulting from human infrastructures like ski-lift wires, power lines or fences is performed by counting animals found dead underneath or close to the human infrastructures (Barrios and Rodriguez 2004; Bevanger and Brøseth 2001). However, individuals will sometimes keep moving after collisions, and death can occur several hundred meters further. This bias, known as the crippling bias, refers to animals, which can be found dead far from the infrastructures and therefore not counted in mortality rate estimations related to the infrastructures. To better evaluate the actual mortality rate, individuals found dead far from human infrastructures has to be taken into account if the death of these individuals is proven as being the result of the human infrastructures. In criminal investigation, DNA tests are the most accurate piece of scientific evidence that a lawyer can have. Thus, since the 1980s, forensics compares DNA samples found on the criminal place and DNA samples of the suspects and/or the victims in order to get more secure information about guilt. As in criminal investigations, forensics could be applied to wildlife management in order to evaluate the impact of potentially dangerous human infrastructures using DNA samples comparisons of dead individuals and traces

(i.e. samples) left at the collision place. To follow up and identify individuals in a free-ranging animal population wildlife researchers can employ a method, effective, inexpensive and permanent, which uses non-invasive samples (hair, faeces, feathers...) and polymorphic molecular markers (i.e. microsatellite loci) (Piggott and Taylor 2003; Segelbacher 2002; Taberlet and Waits 1998).

In the Pyrenees, the rock ptarmigan inhabits the southern edge of the European species' range which confers a particular weakness to this endemic small grouse species. This endangered status is emphasized by recent genetic studies which show that the Pyrenean ptarmigan populations have a very low genetic diversity compared to that found in the Alps and Scandinavia (Caizergues et al. 2003). Moreover, in the Pyrenees, since the last glacial maximum, the habitat of the rock ptarmigan has been reshaped by a severe fragmentation, and is now restricted to high-alpine zones, also called 'sky islands' (Bech et al. 2009).

Since 1960, French mountains have shown a rapid growth of the ski resorts development. Now, the French whole winter sport area represents the largest of our planet (Ménoni et al. 2006). However, in the Pyrenees, ski resort locations often coincide with the winter habitat of rock ptarmigan and other endemic birds like capercaillie (*Tetrao urogallus aquitanus*) (Ménoni et al. 2006). These ski resorts tend to fragment a little more these 'sky islands' by increasing the mortality rate associated with ski-lift collisions (Buffet and Dumont-Dayot 2010; Observatoire des Galliformes de Montagne 2006). Even if several ski resorts take management measures for reducing their environmental impact, ski-lift zones remain a very dangerous ground notably for the alpine birds.

In this paper, we focus on the Err-Puigmal ski resort and more precisely on the Montserrat ski-lift known for being dangerous for the alpine avifauna (Observatoire des Galliformes de Montagne 2006). We carry out molecular tracking on a bird species to demonstrate that one individual can

travel several hundred meters after a collision with a ski-lift and to confirm the underestimation of the alpine bird mortality related to this kind of infrastructure (Observatoire des Galliformes de Montagne 2006).

## Methods

### Sampling

The sampling was carried out in the Err-Puigmal ski resort. This ski resort, located on the eastern part of the chain, is the highest of the Pyrenees (from 1830 to 2700 meters of altitude) and notably encroaches the rock ptarmigan habitat. We have collected two samples, the first one: one corpse of a rock ptarmigan female has been collected on 10 June 2008 in the middle of the free-ride zone of the ski-resort, (31T, 425238 E, 4692134 N) (Fig. 1A). This free-ride zone asserted by the ski-resort is supplied by the Montserrat ski-lift (Fig. 1B) underneath which we have found, three days later, the second sample: some feathers of rock ptarmigan (Fig. 1C). Distance between the two sampling places is 650 meters.

### Comparison between the two samples

Sex and genotype determinations of both samples, collected respectively under the ski-lift and on the corpse of rock ptarmigan found at 650 meters of this ski-lift, were performed using molecular biology methods (See electronic supplementary file). The two samples have been genotyped six times in order to determinate a genotype consensus and to avoid genotype errors due to false alleles or null alleles (Valière et al. 2007). Because the feather found under ski-lift could belong to any bird from our geographic area we have to determine the likelihood that this feather was lost by the rock ptarmigan found dead. For this, we used the Probability of Identity (PI) index which is the probability that two individuals, in the population, share the same genotype. This probability of identity was carried out using GIMLET v.1.3.2 software (Valière 2002) and was

corrected for small samples of individuals (PI unbiased). The population considered 34 DNA samples isolated from distinct individuals occurring in the same geographical zone (radius 60 kilometers).

### **Result and Discussion**

For each sample the six genotypic profiles obtained were identical and we did not need to determinate the genotype consensus. The DNA comparison between samples, respectively collected under the ski-lift and on the corpse of rock ptarmigan gave both an identical sex and strict identical genotype profiles for all microsatellite markers. The probability of identity correcting for small samples of individuals (PI unbiased) was  $1.216E-12$ . This means that there would be close to 100% of probability that both samples come from the same individual, i.e. that feathers found underneath Montserrat ski-lift come from corpse found 650 meters further.

Our study demonstrates that individuals wounded after a ski-lift collision can travel several hundred meters before dying and so, the mortality rate estimations attributed to the human infrastructure are likely underestimated. If our study shows the usefulness of forensic approach to a better evaluation of the mortality rate we cannot evaluate the magnitude of the underestimation. Usually, only birds found death directly underneath the ski-lift are taken into account in mortality rate estimations. For example, during the period 1997-2009, 835 fatal collisions among mountain avifauna were identified in the French ski resorts of the Alps and Pyrenees (Observatoire des Galliformes de Montagne 2006). Field studies considering large transects areas around the ski-lift need to be performed to quantify the relative importance of crippling bias. In the same way, similar studies could be performed on other human infra-structures like power lines or wind farms also known for their impact on the avian mortality.

It is recognized that the actual rate of collision is likely to be underestimated, so it is essential to consider correction factors to be applied to produce more realistic estimates of collision mortality rate (Bevanger 1999). Such factors correct for seasonal bias (Bevanger and Broseth 2004), for scavengers removal bias (Barrios and Rodriguez 2004; Bevanger and Broseth 2000; Kikuchi 2008; Morrison 2002), for search efficiency bias (Kikuchi 2008; Morrison 2002) for habitat structure bias (Bevanger and Broseth 2004) or for crippling bias (Bevanger and Broseth 2004). Crippling bias refers to victims of infrastructure found dead outside the searching zone. We show in this paper that the use of forensic approach would provide a better estimate of the crippling bias and beyond, of the mortality rate associated with collision.

### **Acknowledgements**

This research was supported by the Bureau des Ressources Génétiques, the Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique and the Centre National de la Recherche Scientifique. Authors would thanks Renaud Rabastens for its contribution.

## References

- Arlettaz R, Patthey P, Baltic M, Leu T, Schaub M, Palme R, Jenni-Eiermann S (2007) Spreading free-riding snow sports represent a novel serious threat for wildlife. *P Roy Soc B-Biol Sci* 274: 1219-1224.
- Barrios L, Rodriguez A (2004) Behavioural and environmental correlates of soaring-bird mortality at on-shore wind turbines. *J Appl Ecol* 41: 72-81.
- Bech N, Boissier J, Drovetski S, Novoa C (2009) Population genetic structure of rock ptarmigan in the 'sky islands' of French Pyrenees: implications for conservation. *Anim Conserv* 12: 138-146.
- Bevanger K (1999) Estimating bird mortality caused by collision with power lines and electrocution, a review of methodology. *Birds and power lines. Collision, electrocution and breeding* (M. Ferrer & G. F. E. Janss, Eds.). Quercus, Madrid, 29-56.
- Bevanger K, Broseth H (2000) Reindeer *Rangifer tarandus* fences as a mortality factor for ptarmigan *Lagopus* spp. *Wildlife biol* 6: 121-126.
- Bevanger K, Brøseth H (2001) Bird collisions with power lines - an experiment with ptarmigan *Lagopus* spp. *Biol Conserv* 99: 341-36.
- Bevanger K, Broseth H (2004) Impact of power lines on bird mortality in a subalpine area. *Anim biodivers conserv* 27: 67-77.
- Buffet N, Dumont-Dayot E (2010) Bird collision with overhead ski-cables: a source of mortality which can be reduced. *Betham Science Publishers, In Press*.
- Caizergues A, Bernard-Laurent A, Brenot JF, Ellison L, Rasplus JY (2003) Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in Northern and Western Europe. *Mol Ecol* 12: 2267-2274.

- Kikuchi R (2008) Adverse impacts of wind power generation on collision behaviour of birds and anti-predator behaviour of squirrels. *J nat conserv* 16: 44-55.
- Ménoni E, Defos du Rau P, Blanc P (2006) Extension des domaines skiabiles et grand tétras: l'expertise ONCFS. Rapport scientifique de l'ONCFS: 10-16.
- Morrison M (2002) Searcher bias and scavenging rates in bird/wind energy studies. Subcontractor Report, 9.
- Negro M, Isaia M, Palestrini C, Rolando A (2009) The impact of forest ski-pistes on diversity of ground-dwelling arthropods and small mammals in the Alps. *Biodivers Conserv* 18 : 2799-2821.
- Observatoire des Galliformes de Montagne (2006) Percussion des oiseaux dans les câbles aériens des domaines skiabiles. Zoom n°4, Sevrier, France.
- Patthey P, Wirthner S, Signorell N, Arlettaz R (2008) Impact of outdoor winter sports on the abundance of a key indicator species of alpine ecosystems. *J Appl Ecol* 45: 1704-1711.
- Piggott MP, Taylor AC (2003) Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. *Wildlife Res* 30: 1-13.
- Rolando A, Caprio E, Rinaldi E, Ellena I (2007) The impact of high-altitude ski-runs on alpine grassland bird communities. *J Appl Ecol* 44: 210-19.
- Segelbacher G (2002) Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Mol Ecol Notes* 2: 367-369.
- Taberlet P, Waits LL (1998) Non-invasive genetic sampling. *Trends Ecol Evol* 13: 26-27.
- Thiel D, Jenni-Eiermann S, Braunisch V, Palme R, Jenni L (2008) Ski tourism affects habitat use and evokes a physiological stress response in capercaillie *Tetrao urogallus*: a new methodological approach. *J Appl Ecol* 45: 845-853.

Valière N (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Mol Ecol Notes* 2: 377-379.

Valière N, Bonenfant C, Toïgo C, Luikart G, Gaillard JM, Klein F (2007) Importance of a pilot study for non-invasive genetic sampling: genotyping errors and population size estimation in red deer. *Conserv Genet* 8: 69-78.

Watson A, Moss R (2004) Impacts of ski-development on ptarmigan (*Lagopus mutus*) at Cairn Gorm, Scotland. *Biol Conserv* 116: 267-275.

## Figure Captions

*Fig.1* Puigmal ski-resort and sampling

*A* Place and photo of the corpse of the rock ptarmigan female found on 10 June 2008

*B* Photo of the Montserrat ski-lift known for being dangerous for the avifauna located on crest.

