



KARL-FRANZENS-UNIVERSITÄT



Institut für Zoologie



Diversité génétique de la population d'ombre commun de la Bourne

Henri PERSAT *, Kathrin WINKLER **, Steven WEISS **

* Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés UMR CNRS 5023, Bâtiment Forel, Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne, France

** Université Karl-Franzens, Institut de Zoologie, Universitätsplatz 2, A-8010 Graz, Autriche



2012



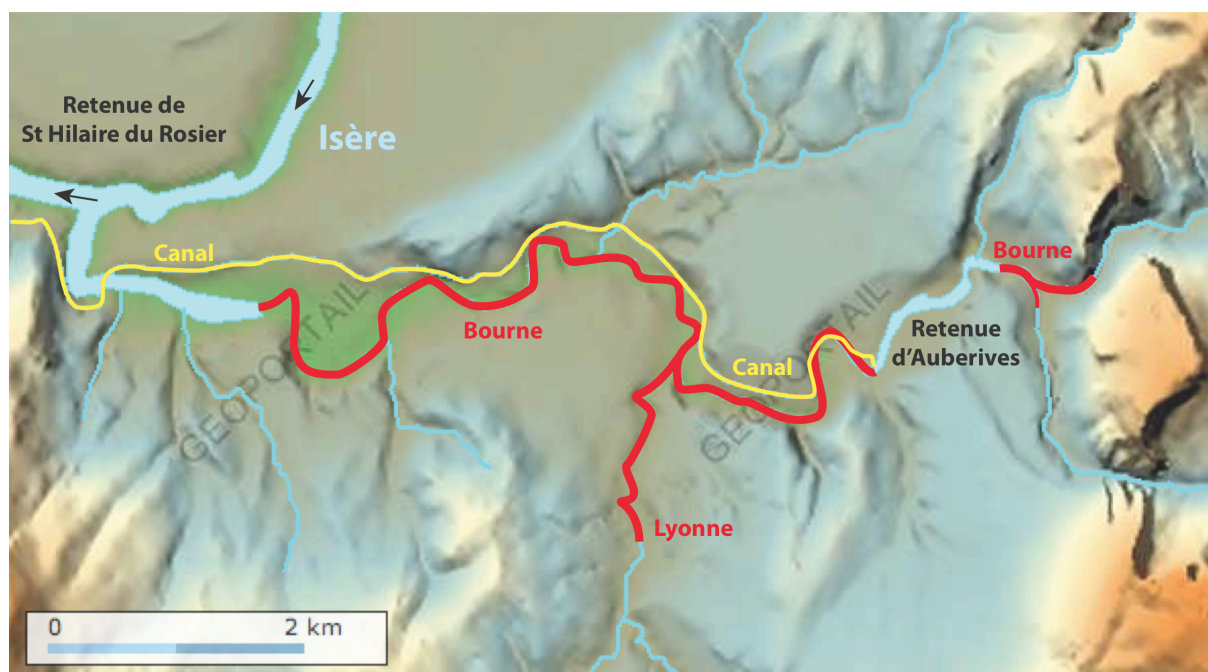


Figure 1 : Basse Bourne : plan de situation (fond de carte IGN-Géoportail). Aire de répartition de l'ombre commun dans la Bourne et la Lyonne (en rouge) et dans le canal de la Bourne (en jaune)

1. Introduction

L'ombre est une espèce autochtone, patrimoniale, à fort intérêt halieutique. Cependant, une nette régression de ses populations a été constatée sur la quasi-totalité de son aire de distribution en Europe de l'Ouest, ce depuis une vingtaine d'années environ. Ainsi, l'espèce est inscrite à l'annexe III de la convention de Berne, et classée comme étant vulnérable par l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature). En France, elle est mentionnée à l'annexe V de la directive habitat faune / flore de 1992, alors qu'en Suisse, elle est considérée comme menacée par l'ordonnance relative à la loi sur la pêche (OLFP RS. 923.01).

La conservation de cette espèce nécessite des plans de gestion adaptés, prenant en compte ses exigences écologiques, mais également ses caractéristiques génétiques, synonymes de « potentiel d'adaptabilité ». Or les nombreux repeuplements auxquels l'espèce a été soumise, ainsi que les obstacles aux libres déplacements des individus, peuvent avoir généré des perturbations de la structure génétique des populations, compromettant leur persistance à long terme.

Dans ce contexte, il nous paraît important de connaître la structure génétique de nos populations. Les études sur l'écologie de l'ombre ont mis en évidence une distribution très fragmentée, morcelée (Persat 1996), et qui, depuis, a encore beaucoup évolué (Persat 2011). L'analyse des allozymes avait révélé un fort effet de la fragmentation de l'habitat et des repeuplements sur la structure et la diversité génétiques des populations du Rhône savoyard (Persat and Eppe 1997). Avec l'évolution très récente des méthodes d'analyse moléculaire, nous disposons aujourd'hui d'outils très performants, modernes, nous permettant d'appréhender des dysfonctionnements au sein des populations à des échelles de temps et d'espace relativement réduites (Grès et al. 2006).

