



**apron**

# Plan national d'actions en faveur de l'apron du Rhône 2012-2016

## Action 7: Etudes génétiques

Rapport de fin de travaux, Décembre  
2017



## PNA apron du Rhône – Action 7 : Etudes génétiques

Rapport de fin de travaux

Decembre 2017

**Vincent DUBUT, Rémi CHAPPAZ**  
UMR 7263 – IMBE  
Aix-Marseille Université, Université d'Avignon, CNRS, IRD  
Station Marine d'Endoume  
Chemin de la Batterie des Lions  
F-13007 Marseille

**Correspondance** : [vincent.dubut@imbe.fr](mailto:vincent.dubut@imbe.fr)





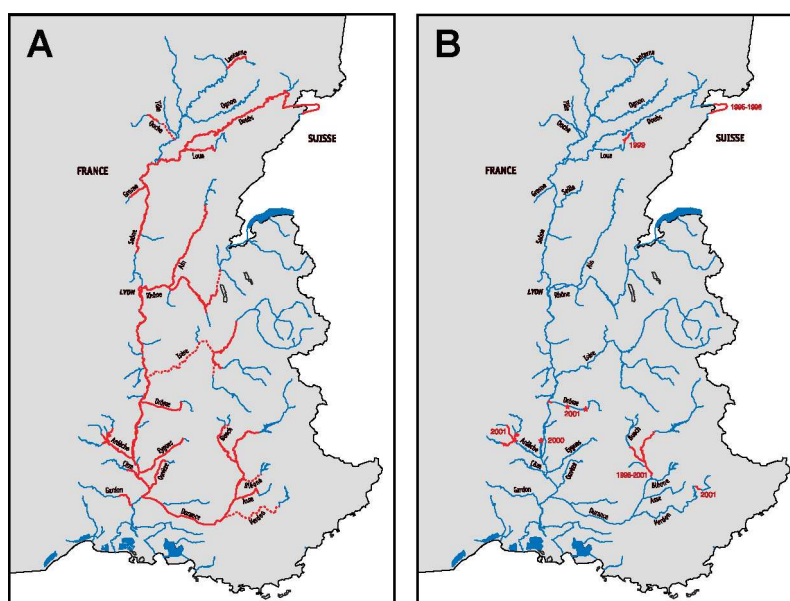
## **Remerciements**

Les auteurs tiennent à remercier chaleureusement les nombreuses personnes qui ont participé aux prospections et aux captures de nuit et notamment l'ensemble des techniciens et ingénieurs de l'Agence Française pour la Biodiversité pour leur soutien logistique et leur appui technique lors des campagnes d'échantillonnage. Nous remercions spécialement François Huger et Patrick Gindre pour les campagnes menées sur la Loue, Frédéric Maillot et Patrick Gélibert pour l'échantillonnage sur la Drôme, et Laurent Mendras et son équipe pour les campagnes menées sur l'Ardèche et la Beauce. Les auteurs remercient aussi Mickaël Béjean (Muséum de Besançon) pour son aide et sa disponibilité lors des prélèvements de géniteurs à Besançon, mais aussi pour les précisions qu'il nous a apporté quant au déroulement des opérations de reproduction artificielles et de réintroduction dans la Drôme. Nous remercions aussi Gauthier Monnet pour son aide lors de l'analyse scalimétrique des apons capturés à l'amont du pont de Blacons.



## 1. CONTEXTE de l'ETUDE

L'apron du Rhône (*Zingel asper* L.) est un poisson de la famille des Percidés endémique du bassin du Rhône. Cette espèce nécessite des fonds non colmatés pour la survie des œufs (qui sont ensevelis sous les graviers) et des zones calmes durant la phase planctonique des larves (50 jours). L'habitat préférentiel de cette espèce est caractérisé par des sections de rivière avec une pente de 3 à 10 ‰, une eau de qualité 1A, un débit allant de 7 à 130 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> pour une vitesse du courant allant de 0,02 à 0,79 m.s<sup>-1</sup>, et une température de ponte entre 6 et 14°C (Boutitie 1984 ; Changeux & Pont 1995 ; Labonne *et al.* 2003 ; Cavalli *et al.* 2003, 2009). Avant le début du XXe siècle, l'apron était présent sur l'ensemble du bassin du Rhône, incluant le cours principal du fleuve et la majorité de ses affluents (Boutitie 1984 ; Olivier *et al.* 2009). A partir de la seconde moitié du XXe siècle, l'apron va perdre presque 90% de son aire de répartition historique (Figure 1).



**Figure 1.** Aire de répartition de l'apron (A) vers 1900 et (B) vers 2000 (d'après : Boutitie 1984 ; Mari 2001).

Cette diminution drastique est liée à un impact toujours croissant des activités humaines sur le milieu : fragmentation de l'habitat, perturbation de l'hydrologie et de la géomorphologie naturelles des cours d'eau (en lien avec l'aménagement et l'exploitation de ces cours d'eau) et pollution (Mari *et al.* 2002). Cette espèce est aujourd'hui restreinte à quelques populations qui ne sont pas en connexion biologique (Georget *et al.* 2009), c'est-à-dire qui ne peuvent pas échanger de migrants. En France, seules quatre populations relativement importantes persistent dans le bassin du Rhône : (i) dans le sous-bassin de l'Ardèche, (ii) sur la Loue dans le sous-bassin du Doubs, (iii) dans la Durance et le Buëch, et (iv) dans les Grandes Gorges du Verdon. Une cinquième population est présente sur le cours du Doubs suisse.

La chute de ses effectifs et de la diminution drastique de son aire de répartition ont justifié que l'apron soit aujourd'hui :

- Protégé au niveau national,
- Classé « en danger critique d'extinction » sur la liste rouge des espèces menacées en France (en tête de liste, tous taxons confondus ; Savouré-Soubelet, 2015),
- Considéré comme « en danger d'extinction » dans le bassin Rhône-Méditerranée-Corse,
- Inscrit aux annexes II et IV de la Directive européenne « Habitats-Faune-Flore »,
- Inscrit à l'annexe II de la Convention de Berne,
- Considéré comme « gravement menacé d'extinction » au niveau mondial (IUCN 2013).

Cette espèce a bénéficié de deux programmes LIFE (LIFE Apron I et LIFE Apron II) lesquels ont été pilotés par Réserve Naturelle de France (1998-2001) et le Conservatoire d'espaces naturels Rhône-Alpes (CEN RA ; 2004-2010).

C'est dans le cadre du Plan National d'Action en cours (2011-2016), piloté par la DREAL Rhône-Alpes et coordonnée par le CEN Rhône-Alpes, que ce travail a été réalisé. Il vise à répondre aux objectifs de la Fiche-Action N°7 « Etude de Génétique » :

- caractériser l'impact du cloisonnement et du décloisonnement sur la structure et la diversité génétique des populations d'apron,
- assurer un suivi démogénétique de certaines populations ayant été fragilisées par les aménagements (rivières Verdon et Buëch),
- assurer un suivi génétique de l'opération de réintroduction de l'apron dans la rivière Drôme

Le présent rapport fait la synthèse des résultats obtenus entre 2012 et 2016 dans le cadre du PNA en faveur de l'apron. Dans un objectif de synthèse des résultats acquis à l'échelle de l'espèce, ce rapport inclut aussi des résultats issus d'études antérieures au PNA et conduites entre 2007 et 2009 dans le Bassin de la Durance (Dubut et al. 2012) et du Verdon (Dubut et al. 2011), ainsi qu'une contextualisation phylogéographique de la structure et de la diversité génétique de l'espèce qui inclut un échantillon de la population d'aprons présente sur le cours du Doubs suisse (Dubut et al. 2017).



# 1. LA DIVERSITE GENETIQUE : SON INTERET POUR LA CONSERVATION

## 1.2. Qu'est-ce que la diversité génétique ?

La diversité génétique d'une espèce ou d'une population représente la somme de l'information contenue au sein du génome de ces deux unités. Le génome est quant à lui constitué par l'ensemble des régions de l'ADN qui codent ou non pour les caractères d'un individu (sa couleur, sa forme, sa capacité à résister au courant, etc.). Seules quatre molécules différentes, appelées bases, permettent d'encoder cette information : l'adénine (A), cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). C'est l'association de ces quatre bases A, C, G et T et l'ordre dans lequel elles sont associées qui forme le code génétique. Les brins d'ADN forment quant à eux des chromosomes. La plupart des Percidés ont 24 paires de chromosomes. Chaque individu présente deux chromosomes homologues par paire et donc deux versions (qui peuvent être différentes ou identiques) pour chacun des codes contenus dans son génome : une version reçue de sa mère et une version reçue de son père. La quasi-totalité du génome est contenu dans le noyau des cellules qui forment un organisme ; il est donc appelé ADN nucléaire. Seul l'ADN mitochondrial (ADNmt) fait exception, et se situe à l'extérieur du noyau des cellules.

La méthode la plus directe pour mesurer la diversité génétique réside dans l'analyse de l'arrangement (appelé séquence) des quatre bases. Si on considère deux séquences d'ADN (qui peuvent par exemple appartenir à deux individus différents), pour un même endroit de cette séquence (endroit appelé locus), l'ordre des bases peut être identique ou peut différer en partie. Lorsqu'il y a des différences, elles peuvent être dues soit à la nature des bases (différences qualitatives) soit au nombre de bases (différences quantitatives).

Prenons le cas de deux séquences homologues (qui correspondent à un même locus) qui diffèrent en partie par la nature de leur bases :

Séquence A1 : ATTCGCGTTGAAAGCTGATCGA

Séquence A2 : ATTCGCGTCGAAAGCTGATCGA

Les séquences sont identiques sauf pour une base (en rouge : un T dans le cas de la Séquence A1, et un C pour la Séquence A2). Dans ce cas, c'est la nature des bases qui est différente et qui crée la diversité au sein de la population qui contient ces deux séquences différentes. Dans le cadre cette étude, ce type de modifications va être analysé dans le cadre de ce travail pour l'ADN mitochondrial.

Maintenant, prenons le cas de deux autres séquences homologues à un autre locus :

Séquence B1 : GTTTAGCAGTGTGTGTGTGTGTCAGGATCTTCGG

Séquence B2 : GTTTAGCAGTGTGTGTGTGTGTCAGGATCTTCGG

Les séquences sont identiques excepté deux bases supplémentaires (en vert) pour la Séquence B2. Dans ce cas, c'est le nombre de bases qui est différent et qui crée la diversité au sein de la population qui contient ces deux séquences différentes. Dans le cas des Séquences B1 et B2, le nombre de bases est différent au niveau d'un motif particulier de la séquence, constitué par la répétition d'un motif de deux bases : GT (en rouge). Dans le cas de la Séquence B1 le motif est répété 6 fois, alors qu'il est répété 7 fois dans le cas de la séquence B2. C'est ce type de motifs, répétés en tandem, qui sont appelés des microsatellites.

Quel que soit le type de différences (de nature ou de nombre), des séquences différentes constitueront des allèles différents à un locus donné.

Dans une démarche de conservation, l'objectif est de mesurer cette diversité génétique. La première étape consiste à identifier et à compter les allèles différents pour une espèce donnée ou au sein des populations qui forment cette espèce. En effet, il y a une relation directe entre diversité génétique et potentiel évolutif (Allendorf et Luikart 2006 ; Frankham et al. 2010). Plus la diversité génétique d'une population sera importante (plus il y aura de codes différents pour la même fonction), plus cette population aura des chances de répondre favorablement aux changements spatiaux et temporels de son environnement.

Une faible diversité génétique potentialise donc des lacunes vis-à-vis des changements environnementaux et peut également être associée à une sensibilité accrue aux pathogènes (virus, bactéries et parasites).

## 2-2. Les processus conduisant à la réduction de la diversité génétique

Certaines populations animales sont relativement importantes : des milliers d'individus sont connectés par un réseau lâche de reproduction qui assure les flux génétique au sein de ces populations. En revanche, d'autres populations peuvent être de taille plus réduite, par exemple lorsqu'elles sont confinées à un habitat de taille limitée et sont privées de connexion reproductive avec les autres populations de la même espèce. Dans ce cas, la diversité de ces petites populations va le plus souvent être inférieure à celle des populations de plus grande taille. Ces petites populations ne représentent en effet qu'un échantillon de taille limitée de la diversité génétique de l'espèce et subissent ainsi ce qui est appelé un goulot d'étranglement génétique.

Les goulots d'étranglement entraînent généralement la perte d'une partie des allèles, notamment les allèles rares (= peu fréquents). Lorsqu'un goulot d'étranglement est sévère, il va alors amplifier un processus appelé la dérive génétique aléatoire. La dérive génétique va accélérer davantage la perte des allèles et modifier rapidement la fréquence des allèles par rapport aux autres populations. En effet, au sein de petites populations, à chaque génération, n'est retenue qu'une partie de la variation de la génération précédente (Hartl et Clark 2007). C'est par la dérive génétique que va s'accélérer le processus de différenciation entre des populations qui n'échangent plus de migrants.

Les barrages construits sur le cours des rivières permettent de stocker l'eau afin de servir des enjeux socio-économiques (production d'énergie électrique, pêche, usages domestiques et agricoles, tourisme, contrôle des crues, etc.). L'objectif de ce type d'ouvrages est de compenser les fluctuations temporelles des débits naturels qui iraient à l'encontre des besoins liés aux activités humaines. Les barrages et les seuils ont ainsi un impact important sur l'hydrologie et la morphologie de la rivière (Helfman 2007) et les perturbations qu'ils occasionnent concernent des processus naturels qui déterminent la mosaïque et entretiennent la dynamique des habitats de la rivière (Junk et al. 1989 ; Richards et al. 2002). Les espèces et les populations de la rivière impactée subissent généralement de fortes contraintes en lien avec la perte et l'altération des habitats et de leur fonctionnalité (Vaughn 2010) :

- Une interruption ou une altération des migrations et des mouvements des populations (Lucas & Frear 1997). Ce type d'altération réduit la capacité des poissons à coloniser ou recoloniser des patchs d'habitats favorables, dans la mesure où leur taux de recolonisation est en relation avec la distance depuis les populations sources (Detenbek et al. 1992 ; Lonzarich et al. 1998)
- Une perte de richesse en espèce et/ou une altération des communautés ichthyennes (Belliard et al. 1999 ; Freeman et al. 2001 ; Miranda et al. 2005 ; Poulet 2007). Ces modifications pénalisent les espèces spécialisées de rivière, qui tendent à être remplacées par des espèces plus généralistes (Aarts et al. 2004)
- Une diminution de la taille (Morita & Yamamoto 2002) et de la densité (Schiemer & Spindler 1989 ; Tiemann et al. 2004) des populations
- Une diminution du recrutement (en agissant notamment sur la survie des juvéniles : Jurajda 1995 ; Freeman et al. 2001)

L'ensemble de ces éléments vont contribuer à dégrader la structure et la diversité génétique des populations et peuvent à terme conduire à l'extinction des populations (Fagan 2002). En particulier, il existe deux types de risques en lien avec la diminution de l'effectif des populations : (i) des risques démographiques, car plus la taille d'une population sera réduite plus elle sera à la merci de la stochasticité de sa démographie ou de l'environnement (Schaffer 1981 ; Lande 1993) ; et (ii) des risques génétiques, les petites populations seront davantage sujettes à des stress liés à la perte de diversité génétique, liée à la diminution de l'effectif efficace ( $N_e$ ) (Knaepkens et al. 2004, Alò & Turner 2005). Cette dernière potentialise en effet, d'une part, une augmentation des risques liés à la consanguinité

(Ellstrand & Elam 1993 ; Lynch et al. 1995) et, d'autre part, une diminution du potentiel évolutif (Allendorf & Luikart 2006 ; Frankham et al. 2010). En effet, moins la diversité génétique d'une population sera importante, moins cette population aura des chances de répondre favorablement aux changements physiques et temporels de son environnement.

### **2-3. Les types de marqueurs génétiques et leur intérêt**

Un des marqueurs les plus utilisés pour étudier le polymorphisme génétique des populations animales est l'ADN mitochondrial (ADNmt), transmis exclusivement par les femelles chez les vertébrés. Présentant un taux d'évolution (c'est-à-dire une capacité à produire des nouveaux allèles par la mutation) modéré, l'ADNmt est particulièrement utile pour reconstruire l'histoire et la structuration anciennes d'une espèce et des populations qui la composent.

En outre, comme l'ADNmt n'est transmis que par les femelles, pour un mâle et une femelle d'une même population qui présenteront à eux deux 4 copies d'un locus nucléaire, il n'y aura qu'une seule copie d'ADNmt qui pourra être transmise à la génération suivante. En ce qui concerne sa diversité, l'ADNmt est donc beaucoup plus sensible au goulot d'étranglement et à la dérive génétique que l'ADN nucléaire (Davis et al. 1999 ; Lawler et al. 1995 ; Nyström et al. 2006 ; Bohonak & Vandergast 2011).

Les marqueurs microsatellites (à transmission biparentale, par le père et la mère) sont des marqueurs de choix dans l'étude fine de flux génétiques et de la diversité des populations. Ils présentent un fort taux d'évolution et donc un grand nombre d'allèles par locus (polymorphisme) peut être observé au sein d'une population. C'est notamment grâce aux microsatellites que la richesse allélique d'une population peut être évaluée.

Les microsatellites vont donc cumuler l'impact d'évènements anciens et récents qui ont affecté une population ou une espèce. Les microsatellites permettent généralement de déterminer finement l'impact de la fragmentation de l'habitat sur la diversité génétique d'une espèce, les flux entre populations, et d'évaluer les relations de parenté entre les individus issus de différentes stations.

### 3. STRUCTURE et DIVERSITE GENETIQUE de l'APRON dans le BASSIN du RHONE.

Les travaux présentés ici sont issus d'une étude correspondant à la mise en place de la Mesure 502 du Plan d'Action National (Suisse) en faveur du Doubs. Elle visait à caractériser la diversité génétique de la population d'apron du Doubs et de la situer (en termes d'histoire évolutive et de conservation) dans le contexte des autres populations d'aprons présentes sur le bassin du Rhône. Des paramètres démogénétiques seront estimés (ex : richesse allélique, effectif efficace) afin d'évaluer l'état de conservation de cette population. A l'issue de l'analyse des données, des préconisations ont pu être proposées concernant les mesures de gestion et de conservation à prendre pour la population suisse.

Mais cette étude a aussi permis de caractériser la structure et la diversité génétique de l'apron à l'échelle du Bassin du Rhône, en incluant des échantillons issus de l'ensemble des populations actuelles de l'apron. Ainsi, elle permet aussi de dégager certains éléments de son histoire évolutive.

#### 3.1. Populations étudiées

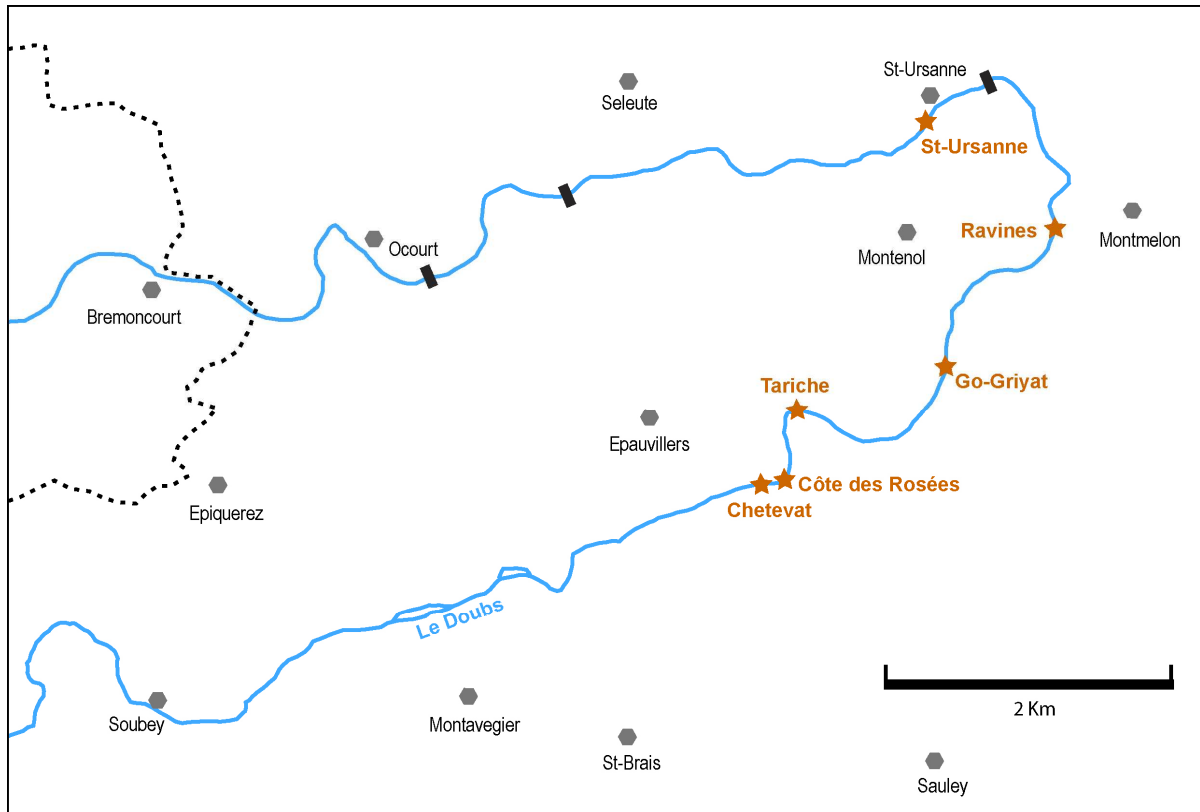
Afin de prendre en compte le contexte de l'espèce, de son histoire évolutive et de sa conservation, les données correspondant à 12 stations d'aprons représentatives des autres sous-bassins du Rhône ont été intégrées aux analyses (Figure 2). Ces données correspondent à trois stations de la rivière Durance -stations HEN (n=33), SLS (n=72) et SAL (n=36)- échantillonnées en 2007, deux stations de la rivière Verdon –SAM (n=46) et EST (n=18)- échantillonnées en 2009, trois stations de la rivière Beaume -PLT (n=52), TCD (n=39) et VRN (n=58)- échantillonnées en 2002, une station de la rivière Ardèche – RUO (n=27)- échantillonnée en 2011, deux stations de la rivière Loue -LBD (n=33) et PLN (n=32) échantillonnées en 2012 et 2013, ainsi que 13 individus prélevés en 1996 dans la rivière Drôme (DRO) avant extinction de cette population.

En outre, l'échantillonnage des aprons du Doubs suisse a été réalisé entre 2012 et 2014 par les personnels de la Société AQUARIUS dans le cadre d'une étude de monitoring commanditée par l'Office Fédéral de l'Environnement (Zaugg & Plomb 2014). Seize prélèvements ont été réalisés sur six stations de suivi (**Tableau 1 ; Figure 1**). Après capture, chaque apron a été mesuré, pesé et a fait l'objet d'un prélèvement au niveau de la seconde nageoire dorsale. Après analyse génétique, il s'avère que les 16 prélèvements correspondent à 14 individus (2 individus capturés à 2 reprises, voir **Tableau 1**).