Delineate zone represents the free ride zone on the ski resort. Map is borrowed and modified from <http://www.puigmal.fr/>

*C* Photo of the feather found underneath Montserrat ski-lift

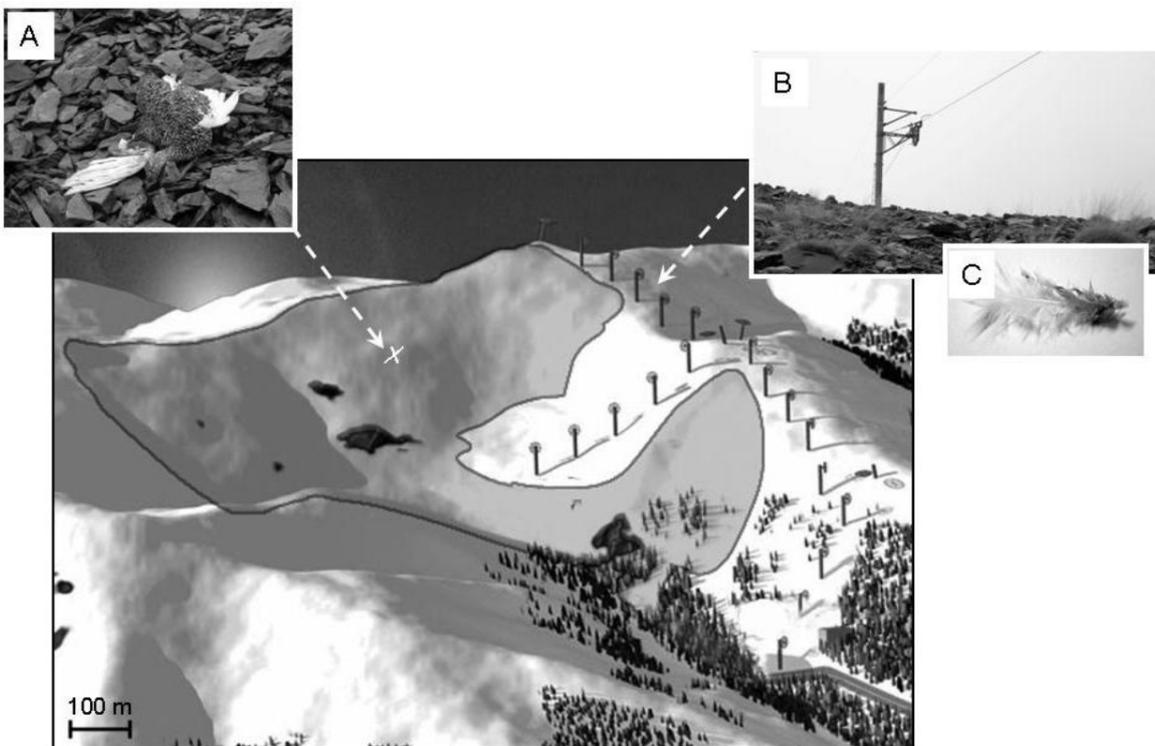


Figure 1

**Supplementary file.** Molecular biology methods and characteristics of polymorphic microsatellite loci for the rock ptarmigan

### *Sexing*

Sex of each sample was determined by amplifying the CHD genes using the P2 and P8 universal primers (Griffiths et al. 1998). The amplified products were resolved on 3% agarose gels.

### *Genotyping*

Genomic DNA was extracted from the calamus (~3 mm) concerning feathers, and from muscle biopsy concerning the corpse, using silica columns (e.Z.N.A Kit of OMEGA BIO-TEK), according to the manufacturer's protocol. All samples were analysed with 14 microsatellite markers (Table 1). The relevant DNA fragment was amplified using Polymerase Chain Reaction (PCR). To maximise efficiency and minimize costs, these PCRs were performed in four multiplexes using the QIAGEN multiplex kit (Table 1). These multiplexes were carried out according to the manufacturer's standard microsatellite amplification protocol in the final volume of 10 $\mu$ L and with 57°C for annealing temperature. PCR products are diluted in Sample Loading Solution (Beckman Coulter) with red-labeled size standard (CEQ™ DNA size standard kit, 400, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and electrophoresed on an automatic sequencer (CEQ™ 8000, Beckman Coulter). Genotypes were determined using the fragment analyzer package from Beckman Coulter.

### *Marker validation and distribution of the genetic diversity*

Global tests implemented in FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2001) detected no evidence for departure from Hardy–Weinberg expectations; no Fis values significantly different from zero (P-value threshold after Bonferroni correction, P= 0.0035 for 14 exact tests) and no evidence for linkage disequilibria either (P-value threshold after Bonferroni correction, P= 0.0005 for

91 exact tests). The software FSTAT revealed a high polymorphism degree on all microsatellites loci with an allelic richness ( $A_n$ ) ranging from 2.829 to 12.610 and an expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranging from 0.379 to 0.876 by locus and over all generations (Table 1).  $H_o$  was computed using the software GENEPOP (Raymond and Rousset 1995).

### References

- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html>.
- Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG (1998). A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol* 7: 1071-75.
- Raymond M, Rousset F (1995). Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248-49.

Marker names	GenBank accession no	MENotes Database ID	Primer sequences (5'- 3')	Multiplex	A	An	He	Ho	Fis	Prob(unbias)
LLSD7	X99057	43736	F: CATGCTTCCAGTACCTGTGC R: GTTAGCCATCACAGTGCACC	Mul1	5	4.829	0.672	0.6	0.107	1.57E-01
LLST5	Y16830	43737	F: AAGACAACAGATGGAGTGACAG R: GTTGTCCCTTGGGGAATGTATC	Mul1	13	12.61	0.876	0.688	0.215	3.68E-03
LLST7	Y16831	43738	F: TCAGTGAAAGAGTGGTGTGG R: GGGCATCCATAACTTTTCTG	Mul1	8	8	0.784	0.759	0.033	2.26E-04
TTT2	AF303099	43739	F: GTGAATGGATGGATGTATGAA R: GTCGTCAATGAACCTCTTGG	Mul1	4	3.98	0.614	0.412	0.329	5.12E-05
BG6	-	43740	F: AAAGAGGCAAGCACTCACAAATG R: CCCTTGAATATCCTTTAACAAAAC	Mul2	8	7.987	0.849	0.758	0.108	1.83E-06
BG19	AF381552	43741	F: CAAGGCGCAACATTAAGATTC R: TGTATTTTGGAACTCTGTGTGC	Mul2	4	4	0.712	0.743	- 0.044	2.35E-07
BG15	AF381549	43742	F: AAATATGTTTGTAGGGCTTAC R: TACATTTTTCATTGTGGACTTC	Mul2	4	3.878	0.379	0.364	0.04	9.46E-08
LLSD4	X99054	43744	F: AGTGAAGCTAAGCAGATTGTG R: ATAGTCAATGCCTACACTCAGC	Mul3	8	7.559	0.775	0.706	0.089	7.02E-09
LLST1	X99051	43745	F: AAATCTTTTCTTGTGATGAG R: TGAGGGTTATGACATTATTAGG	Mul3	4	3.999	0.382	0.265	0.308	2.68E-09
BG12	AF381547	43746	F: TCTCCTTCTAAACCAGTCATTC R: TAGTTCCACAGACACATTG	Mul3	3	2.999	0.393	0.242	0.384	1.07E-09
LLSD10	X99060	43747	F: CGCAGTGTATGTCAGTAAAGG R: ATTCTGAAGTGAGGAAATATCC	Mul3	3	2.993	0.534	0.281	0.474	3.49E-10
Aru1G4	EF546647	43749	F: CTGCAGTCACACAAGGCTAC R: AGTGGGTCAAGGATGAGTGG	Mul4	6	5.828	0.761	0.943	-0.24	2.94E-11
MNT45	AY235058	43750	F: ACATGGAGGCAGAGAACCTC R: TGTACAGCTGAATGTTTCCTC	Mul4	3	2.829	0.459	0.314	0.315	1.11E-11
Aru1F25	EF546645	43736	F: CCTAATGCTGTGCCACCTC R: GCTCACACTGTCAACAGGTG	Mul4	5	4.906	0.736	0.531	0.279	1.22E-12

Tab.1: Characteristics of 14 polymorphic microsatellite loci for the rock ptarmigan occurring in the Pyrenees. Marker name; Genbank accession number; MENotes Database ID ; Prime sequences, F: forward, R: reverse; multiplex and dye number according to Beckman Coulter codes; A: number of alleles; An: allelic richness; He: expected heterozygosity; Ho, Fis are cumulated unbiased probability of identical (Prob unbias) .



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

## Follow-up of the genetic diversity and snail infectivity of a *Schistosoma mansoni* strain from field to laboratory

Nicolas Bech<sup>1,\*</sup>, Sophie Beltran<sup>1,\*</sup>, Julien Portela, Anne Rognon, Jean-François Allienne, Jérôme Boissier, André Théron

Laboratoire de Biologie et d'Écologie Tropicale et Méditerranéenne, UMR 5244 CNRS-UPVD, Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 January 2010  
Received in revised form 27 May 2010  
Accepted 23 June 2010  
Available online 1 July 2010

#### Keywords:

*Schistosoma mansoni* strain  
Microsatellite markers  
Genetic diversity  
Snail infectivity  
Matching-alleles model

### ABSTRACT

*Schistosoma mansoni* is an endoparasite causing a serious human disease called schistosomiasis. The quantification of parasite genetic diversity is an essential component to understand schistosomiasis epidemiology and disease transmission patterns but some studies on parasite genetic diversity are performed using parasite laboratory strains. However, a potential discrepancy in level of genetic variation between field populations and laboratory strains may have various implications in our deductions. In this study, 246 adult worms were analysed on 15 microsatellite markers to investigate variation of genetic diversity between a founder field isolate and the nine successive laboratory generations during three years of laboratory maintenance. In parallel, we measured a parasite life trait (snail infectivity) at each generation in order to test a potential link between inbreeding and snail infectivity. Our genetic analyses demonstrate a significant genetic differentiation between all parasite generations and a significant isolation by time associated with a decrease in neutral genetic diversity that is likely to be the result of successive bottleneck events. However, while snail infectivity decreases sharply between field isolate and the first laboratory generation, this parasite life trait does not evolve between other laboratory generations and appeared disconnected from this continuous neutral genetic diversity loss. We hypothesize that a sufficient level of compatibility polymorphism at a genomic level is maintained independently of an increase of inbreeding, ensuring the stability in the parasite life trait.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Schistosomes (Platyhelminth, Digenea) are endoparasites causing a serious human disease called schistosomiasis. Schistosomiasis ranks second only to malaria in terms of parasite-induced human morbidity and mortality, with more than 200 million people infected (Chitsulo et al., 2000; Crompton, 1999). The quantification of parasite genetic diversity is an essential component to understand schistosomiasis epidemiology and disease transmission patterns (Curtis et al., 2002; Jarne and Théron, 2001). Several studies based on DNA analyses performed directly on parasites from field populations demonstrated a high genetic diversity level (Agola et al., 2009; Curtis et al., 2002; Rodrigues et al., 2002a; Rollinson et al., 2009; Shrivastava et al., 2005; Sire et al., 1999, 2001; Steinauer et al., 2009; Théron et al., 2004). In contrast, analyses on laboratory strains showed a significant loss of

diversity (Loverde et al., 1985; Pinto et al., 1997; Shrivastava et al., 2005; Sorensen et al., 2006; Stohler et al., 2004). As an example, it was shown that only 10% and 14% of alleles are found in the two analysed laboratory strains compared to a field population (Stohler et al., 2004). Such discrepancy in level of genetic variation between field populations and laboratory strains may have various implications as for instance when testing drug or vaccine efficiency (Bergquist et al., 2005; McManus and Loukas, 2008; Pearce, 2003).

Comparisons of genetic diversity between field populations and laboratory strains have often concerned disconnected isolates and strains from different origins and we do not know how the reduction of genetic diversity occurs at the passage from field to laboratory and later, during the successive generations of parasites. Only one recent study has genotyped parents and offspring from field isolates kept in the laboratory for only three generations (Steinauer et al., 2008). Moreover, no parasite fitness trait was followed concomitantly to the reduction of neutral genetic diversity during laboratory maintenance. In this study, we use 15 microsatellites markers to analyse the evolution of genetic diversity from a field isolate of wild *Schistosoma mansoni* adult worms, directly collected from naturally infected murine hosts, and at the origin of the laboratory strain, to the ninth laboratory

\* Corresponding authors. Tel.: +33 4 68 66 20 50.

E-mail addresses: [nicolas.bech@univ-perp.fr](mailto:nicolas.bech@univ-perp.fr) (N. Bech), [beltran.sophie@hotmail.fr](mailto:beltran.sophie@hotmail.fr) (S. Beltran).

