



Université d'Angers
Faculté des Sciences
2 boulevard Lavoisier
49045 Angers



Ecole Doctorale
d'Angers

Equipe « biodiversité »
Ecologie
UMR Paysage et Biodiversité
Faculté des Sciences
49045 Angers

Étude de la dépression de consanguinité sur le développement larvaire de *Rana dalmatina*



Rapport de stage de Master 2 Recherche
Altération des Systèmes Biologiques

Présenté par Emilie COSTA

Responsables de stage :
LEMAIRE Christophe
LODE Thierry

Année universitaire
2005-2006

Remerciements :

Je remercie Monsieur Bruno Lapied, responsable de la formation Master 2 Altération des Systèmes Biologiques, pour m'avoir admise dans sa formation.

Je remercie Monsieur Thierry Lodé, responsable du laboratoire d'Ecologie Animale, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie Monsieur Christophe Lemaire, pour son encadrement dynamique, soutenu, et persuasif ainsi que pour sa patience.

Je remercie Monsieur Stéphane Sourice pour son aide, son soutien, sa compréhension et nos discussions.

Je remercie Monsieur Alain Pagano pour son aide, ses conseils et son écoute.

Je remercie Mademoiselle Cécile Patrelle pour tout, tout simplement.

Je remercie Mademoiselle Nathalie Costa pour sa patience fraternelle, et son humour, lors de la compréhension de la partie statistique, encore une fois....

Je remercie toutes les personnes qui ont pris sur leur temps pour m'aider à réaliser cette étude : je remercie Emeric Hinot et Stéphane Boyer pour leur aide et leur camaraderie, je remercie Thomas Sire et Damien Perrin pour la pêche à la grenouille, et je remercie Vivianne Hardouineau pour son aide sur l'élevage.

Étude de la dépression de consanguinité sur le développement larvaire de *Rana dalmatina*

La consanguinité peut avoir un effet négatif sur la survie des populations, appelé dépression de consanguinité. En effet, la consanguinité diminue la diversité génétique et augmente la proportion d'homozygotes permet l'augmentation de l'expression d'allèles récessifs délétères responsables du fardeau génétique au sein d'un individu. Les études génétiques permettent de calculer ou d'évaluer la consanguinité et sa conséquence : la dépression de consanguinité. Plusieurs méthodes permettent d'estimer l'importance de la dépression de consanguinité dans une population. Une de ces méthodes consiste à corrélérer la valeur sélective individuelle avec l'hétérozygotie (hypothèse de la surdominance associative - effet général). Une autre nécessite la corrélation entre la valeur sélective individuelle avec l'estimation de l'apparentement (par paire). Enfin, avant d'estimer l'apparentement entre les individus, il est souvent intéressant de déterminer l'apparentement entre les parents. Notre étude prend en compte ces trois méthodes génétiques d'estimation de l'impact de la dépression de consanguinité chez la grenouille agile (*Rana dalmatina*). Les résultats de cette étude montrent une tendance générale pour une corrélation positive entre la valeur sélective à court terme (survie post-métamorphique) et à long terme (relation entre variables morphologiques et survie au stade adulte) et la variabilité génétique des individus. Ainsi une diminution de cette valeur sélective est liée à l'augmentation du coefficient de consanguinité. L'intérêt de cette étude porte sur le choix du modèle biologique ; en effet, les amphibiens sont répartis en petite population isolée qui semble souffrir de dépression de consanguinité. Pourtant, l'augmentation des flux de gènes peut diminuer la survie de la population par la migration de mutant non adaptés. Ainsi, il est important d'évaluer l'impact de la dépression de consanguinité sur les populations avant de mettre en place une conservation.

Mots-clés : Consanguinité, dépression de consanguinité, corrélation hétérozygotie-valeur sélective, petites populations, *Rana dalmatina*, amphibiens.

Study of the impact of inbreeding depression on the larval development of *Rana dalmatina*.

The inbreeding may have a negative impact on a population survival, named inbreeding depression. In fact, inbreeding reduces genetic diversity and increase the homozygous proportion, and the expression of recessive deleterious alleles responsible of individual genetic load. Genetic experiments lead to evaluate inbreeding and its consequences: inbreeding depression. Several experiments lead to estimate the impact of inbreeding depression in a wild population. One of them is the correlation of individual fitness with heterozygosity (Associative overdominance hypothesis - general effect). An other needs the correlation of individual fitness with estimates of pairwise relatedness. Finally, before estimating relatedness between mates to infer inbreeding, it is often necessary to determine who the parents are. Our study takes into consideration those three genetics methods to estimate inbreeding and inbreeding depression in *Rana dalmatina*. The results show a correlation between heterozygosity and fitness in the short run (post metamorphic follow up) and in a long run (correlation with adult fitness) and genetic variability of adults. Therefore, a decrease of fitness is related to the increase of inbreeding coefficient. The interest of this study is based on the choice of the biological model: indeed, amphibians have a patchy repartition with small and isolated populations which seems to undergrowth inbreeding depression. However, the increase of gene flux can decrease population survival by mutant migration badly adapted. Then, it is important to evaluate the impact of inbreeding depression on populations before conservation.

Key words: Inbreeding, inbreeding depression, correlation heterozygosity – fitness, small populations, *Rana dalmatina*, amphibians.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

MODELE : *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840

1. Caractéristiques, description et dimorphisme sexuel :
2. Distribution
3. Biologie
4. Reproduction et pontes

METHODES

- 1- Echantillonnage
- 2- Fécondation artificielle
- 3- Echantillonnage et élevage
- 4- Etude de variables représentatives de la valeur sélective
- 5- Protocole d'extraction d'ADN
- 6- Géotypage
8. Facteurs d'études de la variabilité génétique :
9. Analyse statistique
 - Influence de la consanguinité sur la survie des individus
 - Etude de la variation entre les paramètres de variabilité génotypique
 - Etude du poids des individus à l'apparition des pattes avant et arrière en fonction de la famille
 - Etude de la variation phénotypique en fonction de la variation génotypique

RESULTATS

1. Description de la variabilité génétique entre les familles
2. Description de la variabilité phénotypique entre les familles
3. Variabilité génétique et survie
 - 1- Différence de survie entre les familles
 - 2- Corrélation Survie – variabilité génétique
4. Corrélation temps de métamorphose – variabilité génétique
 1. Durée pour l'apparition des pattes arrière
 2. Durée pour l'apparition des pattes avant
5. Corrélation entre le poids et la variabilité génétique
 1. Poids des individus à l'apparition des pattes arrière
 2. Poids des individus à l'apparition des pattes avant
6. Corrélation entre les variables représentatives de la valeur sélective chez les têtards et les différentes variables associées à l'hétérozygotie

DISCUSSION

INTRODUCTION

Dans une population virtuelle dite panmictique (*i.e.* modèle probabiliste en population idéale), il existe un appariement aléatoire des gamètes (loi de Mendel) ; mais de façon générale, les populations possèdent une structure dépend des 4 forces évolutives : dérive, la mutation, la migration et la sélection. Les populations dérivent indépendamment les unes des autres, cette dérive (échantillonnage aléatoire des gamètes) génère la fixation ou l'élimination aléatoire d'un allèle ainsi que la réduction du polymorphisme au sein de chaque population (Buri, 1956 *in* Kristensen & Sørensen, 2005). Par ailleurs, la vitesse de la dérive génétique diminue avec la taille des populations.

Aux différentes échelles populationnelles, il se peut que les croisements ne se réalisent pas aléatoirement. La consanguinité, en tant que régime de reproduction, repose sur le croisement préférentiel au sein d'une population entre individus apparentés. En effet, les organismes d'une même sous-population vont partager un ou plusieurs ancêtres communs proches ou éloignés, et la reproduction entre individus de la même sous population va souvent être une reproduction entre apparentés (Harlt & Clark, 1997). La consanguinité mène alors à une diminution du nombre des hétérozygotes par rapport à une population où les croisements sont aléatoires (panmictique) (Wright, 1921 *in* Harlt & Clark, 1997, Falconer & Mackay, 1996 *in* Kristensen & Sørensen, 2005). Ainsi, moins l'effectif efficace de la population (N_e) est grand et plus son isolement est ancien, alors plus la consanguinité va être importante.

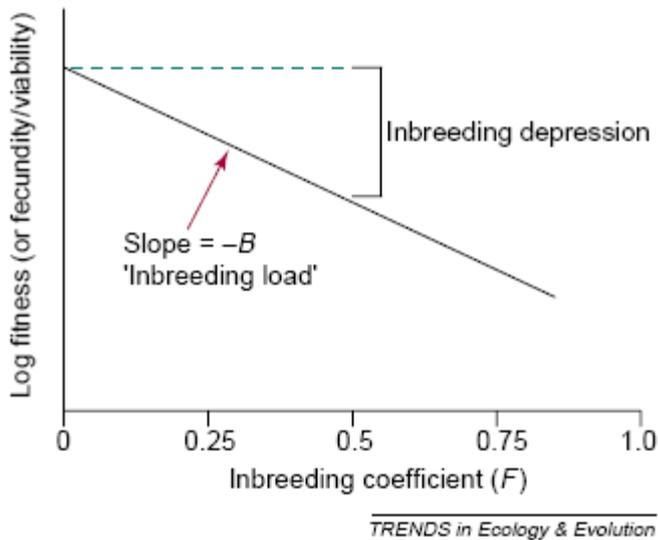
Les conséquences cumulées de la dérive (changement aléatoire dans les fréquences alléliques) et de la consanguinité (la redistribution des génotypes) peuvent être quantifiées par l'utilisation du coefficient de consanguinité f (Kristensen & Sørensen, 2005). Le coefficient f , intrinsèque à un individu, est la proportion d'autozygotie (*i.e.* les deux allèles à un locus sont identiques) moyenne sur tous les locus d'un individu, ou en d'autres mots, la proportion de locus homozygotes pour deux allèles identiques par ascendance au sein d'un individu (Bierne *et al.*, 2000)

La consanguinité peut avoir un effet négatif sur la survie des populations, appelé dépression de consanguinité. En effet, la consanguinité diminue la diversité génétique. L'impact de l'importance de la diversité génétique sur la survie des populations a été particulièrement étudié lors de l'influence de l'hétérozygotie du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) sur la valeur sélective (Tregenza & Weddell 2000 ; Neff & Pitcher, 2005).

De plus, l'augmentation de la proportion d'homozygotes permet l'augmentation de l'expression d'allèles récessifs délétères responsables du fardeau génétique au sein d'un individu (Keller & Waller, 2002).

Les études génétiques permettent de calculer ou d'évaluer la consanguinité et sa conséquence : la dépression de consanguinité. De façon générale, la dépression de consanguinité peut être estimée en comparant la valeur sélective de la progéniture provenant d'une reproduction aléatoire et celle provenant d'une

reproduction entre parents. Si les mutations sur les différents locus ont des effets indépendants, alors le logarithme de la valeur sélective totale tend à diminuer de façon linéaire avec l'augmentation du coefficient de consanguinité (Keller & Waller, 2002). Le fardeau de consanguinité (partie du fardeau génétique) est estimé par le coefficient directeur de la droite.



Le graphique représente la relation entre le fardeau de consanguinité (le nombre d'équivalent létal, B) et la dépression de consanguinité (δ)

La dépression de consanguinité peut être définie en tant que : $\delta = 1 - W_s / W_o = 1 - e^{-B/2}$

Avec W_s : valeur adaptative d'une progéniture consanguine et W_o : valeur adaptative d'une progéniture hybride (Keller & Waller, 2002).

Plusieurs méthodes permettent d'estimer l'importance de la dépression de consanguinité dans une population. Une de ces méthodes consiste à **corrélér la valeur sélective individuelle avec l'hétérozygotie**. La corrélation entre la valeur sélective (croissance, survie, fécondité ou stabilité du développement) et l'hétérozygotie observée a été particulièrement étudiée ces dernières années. Plusieurs recherches ont montré une corrélation positive entre l'hétérozygotie et la valeur sélective comme chez les bivalves marins (Koehn & Gaffney 1988), les crustacés (Bierne *et al.*, 2000), les mollusques (David 1998 *in* Hansson & Westerberg 2002), les amphibiens (Pierce & Mitton 1982), les téléostéens (Thelen & Allendorf 2001, Pujolar *et al.*, 2005) et les mammifères (Slate & Pemberton, 2002). Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer cette relation. En effet, la reproduction entre proches parents augmente la proportion de locus homozygotes chez la descendance, et ainsi, augmente la probabilité de l'association d'allèles récessifs délétères au stade homozygote et résulte alors de la diminution de la valeur sélective de l'individu (dépression de consanguinité) (Bierne *et al.*, 1998)

A l'inverse, la reproduction d'individus génétiquement divergents peut générer une descendance avec une valeur sélective supérieure à la moyenne. Les individus plus hétérozygotes posséderaient alors une valeur sélective plus importante (hypothèse de la surdominance associative - effet général) (Ledig *et al.*, 1983 *in* Hansson & Westerberg, 2002). L'avantage apparent des hétérozygotes serait le résultat des effets de l'homozygotie sur des locus, encore liés à la valeur sélective, éloignés sur le génome. Cette hypothèse est valable lorsqu'il existe un déséquilibre d'identité (associations non aléatoires de génotypes diploïdes dans le génome chez les zygotes) qui est généralement généré par une consanguinité partielle. Dans les populations partiellement consanguines, avec un important déséquilibre de liaison, les individus possèdent des coefficients de consanguinité différents, par conséquent, diffèrent dans leur degré d'hétérozygotie. Dans de telles

populations, l'hétérozygotie sur un ensemble de marqueurs permet de distinguer un continuum allant des individus endogames (génome largement homozygote) aux individus exogames (génome largement hétérozygote). Et la corrélation entre l'hétérozygotie et la valeur sélective pourrait refléter la variation sur les locus associés à la valeur sélective sur une grande partie du génome, comme cela peut être évalué par l'hypothèse de l'effet général (Bierne *et al.*, 2000).