Dans ce contexte, le présent projet vise à :

- ***Estimer la "valeur patrimoniale" de la population de la Bourne sur la base des taux d'introgression de gènes exotiques ;***
- ***Evaluer les impacts de la fragmentation du continuum aquatique sur la structure génétique des populations ;***
- ***Proposer, si nécessaire, des mesures de gestion appropriées aux caractéristiques génétiques des populations en place.***

Contexte local :

La population d'ombre commun de la Bourne occupe un linéaire de quelques kilomètres à la sortie du massif du Vercors, juste avant sa confluence avec l'Isère. Depuis la construction des barrages sur l'Isère, cette population n'a plus de relations avec les éventuelles populations subsistantes plus en amont sur le bassin de l'Isère. Elle est elle-

même scindée en deux par le barrage de Auberives-en-Royans, avec une belle population en amont sur le tout petit parcours de Pont-en-Royans à l'entrée de la retenue, et une population plus clairsemée du pied du barrage de Auberives jusqu'à l'entrée de la retenue de Saint Hilaire du Rosier, en amont de Saint Nazaire, soit environ 5 km, plus le bas cours de son affluent, la Lyonne (Barry 2009). Il convient toutefois de signaler la présence régulière d'individus sur plusieurs kilomètres dans le canal d'irrigation de la Bourne alimentée depuis la retenue d'Auberives (figure 1).

Cette population a régulièrement fait l'objet d'opérations de soutien par alevinages depuis 1980, complétées ces dernières années par transfert dans la rivière des poissons récupérés dans le canal de la Bourne lors de sa mise en chômage technique hivernal (tableau I). Ces alevinages portent principalement sur le tronçon en aval du barrage d'Auberives qui souffre de débits réservés très faibles et d'une raréfaction des frayères.

Tableau I : Empoisonnements en Ombre commun dans la Bourne (données Fédération de Pêche de l'Isère)

date	nombre	stade	remarques	origine
25/11/80	3000	1été	attribution CSP	
14/10/81	5500	1été	attribution CSP	
13/11/82	4200	1 été	attribution CSP (3000)	
année 1983	néant			
22/10/84	3300	1été	attribution CSP (3000)	
année 1985	néant			
23/10/86	4000	1été	attribution CSP (3000)	
19/10/87	3000	1été	attribution CSP (3000)	
24/10/88	500	1 été		
02/11/89	3000	1 été	attribution CSP (3000)	
27/10/90	1000	1 été		
année 1991	néant			
année 1992	néant			
28/10/93	3000	1 été	attribution CSP (3000)	
année 1994	néant		<i>Le nombre de prises devenant de plus en plus faible il a été décidé de reprendre les campagnes de repeuplement</i>	
année 1995	néant			
année 1996	néant			
année 1997	néant			
année 1998	néant			
04/11/99	3000	1 été		Chauvey (pisciculteur)
06/11/00	3000	1 été		Chauvey (pisciculteur)
29/11/01	3000	1 été		Chauvey (pisciculteur)
17/12/02	3000	1 été		Chauvey (pisciculteur)
28/11/03	3000	1 été		Chauvey (pisciculteur)
	250	2 étés	(aval confluent Lyonne)	Chauvey (pisciculteur)
21/10/04	3000	1 été	(300 lac de Pont-en-Royans)	Chauvey (pisciculteur)
18/10/05	3000	1 été	(300 lac de Pont en Royans)	Chauvey (pisciculteur)
26/10/06	3000	1 été		Chauvey (pisciculteur)
	981	1-2 étés	récupération par pêche du canal de la Bourne	
22/10/07	3000	1 été		Chauvey (pisciculteur)
23-25/10/2007	1096	1-2 étés	récupération par pêche du canal de la Bourne	patrimoine
13-14/10/2008	1539	1-2 étés	récupération par pêche du canal de la Bourne	patrimoine
23/10/08	3000	1 été		Chauvey (pisciculteur)
12/09/09	3000	1 été		Besse Puy-de-Dôme
	1574	1-2 étés	récupération par pêche du canal de la Bourne	patrimoine
2010	3000			Besse Puy-de-Dôme
15/10/10	1221	1-2 étés	récupération par pêche du canal de la Bourne	patrimoine

Limite amont : Confluent de la Vernaizon (lac de Pont en Royans)

Limite aval : Confluent avec l'Isère

Echantillonnage :

Pour établir le profil génétique de la population d'ombre commun de la Bourne, le protocole prévoyait l'analyse de 40 individus.

Pour ce faire, nous avons profité des pêches annuelles de sauvetage du canal de la Bourne en octobre 2010 pour collecter des bouts de nageoires sur 40 poissons. La plupart de ces individus étaient des jeunes de l'année mesurant de 11 à 15,7 cm (moyenne 13,6 cm). Nous avons pu toutefois récupérer 8 individus plus âgés, dont plusieurs présentaient des déformations de la colonne vertébrale.

Contrairement à l'individu présenté en couverture (seule bonne photo disponible), les ombres de la Bourne ont tendance à être fortement voire très fortement ponctués (de 30 à plus de 100 taches sur les flancs).

Les prélèvements de bouts de nageoires ont été conservés dans des micro-tubes remplis d'alcool à 95° et expédiés au laboratoire autrichien pour analyses (voir l'annexe technique pour les détails).

Analyses génétiques

Les analyses ont été effectuées par le Dr Kathrin Winkler sous la direction du Pr Steven WEISS à l'Institut de Zoologie de l'Université de Graz, en Autriche. Ce laboratoire possède une longue expérience en termes d'analyses génétiques sur le genre *Thymallus* (cf Grès et al. 2006), le Pr WEISS étant spécialiste en phylogéographie des poissons et plus spécialement en conservation des populations de salmonidés.

