

**Analyses génétiques et analyse du substrat des rivières
pour les populations menacées de Mulettes perlières
(*Margaritifera margaritifera*) dans la région Limousin
(France)**

Rapport du 30 Mars 2014

Durée du projet : Sep. 2013 – Mars 2013

Ralph Kuehn^{1,2)} et Juergen Geist³⁾

¹⁾ Unité de Zoologie Moléculaire, Chaire de Zoologie, Département des sciences animales, Université Technique de Munich, Hans-Carl-von-Carlowitz-Platz 2, 85354 Freising, Allemagne.

²⁾ Département des Poissons, Faune sauvage et Conservation de l'Écologie, Université du Nouveau Mexique, Box 30003, MSC 4901, Las Cruces, NM 88003-8003, Etats-Unis ; Programme de Biologie Moléculaire, Université du Nouveau Mexique, Las Cruces, New Mexico, Etats-Unis.

³⁾ Unité de Système Biologique Aquatique, Département d'Écologie et Gestion des Ecosystèmes, Université technique de Munich, Mühlenweg 22, 85350 Freising, Allemagne.

Contact : **Ralph Kuehn**, Unité de Zoologie Moléculaire, Chaire de Zoologie, Département des sciences animales, Université Technique de Munich, Hans-Carl-von-Carlowitz-Platz 2, 85354 Freising, Allemagne.

E-mail: kuehn@wzw.tum.de; Tel: ++498161714608; Fax: ++498161714613

Résumé

Les Mulettes perlières (*Margaritifera margaritifera*) font parties des mollusques bivalves les plus menacés au niveau mondial. Pour l'élaboration de stratégies de conservation, la compréhension de la configuration spatiale de la diversité génétique en tant que facteur de stochasticité génétique ainsi que les facteurs environnementaux qui influent sur la fitness de la population, sont cruciales. Dans cette étude, 7 (9) populations de *M. margaritifera* de la région Limousin (France) ont été évaluées au niveau de leur diversité génétique et de leur différenciation, sur la base d'un prélèvement non légal d'hémolymphe recueillis sur des Mulettes vivantes. De plus, les propriétés du lit du cours d'eau, en tant qu'habitat majeur pour le recrutement de juvéniles, ont été étudiées.

D'après les analyses de neuf marqueurs microsatellites, la diversité génétique des populations de Mulettes perlières du Limousin est similaire à la diversité génétique observée en Europe centrale, mais beaucoup plus faible que dans la partie nord de leur aire de répartition européenne. La diversité génétique des populations de Mulettes perlières du Limousin est légèrement plus élevée que celle des populations des bassins du Rhin et de la Meuse, et des populations ibériques.. La différenciation génétique entre les populations est forte, mais indépendante des bassins versants.

Comme les conditions de circulation de l'eau dans le substrat sont souvent un facteur limitant pour le recrutement, 150 mesures de potentiel redox en eau libre et dans le lit des cours d'eau ont été effectuées pour révéler des informations sur la séparation de ces deux écotones. Un milieu en bon état présente un potentiel redox élevé et une faible variation de potentiel redox entre l'eau libre et l'eau interstitielle. Ici, dans la plupart des cas, une baisse prononcée du redox dans les 5 premiers cm du substrat a été observée, ce qui indique que ces conditions peuvent limiter le recrutement actuellement. Les taux les plus forts de potentiels redox dans le substrat coïncident avec les populations présentant une dynamique correcte.

Les résultats de cette étude suggèrent qu'il y a encore une diversité génétique importante au sein des populations de Mulettes perlières du Limousin, qui devrait être maintenue en évitant les effets de la dérive génétique et les goulets d'étranglement dans la population. Même s'il est évident que les populations possédant une grande diversité génétique et

vivant dans un milieu présentant des conditions correctes méritent une priorité en termes d'actions, les conditions défavorables du substrat doivent être prises en compte aussi pour les populations en moins bonne santé.

Introduction

Les mollusques bivalves d'eau douce (ordre des Unionoida) sont souvent considérées comme étant le groupe le plus en danger au niveau mondial (Bogan 1993; Neves et al. 1997; Lydeard et al. 2004; Strayer et al. 2004, Geist 2010; Geist 2011). Ils jouent un rôle très important dans les écosystèmes lotiques et lentiques et leur présence ou absence dans un étang ou un cours d'eau peut avoir beaucoup d'implications dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques (Vaughn et Hakenkamp 2001 ; Geist et Auerswald 2007). La Mulette perlière (*Margaritifera margaritifera*) est une des espèces les plus menacées en Europe (Geist 2010). Il y a longtemps, *M. Margaritifera* était répandue et abondante, répartie dans les zones arctiques et les régions tempérées, de la Russie de l'Ouest, à travers toute l'Europe, jusqu'au littoral Nord-Ouest de l'Amérique du Nord (Jungbluth et al. 1988). Plusieurs études ont démontré des baisses de populations spectaculaires partout dans ces régions (e.g. Bauer 1988), et l'espèce est à présent en danger critique d'extinction en Europe où il ne reste qu'un très faible nombre de populations en bon état, c'est-à-dire capable de recruter (Ziuganov 1994; Young, Cosgrove et Hastie 2001; Geist et Auerswald 2007; Geist, 2010). La pêche excessive des perles, la destruction des milieux, la pollution de l'eau, l'eutrophisation, l'acidification, les pratiques agricoles de plus en plus mécanisées et la baisse des populations des poissons hôtes sont tous des facteurs déterminants qui ont contribué au déclin des Mulettes perlières (Young et al. 2001; Geist 2010).

Les populations les plus petites sont non seulement influencées par les facteurs déterministes, mais aussi par les facteurs stochastiques. La stochasticité génétique comme la consanguinité, le manque de diversité génétique et l'accumulation de nouvelles mutations délétères ont tendance à être néfaste pour la santé des populations (Fig.1). L'ampleur de la stochasticité génétique dépend du mode de reproduction, de la structure de la population et de sa taille, et de la pression des facteurs écologiques défavorables.

Des études récentes ont prouvé que la connaissance des structures génétiques des populations de Mulettes perlières peut être très utiles pour leur conservation (Geist et al.

2003, 2008, 2010; Marchordom et al. 2003; Geist et Kuehn 2005, 2008; Bouza et al. 2007). Les plus faibles diversités génétiques et les plus fortes différenciations entre populations ont été observées dans les populations de l'extrême sud-ouest de l'aire de répartition de la Mulette perlière (Bouza et al. 2007) malgré le fait que cette région fut un refuge importante pour plusieurs espèces pendant le pic glaciaire au cours du Pléistocène (Taberlet et al. 1998, Hewitt 2000). En revanche, la diversité génétique la plus élevée a été trouvée dans les populations d'Europe du Nord et orientales. (Geist and Kuehn 2005; Geist and Kuehn 2008, Geist et al. 2010). Aucune étude n'a encore été faite sur la configuration spatiale de la diversité génétique des populations des Mulettes perlières en Limousin (France), une région qui se situe entre les populations de l'Europe centrale et du Sud-Ouest.