Il existe une relation importante entre la surdominance associative et le coefficient de consanguinité. La surdominance associative est le produit du fardeau de consanguinité et un facteur descriptif de l'importance de l'association entre l'homozygotie de marqueurs et le coefficient de consanguinité selon la formule :

$$AO = \beta \left[\frac{\sigma^2(f)}{(1 - E(H))(1 - E(f))} \right]$$

où AO est la surdominance associative, f est le coefficient de consanguinité, $\sigma^2(f)$ est la variance du coefficient de consanguinité, β est le fardeau de consanguinité et $E(H)$ = Espérance de l'hétérozygotie (*i.e.* moyenne de l'hétérozygotie considérée comme une variable aléatoire) (Bierne *et al.*, 2000).

Par conséquent, l'hypothèse de l'effet général relie la surdominance associative aux locus du génome, et peut ainsi être un test de dépression de consanguinité dans le sens classique du terme (Hanson & Westerberg, 2002). Ainsi l'effet de surdominance génère des individus hétérozygotes avec une valeur adaptative supérieure aux homozygotes. A l'inverse, la dépression d'hybridation peut mener à une incompatibilité génétique parentale, et résulter en une production de phénotypes intermédiaires avec des adaptations locales moins performantes (Templeton, 1986 *in* Sagvik *et al.*, 2005).

Une autre méthode consiste à corréler la valeur sélective individuelle avec l'estimation de l'apparentement (par paire). Puisque la similarité entre deux allèles à un locus peut être utilisée pour estimer f , les allèles partagés entre deux individus peuvent permettre d'évaluer leur degré d'apparentement dans les populations naturelles.

Enfin, avant d'estimer l'apparentement entre les individus, il est souvent intéressant de déterminer l'apparentement entre les parents (Keller & Waller, 2002). En effet, le niveau de similarité génétique connu d'un couple de reproducteurs a des conséquences directes sur le niveau de similarité génétique, et probablement aussi sur la valeur sélective de leur descendance (Bensch *et al.*, 1994). Primmer (2003) a étudié la possibilité de prédire la variabilité génétique, et par conséquent, la valeur sélective des descendants de couple reproducteurs en utilisant les données génétiques parentales mesurées par microsatellites sur trois populations de salmonidés en danger. Les résultats de cette étude ont montré une corrélation très significative observée dans toutes les populations entre les estimations de la diversité génétique basée sur la diversité génétique prédite et observée de la descendance. De plus, deux populations sur trois ont montré une association significative entre la diversité génétique de la progéniture et les traits liés à la valeur sélective.

Notre étude prend en compte ces trois méthodes génétiques d'estimation de l'impact de la dépression de consanguinité chez la grenouille agile (*Rana dalmatina*). Cette espèce a été choisie comme modèle biologique de ce travail. En effet, les amphibiens possèdent la différenciation génétique inter-population la plus importante des vertébrés (Driscoll, 1998) ; ceci est dû à des capacités de dispersion limitées (Newman & Squire 2001), une philopatrie importante (Berven & Grugzien, 1990 *in* Sagvik *et al.*, 2005), et une distribution de sites de reproduction particulièrement disséminés (Driscoll, 1998 ; Lampert *et al.*, 2003). De plus, les amphibiens sont généralement composés d'une mosaïque de populations qui diffèrent dans leur degré de variation génétique et dont les flux de gènes sont particulièrement limités même entre sites proches (Lesbarrères *et al.*, 2003 ; Newman et Squire 2001 ; Lampert *et al.*, 2003 ; Sagvik *et al.*, 2005).

Si une population est petite et isolée pendant plusieurs générations, elle subit deux types de menaces. La première menace est liée au fait que, puisque les allèles sont fixés ou perdus de façon aléatoire par dérive génétique, le niveau de variabilité génétique est réduit (la dérive génétique augmente avec la diminution de la taille de la population) (Lande 1995 *in* Keller & Waller, 2002). Conjointement, les mutations délétères tendent à s'accumuler parce que la sélection est moins efficace dans les petites populations (Lynch *et al.*, 1995 *in* Keller & Waller, 2002). Ceci tend à générer une accumulation de mutation pour des populations de petites tailles effectives ($N_e < 100$), processus similaire au cliquet de Muller (i.e. la diminution irréversible de la valeur sélective par l'accumulation stochastique d'allèles délétères dans une population).

Ces deux processus ne menacent pas les populations à court terme. A l'inverse, la consanguinité peut agir rapidement en réduisant les opportunités de reproduction, les petites populations augmentent leur consanguinité *via* l'accouplement entre apparentés et l'augmentation de la fréquence des homozygotes. Une telle consanguinité génère une réduction de la valeur sélective (dépression de consanguinité) (Keller & Waller, 2002). La majorité des études antérieures a été réalisée sur des populations de taille efficace importante, donc l'hypothèse émise ci-dessus ne peut avoir été prise en compte. En effet, dans le cas des populations à grande taille efficace, les allèles ségrégent alors que dans les petites, les effets de la dérive devraient primer sur la sélection. Les populations importantes à reproduction aléatoire et à l'équilibre montrent une dépression de consanguinité et une diversité de marqueurs importante mais peu de variance de la consanguinité alors que l'inverse est vrai pour des petites populations à l'équilibre mutation – sélection (Bierne *et al.*, 2000).

Ces deux hypothèses contradictoires nécessitent alors d'être étudié *via* l'estimation de l'existence et de l'importance de la dépression de consanguinité. Ainsi, les amphibiens de façon générale, et *Rana dalmatina* en particulier, sont de bon modèle d'étude de la consanguinité et de l'impact de la dépression de consanguinité (Sagvik *et al.*, 2005).

La sélection contre les effets délétères de la consanguinité est susceptible d'avoir joué un rôle majeur dans l'évolution des mécanismes comportementaux d'évitement de la reproduction entre individus apparentés (Pusey & Wolf, 1996). En effet, les stratégies d'évitement de la consanguinité ont été étudiées chez plusieurs organismes (Neff & Pitcher, 2005).

Ainsi, les amphibiens sont de bons modèles pour l'étude de l'influence de la dépression consanguine car ils sont composés de petites populations isolées.

Le fardeau génétique est attendu dans le cas d'organismes très féconds et peut être causé en partie par le nombre important de divisions cellulaires qui augmente l'opportunité de mutations (Launey & Hedgecock, 2001). Aussi, comme les pontes de Grenouille agile contiennent de 500 à 2100 œufs (Duguet & Melki, 2003) on peut attendre un fardeau génétique important et donc s'attendre à un impact de la dépression de consanguinité sur la survie des individus.

Le premier objectif de cette étude est de vérifier l'existence d'une dépression de consanguinité en estimant la corrélation entre la valeur sélective individuelle et l'hétérozygotie puis l'apparement des individus, et en analysant la paternité des couples reproducteurs.

Ces estimations permettront d'évaluer l'importance de la dépression de consanguinité au sein d'individus provenant, dans un premier temps, de fécondations artificielles dont les parents ont été choisis en fonction de leur coefficient d'apparement, puis d'individus provenant de familles différentes de la même population.

Le deuxième objectif tend à évaluer l'importance de l'évitement de la consanguinité au sein de couples reproducteurs en comparant le coefficient d'apparement de ces couples et en estimant l'importance de la dépression de consanguinité.

L'estimation de la dépression de consanguinité est réalisée en développant une analyse microsatellite multi locus sur le stade larvaire d'amphibiens.

MODELE

Rana dalmatina Bonaparte, 1840

1. Caractéristiques, description et dimorphisme sexuel :

Cette anoure de taille moyenne, mesurant de 45 à 65 mm, est élancée avec un museau proéminent, long et légèrement arrondi (**Figure 1**).



Figure 1 : Photo de *Rana dalmatina* (Photo : Boris Berglund)

Elle possède un masque temporal contrasté avec un tympan de grande taille. La face supérieure du corps est brune roussâtre ou grisâtre plus ou moins foncée, uniforme ou légèrement tachetée de sombre (Duguet & Melki, 2003). La coloration de la face inférieure varie entre le blanc nacré, le jaunâtre ou le rosé, généralement uniforme (Duguet & Melki, 2003).

La principale caractéristique physique de cette grenouille est la taille de ses membres postérieurs ; en effet, ceux-ci possèdent une articulation tibio-tarsienne qui dépasse la pointe du museau, parfois largement et lui permettent de faire des bonds de plus de 2 m, d'où son nom d'espèce (Nöllert & Nöllert, 2003). Lors de la période de reproduction, les mâles possèdent une callosité nuptiale grisâtre sur la face interne du pouce des membres antérieurs lui permettant d'agripper la femelle lors de l'amplexus, alors qu'en dehors de la période de reproduction, ces callosités sont blanches. Les mâles possèdent des membres antérieurs plus massifs que ceux des femelles. Ils ne possèdent pas de sacs vocaux (Duguet & Melki, 2003). Les femelles sont un peu plus trapues que les mâles et possèdent des ponctuations rouges sur le ventre (Nöllert & Nöllert, 2003).

2. Distribution

La Grenouille agile est présente dans la majeure partie de l'Europe avec quelques populations isolées dans le nord de l'Europe et le pourtour de la Méditerranée (**Figure 2**) (Nöllert & Nöllert, 2003).



Figure 2 : Répartition de la grenouille agile (Nöller & Nöller, 2003).

Sa présence est généralement associée aux boisements et aux fourrés : forêt de plaine, boisement alluviaux, bocage... Cet amphibien est très ubiquiste sur ses zones de reproduction, cohabitant souvent avec d'autres amphibiens, mais évite généralement les zones riches en poissons (Duguet & Melki, 2003).

3. Biologie

L'adulte fréquente en saison estivale un domaine vital distinct de celui de ses congénères, en boisement ou en prairie, d'une superficie de quelques dizaines de mètres carrés. La distance entre le domaine vital et le site de reproduction atteint parfois un km. Il est actif surtout en fin d'après midi, en début de soirée et en début de matinée. Il se nourrit de petits invertébrés capturés à l'affût (araignées, diplopodes, insectes...) (Duguet & Melki, 2003).

Les dernières sorties ont été notées vers la fin octobre ou en novembre. L'espèce effectue vraisemblablement une migration automnale et hiverne à terre, sans doute à proximité du site de reproduction. Les premières sorties s'observent environ quatre mois plus tard, en février ou au début mars, rarement en janvier, à une température d'une dizaine de degrés environ. La saison de reproduction démarre immédiatement et est caractérisée comme explosive, bien qu'elle puisse s'étaler sur plusieurs semaines en cas de conditions météorologiques médiocres. Le développement de l'embryon dure de 20 à 30 jours. La phase larvaire dure 3

mois et se déroule entre mars et juillet avec des métamorphoses dès la mi-juin. La maturité sexuelle est atteinte vers l'âge de 3 ans. La longévité moyenne dans la nature s'élève à 4 ou 5 ans (Duguet & Melki, 2003).

4. Reproduction et pontes

La Grenouille agile est une espèce monotypique dont le chant nuptial est d'intensité faible et émis au fond de l'eau, de nuit (Duguet & Melki, 2003) (**Figure 3**).

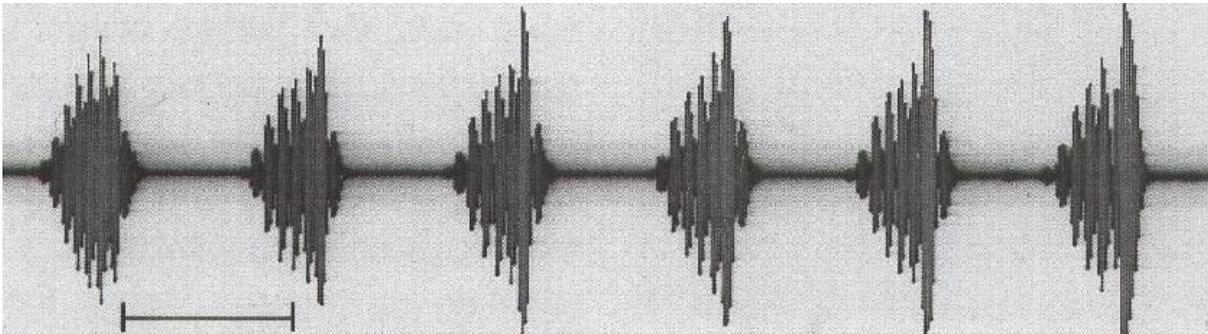


Figure 3 : Sonagramme d'un chant d'accouplement de *Rana dalmatina* ; à 18°C, la distance entre deux groupes d'impulsion est de 100ms (Nöller & Nöller, 2003).

La femelle disposée à pondre choisit toujours un endroit herbeux. La reproduction se fait par amplexus (**Figure 4**) et donc fécondation externe.



Figure 4 : Photo d'amplexus de Grenouille agile.

La ponte est principalement attachée par son centre à un support vertical (**Figure 5**), plus rarement posée sur le fond ou flottant à la surface. C'est une boule plutôt compacte de 500 à 2100 œufs.



Figure 5 : Photo de ponte de Grenouille agile.

Ces œufs ont un diamètre de 1,7 à 3,0 mm et sont bicolores avec un pôle supérieur brun noir et un pôle inférieur blanchâtre (Duguet & Melki, 2003).

METHODES

1- Echantillonnage

L'échantillonnage des individus a été effectué au mois de février sur le site du Château à Motte sur la commune de Saint Sylvain d'Anjou (47° 31' 17'' N ; 0° 28' 15'' O). 12 mâles et 10 femelles ont été prélevés, conservés pendant 2 semaines dans des boîtes contenant de la mousse (**Figure 6**) en attendant la fin du génotypage des différents individus.