Les analyses génétiques portent sur deux matériels différents :

- d'une part, l'ADN mitochondrial pour identifier la ou les lignées évolutives présentes dans la population. Le séquençage de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial étant une opération assez onéreuse, il n'a été pratiqué que sur un sous-échantillon de 13 individus;
- d'autre part, les microsatellites de l'ADN nucléaire pour mettre en évidence des différenciations génétiques à des échelles de temps et d'espace beaucoup plus fines, pouvant résulter d'une fragmentation récente de l'habitat, ou des alevinages. L'analyse a porté sur 12 microsatellites et 39 individus, un des prélèvements s'étant avéré mauvais.

Pour situer la population de la Bourne par rapport aux populations avoisinantes, les résultats ont été comparés à ceux obtenus sur la population de la basse rivière d'Ain, celle de la pisciculture de Chazey-Bons, celle du Rhin en aval du lac de Constance, et celle du Danube autrichien.

L'origine des poissons analysés et leurs effectifs sont précisés dans le tableau II.

Tableau II : Populations considérées avec leur origine et le nombre d'individus analysés pour les microsatellites et l'ADN mitochondrial.

Population	Origine	Cours d'eau	N (μSats)	N (ADNmt)
AIN	Mollon	Ain	43	15
BOURNE	Auberives	Canal de la Bourne	39	13
CHAZEY-BONS	Chazey-Bons	Furans	40	10
DANUBE	Autriche	Danube	29	1
RHIN	Stein-Schaffhouse en aval de la chute	Rhin	54	3

ADN mitochondrial

Les 13 individus séquencés sur la Bourne se sont révélés tous porteurs d'un seul et unique haplotype mitochondrial, codé Rh1. Ce dernier est très commun dans le bassin du Rhône. C'est par exemple le plus fréquent des 4 observés dans la basse rivière d'Ain (figure 1). Par contre, il est plus rare dans la souche de Chazey-Bons où domine l'haplotype Ht4 (figure 2) qui toutefois n'en diffère que d'une seule paire de bases (figure 3). Cette figure montre que les 4 haplotypes "rhodaniens" se distinguent bien des deux haplotypes observés dans le Rhin et sont très éloignés de celui présent dans l'échantillon du Danube autrichien.

On peut en déduire que la population de la Bourne est bien du type rhodanien, mais ne porte pas trace à ce niveau d'une contribution de la souche Chazey-Bons. Le fait de n'avoir trouvé qu'un seul haplotype indique une faible diversité génétique, à mettre sans doute en relation avec la petitesse et l'isolement de cette population.

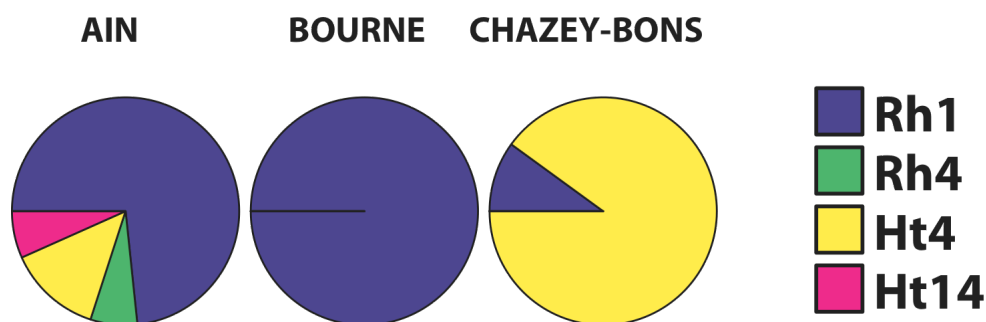


Figure 2 : Fréquences relatives des haplotypes Rh1, Rh4, Ht4 et Ht14 dans les échantillons de la basse rivière d'Ain, de la Bourne et de Chazey-Bons.