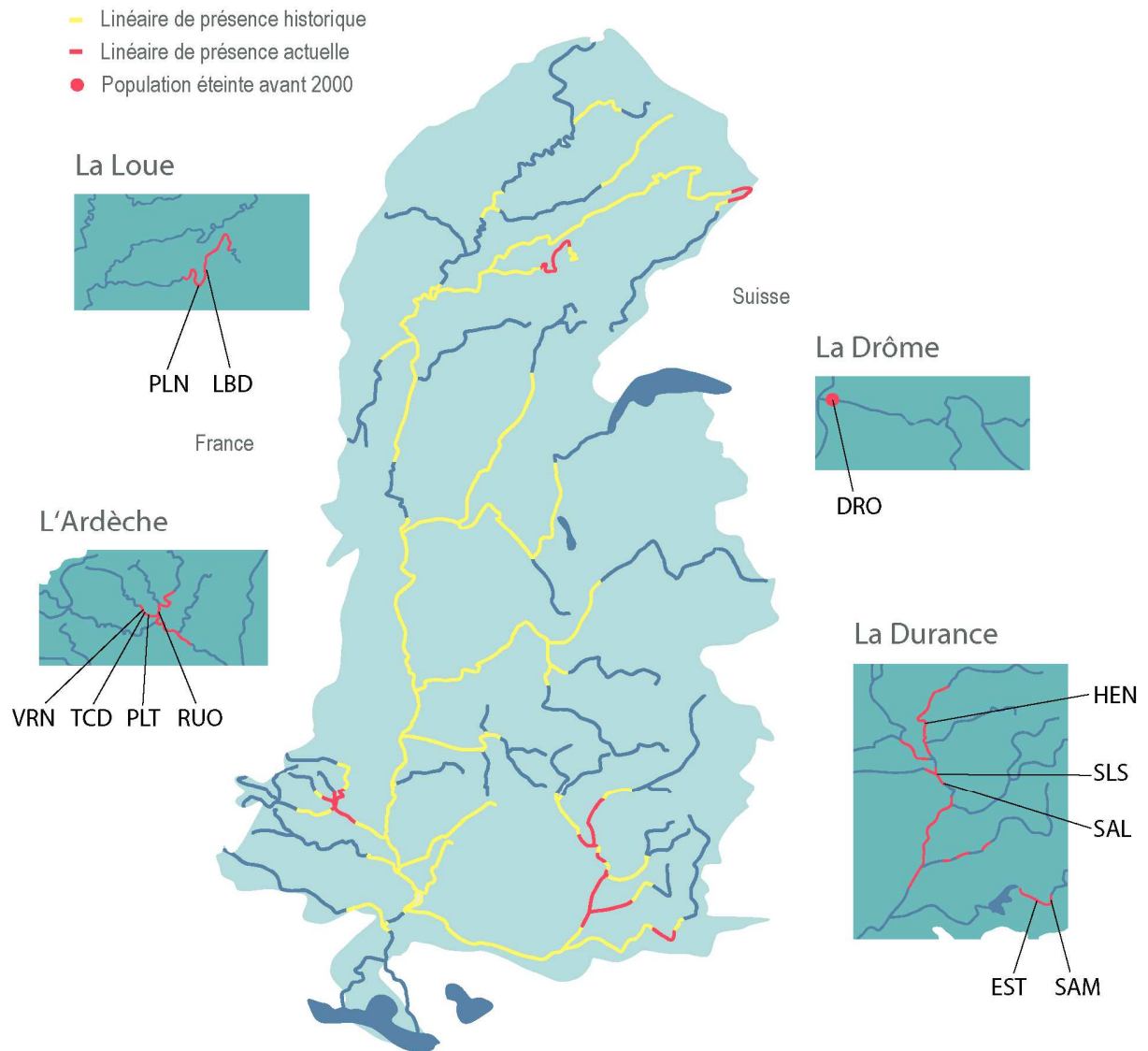
**Tableau 1.** Aprons capturés dans le Doubs ayant fait l'objet d'un prélèvement de nageoire.

Station	Coordonnées	ID	Taille (mm)	Poids (g)	Date de capture	Recapture
Go-Griyat	578°350/242'730	Go50-10-01	250	89	24/07/2012	NON
	578°350/242'730	Go50-10-02	172	50	24/07/2012	NON
	578°350/242'730	Go50-10-03	161	38	24/07/2012	NON
	578°350/242'730	Go50-10-04	170	55	24/07/2012	NON
	578°660/243'300	Go50-10-08	190	66	01/07/2013	NON
Tariche	577°050/242'758	Ta50-10-05	191	72	01/07/2013	NON
	577°050/242'758	Ta50-10-06	199	77	01/07/2013	NON
	577°050/242'758	Ta50-10-07	177	55	01/07/2013	NON
St-Ursanne	578°530/245'920	Su50-10-09	108	12	11/07/2013	NON
	578°453/245'798	Su50-10-11	170	54	22/08/2013	OUI (=Su50-10-16)
	578°453/245'798	Su50-10-16	170	58	25/06/2014	OUI (=Su50-10-11)
Côte des Rosées	576°840/242'050	Cr50-10-10	106	13	25/07/2013	NON
	576°774/242'052	Cr50-10-12	190	60	19/06/2014	OUI (=Ch50-10-14)
	576°085/241'843	Cr50-10-13	170	55	19/06/2014	NON

Chétevat	576°986/242°566	Ch50-10-14	180	65	22/06/2014	OUI (=Cr50-10-12)
Ravines	579°354/244°259	Ra50-10-15	140	25	22/06/2014	NON



**Figure 1.** Stations de capture des aprons (en orange) prélevés dans le Doubs.



**Figure 2.** Aire de répartition de l'apron et localisation des stations françaises analysées.

## 3.2. ANALYSES GENETIQUES et STATISTIQUES

### 3.2.1. Acquisition des données génétiques

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir des fragments de nageoire caudale et préservés dans l'éthanol 96%. L'extraction est réalisée grâce au kit Gentra® Puregene® Tissue Kit (QIAGEN). Pour chaque individu, une séquence de l'**ADN mitochondrial** d'une longueur de 1201 paires de bases et contenant le **gène du cytochrome b** a été obtenu par séquençage Sanger. Le gène du cytochrome *b* est très utilisé en génétique des populations animale (ex : Avise 2000). Il permet à la fois la reconstruction de l'histoire évolutive d'une espèce (c'est-à-dire sa phylogéographie) et une estimation de sa diversité. Enfin, **58 marqueurs microsatellites** (Dubut *et al.* 2010) ont été analysés. A travers l'estimation de la diversité génétique et de la structuration (neutre ou adaptative) de cette diversité, les microsatellites participent à établir le statut de conservation d'une population.

### 3.1.2. Analyse des données génétiques

#### 3.1.2-1. Contrôle qualité des données

Le logiciel **GENEPOP 4.0** (Rousset 2008) a été utilisé pour tester le déséquilibre de Hardy-Weinberg de chacun des loci **58 microsatellites** ainsi que le déséquilibre de liaison entre chacun des loci. Le niveau de significativité de chacun des deux tests a été ajusté en suivant la procédure de Benjamini et Hochberg (1995). Les loci présentant un déséquilibre de liaison ont été analysés suivant la procédure implémentée par le logiciel **MICRO-CHECKER 2.2.3** (van Oosterhout *et al.* 2004) afin de déterminer les causes de l'écart à l'équilibre Hardy-Weinberg, notamment la présence d'allèles nuls.

Trois loci ont été écartés des analyses suivantes en raison de leur écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg : Za096, Za113 et Za176. En outre, le locus Za190 présenté chez certains individus des signes de duplication. **Quatre loci ont donc été écartés des analyses statistiques.**

#### 3.1.2-2. Sélection et adaptation locale

Certains loci peuvent être soumis à la sélection naturelle et s'écarter significativement de la neutralité. Ils peuvent permettre d'identifier des processus d'adaptation locale au sein de certaines populations, mais peuvent biaiser certaines analyses qui font l'hypothèse d'une évolution neutre (non soumise à la sélection naturelle) des loci et des allèles. Il s'agit dans un premier temps d'identifier les loci qui sont potentiellement soumis à la sélection naturelle. Pour cela, une détermination préliminaire de la structuration de la diversité génétique a été effectuée à partir de **54 microsatellites** par une analyse bayésienne d'assignation implémentée par le logiciel **STRUCTURE** (Falush *et al.* 2003, 2007). Les résultats de cette analyse ont permis d'identifier six clusters génétiques qui correspondent à : (i) la Durance, (ii) le Verdon, (iii) la Drôme, (iv) l'Ardèche et la Beauce, (v) la Loue et (vi) le Doubs suisse. Nous avons suivi ensuite la procédure décrite par Excoffier *et al.* (2009) qui prend en compte la structuration génétique des populations pour la détection des loci sous sélection.

Quatre loci ont été détectés comme s'écarter significativement de la neutralité et ont été écartés des analyses qui ont suivi (voir la partie Résultats pour le détail).

#### 3.1.2-3. Structure et différenciation génétiques

Nous souhaitons tester la différenciation populationnelle à l'échelle du bassin du Rhône, en prenant en compte l'ensemble des groupes de populations d'apron. Une nouvelle fois la structuration de la diversité génétique a été évaluée à partir des **50 microsatellites neutres** par une analyse bayésienne d'assignation implémentée par le logiciel **STRUCTURE** (Falush *et al.* 2003, 2007).

Cette différenciation a été testée grâce aux indices de fixation **F<sub>st</sub>** (Weir & Cockerham 1984), estimés grâce au logiciel **ARLEQUIN 3.5** (Excoffier & Lischer 2010) à la fois pour l'**ADN mitochondrial** et les **50 microsatellites neutres**. La valeur des **F<sub>st</sub>** est comprise entre 0 (elle peut aussi être légèrement négative ; dans les deux cas elle indique qu'il n'y a pas de différenciation) et 1 (différenciation totale). Une échelle à seuil est classiquement utilisée :

0,05 pour des populations peu différenciées, puis 0,15 pour des populations différenciées, et 0,25 pour des populations fortement différenciées.

En outre, la **structuration adaptative** de la diversité génétique de l'apron a été aussi déterminée en conduisant une analyse bayésienne d'assignation et en déterminant les  $F_{st}$  à partir des 4 loci microsatellites détectés comme étant soumis à la sélection.

Enfin, le logiciel NETWORK 4.05 (Fluxus Technology Ltd, [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) a été utilisé afin de construire un réseau phylogénétique par l'approche du Median-Joining (Bandelt *et al.* 1999) of des allèles mitochondriaux de l'apron, ceci afin de caractériser les liens de parenté entre ces allèles.

#### 3.1.2-4. Analyse de la diversité génétique

Concernant l'**ADN mitochondrial**, deux indices de diversité ont été estimés grâce au logiciel ARLEQUIN : (i) la **gene diversity** ( $H$  ; Nei, 1987), qui est la probabilité de tirer au hasard deux allèles différents si on prend deux individus différents d'une population ; (ii) le **nombre moyen de différences** entre deux séquences ( $\theta\pi$  ; Nei, 1987) ; et (iii) l'estimateur  $\theta_k$  (Ewens 1972) qui est en lien avec le nombre d'allèles distincts présents au sein d'une population et qui est très sensible aux variations de l'effectif efficace (Helgason *et al.* 2003). En plus de ces trois statistiques résumantes, la procédure de raréfaction implémentée dans CONTRIB 1.02 (Petit *et al.* 1998) a été utilisée pour estimer la richesse allélique ( $H_r$ ) pour les séquences de l'ADNmt.

Pour les **50 microsatellites neutres** trois indices de diversité ont été estimés : (i) le **taux d'hétérozygotie** théorique moyen entre les loci ( $H_e$ ), (ii) la **richesse alléliques** ( $A_r$ ) et la **richesse en allèles privés** ( $A_p$ ) (Petit *et al.* 1998 ; Kalinowski 2004).  $H_e$  a été estimé grâce à ARLEQUIN, tandis que les indices  $A_r$  et  $A_p$  ont été estimés grâce au logiciel ADZE (Szpiech *et al.* 2008) qui prend en compte les tailles différentes des échantillons pour estimer les deux indices.

#### 3.1.2-5. Estimation de l'effectif efficace ( $N_e$ )

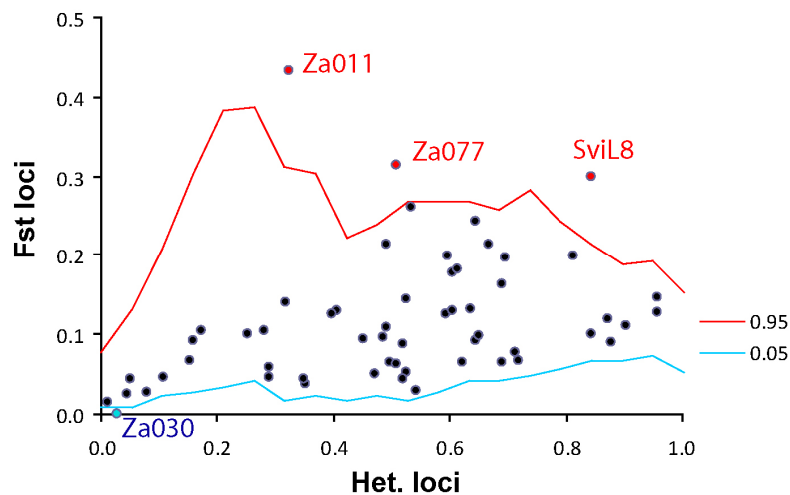
L'**effectif efficace** ( $N_e$ ), paramètre en lien étroit avec le nombre d'adultes participants à la reproduction, a été estimé selon une approche basée sur le déséquilibre de liaison entre les loci microsatellites ( $N_{eLD}$ ), implémentée par LDNe (Waples & Do 2008). Cette analyse a été conduite à partir des données des 50 microsatellites neutres.

### 3.3. RESULTATS

#### 3.3.1. Loci sous sélection

En prenant en compte une structuration de la diversité génétique de l'apron selon 6 clusters, trois loci ont été détectés comme étant soumis à une **sélection dirigée** (un ou peu d'allèles favorisés par la sélection, et de façon différentielle selon les populations) : **SviL8**, **Za011** et **Za077**. En plus de ces 3 loci, le locus **Za030** a été détecté comme étant soumis à une **sélection balancée** (quelle que soit la localité, les fréquences alléliques sont similaires). Pour détecter les loci sous sélection, c'est la relation entre hétérozygotie et la valeur de la  $F_{st}$  qui est considéré. Lorsqu'un locus s'écarte significativement de la distribution attendue au vu des données, il est considéré comme sous sélection (**Figure 3**).





**Figure 3.** Analyse bivariée de l'hétérozygotie (Het. Loci) et de la Fst (Fst loci) pour 54 microsatellites. Les loci s'écartant significativement de la distribution théorique au seuil de 5% sont signifiés en rouge (sélection dirigée) et en bleu (sélection balancée)

Si on considère dans le détail la distribution des allèles pour chacun des six clusters (**Tableau 2**), on peut remarquer la forte prépondérance de l'**allèle 135** du locus **SviL8** au sein du cluster ardéchois (et dans une moindre mesure au sein du cluster de la Loue). De même, l'**allèle 116** du locus **Za077** prédomine dans le bassin de l'Ardèche alors que c'est l'allèle 105 qui est majoritaire dans les autres clusters. Au niveau du locus **Za011**, c'est l'**allèle 118** qui est majoritaire dans la Loue et le Doubs, alors que dans les autres clusters, l'**allèle 116** est majoritaire. Ces différences de fréquences entre clusters illustrent la sélection différentielle qui est exercée sur ces loci en fonction des localités. Ils suggèrent ainsi des adaptations locales de l'apron aux différents habitats qui constituent son aire de répartition.

A l'inverse, pour le locus **Za030** qui a été détecté comme étant soumis à une sélection balancée, deux allèles **235** et **266** sont équi-représentés dans l'ensemble des clusters. De plus, il doit être noté que pour l'ensemble de ces quatre loci sous sélection, le cluster durancien comprend l'ensemble de l'intervalle allélique détecté dans cette étude et présente un nombre important d'allèles qui ne sont retrouvés dans aucun des 5 autres clusters. La forte diversité allélique pour des loci sous sélection suggère un **fort potentiel adaptatif** pour les populations d'**apron de la Durance**.

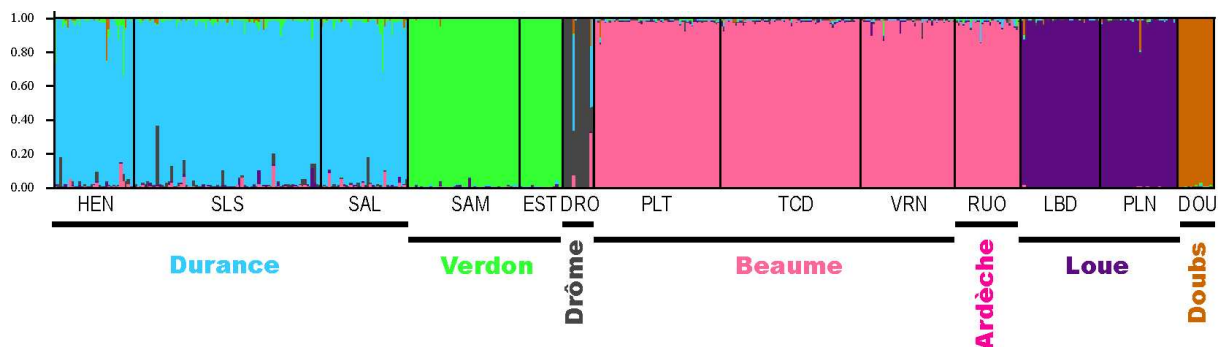
**Tableau 2.** Distribution des allèles des loci sous sélections au sein de six clusters génétiques.

Locus	Allèle	DUR	VER	DRO	ARD	LOU	DOU
SviL8	118	0,252	0,109	0	0,168	0,054	0,286
	120	0,004	0	0	0	0	0
	125	0,018	0	0	0,003	0	0
	127	0,004	0	0,231	0	0	0
	129	0,007	0	0	0	0	0
	133	0,043	0	0	0,017	0	0
	<b>135</b>	0,124	0,039	0,115	<b>0,798</b>	<b>0,477</b>	0
	138	0,089	0	0	0	0,192	0,393
	140	0,153	0,297	0,154	0	0	0
	142	0,036	0	0,077	0	0,008	0
	145	0,184	0,555	0,039	0	0,269	0,321
	147	0,036	0	0,308	0,014	0	0
	149	0,007	0	0	0	0	0

	152	0,007	0	0,077	0	0	0
	154	0,004	0	0	0	0	0
	156	0,014	0	0	0	0	0
	158	0,021	0	0	0	0	0
Za011	116	0,972	1,000	0,923	0,776	0,169	0,107
	<b>118</b>	0,028	0	0,077	0,224	<b>0,831</b>	<b>0,893</b>
Za077	101	0,096	0,156	0,231	0,000	0,108	0,250
	103	0,004	0	0	0	0	0
	105	0,855	0,844	0,731	0,449	0,892	0,679
	107	0,014	0	0	0	0	0,071
	<b>116</b>	0,032	0	0,039	<b>0,551</b>	0	0
Za030	<b>235</b>	<b>0,379</b>	<b>0,539</b>	<b>0,192</b>	<b>0,415</b>	<b>0,246</b>	<b>0,214</b>
	239	0,004	0	0	0	0	0
	263	0,007	0	0	0	0,208	0
	265	0,004	0	0	0,014	0	0
	<b>266</b>	<b>0,557</b>	<b>0,453</b>	<b>0,808</b>	<b>0,560</b>	<b>0,454</b>	<b>0,714</b>
	268	0,046	0,008	0	0	0,092	0,071
	270	0,004	0	0	0,011	0	0

### 3.3.2. Structuration de la diversité génétique de l'apron

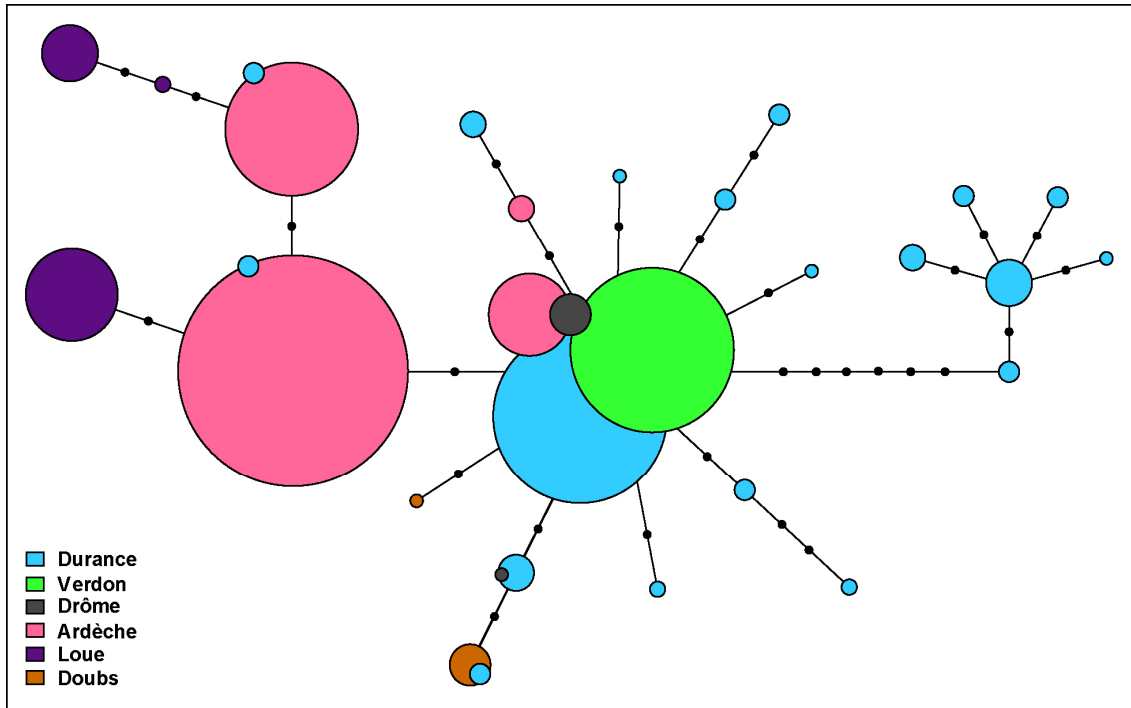
Une **analyse bayésienne d'assignation** implémentée par le logiciel STRUCTURE (Falush et al. 2003, 2007) a été sur l'ensemble des individus sur **50 microsatellites**. Le résultat obtenu est identique à celui qui avait obtenu lors de l'analyse préliminaire et qui incluait les quatre loci sous sélection. Six clusters génétiques sont identifiés : (i) la Durance, (ii) le Verdon, (iii) la Drôme, (iv) l'Ardèche et la Beauce, (v) la Loue et (vi) le Doubs suisse (**Figure 4**). Il indique une forte différenciation génétique à l'échelle du bassin du Rhône.