Figure 6 : Photo d'un mâle Grenouille agile conservé dans une boîte contenant de la mousse

2- Fécondation artificielle

La fécondation artificielle a été réalisée en laboratoire. Les croisements ont été réalisés entre 5 mâles et 5 femelles selon un plan de fécondation croisée en fonction des coefficients d'apparentement des paires (**Figure 7**), définis préalablement grâce au logiciel Identix (i.e. logiciel de test d'apparentement par permutation) (Belkir *et al.*, 2002).

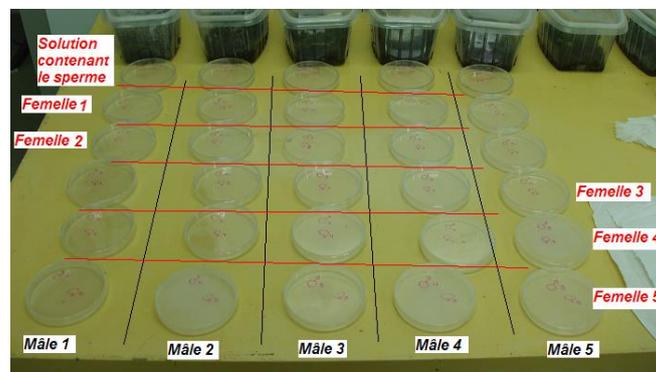


Figure 7 : Photo du plan de fécondation croisée entre les 4 mâles et les 4 femelles.

De plus deux amplexus récupérés sur le terrain ont été accouplés selon le même protocole afin de comparer les résultats avec ceux des accouplements artificiels.

Chaque mâle a été déméduillé et disséqué afin de prélever les testicules nécessaires à la fécondation (**Figure 8**).

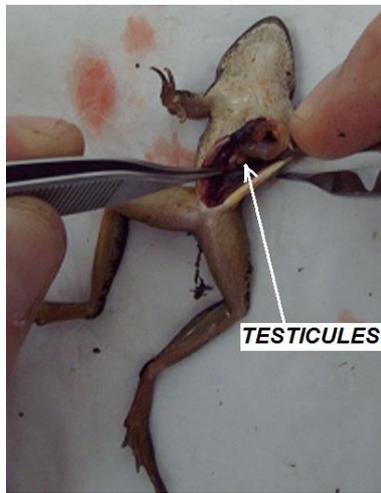


Figure 8 : Photo de la dissection d'un mâle de Rana dalmatina.

Les testicules sont alors conservés quelques minutes dans la solution de Ringer. Les testicules sont alors lacérés dans des boîtes de Pétri contenant une solution d'eau de mare afin de libérer les spermatozoïdes contenant une solution spermatique de mâles différents. Le cloaque de la femelle est ouvert à l'aide d'une pince cannelée et les œufs sont déposés dans les boîtes de Pétri (Figure 9 et 10). Lorsque les œufs sont en contact avec le sperme, la boîte est agitée afin que la fécondation soit uniforme.



Figure 9 : Photo du prélèvement des œufs



Figure 10 : Mise en contact des œufs et de la solution spermatique

Les œufs doivent rester sur une seule couche dans la boîte pour que la fécondation soit de bonne qualité.

Après une minute de contact entre les œufs et le sperme, celui-ci est évacué de la boîte de Pétri afin d'éviter une sur fécondation. Le sperme est alors transféré dans l'autre boîte de Pétri utilisé pour la fécondation de la 2^{ème} femelle.

La boîte de Pétri est alors rempli d'eau de mare, puis les œufs fécondés sont transférés dans un seau jusqu'à l'émergence des têtards.

3- Echantillonnage et élevage

Afin d'évaluer l'influence de la dépression de consanguinité dans le milieu naturel, 10 pontes ont été prélevées sur le site de « T.G.V. » (47°33'54''N ; 0°28'26''O) (Figure 11).



Figure 11 : Carte représentant le site de reproduction duquel à été prélevé les 10 pontes.

Les pontes ont été conservées dans un seau chacune jusqu'à l'éclosion des têtards. Après l'éclosion, pour chaque famille, 10 têtards ont été mis dans 5 bacs (5 répliquas) et positionnés de façon aléatoire dans la salle d'élevage (Figure 12). Ainsi, 500 têtards ont été élevés pendant 56 jours (Figure 13).

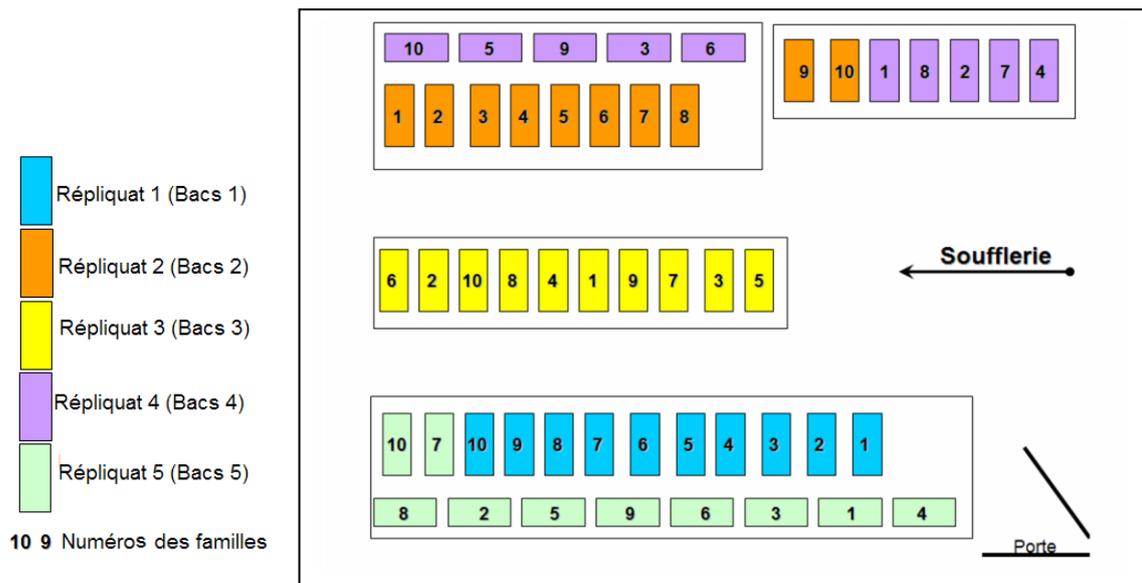


Figure 12 : Plan d'expérimentation



Figure 13 : Photo du site d'élevage des têtards avec les différents bacs contenant les différentes familles.

Les bacs ont été nettoyés tous les jours grâce à une épuisette à maille fine ; cette technique permet une oxygénation de l'eau quotidienne. Les têtards ont été nourris quotidiennement par un mélange de nourriture pour lapin (2/3) et de nourriture pour poisson (1/3) finement broyé.

4- Etude de variables représentatives de la valeur sélective

Lors de l'élevage des têtards, plusieurs variables ont été étudiées en tant que paramètres liés à la valeur sélective

Les différentes variables étudiées sont :

- La survie : chaque jour, les têtards morts ont été notés par bac et prélevés (lorsque cela a été possible puisque la dégradation des têtards, notamment au début de leur vie a été très rapide).
- Le poids de chaque individu à l'apparition des pattes arrière ; les individus ont été remis dans les bacs après la pesée ainsi les données de poids sont considérées par bac et non par individus
- Le poids de chaque individu à l'apparition des pattes avant.



Le temps de métamorphose est l'intervalle de temps entre l'éclosion du têtard (Stade 25, Gosner, 1960) et l'apparition de la deuxième paire de pattes (Stade 42, Gosner 1960).

- La proportion d'individus métamorphosés qui correspond au nombre d'individus ayant fini leur métamorphose (Stade 42) sur la totalité des individus.

Après l'apparition des pattes arrière, un morceau de queue a été prélevé, avant la résorption de celle-ci, afin de génotyper les individus en vue d'analyses génétiques.

5- Protocole d'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN s'est faite par l'utilisation de chelex (billes d'EDTA chélatant les ions positifs bivalent) (Walsh *et al.*, 1991). L'échantillon de tissus est récupéré dans un tube Eppendorf dans lequel est ajouté 300µL de chelex 5%, 10µL de tampon d'extraction et 5µL de protéinase K. Le mélange est mis à 56°C, au bain marie, toute la nuit. Le lendemain, le mélange est vortexé et centrifugé, le surnageant est alors conservé à -22°C pour les études génétiques.

6- Génotypage

L'étude de la structure de génétique des individus a été réalisée grâce à l'étude de marqueurs microsatellites.

Ce type de marqueurs n'a pas encore été séquencé pour *Rana dalmatina* ; de ce fait, les locus utilisés lors de l'étude sont des locus microsatellites amplifiés sur des espèces voisines de *Rana dalmatina* (*Rana temporaria*, *Rana latastei*...) (**Tableau I**). Ce système appelé « amplification croisée » est basé sur le principe selon lequel la proportion de loci amplifiés est fonction de la distance phylogénétique entre les taxa (Primmer *et al.* 1996).

Locus microsatellite	motif microsatellite	Especie source	Amplifié pour	Nombre d'allèles	Taille pdb		Auteurs	Ta	
RlatCa18	(CA)12(N)13(G)13	<i>latastei</i>	<i>R. arvalis</i> , <i>R. temporaria</i> , <i>R. esculenta</i> , <i>R. lessonae</i> , <i>R. catesbeiana</i>	8	111	AF327356	F : ACTGCTGCATCCAAATCTCC R : GGGTATAGCCATACACCTGTGC	1, 3, 4, 5	58°C
RlatCa41	(CA)1(TA)1(CA)7(CG)1(CA)2	<i>R. latastei</i>	<i>R. arvalis</i> , <i>R. temporaria</i>	6	154	AF327362	F : TGGTCTGCAAACCTCATTAC R : GCAACAATGGGACTAATAAAGTGAG	1, 3, 4, 5	58°C
RlatCa17	(CA)8(CC)5	<i>R. latastei</i>	<i>R. arvalis</i> , <i>R. temporaria</i>	5	113	AF327361	F : CCCAATGTTTCGTCAACC R : TGATTAGGAACCCCTGTGTG	1, 3, 4, 5	58°C
RRD590	(GAA)3(GAG)13	<i>R. catesbeiana</i>	<i>R. latastei</i> , <i>R. temporaria</i> , <i>R. esculenta</i> , <i>R. lessonae</i> , <i>R. catesbeiana</i> , <i>R. rugosa</i>	5	176	D78590	F : GATTAGTAAACAATAAAGGCACATG R : CTTTGGAGCAGGAGGTG	2, 6, 5	54°C
WRA1-22	(TC)11	<i>R. arvalis</i>	<i>R. latastei</i> , <i>R. esculenta</i> , <i>R. lessonae</i> , <i>R. catesbeiana</i>	2	153-155	AJ419881	F : GCACCTGCTGTGTAGGAAT R : GCCTGTGCATAGCAAC	5	50°C
RtpE	(CA)12	<i>R. temporaria</i>	<i>R. temporaria</i> , <i>R. dalmatina</i>	18	336	AF489578	F : GACAAATTTGTGGGAGCC R : CAGCACCACATCCAATCC	7	60°C
RtpO	(CT)13	<i>R. temporaria</i>	<i>R. temporaria</i> , <i>R. dalmatina</i>	2	152	AF489581	F : TTTCTCCCTCTCTCTCTC R : ACCAAAAACAGAGAAAAG	7	48°C
Rtemp2	(AC)8AT(AC)22	<i>R. temporaria</i>	<i>R. latastei</i> , <i>R. arvalis</i>	4	83/140	AF297973	F : ATGCTCACTATTATCTGTCCAGC R : TGTTCCTCAGGCAATCTG	8, 5	50°C
Rtemp4	(AC)16	<i>R. temporaria</i>	<i>R. latastei</i> , <i>R. arvalis</i> , <i>R. catesbeiana</i>	11	106/142	AF297975	F : TCATGACGGCAAAGGTCAGG R : AGAACCGCTGTGTCCCAAC	8,9,10,11,6,5	58°C
Rtemp5	(GT)15	<i>R. temporaria</i>	<i>R. latastei</i> , <i>R. arvalis</i>	8	117/157	AF297976	F : GATCCACGTATGAGGATAGTTCAG R : AGCAGGACTGTGGACTGCG	8,9,10,11,6,6	50°C
Rtemp9	(TG)18	<i>R. temporaria</i>	<i>R. latastei</i> , <i>R. arvalis</i> , <i>R. catesbeiana</i>	2	94/100	AF297980	F : AGCCCATGCTTATGCTGAG R : TTGATATTGCTTCCGGGGC	8,5	58°C
Rtemp1	(CA)4GG(CA)24	<i>R. temporaria</i>	<i>R. arvalis</i> , <i>R. catesbeiana</i> , <i>R. esculenta</i> , <i>R. lessonae</i>	12	92/130	AF297972	F : TCTCTCTCTTTGTTCCCTGAGC R : CCTTGAGAGGGGCAAGTAAGGC	9,5	53°C
RECALQ	(GATC)42	<i>R. esculenta</i>	<i>R. lessonae</i>	8	208	X64324	F : GGAGGGTGAAGTCAACACT R : ACATTGGAATATATAAACT	2,5	48°C
RNTYR2	(T)22	<i>R. nigromaculata</i>		2	195	D37779	F : TGGGACTTTTCTAGCTG R : GCCATAGCCCATAGACG	2,5	48°C
RCIDII	(TA)9	<i>R. rugosa</i>	<i>R. rugosa</i>	3	173	L42815	F : GCTGAATTTGGAAAGATGAG R : CAGGAAGGCAAAAAGTTCC	2,5	48°C
RC08604	(C)15	<i>R. catesbeiana</i>		5	174	U08604	F : TTGGAGACCCTCAGGG R : TCATGGAAGTGTCTTATCAC	2	50°C
RtSB3	(GT)14(CT)GT2	<i>R. temporaria</i>	<i>R. arvalis</i> , <i>R. esculenta</i> , <i>R. lessonae</i>	7	172/205	AF257479	F : GAGATCCATGTGATTATGAG R : CCACCTGCGATTCTGACCTGTC	9,11,6,12	53°C
Rt2Ca9		<i>R. temporaria</i>		4	129	AF327358	F : TCCCTTAAATGTGCTTTTTC R : CTCTTTCCCTTATAGGTGAG	9,10,11,6	53°C
RtU4	(GT)23(T)13	<i>R. temporaria</i>	<i>R. arvalis</i>	10	75-108	AF257481	F : GGCTTCAAAGTGAATAAAG R : AATCTTTTCTTACTGTAGC	12,5	50°C
RtU7	(GATA)37	<i>R. temporaria</i>	<i>R. arvalis</i>	22	152-295	AF257482	F : GCATTATTACAGCATCTGGAT R : TTAATGGCTGGAATGATTACC	12,5	50°C
RtSB14	(GT)12(GTT)16	<i>R. temporaria</i>	<i>R. arvalis</i>	4	174-191	AF257478	F : TGTGTCAGCAATGAATGTTA R : GCAGAGTTACAGCCAAGGAA	12,5	55°C
RtSB80	(TA)13	<i>R. temporaria</i>	<i>R. arvalis</i>	9	199-250	AF257480	F : ACAGCTATATCCGACCAC R : GGAGGACATAAGTCAATAA	12	54°C
RtpP	(TC)6	<i>R. temporaria</i>	<i>R. dalmatina</i>	2	173	AF489582	F : TCATCCCTGCTACTAATC R : AAGCAATCAGGAATAAGGGG	7	50°C
Rt2Ca2-22		<i>R. temporaria</i>	<i>R. esculenta</i> , <i>R. rugosa</i>			UNPUB	F : CGGCTTACAAGAGGTGGAG R : AGACTCCCTTACAGGCATGG	9,10,11,6	53°C
Rt2Ca25		<i>R. temporaria</i>	<i>R. esculenta</i> , <i>R. rugosa</i>			UNPUB	F : GCCAGGGTATGAAACTTATGAGC R : CAAATGTATATTGTTGCAATGG	9,10,11,6	50°C
Rtemp10L	(GT)23	<i>R. temporaria</i>	<i>R. esculenta</i> , <i>R. rugosa</i>	46	112/114	AF297981	F : ACAATCTTATGTGAGGAAGC R : TTCTCAAGACTGACAAAGG	8	45°C
RlatCa27	(TACA)8(N)14(CA)3(T)2(CA)9	<i>R. latastei</i>	<i>R. arvalis</i> , <i>R. temporaria</i>	9	170	AF327357	F : TTGCAAAATAGCAGGGTGTTC R : CCGGTTAACTTCATATTTGTAGG	1, 3, 4, 5	58°C