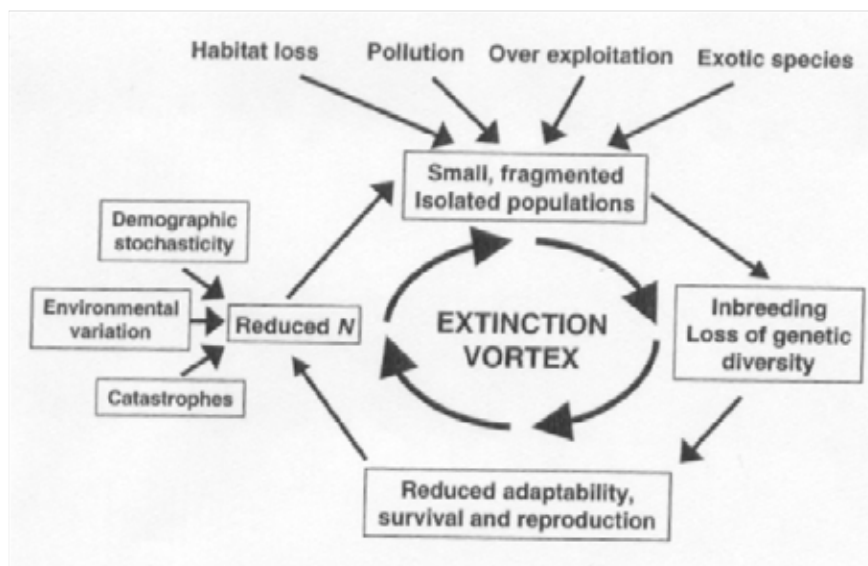


Fig.1: Cycle d'extinction représentant l'interaction de facteurs déterministes et stochastiques dans le déclin des espèces (Frankahm et al. 2002)

Les objectifs de cette étude étaient d'analyser la configuration spatiale de la diversité génétique et la différenciation génétique des Mulettes perlières de 3 grands bassins versants en Limousin (France), et de mesurer les variations de potentiels redox dans l'eau libre (eau de surface) et à 5 cm de profondeur dans le substrat, cette variation étant un facteur clé du succès du recrutement des Mulettes perlières (Geist et Auerswald, 2007).

Matériel et Méthode

Echantillonnage de matériaux génétiques

Au total, 206 individus de Mulettes perlières du Limousin provenant de 7(9) populations localisées sur les trois grands bassins versants de la région (Loire-Bretagne, Adour-Garonne et Charente) ont été échantillonnés en Octobre 2013. La sélection des sites d'échantillonnages a été faite sur la base des connaissances d'acteurs locaux (David Naudon et Gilles Barthelemy) qui ont accompagné toutes les séances d'échantillonnage. Une attention particulière a été portée à la représentativité des mulettes échantillonnées, tant au niveau de leur aire de répartition sur chaque rivière que sur les classes d'âge. Après une recherche intensive, aucune Mulette ne put être trouvée pour la population E (Le Chavanon). Pour la population X (Le Gourbillon) seulement un individu était disponible pour effectuer les analyses génétiques. La localisation des zones échantillonnées est présentée dans le Tableau 1 et la Figure 2. Le prélèvement d'hémolymphe a été réalisé comme décrit par Gesit & Kuehn (2005), en collaboration avec le groupe de spécialistes français. Cette technique d'échantillonnage n'est pas vulnérante pour les Mulettes, qui sont relâchées vivantes à leur emplacement d'origine après le prélèvement.



Figure 2 : Localisation des échantillonnages (cercles noirs) effectués sur les populations de Mulettes perlières (*M. margaritifera*) du Limousin sur trois grands bassins versants (Charente, Dordogne et Loire). Les codes d'échantillons renvoient à la Table 1.

Tableau 1 : Site d'échantillonnage, caractéristiques sédimentaires et caractéristiques des populations de *M. margaritifera* des zones d'échantillonnages dans la région Limousin, France. La taille des populations (Pop. Size) a été estimée par le groupe de spécialistes, David Naudon et Gilles Barthelemy (pers. comm.). Le potentiel redox a été mesuré dans les eaux libres (Ehf) et à 5cm de profondeur dans le substrat (Ehs). U signifie « en aval », O correspond a « en amont ».

Drainage	Population	Pop		GPS latitude (N)	GPS longitude (E)	Altitude (m)	Ehf	Ehs	
		ID	Sample size				Pop. size	media n	media n
Charente	Bandiat	A	30	800	45.603504°	0.796341°	290	495	399
Dordogne	Maumont-Blanc	B	25	500	45.292367°	1.590000°	300	464	349
Loire	La Vienne	C	30	4000	45.704267°	1.847267°	150	498	479
Dordogne	La Méouzette	D	30	3000	45.708593°	2.479289°	720	498	300
Dordogne	Le Chavanon	E	0	<50	45.589917°	2.468267°	580	500	410
Loire	La Leyrenne	F	30	300	46.076264°	1.744747°	435	500	314
		FU						500	377
		FO						500	313
Loire	Le Grandrieux	G	30	3000	46.022902°	1.692289°	400	499	367
		GU						500	401
		GO						499	287
Loire	La Gartempe	H	30	200	46.077450°	1.860484°	490	502	378
		HU						501	407
		HO						502	314
Loire	Le Gourbillon	X	1	<10	45.840830°	2.112090°	665	NA	NA

Extraction de l'ADN et analyses des microsatellites

Les échantillons d'hémolymphe ont été transférés dans des tubes Eppendorf de 1,7 ml et refroidis à 2 ° C au cours de la récolte et durant le transport. L'extraction de l'ADN a été réalisée dans les laboratoires de l'Université Technique de Munich, Allemagne. Après centrifugation à 14 000 g pendant 5 min, le surnageant a été éliminé et l'ADN a été isolé à partir du culot cellulaire restant, grâce au kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) suivant les instructions du fabricant, pour la préparation du tissu. Afin de permettre la comparaison des résultats avec d'autres études génétiques sur les Mulettes perlières, toutes les analyses ont été réalisées sur la base du génotypage de neuf marqueurs spécifiques, marqueurs microsatellites standard pour *M. margaritifera*, comme décrit par Geist et al. (2003, 2010), Geist et Kuehn (2005), et Geist et Kuehn (2008). L'amplification (PCR) a été réalisée dans un volume total de 12,5 µl avec les composants suivants: 25 ng d'ADN génomique, 0,2 mM de chaque amorce, (l'amorce forward était marquée par fluorescence avec Cy-5), 0,2 mM de chaque dNTP (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), 3 mM de MgCl₂ (Solis BioDyne), 1 × tampon PCR (Solis BioDyne), et 0,5 U de Taq ADN polymérase (FIREPol[®], Solis BioDyne). Pour l'amplification PCR, nous avons utilisé un thermocycleur (Mastercycler gradient, Eppendorf, Allemagne). Les produits de PCR ont été séparés sur 5% d'acrylamide dénaturant 19:01: gels bisacrylamide avec l'analyseur d'ADN ALFexpressII et classés avec le logiciel ALLELELINKS 1,02 (Amersham Pharmacia Biotech). Une électrophorèse a été effectuée avec deux standards internes (70 pb, 300 pb) dans chaque voie. En outre, une échelle externe (50-500 pb échelle) et un échantillon de référence précédemment séquencés ont été inclus sur chaque gel afin d'assurer le marquage exact et pour faciliter les références croisées entre les gels.