**Figure 4.** Barplot issu des analyses d'assignation conduite sur 50 microsatellites neutres. Chaque individu est représenté par une barre verticale, chaque barre synthétisant le taux d'assignation à chacun des clusters.

L'analyse d'assignation montre que les six clusters sont clairement différenciables, ce qui indique que les flux génétiques entre clusters ont été très limités au cours du temps et/ou que leur interruption au cours du XXe siècle a engendré une forte différenciation (c'est le cas entre la Durance et le Verdon par exemple). Chaque cluster présente donc une **démographie indépendante**. Cette analyse ainsi permet de dessiner les limites de **six Unités de Gestion (UG)** (*Management Unit*; Moritz 1994), **le Doubs suisse** constituant une **unité de gestion à part entière**.

La structuration de la diversité de l'**ADN mitochondrial** peut être synthétisée par la construction d'un réseau des liens de parenté entre les allèles (**Figure 5**).



**Figure 5.** Réseau de parenté des allèles de l'ADN mitochondrial (gène du Cytochrome b) construit par Median-Joining

Chaque allèle distinct est représenté par un cercle de couleur. La taille du cercle est proportionnelle au nombre d'individus de l'étude présentant l'allèle correspondant. Lorsque les cercles se chevauchent, ils correspondent à un même allèle.

Les allèles mitochondriaux présentent des liens de parenté étroits, qui signe une **histoire évolutive récente partagée** par l'ensemble des populations d'aprons échantillonnées, au moins à l'échelle de l'Holocène. Néanmoins, on observe une différence très marquée concernant le nombre d'allèles et les fréquences alléliques entre la Durance (19 allèles différents) et les autres populations d'aprons situées plus au Nord du Bassin du Rhône (l'Ardèche : 4 allèles ; la Drôme : 2 allèles ; la Loue : 3 allèles ; le Doubs : 2 allèles). De plus on observe deux phénomènes Nord-Sud caractéristiques : i) un changement des fréquences alléliques, spécialement dans le Bassin de l'Ardèche ; et ii) l'occurrence de nouveaux allèles privés et dérivés d'allèles occurrents plus au Sud dans les populations du Nord du Bassin du Rhône : la Loue (3 allèles privés) et dans le Doubs (1 allèle privé). Ce patron de spécificité est attendu selon le « *surfing allele model* » décrit par Excoffier *et al.* (2009b), et suggère une expansion de l'aire de répartition depuis un refuge se situant dans le Sud du Bassin du Rhône à la fin du dernier maximum glaciaire (il y a environ 16 000 ans).

Ces éléments permettent de considérer les six Unité de Gestion définies plus hauts sur la base des microsatellites, comme appartenant à **une seule et unique Unité Evolutive Significative (UES)** (*Evolutionary Significant Unit*) sensu Moritz (1994).

Le **degré de différenciation génétique** entre les Unité de Gestions que nous avons identifiées a été quantifié par la **statistique Fst**, à partir des **50 microsatellites neutres** et de l'**ADN mitochondrial** (gène du Cytochrome b) (**Tableau 3**). L'ensemble des valeurs présentées sont significativement différentes de 0 au seuil de 5%.

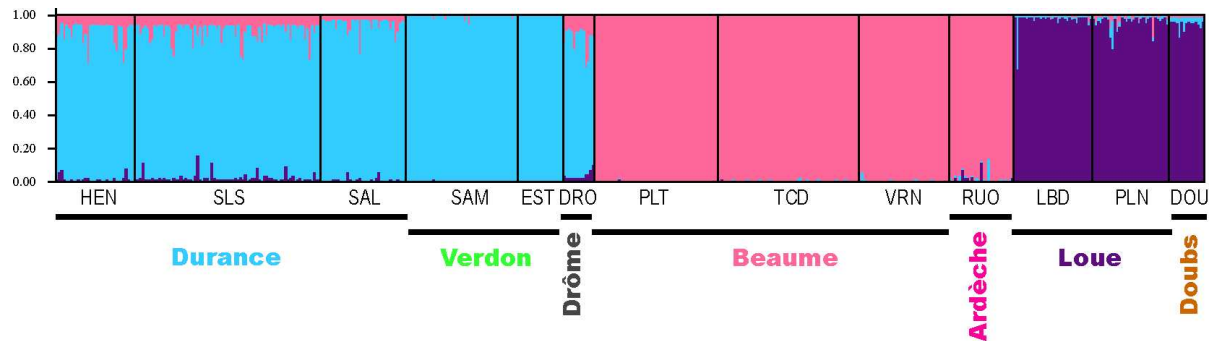
**Tableau 3.** Fst entre les paires d'Unité de Gestion de l'apron pour les 50 microsatellites neutres (demi-matrice inférieure) et pour l'ADN mitochondrial (demi-matrice supérieure)

	DUR	VER	DRO	ARD	LOU	DOU
DUR	0	0,13	0,07	0,34	0,40	0,35
VER	0,08	0	0,16	0,55	0,66	0,96
DRO	0,09	0,23	0	0,48	0,52	0,84

<b>ARD</b>	0,07	0,18	0,13	0	0,39	0,76
<b>LOU</b>	0,13	0,25	0,20	0,18	0	0,68
<b>DOU</b>	0,15	0,30	0,20	0,20	0,17	0

Globalement, sur la base des  $F_{st}$  calculées à partir de l'ADN mitochondrial ou des 50 microsatellites neutres, la plupart des **Unités de Gestion sont fortement différenciées entre-elles** ( $F_{st} > 0,15$ ). Néanmoins, la Durance est plus faiblement différenciées des autres populations, notamment sur la base des microsatellites. Le **Doubs suisse** (DOU) est dans tous les cas **fortement différencié**, notamment si on le compare à la population de la Loue, la plus proche géographiquement et appartenant au même Sous-Bassin versant (celui de la rivière Doubs).

En utilisant les quatre loci sous sélection, et à partir d'une analyse bayésienne d'assignation, il est possible de caractériser encore la **variation génétique adaptative** de l'apron (**Figure 6**). Cette analyse permet de regrouper les populations étudiées en trois **Unités Adaptatives Significatives (UAS)** (*Adaptative Significant Units*; Funk *et al.* 2012) : i) l'**UAS 1** regroupe les populations d'aprons de la **Durance**, du **Verdon** et de la **Drôme** (cluster bleu, Figure 6) ; l'**UAS 2** regroupe les populations de la **Beaume** et de l'**Ardèche** ; et l'**UAS 3** regroupe les populations de la **Loue** et du **Doubs**.



**Figure 6.** Barplot issu des analyses d'assignation conduite sur 4 microsatellites sous sélection. Chaque individu est représenté par une barre verticale, chaque barre synthétisant le taux d'assignation à chacun des clusters.

Au sein de chaque UAS, les populations d'apron ont une histoire commune, fruit d'adaptations à des conditions environnementales spécifiques. Alors que sur la base des marqueurs neutres, le Doubs suisse est différenciable de la Loue (**Figure 4**), l'analyse des loci sous sélection montre que le **Doubs partage avec la Loue une histoire adaptative commune**.

En outre, la pertinence de ces UAS en termes de structuration de la diversité génétique est appuyée par les valeurs de  $F_{st}$  (**Tableau 4**). En effet, les valeurs des  $F_{st}$  correspondant aux comparaisons entre UGs appartenant à la même UAS ont tendance à être plus faibles lorsque l'on considère les 4 microsatellites sous sélection. C'est le cas de la comparaison entre la Loue et le Doubs qui appartiennent à l'UAS 3 : la  $F_{st}$  est de de 0,17 dans le cas des marqueurs neutres (forte différenciation) et de 0,11 dans le cas des marqueurs sous-sélection, et se rapproche des valeurs observées pour les comparaisons entre UGs appartenant à l'UAS 1 (0,07 et 0,08) pour ces mêmes marqueurs sous sélection.

**Tableau 4.**  $F_{st}$  entre les paires d'Unité de Gestion de l'apron pour les 50 microsatellites neutres (demi-matrice inférieure) et pour les 4 microsatellites sous sélection (demi-matrice supérieure)

	<b>DUR</b>	<b>VER</b>	<b>DRO</b>	<b>ARD</b>	<b>LOU</b>	<b>DOU</b>
<b>DUR</b>	0	<b>0,07</b>	<b>0,08</b>	<b>0,23</b>	0,31	0,33
<b>VER</b>	<b>0,08</b>	0	0,19	0,33	0,37	0,42

<b>DRO</b>	<b>0,09</b>	0,23	0	0,25	0,32	0,33
<b>ARD</b>	<b>0,07</b>	0,18	0,13	0	0,31	0,40
<b>LOU</b>	0,13	0,25	0,20	0,18	0	<b>0,11</b>
<b>DOU</b>	0,15	0,30	0,20	0,20	<b>0,17</b>	0

En corollaire, les valeurs des Fst correspondant aux comparaisons entre UGs appartenant à des UASs différentes augmentent fortement lorsqu'on passe des microsatellites neutres aux microsatellites sous sélection. Par exemple, la valeur de la Fst correspondant à la comparaison entre le bassin de l'Ardèche (UAS 2) et la Durance (UAS 1) est faible (0,07) sur la base des microsatellites neutres, alors que sur la base des microsatellites sous sélection elle indique une forte différenciation entre ces deux UGs (0,23 ; voir **Tableau 4**).

### 3.2.3. Diversité génétique et effectif efficace

Les indices de diversité génétiques et l'effectif efficace pour les six UGs de l'apron sont reportés dans le **Tableau 5**. L'UG qui présente les indices de diversité génétique les plus forts regroupe les populations de la Durance (DUR), que ce soit pour l'ADNmt ou les 50 microsatellites neutres. Ces résultats soulignent encore le potentiel adaptatif de la Durance, qui est vraisemblablement supérieur à celui des autres populations du Bassin du Rhône. En effet, il a été montré expérimentalement qu'un plus grand nombre d'allèles potentialise l'adaptation d'une population à des changements environnementaux (pour un exemple récent voir Vilas *et al.* 2015). Pour l'ADNmt, ce sont les populations du Verdon (VER) qui présente les indices de diversité les plus faibles, cette population est en effet monomorphe pour ce locus. L'UG que constitue le Doubs suisse (DOU) présente des indices de diversité de l'ADNmt assez faibles et dont les valeurs comparables la plupart du temps à ceux observés dans la population éteinte de la Drôme (DRO). En ce qui concerne les microsatellites neutres, l'UG de la Durance présente les plus fortes richesses alléliques (Ar) et en allèles privés (Ap), l'UG du Bassin de l'Ardèche vient juste derrière, et présente notamment une richesse en allèles privés similaire à celle de la Durance. A l'opposé, le **Doubs suisse présente les indices Ar et Ap les plus faibles**, associés à un **effectif efficace (Ne) très faible** (21 individus théoriques) et proche, comparativement aux autres UGs, à celui déterminé pour la population éteinte de la Drôme (6 individus théoriques) et 20 fois inférieur à celui de l'UG de la Loue.

**Tableau 5.** Indices de diversité génétique au sein des Unités de Gestion de l'apron

	ADNmt				Microsatellites			
	H	Hr	$\theta\pi$	$\theta k$	He	Ar	Ap	Ne
<b>DUR</b>	<b>0,76</b>	<b>6,52</b>	<b>3,57</b>	<b>6,48</b>	0,49	<b>3,18</b>	<b>0,353</b>	<b>2290</b>
<b>VER</b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,44	2,33	0,155	440
<b>DRO</b>	0,15	2,00	0,15	0,38	0,52	2,52	0,203	<b>6</b>
<b>ARD</b>	0,62	3,26	0,79	0,58	0,43	2,71	0,352	200
<b>LOU</b>	0,51	2,39	1,94	0,49	0,47	2,30	0,154	460
<b>DOU</b>	<b>0,14</b>	<b>1,93</b>	<b>0,43</b>	<b>0,37</b>	0,47	<b>2,04</b>	<b>0,115</b>	<b>21</b>

Globalement, le **Doubs suisse apparaît comme une des populations d'apron présentant des diversités génétiques les plus faibles**. Associés à un **effectif efficace très faible**, ces éléments vont dans le sens d'une **très forte fragilisation démographique** de cette population.

### 3.4. CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

L'analyse d'une séquence de 1201 pb de l'ADNmt (comprenant le gène du cytochrome b) et de 58 loci microsatellites a permis d'explorer la structure et la diversité génétique des populations d'apron du Bassin du Rhône et de resituer la populations du Doubs Suisse dans le contexte de l'histoire évolutive et de la diversité génétique de l'espèce.

Les analyses ont permis de déterminer que **les aprons du Doubs suisse constituent une Unité de Gestion à part entière**. Cette population doit donc faire l'objet de mesure de gestion et de conservation qui lui sont spécifiques. Elle présente néanmoins un **patron adaptatif similaire à celui de la Loue**, le Doubs suisse et la Loue pouvant être regroupés dans la même Unité Adaptative Significative. La population du Doubs suisse se trouve en limite de l'aire de répartition historique de l'apron, sur les marges de l'expansion démographique qui a suivi la fin du Dernier Maximum Glaciaire. Cette situation géographique et historique explique vraisemblablement une partie de la faible diversité génétique de cette population. Les aprons de la Loue, qui sont situés dans un contexte similaire ne présente pas les plus fortes diversités génétiques observées pour l'espèce.

Néanmoins, les analyses de diversité ainsi que l'effectif efficace ( $N_e$ ) indiquent clairement que **les aprons du Doubs suisses sont dans une situation critique de conservation**, très proche de celle observée au sein de la population de la Drôme juste avant son extinction. Ne pouvant plus faire appel à la migration pour maintenir voire augmenter sa diversité génétique et son effectif efficace, la population d'apron du Doubs suisse a donc subit une forte dérive génétique. Cette dérive génétique explique à la fois la différenciation avec les populations de la Loue avec lesquelles elle était en contact avant la seconde partie du XXe siècle, et la chute drastique de sa diversité génétique et de son effectif efficace comparativement à la population de la Loue.

C'est donc une population très fragilisée qui survit dans la boucle suisse de Doubs, potentiellement beaucoup plus sensibles aux variations de son environnement que ses homologues duranciennes, ardéchoises ou de la Loue

Ce statut critique de conservation mérite donc plusieurs mesures de gestion et de conservation :

- 1) La poursuite du **monitoring démographique de l'apron du Doubs** (inscrite au Plan d'Action National en faveur du Doubs ; Mesure 501) apparaît essentielle. Le monitoring démographique permettra de mieux comprendre le fonctionnement de cette population fragilisée, et d'évaluer de façon indépendante sa dynamique démographique : la population du Doubs suisse est-elle encore en train de subir une chute de ses effectifs ? S'est-elle stabilisée ? Ou au contraire est-elle retournée à une phase de croissance démographique ? A ce monitoring démographique, un **monitoring génétique** de cette population sur une phase minimale de 5 à 10 ans sera un complément précieux. Des prélèvements génétiques pourraient être planifiés à l'horizon 2018-2020 afin de suivre l'évolution de la diversité génétique de cette population et déterminer si la chute de diversité observée ici se poursuit ou si la population a recouvré une certaine stabilité.
- 2) Améliorer la **continuité écologique** entre les tronçons de rivières occupés par l'aprons. En effet, les flux génétiques entre secteurs favorisent un maintien de la diversité génétique et peuvent permettre une augmentation de l'effectif efficace. L'**ouvrage de Saint-Ursanne** apparaît notamment comme une des enjeux majeurs de ce secteur pour l'apron du Doubs suisse. La construction d'une passe à poisson « dimensionnée apron » et le suivi de sa fonctionnalité apparaît comme une mesure pertinente dans le but de rétablir la connectivité entre les aprons situés de part et d'autre de l'ouvrage.
- 3) Des mesures de **renforcement génétique** pourraient aussi être envisagées pour cette population. Néanmoins, il est important de s'assurer au préalable que les conditions environnementales sont favorables à la pérennité de cette population, notamment la qualité de l'habitat physique (ex : la qualité du substrat pour sa reproduction) et la ressource trophique (diversité et densité des macroinvertébrés présents dans le secteur), et évaluer avec précisions l'impact des variations et des

stress auxquels la population d'apron du Doubs suisse peut être soumise. Les mesures de renforcement éventuelles pourront s'appuyer sur le retour d'expérience en lien avec l'opération de réintroduction de l'apron conduite sur la rivière Drôme depuis 2008. L'objectif de ces mesures pour les aprons du Doubs suisse sera de restaurer à la fois une partie de la diversité génétique de cette population et une dynamique démographique positive.

En ce qui concerne les **mesures de renforcement génétique** éventuelles, le choix de la population parentale est déterminant. Grâce à cette étude, deux stratégies peuvent être envisagées : soit privilégier des aprons issus de populations présentant une forte diversité génétique et ayant un fort potentiel adaptatif, soit privilégier une introduction d'aprons en provenance des populations appartenant à la même UAS (présentant un patron adaptatif similaire). Dans le premier cas, les populations sources à privilégier seront celles de la Durance, dans le second cas, ce seront les populations de la Loue qui pourront être sollicitées. Ce type de mesure doit cependant être envisagée avec prudence. Notamment, le prélèvement d'individus de la Durance ou de la Loue en vue d'une introduction dans le Doubs ne saurait se faire au détriment de la dynamique populationnelle des populations sources. Si les populations duranciennes semblent en relative bonne santé génétique, leur dynamique démographique récente (quelques dizaines d'années) reste encore peu connue. Enfin, une opération de renforcement devra faire l'objet d'un monitoring qui permettra de suivre en détail l'évolution de deux types d'indicateurs clefs pour la viabilité à termes de la population réintroduite : les paramètres démogénétiques (coefficients d'apparentement et de consanguinité, diversité génétique, et effectif efficace) et la reproduction dans la rivière. Un échantillonnage poussé du secteur de réintroduction associé à des analyses de parenté permettra de déterminer si les aprons introduits se reproduisent dans le Doubs.



## 4 IMPACT DE LA FRAGMENTATION et CONTINUITÉ ECOLOGIQUE

### 4.1 Le Bassin de la Durance

Cette étude s'intègre dans les objectifs de la **Fiche d'action B1-004** (« Préservation de l'apron du Rhône (*Zingel asper*) ») du **Contrat de Rivière du Val Durance** et concerne l'Action « Etude et fonctionnement des populations d'aprons en Durance ». Elle s'inscrit aussi dans le cadre du **Contrat de Rivière du Buëch et de ses Affluents : Action A.3** « Protection et extension des espèces patrimoniales », **Opération A.3.2** « Suivi et étude génétique de la population d'aprons du Buëch ». Elle a été conduite sous la maîtrise d'ouvrage d'EDF de 2007 à 2011.

#### 4.1.1. MATERIEL et METHODE

##### 4.1.1-1. Echantillonnage de l'apron

Pour répondre à ces objectifs, **375 individus** ont été capturés et prélevés (en vue des analyses génétiques). Les effectifs sont répartis en plusieurs échantillons populationnels correspondant aux tronçons de dévalant du bassin durancien dans lesquels l'apron est présent. **Sept tronçons de rivière** (Fig. 3) ont ainsi été échantillonnés.

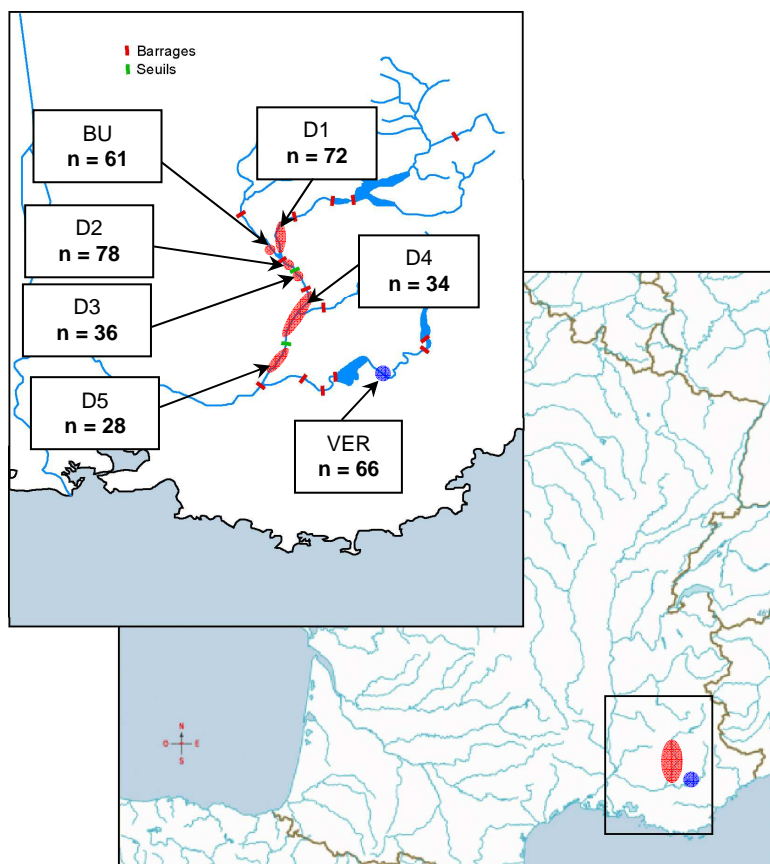


Figure 3. Localisation et effectifs des aprons prélevés et analysés génétiquement.

De l'amont vers l'aval de la Durance, ces échantillons se répartissent de la façon suivante :

- 1) Le tronçon **D1** constitue le linéaire de la Durance situé entre les barrages de La Saulce et de St-Lazare. Deux sections de rivières ont été échantillonnées en 2007 (Chappaz *et al.* 2007) : le radier de la station des **Henris** (codé HEN) et la section allant de l'**embouchure du Sasse à la retenue de Sisteron** (codé SSL). Le tronçon D1 est ainsi représenté par deux échantillons : **7HEN** (n = 33), et **7SSL** (n = 39).