Tableau I : Tableau récapitulatif des microsatellites sélectionnés pour l'amplification croisée chez *Rana dalmatina*. F : brin sens « forward », R : brin sens « reverse ». ¹ Garner et Tomi 2001, ² Vos et al, 2001, ³ Garner et al 2003, ⁴ Garner et al 2004, ⁵ Primmer & Merilä 2002, ⁶ Lesbarrères, 2004, ⁷ Pidancier *et al.*, 2002, ⁸ Rowe & Beebe 2001, ⁹ Palo *et al.*, 2003, ¹⁰ Palo *et al.*, 2004 a, ¹¹ Palo *et al.*, 2004 b, ¹² Berlin *et al.*, 2000.

Les différents locus sont amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction). 4µl d'ADN ont été pipetés et ajoutés à un mélange contenant : 2,5µL de tampon 10mM, 2µL MgCl₂ 2mM, 5µL dNTP 100µM, 1µL de chaque couple d'amorce (Forward et Reverse) 10µM, 0,5 U(0,1µL) de Taq polymérase et 10,4 µL d'eau milliQ ; pour un volume réactionnel totale de 25µL par individu. Les conditions de PCR ont été les mêmes pour chaque

locus : une dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C, puis 35 cycles comprenant 30s à 94°C pour la dénaturation, 30s à la température d'hybridation et 30s d'élongation à 72°C, et enfin 5 minutes d'élongation à 72°C. Les températures d'hybridation ont été modifiées en fonction du résultat de l'amplification.

- Migration de locus et interprétation du polymorphisme
 - Gel dénaturant

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide 5 % permet la séparation des fragments de microsatellites amplifiés par PCR. Le polymorphisme allélique des microsatellites correspondant à un polymorphisme de taille des allèles, plus un fragment microsatellite sera court (c'est à dire moins il présentera de répétitions du motif nucléotidique), plus il migrera vite, donc plus il sera éloigné du front de migration (**Figure 14**).

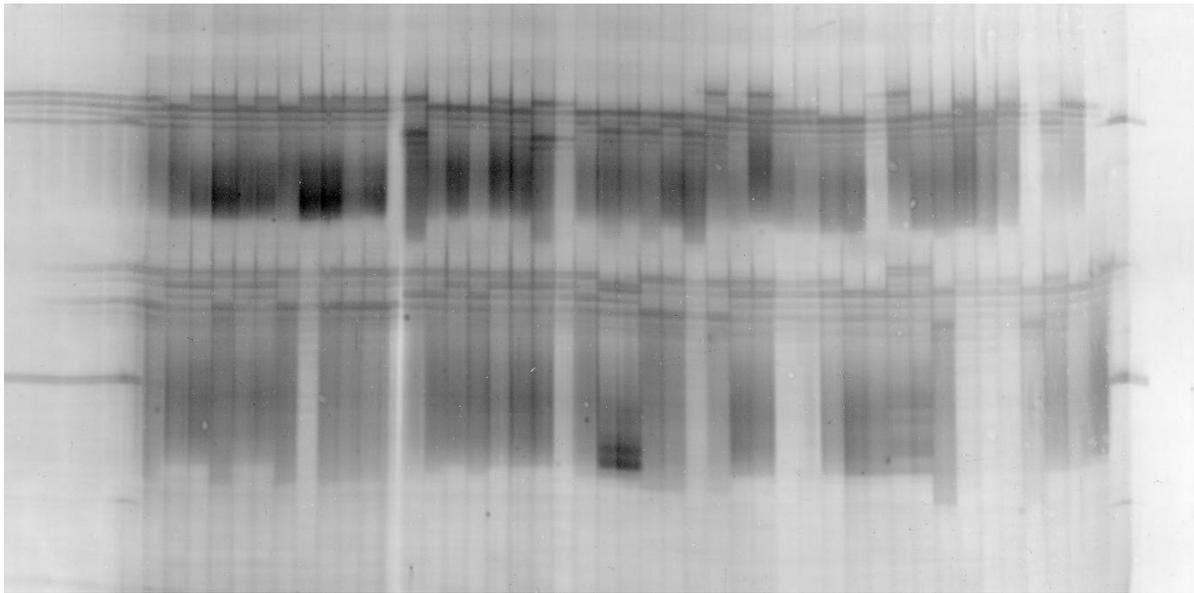


Figure 14 : Locus WRAI22 amplifié sur gel d'acrylamide dénaturant scanné.

Comme un microsatellite résulte d'une transmission héréditaire co-dominante, la visualisation de leur état homozygote ou hétérozygote a aussi été rendue possible. Avant d'être déposés sur le gel, les produits de PCR ont été dénaturés au bleu de formamide désionisé à volume égal de celui de la préparation, à 94°C pendant 5 minutes. 10 µL d'échantillons ont ensuite été déposés dans chaque puits. L'électrophorèse, réalisée dans un tampon de TBE 0,5 X, a été réglée à 60 W, pendant 2h30 – 3 h (en fonction de la taille des allèles).

- Gel non dénaturant (SSCP)

Les migrations SSCP sont des migrations électrophorétiques de fragments d'ADN en brin unique de taille appropriée sur des gels de polyacrylamide non dénaturant. Sous des conditions particulières (température basse, conditions non dénaturantes), les brins d'ADN se replient en structures qui migrent en fonction de leur conformation (à la différence de la migration sur gel de polyacrylamide dénaturant, où les brins d'ADN migrent en fonction de leur taille). Les brins d'ADN de différentes séquences ne possèdent généralement pas la même structure, et possèdent donc des mobilités différentes (Sunnucks *et al.*, 2000).

Les gels non dénaturants contiennent de l'acrylamide (37.5 : 1) 8%, du glycérol 5% et du TBE 0,5%. La polymérisation du gel nécessite l'addition de TEMED et d'APS (Ammonium Persulfate). Les échantillons de PCR (auquel on ajoute une solution stop de bleu de formamide) sont dénaturés pendant 3min à 94°C puis conservés dans la glace pendant le chargement du gel. La migration se fait entre 5-10 W pendant 8-12 heures en fonction de la taille des allèles en paires de bases.

- Révélation des gels de polyacrylamide

La révélation du gel se fait par la précipitation, via les potentiels d'oxydoréduction, de la matière organique qui est ensuite révélée par le carbonate de sodium. A la fin de la migration, le gel a été révélé selon le protocole de Creste *et al.* (2001). Le gel a été fixé dans une solution d'acide acétique 1.25 M à 4°C pendant 30 minutes. Après rinçage à l'eau déminéralisée, il a ensuite été coloré 30 minutes au nitrate d'argent 1 g/L à 4°C contenant 3 mL de formaldéhyde 40 %. La révélation est ensuite effectuée dans une solution de carbonate de sodium à 4°C (60 g carbonate de sodium, 3 mL formaldéhyde 40 %, 400 µL thiosulfate de sodium 10 mg/mL, 1.5 mL soude 5 N dans 2 L d'eau ultra pure à 4°C). Le gel a été fixé à nouveau 5 minutes dans l'acide acétique 1.25 M puis rincé 10 minutes à l'eau ultra pure avant de sécher une nuit à température ambiante.

7. Facteurs d'études de la variabilité génétique :

- Hétérozygotie Multi Locus

Le premier facteur d'étude de la variabilité génétique individuelle est l'Hétérozygotie Multi Locus (MLH).

$$HML = \frac{\sum_{i=1}^n h_i}{\sum_{i=1}^n \overline{h_i}} \text{ Avec } h_i = 1 \text{ pour un locus hétérozygote et } h_i = 0 \text{ pour un locus homozygote}$$

Dans le cas où tous les individus n'ont pas été typés sur tous les locus, une Hétérozygotie Multi Locus standardisée est alors calculée (HMLs)

HMLs est la proportion de locus hétérozygotes typés/hétérozygotie moyenne des locus typés. Cette mesure évite les biais potentiels qui peuvent être introduits par les individus non typés à certains locus (Coltman *et al.*, 1999).

- FIS

De façon à quantifier la structure de la population, Wright (1921) a défini des index de fixation. FIS mesure la diminution de l'hétérozygotie à l'échelle de la population, i.e., FIS est le coefficient de consanguinité d'une sous-population relatif à la population d'où ils proviennent (Hartl & Clark, 1997).

$FIS = \frac{H_s - H_l}{H_s}$ avec H_s : proportion d'hétérozygote dans une population à croisement aléatoire et avec H_l : proportion d'hétérozygote dans la population concernée

- Coefficient de parenté par paire de Lynch et Ritland (1999)

Dans l'étude de la structure des populations via les marqueurs, l'étude de la parenté requiert un choix d'estimateurs particulièrement informants. Pour décrire ces estimateurs, le génotype d'un individu 1 est défini comme $A_i A_j$ et $A_k A_l$ pour un individu 2. δ_{ij} sont des « variables indicatrices ; si $A_i = A_j$ alors $\delta_{ij} = 1$ sinon $\delta_{ij} = 0$

Dans le cas du coefficient de parenté de Lynch et Ritland, le coefficient r de parenté s'écrit :

$$r = \frac{p_i(\delta_{jk} + \delta_{jl}) + p_j(\delta_{ik} + \delta_{il}) - 4p_i p_j}{(1 + \delta_{ij})(p_i p_j) - 4p_i p_j} \quad \text{Où } p_i = \text{fréquence de l'allèle } i \text{ dans la population}$$

$$p_j = \text{Fréquence de l'allèle } j \text{ dans la population}$$

Dans l'estimation de ce coefficient, le premier génotype, $A_i A_j$, est le génotype dit « référent ». Cet estimateur est une mesure asymétrique de la parenté, puisque basé sur un génotype attendu du second individu, donnant le premier.

- Coefficient de consanguinité de Lynch et Ritland

Le coefficient de parenté de Lynch et Ritland, f , est défini par :

$$f = \frac{\delta_{ij}/p_i - 1}{n - 1} \quad \text{Où l'allèle } i \text{ est choisi en tant qu'allèle référent (Ritland \& Travis, 2004)}$$

8. Analyse statistique

- Influence de la consanguinité sur la survie des individus

Afin de différencier les familles en fonction de leur survie en prenant en compte les individus vivants et morts, le modèle de Cox (Boite 1) a été choisi. Ce modèle permet de censurer les individus morts (morts : 1, vivants : 0) afin de différencier l'individu mort à la fin de l'étude et l'individu vivant dont on ne connaît pas la date de fin de vie.

Boite 1 : Modèle de Cox :

Afin de comparer la durée de survie des individus, le modèle de Cox a été choisi.

Soit X_1, \dots, X_p l'ensemble des covariables ; la modélisation par Cox de la « probabilité de survie » $h(t)$ en fonction de ces covariables s'écrit :

$$h(t, X_1, X_2, \dots, X_p) = h_0(t) \exp(b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_p X_p)$$

On dit que les risques instantanés sont proportionnels.

Dans le cas de l'estimation de la probabilité de survie, l'unique facteur de risque est la famille, ce qui simplifie le modèle.

