
*Etude génétique de la population de Grand tétras (*Tetrao urogallus*) dans le Parc National des Cévennes*

Francesco Foletti et Gwenaël Jacob

Table des matières :

Contexte du projet	4
Objectifs de l'étude génétique	4
Analyses génétiques : de l'échantillon à l'ADN.....	5
1. Matériel génétique disponible	5
2. Génotypage.....	6
3. Succès de génotypage.....	Erreur ! Signet non défini.
4. Liste des échantillons utilisés	10
a. 23 échantillons provenant du centre de Ventajols.....	10
b. 46 échantillons collectés par Christian Nappée en 2014 et 2015.....	11
Apport relatif des deux clades réintroduits.....	12
1. Contribution des fondateurs au génome nucléaire de la population actuelle	12
2. Contribution des fondateurs au génome mitochondrial	Erreur ! Signet non défini.
Diversité génétique de la population actuelle.....	16
1. Diversité allélique et hétérozygotie	16
2. Structuration génétique de la population actuelle	Erreur ! Signet non défini.
Comparaison avec les autres populations françaises	18
1. Diversité génétique	18
2. Différentiation génétique	19
Implications pour la gestion de l'espèce dans la Massif Central ?.....	21
1. La population cévenole est-elle menacée par la perte de diversité génétique ?	21
2. Quelle origine choisir pour renforcer génétiquement la population ?	21
3. La diversité génétique est elle responsable du déclin de la population cévenole ?	23
Annexe : Description des méthodes utilisées.....	24
1. Estimation de la diversité génétique	24
2. Assignement des échantillons à des individus	24
3. Assignement à une population d'origine et structuration génétique.....	25
a. Test d'assignement.....	25
b. Structuration génétique et contribution relatives des pools génétiques.....	25
c. Autres tests de structuration génétique	25
Remerciements	26
Références	27

Gwena
Suppr

Gwena
Suppr

Gwena
Suppr

Gwena
Suppr

Gwena
Suppr

Gwena
Suppr

Gwena
Suppr

Gwena
Suppr

Gwena
Suppr

Contexte du projet

Un petit noyau de Grand tétras existe au nord du département de la Lozère, à la suite d'une réintroduction conduite par le Parc National des Cévennes (PNC) depuis 1978 (Nappée 2008). L'éleveur était un agent du Parc National, Christian Nappée, auquel il sera fait référence ci-dessous.

Vingt ans après la fin des lâchers massifs, la population constituée se maintient de façon naturelle, mais sa dynamique ne semble pas de nature à atteindre rapidement un niveau qui garantirait une viabilité à long terme. A la demande du PNC qui s'interrogeait sur les choix de gestion à faire vis-à-vis de cette néo-population, Leclerc et al. (2012) ont réalisé une étude, rendue en 2012, et qui montrait entre autres qu'il existe un fort potentiel d'habitats disponibles et en devenir pour cette espèce dans le sud du massif central. En outre, un certain nombre d'acteurs locaux, parmi lesquels la Fédération départementale des chasseurs de Lozère (FDC 48), se montrent très intéressés par ce projet. Les conclusions de l'étude soulignaient l'intérêt de poursuivre les efforts de conservation pour cette néo-population.

Il était aussi recommandé de faire un diagnostic génétique de la population cévenole, étant donné le faible nombre de fondateurs différents ayant transmis leurs gènes. Les résultats de cette étude permettraient d'orienter les choix de gestion et en particulier l'opportunité ou non d'effectuer des translocations à des fins de renforcement génétique, qui se montrent efficaces chez les tétraonidés pour consolider de petites populations (Westemeier et al. 1998).

Objectifs de l'étude génétique

Comme définit dans la convention de partenariat de recherche, l'objectif était de faire le bilan génétique de la population cévenole du Grand tétras, soit :

1. Estimer l'apport relatif des deux clades réintroduits, à savoir le clade retrouvé aujourd'hui dans les régions d'Europe centrale et du nord, et le clade de la péninsule ibérique et des Balkans, et leur structuration spatiale.
2. Caractériser l'état génétique de la population de Grand tétras des Cévennes, et en particulier l'estimation de la richesse allélique, les taux d'hétérozygotie et une éventuelle structuration génétique de la population.
3. Comparer la diversité génétique de la population cévenole avec d'autres populations européennes,
4. Evaluer l'opportunité d'opération de renforcement par la translocation d'individus sauvages.

Ce rapport décrit les principaux résultats obtenus dans le cadre de l'évaluation génétique de la réintroduction du Grand tétras dans les Cévennes.

Analyses génétiques : de l'échantillon à l'ADN...

Les individus réintroduits dans les Cévennes entre 1979 et 1993 sont nés en captivité dans le centre d'élevage de Ventajols, situé au sein du Parc National, puis relâchés durant leur première année. Dans une deuxième phase (2002–05), des individus nés et élevés en captivité ont été relâchés dans le but de renforcer la population (Nappée 1984; Nappée 2008).

L'analyse génétique de la population actuelle offre l'opportunité de déterminer, parmi les deux sous-espèces réintroduites, laquelle a le plus contribué aux caractéristiques génétiques de la population actuelle, et aussi de déterminer l'impact qu'a eu la campagne de renforcement de population.

1. Matériel génétique disponible

a. Individus fondateurs captifs

Quinze individus ont été intégrés au centre d'élevage de Ventajols entre 1977 et 1994, dont dix individus (7 mâles et 3 femelles) de la sous-espèce alpine *Tetrao urogallus major* (ci-après *major*), et cinq individus (3 mâles 2 femelles) de la sous-espèce pyrénéenne *T. u. aquitanicus* (ci-après *aquitanicus*). De ces individus fondateurs, sont issus les 597 oiseaux relâchés entre 1978 et 1994, dont 321 coqs et 276 poules.

Parmi les échantillons fournis par Christian Nappée, du matériel (plumes ou tissus) était disponible pour huit individus fondateurs, quatre de la sous-espèce *major* et quatre de la sous-espèce *aquitanicus*.

Nous avons aussi sélectionné deux échantillons provenant d'individus issus de parents captifs (première génération), un échantillon provenant d'un individu apparenté à une femelle captive et deux échantillons provenant d'individus morts avant de s'être reproduit. Pour ces cinq individus, nous connaissions les parents, ce qui nous a permis de reconstruire un pedigree et de vérifier que les marqueurs génétiques utilisés sont hérités de façon mendélienne.

Au total nous avons donc analysé 16 échantillons provenant d'individus du centre d'élevage de Ventajols.

b. Phase de renforcement de population (2002–2005)

Entre 2002 et 2005, 48 individus issus des élevages de MM. Othmar Parth et Joseph Pflug (Tyrol) ont été achetés. Ces deux éleveurs avaient des fondateurs communs à leurs souches d'élevage. Quarante-trois individus sur les 48 achetés ont été relâchés dans différents sites du Parc National des Cévennes dans le but de renforcer démographiquement la population établie.

Suite à un incident technique, les 43 échantillons de sang et follicules plumeux prélevés sur ces oiseaux ont été perdus, mais 12 échantillons en double provenant de cinq poules et sept coqs ont été conservés. Nous avons sélectionné sept individus parmi les 12 disponibles.

c. La population actuelle

Christian Nappée organise le suivi annuel de la population cévenole, qui consiste en des battues aux indices sur des parcelles forestières connues pour être attirantes et/ou fréquentées par les oiseaux. Ces comptages ont permis de retracer l'évolution des effectifs de la population cévenole, mais aussi de déterminer le nombre d'individus par classe d'âge ou de sexe entre 1987 et 2015 (Figure 1). Ces opérations ont lieu au mois d'août, soit le cœur de la période de la mue annuelle ce qui offre l'opportunité de collecter des échantillons de crottes et de plumes. Parmi les échantillons collectés en 2013–14, nous avons sélectionné 15 crottes et 29 plumes collectés dans les secteurs du Mont Lozère Nord et Ouest. A ces 44 échantillons s'ajoutent deux plumes collectées en 2015 sur la Montagne du Goulet et dans le secteur du Mont-Lozère Ouest (Figure 2).

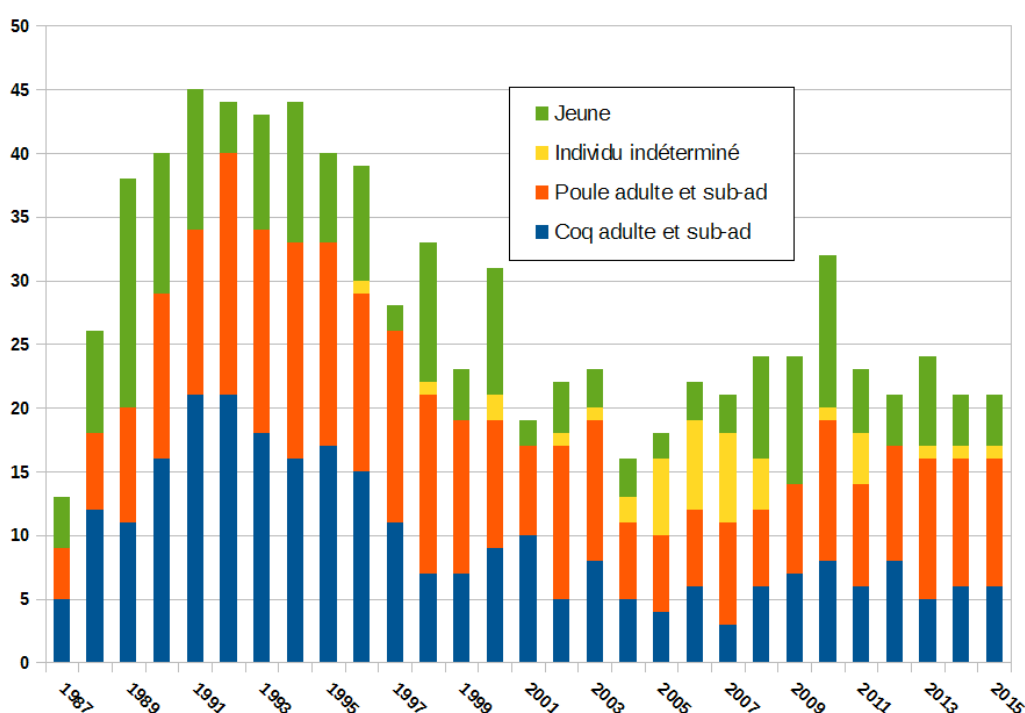


Figure 1 : Effectifs minimum d'été de la population cévenole d'après les comptages réalisés par Christian Nappée. On observe que les effectifs estimés ont fortement augmenté durant la phase de lâchers massifs d'individus pour atteindre une quarantaine d'individus, puis de décliner avant de se stabiliser à une vingtaine d'individus depuis 2005.