- 2) Le tronçon **BU** comprend le linéaire du Buëch du barrage de St-Sauveur à la confluence avec la Durance. La plupart des individus ont été prélevés sur le linéaire compris entre l'aval du pont de Ribiers et la retenue de Sisteron, les autres individus ( $n = 12$ ) ont été prélevés lors de pêches ponctuelles plus en amont, la confluence Méouge / Buëch constituant le point de pêche le plus en amont. Les individus prélevés en 2007 ( $n = 17$  ; Cf. Chappaz *et al.* 2007) étant trop peu nombreux pour être représentatifs, ils ont été poolés avec les individus prélevés en 2008 pour constituer un seul échantillon : **BUE** ( $n = 61$  ; Cf. Chappaz *et al.* 2008).
- 3) Le tronçon **D2** constitue le linéaire de la Durance situé entre le barrage de St-Lazare et le seuil de Salignac (codé SLS). Le tronçon D2 est représenté par un échantillon prélevés en 2007 (**7SLS** ;  $n = 78$  ; Cf. Chappaz *et al.* 2007a)
- 4) Le tronçon **D3** est situé entre le seuil de Salignac et le barrage de L'Escale. Ce tronçon a été échantillonné en 2007, à l'aval immédiat du seuil de Salignac. Le tronçon D3 est ainsi représenté par l'échantillon **7SAL** ( $n = 36$  ; Cf. Chappaz et Cavalli 2007)
- 5) Le tronçon **D4** constitue le linéaire de la Durance compris entre le barrage de l'Escale et le seuil de La Brillanne. Ce tronçon, au sein duquel les densités d'aprons sont faibles, a été échantillonné en 2007, 2008, 2009 et 2010 pour constituer l'échantillon **D4** ( $n = 34$ ) (Cf. Chappaz *et al.* 2007c, 2009, 2010).
- 6) Le tronçon **D5** constitue le linéaire de la Durance compris entre le seuil de La Brillanne et la retenue de Cadarache. Ce tronçon, au sein duquel les densités d'aprons sont très faibles, a été échantillonné en 2007, 2008, 2009 et 2010 (Cf. Chappaz *et al.* 2007c, 2009, 2010) pour constituer l'échantillon **D5** ( $n = 28$ ).
- 7) le tronçon **VER** a été échantillonné en 2009 dans les Grandes Gorges du Verdon à l'occasion d'une étude génétique concernant l'état de conservation de l'apron dans le Verdon (Dubut *et al.* 2011). Le tronçon VER est compris entre le seuil naturel présent au niveau du Couloir Samson et la retenue de Ste-Croix. Il est représenté par l'échantillon **9VER** ( $n = 66$ ).

La plupart des aprons ont été pêchés à l'électricité selon un protocole standard (ex : Chappaz *et al.* 2007), à l'exception de ceux prélevés dans le Verdon (méthode mixte : repérage de nuit à la lampe puis capture à l'électricité ; Cf. Dubut *et al.* 2011). Une fois l'apron capturé, un petit fragment de nageoire caudale ( $< 0,25 \text{ cm}^2$ ) est prélevé à l'aide d'une paire de ciseaux chirurgicaux et stocké dans de l'éthanol à 95% jusqu'à son analyse en laboratoire. L'apron est ensuite relâché à proximité du lieu de capture.

Les prélèvements se sont étalés sur quatre années (2007-2010) et ont été réalisés par l'Université de Provence principalement à l'occasion de pêches de recensement, en partenariat avec l'ONEMA (Brigades départementales du 04, 05 et 83) et avec l'aide d'agents EDF.

#### **4.1.1-2. Acquisition des données génétiques**

##### **4.1.1-2-1. Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir des fragments de nageoire caudale prélevés et préservés dans l'éthanol. Avant l'extraction, les fragments sont débarrassés de l'éthanol grâce à un pilon et du papier absorbant. L'ADN est ensuite extrait des cellules de nageoire caudale grâce au kit DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) en suivant les instructions du fournisseur. On obtient ainsi une pelote d'ADN qui, une fois séchée, est remise en solution dans 100  $\mu\text{L}$  de DNA Hydration Solution (QIAGEN). Chaque extrait d'ADN est ensuite dilué au  $10^{\text{e}}$  pour la suite des analyses moléculaires.

##### **4.1.1-2-2. Séquençage de l'ADN mitochondrial**

Pour chaque individu, une séquence de l'ADN mitochondrial d'une longueur de 1201 paires de base (pb) et contenant le gène du cytochrome *b* a été obtenu par séquençage Sanger. Le gène du cytochrome *b* est très utilisé en génétique des populations animales (ex : Avise 2000). Il permet à la fois la reconstruction de l'histoire évolutive d'une espèce (c'est-à-dire sa phylogéographie) et une estimation de sa diversité.

Le protocole d'acquisition des données mitochondriale fait intervenir des amorces ADN (qui permettent de cibler la séquence d'intérêt) mises au point dans le cadre de l'étude sur la diversité génétique des populations d'apron de la Durance et qui seront prochainement publiées, en collaboration avec EDF, dans une revue scientifique de rang A.

#### 4.1.1-2-3. Génotypage des microsatellites

Dans le cas d'une espèce rare, généralement peu de marqueurs génétiques spécifiques sont disponibles afin d'évaluer sa diversité et sa structure génétique. Pour exemple, une étude pionnière sur la diversité génétique de l'apron (Laroche et Durand 2004) avait pu utiliser seulement 5 marqueurs microsatellites. Ces 5 marqueurs avaient en outre été développés non pas pour l'apron mais pour le sandre canadien (*Sander vitreum*). Or, lorsque l'on veut établir le statut de conservation d'une espèce et des populations qui la compose, il est nécessaire de mesurer avec le plus de précision possible la diversité génétique de cette population. Il s'agit alors de maximiser le nombre de loci étudiés.

Afin de détecter le signal en lien avec les événements récents de fragmentation anthropique du milieu durancien, et de la dégager du signal lié à l'histoire évolutive de l'espèce, nous avons sélectionné **22 marqueurs** parmi les 58 marqueurs développés précédemment (Dubut *et al.* 2010), retenant les marqueurs les plus polymorphes, et donc ceux qui présentent *a priori* les taux d'évolution les plus importants.

#### 4.1.1-3. Analyse des données génétiques

##### 4.1.1-3-1. Différenciation génétique

Nous souhaitons tester la différenciation populationnelle (i) à l'échelle du grand bassin durancien en considérant les populations du Buëch, de la Durance et du Verdon, et (ii) à l'échelle de la Durance et du Buëch.

Cette différenciation a été testée grâce aux indices de fixation **Fst** (Weir & Cockerham 1984), estimés grâce au logiciel **ARLEQUIN 3.05** (Excoffier *et al.* 2005) à la fois pour l'ADNmt et les microsatellites. La valeur des Fst est comprise entre 0 (elle peut aussi être légèrement négative ; dans les deux cas elle indique qu'il n'y a pas de différenciation) et 1 (différenciation totale). Une échelle à seuil est classiquement utilisée pour l'interprétation des valeurs significativement différentes de 0 : 0,05 pour des populations peu différenciées, puis 0,15 pour des populations différenciées, et 0,25 pour des populations fortement différenciées (ex : Hartl & Clark 2007).

La différenciation a ensuite été visualisée au niveau des microsatellites à travers une Analyse Factorielle de Correspondance Multiple (**AFCM**) grâce au logiciel **GENETIX** (Belkir *et al.* 2004) puis testée à l'aide une analyse bayésienne d'assignation implémentée dans le logiciel **STRUCTURE** (Falush *et al.* 2003, 2007).

##### 4.1.1-3-2. Analyse de la diversité génétique des microsatellites

Pour les microsatellites trois indices de diversité ont été estimés : (i) le **taux d'hétérozygotie**<sup>1</sup> théorique moyen entre les loci (**H<sub>e</sub>**), (ii) la **richesse alléliques** (**A<sub>r</sub>**) et la **richesse en allèles privés** (**A<sub>p</sub>**) (Petit *et al.* 1998 ; Kalinowski 2004). H<sub>e</sub> a été estimé grâce à ARLEQUIN, tandis que les indices A<sub>r</sub> et A<sub>p</sub> ont été estimés grâce au logiciel ADZE (Szpiech *et al.* 2008). Alors que la taille de l'échantillon a peu d'impact sur H<sub>e</sub>, les indices A<sub>r</sub> et A<sub>p</sub> vont être fortement influencés par l'effectif échantillonné (Kalinowski 2004). En effet, pour A<sub>r</sub> et A<sub>p</sub>, le paramètre déterminant est le nombre d'allèles, or la probabilité d'observer des allèles nouveaux augmente avec l'effort d'échantillonnage. Le logiciel ADZE permet de standardiser ces deux indices pour toutes les populations échantillonnées au plus petit effectif échantillonné (dans notre cas 28 individus, population D5).

<sup>1</sup> Le taux d'hétérozygotie est la proportion d'individus (les hétérozygotes) d'une population qui présentent à un même locus deux allèles différents, par opposition aux homozygotes qui ont reçu de leur mère un allèle identique à celui de leur père. On fait la différence entre le taux d'hétérozygotie théorique (H<sub>e</sub>) qui est attendu si le locus est à l'équilibre mutation-dérive (la mutation crée autant d'allèles que la dérive en élimine) et l'hétérozygotie observée (H<sub>o</sub>) qui est le nombre d'hétérozygotes observés dans l'échantillon.

Le logiciel **BOTTLENECK v1.2** (Piry *et al.* 1999) permet de tester statistiquement pour les microsatellites si une population a subi une réduction drastique et récente (entre 0,2Ne et 4Ne générations) de ses effectifs. Ce test se base sur la différence observée entre la valeur de  $H_e$  et celle de  $H_o$ . Une population qui n'a pas subi de goulot d'étranglement récent est à l'équilibre mutation-dérive (Cf. note 1, page 16), dans ce cas  $H_e \approx H_o$ . Lorsqu'une population a subi un goulot d'étranglement, l'équilibre est rompu et on observe  $H_o > H_e$  (Nei *et al.* 1975). Le **test de Wilcoxon** et le **Sign Test**, implémentés par BOTTLENECK, opèrent cette comparaison de  $H_e$  et  $H_o$  pour tous les loci et va donc renseigner précisément sur l'occurrence récente d'un goulot d'étranglement. Le modèle mutationnel TPM (Two Phases Model ; Di Rienzo *et al.* 1994) a été utilisé, comme recommandé pour les marqueurs microsatellites par Cornuet & Luikart (1996).

#### 4.1.1-3.3. Analyses de la diversité génétique mitochondriale

Concernant l'ADN mitochondrial, deux indices de diversité ont été estimés grâce au logiciel ARLEQUIN : (i) la **gene diversity** ( $H$  ; Nei 1987), qui est la probabilité de tirer au hasard deux allèles différents si on prend deux individus différents d'une population ; et (ii) le **nombre moyen de différences** entre deux séquences ( $\theta_\pi$  ; Nei 1987). Nous avons aussi estimé d'autres indices de diversité, l'estimateur  $\theta_k$  (Ewens 1972), et la **Fréquence Cumulée des Allèles Rares** (FCAR) pour lesquels il a été démontré une grande sensibilité aux variations de l'effectif efficace (Helgason *et al.* 2003). Afin de tenir compte de la taille de nos échantillons (pour certains inférieurs à 40 individus), un seuil de 10% a été retenu pour les allèles rares.

Le nombre d'haplotypes distincts ( $k$ ) permet de mesurer des différences d'hétérogénéité entre populations de la même espèce. Néanmoins, dans la mesure où  $k$  dépend largement de la taille de l'échantillon, le ré-échantillonnage va nous permettre de comparer ce paramètre lorsque les échantillons ont des tailles très différentes (Helgason *et al.* 2003). Nous avons donc comparé  $k$  entre les populations que nous avons étudiées en ré-échantillonnant 1000 fois sans remise 28 haplotypes (taille du plus petit échantillon, D5) à partir des  $n$  haplotypes des échantillons initiaux. L'indice  $k_{28}$  est ainsi obtenu.

Afin d'obtenir une représentation graphique et synthétique de la variabilité de la diversité mitochondriale dans le Bassin de la Durance, une analyse bivariée de **FCAR** et  $k_{28}$  a ensuite été menée.

### 4.1.2. RESULTATS

#### 4.1.2-1. Différenciation génétique

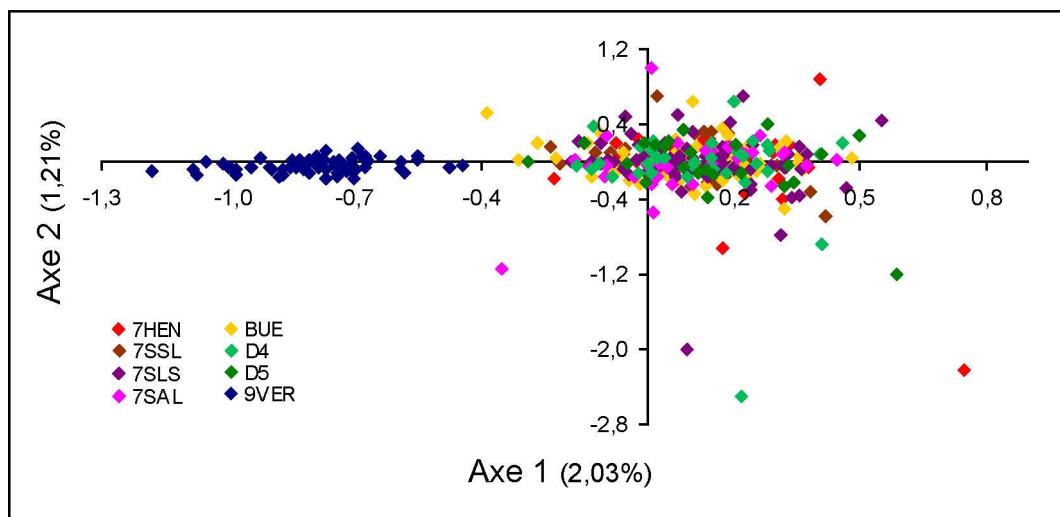
Le Tableau 1 rapporte les valeurs des statistiques  $F_{st}$  entre les paires de populations d'apron. On considère la valeur de  $F_{st}$  comme significative lorsqu'elle est statistiquement différente de 0. Plus cet indice est élevé, plus il y a de différenciation entre les deux populations concernées. La demi-matrice supérieure concerne l'ADNmt, et la demi-matrice inférieure concerne les microsatellites.

	7HEN	7SSL	BUE	7SLS	SAL	D4	D5	9VER
7HEN	0	-0,021	-0,002	-0,007	-0,015	0,024	-0,022	<b>0,274</b>
7SSL	-0,001	0	-0,014	-0,016	-0,023	0,001	-0,015	<b>0,229</b>
BUE	-0,001	-0,001	0	-0,006	-0,014	0,002	0,005	<b>0,166</b>
7SLS	0,000	0,001	0,002	0	-0,019	0,004	-0,005	<b>0,163</b>
7SAL	-0,001	-0,002	0,000	0,001	0	-0,008	-0,008	<b>0,217</b>
D4	-0,001	-0,001	0,000	0,002	0,000	0	<b>0,048</b>	<b>0,145</b>
D5	0,001	-0,002	-0,002	-0,001	-0,002	-0,004	0	<b>0,394</b>
9VER	<b>0,087</b>	<b>0,085</b>	<b>0,083</b>	<b>0,084</b>	<b>0,079</b>	<b>0,090</b>	<b>0,086</b>	0

**Tableau 1.**  $F_{st}$  entre les paires de populations d'apron.

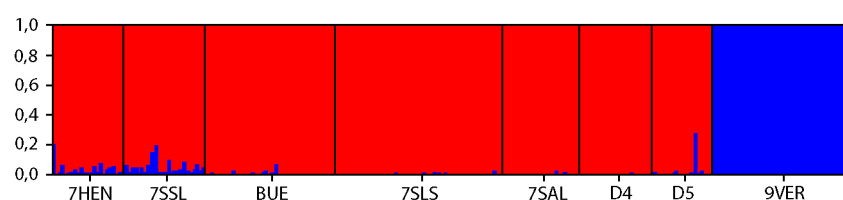
En rouge sont indiquées les valeurs significatives au seuil de 5% après application de la procédure de contrôle de Benjamini et Hochberg (1995)

Cette analyse montre qu'il y a une **forte différenciation entre la Durance (Buëch inclus) et le Verdon**. La structuration est beaucoup plus importante (valeurs Fst plus importantes) en ce qui concerne l'ADNmt. Cette partie du génome subit en effet plus rapidement les effets de la dérive génétique, qu'elle soit due à une réduction de l'effectif de chacune des populations ou à la limitation ou la suppression des flux génétiques entre les populations. En revanche, pour les deux marqueurs, on n'observe **aucune différenciation entre les populations duranciennes (Buëch inclus)**. On note néanmoins une valeur proche de 0,05 (en bleu) lorsque D5 est comparé à D4 en ce qui concerne l'ADNmt. Cette valeur suggère un début de différenciation dans ce tronçon, qui doit néanmoins être interprété avec prudence au vu de l'effectif limité de l'échantillon ( $n = 28$ ) et de la non significativité des valeurs après application de la procédure de contrôle de Benjamini & Hochberg (1995). L'**AFCM menée sur les individus** à partir des microsatellites (Fig. 4), va dans le même sens que l'analyse des Fst. Deux clusters peuvent être identifiés : le **Verdon** d'une part et la Durance (Buëch inclus) d'autre part. Sur la représentation graphique de cette analyse, chaque point correspondant à un individu caractérisé par ses allèles microsatellites. On note que les individus de toutes les populations de la Durance et du Buëch se superposent, et forment un groupe homogène au sein duquel aucune structuration génétique ne peut être identifiée.



**Figure 4.** Représentation graphique de l'AFCM menée sur les individus à partir des microsatellites. (Seuil de significativité des axes : **0,4%** ; en dessous de ce seuil, la variation observée est liée au hasard)

L'analyse conduite avec le logiciel STRUCTURE recherche le nombre de groupes (K) qui explique le mieux les données microsatellites et ceci en minimisant le nombre de groupes. L'algorithme utilisé par **STRUCTURE** maximise ainsi la probabilité postérieure des données. Chaque bande graphique est composée d'autant de barres verticales que d'individus, qui sont alors caractérisés par les résultats des tests d'assignation aux groupes K. C'est pour un nombre de groupes  $K=3$  (Fig. 6) que cette probabilité est la plus forte. Pour  $K=2$ , le **Verdon est encore une fois discriminé** (en bleu), et **un seul cluster est présent dans le reste du bassin de la Durance** (en rouge). Les populations de la Durance (Buëch inclus) ne sont donc pas discriminées, révélant leur homogénéité.



**Figure 6.** Graphe des analyses menées avec STRUCTURE pour K=2 (valeur de vraisemblance la plus élevée).

Les trois types d'analyse de la différenciation (Fst, AFCM et STRUCTURE) sont congruents sur deux points :

- 1) **une nette différenciation du Verdon par rapport au reste du Bassin durancien,**
- 2) **pas de différenciation discernable et significative parmi les populations duranciennes (Buëch inclus), qui sont concernées par la fragmentation en lien avec les barrages et les seuils.**

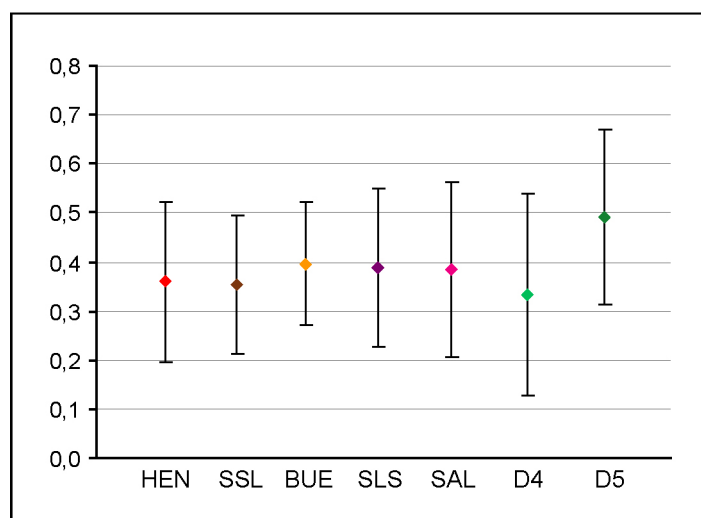
#### 4.1.2-2. Diversité génétique des microsatellites

Concernant les microsatellites, la diversité des populations du Bassin de la Durance est assez homogène (cf. valeurs de He et Ar ; Tableau 2), à l'exception de la population du Verdon dont la diversité est significativement inférieure (voir particulièrement les valeurs de Ar et Ap ; Tableau 2).

	7HEN	7SSL	BUE	7SLS	7SAL	D4	D5	9VER
<b>Nb de loci monomorphes</b>	0	0	0	0	0	0	0	<b>3</b>
<b>He</b>	0,686	0,697	0,703	0,691	0,689	0,685	0,712	<b>0,580</b>
<b>Ar</b>	6,54	6,44	6,43	6,41	6,54	6,23	6,63	<b>3,27</b>
<b>Ap<sub>(2007)</sub></b>	0,360	0,354	0,396	0,388	0,384	0,334	<b>0,490</b>	<b>0,024</b>

**Tableau 2.** Indices de diversité des microsatellites.

Dans le système Durance-Buëch, aucune structuration amont-aval de la diversité génétique n'est observée, ni aucun impact notable de la fragmentation. L'association de richesses alléliques (Ar) et de richesse en allèles privés (Ap) homogènes signent un fonctionnement autonome de l'ensemble des tronçons de dévalant. Même ceux pour lesquels la dévalaison était attendue comme un paramètre déterminant (D3, D4 et D5) présentent des Ap équivalentes (voire supérieure en ce qui concerne D5) à celles des sections amont (Tableau 2, Fig. 7). En effet, si l'hypothèse de la dévalaison comme mode de fonctionnement prévalent ou important était valide, les valeurs de Ap seraient significativement inférieures dans ces trois tronçons.



**Figure 7.** Richesses en allèles privés (Ap) dans la Durance et le Buëch, associées à leurs Intervalles de Confiance à 95% (IC 95%).

En ce qui concerne le Verdon, si le taux d'hétérozygotie moyen attendu ( $H_e$ ) est encore comparable à celui des autres populations, la richesse allélique ( $A_r$ ) est plus de 1,5 fois inférieure à celles des populations duranciennes avec lesquelles le Verdon était en contact avant l'aménagement des cours d'eau. Quant à la richesse en allèles privés ( $A_p$ ), elle est 7 fois inférieure à celle des autres populations du bassin de la Durance.

Le test de Wilcoxon et le Sign Test permettent de détecter si une chute de diversité récente (0,2Ne-4Ne générations), et donc en lien possible avec la fragmentation du milieu générée par les aménagements hydroélectriques de la rivière, a affecté le polymorphisme des microsatellites. D'après ces tests (Tableau 3), les populations duranciennes (Buëch inclus) sont à l'équilibre mutation-dérive. Ce test détecte un excès global d'hétérozygote ( $H_o > H_e$ ) uniquement dans la population du **Verdon**. C'est donc la seule population dans lequel un goulot d'étranglement récent peut être détecté à partir des données des microsatellites.