Analyses de génétique des populations

La fréquence allélique, le nombre moyen d'allèles par locus (A), les taux d'hétérozygotie attendus (H_e) et observés (H_o), les valeurs de F_{ST} (Weir et Cockerham 1984), les valeurs de F_{IS} et la richesse allélique (AR), comme mesure standardisée du nombre d'allèles corrigées par la taille de l'échantillon, ont été calculés avec FSTAT v 2.9.3 (Goudet, 2001). Genepop v 3.4 a été utilisé pour tester la distribution génotypique au sein des populations, pour voir si elle correspondait aux prévisions du modèle de Hardy-Weinberg (HW) (Test exact d'Hardy-Weinberg). Le nombre de génotypes multilocus (MLG) par population a été détecté en utilisant le package poppr (Kamvar et al. 2014) sous R. Les allèles ont été considérés comme « propres à une population » si leur fréquence représentait plus de 5% dans une population et si cela ne s'observait dans aucune autre population. Des tests de différenciation significatifs ont été effectués pour toutes les paires de populations et ont été réalisés avec l'aide de Genepop, utilisant 10.000 itérations et 1000 marches de mémorisation (Raymond et Rousset, 1995b). Le logiciel ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005) a été utilisé pour quantifier hiérarchiquement la structure génétique des populations par l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA; Excoffier et al. 1992), et afin d'intégrer l'information moléculaire basée sur les fréquences alléliques. La distance génétique de Nei D_A (Nei et al. 1983) a été calculée en utilisant le programme DISPAN (OTA, 1993). Tous les tests de probabilité ont été réalisés en appliquant l'algorithme de la chaîne de Markov (Guo et Thomson, 1992; Raymond et Rousset, 1995b). L'ajustement de Bonferroni (Rice, 1989) a été utilisé pour corriger les tests multiples. L'approche bayésienne de test d'assignation de la population implémenté dans le programme GENECLASS 1.0.02 (Piry et Cornuet 1999) a été utilisée pour estimer la probabilité pour qu'un individu à génotype multilocus soit affecté à la population à partir de laquelle il a été prélevé. La parenté entre individus a été estimée sur la base de la valeur F de la 2MOD-programme (Ciofi et Bruford, 1999), qui fait référence à la probabilité que deux gènes partagent un ancêtre commun au sein d'une population et que cela soit en corrélation avec la taille de populations actuelles. Une simulation par Markov Chain Monte Carlo (100 000 itérations) a été réalisée, et les premiers 10% de la production ont été rejetés afin d'éviter le biais dû aux conditions de départ.

Afin de combiner les données géographiques et génétiques, une carte de synthèse a été générée avec les trois premiers résultats de l'Analyse Discriminante des Composantes Principales (DAPC) implémentée dans le package R « adegenet » (Jombart 2008; Jombart et al. 2010) R v.2.12. (R Development Core Team 2011). Cette technique ne nécessite pas d'hypothèses concernant le modèle génétique de la population. Par cette approche, l'ensemble des données génétiques est traité et le modèle extrait les informations en appliquant une analyse en composantes principales. Dans une seconde étape de calcul une analyse discriminante maximise la variation génétique entre les groupes. Les vecteurs tridimensionnels de la DAPC peuvent être visualisés à l'aide de codes de couleur « RougeVertBleu » (Jombart 2008; Jombart et al. 2010). Que ce soit pour une population ou pour un individu, une répartition égale des couleurs caractérise la même constitution génétique. Les vecteurs en trois dimensions (couleurs) de chaque population ont été placés en fonction de leurs coordonnées géographiques sur la carte du Limousin pour visualiser la constitution génétique des populations dans l'espace. La constitution génétique de chaque individu par rapport à la population a également été visualisée en fonction de leur population d'origine.

Analyses de substrat

Le colmatage des espaces interstitiels dans le lit du cours d'eau et la réduction des échanges entre l'eau libre de surface, riche en oxygène, et la zone interstitielle, est considéré comme le problème majeur pour le recrutement de juvéniles de Mulettes perlières dans de nombreuses régions européennes. De plus les mesures comparatives de potentiel redox entre l'eau libre et le substrat du cours d'eau sont un puissant indicateur pour l'évaluation de la qualité de l'habitat (Geist et Auerswald 2007). Par conséquent, les lectures du potentiel redox (Eh) ont été effectués, à raison de 5 à 17 mesures par rivière selon Geist et Auerswald (2007). À chaque endroit, l'Eh a été d'abord mesuré dans l'eau libre, puis à 5 cm de profondeur dans le substrat. Les tronçons correspondant aux populations F, G et H ont été divisés en une zone amont (O) et en une zone aval (U). Les valeurs inférieures à Eh = 300 mV indiquent une anoxie et les valeurs supérieures à 300 mV, des conditions oxygénées (Schlesinger, 1991).

Résultats

Diversité génétique

La diversité génétique des Mulettes perlières en Limousin était dans la même fourchette que celle décrite précédemment pour les populations d'Europe centrale, mais plus élevée que celle de la population de l'Europe du Sud. Un nombre moyen de 4,8 allèles par locus a été observé pour les neuf microsatellites. Le nombre d'allèles par locus variait de deux pour « locus MarMa4726 » à 7 pour « locus MarMa5167 », « MarMa4143 » et « MarMa4322 ».

Des génotypes multilocus identiques ont été trouvés dans toutes les populations et de manière plus marquée dans la population A la moins génétiquement diverse, où 20 génotypes redondants ont été trouvés. Le nombre moyen d'allèles par locus (A) et la richesse allélique (A_R) variaient entre les populations et étaient en moyenne de 2.6 et 2.5 respectivement pour tous les loci et les populations étudiés. Le *Tableau 2* montre un résumé des indices de diversité des microsatellites. La plus haute ($A=3.1$, $A_R=3.0$) et la plus faible diversité allélique ($A=1.8$, $A_R=1.7$) sont observés respectivement dans les populations D et A.