<sup>1</sup> Co-first-authors, have contributed equally.

generation obtained after three years of maintenance. In parallel, we measure the evolution of parasite infectivity toward *Biomphalaria glabrata*, intermediate snail host from the same geographic origin.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Schistosome strain founder and laboratory maintenance

Six naturally *S. mansoni* infected rats (*Rattus rattus*) were trapped in May 2005 at Dans Fond, one of numerous transmission sites located along the marshy forest focus of Grande Terre island in Guadeloupe, West Indies (Théron and Pointier, 1995). Adult schistosomes were collected from each rat using a standard perfusion method (Duvall and DeWitt, 1967). They were carefully washed in physiological saline solution and stored in 70% ethanol. A total of 20 males and 21 females were used for genetic analysis. Worms of this field isolate constituted the “G0” generation.

Miracidia hatched from eggs collected from the livers of the six naturally infected rats were used to infect 50 *B. glabrata* snails individually exposed to 10 larvae. Forty-three of the 46 surviving exposed snails were infected and shed cercariae (i.e. 95.55% of infection). In the laboratory, five mice (Swiss OF1) were infected with cercariae from these snails (see Boissier and Moné, 2000 for snail and mouse infection protocol) to establish the first laboratory generation of adult worms, called “G1”. Each laboratory generation of the schistosome strain represented one cycle rotation. The next generations (G2 to G9) passed through five mice (160 cercariae at exposure) and approximately 24 infected snails. The snail strain was founded using 100 uninfected founders from the field, and collected at the same time (May 2005) as the rat trapping and at the same transmission site. The snail population was maintained at a census size of several hundreds of individuals. Snails were allowed to breed freely. The laboratory population was not exposed to any deliberate selection; snails preferentially out-crossed and showed Hardy–Weinberg equilibrium at molecular markers (unpublished data).

### 2.2. Laboratory sampling and measure of the parasite life trait

Adult worms from G1, G2, G4, G5 and G9 were collected (see Table 1 for details) for the genetic study and their corresponding offsprings (miracidia) were used to expose individually 50 *B. glabrata* snails (7–9 mm in shell diameter) with 10 larvae at each generation. Snail infectivity was measured as the number of snails positively infected divided by the total number of surviving snails.

### 2.3. Genotyping

DNA was extracted using a recently published protocol (Beltran et al., 2008). All samples were genotyped on 15 microsatellite markers, SmC1, SmDO11, SmDA28 (Curtis et al., 2001), R95529, SmD57, SmD28, SmD25, SCMSMOXII, L46951 (Durand et al., 2000), SmBR16, SmBR10, SmBR13 (Rodrigues et al., 2007), SmS7-1 (Blair et al., 2001), SmBR1, SmBR6 (Rodrigues et al., 2002b). The relevant DNA fragments were amplified using Polymerase Chain Reaction (PCR). To maximise efficiency and minimize costs, these PCRs were performed in three multiplexes using the QIAGEN multiplex kit. The PCR amplifications of loci: R95529, SmC1, SmDO11, SmBR16 and SmD57 were grouped in the multiplex 1; loci: SmDA28, SmBR1, SmS7-1, SmD28 and SCMSMOXII were grouped in the multiplex 2; and loci: SmD25, L46951, SmBR6, SmBR10 and SmBR13 were grouped in the multiplex 3. These multiplexes were carried out according to the manufacturer's standard microsatellite amplification protocol in the final volume of 10  $\mu$ L and with 57 °C for annealing temperature. PCR products were diluted in Sample

Loading Solution (Beckman Coulter) with red-labeled size standard (CEQ™ DNA size standard kit, 400, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and electrophoresed on an automatic sequencer (CEQ™ 8000, Beckman Coulter). Genotypes were determined using the fragment analyzer package from Beckman Coulter.

### 2.4. Identical multilocus genotypes (MLGs) and rate of clones calculation

We inspected the data to identify identical MLGs which could be the result of the asexual multiplication occurring in the invertebrate host. Detection was performed with Gencount software (available at <http://www.cmar.uaig.pt/maree/index.php?t=falberto>). The rate of clones was calculated as the number of identical multilocus genotypes (identical MLGs) on the number of total individuals within generations (Table 1).

### 2.5. Genetic analyses

We used the software MICRO-CHECKER (Oosterhout et al., 2004) to identify the presence of null alleles or scoring errors due to stuttering. Deviation from Hardy–Weinberg expectancies and linkage disequilibria were analysed using the global tests in FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). The level of significance was adjusted for multiple testing using a Bonferroni correction. Furthermore, polymorphism was estimated over all loci and for each generation using the number of alleles (A), allelic richness (AR), expected heterozygosity (He), allelic frequencies (see Supplementary Table) and Fis computed with FSTAT v.2.9.3.2. Finally, observed heterozygosity (Ho) was calculated with GENETIX software v.4.05.2 (Belkhir et al., 1996).

### 2.6. Genetic structuring

Significance of genotypic differentiation between generations was tested using global tests implemented in FSTAT v.2.9.3.2. Correction for multiple tests was adjusted with standard Bonferroni corrections. Pairwise  $F_{st}^{(ENA)}$  values were obtained using the ENA (excluding null alleles) correction method to efficiently correct for the positive bias induced by the presence of null alleles on  $F_{st}$  estimation (Chapuis and Estoup, 2007). We described the distribution of microsatellites variability using Principal Component Analysis (PCA) on individuals' genotypes. PCA was conducted using GENETIX software v.4.05.2. We also used the Mantel test implemented in FSTAT to test for 'isolation by time' by regressing pairwise estimated  $F_{st}^{(ENA)}$  against time (in days). Finally, we investigated whether recent bottleneck events appear during the generations. These tests compare the observed heterozygosity (Ho) with the expected heterozygosity according to Infinite Allele Model (IAM) (Kimura and Crow, 1964), and Two Phase Model (TPM) (Di Rienzo et al., 1994) given the number of alleles in the given generation. We performed the Wilcoxon signed ranks test implemented in BOTTLENECK software (Cornuet and Luikart, 1996) with 1000 iterations. We did not consider the Stepwise Mutation Model (SMM) (Kimura and Ohta, 1978) because this mutation model is not really appropriate for microsatellite markers (Ellegren, 2000; Estoup et al., 2002).

### 2.7. Estimated effective population size ( $N_e$ )

We estimated effective population size between each generation. We used MCLPEPS software which provides the maximum-likelihood estimator of  $N_e$  using Monte Carlo simulations (Anderson et al., 2000). We used this program to compute the likelihoods for  $N_e$  values between 10 and 250, in steps of 1, and used 250,000 Monte Carlo replicates for each value of  $N_e$ .

## Author's personal copy

N. Bech et al./Infection, Genetics and Evolution 10 (2010) 1039–1045

1041

**Table 1**

Summary informations for the 15 microsatellite markers for the generations of *Schistosoma mansoni*. Name and GenBank accession numbers, identical MLGs: identical multilocus genotype on the total N of collected individuals, He: expected heterozygosity, Ho: observed heterozygosity, A: number of alleles, AR: allelic richness and Fis.

Markers (Accession number)		Generations						
		Identical MLGs/N						
		G0 4/41	G1 2/12	G2 12/59	G4 4/16	G5 20/64	G9 25/54	All 67/246
R95529 (R95529)	He	0.636	0.811	0.549	0.245	0.398	0.188	0.471
	Ho	0.487	0.900	0.600	0.267	0.439	0.208	0.483
	A	9.000	8.000	7.000	3.000	4.000	2.000	9.000
	AR	5.581	8.000	4.969	2.637	3.323	1.915	4.386
	Fis	0.234	-0.110	-0.092	-0.087	-0.101	-0.106	-0.044
SmC1 (AF325694)	He	0.681	0.656	0.540	0.665	0.618	0.608	0.628
	Ho	0.700	0.600	0.500	0.750	0.683	0.574	0.635
	A	5.000	3.000	4.000	3.000	3.000	3.000	5.000
	AR	3.686	3.000	3.206	3.000	2.982	2.995	3.716
	Fis	-0.028	0.085	0.074	-0.129	-0.105	0.055	-0.008
SmD57 (AF202967)	He	0.826	0.850	0.814	0.842	0.832	0.803	0.828
	Ho	0.590	0.700	0.655	0.938	0.887	0.944	0.786
	A	11.000	7.000	9.000	8.000	8.000	6.000	12.000
	AR	7.174	7.000	6.449	7.055	6.366	5.128	7.614
	Fis	0.286	0.176	0.196	-0.114	-0.067	-0.176	0.050
SmBR16 (LO4480)	He	0.689	0.767	0.670	0.658	0.670	0.580	0.672
	Ho	0.700	0.900	0.630	0.813	0.780	0.688	0.752
	A	5.000	5.000	4.000	3.000	3.000	3.000	5.000
	AR	4.127	5.000	3.789	3.000	3.000	2.935	3.632
	Fis	-0.016	-0.174	0.059	-0.234	-0.164	-0.185	-0.119
SmDO11 (AF325698)	He	0.845	0.828	0.823	0.823	0.838	0.496	0.776
	Ho	0.775	0.600	0.818	1.000	0.871	0.574	0.773
	A	10.000	7.000	12.000	7.000	8.000	5.000	13.000
	AR	7.346	7.000	7.269	6.200	6.442	3.186	6.954
	Fis	0.082	0.275	0.006	-0.215	-0.040	-0.158	-0.008
SmDA28 (AF325695)	He	0.547	0.424	0.544	0.500	0.503	0.467	0.498
	Ho	0.659	0.583	0.446	0.933	0.571	0.151	0.557
	A	5.000	2.000	4.000	2.000	2.000	2.000	6.000
	AR	2.918	2.000	2.983	2.000	2.000	2.000	2.495
	Fis	-0.203	-0.375	0.180	-0.867	-0.135	0.677	-0.121
SmBR1 (L81235)	He	0.178	0.341	0.164	0.186	0.220	0.174	0.211
	Ho	0.190	0.417	0.179	0.200	0.250	0.189	0.237
	A	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
	AR	1.905	2.000	1.873	1.970	1.945	2.049	1.940
	Fis	-0.096	-0.222	-0.089	-0.077	-0.135	-0.084	-0.117
SmS7-1 (AF330105)	He	0.420	0.159	0.320	0.290	0.444	0.020	0.276
	Ho	0.341	0.167	0.196	0.200	0.270	0.020	0.199
	A	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
	AR	2.000	1.978	1.993	1.998	2.000	1.204	1.990
	Fis	0.187	-0.048	0.387	0.311	0.392	0.000	0.205
SmD28 (AF202966)	He	0.484	0.527	0.315	0.129	0.031	0.000	0.248
	Ho	0.537	0.364	0.364	0.133	0.031	0.000	0.238
	A	3.000	2.000	3.000	2.000	2.000	1.000	3.000
	AR	2.823	2.000	2.170	1.897	1.289	1.000	2.178
	Fis	-0.108	0.310	-0.156	-0.037	-0.008	NA	0.000
SCMSMOXII (M85305)	He	0.581	0.714	0.498	0.617	0.615	0.638	0.611
	Ho	0.611	0.636	0.522	0.533	0.623	0.636	0.594
	A	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000
	AR	3.738	3.996	3.409	3.867	3.516	3.902	3.775
	Fis	-0.051	0.108	-0.049	0.135	-0.012	0.002	0.022
SmBR10 (DQ448293)	He	0.547	0.409	0.534	0.500	0.502	0.463	0.493
	Ho	0.659	0.545	0.434	0.923	0.547	0.185	0.549
	A	5.000	2.000	4.000	2.000	2.000	2.000	6.000
	AR	2.918	2.000	2.968	2.000	2.000	2.000	2.471
	Fis	-0.203	-0.333	0.188	-0.846	-0.088	0.600	-0.114
L46951 (L46951)	He	0.557	0.477	0.395	0.477	0.508	0.493	0.485
	Ho	0.634	0.545	0.404	0.750	0.310	0.646	0.548
	A	4.000	3.000	2.000	2.000	3.000	2.000	4.000
	AR	3.254	2.909	1.999	2.000	2.791	2.000	2.595
	Fis	-0.138	-0.143	-0.025	-0.571	0.390	-0.310	-0.133
SmBR13 (DQ137790)	He	0.840	0.882	0.817	0.737	0.840	0.506	0.770
	Ho	0.854	0.909	0.811	1.000	0.875	0.630	0.846
	A	10.000	8.000	8.000	5.000	7.000	4.000	10.000