Le modèle de Cox permet de calculer une probabilité de demi-vie (P (50)). En effet, cette probabilité estime le nombre de jour de la demi- vie d'un individu. La plupart des têtards étaient encore vivant en fin d'expérience, ainsi, il n'a pas été possible de définir la P (50) puisque les courbes de survie ne passent pas par cette horizontale ; par contre nous avons défini la P (80) correspondant au temps de 1/5 de vie. Cette valeur, pour chaque famille, sera étudiée en fonction de la variabilité génétique de ces mêmes familles dans la partie : corrélation variabilité génétique – variabilité phénotypique

- Etude de la variation entre les paramètres de variabilité génotypique

Afin de déterminer s'il existe une différence significative entre les familles en fonction de leur variabilité génétique, on utilise le test non paramétrique de Kuskall-Wallis (**Boite 2**)

Boite 2 : Test de Kruskal -Wallis

Le test de Kruskal – Wallis permet de faire l'étude des liaisons entre un caractère quantitatif et un caractère qualitatif à k classes. C'est donc un équivalent non paramétrique de l'analyse de variance.

Ce test est une généralisation du test de Mann Withney Wilcoxon, et, comme ce dernier, il repose sur les rangs des valeurs des différents échantillons. Ce test permet de déterminer si les k sommets des rangs, et non seulement 2, se révèlent trop disparates pour qu'ils proviennent de la même population.

La statistique de test est la suivante :

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j}{n_j} - 3(N+1) \quad N = \text{Somme des effectifs de tous les échantillons}$$

$n_j =$ L'effectif du $j^{\text{ème}}$ échantillon, $k =$ nombre d'échantillons et $R_j =$ somme des rangs des éléments du $j^{\text{ème}}$ échantillon

- Etude du poids des individus à l'apparition des pattes avant et arrières en fonction de la famille

L'objectif de cette partie est de définir en détail le modèle utilisé pour déterminer s'il existe une différence entre les familles relativement aux poids des pattes arrière en prenant en compte l'effet bac. Ainsi, l'étude se fait via un modèle linéaire généralisé (**Boite 3**)

Boite 3 : Modèle linéaire généralisée

On désigne par y_{ij} le poids, à l'apparition des pattes arrière, de l'individu de la famille n° i, provenant du bac n° j. Ce poids se décompose en un certain nombre d'écarts à la note moyenne générale μ , quantifiant l'influence de l'effet étudié (Type de famille), de l'effet contrôlé Bac ainsi que de leurs interactions.

Le modèle est donné par l'équation 1 : $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha.\delta_{ij} + \varepsilon_{ij}$

où α_i : Mesure l'écart induit par le type de famille n° i. Par définition α_i est centré. L'effet Type de famille est un **effet fixe étudié**. ($\alpha_1 + \dots + \alpha_{10} = 0$)

β_j : Mesure l'écart spécifique du bac n° j. Le bac est considéré comme un **facteur à effets aléatoires** : les bacs sont supposés être représentatifs d'une population de familles.

$\alpha.\delta_{ij}$: Mesure l'écart d'interaction "Type de famille*Bac" qui exprime que la différence sur le poids à l'apparition des pattes arrière entre 2 types de famille dépend du bac. Cet effet est aléatoire à cause du caractère aléatoire du bac et à cause de la randomisation des types de famille entre les bacs.

Enfin, ε_{ij} : Appelé "erreur", ce terme mesure l'écart entre le poids donné à l'unité expérimentale ij et la note prédite par le modèle.

Le modèle contient donc un effet fixe étudié : le Type de famille et 2 effets aléatoires contrôlés : le Bac et l'interaction "Famille*Bac". C'est un modèle **mixte**

- Etude de la variation phénotypique en fonction de la variation génotypique

L'objectif de cette étude est d'évaluer la corrélation entre les variables phénotypiques (poids et survie) et les variables génotypiques (HML , f et r). Les variables génotypiques ne possèdent pas une distribution normale ainsi l'utilisation d'un test non paramétrique est nécessaire. L'étude se fait par l'étude du coefficient de corrélation de Spearman (**Boite 4**) entre les différentes variables.

Boite 4 : Coefficient de corrélation de Spearman

Le coefficient de corrélation de Spearman permet d'estimer le degré de liaison ou d'interdépendance entre deux variables quantitatives. Il est l'équivalent non paramétrique du coefficient de corrélation de Pearson. Cependant, contrairement à ce dernier, ce n'est pas seulement la relation linéaire qui est étudiée mais toute relation monotone croissante ou décroissante, linéaire ou non. La corrélation de Spearman (r_s) indique le degré de liaison existant entre le classement des éléments selon la variable x et le classement des éléments selon y : $r_s = 1$ si les classements de x et de y sont identiques, $r_s = -1$ si les classements sont complètement inversés, $r_s = 0$ si les deux variables sont indépendantes et l'ordre de classement selon x et y est aléatoire. Toute autre valeur de r_s indique qu'il y a une relation monotone entre les deux variables

Le coefficient de corrélation de Spearman est défini par la formule suivante :

$$r_s = 1 - 6 \left(\frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{n(n^2 - 1)} \right)$$

n = Effectif de la population, d_i = différence entre les rangs des $i^{\text{ème}}$ éléments de la variable x et de la variable y

Une fois le coefficient de corrélation calculée, il est nécessaire de vérifier si la valeur prise est significativement différente de 0.

RESULTATS

1. Description de la variabilité génétique entre les familles

Pour tester la différence de variabilité génétique entre les familles, nous utilisons un test de Kriskal – Wallis.

Ce test, version non – paramétrique de l’ANOVA, permet de comparer les médianes de k populations.

Peut-on affirmer, au seuil de 5%, qu’il y a une différence dans la variabilité entre les familles ?

Les hypothèses statistiques sont :

H_0 : les médianes au sein de chacune des 10 familles sont les mêmes (il n’y a pas de différence)

H_1 : les médianes ne sont pas les mêmes (il y a une différence)

Les résultats apparaissent sur le **tableau II**

	Valeur de la stat de Kriskal-Wallis	Nombre de df	P-value
f	24.0	9	0.0044
vf	16.9	9	0.0498
MLHns	22.5	9	0.0074
MLHs	23.6	9	0.005
Rxy	58.0	9	<.0001

Tableau II : Résultats de la différence de variabilité génétique entre les familles.

La règle de décision du test est : si la probabilité associée à chacun des tests est inférieure au seuil du test (nous nous sommes fixés un seuil de 5%), nous rejetons H_0 et nous favorisons l’hypothèse alternative H_1 .

Les résultats montrent que, pour chacune des variables de variabilité génétique considérées, la probabilité associée au test est inférieure à 5%. Nous favorisons donc l’hypothèse alternative H_1 et nous concluons qu’il existe une différence significative de variabilité génétique entre les familles.

Remarque : la population sur laquelle à été effectuée ces tests est celle du répliquat 1.

2. Description de la variabilité phénotypique entre les familles

Après avoir testé la différence de variabilité génétique entre les familles, nous nous sommes intéressés à la différence de variabilité phénotypique. La démarche adoptée est identique.

Les résultats apparaissent sur le **tableau III**.

	Valeur de la stat de Kriskal-Wallis	Nombre de df	P-value
poids apparition pattes avant	39,3	9	<.0001
poids apparition pattes arrière	29,4	9	0,0006
duree de metamorphose	43,6	9	<.0001
prop d'individus metamorphosés	58,0	9	<.0001
P(80)	58,0	9	<.0001

Tableau III : Résultats de la différence de variabilité phénotypique entre les familles.

Les résultats montrent que, pour chacune des variables de variabilité phénotypique considérées, la probabilité associée au test est très inférieure à 5%. Nous favorisons donc l'hypothèse alternative H1 et nous concluons qu'il existe une différence très significative de variabilité phénotypique entre les familles. Remarque : la population sur laquelle a été effectuée ces tests est celle du répliquat 1.

3. Variabilité génétique et survie

3- Différence de survie entre les familles

Afin de comparer la durée de survie des individus de chacune des différentes familles, le modèle de Cox a été choisi.

Le modèle de Cox permet de différencier les familles en fonction de leur temps de métamorphose. En effet, les individus censurés seront ceux dont la phase de métamorphose (apparition des pattes arrière ou apparition des pattes avant) n'est pas survenue

L'objectif est donc, dans un premier temps, d'estimer les durées de survie des individus de chacune des 10 familles puis, de tester s'il existe une différence significative entre les différentes familles relativement à leur courbe de survie.

Le graphique (**Figure 15**) figurant sur la page de gauche trace les probabilités de survie des différentes familles sur la totalité de l'échantillon (*i.e.* tous les répliquas). Au vu de ce graphique, il semble en effet y avoir une influence de l'appartenance à une famille donnée sur la durée de survie des individus.

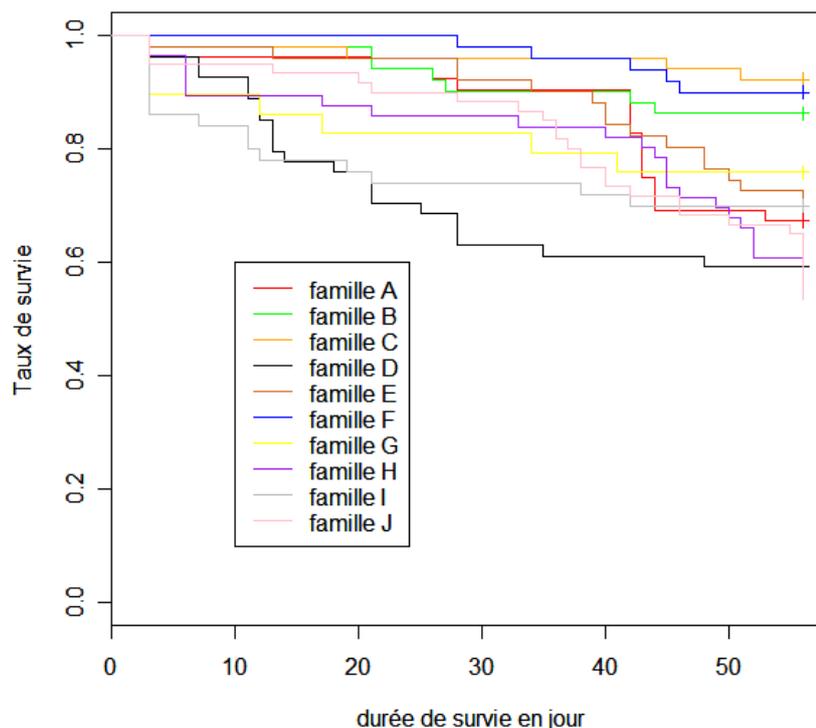


Figure 15 : Courbe de survie des têtards en fonction de la famille

Cependant, il ne s'agit que d'une observation graphique ; afin de pouvoir valider cette hypothèse, il est nécessaire de tester la significativité, dans le modèle de Cox, de la variable famille.

La probabilité associée au test de significativité (test de vraisemblance = 46,2 avec un ddl = 9) de la variable famille est strictement inférieure à 5% ($p = 5,48 \cdot 10^{-9}$). On rejette donc l'hypothèse nulle de nullité du coefficient associé à cette variable, et concluons que la variable famille à un effet significatif sur la durée de survie des individus.

Il existe une différence significative entre la probabilité de survie des différentes familles.

Les données sur lesquelles se base l'étude précédente rassemblent la totalité de l'échantillon. Les données qui ont pu être génotypées ne concernent que le répliquat 1 (bac1). Ainsi, les corrélations entre la survie et l'hétérozygotie se feront sur la survie des individus du bac 1.

Nous avons donc réédité l'étude précédente c'est-à-dire l'estimation des durées de survie des individus de chacune des 10 familles puis, tester s'il existe une différence significative entre les différentes familles relativement à leur courbe de survie mais en se restreignant, dans chacune des familles, aux individus du répliquat 1.

Le graphique (**Figure 16**) trace les probabilités de survie des différentes familles restreintes aux individus du répliquat 1.

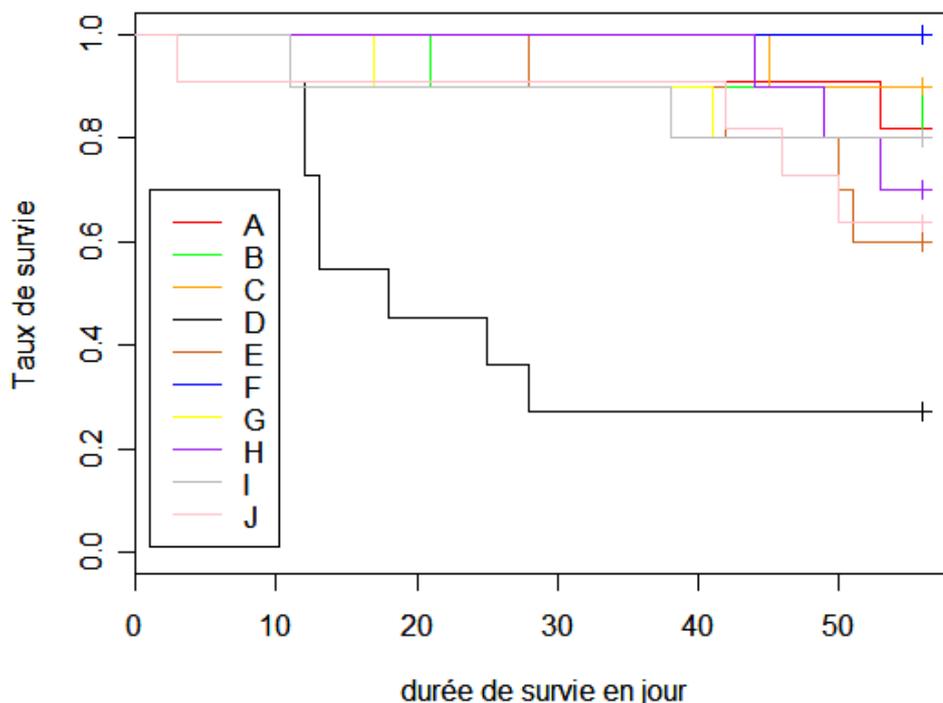


Figure 16 : Courbe de survie des têtards en fonction de la famille (individus du répliquat 1)

Comme précédemment, au vu de ce graphique, il semble en effet y avoir une influence de l'appartenance à une famille donnée sur la durée de survie des individus.