La population A montre une faible diversité génétique comparée aux autres populations. Les hétérozygoties prévues et observées (H_e et H_o) avaient, respectivement, une moyenne de 0.234 et de 0.074, et étaient très faibles pour les populations A et H (*tableau 2*). Le coefficient de consanguinité F_{IS} est le plus élevé dans la population F. La proportion d'ancêtres communs dans chaque population, inférée des valeurs-F du programme 2MOD, allait de $F = 0,171$ dans la population C, la plus diverse génétiquement, à $F = 0,605$ dans la population A. La proportion d'ancêtres communs était fortement corrélée au nombre de génotypes multilocus par population ($r = 0,96$, $p < 0,001$) et démontrait de faibles impacts de la consanguinité dans la population C et D. Les populations A et H montrent qu'entre 67% et

47% des échantillons analysés ont des génotypes identiques. Des allèles privés (propres à la population) ont été mise en valeur sur deux loci différents et dans deux populations. Toutes les populations s'éloignent significativement des proportions attendues par le modèle de Hardy-Weinberg après la correction de Bonferroni (tableau 2).

Tableau 2 : indice de diversité en microsatellites des populations limousines de Mulettes perlières (*Margaritifera margaritifera*). Drainage : bassin versant () ; popID code de la population () ; N : taille de l'échantillon ; MLG : nombre de génotypes multilocus distincts ; A : nombre moyen d'allèles par locus ; A_R : la richesse allélique moyenne par population ; A_p : nombre d'allèles privés ; H_e : hétérozygotie attendue et H_o : observée ; F_{IS} et F : valeur du Fis et F basé sur le programme 2MOD ; P_{HW} : résultats du test de probabilité de déviation par rapport au modèle de Hardy-Weinberg comparé aux proportions attendues.

Drainage	PopID	N	MLG	A	A_R	A_p	H_e	H_o	F_{IS}	F	P_{HW}
Charente	A	30	10	1.8	1.7	0	0.073	0.022	0.697	0.605	***
Dordogne	B	25	20	2.3	2.3	0	0.249	0.067	0.736	0.372	***
Loire	C	30	29	3.0	2.9	1	0.356	0.083	0.77	0.171	***
Dordogne	D	30	28	3.1	3.0	0	0.351	0.125	0.647	0.181	***
Loire	F	30	24	2.7	2.6	0	0.235	0.040	0.833	0.361	***
Loire	G	30	23	2.7	2.5	1	0.244	0.141	0.426	0.351	***
Loire	H	30	16	2.4	2.3	0	0.130	0.038	0.711	0.494	***
Loire	X	1	1	1.0	NA	0	0.000	0.000	NA	NA	NA

Les analyses AMOVA de la hiérarchisation de la diversité génétique ont révélé que 18,9% de la variation génétique était intra-individuelle, 41,3% était due à des différences entre les individus à l'intérieur des populations et de 41,6% était due aux différences entre les populations au sein des bassins versants. Seulement 1,9% de la variation était due aux

différences entre les bassins versants. Les indices globaux de fixation étaient de 0.685, 0.409, 0.811 pour F_{IS} , F_{ST} et F_{IT} , respectivement. F_{CT} était <0.000 .

La différenciation génétique

Avec une moyenne F_{ST} de 0.409, les populations limousines de Mulettes perlières montrent un pattern de différenciation génétique très structuré et indépendant de la structuration hydrologique (bassins-versants) . La distance génétique est très grande entre certaines paires de populations avec des valeurs F_{ST} allant jusqu'à 0.770 entre les populations A et H. Le maximum $Nei D_A$ de 0.632 est entre les populations F et H, malgré leur proximité géographique (*tableau 3*). La plupart du temps, la population H a montré la divergence génétique la plus élevée de toutes les autres populations.

Par contraste, les populations B, C, et D, populations qui ne sont ni situés dans le même bassin versant, ni en proximité géographique, ont révélé la plus faible différenciation génétique avec les valeurs de F_{ST} par paire $\leq 0,050$. Les résultats des matrices de distances (*tableau 3*) et la prise en compte combinée de données géographiques et génétiques dans la carte de synthèse (*Fig. 3 et 4*) indiquent clairement que le schéma de différenciation génétique observé est largement indépendant de la distance géographique et des trois principaux bassins versants dans la région. L'indépendance de la structure génétique des populations par rapport aux bassins versants est en outre étayée par les résultats du test de réassignation et par les analyses d'AMOVA de hiérarchisation de la diversité des gènes.

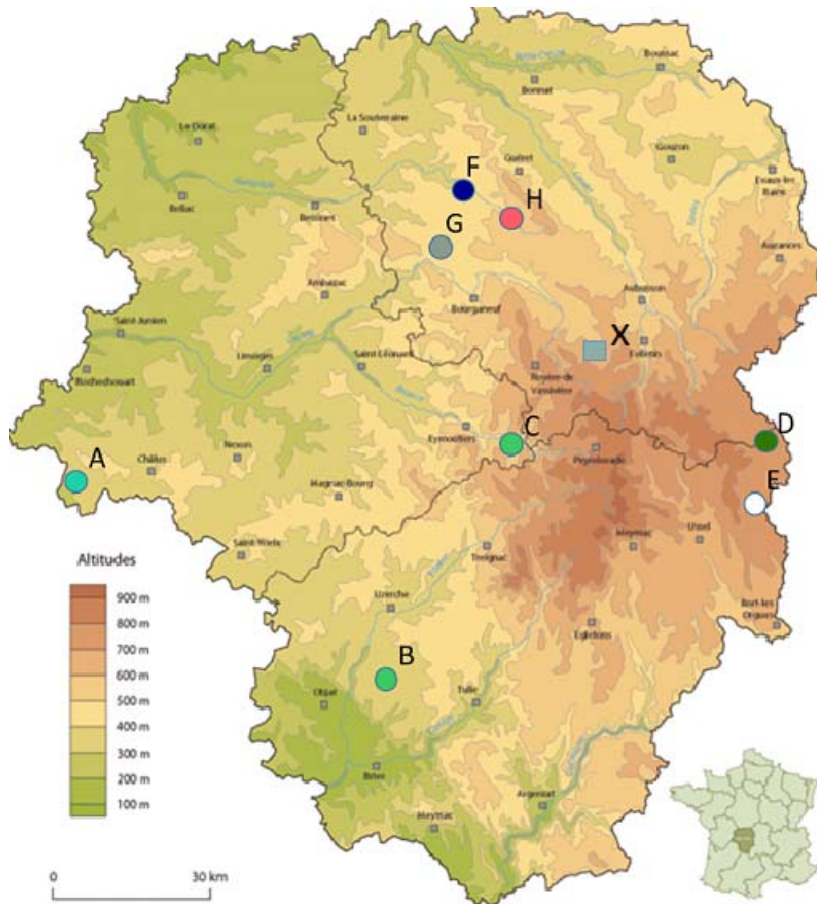


Figure 3: carte de synthèse combinant des données géographiques et génétiques par analyse discriminante en composantes principales (DACP). La similitude de couleur des points indique la similarité génétique des populations. La localisation des points se référer à l'emplacement des prélèvements ; les codes des échantillons renvoient au tableau 1. La population E n'a pas été analysée et la constitution génétique de la population X est basée sur un seul échantillon.

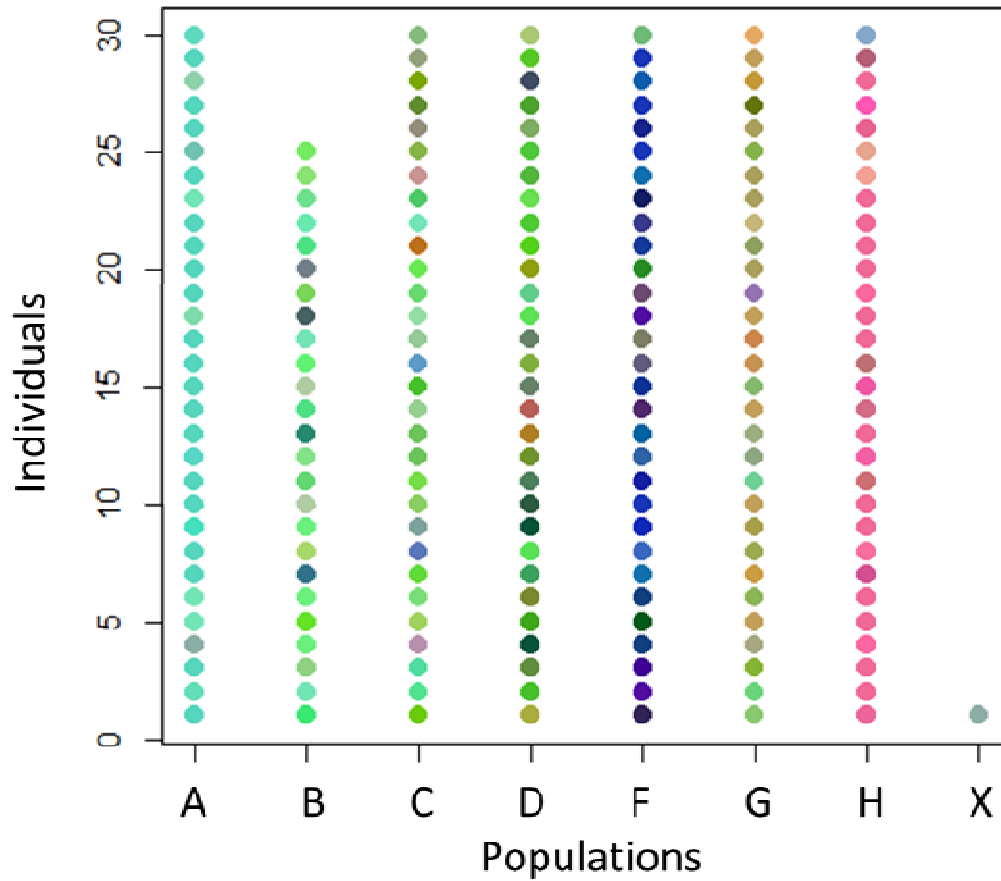


Figure 4: visualisation de la constitution génétique individuelle par population en fonction des vecteurs tridimensionnels de la transformation de couleur DAPC et RougeVertBleu (Jombart 2008; Jombart et al 2010.). Des couleurs identiques caractérisent la même constitution génétique d'un individu.

Tableau 3: matrice de distance F_{ST} des populations de Mulettes perlières de la région Limousin (France) (en bas à gauche) et distances Nei D_A (Nei et al 1983) (en haut à droite). La différenciation génétique était très significative ($p < 0,01$) pour toutes les comparaisons par

	A	B	C	D	F	G	H
A		0.169	0.110	0.210	0.248	0.310	0.577
B	0.409		0.026	0.100	0.330	0.309	0.477
C	0.264	0.043		0.027	0.242	0.188	0.354
D	0.377	0.145	0.035		0.281	0.212	0.456
F	0.509	0.416	0.297	0.302		0.374	0.632
G	0.512	0.363	0.228	0.245	0.444		0.488
H	0.770	0.583	0.431	0.491	0.640	0.561	

paire F_{ST} .

Basé sur le test d'assignation bayésienne, 151 des 205 individus (74%) ont été correctement réassignés à leurs sites d'échantillonnage et 163 sur 166 (81%) ont été correctement réaffectés à leur rivière d'origine (*tableau 4*). Ce résultat est soutenu par la visualisation de la constitution génétique individuelle de la figure 3. Les populations A et H ont montré un taux exceptionnellement élevé de réaffectation correcte. La forte différenciation de ces populations est probablement influencée par de forts effets de dérive génétique. Les populations A et H ont la plus faible diversité génétique de toutes les populations étudiées. En revanche, seulement 27% des individus de la population C et 53% de la population D sont correctement réaffectés à leur population d'origine. En même temps, la population C et D ont la probabilité la plus faible d'avoir des ancêtres communs et ces populations sont génétiquement les plus variables (*tableau 2*).

Tableau 4: tests de réattribution pour les Mulette perlière (*Margaritifera margaritifera*) sur la base de la méthode bayésienne implémentée dans le programme GENECLASS 1.0.02 (Piry et Cornuet 1999).

PopID	A	B	C	D	F	G	H
A	28	2	1				
B		20	7	2		3	
C	1		8	6		1	1
D		1	7	16	4		
F		1	2	3	25	1	
G	1		4	2	1	25	
H		1	1	1			29
Sample size	30	25	30	30	30	30	30
Observed number assigned to sample site	28	20	8	16	25	25	29
Percent correctly assigned to sample site	93%	80%	27%	53%	83%	83%	97%
Observed number assigned to drainage of origin	28	21	16	18	26	27	30
Percent correctly assigned to drainage of origin	93%	84%	53%	60%	87%	90%	100%

Analyses du substrat

En situation non dégradé, les rivières doivent montrer un potentiel redox élevé et une faible différence entre le potentiel redox de l'eau libre et de l'eau interstitielle (dans l'eau libre, la saturation en oxygène devrait être proche de 100%). Dans la plupart des cas, une réduction prononcée du potentiel redox dans les 5 cm de profondeur du substrat a été observée. La valeur d'environ 300 mV marque habituellement le seuil entre les conditions oxygénées et anoxiques (Geist et Auerswald, 2007; Schlesinger, 1991). Trois catégories de qualité du substrat des cours d'eau ont été trouvées: c'est dans la rivière C (Vienne) que nous avons observé la plus faible différence entre le potentiel redox de l'eau libre et le potentiel redox de l'eau interstitielle, indiquant des conditions très favorables. Ce qui est en concordance

avec la grande variabilité génétique et la faible influence de la dérive génétique dans cette population. La qualité du substrat observée dans ce cours d'eau (Vienne), traduit par les valeurs du potentiel redox, correspond à la qualité observée dans les populations fonctionnelles ailleurs en Europe. Un second groupe peut être fait comprenant les rivières A, B, E, GU et HU, où la baisse de potentiel redox entre l'eau libre et interstitielle est forte, mais où la majorité des sites ont des conditions de substrat oxygénées. Dans ce groupe, la rivière HU (Gartempe) montrait la plus petite baisse de potentiel redox. Les autres cours d'eau ont révélé, au moins en partie, des sites avec des conditions anoxiques. Avec une moyenne de 300 mV, la population D (Méouzette) a les conditions les plus anoxiques dans le substrat, mais d'un autre côté elle dispose des populations les plus variables génétiquement. Il convient de noter que ces valeurs redox représentent un instantané de la qualité du lit du cours d'eau et en plus des valeurs redox la stabilité du lit du cours d'eau doit être prise en compte. De plus, en raison de la longue durée de vie de l'espèce, on s'attend à un temps de latence conséquent entre la diminution de la qualité de l'habitat et son impact détectable sur la dérive génétique.

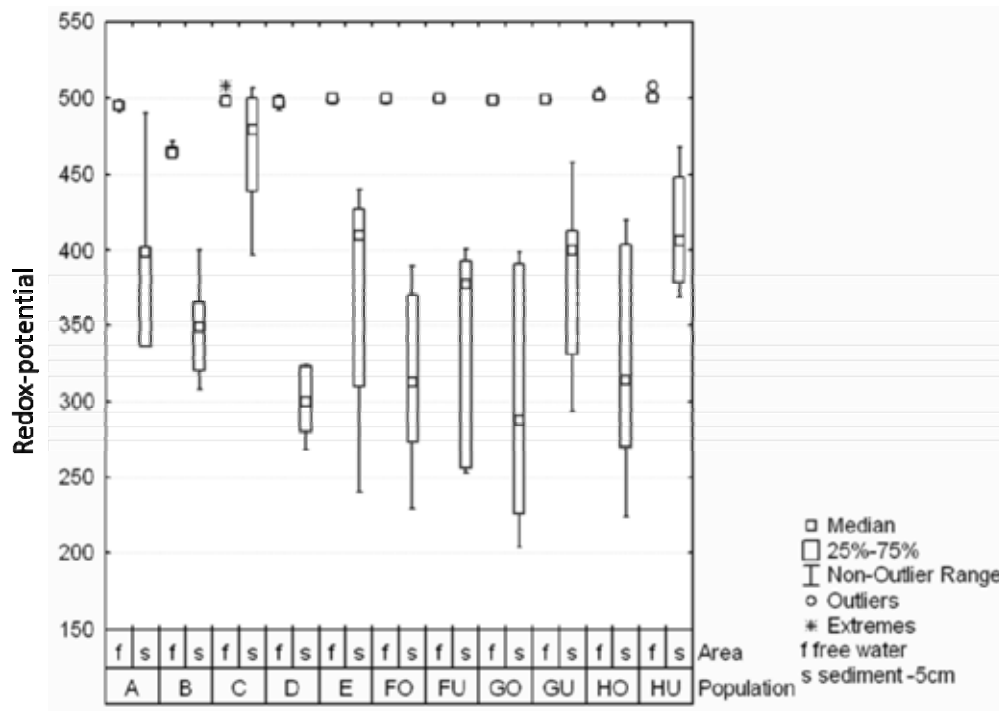


Fig.4 : boîtes à moustaches du potentiel redox dans l'eau libre et à 5 cm de profondeur dans le substrat des populations de Mulette perlière (*Margaritifera margaritifera*) de la région Limousin (France). Entre 5 et 11 analyses ont été effectuées.

Discussion

Relation entre la diversité génétique et la qualité du substrat

À notre connaissance, cette étude présente les premières analyses de la diversité génétique des populations de Mulettes perlières, espèce en voie de disparition, dans la région Limousin (France) en utilisant des marqueurs microsatellites très variables, fournissant des informations qui manquaient entre les populations de l'Europe centrale et méridionale. En accord avec les études génétiques menées sur les populations de Mulettes perlières d'Europe du Sud (Bouza et al. 2007), du centre et du nord, utilisant le même groupe de microsatellites (Geist et Kuehn 2005; Geist et Kuehn 2008, Geist et al. 2010), un degré relativement important de structuration génétique dans une échelle géographique réduite est observé. La diversité génétique mesurée par le nombre moyen d'allèles, par la richesse allélique, par les hétérozygoties prévues et observées, FIS et « F-values » était en moyenne

plus élevé que ceux de la péninsule ibérique, semblables à celle de l'Europe centrale, mais inférieure à celle de l'Europe du Nord. Toutefois, comparé à la diversité génétique des populations de Mulettes perlières des bassins du Rhin et de la Meuse, la diversité génétique des populations du Limousin est légèrement supérieure. Dans six des sept populations étudiées ici, la richesse allélique était supérieure à 2,3 mais elle n'atteignait pas des valeurs supérieures à 3.1 comme ont été enregistrées dans les populations du Nord (Geist et Kuehn 2008, Geist et al. 2009). Dans certaines populations de la région Limousin, les hétérozygoties attendues et observées ont même dépassé les valeurs des populations du nord de l'Europe. Ce pattern est également reflété par la probabilité d'ancêtres communs (2MOD), qui était beaucoup plus faible dans la plupart des populations du Limousin que dans celles d'autres régions environnantes, telles la Belgique et l'Espagne. La population C de la Vienne a les valeurs de redox les plus élevées dans le substrat. Elle apparaît la plus favorable au niveau des écoulements et présente un substrat visuellement favorable. Elle a également la plus grande diversité génétique, la plus faible probabilité d'ancêtres communs et le plus petit taux d'affectation correct de toutes les populations étudiées. Ceci indique qu'il existe un lien entre la qualité de l'habitat et la diversité génétique pour la Mulette perlière. En se basant sur le résultat des analyses génétiques et l'évaluation de la qualité du substrat, cette population a une haute priorité en termes de conservation. La population D (Méouzette) a aussi une grande variabilité génétique, mais le potentiel redox dans le substrat diffère fortement des valeurs observées dans les eaux libres. Ici, la mauvaise qualité de l'habitat, probablement liée à l'impact des activités agricoles en amont (Naudon pers. comm.), peut conduire à un goulot d'étranglement génétique à la prochaine génération. Le fait d'avoir des populations de Mulettes perlières situées dans des zones avec un impact anthropique faible augmente les chances de recrutement de juvéniles génétiquement variés à des taux de dérive génétique faibles (Geist et Auerswald 2007, Geist 2010; Geist et al. 2010). Des effets prononcés de la dérive génétique conduisant à la réduction de la diversité génétique et la surestimation de différenciation génétique comme dans les populations A et H ont pour la plupart été rapportés pour les populations perturbées en Europe méridionale et centrale (Bouza et al. 2007; Geist et Kuehn 2005).

Différenciation génétique en relation avec la qualité du substrat

Le pattern de différenciation génétique des populations observé pour les Mulettes perlières en Limousin était très structuré mais largement indépendant de la structure hydrologique actuelle. L'absence de structure entre les bassins versants pourrait théoriquement être dû aux mouvements du poisson-hôte (historiques ou récents), eux-mêmes liés à une grande aire de distribution (ce qui est connu pour des espèces migratrices comme les Saumons ou la Truite fario) ou des mouvements d'origine anthropique.

Cependant, la différenciation génétique entre les populations sur la base des estimations de F_{ST} et $Nei D_A$, mais aussi l'analyse des autres résultats, indiquent tous une structure génétique marquée des populations de Mulettes perlières du Limousin. Des résultats similaires au sein d'affluents individuels ont également été décrits précédemment dans des populations de Mulettes perlières d'Europe centrale et septentrionale (Geist et Kuehn 2005, Geist et al. 2010).

Les taux de bonneréaffectation aux populations d'origine (73%) sont en concordance avec les taux observés dans les populations d'Europe centrale où 79% (Geist et Kuehn 2005) des individus ont été correctement réattribuée à leurs sites d'échantillonnage. Ce taux est toutefois inférieur à celui des populations du sud de l'Europe (92 %, péninsule ibérique, Bouza et al. 2007).

Le degré de différenciation génétique entre les populations de Mulettes perlières est généralement influencé par leur historique de colonisation, par des adaptations locales dues aux mutations et sélections, ainsi que par la dérive et la migration, et, finalement, par la stratégie d'histoire de la vie et la démographie des populations. L'histoire de la colonisation des Mulettes perlières est probablement étroitement liée à l'histoire de la colonisation des poissons hôtes (Geist et Kuehn 2008), mais les rôles qu'ont joués la truite (*Salmo trutta*), le saumon (*Salmo salar*) et l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*) dans ce processus restent inconnus.

La forte dépendance des Mulettes perlières, pour la migration, dans le transport passif des glochidies par les poissons-hôtes et le haut degré de spécialisation des Mulettes pour les milieux extrêmement oligotrophes ont probablement contribué à des mécanismes d'isolement plus forts comparé aux autres espèces aquatiques, même à l'intérieur de populations adjacentes dans le même système hydrologique. Qui plus est, les femelles

peuvent devenir hermaphrodites et produire périodiquement d'énormes quantités de descendants (Bauer 1987). Cette stratégie reproductive extraordinaire est susceptible d'accentuer les effets fondateurs et les effets de dérive génétique, et conduire à de forts degrés de différenciation inter-populationnelle. Qui plus est, les facteurs d'origine anthropique qui réduisent directement les effectifs efficaces et influencent la qualité de l'habitat et la fragmentation peuvent augmenter les effets de la dérive génétique et induire des goulets d'étranglement (Geist et Kuehn 2005).

Ces effets sont très prononcés dans les populations du Limousin, en particulier dans la population A (Bandiat) et H (Gartempe), comme dans certaines populations de l'Europe centrale et du sud. Les populations A et H comprenaient moins de 800 et 200 individus de taille similaire (et d'âge similaire) et avaient le plus grand nombre de génotypes redondants. Ceci indique que ces populations sont fortement influencées par la dérive et ont atteint les goulets d'étranglement génétiques sévères.

Remerciements

Ce travail a été initié par le Groupe Mulette Limousin, Limousin Nature Environnement et l'ONEMA SD 23 et soutenu financièrement par la société des Autoroutes du Sud de la France, ASF-DOIO. Nous sommes particulièrement reconnaissants à David Naudon et Gilles Barthelemy et leurs équipes qui ont fourni un grand soutien logistique et qui nous ont agréablement accompagnés lors des prélèvements.

LNE remercie également toutes les structures et les personnes qui ont participé activement à cette étude :

Gilles Barthelemy (ONERMA SD 23), Cyril Laborde (PNR de Millevaches en Limousin), Julie Collet (PNR de Millevaches en Limousin), Guillaume Rodier (PNR de Millevaches en Limousin), Kevin Reygnaud (Service civique LNE), Eli Musqui (Stagiaire LNE), Véronique Barthelemy (DREAL Limousin), Patrice LEBRUN (ASF), Laurent Dumée (ONEMA SD 19), Nicolas Moscovit (ASF), Daniel Blangy (ASF), Pascaline Bonnin (SMT), Cédric Devilleger (PNR Périgord-Limousin), Kélian Lagrève (Stagiaire SMT).

Un grand merci également à Vincent Prié (BIOTOPE) pour le travail de traduction et d'amendement de la version française.

Référence :

Bauer G (1987) Stratégie de reproduction de la Mulette perlière d'eau douce *Margaritifera margaritifera*. J Anim Ecol 56:691-704

Bauer G (1988) Les dangers pour la Mulette perlière *Margaritifera margaritifera* en Europe centrale. Biol Conserv 45:239-253

Bauer G (1992) Variation de la durée de vie et la taille de la Mulette perlière d'eau douce. *M. margaritifera* J Anim Ecol 61:425-436

Bogan AE (1993) Extinctions de bivalves d'eau douce (Mollusca : Unionoida): A la recherche des causes ; Am Zool 33:599-609

Bouza C, J Castro, Martínez P, R Amaro, Fernández C, Ondina P, Outeiro A, San Miguel E (2007) Les Mulettes perlières *Margaritifera margaritifera* menacées L. dans le NO de l'Espagne: faible et très structuré variation génétique dans les populations périphériques du sud évalué à l'aide de marqueurs microsatellites. Conserv génétique 8:937-948

Ciofi C, Bruford MW (1999) Structure génétique et flux de gènes entre les populations de dragon de Komodo inférées par l'analyse de loci microsatellites. Mol Ecol 8:17-30

Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999) De nouvelles méthodes utilisant des génotypes multilocus pour sélectionner ou exclure les populations comme origines des individus. Génétique 153:1989-2000

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) analyse de la variance moléculaire déduite de distances métriques entre les haplotypes d'ADN : application aux données de restriction de l'ADN mitochondrial humain. Génétique 131:479-491

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0 : Un logiciel intégré pour l'analyse des données génétiques des populations. Evol Bioinform ligne 1:47-50

Geist J, Rottmann O, W Schröder, Kühn R (2003) Développement de marqueurs microsatellites pour la Mulette perlière d'eau douce en voie de disparition *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia:Unionoidea). *Mol Ecol notes* 3:444-446

Geist J (2005) Conservation génétique et écologie des Mulettes perlières d'eau douce européennes (*Margaritifera margaritifera* L.) Thèse de Doctorat, Université Technique de Munich, Allemagne. Disponible à :
<http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/ww/2005/geist.pdf>, dernier accès le 12 mai 2009

Geist J, Kuehn R (2005) La diversité génétique et la différenciation des populations de Mulettes perlières d'Europe centrale (*Margaritifera margaritifera* L.): implications pour leur conservation et leur gestion. *Mol Ecol* 14:425-239

Geist J, Auerswald K (2007) Caractéristiques physicochimiques du lit du cours d'eau et le recrutement de la Mulette perlière d'eau douce (*Margaritifera margaritifera*). *Eau douce Biol* 55:2299-2316

Geist J, Kuehn R (2008) Interactions hôte - parasite dans les écosystèmes des cours d'eau oligotrophes : les rôles de la stratégie de l'histoire de la vie et des niches écologiques. *Mol Ecol* 17:997-1008

Geist J, H Wunderlich, Kuehn R (2008) L'utilisation de coquilles de mollusques pour les analyses moléculaires basés sur l'ADN. *J Mollus Stud* 74:337-343

Geist J, H Soderberg, Karlberg A et Kuehn R (2010) la structure génétique de drainage indépendant et une grande diversité génétique de l'espèce en danger : Mulettes perlières d'eau douce (*Margaritifera margaritifera*) en Europe du Nord . *Conserv. Génétique*. 11 (4), 1339-1350 .

Geist J (2010) Stratégies pour la conservation de l'espèce en péril Mulettes perlières d'eau douce (*Margaritifera margaritifera*): Une synthèse génétique de la conservation et de l'écologie. *Hydrobiologia* 644 ; 69-88

Geist J (2011) intégrative écologie des eaux douces et de la conservation de la biodiversité. *Indicateurs écologiques* 11 ; 1507-1516

Goudet J (2001) FSTAT, la version 2.9.3 : un programme pour évaluer et tester la diversité des gènes et les indices de fixation.

Guo SW, Thompson EA (1992) Réalisation du test exact de Hardy -Weinberg proportion des allèles multiples. *Biométrie* 48:361-372

Hewitt GM (1996) Quelques conséquences génétiques de l'âge de la glace, et leur rôle dans la divergence et de la spéciation. *Journal biologique de la Société linnéenne* 58:247-276

Hewitt G (2000) Le patrimoine génétique des périodes glaciaires du Quaternaire. *Nature* 405:907-913

Jombart T (2008) adegenet: un paquet R pour les analyses multivariée des marqueurs génétiques *bioinformatiques*, **24**, 1403–1405.

Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) L'analyse discriminante des principaux composants: une nouvelle méthode pour l'analyse de populations génétiquement structurés. *BMC Genetics*, **11**, 94.

Jungbluth JR, Coomans HE, Groh H (1985) Bibliographie der Flussperlmuschel *Margaritifera margaritifera* (Linn. 1785). Verslagenen Technische Gegevens No 41 Instituut voor Taxonomische Zoologie, Universiteit Amsterdam

Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ. (2014) Poppr: un paquet R pour les analyses génétique des populations avec reproduction clonale, partiellement clonale, et / ou sexuel. *PeerJ* 2:e281 <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.281>

Lydeard C, Cowie RH, Ponder WF et al (2004) La baisse globale de mollusques non marins. *BioScience* 54:321-330

Marchordom A, Araujo R, Erpenbeck D, Ramos MA (2003) Les génétiques de la phylogéographie et de la conservation de l'espèce menacée *Margaritifera* européenne (*Bivalvia: Unionoidea*). *Biol J Linn Soc* 78:235-252

Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Précision des distances génétiques et arbres phylogénétiques à partir de données moléculaires.

J Mol Evol 19:153-170

Neves RJ, Bogan AE, Williams JD, Ahlstedt SA, Hartfield PW (1997) Statut des mollusques aquatiques dans le sud-est des États-Unis: la diversité en spirale vers le bas; Dans: La faune aquatique en péril: Le point de vue du sud-est (Eds GW Benz et DE Collins) Publication spéciale 1, du Sud-Est Institut de recherche aquatique, Lenz Design and Communications, Decatur, GA

Ota T (1993) *DISPAN: Des logiciels de distance génétique et d'analyses phylogénétique*. Pennsylvanie. Pennsylvania State University.

Piry S, Cornuet JM (1999) *GENECLASS: Un programme pour assignation et l'exclusion en utilisant des marqueurs moléculaires*. France: URLB / INRA

Raymond M, Rousset F (1995a) Genepop version 3.4: logiciel de génétique des populations pour des tests exacts et œcuménisme. *J Hered* 86:248-249

Raymond M, Rousset F (1995b) Un test exact de différenciation de la population. *Evolution* 49:1280-1283

WR Rice (1989) Tables d'analyse de tests statistiques. *Evolution* 43:223-225

Strayer DL, Downing JA, Haag WR et al (2004) change les perspectives vers les Mulette perlière d'eau douce, l'animal de l'Amérique du Nord le plus menacé. *BioScience* 54:429-439

Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Phylogéographie comparative et routes de colonisation postglaciaires en Europe. *Mol Ecol* 7:453-464

Vaughn CC, Hakenkamp CC (2001) Le rôle fonctionnel des bivalves creuseur dans les écosystèmes d'eau douce. *Eau douce Biol* 46:1431-1446

Wächtler K, Dreher-Mansur MC, Richter T (2001) Types de larves et la biologie post-larves des naïades (Unionoida); Dans: Bauer G, Wächtler K (eds) *Ecologie et Evolution des Mulettes d'eau douce Unionoidea*. Études écologiques 145:93-125 Springer Verlag, Heidelberg

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimation de F-statistiques pour l'analyse de la structure de la population. *Evolution* 38:1358-1370

Jeune MR, Cosgrove PJ, Hastie LC (2001) L'étendue et les causes de la baisse d'une naïade très menacée: *Margaritifera margaritifera*; Dans: *Ecologie et Evolution des Mulettes d'eau douce Unionoidea* (Eds Bauer G et Wächtler K). *Études écologiques* 145:337-357 Springer Verlag, Heidelberg

Ziouganov V, Zotin A, Nezlin L, Tretiakov V (1994) *Les Mulettes perlières d'eau douce et leurs relations avec les salmonidés*. VNIRO, Institut fédéral de la Russie des Pêches et de l'océanographie, Moscou 104 pp