Table 1 (Continued)

Markers (Accession number)		Generations Identical MLGs/N						
		G0 4/41	G1 2/12	G2 12/59	G4 4/16	G5 20/64	G9 25/54	All 67/246
SmBR6 (AF009659)	AR	7.270	7.810	6.510	4.761	6.498	2.800	6.451
	Fis	-0.016	-0.031	0.007	-0.357	-0.042	-0.243	-0.114
	He	0.571	0.477	0.392	0.462	0.498	0.498	0.483
	Ho	0.634	0.545	0.396	0.692	0.297	0.722	0.548
	A	4.000	3.000	3.000	2.000	3.000	2.000	4.000
	AR	3.444	2.909	2.341	2.000	2.753	2.000	2.678
SmD25 (AF202965)	Fis	-0.111	-0.143	-0.010	-0.500	0.403	-0.450	-0.135
	He	0.365	0.255	0.438	0.564	0.571	0.398	0.432
	Ho	0.366	0.273	0.510	0.923	0.383	0.431	0.481
	A	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000
	AR	2.804	2.905	2.896	2.954	2.977	2.195	2.959
	Fis	-0.003	-0.071	-0.164	-0.636	0.350	-0.084	-0.101
All	He	0.584	0.572	0.521	0.513	0.539	0.422	0.525
	Ho	0.582	0.579	0.498	0.670	0.521	0.440	0.548
	A	5.500	4.067	4.733	3.333	3.733	2.929	5.867
	AR	4.066	4.034	3.655	3.156	3.325	2.487	3.722
	Fis	0.003	-0.013	0.044	-0.307	0.035	-0.042	-0.047

2.8. Statistical analyses to follow-up the diversity indices, the parasite life trait, the rate of clones and the estimated effective population size in the course of generations

We observed the evolution of genetic diversity indices (expected heterozygosity: He and allelic richness: AR), of snail infectivity (parasite life trait), of rate of identical MLGs (i.e. rate of clones), and of estimated effective population size (i.e. Ne) in the course of generations. We used linear regression test, implemented in the GRAPH PAD software for Windows, in order to test the link between the genetic diversity indices (AR and He) and time (in days) and between the rate of clones and time (in days). We used logarithmic regression test, implemented in the SPSS 13.0 software for Windows, in order to test the link between the estimated effective population size (Ne) and time (in days). We used Fisher's exact tests, also implemented in the GRAPH PAD software for Windows, in order to test a variation in snail infectivity between field and laboratory generations.

### 3. Results

#### 3.1. Data analysis

##### 3.1.1. Marker validation and distribution of the genetic diversity

After Bonferroni correction and according to the method implemented in the Micro-Checker software, 8 on 90 tests exhibited null alleles but all were randomly distributed across loci and generations and did not become significant at a global level. Moreover, these null alleles did not affect Hardy–Weinberg expectancies. Departure from Hardy–Weinberg on all markers and all generations was not detected; no Fis value was significantly different from 0 ( $P$ -value threshold after Bonferroni correction,  $P=0.0006$ ). No evidence for linkage disequilibria was detected either ( $P$ -value threshold after Bonferroni correction,  $P=0.0005$ ). All microsatellite loci were polymorphic with an AR ranging from 1.940 to 7.614 and an He ranging from 0.211 to 0.828 by locus and over all generations (Table 1).

##### 3.1.2. Identical multilocus genotypes and rate of clones

Gencount software detected some identical multilocus genotypes which corresponded to the number of clones in the different generations (Table 1). We obtained 10% of clones for the field generation G0 and 17%, 20%, 25%, 31% and 46% of clones after 1, 2, 4, 5 and 9 passages through laboratory mice, respectively (Table 1).

##### 3.1.3. Estimated effective population size ( $N_e$ )

We obtained a  $N_e$  of 67 ( $IC^- = 25$ ,  $IC^+ = 250$ ) for the passage from field generation G0 to laboratory generation G1, a  $N_e$  of 36 ( $IC^- = 23$ ,  $IC^+ = 58$ ) for the passage from G1 to G2, a  $N_e$  of 36 ( $IC^- = 25$ ,  $IC^+ = 49$ ) for the passage from G2 to G4, a  $N_e$  of 29 ( $IC^- = 15$ ,  $IC^+ = 57$ ) for the passage from G4 to G5, and a  $N_e$  of 18 ( $IC^- = 15$ ,  $IC^+ = 24$ ) for the passage from G5 to G9.

#### 3.2. Genetic structuring

The genetic structuring analysis (based on 15 microsatellite markers and conducted during the three years of laboratory maintenance) showed a genetic structuring among the different generations. Pairwise  $F_{st}^{(ENA)}$  values (mean  $F_{st}^{(ENA)} = 0.062$ ) detected different genetic substructures within all generations (Table 2). The Principal Component Analysis seemed to reveal three generation groups. G0 and G1 constituted the first group, G2, G4 and G5 the second group and G9 formed, on its own, the third group. In this genetic pattern, G2, G4 and G5 could represent genetic intermediaries between two G0/G1 and G9 clusters. Thus, in the course of time, the distribution of genetic diversity changed until it became different from the initial genetic structuring. G9, which was the last analysed laboratory generation, appeared particularly more different from the other ones. Furthermore, Mantel test identified significant positive correlation ( $N=15$ ,  $ddl=14$ ,  $F=20.00$ ,  $r$  squared = 60.60%;  $P=0.0006$ ) between  $F_{st}^{(ENA)}$  values and time, indicating a strong 'isolation in the course of time' between generations (Fig. 1).

In all generations, from field generation G0 to laboratory generations G1 to G9, tests for heterozygosity excess revealed recent genetic bottleneck signals according to both IAM and TPM mutation models (Table 3).

Table 2

Pairwise  $F_{st}^{(ENA)}$  values for each generation comparison (below diagonal), and their significance level (above diagonal).  $P$ -value threshold is adjusted with the Bonferroni correction,  $P=0.00333$ . Stars indicate the level of significance.

	G0	G1	G2	G4	G5	G9
G0		0.1600	0.0033	0.0033	0.0033	0.0033
G1	0.0219		0.0033	0.0033	0.0033	0.0033
G2	0.0149*	0.0436*		0.0033	0.0033	0.0033
G4	0.0457*	0.0979*	0.0423*		0.0267	0.0033
G5	0.0341*	0.0822*	0.0330*	0.0078		0.0033
G9	0.1037*	0.1699*	0.0941*	0.0629*	0.0725*	

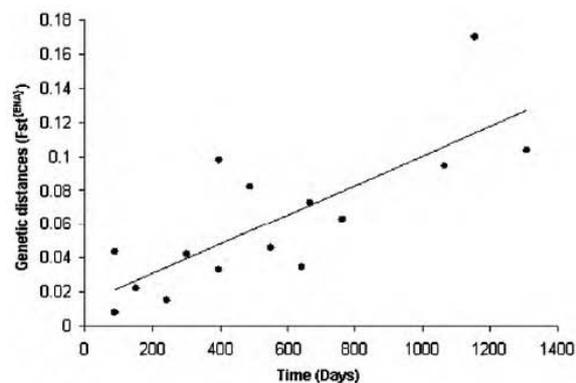


Fig. 1. Pairwise genetic differentiation ( $F_{st}^{ENA}$ ) plotted against time (in days) between generations.

Table 3

Results from BOTTLENECK software for the Wilcoxon signed ranks test which compares observed heterozygosity and expected heterozygosity according to Infinite Allele Model (IAM) and Two Phase Model (TPM). Tests are performed on each generations of *Schistosoma mansoni*.

Generations	Probability (Wilcoxon signed ranks test)		Sign of bottleneck
	IAM	TPM	
G0	0.00066	0.04163	Yes
G1	0.00168	0.02063	Yes
G2	0.00008	0.00107	Yes
G4	0.00011	0.00168	Yes
G5	0.00021	0.00134	Yes
G9	0.00084	0.01279	Yes

### 3.3. Follow-up of diversity indices, parasite life trait, rate of clones and estimated effective population size ( $N_e$ ) in the course of time (Figs. 2 and 3)

In the course of generations, the parasite genetic diversity indices, the snail infectivity, the rate of clones and the  $N_e$  evolved. Linear regression test showed a significant loss of genetic diversity with time: decrease in expected heterozygosity and allelic richness were correlated to the number of generations or days ( $N=6$ ,  $F=26.14$ ,  $r$  squared = 86.73%,  $P=0.0069$  for heterozygosity and  $N=6$ ,  $F=73.14$ ,  $r$  squared = 94.81%,  $P=0.0010$  for allelic richness) (Fig. 2). Concerning the parasite life trait, we obtained 96% of snail infectivity for the field generation G0 and 38%, 30%, 41%, 39% and 38% of snail infectivity after 1, 2, 4, 5 and 9 passages through laboratory mice, respectively. Significant differences in snail infectivity were detected between the field generation G0 and the first laboratory generations G1 (Fisher's exact tests between G0 and all the laboratory generations,  $P$ -values < 0.0020). In contrast, no significant variation of infectivity was detected between laboratory generations (Fisher's exact tests between all the laboratory generations,  $P$ -values > 0.05) (Fig. 2). In parallel, linear regression test showed a significant increase in rate of clones with time: rate of identical MLGs were correlated to the number of generations or days ( $N=6$ ,  $F=220.08$ ,  $r$  squared = 98.21%,  $P=0.0001$ ) (Fig. 3). Logarithmic regression test showed a significant loss of  $N_e$  with time ( $F=12.40$ ,  $r$  squared = 89.68%,  $P=0.0390$ ) (Fig. 3).

## 4. Discussion

To our knowledge, this is the first study which compares the evolution of genetic diversity on a parasite strain of *S. mansoni* from

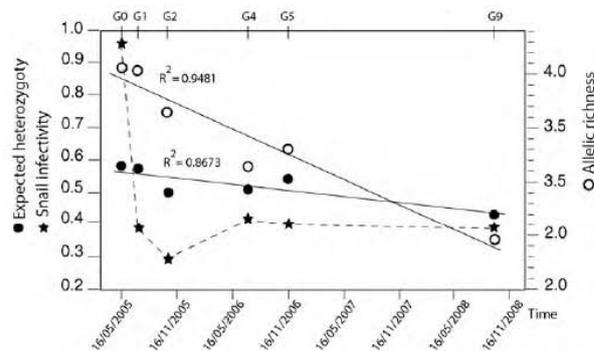


Fig. 2. Loss of genetic diversity indices and snail infectivity with time. The two diversity indices, allelic richness with white circles and expected heterozygosity with black circles, decrease with the time, over the course of the generations. In the course of time, variation in snail infectivity with black stars is detected between the field generation G0 and the laboratory generations G1 to G9.

field founder isolates to nine laboratory generations and concomitantly infectivity to its snail intermediate host *B. glabrata*. Our analyses show a significant increase in identical multilocus genotypes (number of clones) and a significant logarithmic decrease in the estimated effective population size ( $N_e$ ) in the course of generations. Molecular analyses reveal a significant decrease of genetic diversity indices (AR and  $H_e$ ) in the course of generations and finally different genetic substructures among all laboratory generations. Significant differences in allelic frequencies appear between generations (results not shown) with some allelic frequencies decreasing and reaching almost zero (see Supplementary Table). Thus, results seem to reveal three generation groups. G0 and G1 constitute the first group, G2, G4 and G5 the second and intermediary group and G9 forms, on its own, the third group.