On remarque que, à la différence du test précédent mené sur 504 individus, ce test est mené sur 103 individus. La probabilité associée au test de significativité (test de vraisemblance = 23,8 avec un ddl = 9) de la variable famille est strictement inférieure à 5% ($p = 0,00463$).

On rejette donc l'hypothèse nulle de nullité du coefficient associé à cette variable, et concluons que la variable famille a un effet significatif sur la durée de survie des individus, et ce en se restreignant, dans chacune des familles, aux individus du répliquat 1.

Il existe une différence significative de survie entre les familles au sein du répliquat 1.

Le modèle de Cox permet de calculer une probabilité de demi-vie ($P(50)$). En effet, cette probabilité estime le nombre de jour de la demi-vie d'un individu. La plupart des têtards étaient encore vivant en fin d'expérience, ainsi, il n'a pas été possible de définir la $P(50)$ puisque les courbes de survie ne passent pas par cette horizontale ; par contre nous avons défini la $P(80)$ correspondant au temps de 1/5 de vie. Cette valeur, pour chaque famille, sera étudiée en fonction de la variabilité génétique de ces mêmes familles dans la partie : corrélation variabilité génétique – variabilité phénotypique.

4- Corrélation Survie – variabilité génétique

Présentant une tendance de plusieurs variables susceptibles d'influencer les courbes de survie (**Tableau IV**), les familles ont été rassemblées en deux groupes, les familles possédant une variable supérieure à la variable moyenne (variable calculée sur l'ensemble du répliquat) et les familles possédant une variable inférieure à la variable moyenne.

Famille	D	E	J	H	I	G	A	B	C	F	moyenne
nombre d'individu	3	3	3	3	7	8	7	9	9	10	6,2
f	0,970	0,077	0,689	0,568	-0,040	0,065	-0,044	-0,309	-0,292	-0,006	0,168
MLHs	0,117	0,739	0,389	0,175	0,683	0,656	0,667	0,843	1,123	0,596	0,599
r(xy)	-0,106	-0,215	-0,231	-0,251	0,013	-0,145	-0,150	-0,198	-0,111	-0,136	-0,153
Fis	0,191	-0,214	0,107	0,286	-0,292	-0,007	-0,384	-0,498	-0,503	-0,176	-0,149

Tableau IV : Moyenne des variables génotypiques en fonction de la famille

Comme précédent on construit un modèle de Cox sur chacun de ces deux groupes de familles.

Le tableau ci dessous montre le test de la significativité, dans le modèle de Cox, de la survie des familles regroupées en fonction de la variabilité génétique.

	coef	exp(coef)	se(coef)	z	p	Test de vraisemblance	df	p	n
f	-1,17	0,312	0,38	-3,07	0,0021	9,17	1	0,00246	103
HMLs	0,993	2,7	0,388	2,56	0,01	6,77	1	0,00928	103
r	0,211	1,24	0,379	0,558	0,58	0,31	1	0,578	103

Significatif à 5

La probabilité associée au test de significativité (test de vraisemblance = 9,17 et 6,77 avec des degrés de liberté = 1 pour la consanguinité et HMLs respectivement) de la variable famille est strictement inférieure à 5% ($p = 0,00246$ et $0,00928$). On rejette donc l'hypothèse nulle d'égalité des deux courbes de survie dans le cas de ces deux variables.

Il existe une différence significative de survie. La probabilité de survie varie donc en fonction de la consanguinité et de l'HMLs.

Comme précédemment, au vu de ce tableau, il semble en effet y avoir une influence de l'HMLs et de la consanguinité (f) sur la durée de survie des individus. En effet, on constate que les courbes de survie des deux groupes pour chacune des variables semblent différentes (**Figures 17 et 18**)

L'augmentation de la consanguinité entraîne une diminution de survie et l'augmentation de l'HML entraîne une augmentation de la survie dans la famille.

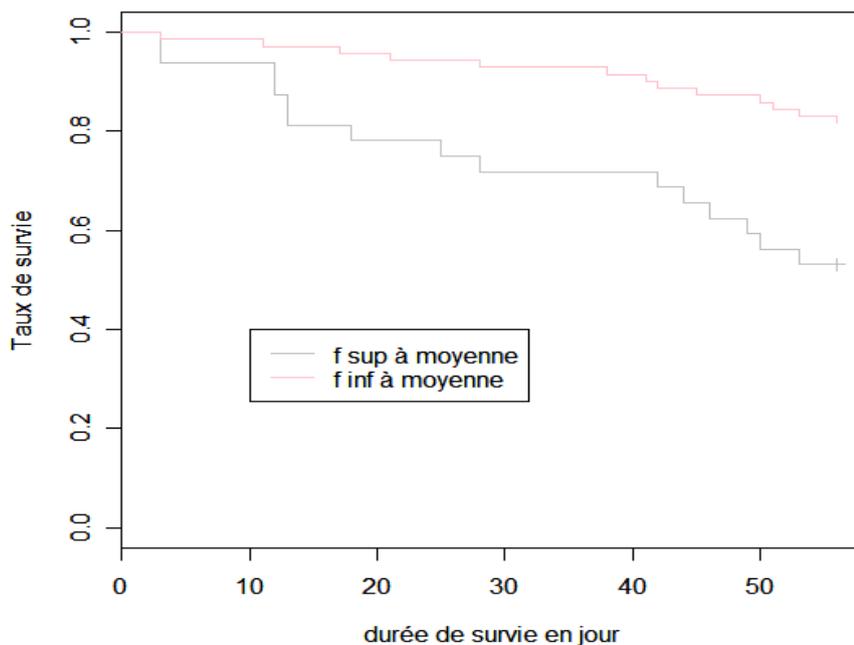


Figure 17 : Courbe de survie des têtards en fonction de la famille – les familles ont été regroupées en fonction de leur consanguinité moyenne - f (individus du répliquat 1)

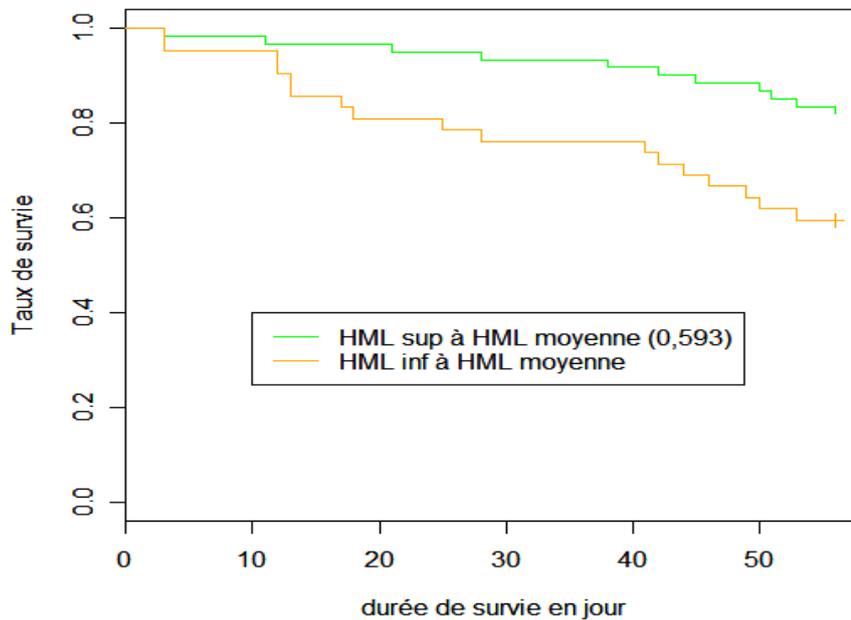


Figure 18 : Courbe de survie des têtards en fonction de la famille – les familles ont été regroupées en fonction de leur HML moyenne (individus du répliquat 1)

Corrélation temps de métamorphose – variabilité génétique

Le modèle de Cox permet de différencier les familles en fonction de leur temps de métamorphose. En effet, les individus censurés seront ceux dont la phase de métamorphose (apparition des pattes arrière ou apparition des pattes avant) n'est pas survenue.

3. Durée pour l'apparition des pattes arrière

Le temps mis pour que les pattes arrière apparaissent chez un individu est une durée, ainsi le modèle de Cox s'impose de nouveau pour l'étude de ce phénomène.

De manière analogue à l'étude de durée de survie, dans le cas de l'estimation de la probabilité d'apparition des pattes arrière, l'unique facteur de risque est la famille.

L'objectif est donc, dans un premier temps, d'estimer les durées d'apparition des pattes arrière des individus de chacune des 10 familles puis, de tester s'il existe une différence significative entre les différentes familles relativement à leur durée d'apparition des pattes arrière.

Le graphique (**Figure 19**) trace les probabilités d'apparition des pattes arrière des différentes familles. Au vu de ce graphique, il semble en effet y avoir une influence de l'appartenance à une famille donnée sur la durée d'apparition des pattes arrière.

Cependant, il ne s'agit que d'une observation graphique ; afin de pouvoir valider cette hypothèse, il est nécessaire de tester la significativité, dans le modèle de Cox, de la variable famille.

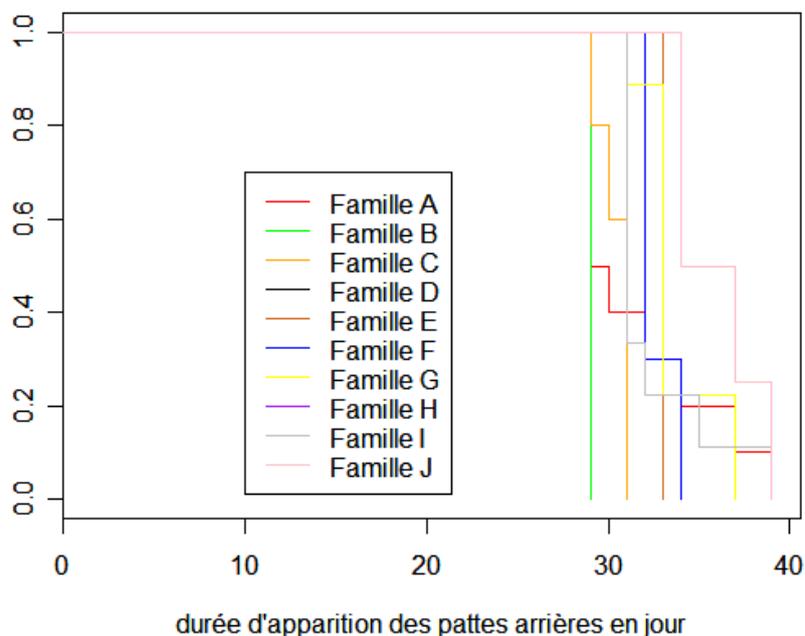


Figure 19 : Courbe de temps d'apparition des pattes arrières survie des têtards en fonction de la famille (individus du répliquat 1).

La probabilité associée au test de significativité (test de vraisemblance = 58,6 avec un ddl = 9) de la variable famille est strictement inférieure à 5% ($p = 2,44 \cdot 10^{-9}$). On rejette donc l'hypothèse nulle de nullité du coefficient associé à cette variable, et concluons que la variable famille à un effet significatif sur la durée d'apparition des pattes arrière.

Il existe une différence significative entre les durées d'apparition des pattes arrière des différentes familles.

4. Durée pour l'apparition des pattes avant

Le modèle de Cox n'a pu être utilisé car le nombre de donnée dans certaines familles n'était pas assez important.

E- Corrélation entre le poids et la variabilité génétique

3. Poids des individus à l'apparition des pattes arrière

- Poids général

Afin de déterminer s'il existe une différence entre les familles relativement aux poids des pattes arrière nous avons mis en place un modèle mixte. Le modèle ainsi que l'ensemble des considérations statistiques sont exposés et développés dans la partie méthode afin de ne pas alourdir la rédaction.

L'estimation de ce modèle est donnée par la sortie donnée dans le **Tableau V** :

Remarque : Le graphe des résidus associés au modèle montre qu'ils sont répartis aléatoirement dans le plan, ce qui garantit la validité du modèle.

Linear mixed-effects model fit by REML					
		(Intercept)		Residual	
		StdDev: 0.02051633		0.1503403	
Fixed effects: poids ~ famille					
	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	0.8442591	0.02422807	379	34.84632	0.0000
familleB	0.0239064	0.03170321	379	0.75407	0.4513
familleC	-0.0175291	0.03104526	379	-0.56463	0.5727
familleD	-0.0311387	0.03549736	379	-0.87721	0.3809
familleE	-0.1491928	0.03152560	379	-4.73243	0.0000
familleF	-0.0539545	0.03153382	379	-1.71100	0.0879
familleG	-0.0327571	0.04796728	379	-0.68290	0.4951
familleH	-0.1846295	0.03187792	379	-5.79177	0.0000
familleI	-0.0800158	0.03190371	379	-2.50804	0.0126
familleJ	-0.1400620	0.03523144	379	-3.97548	0.0001

Tableau V : Résultat de l'étude du poids à l'apparition des pattes arrière en prenant en compte l'effet répliquat.

Nous pouvons donc conclure qu'il existe une différence significative entre les familles en fonction du poids à l'apparition des pattes arrière et ce en prenant en compte l'effet répliquat.

- Poids des individus du répliquat 1

La corrélation entre la variabilité génétique et la variable poids à été développée dans la partie : corrélation variabilité génétique – variabilité phénotypique.