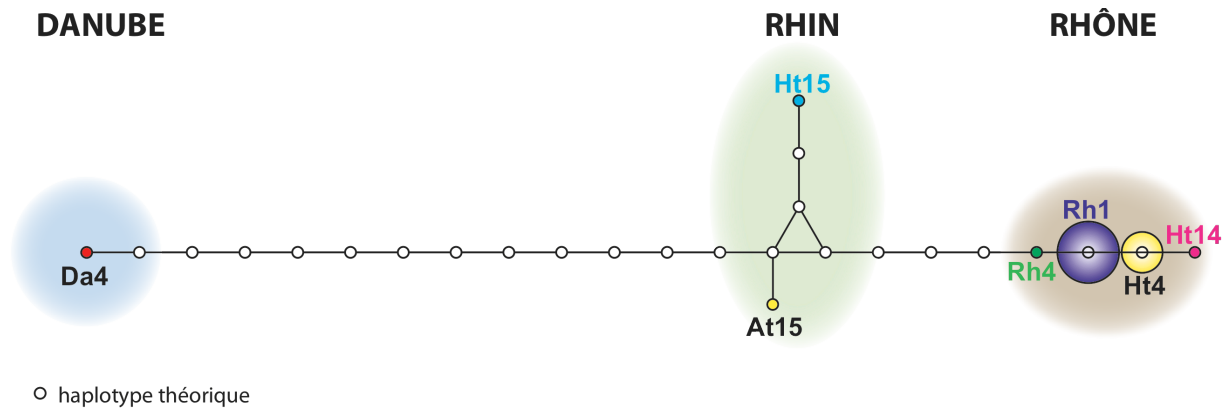


Figure 3 : Distances relatives entre les haplotypes rhodaniens observés (Rh1, Rh4, Ht4 et Ht14), deux haplotypes rhénans (Ht15 et At15) et un haplotype autrichien (Da4). Chaque segment correspond à une mutation (un changement de paire de bases). Pour les 4 haplotypes rhodaniens, la surface des cercles correspond à leur fréquence dans le jeu de données (Ain+Bourne+Chazey-Bons).

Microsatellites

Les résultats des analyses microsatellites sont compilés à l'échelle des populations dans le tableau III.

Le nombre total d'allèles observés en moyenne dans la Bourne (Richesse allélique de 5,6) apparaît bien inférieur à ceux observés dans les autres population où cet indice varie de 8,7 (Chazey) à 12,9 (Ain). Par contre la population présente un bon équilibre Hardy-Weinberg, ce qui indique qu'elle est parfaitement mélangée. Ce n'est par contre pas le cas pour celle de Chazey-Bons où 4 microsatellites sur 12 présentent une distribution allélique déséquilibrée, et à un moindre degré pour celle du Rhin germano-suisse où seul un microsatellite s'écarte de l'équilibre.

L'analyse des correspondances permet de visualiser à l'échelle des individus la structure des populations.

Le premier facteur de l'analyse, en horizontal sur le plan factoriel F1xF2 (figure 4) est entièrement consacré à l'exclusion de la population du Danube de toutes les autres, ce qui confirme les résultats de l'analyse de l'ADNmt. Le second facteur de l'analyse, en vertical, oppose la population de la Bourne à celle du Rhin, de part et d'autre d'un ensemble Ain-Chazey-Bons.

Le plan factoriel F3xF2 (figure 5 en haut) permet de mieux apprécier cette dernière structure, tout en neutralisant la contribution de la population du Danube (ramenée au centre de l'analyse). Le troisième facteur, en horizontal, tend à mieux séparer la population de Chazey-Bons de celle de l'Ain. La faible dispersion des points (individus) sur la Bourne indique que cette population est très homogène

Le 4ème facteur de l'analyse (plan F4xF3, figure 5 en bas), toujours en horizontal, parvient quant à lui à clairement séparer les individus de Chazey-Bons de ceux de l'Ain, les deux nuages de points ne se recoupant pratiquement pas.

L'efficacité avec laquelle l'analyse des microsatellites sépare les individus de chaque population indique que chacune a son identité propre. Celle du Danube est naturellement la plus exotique, mais celles du Rhin et de la Bourne se distinguent complètement du couple Ain Chazey-Bons au sein duquel la plupart des individus

peuvent être classés correctement d'après leur profil génétique. Ceci est confirmé par les valeurs de F_{st} toutes significatives, même entre l'Ain et Chazey-Bons (Tableau IV).

Tableau IV : Estimation des distances génétiques F_s prises deux à deux entre les cinq populations considérées : toutes les valeurs sont significatives à une probabilité inférieure à 0,001.

Population	AIN	BOURNE	CHAZEY	DANUBE
AIN	-			
BOURNE	0.24	-		
CHAZEY	0.08	0.25	-	
DANUBE	0.25	0.34	0.21	-
RHIN	0.23	0.37	0.23	0.29