2. Génotypage

a. Extraction d'ADN

Les échantillons de crottes de Grand tétras étaient conservés dans des tubes en plastique contenant du dessiccant (gel de silica). L'extraction d'ADN à partir des crottes a été effectuée en utilisant le kit d'extraction PSP Stool DNA Kit (Stratec) et en suivant les recommandations du fournisseur. Les plumes étaient conservées dans des enveloppes en papier. L'extraction d'ADN à partir des plumes a été réalisée en utilisant le kit d'extraction Blood & Tissue kit (Qiagen) et en suivant les recommandations du fournisseur.

Les échantillons des individus fondateurs ou apparentés étaient des plumes ou des fragments de muscle. Tous ces échantillons ont été analysés en utilisant le kit d'extraction Blood & Tissue kit (Qiagen) et en suivant les recommandations du fournisseur. Pour deux individus fondateurs, nous avons analysé deux échantillons différents provenant d'un même individu afin de contrôler la fiabilité du génotypage.

Lors de chaque série d'extraction d'ADN, nous avons effectué une analyse additionnelle dans laquelle aucun matériel biologique n'a été ajouté. On s'attend à n'observer aucun résultat pour cet échantillon. Ce contrôle est dit négatif, et permet de contrôler l'absence de contamination entre échantillons lors des étapes d'extraction et d'amplification de l'ADN.

b. Amplification des marqueurs génétiques

Pour chaque échantillon, nous avons amplifié 12 marqueurs microsatellites (Tableau 1) et un fragment permettant de déterminer le sexe des individus. Les 13 marqueurs ont été amplifiés en une seule réaction de 10 µL contenant 1x Type-it (Qiagen), 3–5 µM de chaque amorce (amorce F fluorescente) et 2 µL d'ADN (concentration d'ADN non déterminée). La réaction de PCR a été effectuée sur un thermocycleur en suivant une phase de dénaturation initiale de 5 min à 95°C, puis 37 cycles de [30 s à 94°C, 120 s à 54°C et 45 s à 72°C] et une phase d'élongation finale de 15 min à 72°C.

Le génotypage a été effectué en suivant une approche multitube (Taberlet et al. 1996), c'est-à-dire que chaque échantillon a été amplifié dans 4–8 réactions de PCR indépendantes. Cette approche permet de limiter le risque d'erreur de génotypage.

Nous avons amplifié un fragment d'ADN mitochondrial (Duriez et al. 2007) afin de déterminer la variabilité génétique dans les populations fondatrice et actuelle. Le fragment a été amplifié dans une réaction de PCR de 25 µL contenant 1x Type-it (Qiagen), 5 µM d'amorce et 2 µL d'ADN, en suivant une phase de dénaturation initiale de 5 min à 95°C, puis 35 cycles de [30 s à 94°C, 30 s à 55°C et 60 s à 72°C] et une phase d'élongation finale de 15 min à 72°C.

c. Détection des allèles et séquençage

Après amplification, les fragments PCR (microsatellites + sexage) ont été analysés par électrophorèse sur un séquenceur semi-automatique (ABI 3130, ThermoFisher) en utilisant un marqueur de taille interne (Orange Size Standard, MCLab). La détermination de la taille des fragments et le codage des allèles ont été effectués avec le programme GENEMARKER (SoftGenetics).

Après amplification, le fragment mitochondrial a été séquençé dans les deux sens (méthode Sanger). L'alignement des séquences et l'identification des haplotypes ont été réalisés avec le programme BIOEDIT (Hall 1999).

3. Succès de génotypage

Nous avons obtenus un génotype exploitable pour les 23 individus fondateurs (groupe *major*, groupe *aquitanicus* et individus lâchés entre 2002 et 2005). Malgré l'âge de certains échantillons, les génotypes obtenus étaient de très bonne qualité, comme indiqué par des indices de qualité (Miquel et al. 2006) supérieurs à 0.9. Nous avons analysés deux échantillons provenant des individus Epsilon et CA-41002. Les deux échantillons analysés ont donné le même génotype, ce qui confirme la fiabilité du génotypage.

Quatre crottes sur les 15 analysées et 30 plumes sur les 31 analysées ont donné un génotype exploitable, et pour lesquels l'indice de qualité était compris entre 0.3 (relativement faible) et 1.0 (maximal). Parmi les 34 génotypes obtenus, on observe des groupes de génotypes identiques. La probabilité que deux individus dans la population partagent le même génotype est faible ($PI = 9.6 \times 10^{-6}$, $PI_{SIB} = 3.6 \times 10^{-3}$) et peut être négligée. Il est donc plus probable que les échantillons partageant le même génotype provenaient du même individu.

Les 34 génotypes observés appartenaient à 21 individus, dont sept ont été détectés 2–4 fois. Les 21 individus provenaient de la Montagne du Goulet (une femelle), du secteur Mont-Lozère Nord (cinq mâles et quatre femelles) et du secteur Mont-Lozère Ouest (six mâles et cinq femelles ; Figure 1).

Le faible succès de génotypage à partir de crottes s'explique par une collecte et une conservation inadéquate des échantillons. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les échantillons sont collectés frais (moins d'une semaine) dans une tube étanche contenant du gel de silice et stockés au congélateurs jusqu'à l'analyse.

Locus	Séquence F	Séquence R	Dye	Référence
ADL230	GCCAAATAGTAATCCACTGC	TCGCTCTTGCCATTGTAAGT	PET	Cheng unpublished
BG15	AAATATGTTTGCTAGGGCTTAC	TACATTTTTCATTGTGGACTTC	NED	(Piertney and Höglund 2001)
BG16	GTCATTAGTGCTGTCTGTCTATCT	TGCTAGGTAGGGTAAAAATGG	PET	(Piertney and Höglund 2001)
TuT1	GGTCTACATTTGGCTCTGACC	ATATGGCATCCCAGCTATGG	FAM	(Segelbacher et al. 2000)
TuT2	CCGTGTCAAGTCTCCAAAC	TTCAAAGCTGTGTTTCATTAGTT	NED	(Segelbacher et al. 2000)
TuT3	CAGGAGGCCTCAACTAATCACC	CGATGCTGGACAGAAGTGAC	VIC	(Segelbacher et al. 2000)
TuT4	GAGCATCTCCCAGAGTCAGC	TGTGAACCAGCAATCTGAGC	VIC	(Segelbacher et al. 2000)
ADL142	CAGCCAATAGGGATAAAAGC	CTGTAGATGCCAAGGAGTGC	NED	Cheng unpublished
BG10	ATGTTTCATGTCTTCTGGAATAG	ATTTGGTTAGTAACGCATAAGC	VIC	(Piertney and Höglund 2001)
BG20	AAGCACTTACAATGGTGAGGAC	TATGTTTTCTTTTCAGTGGTAT	VIC	(Piertney and Höglund 2001)
sTuD1	ATTTGCCAGGAACTTGCTC	CCTTGCCTCCTTATGAAATCC	FAM	(Jacob et al. 2009)
sTuD3	CAAGGGGAAAATATGTGTGTG	TGTCAAGATATTTCAAGCCTTTG	FAM	(Jacob et al. 2009)
CHD1/P8	CCCAAGGATGAGAACTGTGC	CTCCCAAGGATGAGRAAYTG	FAM	D'après (Griffiths et al. 1998)

Tableau 1 : Liste des marqueurs génétiques amplifiés dans cette étude. Est indiqué pour chaque marqueur le nom du locus, les séquences F et R, la couleur du fluorochrome utilisé pour marquer l'amorce F et l'article décrivant le marqueur.

Nous avons obtenu une séquence de qualité suffisante pour déterminer les haplotypes mitochondriaux des huit individus fondateurs, des sept individus issus de la phase de renforcement de populations et de 17/21 individus de la population actuelle.