	7HEN	7SSL	BUE	7SLS	7SAL	D4	D5	9VER
<b>H<sub>o</sub> &lt; H<sub>e</sub></b>	0,17006	0,27986	0,35431	0,15908	0,31067	0,55008	0,31778	0,99999
<b>H<sub>o</sub> &gt; H<sub>e</sub></b>	0,83998	0,71999	0,64987	0,84351	0,68995	0,44889	0,69112	<b>0,00001</b>
<b>Sign Test</b>	0,23919	0,10346	0,44112	0,32723	0,42132	0,48989	0,41987	<b>0,00001</b>

**Tableau 3.** Résultats du test de Wilcoxon et du Sign Test (BOTTLENECK).

En rouge sont indiquées les valeurs significatives au seuil de 5% après application de la procédure de contrôle de Benjamini & Hochberg (1995)

#### 4.1.2-3. Diversité génétique de l'ADN mitochondrial

En accord avec la détection d'un goulot d'étranglement récent dans le Verdon à partir des microsatellites, une **diversité génétique de l'ADNmt nulle est observée dans le Verdon** (valeurs en rouge, Tableau 4). En outre la **diversité dans le Buëch et dans le tronçon D5 est globalement plus faible que dans les populations de la Durance**, ceci pour l'ensemble des indices de diversité (valeurs en orange dans le Tableau 4).

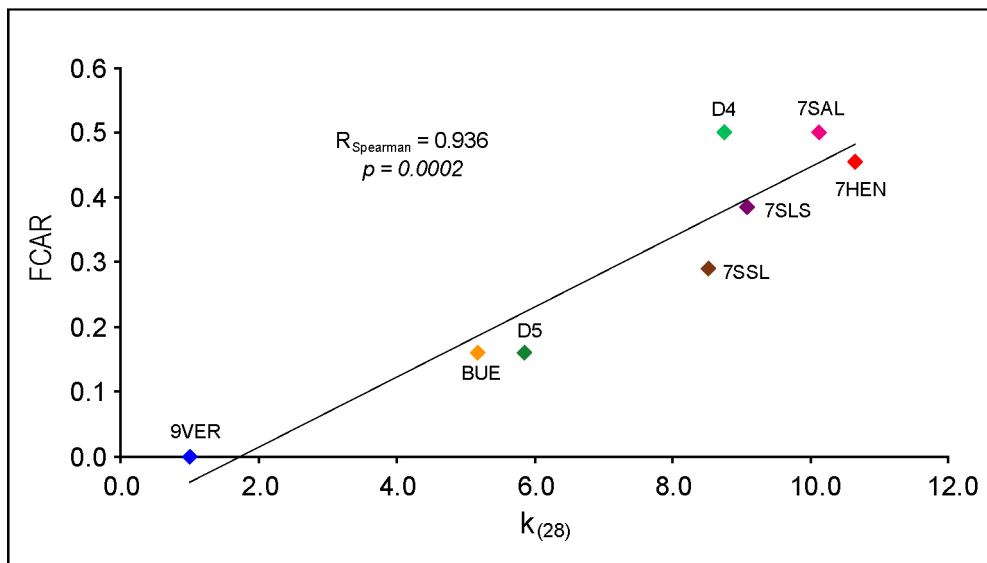
	7HEN	7SSL	BUE	7SLS	7SAL	D4	D5	9VER
<b>H</b>	0,82	0,72	<b>0,46</b>	0,74	0,74	0,74	<b>0,63</b>	<b>0,00</b>
<b><math>\theta_\pi</math></b>	4,06	3,40	<b>2,61</b>	3,41	3,42	2,67	<b>3,49</b>	<b>0,00</b>
<b><math>\theta_k</math></b>	7,42	5,65	<b>3,15</b>	6,41	6,86	4,40	<b>2,13</b>	<b>0,00</b>
<b>FCAR</b>	0,45	0,29	<b>0,16</b>	0,38	0,50	0,50	<b>0,16</b>	<b>0,00</b>
<b><math>k_{(28)}</math></b>	10,65	8,52	<b>5,18</b>	9,08	10,13	8,76	<b>5,86</b>	<b>1,00</b>
<b>k</b>	13	12	<b>10</b>	17	13	10	<b>6</b>	<b>1</b>

**Tableau 4.** Indices de diversité de l'ADN mitochondrial.

Comparativement aux autres populations de la Durance, la faible diversité du Buëch et du secteur D5 est encore plus évidente pour les indices les plus sensibles aux variations d'effectif efficace que sont  $\theta_k$ , **FCAR** et  $k_{(28)}$  : pour ces trois paramètres la **diversité du Buëch et de D5 est entre 1,5 et 2 fois inférieure à celle du reste de la Durance**. Cette faible diversité peut être caractérisée graphiquement par une analyse bivariée de ces deux estimateurs (Fig. 5).

Une forte corrélation (Figure 8) est observée entre les deux paramètres ( $R_{\text{Spearman}} = 0,936$  ;  $p = 0,0002$ ), et le **Buëch et D5 apparaissent clairement en position intermédiaire** entre les populations de la Durance (présentant une forte diversité) et la population du Verdon

(présentant une diversité nulle). Une corrélation significative est aussi observée entre les paramètres FCAR et  $\theta_k$  ( $R_{\text{Spearman}} = 0,957$  ;  $p = 0,0002$ ).



**Figure 8.** Analyse bivariée et test de corrélation des paramètres **FCAR** (fréquence cumulée des allèles rares) et  $k_{(28)}$  (nombre d'haplotypes distinct pour 28 individus ré-échantillonnés).

#### 4.1.3. SYNTHÈSE des RESULTATS et PERSPECTIVES de CONSERVATION dans le BASSIN de la DURANCE

L'analyse d'une séquence de 1201 pb de l'ADNmt (comprenant le gène du cytochrome *b*) et de 22 loci microsatellites a permis d'apporter des réponses concernant (i) la diversité génétique des populations d'apron dans le bassin de la Durance, (ii) leur structure génétique dans ce bassin, et (iii) l'impact de la fragmentation sur la diversité et la structure génétiques.

Nos analyses montrent que, en ce qui concerne le polymorphisme des microsatellites, seul le Verdon a connu une chute drastique de sa diversité génétique en lien avec un goulot d'étranglement récent. Les analyses de diversité menées sur l'ADN mitochondrial confirment la chute récente de l'effectif efficace de la population du Verdon mise en évidence sur les analyses menées à partir de microsatellites. L'exploration de la structure des populations et de la diversité génétique a mis en évidence une **forte différenciation entre le Verdon d'une part et le système Durance-Buëch d'autre part**. Cette différenciation forte est vraisemblablement le fruit d'une **dérive génétique importante** subie par la population d'apron de ce secteur, elle-même faisant suite à un **goulot d'étranglement en lien avec les aménagements du cours du Verdon**. Ces aménagements ont débuté dès 1866, rompant la connectivité entre la partie amont du Verdon (dans laquelle subsiste la population actuelle) et le reste du bassin versant. Dans la seconde partie du XXe siècle des aménagements supplémentaires (barrage actuel de Quinson et barrage de Sainte-Croix) ont détruit une part non négligeable des habitats de rivière situés en amont de Quinson en les noyant sous les lacs de retenue associés au barrage. Ces événements, associant fragmentation et destruction des habitats, semblent avoir contribué à faire passer la population du Verdon par un goulot d'étranglement très étroit, favorisant ainsi une forte dérive génétique.

En ce qui concerne le **système Durance-Buëch**, la diversité génétique des microsatellites est à la fois élevée et homogène sur l'ensemble du linéaire. En outre, aucun gradient amont-aval de la diversité génétique n'a pu être mis en évidence, signant un rôle très limité de la dévalaison dans le fonctionnement des populations d'aprons. Ces éléments, marquant un



effectif efficace très important, suggère que **cet effectif efficace et les flux génétiques entre les populations de la Durance et du Buëch ont toujours été très importants avant la fragmentation de l'habitat liée aux ouvrages**. Dans la mesure où vraisemblablement des barrières physiques (les barrages et les seuils) empêchent actuellement les flux entre les différents tronçons de dévalant, l'absence de structuration génétique (au niveau des microsatellites et de l'ADN mitochondrial) entre la plupart de ces tronçons suggère que l'ensemble des populations de la Durance et celle du Buëch étaient en panmixie avant la fragmentation de l'habitat. Dans le cas des microsatellites l'effectif efficace de la population durancienne (Buëch inclus) était initialement suffisamment important pour ne pas être érodé sous l'effet de la fragmentation liée aux barrages et aux seuils.

Cependant, les analyses de diversité menées sur l'ADN mitochondrial montrent, à l'inverse des microsatellites, que les populations du **Buëch et de D5 ont subi une chute de leur effectif efficace**. Le différentiel de diversité est tel entre le Buëch et D5 d'une part et le reste de la Durance d'autre part que **les flux génétiques en provenance des autres tronçons sont suffisamment restreints pour ne pas influencer la diversité génétique mitochondriale des populations du Buëch et de D5**. Ces flux ne compensent pas la chute de diversité. Le **contraste observé entre le patron de diversité génétique des microsatellites et celui de l'ADN mitochondrial** est lié à leurs propriétés démographiques respectives : l'ADN mitochondrial, présentant 4 fois moins de copies dans la population que l'ADN nucléaire, sa diversité sera en premier lieu touchée par une diminution de l'effectif efficace d'une population. C'est ce contraste qui permet de penser que le **déclin démographique** des populations du Buëch et de D5 est **très récent**, trop récent pour avoir entamé la diversité (de surcroît très importante) des microsatellites dans le Buëch et D5.

Les analyses permettent ainsi d'avancer trois hypothèses qui permettent d'expliquer ce patron de variation :

- 1) un **déclin démographique très récent dans le Buëch et D5**,
- 2) un **arrêt des flux génétiques Durance → Buëch**,
- 3) une **perte de connectivité fonctionnelle entre D5 et les autres tronçons de la Durance** (situés en amont)

Les ouvrages semblent donc avoir eu un impact direct ou indirect sur la diversité génétique de ces deux secteurs, en limitant la connectivité avec les autres populations au point que les flux entrants (faibles) n'ont pas d'impact positif sur la démographie dans le Buëch et D5. Dans le cas de D5, le seuil de La Brillanne (construit en 1906) serait à l'origine de la perte de connectivité fonctionnelle entre D4 et D5. Dans le cas du Buëch, l'ouvrage le plus proche est le barrage de St-Lazare, construit en 1976. Néanmoins, il n'interrompt pas directement a priori la connectivité entre la Durance et son affluent le Buëch. Cependant, le passage entre les deux systèmes ne peut désormais se faire que par le lac de retenue associé au barrage. Les données génétiques montrent qu'au niveau de la confluence Durance-Buëch, il semble donc exister une barrière empêchant les flux Durance → Buëch. Si la hauteur d'eau peut être un facteur limitant, il n'est pas obligatoirement rédhibitoire pour l'apron (Labonne *et al.* 2003 ; Cavalli *et al.* 2009). En revanche, le colmatage de la retenue est important (Maison Régionale de l'Eau 2009), et ce sur une distance de plusieurs centaines de mètres à plus d'un kilomètre entre le cours vif de la Durance et celui du Buëch. En outre, la restitution du canal EDF dans le Buëch juste en amont de la confluence, impose des débits et des vitesses très importants, qui pourraient limiter fortement (i) l'entrée d'apron d'origine durancienne dans le Buëch et (ii) la montaison des aprons du Buëch qui aurait dévalé en aval de la restitution. Ces trois facteurs ainsi que leur effet combiné sur la connectivité Durance-Buëch nécessitent davantage d'investigations dans la mesure où ils sont potentiellement à l'origine de l'arrêt de flux populationnels (et génétiques) significatifs dans le sens Durance → Buëch et potentiellement, dans le sens Buëch aval restitution → Buëch amont restitution.

Le différentiel de diversité mitochondriale entre D4 et D5, mais aussi l'homogénéité et l'importance des richesses alléliques et des richesses en allèles privés suggèrent aussi que **la dévalaison n'est pas le facteur principal de fonctionnalité des populations d'aprons**



**de la Durance**, ceci même dans les cas où elle est possible en théorie toute l'année, comme au niveau du seuil de La Brillanne (séparant D4 et D5) ou au niveau du seuil de Salignac (séparant D2 et D3). **Dans chacun des tronçons de dévalant il y a donc reproduction.**

Cependant, dans le cas des populations du Buëch et de D5 l'**effet de sauvetage** (*rescue effect*; Brown et Kodric-Brown 1977), lié à la migration d'aprons en provenance d'autres secteurs, est rompu. Le déclin démographique récent de ces deux populations semble lié à la suppression de cet effet de sauvetage nécessaire à la persistance, à terme, de la population du Buëch. Dans ce cas, **la rivière Buëch et le tronçon D5 auraient une capacité d'accueil<sup>2</sup> (*carrying capacity*; ex : Watts 1971) plus faible que celle des autres secteurs de la Durance.** Ces hypothèses, issues des données génétiques, sont en accord avec les données issues des pêches de recensement effectuées sur le Buëch et D5 qui ont permis de montrer que la densité des aprons sur le Buëch et D5 est plus faible que dans la plupart des autres secteurs de la Durance (Chappaz *et al.* 2010 ; Chappaz *et al.* 2011).

Ce sont donc **trois populations qui ont subi un déclin démographique** (c.a.d, une chute de leurs effectifs réels et efficaces) : **celles du Verdon, du Buëch et du tronçon D5.** Ce diagnostic de conservation doit donc susciter un suivi poussé de ces populations. Il s'agit d'évaluer la dynamique démographique de ces trois populations : sont-elles encore en train de subir une chute de ses effectifs ? Ou bien se sont-elles stabilisées ? Dans cette perspective, la mise en place d'un **monitoring génétique** et d'un **suivi démographique** de ces populations sur une phase minimale de 5 à 10 ans (avec des réserves sur la faisabilité du suivi démographique en D5 au vu des très faibles densités) permettrait d'apporter des réponses à ces questions et ainsi d'améliorer la gestion des populations d'aprons. Des prélèvements génétiques pourraient être planifiés pour 2012 et 2016 afin de suivre l'évolution de la diversité génétique de ces populations et déterminer si la chute de diversité observée ici se poursuit ou si ces populations ont recouvré une dynamique démographique stable voire positive.

Enfin, la diversité génétique joue un rôle clé dans la survie des individus et dans leur reproduction et donc dans la persistance de l'ensemble de la population. Or cette diversité ne pourra pas être restaurée par la mutation qui ne générera pas de nouveau allèles avant plusieurs dizaines de milliers d'années. Seuls des flux (échanges) génétiques permettraient d'accélérer rapidement le recouvrement de la diversité génétique initiale, équivalente à celle de la Durance. Il est nécessaire de **favoriser la connectivité entre les populations**, et donc de favoriser l'**apport de diversité nouvelle** dans les populations qui en ont perdu, mais aussi **favoriser la complémentarité des habitats** et donc la survie des individus.

## 4.2 Le Bassin de l'Ardèche

### 4.2.1. Echantillonnage

En 2012 a débuté un échantillonnage ayant pour objectif de prendre en compte l'ensemble des secteurs où l'apron est recensé dans le Bassin de l'Ardèche. Sur la période de juillet à septembre 2012, **175 individus** ont été capturés et prélevés en vue des analyses génétiques. Les captures ont été effectuées à l'occasion de prospections nocturnes de recensement effectuées par l'ONEMA. Les aprons sont d'abord repérés à la lampe (leurs yeux réfléchissent la lumière), puis capturés à l'aide d'épuisettes ou à l'aide d'un appareil de pêche électrique de type DEKA.

Les effectifs des aprons échantillonnés en 2012 sont répartis en plusieurs échantillons populationnels correspondant aux tronçons de dévalant du bassin ardéchois dans lesquels l'apron est présent. **Neuf tronçons et sous-tronçons de rivière** (A1a, A1b, A20, A30, A60, A7a et A7b sur l'Ardèche, B10 et B20 sur la Beaume) (Fig. 1) ont ainsi été prospectés et huit ont pu être échantillonnés (la prospection en A60 n'a pas permis de mettre en évidence des

---

<sup>2</sup> La capacité d'accueil est la taille maximale de la population d'un organisme qu'un milieu donné peut supporter au vu de paramètres tels que les ressources alimentaires, le nombre de sites de reproduction, la température, etc.

aprons). Le rapport intermédiaire de février 2013 (Dubut *et al.* 2013) recueille les détails concernant les zones prospectées ainsi que les classes de taille des aprons capturés. Un échantillon complémentaire (A1c), prélevé par Pascal Roche (ONEMA) en 2011 au niveau de Pradons (amont du seuil de Ruoms), a été ajouté pour les analyses.

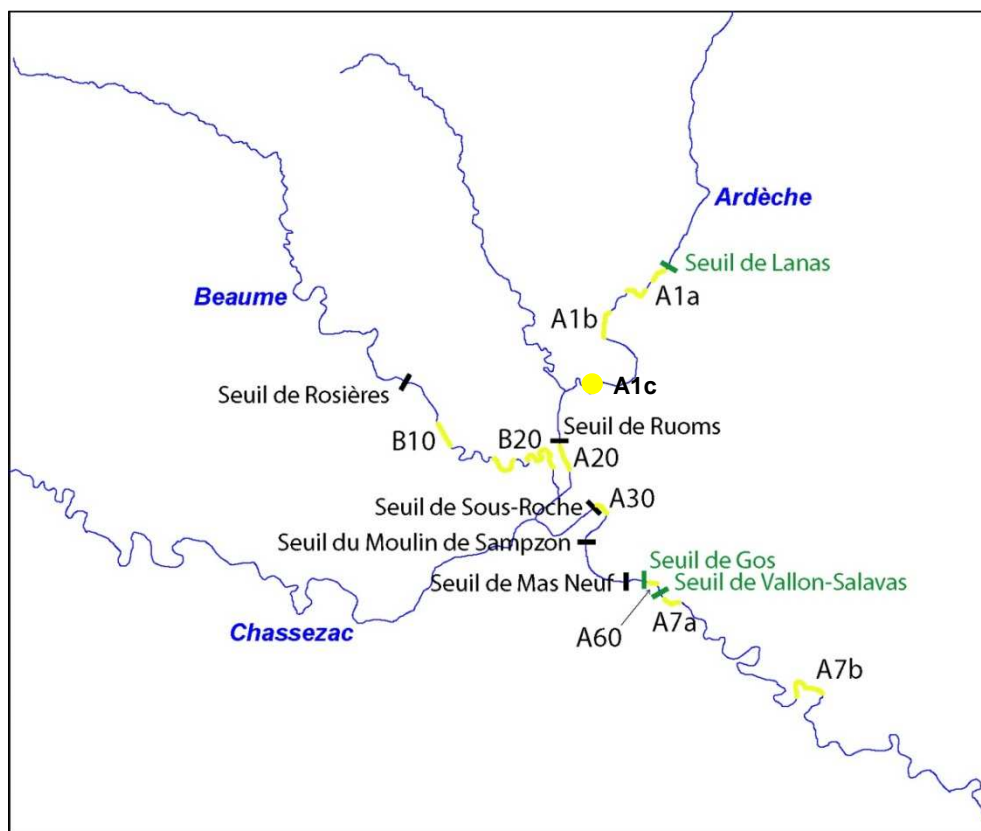


Figure 1. Localisation des zones prospectées en 2012 (en jaune)

#### 4.2.2. Résultats

La différenciation observée entre les différents secteurs échantillonnés est assez nette. Les analyses d'assignation ont permis de mettre en évidence trois clusters distincts (Fig. 2). Le cluster I (en bleu, Fig. 2) regroupe l'ensemble des individus collectés sur la rivière Beaume, ainsi que certains des individus collectés directement à l'aval du seuil de Ruoms. Le cluster II (en rouge, Fig. 2) regroupe l'ensemble des individus collectés en amont du seuil de Ruoms et participe à la caractérisation des secteurs de la rivière Ardèche situés en aval du seuil de Ruoms, jusque dans les Gorges de l'Ardèche. Le cluster III (en vert, Fig. 2) est moins différencié que les clusters I et II mais il est retrouvé uniquement dans les secteurs échantillonnés à l'aval du seuil de Sous-Roche. Le cluster III est associé dans ces secteurs soit aux clusters I et II (à l'aval direct du seuil de Sous-Roche), soit en association avec le cluster II.

Les analyses d'assignation permettent d'identifier des individus migrants. Notamment, à l'aval du seuil de Ruoms, la plupart des individus appartiennent soit au cluster I, et sont vraisemblablement issus de la Beaume, soit au cluster II, et sont vraisemblablement issus de l'amont du seuil du Ruoms. L'**aval du seuil de Ruoms** apparaît ainsi comme une **population puits** ayant pour sources les populations de la Beaume et les populations de l'Ardèche localisées à l'amont du seuil de Ruoms. Il faut noter aussi dans ce secteur trois individus « hybrides » caractérisés par 50% du cluster I et 50% du cluster II (Fig. 2).

La Beaume apparaît aussi comme une population source fournissant des migrants pour le secteur A30 (aval du seuil de Sous-Roche). Globalement, les analyses menées indiquent que

la plupart des flux se font dans le sens amont-aval, et que la montaison est soit très limitée (ex : seuls 2 individus sur la Beauce présentent ~25% du génome du cluster II caractéristique de l'Ardèche), soit inexistante. Ce dernier cas est observé au niveau des seuils de Ruoms et de Sous-Roche qui sont des barrières infranchissables à la montaison. Ces ouvrages empêchent en effet la diffusion du cluster I à l'amont du seuil de Ruoms, et du cluster III à l'amont du seuil de Sous-Roche. Ces flux quasi unidirectionnels (dans le sens amont-aval) ont vraisemblablement permis la différenciation très nette des clusters I et II, respectivement sur la Beauce et sur l'Ardèche en amont du seuil de Ruoms.

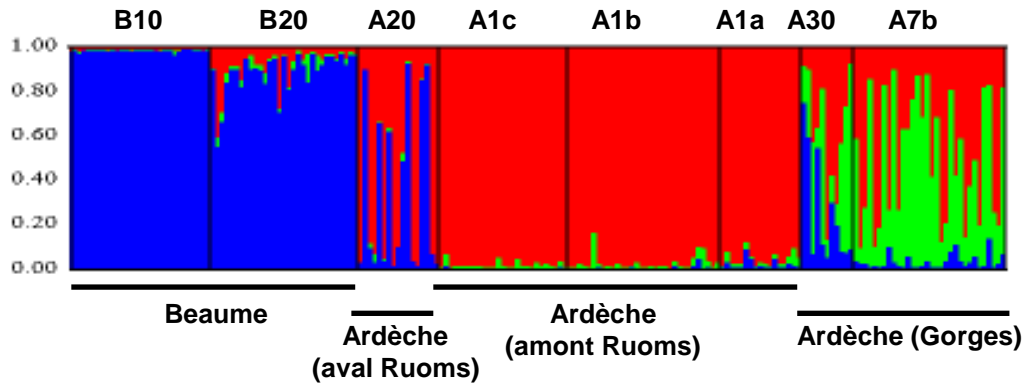


Figure 2. Barplot issu des analyses d'assignation.

L'analyse des richesses alléliques et en allèles privés ont été menées pour les stations comprenant au moins 15 individus échantillonnés. Pour des effectifs inférieurs à 15 individus, la significativité des indices de diversité est très limitée. Dans les cas où plusieurs stations ont été échantillonnées pour un même tronçon de rivière (A1a, A1b et A1c pour l'Ardèche en amont du seuil de Ruoms ou B10 et B20 pour la Beauce), à l'instar des analyses d'assignation, les analyses de diversité génétique n'ont pas permis de mettre en évidence de différences intra-tronçon significatives. Les résultats pour Ar et Ap sont donc présentés par tronçon (Tableau 1).