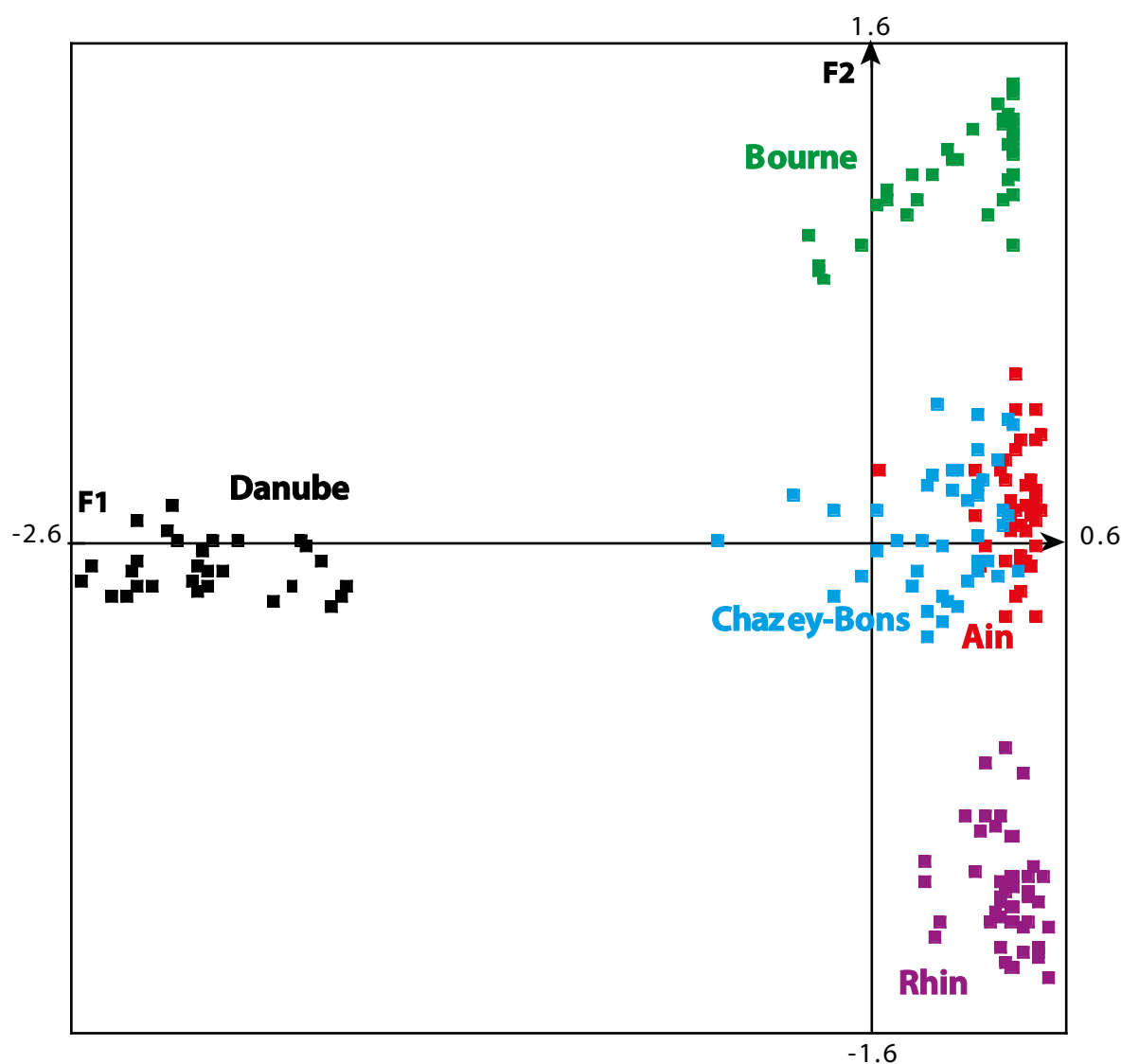


Figure 4 : Plan factoriel F1xF2 de l'analyse factorielle des correspondances des profils génétiques microsatellites de 208 ombres appartenant à 5 populations : chaque point correspond à un individu, chaque couleur à une population.