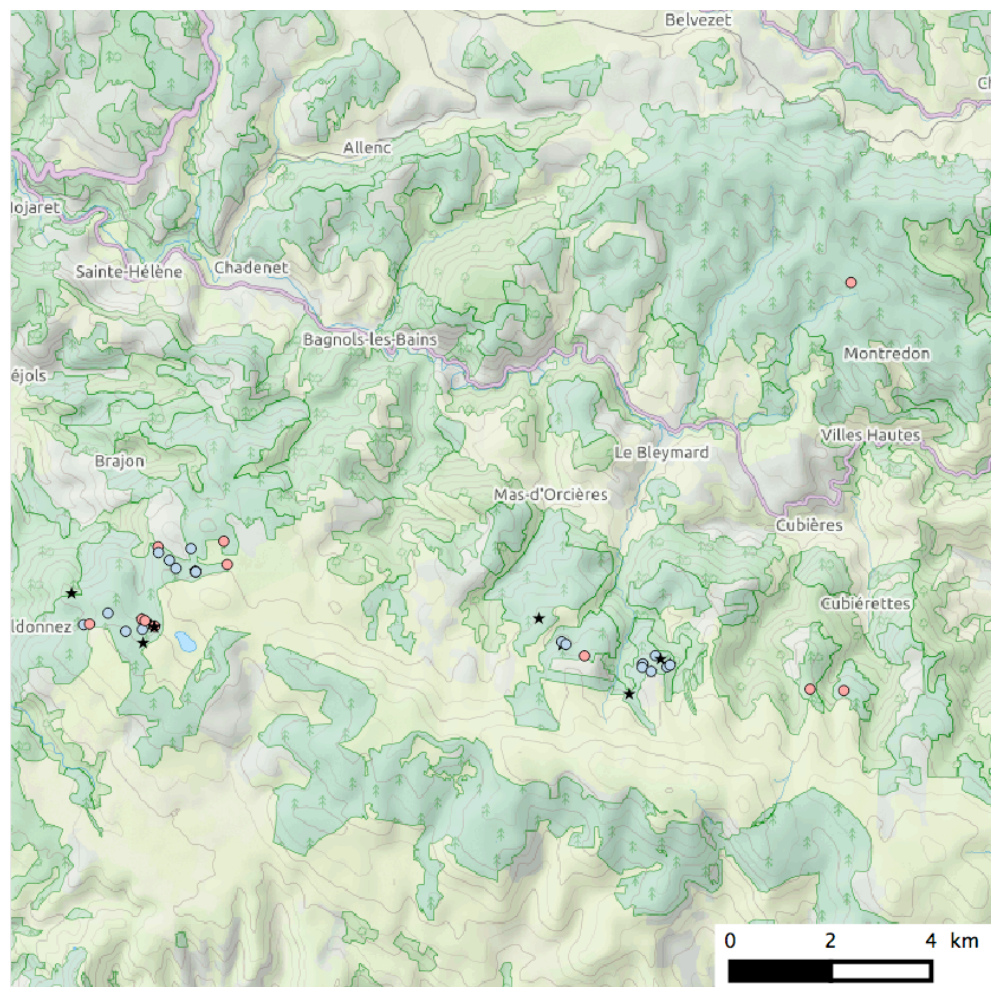


Figure 2 : Localisations des échantillons collectés en 2014 et 2015. Les échantillons assignés à des individus mâles sont indiqués en bleu, ceux assignés à des femelles sont indiqués en rose et ceux qui n'ont pas donné de génotype exploitable sont indiqués avec une étoile noire. Au total, 21 individus ont été identifiés dans trois secteurs : Montagne du Goulet (une femelle), Mont-Lozère Nord (cinq mâles + quatre femelles) et Mont-Lozère Ouest (six mâles et cinq femelles).

4. Liste des échantillons utilisés

a. 23 échantillons provenant du centre de Ventajols

Individu	Entrée	Sexe	Sous-espèce	Origine	Type d'éch	#ech	Remarque
DA-147077	1976	Femelle	<i>major</i>	Trente	Plume	PF02	
Béta	1978	Mâle	<i>major</i>	Trente	Plume	PF01	
Epsilon	1979	Mâle	<i>major</i>	Aschenbrenner	Plume	PF04	= PF04bis
Epsilon	1979	Mâle	<i>major</i>	Aschenbrenner	Plume	PF04bis	= PF04
CA-41007	1980	Mâle	<i>aquitanicus</i>	Quérigut*	Plume	PF05	
CA-41031	1981	Mâle	<i>major</i>	Mautern	Plume	PF06	
DA-150010	1985	Femelle	<i>aquitanicus</i>	Mont Vallier*	Plume	PF08	
CA-20523	1987	Mâle	<i>aquitanicus</i>	Esterri	Plume	PF09	
DA-150984	1989	Femelle	<i>aquitanicus</i>	Luchon*	Muscle	TF04	

Tableau 2.1 : Liste des individus fondateurs captifs ainsi que leur date d'entrée effective dans le centre de Ventajols. Quatre individus *major* et quatre individus *aquitanicus* ont été identifiés. Sont reportés le nom ou le numéro de bague, le sexe, la sous-espèce et l'origine des individus (les individus issus de pontes sauvages sont marqués par un astérisque), ainsi que le type et le numéro d'échantillons analysés.

Individu	Entrée	Sexe	Sous-espèce	Origine	Type d'éch.	#ech	Remarque
CA-41002	1979	Mâle	<i>major</i>	Née à Ventajols	Plume	PF03	= PF01bis
CA-41002	1979	Mâle	<i>major</i>	Née à Ventajols	Plume	PF01bis	= PF03
DC-25995		Mâle	<i>major</i>	Née à Ventajols	Muscle	TF01	Morte avant reproduction
		Femelle	<i>major</i>	Né à Ventajols	Muscle	TF02	Non-reproducteur
		Mâle	<i>major</i>	Né à Ventajols	Muscle	TF03	Non-reproducteur
		Femelle	<i>aquitanicus</i>	Mont Vallier*	Plume	PF08bis	Sœur de DA-150011
		Mâle	<i>major</i>	Bavière	Plume	PF07	Descendant DA-147075

Tableau 2.2 : Liste des individus apparentés à des fondateurs ou des individus non-reproducteurs pour lesquels un échantillon a été analysé. Sont reportés le nom ou le numéro de bague, le sexe, la sous-espèce et l'origine des individus (les individus issus de pontes sauvages sont marqués par un astérisque), ainsi que le type et le numéro d'échantillons analysés.

Individu	Entrée	Sexe	Sous-espèce	Origine	Type d'éch.	#ech
DA-196600	2004	Femelle	<i>major</i>	Parth	Plume	PF23
DA-196598	2004	Femelle	<i>major</i>	Parth	Plume	PF22
DA235921	2005	Femelle	<i>major</i>	Parth	Plumes	PF26
CH-5493	2005	Mâle	<i>major</i>	Parth	Plumes	PF26
DA-235916	2005	Femelle	<i>major</i>	Pflug	Plume	PF24
DA-235917	2005	Femelle	<i>major</i>	Pflug	Plume	PF24
DA-235918	2005	Femelle	<i>major</i>	Pflug	Plume	PF24

Tableau 2.3 : Liste des individus achetés à des éleveurs autrichiens et relâchés dans le cadre du programme de renforcement de population 2002–05. La plupart de ces individus sont morts avant de se reproduire. La poule DA-196598 a été observée en compagnie de son jeune. Aucun échantillon de la poule la plus longévive (DA-235913 qui a survécu au moins 5 ans) n'a été analysé. Sont reportés le nom ou le numéro de bague, le sexe, la sous-espèce et l'origine (éleveur) des individus, ainsi que le type et le numéro d'échantillons analysés.

b. 46 échantillons collectés par Christian Nappée en 2014 et 2015

#ech	Secteur	Canton	Année	X_Lamblle	Y_Lamblle	Type_ech
14-C-CR-29	Mt-Lozere_Nord	Crussinas GF Mas d'Orcières	2014	709478.8	1939948.5	Crotte
14-C-CE-32	Mt-Lozere_Nord	Cubierette Est	2014	709478.8	1939948.5	Crotte
14-C-CO-31	Mt-Lozere_Nord	Cubierette Ouest	2014	710829.9	1938995.3	Crotte
14-C-MA-23	Mt-Lozere_Nord	Malavieille	2014	711089.9	1939598.8	Crotte
14-C-MA-24	Mt-Lozere_Nord	Malavieille	2014	711630.9	1939608.4	Crotte
14-C-MA-26	Mt-Lozere_Nord	Malavieille	2014	711571.3	1939549.3	Crotte
14-C-MA-27	Mt-Lozere_Nord	Malavieille	2014	711257.8	1939454.7	Crotte
14-C-AS-04	Mt-Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	701290.5	1940210.2	Crotte
14-C-AS-05	Mt-Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	701097.1	1940319.2	Crotte
14-C-AS-07	Mt-Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	701129.3	1939846.7	Crotte
14-C-AS-08	Mt-Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	699689.0	1940810.7	Crotte
14-C-AS-09	Mt-Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	699940.0	1940191.9	Crotte
14-C-AS-10	Mt-Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	709493.3	1939978.3	Crotte
14-C-SC-16	Mt-Lozere_Ouest	Serre des Countrasts	2014	702145.8	1941292.1	Crotte
14-C-SC-18	Mt-Lozere_Ouest	Serre des Countrasts	2014	702145.8	1941292.1	Crotte
14-P-CO-37	Mt_Lozere_Nord	Cubierette_Ouest	2014	715103.2	1939144.2	Plume
14-P-CO-38	Mt_Lozere_Nord	Cubierette_Ouest	2014	714430.1	1939159.7	Plume
14-P-AS-01	Mt_Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	701354.0	1940182.5	Plume
14-P-AS-02	Mt_Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	701111.7	1940116.8	Plume
14-P-AS-03	Mt_Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	700420.8	1940430.1	Plume
14-P-AS-05	Mt_Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	701160.9	1940291.8	Plume
14-P-AS-06	Mt_Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	700058.1	1940207.1	Plume
14-P-AS-09	Mt_Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	701347.6	1940168.8	Plume
14-P-AS-09	Mt_Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	701347.6	1940168.8	Plume
14-P-AS-11	Mt_Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	701097.1	1940319.2	Plume
14-P-AS-13	Mt_Lozere_Ouest	Arcinal-Sapet	2014	700779.4	1940073.5	Plume
14-P-CR-31	Mt_Lozere_Nord	Crussinas GF Mas d'Orcières	2014	709465.9	1940013.3	Plume
14-P-CR-32	Mt_Lozere_Nord	Crussinas GF Mas d'Orcières	2014	709551.6	1939961.4	Plume
14-P-CR-33	Mt_Lozere_Nord	Crussinas GF Mas d'Orcières	2014	709925.0	1939740.1	Plume
14-P-MA-24	Mt_Lozere_Nord	Malavieille	2014	711089.9	1939598.8	Plume
14-P-MA-25	Mt_Lozere_Nord	Malavieille	2014	711338.4	1939769.6	Plume
14-P-MA-26	Mt_Lozere_Nord	Malavieille	2014	711442.3	1939703.3	Plume
14-P-MA-27	Mt_Lozere_Nord	Malavieille	2014	711631.2	1939587.4	Plume
14-P-MA-30	Mt_Lozere_Nord	Malavieille	2014	711257.8	1939454.7	Plume
14-P-MA-34	Mt_Lozere_Nord	Malavieille	2014	711079.4	1939531.9	Plume
14-P-SL-36	Mt_Lozere_Nord	Serre-Long	2014	709005.1	1940465.5	Plume
14-P-RT-23	Mt_Lozere_Ouest	Roc des Tulipes	2014	702704.0	1941894.3	Plume
14-P-SC-14	Mt_Lozere_Ouest	Serre des Countrasts	2014	702154.9	1941276.8	Plume
14-P-SC-15	Mt_Lozere_Ouest	Serre des Countrasts	2014	702154.9	1941276.8	Plume
14-P-SC-17	Mt_Lozere_Ouest	Serre des Countrasts	2014	701407.3	1941647.4	Plume
14-P-SC-18	Mt_Lozere_Ouest	Serre des Countrasts	2014	701625.9	1941498.6	Plume
14-P-SC-19	Mt_Lozere_Ouest	Serre des Countrasts	2014	701759.6	1941340.5	Plume
14-P-SC-21	Mt_Lozere_Ouest	Serre des Countrasts	2014	702779.9	1941435.0	Plume
14-P-SC-22	Mt_Lozere_Ouest	Serre des Countrasts	2014	701396.8	1941762.1	Plume
15-P-ES-X	Mgne du Goulet	Forêt communale d'Estampes	2015	715098.0	1947247.4	Plume
15-P-RT-X	Mt_Lozere_Ouest	Roc des Tulipes	2015	702053.4	1941738.1	Plume

Tableau 3 : Liste des individus de la population actuelle. Les 46 échantillons ont été collectés en 2014 et 2015 dans les secteurs du Mont-Lozère Nord et Ouest, et sur la Montagne du Goulet. Les coordonnées (Lambert II étendu) et le type d'échantillon collecté sont aussi reportés.