	Beauce	Ardèche Aval Ruoms	Ardèche Amont Ruoms	Ardèche Gorges
Ar	3,26	3,27	3,02	3,31
Ap	0,18	0,08	0,07	0,14

Tableau 1. Indices de diversité génétique par tronçon de rivière (Bassin de l'Ardèche).

La richesse allélique (Ar) semble assez homogène entre les différents secteurs du bassin de l'Ardèche avec des valeurs proches de 3,3. Seules les populations à l'amont du seuil de Ruoms présentent une diversité allélique inférieure (3,02). Ces populations présentent aussi une richesse en allèles privés (Ap) plus faible que les populations de la Beauce ou des Gorges de l'Ardèche. Ceci complète les conclusions issues des analyses d'assignation concernant l'infranchissabilité du seuil de Ruoms à la montaison. Cet ouvrage ne permet plus aux populations situées en amont de faire appel à la migration comme source de variation génétique. Les patrons de structure et de diversité génétiques suggèrent que ce manque de flux a induit un phénomène de dérive génétique, lui-même à l'origine de la différenciation de ce secteur et de l'érosion de sa diversité génétique.

En outre, dans le secteur Ardèche à l'aval immédiat du seuil de Ruoms (A20) une faible valeur d'Ap est observée associée à une valeur d'Ar forte. C'est ce qui est attendu d'une population puis. Les allèles qui lui sont spécifiques (privés) sont très peu nombreux puisqu'elle reçoit ses allèles d'autres

populations. En revanche, comme elle bénéficie d'apports importants des populations sources, une population peut peu maintenir une forte diversité génétique.

#### 4.2.3. Conclusions pour le Bassin de l'Ardèche

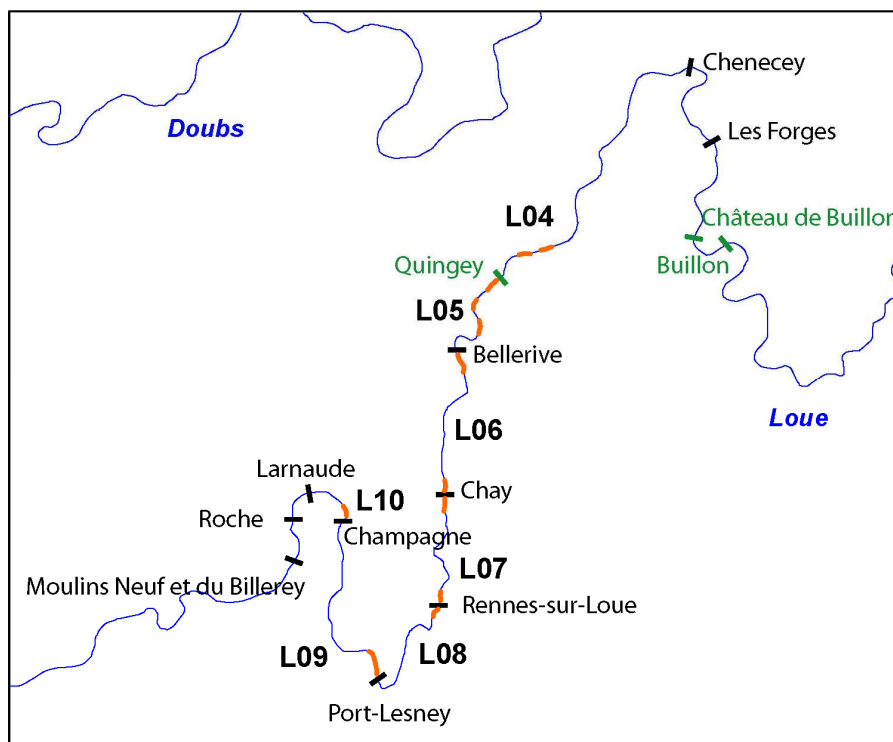
La différenciation génétique entre la Beauce et l'Ardèche est très importante. Elle est notamment liée à l'impact des seuils de Ruoms et de Sous-Roche (infranchissables à la montaison) et au fonctionnement des flux entre secteurs qui fait appel largement à la dévalaison, mais qui limite les flux à la montaison (notamment Ardèche vers Beauce).

En conséquence, à ce stade de l'étude un secteur apparaît comme plus fragilisé : le secteur en amont du seuil de Ruoms.

### 4.3 La rivière Loue

#### 4.3.1. Echantillonnage

Sur la Loue, la présence de l'apron est avérée ou supposée sur treize tronçons de rivière (notés L) (délimités chacun par des seuils ou des barrages) (ex : Richard 2007). Néanmoins les faibles densités des populations des tronçons en amont (L01, L02 et L03) et en aval (L11, L12 et L13) ne permettent pas d'envisager un échantillonnage suffisant permettant de répondre aux objectifs de l'étude. Dans le cadre des études génétiques, **sept tronçons ont donc été retenus : L04 à L10** (Fig. 3).



**Figure 1.** Localisation des zones prospectées en 2012, 2013 et 2014 sur la Loue (en orange).

Trois campagnes de prospections ont été menées à ce jour. La première campagne a été menée en 2012 à l'aval du seuil de Bellerive (L06). La deuxième campagne a été menée en 2013 sur les tronçons L04, L05, L09 et L10. Cette dernière campagne a aussi été l'occasion de prospecter le tronçon L13, à l'aval direct des barrages du moulin Neuf et du moulin du Billerey, mais n'a pas permis de détecter l'espèce sur ce secteur. La troisième campagne de prospection a été conduite en 2014. L'objectif était de compléter l'échantillonnage sur les tronçons L04, L05 et L10, mais aussi d'échantillonner les secteurs L07 et L08 (qui n'avaient pu faire l'objet de prospection en 2012 et 2013). En outre, à l'occasion des prospections

conduites dans le secteur L07, un second échantillon pour le secteur L06 a pu être constitué. Il s'agit de juvéniles capturés directement à l'amont du seuil de Chay. Pour obtenir un effectif suffisant, les individus capturés sur les secteurs L07 et L08 ont été poolés afin de constituer un seul et même échantillon.

Date de prospection	Tronçons	Code Station	Précisions	Effectifs
	<b>L04</b>			<b>30</b>
2009		CHE+CAB	Chenecey + Chouzelot Abrevoir	4+4
02/09/2013		CHZ	Chouzelot Village	1
02/09/2013		CHA	Chouzelot Abrevoir	11
19/09/2014		CHZ	Chouzelot Village	2
19/09/2014		CAB	Chouzelot Abrevoir	8
2008-2009-2010	<b>L04/L05</b>	QGP	Passe de Quingey	<b>17</b>
	<b>L05</b>			<b>28</b>
2009		LLQ	Lavans	1
02/09/2013		QAV	Quingey Aval Barrage	10
02/09/2013		QGR	Quingey Graves	5
02/09/2013		QGL	Lavans	6
18/06/2014		QAV	Quingey Aval Barrage	6
	<b>L06a</b>			<b>33</b>
2009		BEL	Aval du seuil de Belle rive	3
31/07/2012		LBD	Aval du seuil de Belle rive	30
03/09/2013	<b>L06b</b>	LBV	Amont seuil de Chay	<b>26</b>
	<b>L07+L08</b>			<b>29</b>
15/09/2014		RSL	Seuil de Rennes/Loue	22
15/09/2014		CYM+CYV	Aval du seuil de Chay	7
	<b>L09</b>			<b>32</b>
2009		PTL	Port-Lesney	2
03/09/2013		PLN	Port-Lesney	30
	<b>L10</b>			<b>15</b>
03/09/2013		BUF	Buffard aval	14
18/06/2014		BUF	Buffard aval	1
	<b>TOTAL</b>			<b>210</b>

**Tableau 1.** Détails des zones prospectées et effectifs des aprons capturés sur la Loue.

L'échantillonnage a été effectué à l'occasion de prospections nocturnes avec le support technique et logistique de l'ONEMA : les aprons sont d'abord repérés à la lampe, puis capturés à l'aide d'épuisettes ou à l'aide d'un appareil de pêche électrique de type DEKA. Les campagnes de prospection ont permis à ce jour de capturer et échantillonner **181 individus** en vue des analyses génétiques. Certains individus ont été capturés à deux reprises : 3 individus re-capturés sur 13 échantillonnés pour le secteur L04 ; 3 sur 9 pour L05 ; et 4 sur 5 pour L10. Ces recaptures étaient suspectées lors des prospections (marque de régénération des secondes nageoires dorsales) puis confirmées par les analyses génétiques. Les effectifs reportés dans le **Tableau 1**, qui correspondent à ceux utilisés pour les analyses statistiques, ne prennent en compte qu'une seule fois ces individus re-capturés et incluent **14 individus** prélevés en **2009** par l'ONEMA sur plusieurs des secteurs étudiés (Cf. Tableau 1). Sont aussi inclus dans cette étude **17 individus** échantillonnés en 2008, 2009 et 2010 dans le cadre du suivi de la **passé à apron du barrage de Quingey**. Au total, **210 individus** sont inclus dans cette étude.

#### 4.3.2. Diversité et structure génétique sur la Loue

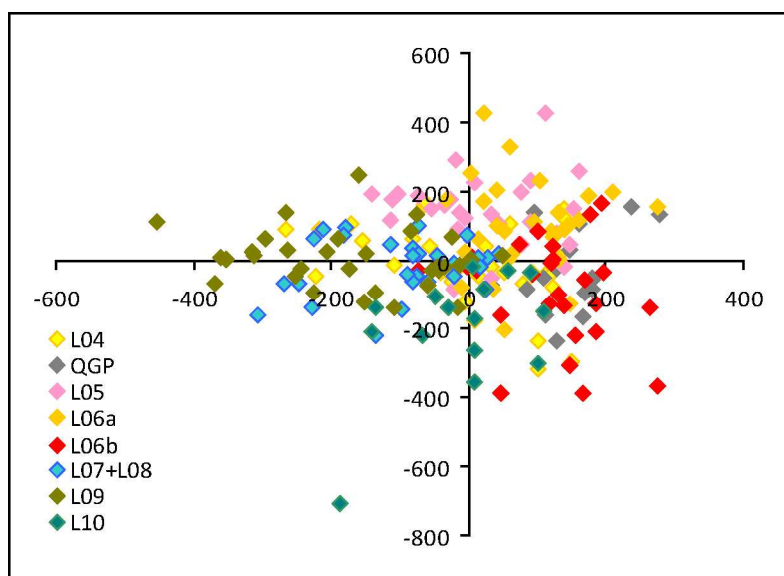
Dans le **Tableau 2** sont reportés les valeurs des trois indices de diversité génétique mesurés à partir des échantillons collectés sur la Loue.

Tronçons	Effectif	He	Ar	Ap
L04	30	0,38	2,52	0,014
QGP	17	0,37	2,53	0,021
L05	28	0,38	2,52	0,009
L06a	33	0,38	2,57	0,013
L06b	26	0,37	2,49	0,016
L07+L08	29	0,38	2,49	0,016
L09	32	0,39	2,57	0,005
L10	15	0,37	2,49	0,024

**Tableau 2.** Diversité génétique de l'apron pour les tronçons échantillonnés de la Loue.

Globalement, la **diversité génétique sur la Loue est assez faible**, notamment en ce qui concerne l'indice Ar dont les valeurs sur la Loue ne dépassent pas 2,60. La diversité génétique est par exemple inférieure à celle mesurée dans le bassin de l'Ardèche (Ar = 3.03 pour la station Les Platanes sur la Beaume ; cf. Tableau 4 ci-dessous). Cette diversité génétique ne se semble pas être structurée selon le gradient amont aval : les **diversités génétiques sont très similaires quelles que soit les tronçons**. En outre, les valeurs de la richesse en allèle privés est extrêmement faible : les allèles qui ne sont retrouvés que dans un seul tronçon ne représentent rarement plus de 2% de l'ensemble des allèles. Ces deux éléments –homogénéité des diversités génétiques et très faibles valeurs de l'indice Ap– vont dans le sens d'un impact assez limité des ouvrages sur les flux génétiques (à la dévalaison ou à la montaison) sur la Loue.

La différenciation entre les tronçons a ensuite été testée au niveau des microsatellites à travers une AFCM et une analyse bayésienne d'assignation grâce aux logiciels GENETIX et STRUCTURE respectivement. Les résultats issus des deux types d'analyse étant concordants, nous ne présentons ici que les résultats de l'AFCM (**Fig. 2**).



**Figure 2.** Représentation graphique de l'AFCM menée à partir des individus échantillonnés dans les différents tronçons étudiés de la Loue.

Les résultats de l'AFCM (Fig. 2) et des analyses bayésiennes d'assignation ne permettent pas de différencier les populations échantillonnées sur les différents tronçons de la Loue. Ces analyses confirment l'homogénéité de la structure génétique des aprons de la rivière Loue et que les flux génétiques entre tronçons sont de nature bidirectionnelle et suffisamment importants pour prévenir leur différenciation, tant en terme de structure génétique qu'en terme de diversité génétique.

Ces résultats contrastent avec l'impact marqué de certains ouvrages dans le Bassin de l'Ardèche.

## 5. MONITORING des POPULATIONS DU VERDON et DU BUECH

### 5.1. La population du Verdon

Historiquement, l'apron était présent dans le Verdon au moins entre le Grand Canyon et la confluence Durance-Verdon. Néanmoins, il n'a plus été observé dans le Verdon depuis 1977 (captures lors d'échantillonnages dans la retenue de Quinson) puis 1979 (présence dans les gorges de Baudinard et la partie inférieure du Grand Canyon) (Ctgreff 1979 ; Beaudou et Langon 2004), jusqu'à sa « redécouverte » dans les Grandes Gorges en 2001 (Roche et Niveau 2006). La présence de l'apron est actuellement connue sur 18 Km de cours d'eau dans le Moyen Verdon, entre les lieux-dits « Couloir Samson » (Rougou) et « Maireste » (La Palud-sur-Verdon). Depuis 2006, des recensements de ce poisson sont effectués à l'initiative des Brigades Départementales de l'ONEMA sur différents tronçons des Grandes Gorges du Verdon.

En tant qu'espèce inscrite aux annexes II et IV de la Directive européenne « Habitats-faune-Flore », la présence de l'apron a notamment justifié le classement des grandes gorges du Verdon au titre de Natura 2000 (Arrêté ministériel du 26 juin 2014).

En 2010 un état des lieux de la diversité génétique de la population d'apron des Grandes Gorges avait été conduit sur la base de 66 individus (Dubut et al. 2011). Deux stations avaient été échantillonnées : l'Estellié (19 individus) et l'aval du Couloir Samson (47 individus). Cette étude génétique avait détecté un goulot d'étranglement récent et montrait clairement une chute drastique de la diversité génétique de la population d'aprons du Verdon, qui a été mise en lien avec les aménagements de la Durance et du Verdon. Ces aménagements ont supprimé les flux génétiques entre les populations duranciennes d'une part et celle du Verdon d'autre part. Ne pouvant plus faire appel à la migration pour maintenir sa diversité génétique, et ayant été confinée à l'étroit linéaire des Grandes Gorges du Verdon, la population d'apron a donc subi une forte dérive génétique et une chute de son effectif efficace (lié au nombre de reproducteurs). Sur cette base, la population d'aprons des Grandes Gorges du Verdon apparaît très fragilisée, et plus sensible aux variations de son environnement que ses homologues duranciennes. Ce statut critique de conservation a notamment justifié la mise en place d'un monitoring génétique de cette population sur une phase minimale de 5 à 10 ans, ceci dans le cadre du Plan National d'Actions en faveur de l'Apron (Fiche-Action N°7).

En 2013, une première étape de ce monitoring génétique a été réalisée sous maîtrise d'ouvrage de la DREAL PACA (Dubut et al. 2014). Un échantillonnage génétique de la population d'apron (30 individus) des Grandes Gorges du Verdon avait été effectué au niveau de la station de l'Estellié. Ce travail n'a mis en évidence aucune différenciation sur la période 2009-2013, tant en termes de structure génétique qu'en termes de diversité génétique. L'échantillonnage réalisé en 2013 montre que les propriétés démogénétiques de la population comprise entre le lac de Sainte-Croix et le Couloir Samson sont restées identiques à celle évaluées en 2009.

Ce résultat suggérait une **stabilisation démographique de la population du Verdon**, le crash démographique diagnostiqué sur la base des résultats de l'étude de 2009 semble ne pas se poursuivre.

La présente étude constitue une seconde étape du monitoring génétique de la population du Verdon. L'objectif de ce monitoring génétique est de suivre l'évolution de la diversité et de la structure génétique et de confirmer l'hypothèse d'une stabilité démographique recouvrée émise sur la base de la comparaison des résultats issus des données 2009 et 2013. Il s'agit ici de comparer les résultats obtenus à partir d'aprons échantillonnés en 2016 à ceux obtenus à partir d'aprons échantillonnés en 2009 et 2013.

#### 5.1.1. MATERIEL et METHODES

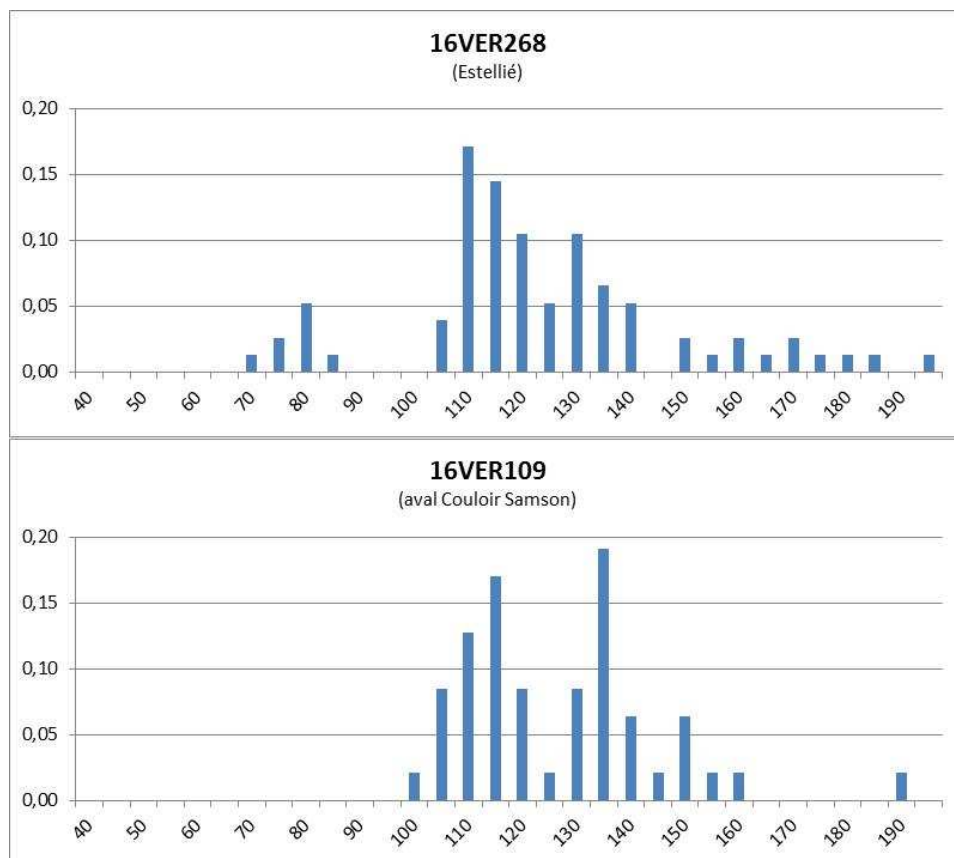
##### 5.1.1-1. Echantillonnage des aprons

Pour répondre à ces objectifs, deux stations ont été échantillonnées : 47 individus ont été capturés à l'aval du Couloir Samson sur un linéaire d'environ 250 m dans la nuit du 18 au 19



juillet 2016, et 35 d'entre eux (codés **16VER109**) ont été prélevés en vue des analyses génétiques ; 76 individus ont été capturés au niveau de la station de l'Estellier sur un linéaire d'environ 1300m dans la nuit du 19 au 20 juillet 2016, et 35 d'entre eux (codés **16VER268**) ont été prélevés en vue des analyses génétiques.

Le repérage des aprons est réalisé à pied à l'aide d'une lampe frontale et la capture a été réalisée à l'électricité. Une fois que l'apron est capturé, sa taille est mesurée à la fourche (en mm), et un petit fragment de la deuxième nageoire dorsale ( $\approx 0,25 \text{ cm}^2$ ) est prélevé à l'aide d'une paire de ciseaux chirurgicaux et stocké dans de l'éthanol à 95% jusqu'à son analyse en laboratoire. L'apron est ensuite relâché à proximité directe du lieu de capture. Les classes de taille mesurées à la fourche pour les aprons capturés sont rapportées dans la Figure 1.



**Figure 1.** Fréquences relatives des classes de taille (en mm) des aprons capturés dans le Verdon en 2016.

Les deux pêches ont été réalisées par les personnels de l'IMBE avec l'aide et l'appui logistique des Services Départementaux (04 et 83) de l'ONEMA

### 5.1.1-2. Acquisition et analyses des données génétiques

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir des fragments de nageoire caudale prélevés lors des campagnes d'échantillonnage (Cf. ci-dessous pour le détail par secteur géographique) et préservés dans l'éthanol 96%. L'extraction est réalisée grâce au kit Gentra® Puregene® Tissue Kit (QIAGEN).

Pour chaque individu, une séquence de l'ADN mitochondrial d'une longueur de 1201 paires de bases et contenant le gène du cytochrome *b* a été obtenue par séquençage Sanger. En outre, afin de détecter le signal en lien avec les événements récents de fragmentation anthropique du milieu durancien, et de la dégager du signal lié à l'histoire évolutive de l'espèce, 56 marqueurs microsatellites (Dubut *et al.* 2010) ont été analysés.

Le présent rapport focalisera sur les résultats issus de l'analyse des microsatellites (les résultats des analyses concernant l'ADN mitochondrial seront fournis dans un rapport ultérieur, dans le contexte du Bassin Rhodanien dans son ensemble).

La différenciation entre populations à l'échelle du bassin de l'Ardèche a été testée au niveau des microsatellites à travers une Analyse Factorielle de Correspondance Multiple (AFCM) grâce au logiciel GENETIX (Belkir *et al.* 2004).

Pour les microsatellites trois indices de diversité ont été estimés : (i) le **taux d'hétérozygotie** théorique moyen entre les loci ( $H_e$ ), (ii) la **richesse alléliques** ( $A_r$ ) et la **richesse en allèles privés** ( $A_p$ ) (Petit *et al.* 1998 ; Kalinowski 2004).  $H_e$  a été estimé grâce à ARLEQUIN, tandis que les indices  $A_r$  et  $A_p$  ont été estimés grâce au logiciel ADZE (Szpiech *et al.* 2008) qui prend en compte les tailles différentes des échantillons pour estimer les deux indices.