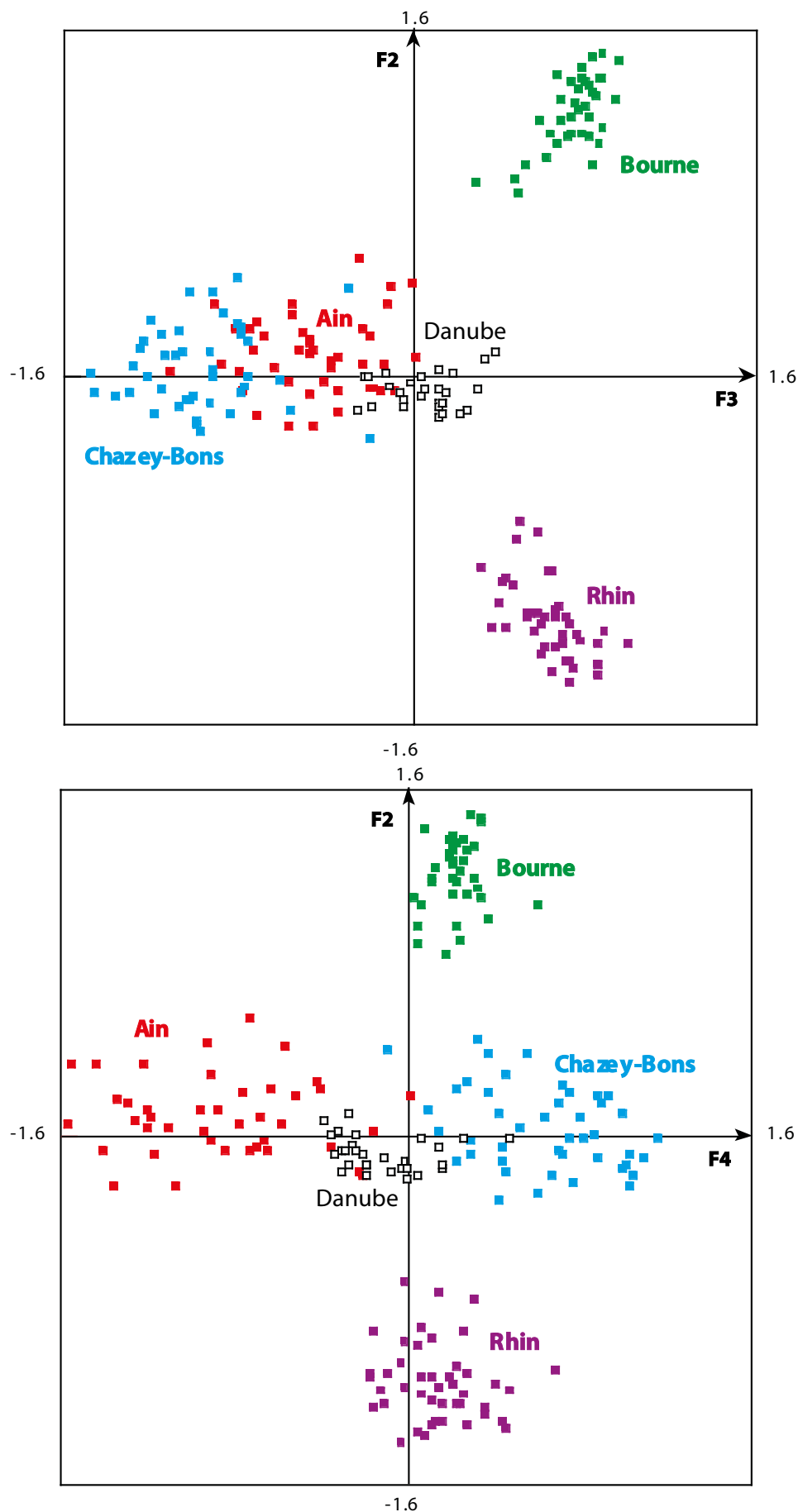


Figure 5 : Plans factoriel F3x2 (en haut) et F4x2 (en bas) de la même analyse.

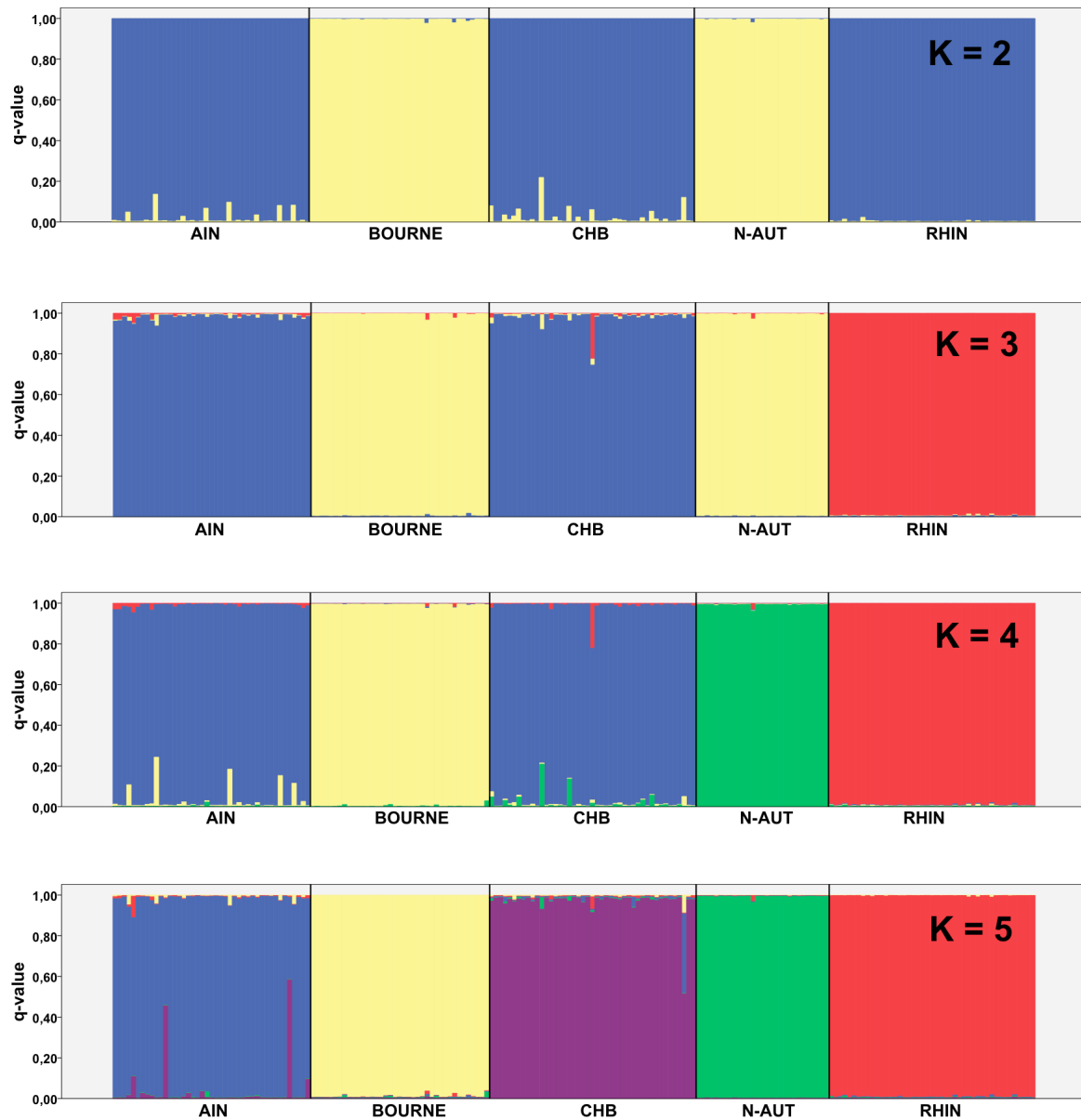


Figure 6 : Diagramme de répartition des individus selon un nombre croissant de partitions (chaque barre colorée correspond à un individu, chaque couleur à un groupe). Le degré d'appartenance de chaque individu à un ou plusieurs groupes se voit à sa couleur homogène ou plus ou moins hétérogène.