Apport relatif des deux clades réintroduits

1. Contribution des fondateurs au génome nucléaire de la population actuelle

L'analyse de la différenciation génétique entre les populations de fondateurs avec le programme STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) a révélé la présence de trois pools génétiques. Les génomes des individus fondateurs *major*, des individus fondateurs *aquitanicus* et des individus lâchés entre 2002 et 2005 sont assignés à plus de 90 % à l'un des trois pools génétiques (Figure 3). On peut donc conclure que les trois populations fondatrices sont fortement différenciées. Les pools génétiques *major* et *aquitanicus* ont contribué respectivement environ 72 % et 27 % du génome des individus de la population actuelle. Seul 1 % du génome de la population actuelle est assigné aux individus lâchés entre 2002 et 2005. Cette contribution est négligeable et on peut conclure que ce groupe de fondateurs n'a pas contribué à la population actuelle.

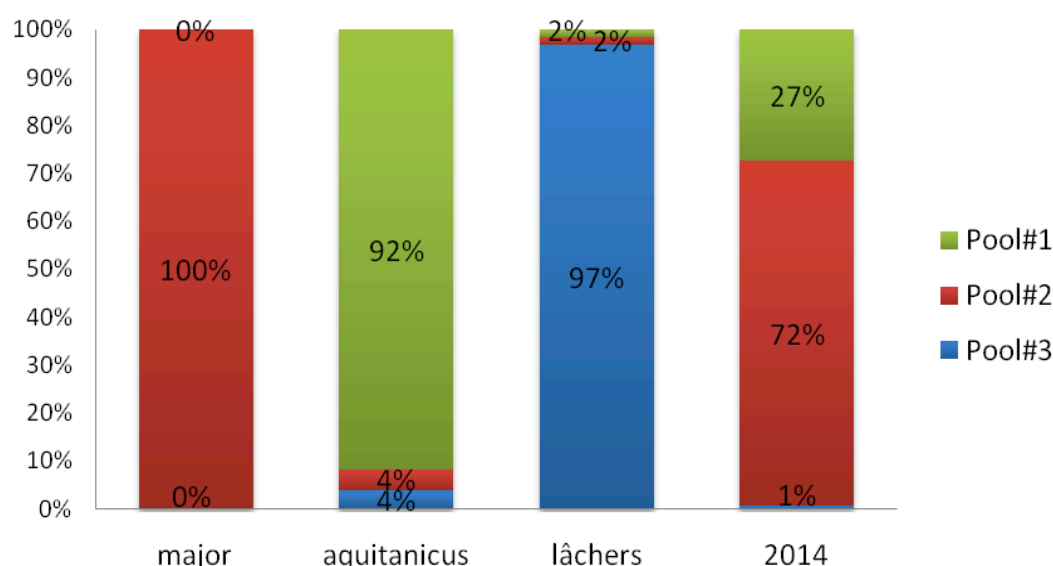


Figure 3: Différenciation génétique entre les populations fondatrices et actuelles.

Chaque barre verticale représente un groupe d'individus fondateurs et la population actuelle. Pour chaque groupe d'individu, les aires de couleur et les valeurs en % représentent la contribution moyenne des trois pools génétiques au génome des individus de ce groupe. On observe que les populations fondatrices sont assignées à plus de 90 % à l'un des trois pools génétiques. Selon ces analyses, les populations fondatrices *major* et *aquitanicus* auraient contribué respectivement 27 % et 72 % du génome des individus de la population actuelle. Les individus lâchés entre 2002 et 2005 ne semblent pas y avoir contribué.

Bien que l'approche décrite ci-dessus donne des résultats d'apparence convaincants, la méthode décrite par Pritchard et al (2000) repose sur l'hypothèse que les populations sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Or, le faible nombre d'individus fondateurs ne permet pas de tester cette hypothèse. Bien que la méthode soit réputée robuste à la violation de cette hypothèse, il n'existe pas d'études ayant testé les performances du programme STRUCTURE dans des conditions limites, telles que des populations de petite taille. Nous avons donc suivi une autre approche ne reposant pas sur l'hypothèse de populations à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Le test d'assignement décrit par Paetkau et Strobeck (1994) et Paetkau et al (1995), nous a permis d'identifier parmi les trois groupes d'individus fondateurs, lequel a les fréquences alléliques les plus proches de la population actuelle.

Nous avons testé dans un premier temps si les fréquences alléliques de la population actuelle étaient plus proches du groupe d'individus fondateurs captifs (*major* + *aquitanicus*) ou des individus lâchés entre 2002 et 2005. En utilisant le programme GENALEX (Peakall and Smouse 2012) nous avons calculé pour chaque individu de la population actuelle, sa valeur d'assignement à la population fondatrice captive (*major* + *aquitanicus*) et au groupe d'individus lâchés entre 2002 et 2005. Ces valeurs d'assignement ont été reportées sur l'axe des abscisses et des ordonnées de la Figure 4A.

On constate que les individus de la population actuelle sont regroupés avec les individus fondateurs captifs. Ce résultat suggère que les fréquences alléliques dans les deux groupes sont proches et exclut donc une contribution des individus relâchés entre 2002 et 2005 à la diversité génétique de la population actuelle.

Les axes de la Figure 4B indiquent les valeurs d'assignement au groupes fondateurs captifs *major* (abscisses) et *aquitanicus* (ordonnées). Quatorze individus de la population actuelle sont assignés au groupe fondateur captif *major* contre sept assignés au groupe *aquitanicus*. Ce résultat suggère que les individus fondateurs captifs *major* auraient eu une contribution majoritaire au génome des individus de la population actuelle.

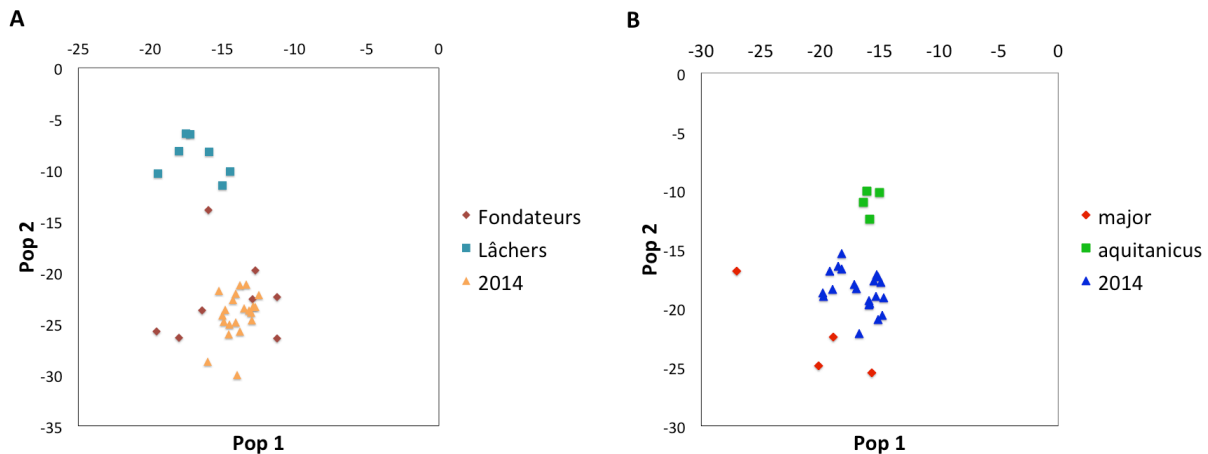


Figure 4 : Tests d'assignement des individus de la population actuelle aux groupes de fondateurs. Chaque individu est représenté par un point, dont les coordonnées sont les valeurs d'assignement à deux populations de référence (du fait de la forte similarité génétique entre individus, il se peut que certains points se chevauchent). A : Les individus de la population actuelle sont génétiquement plus proches des individus fondateurs captifs que des individus lâchés entre 2002 et 2005. B : Les individus de la population actuelle sont génétiquement plus proches des individus fondateurs captifs *major* que des individus fondateurs captifs *aquitanicus*.

Les deux méthodes mettent en évidence l'absence de contribution des individus lâchés entre 2002 et 2005 à la diversité génétique de la population actuelle.

Divers observations, dont celle en 2005 d'une poule (DA-196598) suivie d'un jeune, ont prouvé que certaines femelles avaient survécu et s'étaient reproduites plusieurs années après leur lâcher. L'absence de contribution génétique des ces individus à la population actuelle suggère que la descendance des poules reproductrices issues des lâchers de renforcement n'ait pas survécu. On ne peut cependant pas totalement exclure que des descendants des individus relâchés entre 2002 et 2005 n'aient pas été détectés. En effet, l'échantillonnage de la population actuelle était restreint aux noyaux du Mont Lozère et à un échantillon collecté sur la Montagne du Goulet.