4. Poids des individus à l'apparition des pattes avant

- Poids général

Comme précédemment, et afin de déterminer s'il existe une différence entre les familles relativement aux poids des pattes avant nous avons mis en place un modèle mixte. Le modèle utilisé est analogue au modèle précédent où le poids utilisé est le poids à l'apparition des pattes avant.

L'estimation de ce modèle est donnée par le **Tableau VI**

Linear mixed-effects model fit by REML					
	(Intercept)		Residual		
	StdDev: 5.940518e-06		0.1223432		
Fixed effects: poids ~ famille					
	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	0.6766897	0.02271856	253	29.785769	0.0000
familleB	-0.0386431	0.02939766	253	-1.314497	0.1899
familleC	-0.0780078	0.02926280	253	-2.665768	0.0082
familleD	0.0150303	0.03338932	253	0.450154	0.6530
familleE	-0.1462281	0.04083511	253	-3.580941	0.0004
familleF	-0.0489599	0.03034253	253	-1.613574	0.1079
familleG	0.1376437	0.04199350	253	3.277738	0.0012
familleH	-0.0178772	0.03810018	253	-0.469215	0.6393
familleI	-0.0679674	0.03052714	253	-2.226459	0.0269
familleJ	-0.0496897	0.04199350	253	-1.183270	0.2378

Tableau VI : Résultat de l'étude du poids à l'apparition des pattes avant arrière en prenant en compte l'effet répliquat.

Remarque : Le graphe des résidus associés au modèle montre qu'ils sont répartis aléatoirement dans le plan, ce qui garantit la validité du modèle.

Nous pouvons donc conclure qu'il existe une différence significative entre les familles en fonction du poids à l'apparition des pattes avant et ce en prenant en compte l'effet répliquat.

- Poids des individus du répliquat 1

La corrélation entre la variabilité génétique et la variable poids a été développée dans la partie : corrélation variabilité génétique – variabilité phénotypique.

F- Corrélation entre les variables représentatives de la valeur sélective chez les têtards et les différentes variables associées à l'hétérozygotie

Afin d'estimer le degré de liaison ou d'interdépendance entre les variables représentatives de la valeur sélective chez les têtards et les différentes variables associées à l'hétérozygotie, nous calculons le coefficient

de corrélation de Spearman entre chacune de ces variables puis nous testerons la significativité de ce coefficient.

Les hypothèses statistiques sont :

H_0 : Le coefficient de corrélation de Spearman est nul.

H_1 : Le coefficient de corrélation n'est pas nul ; il existe une relation entre les deux variables.

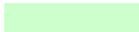
La règle de décision du test est : si la probabilité associée à chacun des tests est inférieure au seuil du test (nous nous sommes fixés un seuil de 10%), nous rejetons H_0 et nous favorisons l'hypothèse alternative H_1 . Nous concluons alors que le coefficient de corrélation de Spearman est significativement différent de 0, il existe donc une relation monotone (croissante ou décroissante selon le signe du coefficient) entre les deux variables.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	poids avant	Significativité	poids arrière	Significativité	duree de metam	Significativité
reg(f)	0,06208	0,6405	-0,21853	0,0964	0,39629	0,0019
MLHs	-0,16036	0,225	0,12328	0,3522	-0,29141	0,0251
Rxy	-0,36167	0,0049	0,19615	0,1365	-0,21874	0,096

	prop d'ind metam	Significativité	P(80)	Significativité
reg(f)	-0,32147	0,013	-0,531	<0,001
MLHs	0,24576	0,0606	0,415	0,001
Rxy	0,4123	0,0012	0,294	0,024

 Significatif à 5%

 Significatif à 10%

Les résultats du test de nullité du coefficient de Spearman, il existe une relation entre f et

- le poids des têtards à l'apparition des pattes arrière ; lorsque f augmente, le poids à l'apparition des pattes arrière diminue
- la durée de métamorphose, lorsque f augmente, la durée de métamorphose augmente
- la proportion d'individus métamorphosés, lorsque f augmente, la proportion d'individus à la métamorphose diminue.
- et P (80), lorsque f augmente, P (80) diminue donc la probabilité de survie diminue.

De façon générale, lorsque le coefficient de consanguinité augmente, il y a une diminution de des variables liées à la valeur sélective.

Le test de nullité du coefficient de Spearman montre une relation entre l'HMLs et :

- la durée de métamorphose : lorsque l'HML ns augmente, la durée de métamorphose diminue ;

- la proportion d'individus métamorphosés : lorsque l'HML augmente, la proportion d'individus métamorphosés augmente ;

- P (80) : lorsque l'HLM augmente, le P (80) augmente et donc la survie augmente ;

Ainsi, lorsqu'il y a une augmentation de l'hétérozygotie, les variables liées à la valeur sélective augmentent.

Il y a donc bien une corrélation hétérozygotie valeur sélective.

Enfin lors de l'étude de la relation entre le coefficient d'apparentement et les variables de valeur sélective, on observe que :

Le test de nullité du coefficient de Spearman montre une relation entre r et :

- le poids à l'apparition des pattes avant : lorsque le coefficient augmente, le poids à l'apparition des pattes avant diminue ;

- la durée de métamorphose : lorsque le coefficient augmente, la durée de métamorphose diminue ;

- la proportion d'individus métamorphosés : lorsque le coefficient augmente, la proportion d'individus métamorphosés augmente ;

- P (80) : lorsque le coefficient augmente, P (80) diminue, donc la survie diminue.

L'importance de l'apparentement entre individus peut générer une diminution des variables de survie et de valeur sélective, de façon générale. Par contre, l'augmentation du nombre d'individus métamorphosé n'est pas vraiment explicable.

Les résultats montrent qu'il existe un impact sur la valeur sélective de la consanguinité, donc les familles de *Rana dalmatina* subissent les conséquences de la dépression de consanguinité.

DISCUSSION

Le premier objectif de cette étude est de vérifier l'existence d'une dépression de consanguinité en estimant la corrélation entre la valeur sélective individuelle et l'hétérozygotie puis la corrélation entre la valeur sélective et l'apparentement des individus, et en analysant la paternité des couples reproducteurs. Ces estimations permettront d'évaluer l'importance de la dépression de consanguinité au sein d'individus provenant, dans un premier temps, de fécondations artificielles dont les parents ont été choisis en fonction de leur coefficient d'apparentement, puis d'individus provenant de familles différentes de la même population.

Le deuxième objectif tend à évaluer l'importance de l'évitement de la consanguinité au sein de couples reproducteurs en comparant le coefficient d'apparentement de ces couples et en estimant l'importance de la dépression de consanguinité.

L'étude de l'importance de la dépression consanguine des têtards en fonction de l'apparentement des couples reproducteurs, ainsi que l'étude de l'évitement de l'apparentement sur des couples prélevés dans la nature, a nécessité la fécondation artificielle entre individus en fonction de leur coefficient d'apparentement, et donc, préalablement génotypés.

La fécondation artificielle n'a pas donné les résultats escomptés. En effet, aucun des œufs fécondés n'a éclos. Ainsi, l'étude de l'apparentement des parents ainsi que l'étude de l'évitement de la consanguinité n'ont pu être menées. Après fécondation, les différentes solutions spermatiques ont été observées au microscope et des spermatozoïdes vivants ont été observés, ainsi, l'absence d'éclosions résultats ne semble pas être liée à des individus stériles. Les installations disponibles en animalerie nous ont contraint à conserver les pontes dans des seaux à 18°C. La grenouille agile possède une reproduction précoce qui se situe vers la fin du mois de février et le début du mois de mars ; la température de l'eau à cette période est peu élevée (~4°C). Des études montrent que la température a une influence sur le développement de têtards et notamment, le taux de croissance est corrélé avec la température (Morand *et al.*, 1997 ; Olsson & Uller, 2002 ; Lindgren & Laurila, 2005) avec une température optimale située autour de 10°C. Enfin, des pontes déposées dans des seaux à l'extérieur ont montré un développement beaucoup plus long mais aussi un taux de fécondation plus important. Ainsi, il est possible que l'échec de la fertilisation artificielle soit lié à une température élevée et une absence de variation de température entre le jour et la nuit. Des études plus approfondies sur le développement embryonnaire des grenouilles permettraient d'expliquer cet échec.

Le régime de reproduction de consanguinité augmente le niveau d'homozygotie sur la totalité du génome, ce qui tend à diminuer la valeur sélective par l'expression d'allèles récessifs délétères et la perte de l'avantage des hétérozygotes. Ainsi, de nombreuses études ont montré une diminution de la valeur des traits associés à

la valeur sélective chez les individus pourvus d'un coefficient de consanguinité important (Hanson & Westerberg, 2002).

Un des objectifs de cette étude est de tester l'existence d'une corrélation hétérozygotie– valeur sélective à un stade précoce du cycle de vie afin d'évaluer l'importance de la dépression de consanguinité sur différentes familles d'une population de *Rana dalmatina*

L'étude menée tend à montrer qu'il existerait une corrélation positive variabilité génétique – valeur sélective chez *Rana dalmatina*.

Lorsque les pontes ont été prélevées dans la nature, la date de ponte exacte n'était pas connue puisque le suivi de la reproduction n'a pu être fait. Le biais apporté par ce manque de précision quant à l'âge des pontes a été limité par l'observation de celles-ci (les pontes âgées se différencient par la présence d'une pellicule de sédiment et d'algues à leur surface) ; de plus, l'éclosion de tous les œufs s'est faite en l'espace de 24h, ce qui renforce l'hypothèse de l'homogénéité de l'âge des individus étudiés.

Les résultats montrent qu'il existe une différence significative entre les familles en termes de survie des individus. Le regroupement des familles en fonction de leur HML et de leur consanguinité montre que les individus possédant une HML (hétérozygotie multi locus) plus importante survivent plus longtemps et que les individus possédant une consanguinité plus importante survivent moins longtemps dans des conditions standards. Cette hypothèse a été confirmée lors de l'étude du temps de vie de 1/5^{ème} de vie P (80). En effet, il existe une corrélation entre l'augmentation de l'HML et l'augmentation de la survie.

La survie a été, de plus, corrélée à la totalité des variables de croissance et de développement des têtards. En effet, l'augmentation de la consanguinité (f), de la variance de la consanguinité (vf), ainsi que du coefficient d'apparentement de Lynch et Ritland (r) sont corrélés positivement avec une diminution de la survie dans les populations (P₍₈₀₎).

Il existe alors une relation significative entre la survie des populations et l'hétérozygotie. L'augmentation de l'hétérozygotie au sein de la famille, ainsi que ou via la diminution de l'influence du fardeau génétique (diminution de la consanguinité, de la l'apparentement donc de l'association d'allèles délétères récessives) génère une augmentation appréciable (475% -P₍₈₀₎ min=12, P₍₈₀₎ max = 57) de la survie dans le cas du développement larvaire.

L'étude des variables liées à la valeur sélective permet en effet de définir la valeur sélective à plus long terme. En effet, les modèles de survie post métamorphose et de croissance, notamment chez les grenouilles vertes, montrent qu'une taille importante à la métamorphose tend à augmenter la survie, et les métamorphoses précoces augmentent la croissance future des individus. Ainsi, les métamorphoses précoces avec une taille importante, et donc un développement larvaire rapide, génèrent une survie et une croissance plus importantes après la métamorphose, et donc à une probable valeur sélective plus importante (Altwegg & Reyer, 2003).

Par conséquent, l'influence positive de l'HML sur la proportion d'individus développés et la corrélation négative entre cette même variable et la durée de la métamorphose permet de faire l'hypothèse que

l'augmentation de l'hétérozygotie au sein d'une population génère une augmentation de la valeur sélective au stade adulte. La durée de métamorphose diminue en fonction de l'importance de la consanguinité et de l'apparentement entre les individus ; ainsi, l'influence de la dépression consanguine peut amener à limiter la valeur sélective d'individus adulte, ajouté à l'augmentation de la mortalité chez les têtards.

En comparaison avec l'étude de la corrélation entre les différentes variables, la durée de métamorphose et la survie, les résultats obtenus sur l'étude de la corrélation entre les poids à l'apparition des pattes avant et arrière ne sont pas concluants. L'absence de résultats significatifs ne permet donc ni d'affirmer ni d'infirmer une relation. Il existe plusieurs hypothèses explicatives de cette absence de résultats. Comme décrit précédemment, même si le poids peut être un composant de la valeur sélective chez les grenouilles vertes, cette étude n'a pas été menée chez la grenouille agile. De plus, lors de l'expérimentation, la densité des têtards au sein des bacs a changé en fonction de la mortalité puisque défini à 10 têtards par bac au départ. Il existe une influence significative de la densité sur la croissance des têtards (Loman, 1999). Par conséquent, cette circonstance est susceptible d'avoir influencé l'étude et générer l'absence de résultats significatifs sur ces variables. L'étude génétique ne concerne que le répliquat 1 ; ainsi, le manque de données peut alors expliquer l'absence de résultats significatifs.

De façon générale, l'étude de la totalité des génotypes corrélés avec les variables liées à la valeur sélective sur l'ensemble des 10 familles permettrait de confirmer la corrélation déjà affirmée, limiter l'influence de l'effet densité et de l'effet répliquat. L'augmentation de la quantité de données pourra limiter l'influence des données aberrantes et ainsi avoir des variables normalisées qui permettront l'utilisation de corrélations par des tests statistiques paramétriques.