## 5.1.2. RESULTATS

### 5.1.2-1. Différenciation génétique

L'AFCM menée sur les microsatellites (Fig. 1), ne permet pas de mettre en évidence une de différenciation temporelle entre les aprons échantillonnés en 2009 (en bleu) et ceux échantillonnés en 2013 (en rose). Malgré son positionnement excentré, l'échantillon collecté à Pont de Soleil (en orange), se situe dans la variation des individus collectée en 2009 et 2013 à l'aval du Couloir Samson. Il ne peut donc pas être le résultat d'une introduction depuis une autre population d'apron (c.a.d. Durance, Ardèche ou Loue).

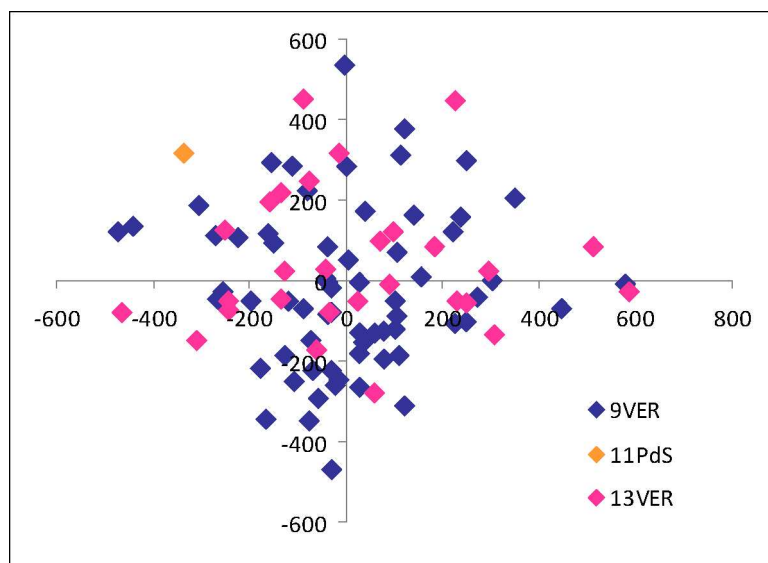


Figure 1. Représentation graphique de l'AFCM menée à partir des microsatellites

Sur la base des individus capturés en 2016, les résultats préliminaires indiquent qu'il n'y a pas eu de différenciation temporelle entre la première (2009) et la dernière année (2016) du monitoring génétique de la population d'apron du Verdon. En outre, comme en 2009, aucune différenciation génétique ne peut être observée entre la population échantillonnées à l'aval du Couloir Samson et celle échantillonnée à l'amont de l'Estellier.

### 5.1.2-2. Diversité génétique

La diversité génétique de l'ADNmt dans le Verdon reste nulle : un seul allèle mitochondrial avait été détecté en 2009, et c'est ce même allèle que partagent l'ensemble des individus échantillonnés en 2013, mais aussi en 2016. Cet allèle est aussi retrouvé en Durance et en Ardèche, mais associé à d'autres allèles. En revanche, l'individu de Pont-de-Soleil présentait un allèle différent des 96 individus échantillonnés à l'aval du Couloir Samson (Dubut *et al.* 2014). Cet allèle se retrouve aussi dans la Durance et l'Ardèche (en association avec

d'autres allèles). Avant le goulot d'étranglement subi par la population du Verdon, cet allèle était vraisemblablement présent (avec d'autres) sur le linéaire compris entre le Couloir Samson en amont et le lac de Sainte-Croix en aval. Il a certainement été perdu suite à la dérive génétique très forte qu'a subi la population présente sur ce linéaire consécutivement aux aménagements hydroélectriques. Sa présence en amont du Couloir Samson suggère qu'il a été retenu à l'amont du Couloir Samson, au sein d'une population qui n'a pas encore été clairement caractérisée par des prospections ciblant l'apron.

En ce qui concerne les microsatellites, la diversité des individus collectés en 2016 est très similaire à celle de ceux collectés en 2009 et 2013 (Tableau 1). Il n'y a donc pas eu de chute de diversité génétique sensible dans la période du monitoring génétique, ce qui suggère que la démographie de la population du Verdon est stabilisée.

	9VER	13VER	16VER
Nb de loci monomorphes	8	7	7
$H_e$	0,38	0,39	0,39
$A_r$	2,59	2,64	2,62
$A_p$	0,14	0,19	0,18

**Tableau 1.** Indices de diversité pour les populations d'apron du Verdon.

Néanmoins, il faut rappeler que tant au niveau de l'ADNmt que des microsatellites montrent un niveau de diversité très faible dans le Verdon comparativement à toutes les autres populations du bassin du Rhône (Dubut *et al.* 2011).

### 5.1.3. SYNTHÈSE des RESULTATS et PERSPECTIVES

L'analyse d'une séquence de 1201 pb de l'ADNmt (comprenant le gène du cytochrome *b*) et de 58 loci microsatellites a permis de suivre l'évolution de la structure et la diversité génétique de la population d'apron du Verdon.

Aucune différenciation temporelle n'a pu être mise en évidence sur la période 2009 à 2016, tant en termes de structure génétique qu'en termes de diversité génétique. L'échantillonnage réalisé en 2016 montre que les propriétés démogénétiques de la population comprise entre le lac de Sainte-Croix et le Couloir Samson sont restées identiques à celle évaluées en 2009 et 2013.

Ce résultat conforte l'hypothèse d'une **stabilisation démographique de la population du Verdon**, le crash démographique diagnostiqué sur la base des résultats de l'étude de 2009 semble ne pas se poursuivre.

Sur la base des résultats obtenus pour l'individu capturé en 2011 à Pont-de-Soleil (pas différenciable des aprons capturés plus à l'aval sur la base des microsatellites, mais avec un allèle mitochondrial différent), **il semblerait qu'une population viable existe à l'amont du Couloir Samson** (vraisemblablement délimitée à l'amont par le barrage de Chaudanne). Ce résultat est d'une grande importance pour la conservation de l'apron dans ce secteur. D'abord, l'aire de répartition et la diversité génétique de l'apron dans les Grandes Gorges seraient à ce jour sous-estimées. Des prospections ciblées apron ainsi que des analyses d'ADN environnemental sur le linéaire compris entre le Couloir Samson et le barrage de Chaudanne ont été conduites en 2016 et 2017 par l'Agence Française de la Biodiversité dans le cadre du PNA apron. Elles ont permis de confirmer l'hypothèse de cette autre population du Verdon. Sur ce même linéaire, des prélèvements génétiques ont été effectués sur 10 individus en 2017 par l'Agence Française de la Biodiversité. Ils permettront de commencer l'évaluation du statut de conservation de la population d'aprons situées en amont du Couloir Samson, notamment en termes de connectivité avec la population aval et de diversité génétique. En effet, une évaluation et des mesures conservatoires spécifiques

devront être menées, le secteur à l'amont du Couloir Samson étant très fréquenté par les pratiquants de sports d'eau vive.

## 6. SUIVI de l'OPERATION de REINTRODUCTION dans la DROME

Nous présentons ici les résultats du monitoring génétique des opérations de réintroductions menées depuis 2006 (dans le cadre du LIFE Apron II et poursuivies dans le cadre du PNA), résultats notamment obtenus dans le cadre du stage de Master 2 de Simon Barbary en 2015. Ce travail a deux objectifs : i) évaluer l'impact des opérations de reproduction en captivité menées de 2008 à 2014 au Muséum de Besançon sur plusieurs paramètres démogénétiques de l'apron (richesse allélique, effectif efficace, taux d'apparentement et de consanguinité moyen), et ii) mettre en évidence de la reproduction dans la Drôme suite aux opérations de réintroduction.

### 6.1. Bref historique des opérations de réintroduction sur la Drôme

Dans le cadre du Life II Apron, une opération pilote de réintroduction de l'apron dans la Drôme a été conduite à partir de 2006. La première année de cette opération pilote, 30 adultes de souche Beaume et 10 adultes de souche Durance ont été introduits dans la rivière Drôme. De 2008 à 2012, ce sont principalement des juvéniles d'aprons de souche Beaume qui ont été réintroduits. Les opérations de réintroduction ont concerné principalement deux secteurs : un secteur situé sur la commune de Mirabel-et-Blacons et un secteur situé sur la commune de Sainte-Croix et Pontaix. En 2008, certains alevins ont aussi été réintroduits sur la Drôme au niveau de la confluence avec le Bès. Le maintien des aprons réintroduits a pu être mis en évidence par les suivis effectués par l'ONEMA avant et après chaque opération. A partir de 2013, des juvéniles de souches Durance ont pu être réintroduit au niveau de Sainte-Croix, alors que la réintroduction de juvéniles de souche Beaume s'est poursuivi sur le secteur de Mirabel-et-Blacons.

Deux groupes de géniteurs de souche Beaume dont les descendants ont été réintroduits sur la Drôme peuvent être distingués. Un premier groupe de géniteurs a été constitué à partir de 41 individus nés en captivité à la Réserve de la gare des Ramières, eux-mêmes issus de géniteurs originaires de la rivière Beaume. Par commodité, ce premier groupe de géniteur sera identifié comme de souche « Ramières » et les individus le constituant seront codés RAM. Une partie de leurs descendants nés en 2005 ont participé aux opérations de réintroduction en 2006, alors qu'une autre partie a été retenue pour constituer une nouvelle cohorte de géniteurs (codés RG5), dont les descendants ont été réintroduits dans la Drôme en 2008 et 2009.

Le second groupe de géniteurs de souche Beaume a été constitué à partir de 17 individus capturés en décembre 2007 dans la rivière Beaume (codés BSV). Une partie de la génération née en 2008 issue de ces géniteurs a été réintroduite sur la Drôme en 2008, une autre partie (50 individus issus de 10 pontes différentes) a été retenue pour constituer un nouveau groupe de géniteurs (codé C08). Les descendants du groupes C08 ont été réintroduits sur la Drôme à partir de 2010, et ce jusqu'en 2015. Ce sont les descendants directs de ce groupe C08 qui participeront une dernière fois à l'opération de réintroduction de juvéniles de souche Beaume en 2015 sur le secteur Mirabel-et-Blacons. Une autre partie des descendants directs des individus C08 ont été conservés au Muséum de Besançon dans un but d'exposition. Ces individus (codés C8D) se sont reproduits, et leur descendants directs ont été réintroduits dans la Drôme de 2012 à 2014.

Il faut préciser que le groupe de juvéniles réintroduits en 2008 (928 individus) est assez hétérogène. Il est à la fois composé de descendants directs des géniteurs BSV (~50%), de descendants directs des géniteurs RG5 (~20%), mais aussi d'individus issus d'un stripping entre une femelle BSV et un mâle RG5 (~30%).

Un groupe de 18 géniteurs de souche Durance a été constitué en 2012, à l'occasion d'une pêche de sauvetage en lien avec la vidange de canaux usiniers EDF. En 2013, deux individus supplémentaires (issus du même contexte) ont été joints au groupe de 2012. Ce groupe de géniteurs est codé V4V5. La plus grande partie de leurs descendants directs ont été réintroduits dans la Drôme dans le secteur de Sainte-Croix au début des étés 2013 et 2014. Parallèlement, un groupe de 40 individus nés en 2013 (codés D13) et un groupe

d'une quarantaine d'individus nés en 2014 (codés D14) ont été maintenus au Muséum de Besançon. Ce groupe d'individus D13+D14 sera ici considéré comme un échantillon représentatif des alevins de souche Durance réintroduits en 2013 et 2014. En 2014, les géniteurs V4V5 ont été relâchés dans la Drôme dans le secteur de Pontaix / Ste-Croix. Les individus D13+D14 ont à leur tour participé à la reproduction en captivité en 2015. Un échantillon de leurs descendants a été échantillonné (codé D15), et sera considéré comme représentatif des alevins de souche Durance réintroduits en 2015.

## 6.2. Analyses Génétiques et Statistiques

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir des fragments de nageoire caudale prélevés lors des campagnes d'échantillonnage (Cf. ci-dessous pour le détail par secteur géographique) et préservés dans l'éthanol 96%. L'extraction est réalisée grâce au kit Gentra® Puregene® Tissue Kit (QIAGEN).

Pour chaque individu, une séquence de l'ADN mitochondrial d'une longueur de 1201 paires de bases et contenant le gène du cytochrome *b* a été obtenue par séquençage Sanger. Afin de détecter le signal en lien avec les événements récents de fragmentation anthropique du milieu durancien, et de la dégager du signal lié à l'histoire évolutive de l'espèce, **54 marqueurs** microsatellites (Dubut *et al.* 2010) ont été analysés.

Le présent rapport focalisera sur les résultats issus de l'analyse des microsatellites (les résultats des analyses concernant l'ADN mitochondrial seront fournis dans un rapport ultérieur, dans le contexte du Bassin Rhodanien dans son ensemble).

Une **analyse bayésienne d'assignation** implémentée par le logiciel STRUCTURE (Falush *et al.* 2003, 2007) a été menée afin d'identifier la souche (Beaume ou Durance) des aprons capturés dans la Drôme.

Afin d'évaluer l'impact du programme de reproduction en captivité sur les paramètres démogénétiques de l'apron, les indices suivants ont été estimés : (i) la **richesse allélique (Ar)**, (ii) l'**effectif efficace (Ne)**, paramètre en lien étroit avec le nombre d'adultes participants à la reproduction, (iii) le **coefficient d'apparement moyen (R)** et le **coefficient de consanguinité moyen (F)**. Ar a été estimé grâce au logiciel ADZE (Szpiech *et al.* 2008) qui prend en compte les tailles différentes des échantillons. Ne a été estimé selon deux approches, celle basée sur le déséquilibre de liaison entre les loci (**Ne<sub>LD</sub>**), implémentée par LDNe (Waples & Do 2008) et celle basée sur le taux d'apparement entre individus (**Ne<sub>RM</sub>**) implémentées par COLONY (Jones & Wang 2010). R et F ont été estimés grâce au logiciel COANCESTRY (Wang 2011) selon l'approche TrioML (Wang 2007). L'estimation des indices F et R est très dépendante des fréquences alléliques. Or, les fréquences alléliques dans la Beaume et dans la Durance sont différentes (Laroche & Durand 2004). Aussi afin de mener des comparaisons pertinentes, seules les estimations de ces paramètres ont été conduites avec les individus de souche Beaume d'une part et les individus de souche Durance d'autre part. Les comparaisons de ces paramètres ne pourront se faire qu'à l'intérieur de ces deux groupes, et non entre les deux groupes.

Afin de détecter de la reproduction dans la rivière Drôme suite aux opérations successives de réintroduction, des analyses de parenté ont été conduites grâce au logiciel COLONY à partir des données microsatellites. L'approche dite du Maximum de Vraisemblance (Wang & Santure 2009) a été privilégiée. Lors de cette analyse, les aprons capturés dans la Drôme en 2015 pouvaient être les descendants des individus échantillonnés au Muséum de Besançon (voir ci-dessous) et de ceux capturés dans la Drôme de 2011 à 2014. L'analyse permettait aussi que des aprons capturés dans la Drôme en 2015 puissent être les parents d'autres aprons (plus jeunes) capturés dans la Drôme en 2015.

## 6.3. Echantillonnage

En 2014 et 2015, des individus de l'ensemble des groupes de géniteurs décrits plus haut (BSV, RAM, RG5, C08, C8D, V4V5, D13+D14) ainsi que 49 individus du groupe D15 ont pu être échantillonnés au Muséum de Besançon.

**Tableau 1.** Aprons capturés dans la rivière Drôme en 2011, 2012, 2013 et 2014.

<b>ID</b>	<b>Taille (mm)</b>	<b>Lieu de capture</b>	<b>Date de capture</b>
DRO2011	145	Saillans	07/10/2011
11PBLDb1	138	Pont de Blacons	04/11/2011
11PBLDb2	140	Pont de Blacons	04/11/2011
11PBLDb3	142	Pont de Blacons	04/11/2011
11PBLDb4	145	Pont de Blacons	04/11/2011
12SAI01	120	Saillans	27/08/2012
12SAI02	135	Saillans	27/08/2012
12SCXD1	<i>nc</i>	Sainte-Croix	21/08/2012
12SCXD2	<i>nc</i>	Sainte-Croix	21/08/2012
12SCXD3	<i>nc</i>	Sainte-Croix	21/08/2012
12SCXD4	<i>nc</i>	Sainte-Croix	21/08/2012
12SCXD5	<i>nc</i>	Sainte-Croix	21/08/2012
12SCXD6	<i>nc</i>	Sainte-Croix	21/08/2012
13SAI01	<b>0+</b>	Saillans	2013
13SAI02	<b>adulte</b>	Saillans	2013
13SCXC1	125	Sainte-Croix	2013
13SCXD1	140	Sainte-Croix	2013
14SAI01	120	Saillans	05/09/2013
14SAI02	60	Saillans	05/09/2013
14SCX01	75	Sainte-Croix	21/10/2013
14SCX02	120	Sainte-Croix	21/10/2013
14SCX03	120	Sainte-Croix	21/10/2013
14SCX04	120	Sainte-Croix	21/10/2013
14SCX05	75	Sainte-Croix	21/10/2013
14SCX06	75	Sainte-Croix	21/10/2013
14SCX07	78	Sainte-Croix	21/10/2013
14SCX08	125	Sainte-Croix	21/10/2013
14SCX09	75	Sainte-Croix	21/10/2013

A ce groupe s'ajoutent des échantillons considérés ici comme représentatifs de la diversité génétique des deux populations sources : 52 aprons capturés en 2002 (codés **02PLT**) et 29 aprons capturés en 2012 (codés **12PLT**) dans la Beaume au lieu-dit Les Platanes, ainsi que 41 individus capturés dans la Durance à l'aval du seuil de Salignac en 2014 (codés **SALN**). Au cours de prospections de suivi des opérations de réintroduction menées en 2011, 2012, 2013 et 2014, l'ONEMA a pu capturer **28 aprons** dans la rivière Drôme et prélever un fragment de nageoire en vue d'analyses génétiques (Cf. **Tableau 1**).

En 2015, un effort important d'échantillonnage dans la Drôme a été conduit, en coordination avec le SD26 de l'ONEMA. Trois secteurs ont été prospectés : Pontaix / Ste-Croix (**46 individus** codés **15PSX**) le 28 mai 2015, Saillans (**3 individus** codés **15SAI**) le 6 août 2015 et l'aval et l'amont du pont de Blacons (échantillon codé **15PBL**) le 16 juillet 2015 (voir **Tableau 3** pour les tailles de individus). Les aprons capturés à l'amont du seuil du pont de Blacons (**7 individus** codés **PBM**) ont été distingués de ceux capturés à l'aval du seuil (**26 individus** codés **PBV**) afin de pouvoir détecter un éventuel franchissement du seuil par montaison.

#### 6.4. Reproduction en captivité et paramètres démogénétiques

Les paramètres démogénétiques estimés pour les échantillons d'aprons utilisés ou issus du programme de reproduction en captivité menée au Muséum de Besançon de 2008 à 2015 sont reportés dans la **Tableau 2**. Les valeurs pour l'échantillon BSV sont données à titre indicatif, la taille réduite de l'échantillon ( $n = 12$ ) ne permettant pas d'obtenir des estimations fiables.

Comme déjà observés (Laroche & Durand 2004), les indices de diversité  $A_r$  estimés pour les populations sauvages duranciennes (V4V5 et SALN) sont supérieurs à ceux des populations sauvages de la Beume (02PLT et 12PLT). Cette diversité génétique plus importante est associée à un effectif efficace ( $N_e$ ) supérieur dans la Durance comparativement à la Beume, surtout si l'on considère l'indice  $N_{eLD}$ . **Ces résultats soulignent que le potentiel adaptatif de la Durance est vraisemblablement supérieur à celui de la Beume.** En effet, il a été montré expérimentalement qu'un plus grand nombre d'allèles potentialise l'adaptation d'une population à des changements environnementaux (pour un exemple récent voir Vilas et al. 2015). Cependant, on observe dès la première génération d'aprons nés en captivité, ceux issus d'individus sauvages (RAM et C08 pour la souche Beume et D13+D14 pour la souche Durance), une réduction drastique du  $N_e$ . Par exemple, pour la souche Beume, on passe d'un  $N_{eRM}$  dont la moyenne est comprise entre 49 et 71 individus si l'on considère les deux échantillons de comparaison sauvages (02PLT et 12PLT) à un  $N_{eRM}$  de 6-7 individus pour C08 et RAM. Pour la Durance les populations sauvages (V4V5 et SALN) ont un  $N_{eRM}$  compris entre 79 et 87 individus, alors que la première génération d'aprons né en captivité présente un  $N_{eRM}$  de 11 individus. Si on s'attache à l'indice  $N_{eRM}$  on observe donc une réduction du  $N_e$  d'un facteur de 7-8 dès la première génération, ce facteur étant encore plus important (jusqu'à plus de 100) si on considère l'indice  $N_{eLD}$ . Cette diminution du  $N_e$  est associée à une réduction de la richesse allélique, passant de 3,25 en moyenne dans les populations sauvages de la Beume à environ 2,60 au sein des aprons de la première génération née en captivité et de 4,09 pour les populations sauvages de la Durance à 3,33 pour dans le groupe D13+D14.

**Tableau 2.** Paramètres démogénétiques des aprons.

	Echantillon	Effectif (N)	$A_{r29}$	$N_{eRM}$ [IC 95%]	$N_{eLD}$ [IC 95%]	R	F
Souche Beume	02PLT	52	3,24	71 [48 ; 108]	145,4 [111,5 ; 204,3]	0,053	0,038
	12PLT	29	3,26	49 [29 ; 84]	116,7 [77,7 ; 221,2]	0,070	0,041
	BSV	12	n.d.	38 [17 ; 234]	4,2 [3,1;5,6]	0,086	0,042
	C08	41	2,69	6 [3 ; 21]	5,1 [4 ; 6,1]	0,286	0,034
	C8D	88	2,71	34 [22 ; 56]	26,2 [23 ; 27,6]	0,257	0,083
	RAM	29	2,48	7 [4 ; 21]	6,9 [5,8 ; 8,1]	0,295	0,068
Souche Durance	SALN	40	4,06	87 [56 ; 141]	$+\infty$ [1030 ; $+\infty$ ]	0,036	0,026
	V4V5	30	4,11	79 [49 ; 140]	1619,8 [295,8 ; $+\infty$ ]	0,038	0,058
	D13+D14	75	3,33	11 [5 ; 26]	12,3 [11,7 ; 13]	0,193	0,046
	D15	49	3,24	24 [14 ; 42]	25,1 [23,1 ; 27,4]	0,198	0,110
Drôme	15DRO	81	3,60	14 [8 ; 30]	10,6 [10,1 ; 10,2]	0,162	0,112
	15PBL	33	3,00	24 [14 ; 44]	21,7 [19,1 ; 24,8]	0,279	0,111



15PSX      46      3,25      6 [3 ; 21]      10,3 [9,6 ; 11]      0,220      0,065

n.d. : paramètre non estimé

Concernant les aprons de la seconde génération nés en captivité, et dont les parents sont de la première génération en captivité, on n’observe pas de diminution sensible de la richesse allélique, et les  $N_e$  tendent à augmenter. Ces deux observations peuvent être mises en relation avec le nombre d’individus plus important qui participe effectivement à la reproduction comparativement à celui des individus de souche sauvage.