What it is interesting is the fact that the loss of genetic diversity occurred gradually from the field isolate to the last laboratory generation analysed. We did not observe a sharp reduction when ongoing from the field to the first lab generation. This should indicate that, in the conditions under which the strain was established (i.e. from 46 infected snails previously exposed to 10 miracidia), the founder effect had limited consequences and both the reduction of genetic diversity and the associated increase of number of parasite clones and decrease of estimated effective size ( $N_e$ ) should mainly be the results of repeated bottleneck events during laboratory maintenance. Moreover, we may also expect that potential selection pressures exerted by the rodent experi-

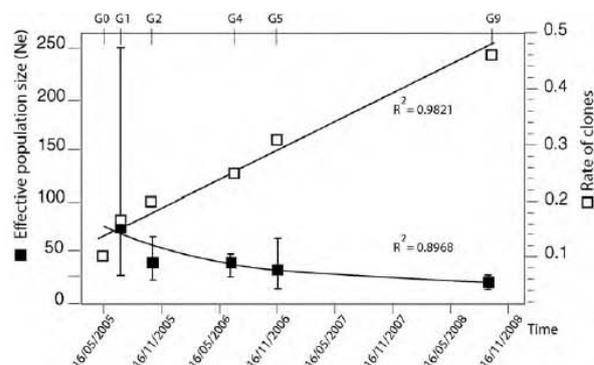


Fig. 3. Loss of estimated effective size ( $N_e$ ) with black squares and increase in rate of clones (identical MLGs/ $N$ ) with white squares with time (in day).

mental host (Bremond et al., 1993; Loverde et al., 1985) were limited in our case due to the murine origin of the wild population of schistosomes.

Concerning the evolution of the life history trait, our results show a sharp decrease in compatibility between the field population of snails and parasites, and the laboratory ones. Snail infectivity dropped from 96% in G0 to 38% in G1 and then remained relatively constant between 30% and 41% during the successive laboratory generations.

As regards as the loss of compatibility, these results are similar to those of Théron et al. (2008), showing a massive drop in compatibility during the passage from field to laboratory. To explain such a loss of compatibility, the authors emphasised that the founder effect may cause a random loss of alleles at polymorphic loci that control compatibility through the matched/mismatched status of the host and parasite genotypes as in a matching-alleles model (Agrawal and Lively, 2003; Théron and Coustau, 2005). Under this condition, a proportion of individuals within the snail strain would not be matched by the reduced number of parasite genotypes contained within the genetically depauperate laboratory strain.

Concerning the fact that in the course of laboratory generations, snail infectivity remained stable despite repeated bottlenecks at each maintenance cycle, it is more intriguing. Some hypotheses could be proposed: (1) the measured life trait (snail infectivity) could not be sufficiently sensitive to test the link between genetic diversity loss and fitness decrease; (2) the obtained range of genetic diversity loss was not high enough to observe an evolution in life traits; and/or (3) a substantial level of compatibility polymorphism was maintained independently of the decrease of neutral genetic diversity. This last phenomenon could be linked to recently described genomic mechanisms able to generate high diversification in molecules potentially implicated in the compatibility between *S. mansoni* and *B. glabrata*. Indeed, Roger et al. (2008) have demonstrated that in *S. mansoni*, a complex hierarchical system has evolved, generating high polymorphism in antigenic molecules (SmPoMucs) through somatic recombinatorial processes and differential expression mechanisms (Roger et al., 2008). In this way, each miracidium expressed a unique combination of SmPoMucs derived from a limited set of genes. Similar mechanisms of diversification through somatic recombination have been previously described for fibrinogen related proteins (FREPS) of *B. glabrata* that participate to the innate immune response of the snail (Zhang et al., 2004).

We showed that neutral DNA and functional markers may have different ways of evolution. Whatever the way of evolution, the parasite neutral genetic diversity and the compatibility (snail infectivity) decrease in the course of laboratory passages. These decreases, associated to an increase in rate of clones and a decrease of estimated effective size ( $N_e$ ), could be the result of the selection process through the snail host and/or of bottlenecks during laboratory strains' maintenance (resulting from the associated techniques of laboratory maintenance). This element and the number of laboratory passages used have to be taken into account in the future study using laboratory parasite isolates. The population genetic analyses and other studies testing resistance to drugs for example have to use first laboratory passages and not more if they aim to reflect a reality in field parasite populations. In parallel, when it is possible, the bottlenecks resulting from the techniques of laboratory maintenance has to be limited. Finally, integration of population, molecular and functional approaches may be of particular interest to elucidate complex interactions such as in *B. glabrata*/*S. mansoni* compatibility polymorphism.

#### Acknowledgements

We wish to thank Cécile Perrin, Corentin Barbu and Juliette Langand for their constructive comments and their assistance on

analyses, Bernard Dejean for technical assistance and Joan Straub for editing the English of the manuscript. This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the CNRS, and the Agence Nationale de la Recherche (Program Monogamix ANR-08-BLAN-0214-02 and Biomgenim ANR-07-BLAN-0214-03).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.meegid.2010.06.012.

#### References

- Agola, L.E., Steinauer, M.L., Mburu, D.N., Mungai, B.N., Mwangi, I.N., Magoma, G.N., Loker, E.S., Mkoji, G.M., 2009. Genetic diversity and population structure of *Schistosoma mansoni* within human infrapopulations in Mwea, central Kenya assessed by microsatellite markers. *Acta Trop.* 111, 219–225.
- Agrawal, A.F., Lively, C.M., 2003. Modelling infection as a two-step process combining gene-for-gene and matching-allele genetics. *Proc. R. Soc. B – Biol.* 270, 323–334.
- Anderson, E.C., Williamson, E.G., Thompson, E.A., 2000. Monte Carlo evaluation of the likelihood for  $N_e$  from temporally spaced samples. *Genetics* 156, 2109–2118.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 1996. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Beltran, S., Galinier, R., Allienne, J.F., Boissier, J., 2008. Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 501–503.
- Bergquist, N.R., Leonardo, L.R., Mitchell, G.F., 2005. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? *Trends Parasitol.* 21, 112–117.
- Blair, L., Webster, J.P., Barker, G.C., 2001. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Schistosoma mansoni* from Africa. *Mol. Ecol. Notes* 1, 93–95.
- Boissier, J., Moné, H., 2000. Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology* 121, 379–383.
- Bremond, P., Pasteur, N., Combes, C., Renaud, F., Théron, A., 1993. Experimental host-induced selection in *Schistosoma mansoni* strains from Guadeloupe and comparison with natural observations. *Heredity* 70, 33–37.
- Chapuis, M.P., Estoup, A., 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24, 621–631.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli, L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* 77, 41–51.
- Cornuet, J.M., Luikart, G., 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001–2014.
- Crompton, D.W.T., 1999. How much human helminthiasis is there in the world? *J. Parasitol.* 85, 397–403.
- Curtis, J., Sorensen, R.E., Kristen Page, L., Minchella, D.J., 2001. Microsatellite loci in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and their utility for other schistosome species. *Mol. Ecol. Notes* 1, 143–145.
- Curtis, J., Sorensen, R.E., Minchella, D.J., 2002. Schistosome genetic diversity: the implications of population structure as detected with microsatellite markers. *Parasitology* 125, S51–S59.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B., 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3166–3170.
- Durand, P., Sire, C., Théron, A., 2000. Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe island. *Mol. Ecol.* 9, 997–998.
- Duvall, R.H., DeWitt, W.B., 1967. An improved perfusion technique for recovering adult Schistosomes from laboratory animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16, 483–486.
- Ellegren, H., 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.* 16, 551–558.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.M., 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol. Ecol.* 11, 1591–1604.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html>.
- Jarne, P., Théron, A., 2001. Genetic structure in natural populations of flukes and snails: a practical approach and review. *Parasitology* 123, S27–S40.
- Kimura, M., Crow, J.F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49, 725–738.
- Kimura, M., Ohta, T., 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2868–2872.

## Author's personal copy

N. Bech et al./Infection, Genetics and Evolution 10 (2010) 1039–1045

1045

- Loverde, P.T., De Wald, J., Minchella, D.J., Bosshardt, S.C., Damian, R.T., 1985. Evidence for host-induced selection in *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 71, 297–301.
- McManus, D., Loukas, A., 2008. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 225–242.
- Oosterhout, C.V., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol.* 4, 535–538.
- Pearce, E.J., 2003. Progress towards a vaccine for schistosomiasis. *Acta Trop.* 86, 309–313.
- Pinto, P.M., Brito, C.F., Passos, L.K., Tendler, M., Simpson, A.J., 1997. Contrasting genomic variability between clones from field isolates and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 409–414.
- Rodrigues, N.B., Coura Filho, P., de Souza, C.P., Jannoti Passos, L.K., Dias-Neto, E., Romanha, A.J., 2002a. Populational structure of *Schistosoma mansoni* assessed by DNA microsatellites. *Int. J. Parasitol.* 32, 843–851.
- Rodrigues, N.B., Loverde, P.T., Romanha, A.J., Oliveira, G., 2002b. Characterization of new *Schistosoma mansoni* microsatellite loci in sequences obtained from public DNA databases and microsatellite enriched genomic libraries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 71–75.
- Rodrigues, N.B., Silvia, M.R., Pucci, M.M., Minchella, D.J., Sorensen, R., Loverde, P.T., Romanha, A.J., Oliveira, G., 2007. Microsatellite-enriched genomic libraries as a source of polymorphic loci for *Schistosoma mansoni*. *Mol. Ecol. Notes* 7, 263–265.
- Roger, E., Grunau, C., Pierce, R.J., Hirai, H., Gourbal, B., Galinier, R., Emans, R., Cesari, I.M., Cosseau, C., Mita, G., 2008. Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e330.
- Rollinson, D., Webster, J.P., Webster, B., Nyakaana, S., Jorgensen, A., Stothard, J.R., 2009. Genetic diversity of schistosomes and snails: implications for control. *Parasitology* 1–11.
- Shrivastava, J., Gower, C.M., Balolong, E.J., Wang, T.P., Qian, B.Z., Webster, J.P., 2005. Population genetics of multi-host parasites—the case for molecular epidemiological studies of *Schistosoma japonicum* using larval stages from naturally infected hosts. *Parasitology* 131, 617–626.
- Sire, C., Durand, P., Pointier, J.P., Théron, A., 1999. Genetic diversity and recruitment pattern of *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* snail population: a field study using random-amplified polymorphic DNA markers. *J. Parasitol.* 85, 436–441.
- Sire, C., Durand, P., Pointier, J.P., Théron, A., 2001. Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* within and among individual hosts (*Rattus rattus*): infrapopulation differentiation at microspatial scale. *Int. J. Parasitol.* 31, 1609–1616.
- Sorensen, R.E., Rodrigues, N.B., Oliveira, G., Romanha, A.J., Minchella, D.J., 2006. Genetic filtering and optimal sampling of *Schistosoma mansoni* populations. *Parasitology* 133, 443–451.
- Steinauer, M.L., Agola, L.E., Mwangi, I.N., Mkoji, G.M., Loker, E.S., 2008. Molecular epidemiology of *Schistosoma mansoni*: a robust, high-throughput method to assess multiple microsatellite markers from individual miracidia. *Infect. Genet. Evol.* 8, 68–73.
- Steinauer, M.L., Hanelt, B., Agola, L.E., Mkoji, G.M., Loker, E.S., 2009. Genetic structure of *Schistosoma mansoni* in western Kenya: The effects of geography and host sharing. *Int. J. Parasitol.* 39, 1353–1362.
- Stohler, R.A., Curtis, J., Minchella, D.J., 2004. A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 34, 595–601.
- Théron, A., Coustau, C., 2005. Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *J. Helminthol.* 79, 187–191.
- Théron, A., Coustau, C., Rognon, A., Gourbiere, S., Blouin, M.S., 2008. Effects of laboratory culture on compatibility between snails and schistosomes. *Parasitology* 135, 1179–1188.
- Théron, A., Pointier, J.P., 1995. Ecology, dynamics, genetics and divergence of trematode populations in heterogeneous environments: the model of *Schistosoma mansoni* in the insular focus of Guadeloupe. *Res. Rev. Parasitol.* 55, 49–64.
- Théron, A., Sire, C., Rognon, A., Prugnolle, F., Durand, P., 2004. Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology* 129, 571–585.
- Zhang, S.M., Adema, C.M., Kepler, T.B., Loker, E.S., 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science* 305, 251–254.

## BIBLIOGRAPHIE

- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 613-622.
- Arlettaz R, Patthey P, Baltic M, Leu T, Schaub M, Palme R, Jenni-Eiermann S (2007) Spreading free-riding snow sports represent a novel serious threat for wildlife. *Proceedings of the Royal Society B* **274**, 1219-1224.
- Bàldi A, Farago S (2007) Long-term changes of farmland game populations in a post-socialist country (Hungary). *Agriculture, Ecosystems and Environment* **118**, 307-311.
- Bantock TM, Prys-Jones RP, Lee PLM (2008) New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens. *Molecular Ecology Resources* **8**, 519-528.
- Baratti M, Ammannati M, Magnelli C, Dessi-Fulgheri F (2004) Introgression of *chukar* genes into a reintroduced red-legged partridge (*Alectoris rufa*) population in central Italy. *Animal Genetics* **36**, 29-35.
- Barilani M, Bernard-Laurent A, Mucci N, Tabarroni C, Kark S, Perez Garrido JA, Randi E (2007a) Hybridisation with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A. graeca*) and red-legged (*A. rufa*) partridge populations. *Biological Conservation* **137**, 57-69.
- Barilani M, Sfougaris A, Giannakopoulos A, Mucci N, Tabarroni C, Randi E (2007b) Detecting introgressive hybridisation in rock partridge populations (*Alectoris graeca*) in Greece through Bayesian admixture analyses of multilocus genotypes. *Conservation Genetics* **8**, 343-354.
- Barnekow L (1999) Holocene tree-line dynamics and inferred climatic changes in the Abisko area, northern Sweden, based on macrofossil and pollen records. *The Holocene* **9**, 253-265.
- Barnett C, Dumayne-Peaty L, Matthews JA (2001) Holocene climatic change and tree-line response in Leirdalen, central Jotunheimen, south central Norway. *Review of Palaeobotany and Palynology* **117**, 119-137.
- Barrios L, Rodriguez A (2004) Behavioural and environmental correlates of soaring-bird mortality at on-shore wind turbines. *Journal of applied ecology* **41**, 72-81.
- Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* **10**, 551-568.
- Beaumont MA, Rannala B (2004) The bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews Genetics* **5**, 251-261.
- Bech N (2005) Développement de techniques non invasives pour l'étude du Lagopède alpin *Lagopus mutus pyrenaicus*. *mémoire Université de Perpignan*, 29p.
- Bech N, Boissier J, Drovetski S, Novoa C (2009) Population genetic structure of rock ptarmigan in the 'sky islands' of French Pyrenees: implications for conservation. *Animal Conservation* **12**, 138-146.
- Bech N, Novoa C, Allienne JF, Boissier J (2010) Transferability of microsatellite markers among economically and ecologically important galliform birds. *Genetics and Molecular Research* **9**, 1121-1129.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France)*.
- Beltran S, Cézilly F, Boissier J (2008) Genetic dissimilarity between mates, but not male heterozygosity, influences divorce in schistosomes. *PLoS ONE* **3**, e3328. doi:3310.1371/journal.pone.0003328.
- Bernard-Laurent A, Brenot JF, Corti R, Desmet JF, Ellison L, Morscheidt J (2002) Le lagopède alpin. *publications ONCFS n°29*, 32p.
- Besnard A, Novoa C, Gimenez O (2010) Hunting impact on the population dynamics of Pyrenean grey partridge *Perdix perdix hispaniensis*. *Wildlife biology*. **16**, 135-143.

- Bevanger K, Broseth H (2001) Birds collisions with power lines - an experiment with ptarmigan (*Lagopus spp.*). *Biological Conservation* **99**, 341-346.
- Birkan M (1971) Réussite des lâchers de perdrix grise (*Perdix perdix*) et de perdrix rouge (*Alectoris rufa*) d'élevage. *Bulletin du Conseil Supérieur de la Chasse* **15** 44-56.
- Birkan M, Jacob M (1988) La perdrix grise. (ed Hatier), p.284. Paris.
- Blanc P, Ledème P, blanc C-P (1986) variation géographique de la diversité génétique chez la perdrix grise (*Perdix perdix*). *Gibier Faune Sauvage* **3**, 5-41.
- Blondel J (1986) Biogéographie évolutive. *Masson, Paris*, 221 pages.
- Blondel J (1995) Biogéographie. Approche écologique et évolutive. *Masson, Paris*.
- Bouzat JL, Cheng HH, Lewin HA, Westemeier RL, Brawn JD, Paige KN (1998) Genetic evaluation of a demographic bottleneck in the greater prairie chicken. *Conservation Biology* **12**, 836-843.
- Bradley RS, Keimig FT, Diaz HF (2004) Projected temperature changes along the American cordillera and the planned GCOS network. *Geophysical research letters* **31**, L17701.
- Bro E, Guyon J, Delettre Y, Reitz F, Burel F (2008) Risque de prédation et structure de l'habitat: perdrix, rapaces et carnivores. *faune sauvage* **281**, 24-31.
- Bro E, Reitz F, Clobert J, Migot P, Massot M (2001) Diagnosing the environmental causes of the decline in Grey Partridge *Perdix perdix* survival in France. *Ibis* **143**, 120-132.
- Bro E, Reitz F, Mayot P, Landry P (2006) Conservation de la Perdrix grise: la France au premier rang. Bilan des 10 dernières années de suivi des populations. *faune sauvage* **272**, 22-30.
- Bro E, Reitz F, Mayot P, Migot P (1999) Environmental correlates of the demographic pattern of declining populations of grey partridge (*Perdix perdix*) in France. *Hungarian small game bulletin* **5**, 241-256.
- Bro E, Reitz F, Mayot P, Millot F (2009) La perdrix grise: état des lieux et outils de gestion. *faune sauvage* n°**286**, 18-24.
- Bureau L (1905) La perdrix des Pyrénées, *Perdix perdix charrela lopez Seoane*. *Proc. IV Int. Orn. Congr.*, 494-512.
- Butlin RK, Hewitt GM (1985) A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): behavioural characters. *Biological Journal of the Linnean Society* **26**, 287-299.
- Caizergues A, Bernard-Laurent A, Brenot JF, Ellison L, Rasplus JY (2003a) Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in Northern and Western Europe. *Molecular Ecology* **12**, 2267-2274.
- Caizergues A, Dubois S, Loiseau A, Mondor G, Rasplus JY (2001a) Isolation and characterization of microsatellite loci in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology Notes* **1**, 36-38.
- Caizergues A, Dubois S, Mondor G, Loiseau A, Ellison L, Rasplus JY (2001b) Genetic structure of Black Grouse (*Tetrao tetrix*) populations of the French Alps. *Genetic Selection Evolution* **33 (Suppl. 1)**, S177-S191.
- Caizergues A, Ellison LN (2002) Natal dispersal and its consequences in Black Grouse (*Tetrao tetrix*). *Ibis* **144**, 478-487.
- Caizergues A, Rätti O, Helle P, Rotelis L, Ellison L, Rasplus JY (2003b) Population genetic structure of male black grouse (*Tetrao tetrix*) in fragmented vs. continuous landscapes. *Molecular Ecology* **12**, 2297-2305.
- Cassar S (2007) Organisation spatiale de la variabilité génétique et phénotypique à l'échelle du paysage : le cas du chamois et du chevreuil en milieu de montagne. *PhD thesis Université de Lyon*.
- Chamberlain DE, Fuller RJ, Bunce RGH, Duckworth JC, Shrubbs M (2000) Changes in the abundance of farmland birds in relation to the timing of agricultural intensification in England and Wales. *Journal of applied ecology* **37**, 771-788.
- Chazara O, Lumineau S, Minvielle F, Roux D, Fève K, Kayang B, Boutin JM, Vignal A, Coville JL, Rognon X (2006) Etude des risques d'introgession génétique de la caille des blés

- (*Coturnix coturnix coturnix*) par la caille japonaise (*C. c. japonica*): comparaison et intégration des données comportementales et moléculaires obtenues dans le sud-est de la France *Les Actes du BRG* **6**, 317-334.
- Chen C, Durand E, Forbes F, François O (2007) Bayesian Clustering Algorithms Ascertain Spatial Population Structure: A New Computer Program and a Comparison Study. *Molecular Ecology Notes* **7**, 747-756.
- Cheng HH, Crittenden LB (1994) Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *poultry science* **73**, 539-546.
- Connelly JW (1997) Prairie grouse translocations in North America: a viable management alternative? *Grouse news* **14**, 7-11.
- 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.
- Craul M, L. C, Sousa V, Olivieri GL, Rabesandratana A, Zimmermann E, Radespiel U (2009) Influence of forest fragmentation on an endangered large-bodied lemur in northwestern Madagascar. *biological conservation* **142**, 2862-2871.
- Dawson DA, Darby S, Hunter FM, Krupa AP, Jones IL, Burke T (2001) A critique of avian *CHD*-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. *Molecular Ecology Notes* **1**, 201-204.
- Del Barrio G, Creus J, Puigdefabregas J (1990) Thermal seasonality of the high mountain belts of the Pyrenees. *Mountain Research and Development* **10**, 227-233.
- Desholm M (2009) Avian sensitivity to mortality: Prioritising migratory bird species for assessment at proposed wind farms. *Journal of Environmental Management* **90**, 2672-2679.
- Desmet JF, Muffat-Joly B, Arvin-Berod M, Brenot JF, Sentilles J, Novoa C, Miquet A (2005) Seasonal movements and attachment to winter and breeding sites of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in the Northern Alps and the Pyrenees. *10th International Grouse Symposium, Luchon, France, abstracts-Posters:18-19*.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3166-3170.
- Dias PC, Verheyen GR, Raymond M (1996) Source-sink populations in mediterranean Blue tits: evidence using single-locus minisatellite probes. *Journal of evolution biology* **9**, 965-978.
- Dimcheff DE, Drovetski SV, Mindell DP (2002) Phylogeny of tetraoninae and other galliform birds using mitochondrial 12S and ND2 genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **24**, 203-215.
- Dytham C (2008) Evolved dispersal strategies at range margins. *Proceedings of the Royal society B* **276**, 1407-1413.
- Effenberger S, Suchentrunk F (1999) Population genetics of grey partridge (*Perdix perdix*) in Austria-preliminary results. *Hungarian small game bulletin* **5**, 179-181.
- Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet* **16**, 551-558.
- Ellegren H, Primmer CR, Sheldon B (1995) Microsatellite evolution: directionality or bias in locus selection? *Nature genetics* **11**, 60-62.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol Ecol* **11**, 1591-1604.
- 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.
- Ferrero ME, Gonzàles-Jara P, Blanco-Aguilar JA, Sánchez-Barbudo I, Dàvila JA (2007) Sixteen new polymorphic microsatellite markers isolated for red-legged partridge (*Alectoris rufa*) and related species. *Molecular Ecology Notes* **7**, 1349-1351.
- Foerster K, Delhey K, Johnsen A, Lifjeld JT, Kempenaers B (2003) Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings. *Nature* **425**, 714-717.