Plusieurs facteurs pourraient expliquer l'échec relatif de la phase de renforcement. Tout d'abord, plus d'une trentaine d'individus ont été relâchés annuellement entre 1978 et 1994, pour un total de 597 individus. Ces lâchers massifs ont permis d'établir quatre noyaux de population (Mont

Lozère, Bougès et Fontmort), pour un effectif total dépassant la quarantaine d'individus entre 1989 et 1996. Lors de la phase de renforcement, 14 à 19 individus ont été relâchés par année entre 2002 et 2005 pour un total de 47 individus. La population cévenole était alors dans une phase de déclin et répartie en deux noyaux autour du Mont Lozère, pour un total d'une vingtaine d'individus. La phase de renforcement a donc été conduite avec des effectifs beaucoup plus faibles que pour la phase de réintroduction, sur une période plus courte et durant une période de dynamique déclinante de la population cévenole.

Les oiseaux achetés entre 2002 et 2005 ont profité d'une préparation à la vie sauvage dans le centre de Ventajols, ce qui pourrait expliquer les taux plus élevés de survie individuelle chez les individus relâchés dans les Cévennes que ceux reportés dans la littérature (Siano et al. 2006; Unger and Klaus 2008). Ces taux de survie restent cependant faibles et n'ont pas permis l'établissement d'un nombre suffisant d'individus pour renforcer durablement la population établie.

Enfin, on constate que les individus relâchés entre 2002 et 2005 ont une signature génétique très différente de la population captive *aquitanicus* (ce qui était attendue), mais aussi de la population fondatrice captive *major*, ce qui est plus surprenant. Sauf à être particulièrement attentifs au maintien d'une variabilité génétique convenable, les élevages ne disposent généralement que de peu d'individus ce qui entraîne une perte rapide de la diversité génétique dans les populations captives. Les échanges d'individus entre élevages ne sont pas assez réguliers pour maintenir des taux de diversité génétique élevés. La dérive génétique (perte de diversité génétique et fixation aléatoire d'allèles) est à l'origine de la forte différenciation génétique entre les individus relâchés entre 2002 et 2005 et les populations fondatrices captives. Il est donc probable que les individus issus de centres d'élevage amateur ou de taille petite à moyenne soient très consanguins, ce qui pourrait encore limiter leur capacité à s'adapter à un environnement naturel (flore intestinale inadaptée, faible résistance aux parasites et maladies, etc.).

Les caractéristiques des deux sous-espèces sont retrouvées dans la population actuelle. Le groupe de fondateurs *major* a contribué la majorité du génome nucléaire des individus de la population actuelle.

Les fréquences alléliques observées dans la population actuelle sont intermédiaires entre les fréquences alléliques des pools génétiques *major* et *aquitanicus*. Les deux méthodes d'assignement utilisées donnent des résultats similaires quant à la contribution relative des groupes fondateurs captifs *major* et *aquitanicus* à la population actuelle.

Les populations de références n'étaient constituées que par un faible nombre d'individus (quatre individus *major* et quatre individus *aquitanicus*), probablement apparentés pour certains. Nous ne connaissons pas d'études analysant le comportement de l'algorithme implémenté dans le programme STRUCTURE avec des effectifs faibles et en cas de violation de l'hypothèse de populations à Hardy-Weinberg. On observe néanmoins que la méthode d'assignement de Paetkau et Strobeck (1994), qui ne repose pas sur une telle hypothèse, indique elle aussi que 2/3 des individus de la population actuelle serait génétiquement plus proches des fondateurs *aquitanicus*.

2. Origine des haplotypes mitochondriaux observés dans la population actuelle

L'ADN mitochondrial est hérité de la mère et n'est pas recombiné lors de la reproduction. Il est donc aisé de déterminer de quelle femelle fondatrice sont issus les individus de la population actuelle, et la contribution relative des femelles fondatrices à la population actuelle. Le séquençage d'un fragment d'ADN mitochondrial a montré que les trois femelles fondatrices pour lesquelles nous disposons d'un échantillon d'ADN portaient un haplotype différent.

Tous les individus de la population actuelle partagent un même haplotype mitochondrial, ce qui indique qu'ils descendent tous d'une même femelle fondatrice captive *aquitanicus* (DA-150011). D'après les renseignements fournis par Christian Nappée, cette poule est issue d'une ponte sauvage collectée en 1983 en forêt domaniale du Mont Vallier en Ariège. Cette poule ne se serait que très peu reproduite, avec quatre poussins en 1985 et deux en 1987. Christian Nappée doutait alors que la descendance de cette poule n'ait atteint le stade du lâcher.

Les analyses indiquent que tous les individus de la population actuelle analysés partagent un même ancêtre commun, à savoir une poule de la sous-espèce *aquitanicus*. Du fait de la faible taille de la population et de la forte dérive génétique, il est impossible de conclure ou d'exclure que l'unique haplotype mitochondrial fixé dans la population actuelle ne l'ait été sous l'effet d'un avantage sélectif.

D'après les comptages réalisés par Christian Nappée, les effectifs de la population actuelle se situeraient autour d'une trentaine d'individus (Figure 1). Bien que la probabilité soit faible, on ne peut exclure qu'il existe encore aujourd'hui dans les Cévennes des individus issus d'autres femelles fondatrices captives, ou qui descendraient d'individus relâchés entre 2002 et 2005.

Il ne faut pas interpréter les résultats obtenus comme une indication de sélection. En effet, le phénomène de dérive génétique peut entraîner très rapidement la fixation d'un allèle, et ce encore plus rapidement au niveau de l'ADN mitochondrial (taille effective de la population plus faible que pour l'ADN nucléaire). Il est plus probable que la diversité génétique observée dans la population actuelle résulte d'un échantillonnage aléatoire d'allèles de la population d'individus fondateurs.

Diversité génétique de la population actuelle

1. Diversité allélique et hétérozygotie

La population cévenole a été établie à partir d'individus de deux sous-espèces (*Tetrao urogallus aquitanicus* et *T. u. major*), ce qui a contribué au brassage génétique de ces deux lignées. Lors de son établissement, la population cévenole était génétiquement très diversifiée. Comment a évolué la diversité génétique depuis l'établissement de la population, et quelle diversité génétique observe-t-on dans la population actuelle, plus de 20 ans après les derniers lâchers massifs d'individus ?

La diversité génétique a deux composantes, qui sont le nombre d'allèles présents dans la population et la distribution des fréquences alléliques. L'estimation de ces paramètres renseigne sur l'état de la population, mais ne fait sens qu'en comparaison avec d'autres populations de la même espèce. La diversité génétique a été estimée par le nombre d'allèles par locus (N_A), le nombre moyen d'allèles privés (allèles retrouvés chez un seul groupe d'individus) par locus (N_{PA}), l'hétérozygotie attendue (H_E) et l'hétérozygotie observée (H_O). Tous les paramètres ont été estimés avec le programme GENALEX (Peakall and Smouse 2012).

Il est difficile de comparer le nombre d'allèles entre populations du fait que cette valeur dépend en partie du nombre d'individus analysés. Cependant, on observe que pour un effectif égal ($n = 4$), le nombre moyen d'allèles et le nombre moyen d'allèles privés par locus sont plus élevés dans le groupe de fondateurs captifs *major* que dans le groupe *aquitanicus* (Figure 5). Les mesures d'hétérozygoties montrent la même tendance. Ce résultat reflète à la fois la perte de diversité génétique dans la population pyrénéenne suite au déclin démographique de cette population au 19^e siècle (Duriez and Ménoni 2008) et les origines diverses des individus du groupe *major*, issus de centres d'élevage en Allemagne, Autriche et Italie.

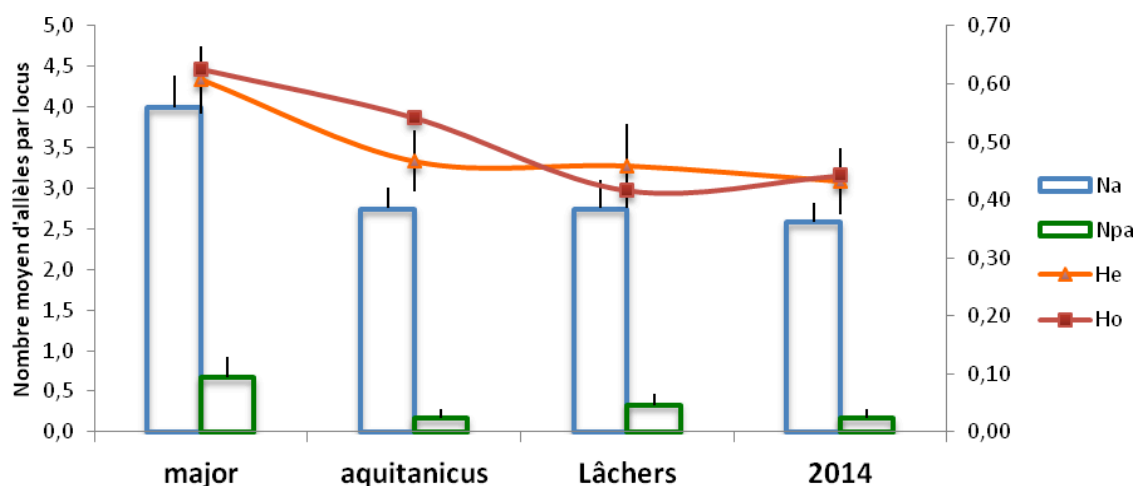


Figure 5 : Diversité génétique des populations fondatrices et de la population cévenole actuelle.

Sont indiqués pour chaque population, le nombre moyen d'allèles (N_A) et le nombre moyen d'allèles privés (N_{PA}) par loci (histogramme, échelle à gauche du graphique), et les taux d'hétérozygotie attendue (H_E) et observée (H_O), échelle à droite sur le graphique).

On observe aussi que la population actuelle, malgré l'effectif le plus important ($n = 21$) montre les plus faibles nombre moyen d'allèles et d'allèles privés par locus (Figure 5). L'hétérozygotie observée (H_o) de la population cévenole reste cependant plus élevée que celle des individus relâchés entre 2002 et 2005, issus d'élevages voisins et probablement consanguins.