Si on compare les résultats obtenus pour les aprons nés en captivité avec les estimations obtenues pour les aprons capturés dans la Drôme en 2015, on observe que globalement la richesse allélique dans la Drôme est similaire à celle observée dans les populations sauvages de la Beaume. Les aprons capturés dans la Drôme rassemblent en effet des individus issus de deux lots de géniteurs de souche Beaume (ceux capturés en 2007 et ceux capturés en 2005, parents de l’échantillon RAM), mais aussi des individus issus de géniteurs de souche Durance Ramières. **Ce résultat montre l’intérêt d’avoir un nombre de reproducteurs effectifs important afin de limiter l’érosion de la diversité génétique.** Néanmoins, le  $N_e$  des aprons de la Drôme reste très faible, entre 6 dans le secteur de Pontaix / Ste-Croix et 24 dans le secteur de Blacons.

L’impact de la reproduction en captivité a aussi un effet sur le taux d’apparement moyen des aprons, et sur le coefficient moyen de consanguinité (Tableaux 2, 3 et 4 ; Figures 1 et 2).

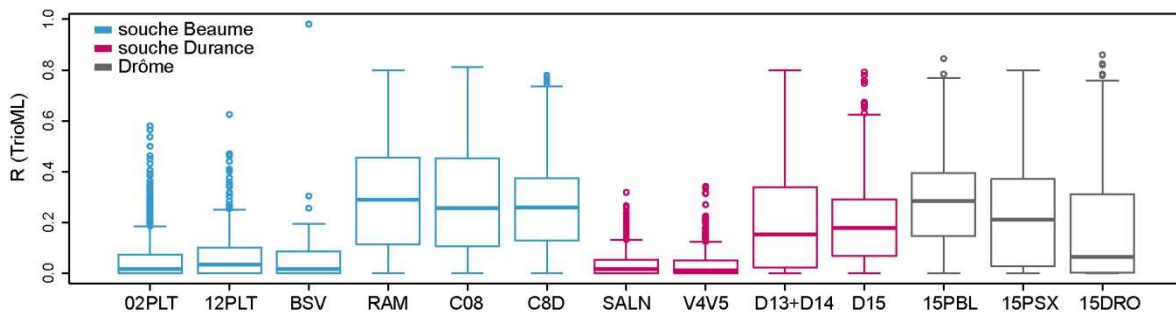


Figure 1. Box-plot des taux d’apparement (R) des aprons.

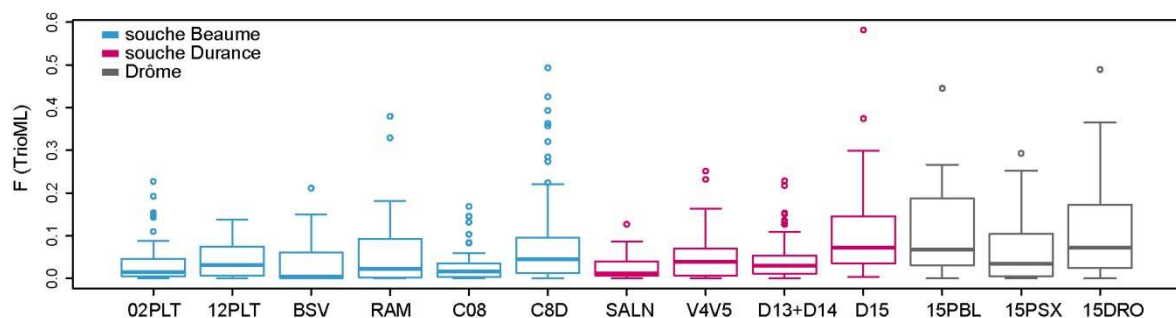


Figure 2. Box-plot des coefficients de consanguinité (F) des aprons.

Au sein de la première génération d’aprons nés en captivité (RAM et C08 pour la souche Beaume ; D13+D14 pour la souche Durance), le taux d’apparement moyen (R) est significativement supérieur à celui observé dans les populations sauvages, et les moyennes restent relativement stables (quoique significativement différentes) entre la première et la deuxième génération (voir C08 vs. C8D et D13-D14 vs. D15).

Le coefficient de consanguinité n’augmente pas significativement au sein de la première génération née en captivité comparativement à celui mesuré dans les populations sauvages. En revanche, ce coefficient augmente significativement à la deuxième génération (Cf. D15

vs. D13+D14 et C8D vs. C08), des individus partageant au moins un parent pouvant être amenés à se reproduire ensemble. On note que le taux de consanguinité des aprons de souche Beaume dans la Drôme à Blacons (15PBL) est relativement élevé ( $F = 0,11$ ) et similaire à celui observé pour C8D ( $F = 0,08$ ) (Tableaux 2 et 3).

**Tableau 3.** Comparaisons de moyenne de F (demi-matrice supérieure) et R (demi-matrice inférieure) :

Souche Beaume						
	02PLT	12PLT	RAM	C08	C8D	15PBL
02PLT	-	n.s.	n.s.	n.s.	**	**
12PLT	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	*
RAM	**	**	-	n.s.	n.s.	n.s.
C08	**	**	n.d.	-	**	**
C8D	**	**	n.d.	*	-	n.s.
15PBL	**	**	n.s.	n.s.	*	-

n.d. : paramètre non estimé ; n.s. : test de comparaison des moyenne non significatif

**Tableau 3.** Comparaisons de moyenne de F (demi-matrice supérieure) et R (demi-matrice inférieure) :

Souche Durance					
	V4V5	SALN	D13+D14	D15	15PSX
V4V5	-	n.s.	n.s.	*	n.s.
SALN	n.s.	-	n.s.	**	n.s.
D13+D14	**	**	-	**	n.s.
D15	**	**	**	-	*
15PSX	**	**	**	*	-

n.d. : paramètre non estimé ; n.s. : test de comparaison des moyenne non significatif

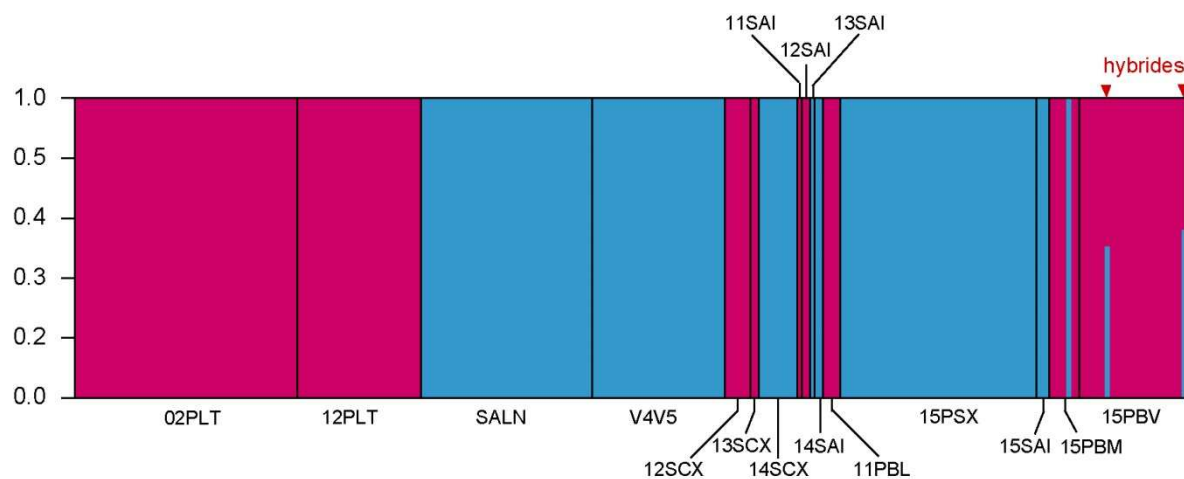
**La perte de diversité génétique, la réduction importante de l'effectif efficace et un taux de consanguinité élevé au sein des populations d'aprons réintroduites est inévitablement dues au nombre limité de géniteurs participant de façon effective à la reproduction en milieu contrôlé.** Pour éviter ces phénomènes pouvant nuire à la viabilité de la population réintroduite, **le renouvellement régulier des reproducteurs mis en place dès 2015 avec la capture de 30 aprons sauvage dans la Durance apparaît essentiel.**

### 6.5. Mise en évidence de reproduction dans la Drôme

Le succès d'une opération de réintroduction est lié à la viabilité de la population réintroduite. Un indice de viabilité peut être amené par la mise en évidence d'individus nés sur le site de réintroduction. Deux approches ont été mise en œuvre pour détecter de la reproduction. La première met à profit le fait que deux souches (Beaume et Durance) ont été utilisées pour l'opération de réintroduction sur la Drôme. Ces souches étant différenciées génétiquement, des tests d'assignation pourront détecter des hybrides entre les deux souches.

Les analyses préliminaires (Dubut et al. 2013) avaient suggéré qu'un des deux individus capturés à Saillans en 2012 (code 12SAI02) présentait  $\sim 1/8^e$  de son génome similaire identique à celui des aprons natifs de la Drôme capturés en 1996 et 1997. Néanmoins, des analyses de parentés (Barbary 2015) ont pu montrer que ce résultat n'était pas fondé. En effet, comme pour l'ensemble des individus capturés dans la Drôme entre 2011 et 2014, au moins un de ses deux parents a pu être identifié comme faisant partie des géniteurs du Muséum de Besançon. L'individu 12SAI02, comme tous les individus capturés dans la Drôme avant 2015, était né à Besançon.

Les analyses d'assignation ont été conduites sur l'ensemble des individus capturés sur la Drôme entre 2011 et 2015 (**Figure 3**). Ces nouvelles analyses montrent la nature artéfactuelle du résultat obtenu en 2013 pour l'individu 12SAI02 (cet individu est entièrement de souche Beaume). En revanche, au sein des individus capturés en 2015 à l'aval du Pont de Blacons (15PBV), deux individus (15PBV08 et 15PBV26) apparaissent clairement présenter la moitié de leur génome qui est d'origine Beaume, l'autre moitié d'origine Durance (**Figure 3**).



**Figure 3.** Barplot issu des analyses d'assignation.

En rose, le cluster Beaume, en bleu le cluster Durance. Chaque individu est représenté par une barre verticale, chaque barre synthétisant le taux d'assignation à chacun des clusters.

Au-delà de la détection de ces deux individus hybrides, on observe plusieurs éléments en lien avec la dynamique de la population réintroduite. Dès 2013, la souche Durance est détectée à Saillans et à partir de 2015, elle est détectée à Blacons : un individu de souche Durance à l'amont du pont (15PBM31) et les deux hybrides décrits plus haut à l'aval du pont. La souche Durance ayant été réintroduite seulement à partir de 2013 à plusieurs kilomètres en amont (Sainte-Croix), ces détections d'aprons de souche Durance à Saillans dès 2013 et à Blacons à partir de 2015 **soulignent la capacité de dispersion des aprons, au moins à la dévalaison dans notre cas, et son importance dans la colonisation de la rivière** (voir aussi Danancher *et al.* 2008).

Ensuite si on considère le secteur de Sainte-Croix, on assiste dès 2014 à un remplacement de la souche Beaume (réintroduite sur ce site de 2008 à 2010) par la souche Durance (réintroduite sur le site à partir de 2013). **Cette observation suggère que 1) la survie des aprons ne se prolonge pas au-delà de 3 ans sur ce secteur et 2) qu'il n'y a pas eu de reproduction notable qui aurait permis de pérenniser la souche Beaume dans la secteur de Sainte-Croix.**

Ce résultat contraste avec les observations faites au niveau du pont de Blacons. En effet, dans ce secteur, les deux souches sont retrouvées, et c'est sur ce secteur que les **analyses de parenté** ont permis de détecter 7 individus nés sur la rivière Drôme (individus en rouge dans la **Tableau 4**). En effet, pour 6 individus (PBV01-08-22-23-24-26), aucun parent n'a pu être identifié parmi les géniteurs connus du Muséum de Besançon, et pour un individu (15PBM30), un de ses parents avait été capturé à Saillans en 2011 (DRO2011, voir aussi **Tableau 1**). **Le secteur aval (entre Saillans et Blacons) présenterait des conditions écologiques plus favorables à l'apron (comparativement au secteur de Pontaix / Sainte-Croix), permettant notamment à l'apron de se reproduire, 20% (7/33) des individus capturés au niveau du pont de Blacons étant nés dans la Drôme.**

Enfin, des analyse scalimétriques complémentaires ont permis de déterminer l'âge des individus de souche Beaume capturés à l'amont du Pont de Blacons (15PBV27-28-29-32-33). Il s'agit de deux 1+, de deux 2+ et d'un 3+. Ces aprons de souche Beaume sont nés en

captivité (Cf. **Figure 3** et **Tableau 4**). Dans la mesure où aucun apron de souche Beaume n'a été relâché à l'amont du seuil depuis 2010, **les analyses mettent en évidence que l'apron est capable de franchir le seuil du pont de Blacons à la montaison.**

**Tableau 4.** Résultats des analyses de parenté conduite sur les aprons capturés dans la Drôme en 2015

Individu	T <sub>F</sub> (mm)	Parent 1	Parent 2	Souche
15SAI01	136	V406	V418	Durance
15SAI02	102	V406	V418	Durance
15SAI03	101	V417	V418	Durance
15PBM27	131	C0803	n.d.	Beaume
15PBM28	142	C0801	C0817	Beaume
15PBM29	122	C8D04	C8D10	Beaume
15PBM30	130	DRO2011	n.d.	Beaume
15PBM31	131	V407	V418	Durance
15PBM32	103	C8D62	C8D64	Beaume
15PBM33	107	C0803	C0805	Beaume
15PBV01	130	n.d.	n.d.	Beaume
15PBV02	126	C0803	n.d.	Beaume
15PBV03	125	C8D33	n.d.	Beaume
15PBV05	104	C8D32	n.d.	Beaume
15PBV06	111	C8D33	n.d.	Beaume
15PBV07	116	C8D56	C8D64	Beaume
15PBV08	102	n.d.	n.d.	Hybride
15PBV09	111	C8D33	n.d.	Beaume
15PBV10	121	C8D33	n.d.	Beaume
15PBV11	114	C0801	C0813	Beaume
15PBV12	111	C0803	C0805	Beaume
15PBV13	101	C0805	n.d.	Beaume
15PBV14	116	C8D11	C8D12	Beaume
15PBV15	113	C8D35	n.d.	Beaume
15PBV16	107	C0801	C0808	Beaume
15PBV17	105	C8D11	C8D64	Beaume
15PBV18	110	C0801	C0817	Beaume
15PBV19	109	C8D04	C8D10	Beaume
15PBV20	103	C0805	C0808	Beaume
15PBV21	122	C0803	C0805	Beaume
15PBV22	113	n.d.	n.d.	Beaume
15PBV23	116	n.d.	n.d.	Beaume
15PBV24	116	n.d.	n.d.	Beaume
15PBV25	105	C8D33	n.d.	Beaume
15PBV26	103	n.d.	n.d.	Hybride
15PSX01	83	V406	V418	Durance
15PSX02	83	V419	V425	Durance
15PSX03	71	V406	V419	Durance
15PSX04	87	V418	V425	Durance
15PSX05	118	V407	V419	Durance
15PSX06	86	V418	V420	Durance

n.d. : parent non identifié par la reconstruction de parenté

**Tableau 4 (suite).** Résultats des analyses de parenté conduite sur les aprons capturés dans la Drôme en 2015

<b>Individu</b>	<b>T<sub>F</sub> (mm)</b>	<b>Parent 1</b>	<b>Parent 2</b>	<b>Souche</b>
15PSX07	75	V406	V418	<b>Durance</b>
15PSX08	80	V418	V425	<b>Durance</b>
15PSX09	68	V419	V426	<b>Durance</b>
15PSX10	82	V418	V420	<b>Durance</b>
15PSX11	86	V418	V420	<b>Durance</b>
15PSX12	88	V418	V425	<b>Durance</b>
15PSX13	78	V407	V419	<b>Durance</b>
15PSX14	83	V409	V418	<b>Durance</b>
15PSX15	80	V419	V425	<b>Durance</b>
15PSX16	123	V418	V420	<b>Durance</b>
15PSX17	83	V409	V418	<b>Durance</b>
15PSX18	125	V419	V425	<b>Durance</b>
15PSX19	82	V419	V420	<b>Durance</b>
15PSX21	84	V418	V425	<b>Durance</b>
15PSX22	85	V407	V418	<b>Durance</b>
15PSX23	88	V418	V420	<b>Durance</b>
15PSX24	82	V409	V419	<b>Durance</b>
15PSX25	88	V419	V425	<b>Durance</b>
15PSX26	81	V418	V420	<b>Durance</b>
15PSX27	84	V418	V425	<b>Durance</b>
15PSX28	82	V406	V419	<b>Durance</b>
15PSX29	86	V407	V418	<b>Durance</b>
15PSX30	84	V406	V419	<b>Durance</b>
15PSX31	70	V417	V418	<b>Durance</b>
15PSX32	74	V406	V418	<b>Durance</b>
15PSX33	76	V406	V418	<b>Durance</b>
15PSX34	130	V419	V420	<b>Durance</b>
15PSX35	125	V406	V418	<b>Durance</b>
15PSX36	127	V414	V418	<b>Durance</b>
15PSX37	127	V416	V418	<b>Durance</b>
15PSX38	134	V419	V420	<b>Durance</b>
15PSX39	118	V419	V420	<b>Durance</b>
15PSX40	132	V414	V418	<b>Durance</b>
15PSX41	118	V414	V418	<b>Durance</b>
15PSX42	116	V416	V418	<b>Durance</b>
15PSX44	134	V416	V418	<b>Durance</b>
15PSX45	129	V419	V425	<b>Durance</b>
15PSX46	120	V416	V418	<b>Durance</b>
15PSX47	130	V419	V425	<b>Durance</b>
15PSX48	135	V416	V418	<b>Durance</b>

n.d. : parent non identifié par la reconstruction de parenté

#### **6.4 Conclusions et perspectives**

Ce travail a permis de mettre en évidence l'impact des pratiques d'élevage en captivité menée de 2008 à 2015 sur les paramètres démogénétiques des aprons. Il souligne encore une fois l'importance de **renouveler régulièrement les géniteurs pour éviter une diminution trop importante du potentiel adaptatif** des aprons réintroduits. Il montre aussi que **l'utilisation d'apron nés en captivité pour produire des alevins augmente la consanguinité**, potentialisant son impact négatif sur la viabilité des populations réintroduites.

Un des résultats forts de ce travail est très encourageant pour la suite de l'opération de réintroduction de l'apron dans la rivière Drôme : pour la première fois, il a pu être **mis en évidence plusieurs individus nés dans la Drôme**, issus des aprons réintroduits. Ce travail a permis en outre de mettre en évidence la **franchissabilité à la montaison du seuil du pont de Blacons**.

L'opération de réintroduction dans la rivière Drôme s'est poursuivie jusqu'en 2018. Le monitoring génétique de l'opération est programmé jusqu'en 2020. Ce monitoring permettra de suivre en détail l'évolution de deux types d'indicateurs clefs pour la viabilité à termes de la population réintroduite : les paramètres démogénétiques et la reproduction dans la rivière. Un échantillonnage poussé du secteur de réintroduction associé aux analyses de parenté permettra en effet de suivre l'évolution de la reproduction dans la Drôme. Concernant les paramètres démogénétiques une baisse des coefficients d'apparentement et de consanguinité est notamment attendue grâce à l'introduction de nouveaux géniteurs de souche Durance dans le programme de reproduction en captivité (30 nouveaux géniteurs par an sur la période 2016-2018).

## V. BIBLIOGRAPHIE

- Barbary (2015) *Analyses de parenté et évaluation d'un programme de réintroduction d'une espèce en danger d'extinction : l'apron du Rhône (Zingel asper L. 1758)*. Mémoire de Master 2 Ecologie Evolution Biométrie, Université Lyon I, 47 pp.
- Boutitie F (1984) *L'apron Zingel asper L. (Percidae), poisson rare menacé de disparition (biologie, répartition, habitat)*. Rapport de DEA Écologie des Eaux Continentales, Université Lyon I, 27 pp.
- Danancher D, Izquierdo JI, García-Vásquez E (2008) Microsatellite analysis of relatedness structure in young of the year of the endangered *Zingel asper* (Percidae) and implications for conservation. *Freshwater Biology*, 53:546-557.
- Dubut V, Grenier R, Megléczy E, Chappaz R, Costedoat C, Danancher D, Descloux S, Malausa T, Martin JF, Pech N, Gilles A (2010) Development of 55 novel polymorphic microsatellite loci for the critically endangered *Zingel asper* L. (Actinopterygii: Perciformes: Percidae) and cross-species amplification in five other percids. *European Journal of Wildlife Research*, 56: 931-938.
- Dubut V, Gilles A, Chappaz R (2013) *PNA apron du Rhône – Action 7 : Etudes génétiques. Rapport 2013-2014*. 17 p.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574-578.
- Georget M, Roche P, Langon M (2009) *Bilan de l'état des populations d'apron du Rhône*. Rapport du Life apron II, CREN, ONEMA, 55 p.
- Jones OR, Wang J (2010) COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10: 551-555.
- Laroche J, Durand JD (2004). Genetic structure of fragmented populations of a threatened endemic percid of the Rhone river: *Zingel asper*. *Heredity* 92: 329-334.
- Mari S, Labonne J, Gaudin P (2002) A conservation strategy for *Zingel asper*, a threatened endemic percid of the Rhône basin. In: Collares-Pereira MJ, Cowx IG, Coelho MM (eds) *Conservation of freshwater fishes: Options for the future*. Fishing News Books, Oxford, pp 149-156
- Olivier JM, Carrel G, Lamouroux N, Dole-Olivier MJ, Malard F, Bravard JP, Amoros C (2009) The Rhône River Basin. In: Tockner K, Uehlinger U, Robinson CT (eds) *Rivers of Europe*. Academic Press, Amsterdam, pp. 247-295
- Szpiech ZA, Jakobsson M, Rosenberg NA (2008) ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics* 24: 2498-2504.
- Vilas A, Pérez-Figueroa A, Quesada H, Caballero A (2015) Allelic diversity for neutral markers retains a higher adaptive potential for quantitative traits than expected heterozygosity. *Molecular Ecology* 24: 4419-4432.
- Waples RS, Do CHI (2008) LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8: 753-756.
- Wang J (2007) Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetical Research* 89, 135-153.
- Wang J (2011) COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11: 141-145.
- Wang J, Santure A (2009) Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics* 181: 1579-1594.





Etude s'inscrivant dans le cadre du PNA Apron, animé par le



Et coordonné par la DREAL Auvergne Rhône-Alpes



Partenaires financiers du PNA:

