

SAUVEGARDE DES POPULATIONS DE SONNEURS À VENTRE JAUNE (*BOMBINA VARIEGATA*) DU VALAIS : ANALYSE GÉNÉTIQUE COMPARATIVE DE DIFFÉRENTES POPULATIONS

SOPHIE COTTING¹, SYLVAIN URSENBACHER², RAPHAËL ARLETTAZ³,
JÉRÔME PELLET⁴, † PAUL MARCHESI¹ & FLAVIO ZANINI¹

Bull. Murithienne 136/2018: 31 - 41

En souvenir de notre cher ami et collègue Paul Marchesi (1958-2013), initiateur du projet et acteur fondamental de la sauvegarde des batraciens en Valais.

En Valais, les populations de sonneurs à ventre jaune sont en déclin. À peine une dizaine de populations subsistent le long de la plaine du Rhône et présentent un important déficit de connexion qui pourrait conduire à leur disparition. Cette étude, réalisée en partenariat entre le bureau Drosera, les Universités de Bâle et de Berne et le KARCH, vise à évaluer la diversité génétique des populations valaisannes de sonneurs en les comparant à des populations du canton de Vaud proches et moins isolées, afin d'affiner les stratégies de conservation de l'espèce mises en place ces dernières années par le canton. Globalement, une faible à très faible diversité génétique a été trouvée au sein des populations analysées, avec une diversité plus importante dans les populations vaudoises que valaisannes et qui diminue à mesure qu'on remonte le Rhône. L'étude montre que la situation du sonneur reste préoccupante et qu'il est essentiel de continuer les mesures de conservation de l'espèce afin d'en assurer la sauvegarde.

Schutz der Populationen der Gelbbauchunke (*Bombina variegata*) im Wallis: genetische Untersuchung verschiedener Populationen. Im Wallis sind die Gelbbauchunke-Populationen rückläufig. Es sind kaum zehn, die sich in der Rhoneebene noch halten können. Ausserdem sind die Standorte meist isoliert und drohen zu verschwinden. Diese Studie ist eine Zusammenarbeit zwischen Drosera, den Universitäten Basel und Bern und der Karch. Sie hat zum Ziel, die genetische Vielfalt innerhalb der Walliser-Populationen zu untersuchen und sie dann mit den Ergebnissen aus dem angrenzenden Kanton Waadt zu vergleichen, wo die Populationen besser vernetzt sind. Aufgrund der Resultate soll die in den letzten Jahren erarbeitete Schutzstrategie des Kantons Wallis verbessert werden. Die untersuchten Populationen weisen insgesamt eine geringe bis sehr geringe genetische Vielfalt auf, welche mit der Distanz zum Genfersee der Rhone entlang abnimmt. Auch im Vergleich zum Kanton Waadt ist die genetische Diversität in den Walliser Populationen relativ tief. Die Studie zeigt, dass die Situation der Gelbbauchunke alles andere als stabil ist und dass weitere Schutzmassnahmen für den Erhalt der Art notwendig sind.

Mots clés:

Sonneur à ventre jaune (*Bombina variegata*), régression, diversité génétique, fragmentation de l'habitat, habitat, protection, conservation, restauration

Schlüsselwörter:

Gelbbauchunke (*Bombina variegata*), Rückgang, genetische Vielfalt, Habitatfragmentierung, Habitat, Schutz, Restaurierung

¹Bureau Drosera Ecologie Appliquée SA
Ch. Poudrière 36, 1950 Sion
+41 (0) 27 323 70 17
drosera@drosera-vs.ch

²Departement of Environmental Sciences, Section of Conservation Biology
University of Basel,
St.Johanns-Vorstadt 10, 4056 Basel
+41 (0) 61 267 08 57
s.ursenbacher@unibas.ch

³Division of Conservation Biology, Institute of Ecology and Evolution, University of Bern,
Baltzerstrasse 6, 3012 Bern
+41 (0) 31 631 31 61
raphael.arlettaz@iee.unibe.ch

⁴Info fauna - karch
Avenue de Bellevaux 51, 2000 Neuchâtel
+41 (0) 32 718 36 13
sylvain.ursenbacher@unine.ch
+41 (0) 32 725 72 42
jerome.pellet@unine.ch

INTRODUCTION

Le sonneur à ventre jaune *Bombina variegata* (Ph. I) est une espèce de crapaud menacée au niveau suisse (considéré comme «En danger» dans la dernière liste rouge suisse, SCHMIDT & ZUMBACH 2005). Comme toutes les autres espèces de batraciens indigènes, cette espèce est légalement protégée depuis 1967 (Loi sur la protection de la nature SR 451 et son ordonnance SR 451.1). Cette espèce pionnière, adaptée aux milieux naturels dynamiques où de nouveaux plans d'eau apparaissent et disparaissent régulièrement, affectionne les petites mares temporaires et dépourvues de végétation pour s'y reproduire (MERMOD & al. 2010).

En Valais, où la plaine s'est fortement anthropisée et où les zones humides ont été fortement asséchées suite aux corrections du Rhône, le sonneur est en déclin, notamment à cause de la dégradation et de la destruction de ses habitats, ainsi que de ses sites de reproduction (**Fig. 1**). Actuellement, à peine une dizaine de populations subsistent le long de la plaine du Rhône, du Bouveret à Chalais, alors que 19 populations étaient encore recensées lors du premier inventaire des batraciens du Valais. Celui-ci relevait déjà la

Jeune sonneur à ventre jaune. Photo Henri Guanzini



disparition de plusieurs populations dans les années 1980 (MARCHESI & ZANINI 2009a, REY & al. 1986). La situation est donc particulièrement critique en Valais central où il ne subsistait apparemment plus qu'une seule population viable en 2009. En effet, des relevés effectués alors dans 17 sites a priori favorables au sonneur ou qui étaient encore occupés par ce dernier il y a moins d'une trentaine d'années n'avaient permis de ne retrouver qu'une seule population, sur le territoire de la commune de Chalais, à Tsararogne (MARCHESI & ZANINI 2009b). Suite à ce constat alarmant, un plan d'action a été mis en route par le canton pour essayer de sauvegarder les dernières populations existantes de cette espèce sur l'ensemble du territoire cantonal, notamment par le suivi et la revitalisation des sites en abritant encore (MARCHESI & ZANINI 2010, MARCHESI 2012, ZANINI & COTTING 2014, FOURNIER 2017, ZANINI 2017, ZANINI & EVEQUOZ 2018). Les populations actuelles, situées pour la plupart en rive gauche du Rhône, présentent un déficit de connexion entre elles (ZANINI 2006). Un manque de connectivité spatiale, conséquence de la fragmentation et de l'isolement progressive des populations, entraîne généralement un appauvrissement de la diversité génétique, lequel peut, à terme, conduire à la disparition d'une population.

Cette étude vise à éclaircir la situation génétique des populations de sonneurs à ventre jaune du Valais, notamment en les comparant avec les populations les plus proches géographiquement (Chablais vaudois, rive droite du Rhône), apparemment mieux connectées entre elles. Par ailleurs, l'origine de certaines (sous-)populations valaisannes demeure incertaine car des lâchers ont peut-être eu lieu en Valais central, notamment en provenance d'un élevage privé qui existe depuis quelques décennies. Selon son propriétaire, les individus souches de cet élevage proviennent d'une population aujourd'hui éteinte de la région d'Aproz VS, ainsi que d'une population fribourgeoise (barrage de Schiffenen) (Pierre-Louis Cerutti, com. pers.). Il nous a donc paru nécessaire d'effectuer une analyse génétique comparative,

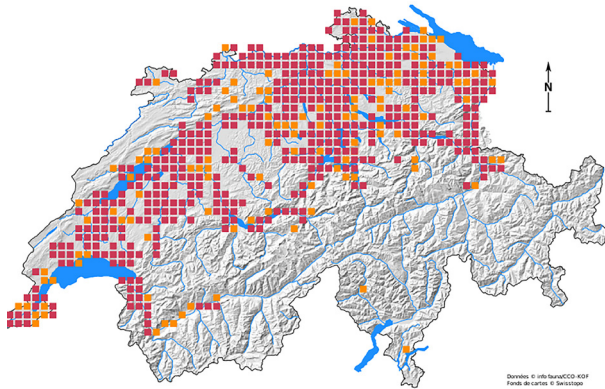


Figure 1 - Carte de répartition du sonneur à ventre jaune (*Bombina variegata*) en Suisse selon le Centre Suisse de la Cartographie de la faune (CSCF) et le Centre de coordination pour la protection des amphibiens et reptiles de Suisse (KARCH) (2019). Carré orange: données avant 2000. Carré rouge: Données à partir de 2000. La situation en Valais est particulièrement préoccupante.

incluant des individus de cet élevage, afin de mieux cerner l'origine des populations relictuelles de la Vallée du Rhône. L'accent a aussi été mis sur l'analyse de la diversité génétique de ces populations dans le but d'affiner les stratégies de conservation de l'espèce déjà mises en place et futures.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) ECHANTILLONNAGES

En 2013, des échantillons buccaux contenant de l'ADN ont été prélevés sur 196 sonneurs à ventre jaune provenant de quatre populations valaisannes de taille moyenne à très grande (PELLET & *al.* 2012), ainsi que de quatre populations



Figure 2 - Sites d'échantillonnage des différentes populations sauvages analysées génétiquement. La ligne verte correspond à l'axe utilisé pour calculer la distance qui sépare Genève, le long de l'axe du Rhône, de chacune des populations sauvages.

vaudoises. En complément, des animaux provenant de l'élevage privé de Cerutti (qui pourrait être à l'origine de certaines populations) ont aussi été échantillonnés. Notons que ces prélèvements visaient également à mettre en évidence une éventuelle présence de la chytridiomycose (une maladie affectant les amphibiens dans le monde entier); en effet la présence de ce champignon dans l'élevage en aurait compromis l'usage pour d'éventuelles futures opérations de réintroduction.

L'échantillonnage des populations situées en rive droite du Rhône (Chablais vaudois) et au-delà au sein de l'Arc

Tableau 1 - Liste des sites échantillonnés en 2013.

N°	Lieu	Commune	Canton	Nombre échantillons	Echantillonneur
1	Châtelet	Port-Valais	VS	13	Drosera
2	Noyeraya	Monthey	VS	30	Drosera + R. Arlettaz
3	Mont d'Ottan	Martigny	VS	28	Drosera
4	Tsararogne	Chalais	VS	36	Drosera + R. Arlettaz
5	Élevage Cerutti			20	R. Arlettaz
6	Mossièrès	Bière	VD	23	J. Pellet
7	Roche	Roche	VD	25	J. Pellet
8	Gilamont	Vevey	VD	19	J. Pellet
9	Iles d'Aval	Ollon	VD	2	Drosera

lémanique était essentiel pour pouvoir comparer la diversité génétique des populations valaisannes avec des populations proches et moins isolées. Les sites échantillonnés sont présentés dans le **tableau 1** et la **figure 2**.

B) ANALYSES GÉNÉTIQUES ET INTERPRÉTATION DES DONNÉES

Les analyses génétiques ont été effectuées à l'aide de sept marqueurs microsatellites développés spécifiquement pour *Bombina bombina* et *Bombina variegata* (cf. **Annexe I** pour plus de détails sur les méthodes). Ces marqueurs ont d'abord été testés par différentes méthodes pour savoir s'ils étaient statistiquement utilisables. Afin d'évaluer la diversité génétique au sein des différentes populations échantillonnées (diversité intrapopulationnelle) et entre elles (diversité interpopulationnelle), plusieurs métriques ont été utilisées:

- Le niveau d'hétérozygotie attendu (H_e): correspond au niveau d'hétérozygotie calculé en fonction de la fréquence des différents allèles au sein de chaque locus.
- La richesse allélique A_r (nombre d'allèles pour un locus donné): plus le nombre d'allèles est élevé, plus la diversité génétique est grande.
- La proportion d'allèles rares (allèles privés): allèles présents uniquement dans une seule population échantillonnée; fournit un indice sur l'originalité génétique d'une telle population.
- Le niveau de fixation F_{IS} : mesure le niveau de structuration (différenciation des individus) au sein d'une population (intrapopulation) à partir du polymorphisme génétique. Une valeur de 0 indique que la population est homogène, alors que des valeurs significativement supérieures à 0 indiquent la présence d'une forte structuration ou de consanguinité au sein de cette population.
- La différenciation génétique entre les populations (interpopulation) par reconstruction phylogénétique: visualisation des distances génétiques entre les différentes

populations (par paire de populations) à l'aide d'un arbre phylogénétique qui permet de visualiser les liens d'apparementement entre les populations.

Les tests de significativité ont été opérés au moyen de simulations comptant 1000 permutations. De plus, la structure dans et entre les différentes populations a été évaluée au moyen du logiciel STRUCTURE qui permet de regrouper des individus ayant des similarités génétiques. Finalement, les résultats génétiques ont été analysés dans une perspective spatiale, au moyen de deux tests; 1) un test d'isolation par distance qui permet de déterminer si les populations géographiquement éloignées sont aussi plus distantes du point de vue génétique; 2) un test qui a consisté à déterminer si la distance d'une population par rapport à un gradient ouest-est traversant tout le bassin lémanique selon l'axe du Rhône (le point 0 ayant été placé à l'entrée du Rhône en ville de Genève) pouvait expliquer la diversité génétique observée au sein des différentes populations étudiées (voir **Fig. 2**).

RÉSULTATS

L'un des sept marqueurs microsatellites a montré des problèmes d'amplification lors de tests génétiques préliminaires et n'a donc pas été retenu pour le traitement statistique ultérieur. Globalement, une faible diversité génétique a été trouvée au sein de toutes les populations échantillonnées, avec toutefois une diversité plus importante dans les populations vaudoises par rapport aux populations valaisannes. Le second test le long du gradient géographique ouest-est montre que cette diversité génétique se réduit progressivement en direction du Haut-Valais (**Fig. 3**). La diversité génétique est nettement plus faible dans les populations des Iles d'Aval (Ollon) et Tsararogne (Chalais) que dans les autres populations (**Tab. 2**). Mais la très faible taille d'échantillon aux Iles d'Aval ($n = 2$) explique certainement cette faible diversité génétique sur ce site.

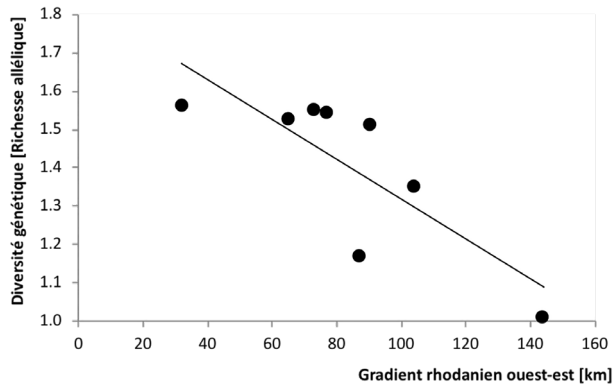


Figure 3 - Relation entre la diversité génétique observée dans une population donnée et la distance géographique de cette population selon un gradient ouest-est courant le long de l'axe du bassin rhodanien, allant de Genève (0) au Valais central. Ce graphique démontre que la diversité génétique au sein des populations de crapaud sonneur se réduit à mesure qu'on remonte le Rhône. $R^2 = 0.6422$; $p < 0.01$

Des allèles privés ont été détectés principalement dans la population captive (Cerutti), dans celle du Châtelet (Port-Valais) et dans une moindre mesure aux Mossières (Bière) (**Tab. 2**).

Les niveaux de fixation des allèles (F_{IS}) au sein des différentes populations sont limités et non significatifs. Ceci tendrait à indiquer que les unités échantillonnées

(parfois regroupant plusieurs étangs distants de quelques centaines de mètres) peuvent être considérées comme formant une seule population homogène, avec des échanges génétiques entre ces différents étangs.

La différenciation génétique la plus marquée apparaît au sein de la population de Tsararogne, caractérisée par une très faible diversité génétique (**Annexe 2**). Les relations entre les différentes populations, calculées sur la base de la distance génétique, montrent que les populations de Gilamont et de Roche (et dans une moindre mesure la population du Châtelet) sont proches des individus de l'élevage privé, suggérant qu'une partie des individus captifs pourraient provenir de ces populations (ou de populations génétiquement proches mais non échantillonnées et/ou aujourd'hui éteintes) ou que ces populations seraient en partie issues de lâchers opérés à partir de cet élevage.

Les populations de Tsararogne et des Iles d'Aval apparaissent étonnamment assez proches génétiquement, mais la faible taille d'échantillons récoltés sur le second site ($n = 2$ individus) ne permet de tirer aucune conclusion.

Tableau 2 - Diversité génétique évaluée via quatre métriques: H_e = niveau d'hétérozygoté estimé; A_r = richesse allélique (basée sur deux individus diploïdes); F_{IS} = niveau de fixation des allèles au sein des populations; proportion d'allèles privés.

Site	Canton	Nombre échantillons	H_e	A_r	F_{IS}	Allèles privés
Mossières	VD	23	0.286	1.562	0.113	0.167
Gilamont	VD	19	0.272	1.528	-0.226	0.000
Roche	VD	25	0.271	1.543	-0.155	0.000
Iles d'Aval	VD	2	0.083	1.167	0	0.000
Moyenne VD			0.228	1.450		
Noyeraya	VS	30	0.257	1.511	-0.088	0.000
Châtelet	VS	13	0.250	1.550	-0.131	0.500
Mont d'Ottan	VS	28	0.165	1.349	0.17	0.000
Tsararogne	VS	36	0.005	1.009	0	0.000
Moyenne VS			0.169	1.355		
Élevage Cerutti	-	20	0.305	1.633	0.087	0.500

Finalement, l'analyse avec le programme STRUCTURE n'a pas été en mesure de trouver des affinités entre les individus et les populations, probablement dû à un nombre limité de marqueurs et la faible variabilité de ceux-ci (**Annexe 3**).

DISCUSSION

De manière générale, la diversité génétique observée est plutôt faible dans toutes les populations étudiées, avec toutefois une diversité plus importante dans les populations vaudoises par rapport aux populations valaisannes, et qui diminue à mesure que l'on remonte le cours du Rhône (**Fig 3**). Cet appauvrissement génétique peut être interprété par différents phénomènes.

Une telle différenciation graduelle pourrait tout d'abord résulter de la dynamique historique de colonisation par le sonneur de la haute vallée du Rhône, en amont du Léman, à la suite des retraits glaciaires. La configuration génétique actuelle des populations étudiées, pour la plupart relictuelles, refléterait ainsi encore la situation qui prévalait avant le déclin de ce crapaud. Toutefois, cette diminution graduelle de la diversité génétique pourrait aussi être une simple conséquence de la fragmentation et de l'isolation progressive des populations suite à la destruction des habitats clefs et de leur perte de connectivité, particulièrement flagrante en amont du goulet de St-Maurice, au-delà duquel les populations sont plus particulièrement menacées.

C'est néanmoins dans une optique de conservation que nos résultats revêtent tout leur intérêt. Premièrement, la diversité génétique des populations valaisannes étudiées est faible à très faible, pour des raisons naturelles ou liées à l'homme. Ceci pose la question de leur survie à long terme vu leurs petites tailles et leur isolement actuel. En effet, les chances de survie d'une population sont généralement plus élevées lorsque sa diversité génétique est importante. Des opérations de supplémentation ou de translocation (par

exemple à partir de populations florissantes ou d'élevage) pourraient permettre d'y remédier. Cependant, ce type d'opération demeure délicat en raison des risques de transmission de maladies. Heureusement, les sonneurs valaisans sont, selon nos analyses, non infectés par la chytridiomycose (résultats non publiés). De telles opérations doivent toutefois tenir compte d'autres pathogènes aussi présents chez les amphibiens, tels que les ranavirus. Le risque représenté par l'ex-sanguinité («outbreeding depression») peut aussi fragiliser des populations lors de translocation: le croisement entre individus provenant de populations très différentes (de par leurs adaptations locales divergentes ou des patrimoines génétiques trop différents) pourrait produire des juvéniles non adaptés au site de lâcher, affaiblissant ainsi la population réceptrice des translocations (RALLS & *al.* 2013). En conséquence, tant que les populations ayant une faible diversité génétique semblent stables et pérennes, il est plus sûr de ne pas effectuer de tels apports artificiels.

Si de telles opérations clandestines ont déjà été menées en Valais, il est difficile de mesurer leur réelle contribution au statut actuel des populations. La faible diversité génétique de la population de Tsararogne pourrait indiquer un effet fondateur. Cerutti a reconnu récemment y avoir relâché des individus de son élevage (com. pers.). Cette population étant installée dans des suintements de versants (pertes d'eau d'un bisse se déversant en partie dans des gouilles récemment aménagées), personne n'est en mesure de dire si le sonneur existait autrefois sur ce site ou si cette population a été créée de toute pièce. Pour les autres sites échantillonnés, l'effet d'éventuels lâchers est loin d'être clair. Les analyses génétiques tendent à démontrer que si des sonneurs issus de captivité ont été relâchés dans certains sites, ceux-ci n'ont pas contribué de façon décisive à en améliorer la diversité génétique. Des lâchers à partir de, ou des prélèvements pour cet élevage, sont par contre possibles dans les populations vaudoises ou limitrophes, étant donné la proximité génétique entre les sonneurs captifs et ceux des populations de Gilamont et de

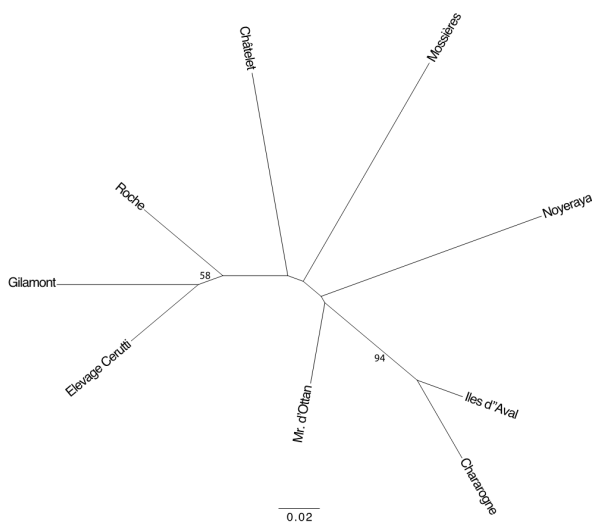


Figure 4 - Représentation phylogénétique des liens entre les différentes populations, estimés à partir de la distance génétique calculée selon la méthode de CAVALLI-SFORZA & EDWARDS (1967). Les valeurs indiquées représentent les deux seuls branchements significatifs, soit ceux dont les valeurs sont supérieures à 50% (technique du bootstrapping, $n = 1000$ itérations).

Roche (**Fig. 4**). Cette interprétation (lâchers peu nombreux et/ou peu efficaces) est corroborée par l'observation d'une baisse graduelle de la diversité génétique lorsque l'on remonte la Vallée du Rhône (**Fig 3**).

Il est donc clair que c'est sur la mise en place de mesures visant à préserver et améliorer l'habitat des populations résiduelles, ainsi que sur leur mise en réseau que devraient se focaliser tous les efforts de conservation et de gestion. Si ceci représente un réel défi dans la plaine du Rhône où l'utilisation moderne du sol crée autant de barrières quasiment infranchissables (agglomérations, zones artisanales et industrielles, cultures intensives, réseau de routes, etc.), il faut continuer à revaloriser les zones humides, comme déjà mis en œuvre en maints endroits de la plaine, en veillant à y créer des habitats ad hoc pour le sonneur à ventre jaune (ZANINI & COTTING 2014, FOURNIER 2017, ZANINI 2017, ZANINI & EVEQUOZ 2018). Dans cette optique, des opérations de supplémentation et de translocation ne seraient à envisager qu'en ultime recours, là où la connectivité n'aurait pas pu être

réinstaurée en raison d'une trop forte emprise humaine sur le territoire et là où la création de populations pérennes est garantie par la protection de l'habitat à long terme (réserve naturelle, zones protégées, etc...).

Une stratégie d'augmentation de l'offre en habitats et d'amélioration de leur connectivité a déjà été définie pour la plaine du Rhône (MARCHESI & ZANINI 2009a,b, MARCHESI & ZANINI 2010, MARCHESI 2012). Elle consiste d'une part à augmenter la capacité d'accueil au sein des populations relictuelles, ce qui passe forcément par des mesures de gestion pour augmenter les surfaces d'habitat favorable. Le sonneur est une espèce pionnière préférant les gouilles temporaires pour se reproduire (évitement de la prédation) et peu végétalisées, l'un accompagnant souvent l'autre. La grande difficulté est ici de maintenir une dynamique d'habitat suffisante pour disposer en permanence de milieux humides pionniers, comme le fait un système alluvial naturel. Souvent, les gouilles créées pour les sonneurs perdent leur attractivité quelques d'années après leur création. Il faut ici trouver des solutions ingénieuses pour proposer à l'espèce des milieux humides propices à moyen et à long terme en limitant au minimum les interventions de gestion nécessaires au maintien d'un habitat propice. Ainsi, la création de gouilles réduisant la colonisation par la végétation palustre semble essentielle. Il faut d'autre part multiplier les milieux favorables au sonneur entre les sites encore habités, en créant de véritables têtes de pont («stepping stones») pour permettre la dispersion de ce petit crapaud. Les analyses de MARCHESI & ZANINI (2009a, 2010) montrent où ces zones nodales clefs devraient être recrées en priorité. La conjonction de ces deux mesures (augmentation de la capacité d'accueil des populations actuelles; amélioration de la connectivité des sites ad hoc dans une perspective métapopulationnelle) sont les deux piliers de l'action visant à assurer la pérennité du sonneur à ventre jaune en Valais. Ils permettraient d'augmenter les effectifs et limiteraient les risques d'extinction locale suite à une destruction de sites ou des phénomènes stochastiques. En conclusion, la diversité génétique observée au sein des

populations de sonneurs étudiées montre que sa situation est préoccupante en Valais. Il est important de poursuivre et de renforcer les mesures de conservation de l'espèce mises en place ces dernières années sous l'égide du Service cantonal des forêts, des cours d'eau et du paysage qui semblent commencer à payer leurs fruits, notamment dans le Bas-Valais où des sites nodaux d'importance capitale pour l'espèce abritent de grandes à très grandes populations (PELLET & *al.* 2012, COTTING & ZANINI 2016a, EVEQUOZ & ZANINI 2018). En ce qui concerne le Valais central, le suivi et l'entretien de bacs de reproduction (JAGGI 2010) a également permis de localiser deux nouvelles populations de sonneur à ventre jaune qui semblaient éteintes (COTTING & ZANINI 2016b). Ces découvertes inopinées indiquent soit que des populations relictuelles ont réussi à survivre ici ou là en Valais central, soit que des introductions clandestines ont eu lieu au-delà de ce qui nous est connu. La longévité du sonneur étant élevée et son système de reproduction étant de type «pulse» (années avec forte reproduction efficace et années sans reproduction efficace; voir CAYUELA & *al.* 2019), la résilience de cette espèce à la dégradation de son habitat pourrait être plus élevée que nous le pensons. Dans cette éventualité, l'avenir du sonneur à ventre jaune en Valais central pourrait s'avérer moins incertain qu'il n'y paraît.

REMERCIEMENTS

Cette étude, réalisée entre 2013 et 2015 en partenariat entre le bureau d'études Drosera, les Universités de Bâle et de Berne et le karch a été soutenue financièrement par le Service cantonal des forêts, des cours d'eau et du paysage du Valais, ainsi que par la Fondation Ignace Mariétan de La Murithienne. Nous les en remercions vivement. Nos chaleureux remerciements vont également à Pierre-Louis Cerutti qui nous a fait part de ses nombreuses connaissances sur les sonneurs et nous a permis d'accéder à son élevage pour nos échantillonnages. Enfin, nous remercions toutes les personnes qui nous ont fait part de leurs observations et de

leur expérience sur le sonneur en Valais et en Suisse depuis de très nombreuses années. Finalement, nous remercions aussi Paul Marchesi qui nous a trop tôt quittés; sans lui ce projet n'aurait pu voir le jour. Il a consacré sa vie à l'étude et la sauvegarde de la biodiversité en Valais, notamment de ce petit crapaud qu'il affectionnait tant. Cet article lui est donc dédié.

BIBLIOGRAPHIE

- CAVALLI-SFORZA, L. L. & A. W. F. EDWARDS 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19: 233-257.
- CAYUELA, H., S. S. CRUICKSHANK, H. BRANDT, A. OZGUL & B. R. SCHMIDT 2019. Habitat-driven life history variation in an amphibian metapopulation. *Oikos* 00: 1-12, 2019.
- COTTING, S. & F. ZANINI 2016a. *Bilan du Monitoring des batraciens dans le Bas-Valais et Valais Central de 2013 à 2015*. Rapport du bureau Drosera SA. Service des forêts et du paysage, Sion.
- COTTING, S. & F. ZANINI 2016b. *Investigation sur la présence du sonneur à ventre jaune en Valais: Suivi et entretien des bacs en 2015*. Rapport du bureau Drosera SA. Service des forêts et du paysage, Sion: 11 pp. + annexe.
- DIXO, M., J. P. METZGER, J. S. MORGANTE & K. R. ZAMUDIO 2009. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation* 142: 1560-1569.
- EVEQUOZ, N. & F. ZANINI. 2018. *Monitoring des batraciens dans le Valais romand de 2016 à 2019. Compte rendu 2018*. Rapport du bureau Drosera SA. Service des forêts, des cours d'eau et du paysage. Sion: 16 pp. + annexe
- FALUSH, D., M. STEPHENS & J. K. PRITCHARD 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574-578.
- FOURNIER, J. 2017. *Etude du projet et suivi des travaux d'aménagement de mares à sonneur à Vernayaz*. Rapport du bureau Drosera SA. WWF.

- GOUDET, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- HAUSWALDT, J. S., C. SCHRODER & R. TIEDEMANN 2007. Nine new tetranucleotide microsatellite markers for the fire-bellied toad *Bombina orientalis*. *Molecular Ecology Notes* 7: 49-52.
- JAGGI, V. 2010. *Potential de colonisation de milieux artificiels et efficacité comparée de ces mesures pour le sonneur à ventre jaune*. Commune de Jussy, Gy et Presinge (GE). Thèse de Bachelor, HEPIA Lullier: 43 pp.
- LANGELLA, O. 1999. Populations v1.2.28. Version v1.2.28: available at <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>.
- MARCHESI, P. & F. ZANINI 2009a. *Plan d'action batraciens Valais*. Rapport du bureau Drosera SA. Service des forêts et du paysage, Sion: 74 pp. + annexes.
- MARCHESI, P. & F. ZANINI 2009b. *Recherche de la présence du sonneur en Valais central en 2009*. Rapport du bureau Drosera SA. Service des forêts et du paysage, Sion: 10 pp. + annexes.
- MARCHESI, P. & F. ZANINI 2010. *Plan d'action sonneur en Valais central. Monitoring 2010*. Rapport du bureau Drosera SA. Service des forêts et du paysage, Sion: 10 pp. + annexes.
- MARCHESI, P. 2012. *Réseau et monitoring des batraciens dans le Chablais (Martigny-Port-Valais)*. *Compte rendu 2012*. Rapport du bureau Drosera SA. Service des forêts et du paysage, Sion: 9 pp. + annexes.
- MERMOD, M., S. ZUMBACH, A. BORGULA, E. KRUMMENACHER, B. LÜSCHER, J. PELLET & B. R. SCHMIDT 2010. *Notice pratique pour la conservation du sonneur à ventre jaune Bombina variegata*. Centre de coordination pour la protection des amphibiens et reptiles de Suisse (KARCH), Neuchâtel.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- SCHMIDT, B. R. & S. ZUMBACH 2005. *Liste Rouge des amphibiens menacés en Suisse*. Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage (OFEP) & KARCH, Berne.
- PEAKALL, R. & P. E. SMOUSE 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- PELLET, J., A. BORGULA, J. RYSER & S. ZUMBACH 2012. *Inventaire fédéral des sites de reproduction de batraciens d'importance nationale. Evaluation des sites de reproduction de batraciens et définition des seuils nationaux*. OFEV: 7 pp.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS & P. DONNELLY 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- RALLS, K., R. FRANKHAM & J. D. BALLOU 2013. Inbreeding and outbreeding. In S. A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of biodiversity* (2nd ed., pp. 245-252). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- REY, A., B. MICHELLOD & K. GROSSENBACHER 1986. Inventaire des batraciens du Valais. Situation en 1985. *Bull. Murith*. 103/1985: 3-38.
- ROUSSET, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from f-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.
- STUCKAS, H. & R. TIEDEMANN 2006. Eight new microsatellite loci for the critically endangered fire-bellied toad *Bombina orientalis* and their cross-species applicability among anurans. *Molecular Ecology Notes* 6: 150-152.
- VAN OOSTERHOUT, C., W. F. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS & P. SHIPLEY 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- ZANINI, F. 2006. *Amphibian conservation in human shaped environments: landscape dynamics, habitat modeling and metapopulation analyses*. Thèse EPFL n° 3635, Lausanne: 180 pp.
- ZANINI, F. & S. COTTING. 2014. *Site à batraciens d'importance cantonale de Chararogne (VS 793)*. *Compte rendu du suivi des mesures de revitalisation*. Rapport du bureau Drosera SA. SFCEP.
- ZANINI, F. 2017. *Site à batraciens d'importance nationale de Malévoz (VS 476)*. *Compte rendu du suivi des mesures de revitalisation*. Rapport du bureau Drosera SA. SFCEP.
- ZANINI, F. & N. EVEQUOZ. 2018. *Décharge du Châtelet: suivi des travaux de réalisation des nouvelles mares pluviales*. Rapport du bureau Drosera SA. SATOM.

ANNEXES

Annexe I : Détail des méthodes utilisées

Des échantillons buccaux ont été prélevés sur 196 crapauds sonneurs provenant de 4 populations vaudoises, 4 populations valaisannes et des individus de l'élevage Cerutti. L'ADN a été extrait à l'aide du kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) selon le protocole fourni par le producteur. Sept locus microsatellites (Bobom5F, Bobom8A, Bobom9H, Bobom10F, BobomF2, BobomF22, BobomB13) développés par STUCKAS & TIEDEMANN (2006) et HAUSWALDT & *al.* (2007) ont été amplifiés par PCR pour déterminer la diversité génétique au sein des différentes populations. Les conditions PCR ont été légèrement adaptées par rapport aux conditions suggérées par STUCKAS & TIEDEMANN (2006) et HAUSWALDT & *al.* (2007). Les produits PCR ont ensuite été regroupés, analysés sur séquenceur (AB3130xl Applied Biosystems) et visualisés grâce à des primers fluorescents et à l'aide du logiciel PEAKSCANNER 1.0 (Applied Biosystem). Afin d'éliminer les loci pouvant contenir des allèles nuls (lesquels peuvent poser des problèmes lors de l'analyse), un test a été effectué avec MICROCHECKER v 2.2.2 (VAN OOSTERHOUT & *al.* 2004). Un éventuel lien entre les différents marqueurs génétiques ou un déséquilibre de Hardy-Weinberg a été testé avec FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET 1995) sur la base de 1000 permutations. La diversité génétique (mesurée par la richesse allélique) a aussi été calculée avec FSTAT. La recherche d'allèles rares ou uniques au sein d'une population a été effectuée avec GenAIEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE 2006). Les statistiques F ont été utilisées pour évaluer le degré

de fixation (F_{IS}) et la différenciation génétique entre les différentes populations (F_{ST}) et testées statistiquement sur la base de 1000 permutations. Afin de visualiser les relations génétiques entre les différentes populations, une reconstruction phylogénétique a été réalisée à partir des distances génétiques calculées selon CAVALLI-SFORZA & EDWARDS (1967) et mise en forme avec POPULATIONS (LANGELLA 1999). Le support des différentes branches a été testé avec 1000 bootstraps. Finalement, la structure entre les différentes populations a été évaluée à l'aide d'une méthode cherchant à regrouper des individus ayant des similarités génétiques avec STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD & *al.* 2000; FALUSH & *al.* 2007). Cette approche bayésienne a été testée avec un nombre de clusters (K) compris entre 1 et 10, avec 10 simulations pour chaque valeur de K et avec 600'000 simulations précédées par 300'000 simulations-tests.

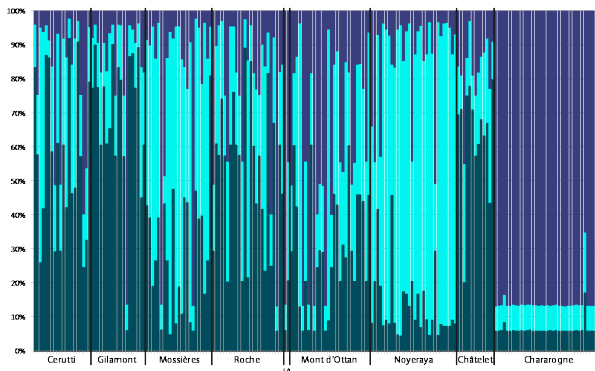
Au niveau géographique un test d'isolation par la distance (IBD) a été conduit selon la méthode décrite par ROUSSET (1997) en comparant la différenciation génétique corrigée ($F_{ST} / (1 - F_{ST})$) avec le log de la distance géographique à l'aide d'un test de Mantel (analyse conduite avec FSTAT, et la valeur de p a été déterminée par 10'000 randomisations). De plus, afin de tester si la diversité génétique observée pouvait être expliquée par la recolonisation post-glacière le long du Rhône, la position géographique de chaque population a été reportée le long du fil du Rhône, celui-ci servant de « ligne de référence ». Le point 0 a été placé à la fin du Lac Léman côté Genève. Cette distance a été comparée par régression linéaire avec la richesse allélique.

Annexe 2:

	Gilamont	Mossièrès	Roche	Iles d'Aval	Mont D'Ottan	Noyeraya	Châtelet	Tsararogne
Cerutti	0.0102	0.1117	0.0143	0.0584	0.0669	0.1488	0.0442	0.4307
Gilamont		0.1779	0.0972	0.2022	0.1658	0.222	0.1514	0.5271
Mossièrès			0.1707	0.0768	0.1784	0.1238	0.1445	0.4354
Roche				0.0724	0.0614	0.1686	0.033	0.3937
Iles d'Aval					-0.0516	0.1322	0.0689	0.5475
Mt. D'Ottan						0.1533	0.079	0.3433
Noyeraya							0.2058	0.4475
Châtelet								0.5231
Tsararogne								

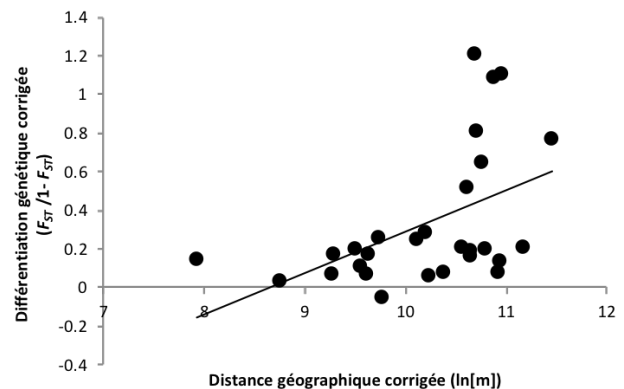
Niveau de différenciation entre les différentes populations (F_{ST}) calculé avec FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET 1995). En gras, les différences statistiquement significatives.

Annexe 3:



Résultats de l'analyse avec STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD & al. 2000; FALUSH & al. 2007); les simulations indiquent que le nombre de clusters le plus probable est 3 (résultat présenté ici: $K=3$). Chaque couleur représente un cluster différent, et chaque colonne représente 1 individu. IA correspond à la population d'Iles d'Aval.

Annexe 4:



Comparaison entre la distance géographique (corrigée par le logarithme naturel) et la différenciation entre les populations (corrigée par $F_{ST} / 1 - F_{ST}$) selon la méthode décrite par ROUSSET (1997) et calculé avec le programme FSTAT (GOUDET 1995). Chaque point correspond à un couple de populations. $R^2 = 0.239$; $p = 0.0083$.