Tableau V : Statistiques de la pertinence de la partition selon les différentes valeurs de K

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	3	-9840,000	0,361	n.a.	n.a.	n.a.
2	3	-8711,167	3,215	1128,833	584,967	181,975
3	3	-8167,300	70,848	543,867	29,133	0,411
4	3	-7652,567	1,343	514,733	310,167	230,971
5	4	-7448,000	1,175	204,567	216,567	184,354
6	3	-7460,000	1,868	-12,000	3,433	1,838
7	3	-7468,567	1,320	-8,567	n.a.	n.a.

n.a. : non applicable

Le traitement du même jeu de données avec le logiciel "Structure" permet de vérifier le classement des individus au sein des populations.

L'analyse découpe successivement et arbitrairement le jeu de données en deux, trois, quatre, K groupes d'individus et teste la pertinence de ce découpage, tout en mettant en évidence le degré d'appartenance de chaque individu à chaque groupe. En sortie graphique, chaque individu se voit attribuer une ou plusieurs couleurs selon qu'il comporte des traits génétiques susceptibles d'être rapportés à l'un ou plusieurs groupes.

Les valeurs du Delta K (tableau V) indiquent que les partitions en trois ou au-delà de 5 groupes ne correspondent à rien. La figure 6 permet d'illustrer le résultat du classement.

Si la partition en 4 groupes (associant Ain et Chazey-Bons) correspond bien à ce que suggérait d'entrée l'analyse factorielle des correspondances, il est évident que celle en cinq groupes correspondant aux cinq populations étudiées, et donc distinguant Chazey-Bons de l'Ain est encore plus légitime (figure 5). D'ailleurs le très faible nombre d'individus de l'une de ces deux populations porteurs de traces significatives de l'autre (un de Chazey-Bons partiellement en bleu, et principalement deux de l'Ain partiellement en violet) confirme l'indépendance de ces deux populations malgré leur voisinage génétique et géographique.

Une partition en 6 groupes aurait pu apparaître si une de nos cinq populations avait été constituée de deux sous-populations distinctes, ce qui à l'évidence n'est pas le cas ici (Delta de K = 6 anecdotique).

Conclusion :

L'analyse génétique de la population d'ombre commun de la Bourne selon deux types de marqueurs congruents, nucléaires et mitochondriaux, montre que l'on a affaire à une **population homogène quoique que relativement peu diversifiée**. Cette population appartient sans l'ombre d'un doute à l'ensemble populationnel rhodanien, sans pour autant présenter le moindre indice d'hybridation avec l'une des deux populations voisines considérées (Ain et Chazey-Bons). Elle ne porte pas non plus de traces d'éventuelles contributions des génotypes rhénans ou danubiens qui ont pu être introduits avec les nombreux alevinages pratiqués dans cette rivière au cours de ces dernières décennies. Cette constatation ne s'applique pas forcément au secteur en aval du barrage d'Auberives, puisque tous nos échantillons provenaient du canal de la Bourne, donc issus de la population de Pont-en-Royans. La section aval, plus régulièrement alevinée mériterait d'être également analysée, d'autant plus qu'elle est susceptible de voir sa situation s'améliorer avec une prochaine augmentation des débits réservés et la restauration de la continuité hydrologique avec la construction d'une échelle à poissons sur le barrage d'Auberives.

En attendant, dans la limite de nos connaissances actuelles, et sous réserve de la découverte ultérieure, bien improbable, d'une population identique quelque part dans le bassin du Rhône, nous devons considérer la population d'Ombre commun de la Bourne comme une **population native, originale**, et donc à **haute valeur patrimoniale**. En conséquence, il est indispensable d'adopter un **mode de gestion adapté à la conservation** de cette population, **et surtout de son milieu**, de façon à ne pas prendre le risque de perdre une population **unique** et donc **irremplaçable**.

ANNEXE TECHNIQUE

Analyse de l'ADN mitochondrial (ADN_{mt})

La région de contrôle de l'ADN mitochondrial (ADN_{mt}) a été amplifiée par PCR avec les amorces LRBT-25 et LRBT-1195, initialement publiées par Uiblein *et al.* (2001), avec les conditions décrites dans Froufe *et al.* (2005). Alors que la totalité de la région de contrôle avait initialement été ciblée (soit environ 1082 paires de bases), nous avons rencontré des difficultés d'amplification dans la deuxième partie (côté 3') à cause d'une séquence répétée impliquant 82 paires de bases. Afin d'outrepasser ce problème, nous avons adapté la stratégie d'amplification utilisée en démarrant la réaction par la première moitié (côté 5') de la région de contrôle avec les amorces LRBT-25 et INT-5' (5'- ATA TAA GAG AAC GCC CGG CT - 3'), puis amplifié la seconde moitié (côté 3') avec une amorce nouvellement conçue (CRint3F; 5' - GAA ACC ACT CAC TGA AAG CCG - 3') et HN20 (5'- GTG TTA TGC TTT AGT TAA GC - 3') (Bernatchez & Danzmann 1993).