- Frankham R, Ballou J, Briscoe D (2002) Introduction to Conservation Genetics. *Cambridge: Cambridge University Press*.
- Fridolfsson AK, Ellegren H (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* **30**, 116-121.
- Galop D (1989) laforêt, l'homme et le troupeau dans les Pyrénées. 6000 ans d'histoire de l'environnement entre Garonne et Méditerranée. *Thèse de l'Université de Toulouse*
- Galop D, Cugny C, Rius D (2008) Rythmes et rupture dans l'histoire de l'anthropisation du massif pyrénéen à partir des données polliniques. *Pyrénées d'hier et d'aujourd'hui édition atlantica*, 181-190.
- Giesen KM, Braun CE (1992) Winter home range and habitat characteristics of white-tailed Ptarmigan in Colorado. *Wilson bulletin* **104**, 263-272.
- Giesen KM, Braun CE (1993) Natal dispersal and recruitment of juvenile white-tailed Ptarmigan in Colorado. *Journal of wildlife Management* **57**, 72-77.
- Godfrey M, Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography-or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**, 537-549.
- Gomez-Moliner BJ (2007) caracterizacion de las poblaciones de perdiz pardilla dal pirineo catalan mediante el analisis de ADN mitochondrial. *rapport de stage*.
- Gonzales EG, Castilla AM, Zardoya R (2005) Novel polymorphic microsatellites for the red-legged partridge (*Alectoris rufa*) and cross-species amplification in *Alectoris graeca*. *Molecular Ecology Notes* **5**, 449-451.
- Gonzalez G, Novoa C (1989) Partage de l'espace entre le lagopède *Lagopus mutus pyrenicus* et le perdrix grise *Perdix perdix hispaniensis* dans les massif du Carlit (Pyrénées Orientales) en fonction de l'altitude et de l'exposition. *la Revue d'écologie (La Terre et la Vie)* **44**, 347-360.
- Goosens B, Chikhi L, Utami SS, Ruiter Jd, W.Brudford M (2000) A multi-samples, multi-extracts approach for microsatellite analysis of faecal samples in an arboreal ape. *Conservation genetics* **1**, 157-162.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html>.
- Grace J, Berninger F, Nagy L (2002) Impacts of Climate Change on the Tree Line. *Annals of Botany* **90**, 537-544.
- Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG (1998) A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* **7**, 1071-1075.
- Griffiths R, Korn RM (1997) A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene* **197**, 225-229.
- Guillot G (2009) Response to comment on 'On the inference of spatial structure from population genetics data using Tess program'. *Bioinformatics Advance Access published*, 1-2.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) Geneland: A program for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* **5**, 712-715.
- Guitart SS, Cassaing J (2000) Suivis de perdrix grises (*Perdix perdix*) d'élevage utilisées pour le renforcement de populations de montagne de *P.p. hispaniensis*. *vie et milieu* **50**, 39-43.
- Hansen J, Sato M, Ruedy R, Lo K, Lea DW, Medina-Elizade M (2006) Global temperature change. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14288-14293.
- Henry JP, Gouyon PH (2003) Précis de génétique des populations. *Dunod*, 186.
- Hey J, Nielsen R (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* **167**, 747-760.
- Holder K, Mongomerie R, Friensen VL (2000) Glacial vicariance and historical biogeography of rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) in the bering region. *Molecular Ecology* **9**, 1265-1278.
- Holder K, Montgomerie R, Friensen VL (2004) Genetic diversity and management of nearctic rock ptarmigan (*Lagopus mutus*). *Canadian Journal of Zoology* **82**, 564-575.

- Holder K, Montgomerie R, Friesen VL (1999) A test of the glacial refugium hypothesis using patterns of mitochondrial and nuclear DNA sequence variation in Rock Ptarmigan (*Lagopus mutus*). *Evolution* **53**(6), 1936-1950.
- Johnson GD, Erickson WP, Strickland MD, Shepherd MF, Shepherd DA, Sarappo SA (2002) Collision mortality of local and migrant birds at a large-scale wind-power development on Buffalo Ridge, Minnesota. *Wildlife Society Bulletin* **30**, 879-887.
- Jump AS, Penuelas J (2005) Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters* **8**, 1010-1020.
- Kaler RSA (2007) Demography, habitat use and movements of a recently reintroduced island population of evermann's rock ptarmigan. *PhD thesis Kansas state university* **67 pages**.
- Kaler RSA, Ebbeert SE, Braun CE, Sandercock BK (2010) Demography of a reintroduced population of evermann's rock ptarmigan in the Aleutian Island. *The Wilson journal of ornithology* **122**, 1-14.
- Kimbal RT, Braun EL, Zwartjes PW, Crowe TM, Ligon JD (1999) A Molecular Phylogeny of the Pheasants and Partridges Suggests that These Lineages Are Not Monophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **11**, 38-54.
- Kimura M, Crow JF (1964) The Number of Alleles That Can Be Maintained in a Finite Population. *Genetics* **49**, 725-738.
- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2868-2872.
- Korner C, Paulsen J (2004) A world-wide study of high altitude treeline temperatures. *Journal of Biogeography* **31**, 713-732.
- Krajick K (2004) Climate change. All downhill from here? *Science* **303**, 1600-1602.
- Kremenetski KV, Boettger T, MacDonald GM, Vaschalova T, Sulerzhitsky L, Hiller A (2004) Medieval climate warming and aridity as indicated by multiproxy evidence from the Kola Peninsula, Russia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **209**, 113-125.
- Kuijper DPJ, Oosterveld E, Wymenga E (2009) Decline and potential recovery of the European grey partridge (*Perdix perdix*) population-a review. *European Journal of Wildlife Research* **55**, 455-463.
- Lenoir J, Gégout JC, Marquet PA, de Ruffray P, Brosse H (2008) A significant upward shift in plant species optimum elevation during the 20th century. *Science* **320**, 1768-1771.
- Lescourret F (1986) La perdrix grise des Pyrénées (*Perdix p. hispaniensis* Reich.) : répartition, habitats et caractères morphologiques au versant français de la chaîne. *Rapport interne Office National de la Chasse*, 75p.
- Lescourret F (1988) Eléments de répartition de la perdrix grise (*Perdix perdix hispaniensis* Reich) dans les Pyrénées françaises. *Gibier Faune Sauvage* **5**, 123-148.
- Lescourret F, Birkan M, Novoa C (1987) Aspects particuliers de la morphologie de la perdrix grise des Pyrénées, *Perdix perdix hispaniensis* R., et comparaison avec la perdrix grise de Beauce, apparentée à *Perdix perdix perdix* L. *Gibier Faune Sauvage*, 49-66.
- Lescourret F, Catusse M (1987) Que sait-on aujourd'hui sur la perdrix grise des Pyrénées. (*Perdix perdix hispaniensis*, Reichenow 1892) ? . *Bulletin mensuel Office national de la Chasse* **116**, 30-37.
- Liukkonen-Anttila T, Uimaniemi L, Orell M, Lumme J (2002) Mitochondrial DNA variation and the phylogeography of the grey partridge (*Perdix perdix*) in Europe: from Pleistocene history to present day populations. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 971-982.
- MacDonald GM, Kremenetski KV, Beilman DW (2008) Climate change and the northern Russian treeline zone. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 2285-2299.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* **4**, 189-197.
- Martin JF, Novoa C, Blanc-Manel S, Taberlet P (2003) Les populations de perdrix grise des Pyrénées (*Perdix perdix hispaniensis*) ont-elles subi une introgression génétique à partir

- d'individus d'élevage? Analyse du polymorphisme de l'ADN mitochondrial. *Les Actes du Bureau des Ressources Génétiques* **4**, 115-126.
- Mautner S (2001) Genetic variability, inbreeding risk and fertility in the grey partridge (*Perdix Perdix*). *PhD thesis Vienna university*.
- Mayot P, Baron Y, Malécot M, Meunier C, Niot D, Nouailles F, Peltier D, Pindon G, Bro E, Reitz F (2004) Impact des couverts faunistiques sur la perdrix grise en plaine de grandes cultures. Résultats d'expérimentations menées en région Centre. *faune sauvage* **262**, 33-41.
- McCarty JP (2001) Ecological consequences of recent climate change. *Conservation Biology* **15**, 320-331.
- Ménoni E, Defos du Rau P, Blanc P (2006) Extension des domaines skiables et grand tétras: l'expertise ONCFS. *Rapport scientifique de l'ONCFS*, 10-16.
- Menotti-Raymond M, O'Brien SJ (1993) Dating the genetic bottleneck of the African cheetah. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **15**, 3172-3176.
- Miller MP (2005) Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic information. *Journal of Heredity* **96**, 722-724.
- Miquet A, Deana T (2002) Sur des destructions de nids de Lagopède alpin *Lagopus mutus* dues aux ongulés domestiques *Alauda* **70**, 345-346.
- Moss R, Storch I, Müller M (2010) trends in grouse research. *wildlife biology* **16**, 1-11.
- Moss R, Watson A (1984) maternal nutrition, egg quality and breeding success of Scottish Ptarmigan *Lagopus mutus*. *Ibis* **126**, 212-220.
- Negro M, Isaia M, Palestini C, Rolando A (2009) The impact of forest ski-pistes on diversity of ground-dwelling arthropods and small mammals in the Alps. *Biodiversity and Conservation* **18**, 2799-2821.
- Nielsen EE, Bach LA, Kotlicki P (2006) HYBRIDLAB (version 1.0): a program for generating simulated hybrids from population samples. *Molecular Ecology Notes* **6**, 971-973.
- Nogués-Bravo D, Araujo MB, Lasanta T, Lopez Moreno JI (2008) Climate change in mediterranean mountains during the 21st century. *Ambio* **37**, 280-285.
- Nogués-Bravo D, B. AM, Errea MP, Martinez-Rica JP (2007) Exposure of global mountain systems to climate warming during the 21st Century. *Global Environmental Change* **17**.
- Novoa C (1998) La perdrix grise dans les Pyrénées-orientales. Utilisation de l'habitat, élément de démographie, incidence des brûlages dirigés. *PhD thesis Université de Paris 6*, 200 pages.
- Novoa C (2002) Upland habitat use by Pyrenean grey partridges *Perdix perdix hispaniensis* during the breeding season. *Wildlife Biology* **8**, 99-108.
- Novoa C, Besnard A, Brenot JF, Ellison L (2008) Effect of weather on the reproductive rate of rock Ptarmigan *Lagopus muta* in the eastern Pyrenees. *Ibis* **150**, 270-278.
- Novoa C, Brenot JF, Thillet D, Sentilles J, Ellison LN (2003) Are temperature-loggers useful for studying nest disturbance in Rock ptarmigan *Lagopus mutus*? *Avocetta* **27**, 187-192.
- Novoa C, Desmet JF, Brenot JF, Muffat-Joly B, Arvin-Berod M, Resseguier J, Tran B (2010) Demographic traits of rock ptarmigan in the french Alps and Pyrenees. *Studies in Avian Biology* **in press**.
- Novoa C, Ellison L, Desmet JF, Miquet A, Sentilles J, Sarrazin F (2005) Lagopède Alpin : Démographie et impact des activités humaines. *rapport scientifique*, 52.
- Novoa C, Gonzalez G (1988) Comparaison des biotopes sélectionnés par le lagopède alpin (*Lagopus mutus*) et la perdrix grise des pyrénées (*Perdix perdix hispaniensis*) sur le massif du Carlit (Pyrénées Orientales). *Gibier Faune Sauvage* **5**, 187-202.
- O.N.C. (1988) La perdrix grise de montagne. *Notes techniques. Fiche n°46. Supplément du bulletin mensuel de l'Office National de la Chasse n°124*, 6 p.
- OGM (2006) Percussion des oiseaux dans les câbles aériens des domaines skiables. *Zoom n°4, Sevrier, France*.

- Ohlemuller R, Anderson BJ, Araujo MB, Butchart SH, Kudrna O, Ridgely RS, Thomas CD (2008) The coincidence of climatic and species rarity: high risk to small-range species from climate change. *Biol Lett* **4**, 568-572.
- Ong AHK, Vellayan S (2008) An evaluation of CHD-specific primer sets for sex typing of birds from feathers. *Zoo biology* **27**, 62-69.
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology* **4**, 535-538.
- Pakkala T, Pellikka J, Lindén H (2003) Capercaillie *Tetrao urogallus* - a good candidate for an umbrella species in taiga forests. *Wildlife biology*. **9**, 309-316.
- Panek M (2005) demography of grey partridge *Perdix perdix* in poland in the years 1991-2004: reasons of population decline. *European Journal of Wildlife Research* **51**, 14-18.
- Parnesan C (2006) Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **37**, 637-669.
- Parnesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* **421**, 37-42.
- Patthey P, Wirthner S, Signorell N, Arlettaz R (2008) Impact of outdoor winter sports on the abundance of a key indicator species of alpine ecosystems. *Journal of applied ecology* **45**, 1704-1711.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.
- Peñuelas J, Boada M (2003) A global change-induced biome shift in the montseny mountains (NE Spain). *Global change Biology* **9**, 131-140.
- Pépin D, Birkan M, Angibault JM (2008) factors affecting changes in grey pertridge population dynamics in a french arable farmland. *European Journal of Wildlife Research* **54**, 179-187.
- Pepin NC, Seidel DJ (2005) A global comparison of surface and free-air temperatures at high elevation. *Journal of Geophysical Research* **110**, 1-15.
- Piertney SB, Dallas JF (1997) Isolation and characterization of hypervariable microsatellites in the red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Molecular Ecology* **6**, 93-95.
- Piertney SB, Höglund J (2001) Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology* **1**, 303-304.
- Piertney SB, MacColl AD, Bacon PJ, Dallas JF (1998) Local genetic structure in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* **7**, 1645-1654.
- Piggott MP, Taylor AC (2003) Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. *Wildlife Research* **30**, 1-13.
- Popy S (2008) Vers un test des conséquences du changement climatique sur la biodiversité, via le modèle de gradient altitudinal. *Thèse de l'université de Montpellier Supagro*, 218 pages.
- Potts GR (1970) Recent changes in the farmland fauna with special reference to the decline of the grey partridge. *Bird study* **17**, 145-166.
- Potts GR, Aebischer NJ (1995) Population dynamics of the grey partridge *Perdix perdix* 1793-1993: monitoring, modelling and management. *Ibis* **137**, S29-S37.
- Primmer CR, Moller AP, Ellegren H (1996) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* **5**, 365-378.
- Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU, Merilä J (2005) Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* **36**, 348-360.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.