La faible diversité génétique de la population cévenole actuelle reflète l'érosion graduelle de la diversité génétique au cours des générations, due au fait que la population était de petite taille et n'a pas reçu d'apport extérieur.

2. Structuration génétique de la population actuelle

Les 21 individus de la population actuelle du PNC proviennent de trois noyaux séparés par des distances d'environ 10 km, la Montagne du Goulet ($n = 1$), le Mont-Lozère Nord ($n = 9$) et le Mont-Lozère Ouest ($n = 11$). Nous avons utilisé une analyse de variance moléculaire (AMOVA) afin de déterminer quelle proportion de la variance moléculaire totale était expliquée par la structuration spatiale de la population cévenole. Cette analyse requiert qu'au moins deux individus soient présents dans chaque population et nous avons donc exclu la femelle observée sur la Montagne du Goulet.

On mesure une différenciation génétique modérée ($F_{ST} = 0.1$) entre les deux noyaux de populations du Mont Lozère. On constate cependant que la différenciation génétique est plus importante, et significative, entre mâles ($F_{ST} = 0.13$, $p = 0.02$) qu'entre femelles ($F_{ST} = 0.05$, $p = 0.15$).

On constate le même type de structure génétique entre les deux noyaux de populations du Mont Lozère qu'entre places de chant voisines dans d'autres populations de Grand tétras (Regnaut et al. 2006). La forte philopatrie des mâles favorise l'apparition de groupes de mâles apparentés sur les places de chant (forte différenciation génétique entre mâles). Les femelles sont plus grégaires et tendent à se déplacer entre les places de chant (différenciation génétique entre femelles faible ou nulle), et à s'établir comme reproductrice ailleurs que là où elles sont nées (brassage génétique entre sous-populations). On peut donc conclure que les noyaux de population Nord et Ouest du Mont Lozère sont connectés par des déplacements d'individus.

Comparaison avec les autres populations françaises

1. Diversité génétique

La diversité génétique peut-être séparée en deux composantes, à savoir le nombre d'allèles présents et la proportion d'individus hétérozygotes dans la population.

Le nombre d'allèles détectés dans une population varie avec le nombre d'individus analysés, ce qui complique la comparaison entre populations de tailles différentes. Afin d'éviter ce problème, nous avons calculé la richesse allélique (A_{17}) avec le programme FSTAT (Goudet 2001). La richesse allélique A_{17} est le nombre moyen d'allèles observés chez 17 individus échantillonnés au hasard dans les quatre populations. Cette mesure est indépendante de la taille des populations et permet donc de comparer la valeur de diversité allélique dans des populations de taille différentes. Nous avons aussi dénombré les allèles privés, c'est-à-dire les allèles qui ne sont présents que dans l'une des quatre populations (N_{PA}).

Si l'appariement entre individus se fait de façon aléatoire (= panmixie), la proportion d'hétérozygotes (notée H_E) est calculée à partir des fréquences alléliques observées dans la population. Cette valeur peut alors être comparée avec l'hétérozygotie observée (notée H_O), qui est la fréquence mesurée d'hétérozygotes dans la population. $H_O = H_E$ dans une population panmictique, $H_O < H_E$ si la population est génétiquement structurée ou si les appariements entre individus apparentés sont favorisés, et $H_O > H_E$ si les appariements entre individus apparentés sont moins fréquents qu'attendu.

On observe que la richesse allélique est plus faible dans les populations cévenole ($A_{17} = 2.6$, Figure 6) et vosgienne ($A_{17} = 2.4$) que dans les populations pyrénéenne et jurassienne ($A_{17} \geq 3.0$). Il n'y a pas de différence notable dans le nombre d'allèles privés entre les quatre populations étudiées ($N_{PA} = 0.4-0.6$). La perte rapide de diversité allélique par dérive génétique dans les populations de petites tailles et génétiquement isolée a été démontrée tant de façon théorique qu'empirique. Il est surprenant de constater que la population vosgienne a la plus faible diversité allélique, malgré des effectifs supérieurs à la population cévenole.

On observe une nette différence entre les taux d'hétérozygotie des populations cévenole, pyrénéenne et jurassienne ($H_E \geq 0.43$, $H_O \geq 0.41$) et la population vosgienne ($H_E = 0.30$, $H_O = 0.30$). On observe que la population cévenole conserve encore un taux d'hétérozygotie élevé, malgré une diversité allélique faible. La dérive génétique affecte en premier lieu la diversité allélique puis l'hétérozygotie et on doit donc s'attendre à une baisse de l'hétérozygotie dans la population cévenole. On constate aussi que la population vosgienne montre les taux d'hétérozygotie les plus faibles. Cette perte rapide de diversité génétique peut s'expliquer par des effectifs faibles, inférieurs à une centaine d'individus (Lefranc and Preiss 2008) et une connectivité nulle ou très faible avec les populations voisines du Jura et de la Forêt Noire. De plus, l'aire de répartition de l'espèce au niveau régional est très fragmentée et les sous-populations sont distantes de plusieurs dizaines de km, ce qui limite les échanges et favorise la consanguinité (faible hétérozygotie) dans les sous-populations.

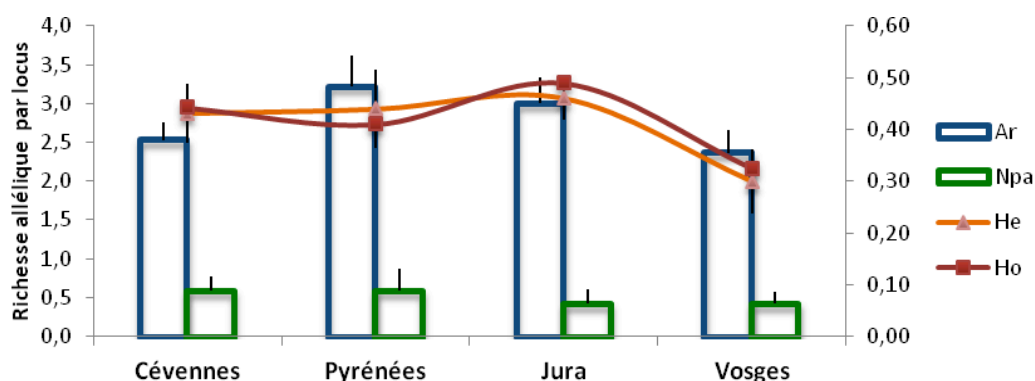


Figure 6: Diversité génétique des populations de Grand tétras des Cévennes, Pyrénées, Jura et Vosges
L'histogramme (échelle à gauche du graphique) indique la richesse allélique moyenne par locus observée (A_r) et le nombre moyen d'allèles privés par locus (N_{pa}) dans les quatre populations. Les deux courbes (échelle à droite du graphique) indiquent respectivement les taux d'hétérozygotie attendue (H_e) et observée (H_o).

2. Différentiation génétique

La population cévenole est issue d'individus des sous-espèces *Tetrao urogallus aquitanicus* et *T. u. major*. Le génome des individus cévenols est constitué d'allèles caractéristiques des deux sous-espèces.

Au niveau local, les fréquences alléliques ne diffèrent pas entre les deux noyaux étudiés et les analyses n'ont pas permis de détecter de structuration génétique à l'intérieur de la population cévenole (résultat non illustré). Ces résultats suggèrent que des individus se déplacent régulièrement entre les deux noyaux étudiés.

Au niveau national, nous avons fait les deux hypothèses suivantes :

1. Les populations pyrénéenne, jurassienne et vosgienne étaient génétiquement différenciées.
2. Il serait possible de détecter dans la population cévenole, la signature du brassage génétique entre les sous-espèces *aquitanicus* et *major*.

L'analyse des quatre populations françaises avec le programme STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) indique que les individus sont assignés avec une très forte probabilité à leur population d'origine (Pyrénées, Cévennes, Jura et Vosges), ce qui n'apporte que peu d'information. On n'observe pas de signature du brassage génétique entre les sous-espèces *aquitanicus* et *major* dans la population cévenole, ce qui indique une différenciation génétique rapide (forte dérive génétique résultant du faible nombre d'individus, Figure 7).

Nous avons donc conduit une analyse complémentaire afin de mieux décrire les effets de la récente perte de diversité génétique observée dans les populations des Cévennes et des Vosges. L'analyse en coordonnées principales est une méthode permettant de décrire la variabilité d'un jeu de données (*i.e.* les génotypes des individus) en un minimum de dimensions. Dans le cas présent, les individus sont représentés par un point dans un graphique à deux dimensions (Figure 8, axes 1 et 2).

On peut noter que les populations vosgienne et cévenole sont situées de part et d'autre de l'axe des abscisses (Axe 1), ce qui indique que ces deux populations sont génétiquement très différenciées. La différenciation génétique entre ces deux populations représente plus de 40 % de la variabilité génétique totale. Les populations cévenole et pyrénéenne sont situées de part et d'autre de l'axe des ordonnées (Axe 2), qui capture 20 % de la variabilité génétique totale.

L'analyse en coordonnées principales illustre le fait que les deux populations de petite taille et isolée génétiquement ont très rapidement divergé et sont maintenant très différenciées des autres populations.

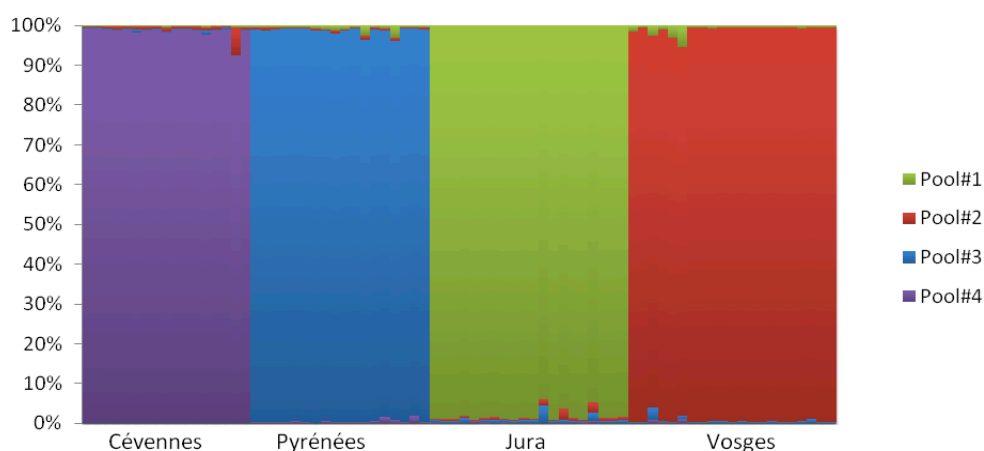


Figure 7: Différentiation génétique entre les populations cévenole, pyrénéenne, jurassienne et vosgienne.