Les résultats de cette étude montrent une tendance générale pour une corrélation positive entre la valeur sélective à court terme (survie post-métamorphique) et à long terme (relation entre variables morphologiques et survie au stade adulte) et la variabilité génétique des individus. Il semble exister alors un effet de **surdominance associative à effet général** sur les 10 familles de *Rana dalmatina*. Selon cette hypothèse, l'HML peut reflète la variation dans le coefficient de consanguinité et peut être associé à la valeur sélective *via* les effets de l'homozygotie sur les locus dispersés sur le génome. La limite de cette conclusion est liée à la quantité de marqueurs. Les marqueurs très variables (cas des microsatellites) sont les meilleurs estimateurs de la consanguinité et donc, ils montrent une surdominance associative plus importante. Par contre, l'approximation de l'autozygotie du génome et la corrélation entre l'hétérozygotie et la valeur sélective sont plus importants dans le cas d'une étude avec un nombre important de marqueurs (Bierne *et al.*, 2000). Dans le cas de cette étude, même si 27 marqueurs ont été utilisés, seulement 4 se sont avérés polymorphes. Subséquemment, il est important de définir (par amplification croisée ou l'utilisation d'autres types de marqueurs) une quantité de locus polymorphes plus important afin de renforcer ces résultats.

Pourtant, l'hypothèse de la surdominance associative à effet général n'est qu'une des trois hypothèses qui prévalent pour l'explication de la corrélation hétérozygotie - valeur sélective. Dans la deuxième hypothèse, appelée **hypothèse de l'effet direct ou hypothèse de la surdominance fonctionnelle**, l'avantage des hétérozygotes provient de la surdominance fonctionnelle (Hanson & Westerberg, 2002). En effet, la surdominance fonctionnelle se produit lorsque les individus qui sont hétérozygotes pour les marqueurs ont une valeur sélective intrinsèque supérieure à celle des homozygotes.

Un des mécanismes suggérés pour expliquer ce phénomène, dans les études d'allozymes, est que les systèmes biologiques seront plus efficaces chez les hétérozygotes que chez les homozygotes, en raison des propriétés des combinaisons catalytiques des différents enzymes chez les hétérozygotes (Mitton 1997 *in* Hanson & Westerberg, 2002). Ainsi, l'hypothèse de l'effet direct est particulièrement importante dans le cas d'études sur les allozymes, et moins dans celles utilisant des marqueurs de l'ADN non codants, tels que les microsatellites. Ce scénario est considéré dans le cas d'études où la totalité du modèle des propriétés enzymologiques est connu comme le phosphoglucose isomérase des papillons *Cotias* (Mitton 1998). Enfin, l'**hypothèse de la surdominance associative – effet local** où l'avantage apparent des hétérozygotes résulte de l'homozygotie sur des locus proches liés à la valeur sélective. Cette hypothèse est valable lorsqu'il existe un déséquilibre de liaison ou déséquilibre de la phase gamétique (*i.e.* association non aléatoire d'allèles à différents locus dans les gamètes) qui peut être attendus dans des populations qui ont subi un goulot d'étranglement puis une nouvelle expansion. Le déséquilibre de liaison est aussi attendu dans le cas de dérive génétique dans des petites populations (Houle 1989) et de la sélection. Dans des niveaux importants de déséquilibre de liaison, les marqueurs vont être associés avec les locus liés à la valeur sélective, et montrent, de façon hypothétique, une surdominance sur ces locus liés (David, 1998). Inversement, selon Bierne (2000), le système de reproduction (surdominance associative à effet direct) et la liaison (surdominance associative à effet local) ne devraient pas être considérés comme deux hypothèses différentes de l'avantage d'hétérozygotie. En effet, les deux agissent par l'augmentation de la variance au niveau du coefficient de consanguinité individuel. La surdominance associative existe alors quelle que soit la structure et/ou la dynamique de la population (Bierne *et al.*, 2000).

De nombreuses études valident des résultats pour l'une des trois hypothèses (Hansson & Westerberg, 2002). Dans le cas de la surdominance directe, la corrélation hétérozygotie – valeur sélective ne devrait pas être exprimée par des marqueurs neutres (microsatellites) mais seulement par des marqueurs touchés par la sélection (allozymes). Un avantage apparent observé chez les individus hétérozygotes devrait être, pour le coup, indépendant de l'utilisation des marqueurs génétiques utilisés (Pujolar *et al.*, 2005).

La limite de cette étude est liée à l'utilisation d'un seul type de marqueurs ; en effet, il est indispensable, pour une étude de distinction entre les différentes hypothèses de mettre en place une étude génotypique multi-locus.

Cette étude montre l'influence de la dépression de consanguinité sur la survie et la valeur adaptative de cette population. A l'inverse, la dépression d'hybridation (*i.e.* reproduction entre individus différents génétiquement), peut mener à une incompatibilité génétique parentale ; ceci résulte alors en la production d'individus possédant un phénotype intermédiaire avec une adaptation locale moins importante (Alstad & Edmunds, 1983 in Sagvik et al., 2005). Les effets de la dépression de consanguinité et d'hybridation dépendent de l'histoire de la population. Lorsqu'une population possédant un flux de gène limité, les populations sous sélection vont avoir tendance à s'adapter à leur environnement local. Ainsi, l'hybridation devrait générer des effets négatifs lors du croisement entre populations dont l'optimum d'adaptation locale diffère (Sagvik et al., 2005).

La dépression d'hybridation n'a pas été démontrée chez de nombreuses espèces ; pourtant, les populations d'amphibiens sont particulièrement isolées et petites par rapport à un autre taxon, ainsi, il est important de prendre en compte la notion d'adaptation locale lors de l'étude de la structure des populations (Newman & Squire, 2001). Les flux de gènes entre populations tendent à homogénéiser les populations, diminuer les différenciations locales et réduire les adaptations locales (Mayr, 1963 *in* Storfer, 1999). Dans le cas de l'étude de populations de *Rana latastei*, (Grenouille agile italienne) la translocation d'individus de façon à augmenter la valeur sélective de populations soumises à une dépression de consanguinité risque de générer des effets négatifs. En effet, l'homogénéisation génétique pourrait diminuer le potentiel évolutif de la population (Ficetola & De bernardi, 2005). Ainsi, les flux de gènes génèrent des compromis sur évolution adaptative relative à la survie, les traits d'histoire de vie, les comportements liés aux prédateurs, et le degré auquel chaque individu est cryptique (Storfer, 1999).

L'étude de l'importance de la dépression consanguine sur des populations doit être indispensablement liée à l'étude des flux de gènes et des adaptations locales. Dans le cas des amphibiens, où la connectivité du paysage à une importance particulière dans la survie des populations, l'étude complexe de la dépression et hybridation consanguine doit impérativement précéder toute action de conservation et d'intervention sur des populations apparemment en voie de disparition.

Notre étude peut constituer le préliminaire d'une étude générale qui tend à étudier les flux de gènes liés à la connectivité du paysage dans des écosystèmes de plus en plus urbanisés.

BIBLIOGRAPHIE

- **Altweg R. & Reyer, H. U. 2003.** Pattern of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *The society for the Study of Evolution*. **57**(4):872-882.
- **Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N & Bonhomme F, 2002.** Genetix v. 4.03, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- **Belkir K, Castric V, Bonhomme F, 2002.** IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes* **2** : 611-614.
- **Bensch et al 1994** Genetic similarity between parents predicts hatching failure – non-incestuous inbreeding in the great reed warbler. *Evolution* **48**:317-326
- **Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y., Bonhomme F., 1998.** Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* Larvae. *Genetics* **148**:1893-1906.
- **Coltman D.W, Pilkington, J. G., Smith, J. A., Pemberton, J. M. 1999.** Parasite-mediated selection against inbred soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* **53**(4):1259-1267.
- **Bierne N., Tristone A., David P., 2000.** An Inbreeding Model of Associative Overdominance during a population bottleneck. *Genetics* **155**: 1981-1990.
- **Creste S., Neto A.T., Figueira A., 2001.** Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant molecular biology reporter*, **19**, 299-306.
- **Driscoll D. A., 1988.** Genetic structure, metapopulation processes and evolution influence the conservation strategies for two endangered species. *Biological Conservation*. **83**(1) 43-54.
- **Duguet R., Melki F. 2003.** Les amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. Parthénope Collection, édition biotope. 480p.
- **Ficetola G. F., De bernardi F., 2005.** Supplementation or conservation in-situ? Evidence of local adaptation in the Italian agile frog *Rana latastei* and consequences for the management of populations. *Animal conservation* **8**:33-40.
- **Hanson B., Westerberg L., 2002.** On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology* **11**: 2467-2474
- **Garner T.W.J. & Tomio G., 2001.** Microsatellites for use in studies of the Italian agile frog, *Rana latastei* (Boulenger). *Conservation Genetics*, **2**, 77-80.
- **Garner T.W.J., Pearman P.B. & Angelone S.,2004.** Genetic diversity across a vertebrate species'range: a test of the central-peripheral hypothesis. *Molecular Ecology*, **13**, 1047 - 1053.

- **Gosner, 1960.** A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**:183-190.
- Hartl D., Clark A. G, 1997. Principle of Population Genetics. ed Sinauer.
- **Houle, 1989.** Allozyme-associated heterosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **123**:789-801.
- **Keller & Waller, 2002.** Inbreeding effects in wild populations. *TRENDS in Ecology & Evolution*. **17**:230-241.
- **Koehn R. K., Dielh W.J., Scott T.M., 1988.** The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* **118**:121-130
- Kristensen & Sørensen, 2005
- **Lampert K. P., Rand A.S., Mueller U.G. Ryan M.J., 2003.** Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology* **12**, 3325–3334.
- **Launey S., Hedgecock D., 2001.** High genetic load in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* **159**:255-265.
- **Lesbarrères D., Pagano A., Lodé T., 2003.** Inbreeding and road effect zone in a Ranidae: the case of Agile frog, *Rana Dalmatina* Bonaparte, 1840. *C.R. Biologies* **326**: S68-S72.
- **Lesbarrères D., Primmer C.R., Laurila A. & Merila J., 2004.** Environmental and population dependency of genetic variability-fitness correlations in *Rana temporaria*. *Molecular Ecology*, 1-13.
- **Lindgren B., Laurila A., 2005.** Proximate causes of adaptive growth rates: growth efficiency variation among latitudinal populations of *Rana temporaria*. *Journal of Evolutionary Biology*. **18**:820-828.
- **Loman, 1999.** Early metamorphosis in common frog *Rana temporaria* tadpoles at risk of drying: an experimental demonstration. *Amphibia-Reptilia* **20**:421-430.
- **Morand A., Joly P., Grolet O. 1997** Phenotypic variation in metamorphosis in five anuran species along a gradient of stream influence. *Ecology* **320**:645-652.
- **Mitton J B, Grantm M. C., Yoshino A. M. 1998.** Variation in allozymes and stomacal size Pinyon (*Pinus edulis*, Pinaceae), associated with soil moisture. *American Journal of Botany* **85**(9) : 1262–1265.
- **Neff B.D., Pitcher T.E. 2005.** Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular ecology* **14**:19-38.
- **Newman R. A. & Squire T. 2001.** Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Biology* **10**:1087-1110.
- **Nöllert A., Nöller C., 2003.** Guide des amphibiens d'Europe. *Les guides du naturaliste*. Delachaux & Niestlé.
- **Olsson M., Uller T., 2002.** Developmental stability and architecture: a comparaison within and across thermal regimes in tadpole. *Journal of Evolutionary Biology*. **15**:625-633

- **Palo J.U., O'Hara R.B., Laugen A.T., Laurilaz A., Primmer C.R. & Merilä J.,2003.** Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection: evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. *Molecular Ecology*, **12**, 1963-1978.
- **Palo J.U., Schmeller D.S., Laurila A., Primmer C.R., Kuzmin S.L. & Merilä J.,2004.** High degree of population subdivision in a widespread amphibian. *Molecular Ecology*, **13**,2631-2644.
- **Pidancier N., Gauthier P., Miquel C. & Pompanon F.,2002.** Polymorphic microsatellite DNA loci identified in the common frog (*Rana temporaria*, Amphibia, Ranidae). *Molecular Ecology Notes*, **2**: 304-305.
- **Primmer C.R. & Merilä J.,2002.** A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics*, **3**, 445-449.
- **Primmer C.R, Landry P.A, Ranta E., Merilä J., Piironen J., Tiira K., Peuhkuri N., Pakkasmaa S., Eskelinen P., 2003.** Prediction of offspring fitness based on parental genetic diversity in endangered salmonid populations. *Journal of Fish Biology* **63**: 909-927
- **Primmer C.R., Møller A.P. & Ellegren H. 1996.** A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, **5**, 365-378.
- **Pujolar J.M, Maes G.E, Vancoillie C., Volckaert F.A.M., 2005.** Growth rate correlates to individual heterozygosity in the European Eel, *Anguilla L.* *Evolution* **59**(1):189-199
- **Pussey A., Wolf M., 1996.** Inbreeding avoidance in animals. *TREE* **11**:201-206.
- **Lynch M., Ritland K., 1999** Estimation of Pairwise Relatedness with Molecular Markers. *Genetics* **152**: 1753-1766.
- **Rowe G. & Beebee T.J.C., 2001.** Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the common frog *Rana temporaria*. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 6-7.
- **Sagvik J., Uller T., Olson M. 2005.** Outbreeding depression in the common frog *Rana temporaria*. *Conservation Genetics* **6**:205-211.
- **Slate J., Pemberton J.M, 2002.** Comparing molecular measures for detecting inbreeding depression. *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 20-31
- **Storfer A., 1999.** Gene flow and local adaptation in a sunfish-salamander. *Behavioural Ecological Sociobiology* **46**:273-279.
- **Sunnuck et al., 2000.** SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* **9**:1699-1710.
- **Thelen G.C., Allendorf F.W., 2001.** Heterozygosity–fitness correlations in rainbow trout: Effect of allozymes loci or associative overdominance? *Evolution* **55**(6):1180-1187.
- **Trezenga T., Wedell N., 2000.** Genetic compatibility, mate choice and pattern of parentage: Invited review. *Molecular Ecology* **9**:1013-1027.

- **Vos C.C., Antonisse-De Jong A.G., Goedhart P.W. & Smulders M.J.M., 2001.** Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). *Heredity*, 86, 598-608.
- **Walsh PS, Metzger D, Higuchi R, 1991** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. **10**(4):506-513.