- Pruett CL, Turner TN, Topp CM, Zagrebelny SV, Winker K (2010) Divergence in an archipelago and its conservation consequences in Aleutian island rock ptarmigan. *Conservation genetics* **11**, 241-248.
- Rabastens R (2008) Etude d'impact des installations de la station de ski d'Err-Puigmal (Pyrénées Orientales) sur les populations de lagopède alpin (*Lagopus muta pyrenaica*) et de grand tétras (*Tetrao urogallus aquitanus*). *rapport de soutenance de Master 1*.
- Randi E (2008) detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology* **17**, 285-293.
- Randi E, Bernard-Laurent A (1998) Introgression of red-legged (*Alectoris rufa*) allozymes and mitochondrial DNA in rock partridge (*Alectoris graeca*) alpine populations : The population genetic consequences of natural hybridization. *Gibier Faune Sauvage* **15**, 435-444.
- Ray N (2005) PATHMATRIX: a geographical information system tool to compute effective distances among samples. *Molecular Ecology Notes* **5**, 177-180.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Reed KM, Chaves LD, Hall MK, Knutson TP, Rowe JA, Torgerson AJ (2003) Microsatellite loci for genetic mapping in the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Animal Biotechnology* **14**, 119-131.
- Reed KM, Roberts MC, Murtaugh J, Beattie CW, Alexander LJ (2000) Eight new dinucleotide microsatellite loci in turkey (*Meleagris gallopavo*). *Animal Genetics* **31**, 140.
- Regnaut S (2004) Population genetics of capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Jura and the Pyrenees: a non-invasive approach to avian conservation genetics. *PhD thesis Lausanne university*, 180.
- Reitz F (2009) Situation des perdrix dans le Centre-Nord en 2008. *Perdrix-faisans info n°16-février 2009*, 3-9.
- Richardson DS, Burke T, Komdeur J, von Schantz T (2005) MHC-based patterns of social and extra-pair mate choice in the Seychelles warbler. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**, 759-767.
- Roberts D, Gray CA, West RJ, Ayre DJ (2010) Marine genetics swamping: hybrids replace an obligately estuarine fish. *Molecular Ecology* **19**.
- Rolando A, Caprio E, Rinaldi E, Ellena I (2007) The impact of high-altitude ski-runs on alpine grassland bird communities. *Journal of applied ecology* **44**, 210-219.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**, 137-138.
- Rowe KC, Heske EJ, Brown PW, Paige KN (2004) Surviving the ice: Northern refugia and postglacial colonization. *PNAS* **101**, 10355-10359.
- Scapozza C, Lambiel C, Reynard E, Fallot J-M, Antognini M, Schoeneich P (2010) Radiocarbon dating of fossil wood remains buried by the Piancabella rock glacier, Blenio Valley (Ticino, Southern Swiss Alps): Implications for rock glacier, treeline and climate history. *Permafrost and Periglacial Processes* **21**, 90-96.
- Seehausen O (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 198-207.
- Segelbacher G, Höglund J (2000) Using Microsatellites to study the Conservation of Black Grouse. *Cahier d'éthologie* **20**, 411-420.
- Segelbacher G, Storch I (2002) Capercaillie in the Alps: genetic evidence of metapopulation structure and population decline. *Molecular Ecology* **11**, 1669-1677.
- Shepard DB, Burbrink FT (2008) Lineage diversification and historical demography of a sky island salamander, *Plethodon ouachitae*, from the Interior Highlands. *Molecular Ecology* **17**, 5315-5335.

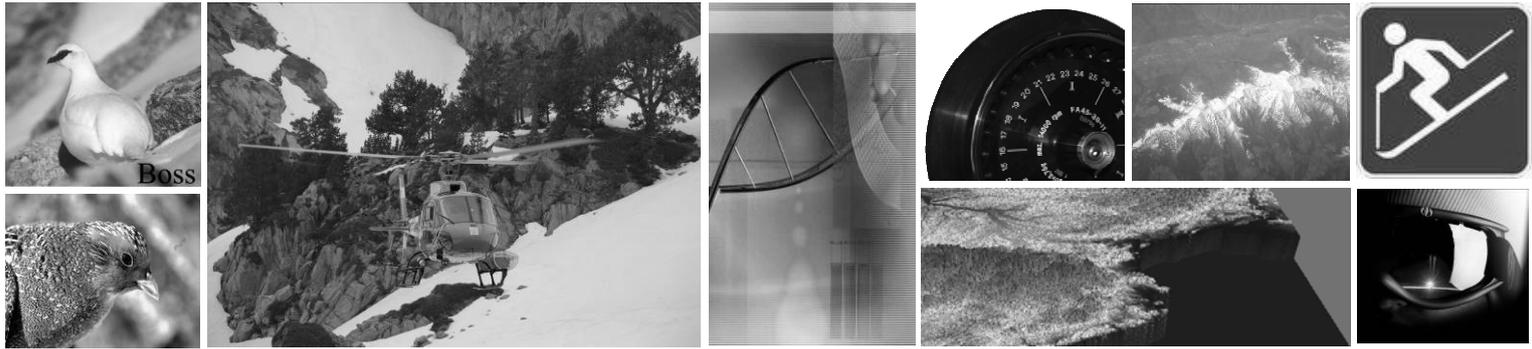
- Shields WM (1982) Philopatry, inbreeding, and Evolution of sex. *University of New York press, Albany*.
- Shoemaker JS, Painter IS, Weir BS (1999) bayesian statistics in genetics. *Trends in genetics* **15**, 354-358.
- Steen JB, Unander S (1985) Breeding biology of the Svalbard Rock Ptarmigan *Lagopus mutus hyperboreus. ornis Scandinavica* **16**, 191-197.
- Stewart JR, Lister AM, Barnes I, Dalén L (2010) Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the royal society B* **277**, 661-671.
- Storey JD (2002) A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* **64**, 479-498.
- Storz JF, Beaumont MA (2002) Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. *Evolution* **56**, 154-166.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Taberlet P, Waits LL (1998) Non-invasive genetic sampling. *Trends in Ecology and Evolution* **13**, 26-27.
- Tapper SC, Potts GR, Brockless MH (1996) the effect of an experimental reduction in predation pressure on the breeding success and population density of grey partridge *Perdix perdix*. *Journal of applied ecology* **33**, 965-978.
- Tautz D (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *in DNA Fingerprinting: State of the Science, edited by S. D. J. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPIEN and A. J. JEFFREYS. Birkhäuser Verlag: Basel.*, 21-28.
- Tejedor MT, Monteagudo LV, Arruga MV (2008) Microsatellite markers for the analysis of genetic variability and relatedness in red-legged partridge (*Alectoris rufa*) farms in Spain. *Research in Veterinary Science* **85**, 62-67.
- Tejedor MT, Monteagudo LV, Hadjisterkotis E, Arruga MV (2005) Genetic variability and population structure in Cypriot chukar partridges (*Alectorischukar cypriotes*) as determined by microsatellite analysis. *European Journal of Wildlife Research* **51**, 232-236.
- Thiel D, Jenni-Eiermann S, Braunisch V, Palme R, Jenni L (2008) Ski tourism affects habitat use and evokes a physiological stress response in capercaillie *Tetrao urogallus*: a new methodological approach. *Journal of applied ecology* **45**, 845-853.
- Torbjornslashrn A, Vorrenb VK-D, Brynhild M (1996) Holocene tree-line fluctuations and climate in central tross, Northern Norway *Historical Biology* **12**, 25-38.
- Uimaniemi L, Lumme J, Putaala A, Hissa R (1999) Conservation status of the finnish grey partridge (*Perdix perdix lucida*). *Hungarian small game bulletin* **5**, 165-170.
- Valière N (2002) Amélioration et optimisation des méthodes non-invasives et des marqueurs microsatellites en Biologie des Populations et de la conservation. *Thèse de Doctorat Université Claude Bernard de Lyon I*, 170p.
- Vuille M, Bradley RS (2000) Mean annual temperature trends and their vertical structure in the tropical Andes. *Geophysic Research Letters* **27**, 3885-3888.
- Walther GR, Beibner S, Burga CA (2005) Trends in the upward shift of alpine plants. *Journal of Vegetation Science* **16**, 541-548.
- Walther GR, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJ, Fromentin JM, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**, 389-395.
- Watson A, Moss R (2004) Impacts of ski-development on ptarmigan (*Lagopus mutus*) at Cairn Gorm, Scotland. *Biological Conservation* **116**, 267-275.
- Watson M, Aebischer NJ, Potts GR, Ewald JA (2007) The relative effects of raptor predation and shooting on overwinter mortality of grey partridges in the United Kingdom. *journal of applied ecology* **44**, 972-982.

- 
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Westemeier RL, Brawn JD, Simpson SA, Esker TL, Jansen RW, Walk JW, Kershner EL, Bouzat JL, Paige KN (1998) Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science* **282**, 1695-1698.
- Wettstein W, Schäffer N (2000) Population structure, dispersal and migration of Corncrakes (*Crex crex*): genetic and chemical information obtained from feathers. *Research project proposal*.
- Willis KJ, Whittaker RJ (2000) PALEOECOLOGY: the Refugial Debate. *Science* **287**, 1406-1407.
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian Inference of Recent Migration Rates Using Multilocus Genotypes. *Genetics* **163**, 1177-1191.





Sempre endavant...



---

## Génétique de la conservation et du paysage

Etude des Populations de Lagopède alpin et de Perdrix grise en France

---

Le lagopède alpin (*Lagopus muta*) et la perdrix grise (*Perdix perdix*) atteignent dans les Pyrénées les limites méridionales de leurs aires de répartition mondiale. Les populations pyrénéennes de ces deux sous-espèces (*Lagopus muta pyrenaica* et *Perdix perdix hispaniensis*) sont donc en situation d'isolat biogéographique. Les deux espèces sont d'excellents bio-indicateurs de l'évolution des milieux ouverts d'altitude. Sous la pression conjuguée des contraintes environnementales et anthropiques, ces milieux connaissent actuellement une évolution sensible caractérisée par un relèvement altitudinal des étages de végétation et donc un rétrécissement de l'habitat disponible pour les espèces d'altitude. La régression des activités agro-pastorales accentue ce phénomène généralisé de reforestation des milieux. Une conséquence attendue de ces bouleversements est l'augmentation du degré de fragmentation des habitats notamment pour les populations d'altitude. Au-delà de l'influence du paysage sur la structuration des populations, un autre facteur pourrait structurer les populations de perdrix grise : les lâchers d'individus d'élevage dans des populations sauvages. **Dans cette thèse, nous nous intéressons à la structuration génétique du lagopède alpin des Pyrénées et de la perdrix grise en France afin d'aider à la décision des plans de conservation.**

**Mots clés :** Galliformes de montagne, Génétique de la Conservation, Microsatellites, Génétique du Paysage, Sky Island, Introgression Génétique.