Chaque individu est représenté par une barre verticale et la proportion du génome contribué par les quatre pools génétiques est illustrée par des aires de couleur. Les populations étudiées sont génétiquement différenciées. La dérive génétique a entraîné la différenciation génétique rapide de la population cévenole qui apparaît aujourd'hui comme une population à part entière. On ne détecte plus l'origine hybride de la population cévenole, pas plus que les liens historiques entre les populations jurassienne et vosgienne, isolée génétiquement depuis quelques décennies seulement.

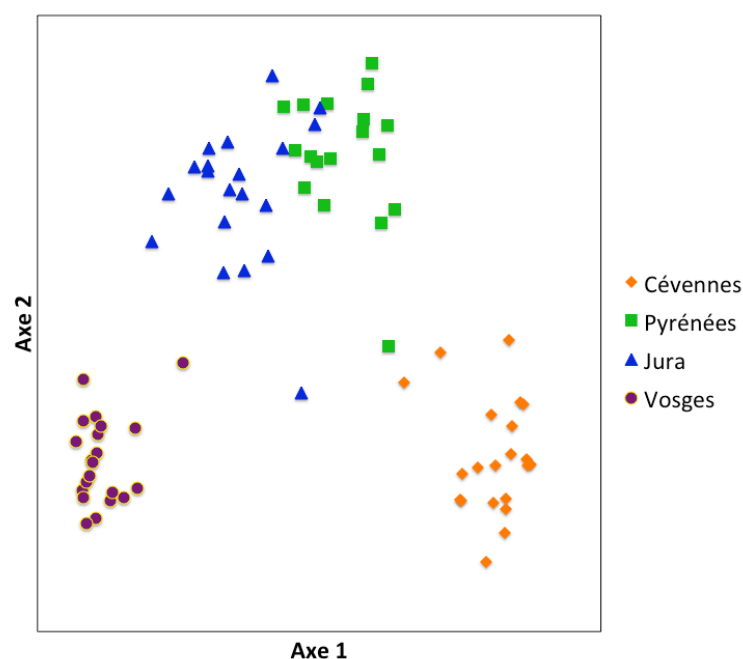


Figure 8: Différentiation génétique entre les populations cévenole, pyrénéenne, jurassienne et vosgienne.

L'analyse en coordonnées principales permet de visualiser la différenciation génétique entre les quatre populations françaises. Les populations vosgienne et cévenole sont les plus différenciées. Ce résultat illustre la rapidité avec laquelle des populations isolées et de petite taille divergent et perdent de la diversité génétique.

Implications pour la gestion de l'espèce dans la Massif Central

1. La population cévenole est-elle menacée par la perte de diversité génétique ?

La néo-population cévenole a été fondée à partir d'individus provenant des Pyrénées, sous espèce *Tetrao urogallus aquitanicus*, et de différentes populations ou centres d'élevage de la sous-espèce *T. u. major*. La diversité génétique de cette population était relativement élevée durant les premières années après sa réintroduction. Cependant, les analyses effectuées suggèrent que la diversité génétique a très fortement diminué deux décennies après la fin des lâchers massifs d'individus. L'absence d'échanges génétiques avec les populations voisines et la petite taille de la population cévenole ont favorisé la dérive génétique et la différenciation génétique avec les populations pyrénéennes et alpines dont elle est issue.

L'intégration de paramètres démographiques collectés par suivi télémétrique a permis d'estimer la taille minimale nécessaire pour assurer la viabilité d'une population de Grand tétras. Grimm et Storch (2000) ont ainsi estimé qu'un minimum de 470 individus permettrait d'abaisser à moins d'1 % la probabilité d'extinction à 100 ans de la population de Grand tétras des Alpes bavaroises. Cet effectif minimum est susceptible de varier entre zones de présence du tétras, mais renseigne sur l'ordre de grandeur requis pour maximiser résilience d'une population à des événements stochastiques.

Les événements stochastiques ne sont cependant pas le seul risque encouru par les populations de petites tailles. Nous avons pu constater que la dérive génétique a entraîné une perte d'allèles plus rapide de la diversité génétique dans les populations cévenole ($n \pm 30$ individus) et vosgienne ($n \leq 100$ individus) que dans la population jurassienne estimée à 400 individus. Le suivi d'une population de tétraonides lors d'une phase de déclin a mis en évidence une perte rapide de diversité génétique (Bouzat et al. 1998). Bien que les causes mécanistiques ne soient pas connues, cette étude suggère que l'augmentation de la consanguinité dans la population a entraîné une baisse de la fécondité des femelles (augmentation du nombre d'œufs non-fécondés), ce qui aurait accéléré le déclin de la population (Bouzat et al. 1998; Westemeier et al. 1998).

Du fait de la susceptibilité de la population cévenole tant à des événements stochastiques qu'à une perte rapide de diversité génétique, des mesures sont nécessaires visant dans un premier temps à stopper l'érosion puis à augmenter la diversité génétique et les effectifs de la population cévenole.

2. Quelle origine génétique choisir pour renforcer la population cévenole?

La présente étude avait comme objectif d'évaluer le renforcement de la population cévenole par la translocation d'individus sauvages. Les analyses effectuées n'ont pas révélé de signes de sélection en faveur ou en défaveur d'une des deux sous-espèces intégrées dans le centre d'élevage de Ventajols. Il n'est cependant pas non plus possible d'exclure que l'haplotype mitochondrial ou les allèles nucléaires hérités des sous-espèces *major* et *aquitanicus* aient pu apporter un avantage sélectif aux individus. Au regard de ces résultats, il ne semble pas qu'il y ait d'arguments objectifs pour exclure l'une ou l'autre des deux sous-espèces comme source d'individus pour renforcer la population cévenole.

Comme souligné par Christian Nappée, le lâcher d'individus nés et élevés en captivité ne doit pas être négligé. Cette technique a en effet permis, moyennant certaines précautions lors de l'élevage des jeunes dans le centre de Ventajols et après le lâcher des individus, d'établir la population cévenole. Les résultats de la présente étude suggèrent que la phase de renforcement a été un échec, en partie du à la faible survie des individus relâchés. De ce fait, le renforcement démographique ne peut se concevoir que par le lâcher massif d'individus sur une période relativement longue, ce qui exclut une origine sauvage des individus relâchés. Une telle opération demanderait donc la mise en place d'un centre d'élevage comme cela a été entrepris durant la phase de réintroduction, entre 1978 et 1994.

Une stratégie alternative serait de viser au renforcement génétique, c'est-à-dire de restaurer une diversité génétique élevée dans la population. En principe, cet objectif peut être atteint en relâchant annuellement un nombre limité d'individus, qui peuvent alors être prélevés dans des populations sauvages. Outre la question de l'approvisionnement en oiseaux issus de populations sauvages qui ne sera pas abordée dans ce rapport, la mise en application du renforcement génétique d'une population demande un certain nombre de précautions.

Il faut en premier lieu s'assurer que la dynamique de la population est négativement affectée par une faible diversité génétique ou une forte consanguinité. Le suivi d'un autre tétraonidé (*Tympanuchus cupido*) suggère que la survie et la fécondité des individus sont négativement corrélées avec la consanguinité (Westemeier et al. 1998). Dans ce cas, la translocation de quelques individus issus de populations voisines a permis de restaurer la diversité génétique et les paramètres démographiques de la population en déclin (Bouzat et al. 2009). On observe que la diversité génétique de la population cévenole a fortement décliné depuis les premières phases de réintroduction. On peut donc s'attendre à ce que la survie et la fécondité des individus soient affectées par la consanguinité. De ce fait, la translocation de quelques individus par an, et ce durant plusieurs années, dans la population cévenole pourrait avoir des effets bénéfiques.

Comme justement indiqué par Bouzat et al. (2009), il est aussi important de s'assurer que l'expansion en nombre de l'espèce n'est pas limitée par la disponibilité en habitat. L'étude de Leclercq et al. (Leclercq et al. 2012) montre que ce n'est pas le cas.

Un problème récurrent dans les programmes de renforcement de population est de trouver la juste balance entre un nombre de reproducteurs effectifs (= un flux de gènes) suffisant pour restaurer la diversité génétique de la population cible, tout en conservant les caractéristiques génétiques de la population résiduelle. Cette discussion n'a pas lieu d'être dans le cas de la population cévenole, issue du mélange de deux sous-espèces.

Enfin, il est indispensable de mettre en place un suivi de la population visant à déterminer l'efficacité des opérations de renforcement par l'estimation de la diversité génétique et/ou de paramètres démographiques. L'analyse du succès reproducteurs des individus relâchés permettrait par exemple de préciser le nombre minimum d'individus de chaque sexe qui doit être relâché par année et la durée minimale d'une telle opération.

Bien que cela semble anecdotique, et dépasser les objectifs fixés, il est très important de réaliser un suivi rigoureux dans l'idée de rendre les résultats accessibles à la communauté scientifique et aux acteurs impliqués dans des programmes de conservation. Il y a peu de programme de renforcement de populations mis en place et une fraction seulement est suffisamment détaillée et permet d'améliorer la compréhension des facteurs déterminant le succès ou l'échec des programmes de conservation.

3. La diversité génétique est elle responsable du déclin de la population cévenole ?

Les informations permettant de conduire une étude sur la relation entre diversité génétique et dynamique des populations sont disponibles. En effet, Christian Nappée détient aujourd'hui une collection de plumes collectées annuellement sur toute la zone de présence connue de l'espèce dans les Cévennes. Cette série temporelle inclut la phase d'expansion en nombre de la population cévenole, qui s'est accompagnée par la colonisation de nouveaux territoires et comporte donc probablement des informations capitales sur les échanges entre noyaux de populations. Après cette phase d'expansion, la population cévenole a d'abord décliné juste après la fin des lâchers, puis s'est maintenu à effectif réduit depuis 2005 (Figure 1). Par l'analyse de cette série temporelle, il serait possible de retrouver les signatures génétiques des phénomènes qui ont contraint l'expansion de l'espèce malgré une bonne disponibilité d'habitats favorables. Il serait ainsi particulièrement intéressant d'étudier l'impact de la consanguinité sur la fécondité et la survie des mâles et des femelles, et les conséquences sur la dynamique de la population.

Annexe : Description des méthodes utilisées

1. Estimation de la diversité génétique

On distingue deux composantes de la diversité génétique d'une population :

- le nombre moyen d'allèles présents à chaque locus (noté A),
- la fréquence des hétérozygotes dans la population (hétérozygotie observée notée H_O), et la fréquence des hétérozygotes si les allèles sont associés au hasard pour former les génotypes (hétérozygotie attendue notée H_E).

Déterminer le nombre d'allèles à un locus ne demande aucun calcul particulier, puisqu'il suffit d'énumérer dans la population le nombre d'allèles détectés à un locus particulier. On utilise généralement le nombre moyen d'allèles par locus, c'est-à-dire le nombre total d'allèles observés divisé par le nombre de loci analysés.

Si les allèles sont associés au hasard pour former les génotypes, l'hétérozygotie observée est égale à l'hétérozygotie attendue. Si les individus tendent à se reproduire avec des individus apparentés (consanguinité) ou que la population est génétiquement structurée, on observe alors que l'hétérozygotie observée est inférieure à l'hétérozygotie attendue. Dans le cas où les individus préfèrent des individus génétiquement distants (évitement de la consanguinité) on observe que l'hétérozygotie observée est supérieure à l'hétérozygotie attendue. L'estimation de l'hétérozygotie attendue et observée permet donc de caractériser le mode de reproduction à l'intérieur d'une population.

L'hétérozygotie observée peut être calculée en utilisant la formule suivante :

$$H_O = 1/N \sum H_i$$

N est le nombre total de loci analysés, et H_i est l'hétérozygotie observée au locus i.

Pour un locus A à k allèles A_1, A_2, \dots, A_k de fréquences f_1, f_2, \dots, f_k , l'hétérozygotie attendue peut être calculée en utilisant la formule suivante :

$$H_{Ei} = 1 - (f_1^2 + f_2^2 + \dots + f_k^2) = 1 - \sum f^2$$

$$H_E = 1/N \sum H_{Ei}$$

N est le nombre total de loci analysés, et H_{Ei} est l'hétérozygotie attendue au locus i

2. Assignement des échantillons à des individus

Chaque échantillon a été amplifié dans 4–8 réactions de PCR, en suivant l'approche recommandée par Taberlet et al. (1996) pour l'analyse d'échantillons d'ADN potentiellement dégradés. Pour chaque échantillon, nous avons déterminé un génotype consensus et calculé l'index de qualité (Miquel et al. 2006). Une fois le génotype déterminé, nous avons utilisé GENALEX (Peakall and Smouse 2012) pour regrouper les paires d'échantillons ayant le même génotype et pour calculer

la probabilité que deux individus dans la populations partagent le même génotype (Taberlet and Luikart 1999).

3. Assignment à une population d'origine et structuration génétique

L'un des buts de l'analyse génétique était d'estimer l'apport relatif des deux clades réintroduits, à savoir le clade retrouvé aujourd'hui dans les régions d'Europe centrale et du nord, et le clade de la péninsule ibérique et des Balkans, et leur structuration spatiale. Nous avons utilisé trois méthodes différentes pour répondre à cette question.

a. Test d'assignment

Nous avons suivi la méthode proposée par Paetkau et Strobeck (1994) qui ont défini un test permettant de déterminer pour chaque individu capturé sa population d'origine la plus probable. Ce test est basé sur les fréquences alléliques observées dans les populations étudiées. Ce test ne nécessite aucune hypothèse quant au mode de reproduction à l'intérieur de la population cévenole, mais ne permet d'obtenir qu'un résultat qualitatif.

b. Structuration génétique et contribution relatives des pools génétiques

En faisant l'hypothèse que les populations étudiées sont à l'équilibre de Hardy–Weinberg, il devient possible de quantifier la contribution relative de différents pools génétiques à la diversité génétique d'une population. C'est la méthode proposée par Pritchard et al. (Pritchard et al. 2000) et implémentée dans le programme STRUCTURE que nous avons utilisé dans cette étude. L'hypothèse de populations à l'équilibre de Hardy–Weinberg n'est pas testable avec des populations de taille aussi faible que celles analysées dans cette étude. Les résultats obtenus avec STRUCTURE apparaissent à première vue plus précis que le test d'assignment de Paetkau et Strobeck. Cependant, nous n'avons pas connaissance de publications testant l'impact de la violation de cette hypothèse sur la fiabilité des analyses.

Nous avons déterminé la structuration génétique des populations de Grand tétras en France en utilisant plus de 20 individus par population. Ces effectifs nous ont permis de tester que les populations ne déviaient pas de l'équilibre de Hardy–Weinberg. Les résultats obtenus par STRUCTURE sont donc valides à cette échelle spatiale.

c. Autres tests de structuration génétique

Nous avons aussi utilisé une analyse statistique appelée Analyse en Composantes Principales (ACP), qui permet de réduire l'information contenue dans les onze marqueurs microsatellites en deux axes indépendants (une espace à deux dimensions) capturant au mieux la variabilité génétique des populations étudiées. Enfin, nous avons utilisé une analyse de variance moléculaire (AMOVA, Excoffier et al. 2002) afin d'estimer quelle proportion de la variance totale est issue de la structuration génétique de la population cévenole, ce qui équivaut à tester si la population cévenole est génétiquement structurée. L'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse de variance moléculaire (AMOVA) ont été effectuées en utilisant le programme GENALEX (Peakall and Smouse 2012).

Remerciements

Cette étude a été financée dans le cadre d'une convention de partenariat de recherche (n°2014/16/6171) par l'Office national de la chasse et de la faune sauvage, le Parc National des Cévennes et l'Université de Fribourg.

Cette étude n'aurait pu être réalisée sans les échantillons de plumes, crottes et muscle provenant d'individus du centre d'élevage de Ventajols ou de la population actuelle, tous fournis par Christian Nappée. Les échantillons de plumes des populations vosgiennes, jurassiennes et pyrénéennes ont été fournis respectivement par le Groupe tétras Vosges, le Groupe tétras Jura, et l'ONCFS.

Les corrections et commentaires apportés par Jocelyn Fonderflick, Emmanuel Ménoni et Christian Nappée ont grandement améliorés la version finale de ce rapport.

Références

- Bouzat JL, Cheng HH, Lewin HA, et al (1998) Genetic evaluation of a demographic bottleneck in the Greater Prairie Chicken. *Conservation Biology* 12:836–843.
- Bouzat JL, Johnson JA, Toepfer JE, et al (2009) Beyond the beneficial effects of translocations as an effective tool for the genetic restoration of isolated populations. *Conservation genetics* 10:191–201. doi: 10.1007/s10592-008-9547-8
- Duriez O, Ménoni E (2008) Le Grand Tétrás *Tetrao urogallus* dans les Pyrénées: historique et statut actuel. *Ornithos* 15:272–281.
- Duriez O, Sachet J-M, Ménoni E, et al (2007) Phylogeography of the capercaillie in Eurasia: what is the conservation status in the Pyrenees and Cantabrian Mounts? *Conservation genetics* 8:513–526. doi: 10.1007/s10592-006-9165-2
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (2002) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices.
- Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJ (1998) A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7:1071–1075.
- Grimm V, Storch I (2000) Minimum viable population size of capercaillie. *Wildlife Biology* 6:219–225.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
- Jacob G, Debrunner R, Gugerli F, et al (2009) Field surveys of capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Swiss Alps underestimated local abundance of the species as revealed by genetic analyses of non-invasive samples. *Conservation genetics* 11:33–44. doi: 10.1007/s10592-008-9794-8
- Leclercq B, Ménoni E, Montadert M (2012) Réintroduction du Grand Tétrás par le Parc National des Cévennes. Bilan en 2012, enseignement tirés de ce projet, perspectives d’avenir.
- Lefranc N, Preiss F (2008) Le Grand Tétrás *Tetrao urogallus* dans les Vosges: historique et statut actuel. *Ornithos* 15:244–255.
- Miquel C, Bellemain E, POILLON C, et al (2006) Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach. *Molecular Ecology Notes* 6:985–988. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01413.x
- Nappée C (2008) Le Grand Tétrás *Tetrao urogallus* dans les Cévennes : histoire d’une réintroduction difficile. *Ornithos* 15:282–293.
- Nappée C (1984) Réintroduction du Grand tétras (*Tetrao urogallus*) dans le Parc National des Cévennes. *Le Grand Duc* 24:19–21.

- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4:347–354.
- Paetkau D, Strobeck C (1994) Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3:489–495.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Piertney SB, Höglund J (2001) Polymorphic microsatellite DNA markers in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Molecular Ecology Notes* 1:303–304.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Regnaut S, Christe P, Chapuisat M, Fumagalli L (2006) Genotyping faeces reveals facultative kin association on capercaillie's leks. *Conservation genetics* 7:665–674. doi: 10.1007/s10592-005-9097-2
- Segelbacher G, Paxton RJ, Steinbrück G, et al (2000) Characterization of microsatellites in capercaillie *Tetrao urogallus* (AVES). *Molecular Ecology* 9:1934–1935.
- Taberlet P, Griffin SS, Goossens B, et al (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24:3189–3194. doi: 10.1093/nar/24.16.3189
- Taberlet P, Luikart G (1999) Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of The Linnean Society* 68:41–55.
- Westemeier RL, Brawn JD, Simpson SA, et al (1998) Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science (New York, NY)* 282:1695–1698.