Les fragments d'ADN ont été purifiés à l'aide d'ExoSAP-IT et séquencés (BigDye, ABI PRISM 3130xl capillary genotyper). Les séquences d'ADN_{mt} ont été éditées, combinées, et alignées avec 62 haplotypes publiés (Weiss *et al.* 2002, Gum *et al.* 2005) à l'aide de MEGA 5.6.1 (Tamura *et al.* 2007). La liaison potentielle entre les allèles microsatellites et l'ADN_{mt} a été testée en utilisant FSTAT, en opérant un recodage des haplotypes uniques en variables muettes. Les relations phylogénétiques entre haplotypes ont été évaluées par le maximum de vraisemblance tel qu'implémenté dans RAxML 7.0.4 (Stamatakis *et al.* 2006). La pertinence des noeuds de la topologie ainsi construite a été évaluée par *bootstrap* (1000 réplicats).

Extraction de l'ADN et analyses des microsatellites

L'ADN génomique des individus a été extrait à l'acétate d'ammonium concentré selon le protocole de Miller *et al.* (1988) modifié. La variation allélique a été recherchée pour 12 loci microsatellites (*Thy1*, *Thy54*, *Thy62*, *Tth447*, *Tar101*, *Tar104*, *Tar106*, *Tth213*, *Tth305*, *Tth446*, *Tth414*, *Tth445*). Quatre loci di-nucléotides et 8 loci tétra-nucléotides ont été combinés dans deux réactions PCR de 6 loci chacune. Chaque mélange de 10 µl était constitué de 10-100 ng d'ADN, de 0.2 µM de chaque amorce, de 5 µl 2x Type-it Multiplex PCR Master Mix (QUIAGEN) et d'eau. Les procédures pour la PCR étaient conformes aux recommandations du constructeur, et sont disponibles auprès des auteurs sur demande.

Le nombre d'allèles par locus (AN), et les taux d'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e) ont été calculés à l'aide du logiciel GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.* 1996-2004). La richesse allélique par locus (AR) et les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg (F_{IS} par population) ont été calculés en utilisant FSSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 2001). Le logiciel MicroChecker (van Oosterhout *et al.* 2004) a été utilisé pour vérifier la présence potentielle d'allèles nuls. Le déséquilibre de liaison (LD) à l'échelle de la population a été testé en utilisant FSSTAT avec 12 000 permutations. La signification statistique des tests a été évaluée après correction des probabilités par la méthode de Bonferroni.

La structure génétique des populations a été analysée à différents niveaux afin de mettre en évidence la variabilité de la façon la plus optimale.

Analyses statistiques

Le degré de différenciation entre les populations a été quantifié par F_{ST} et R_{ST} , calculés par FSSTAT GenAlEx 6.4 (Peakall & Smouse 2006).

Une analyse factorielle des correspondances (AFC ; selon les recommandations de She *et al.* (1987) dans GENETIX 4.05) a été réalisée afin de représenter graphiquement les relations génétiques entre individus. Les deux premiers axes ont été conservés. Un code couleur permet de visualiser l'appartenance de chaque individu à sa population d'origine.

La structure génétique des populations a également été explorée par une approche Bayésienne de classification, réalisée à l'aide de STRUCTURE ver. 2.3.3. (Pritchard *et al.* 2000). Cette approche définit « K » sous-populations (« clusters », classes), en assignant les individus à des groupes en équilibre de Hardy-Weinberg, sans information *a priori* sur leur appartenance à une population.

Références

- Barry, S., 2009 : *Historique des populations d'ombres commun, Thymallus thymallus (L.1758), sur le bassin de l'Isère, suivi de la fraie et de l'émergence des alevins sur la Bourne*. Rapport Master 1 BEE, Université de Grenoble, 15p.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., and Bonhomme F. 1996–2004. *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations* , Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bernatchez, L and Danzmann G. 1993. Congruence in control-region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Molecular Biology and Evolution*, **10**: 1002-1014.
- Froufe, E., Knizhin, I., and Weiss, S. 2005. Phylogenetic analysis of the genus *Thymallus* (grayling) based on mtDNA control region and ATPase 6 genes, with inferences on control region constraints and broad-scale Eurasian phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34**: 106-117.
- Goudet, J. M. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3), <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> (updated from Goudet 1995).
- Grès P., Persat H., Weiss S., Kopun T., 2006. *Etude des populations d'Ombre commun du Forez, sur l'Ance du Nord, le Lignon du Forez et l'Aix. Caractérisation Génétique et Dynamique des Populations*. Rapport Fédération de Pêche de la Loire, 102p. + annexes.
- Gum, B., Gross, R., and Kuehn, R. 2005. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of European grayling (*Thymallus thymallus*): evidence for secondary contact zones in central Europe. *Molecular Ecology*, **14**: 1707-1725.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **16**: 1215.
- Peakall, R., and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288-295.
- Persat, H. 1996. Threatened populations and conservation of the European grayling *Thymallus thymallus* (L., 1758). In *Conservation of Endangered Freshwater Fish in Europe*. Edited by A. Kirchhofer and D. Hefti. Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 233-247.
- Persat H., 2011 : L'ombre commun. In Keith et al. 2011, *Les poissons d'eau douce de France*. MNHN, Collection Inventaires @ Biodiversité, Biotope Editions, p.413-415.
- Persat, H., and Eppe, R. 1997. Alevinage, pollution et cloisonnement de l'espace fluvial dans les structures génétiques des populations de poisson: l'ombre commun, *Thymallus*

thymallus, dans le Rhône au niveau de la Savoie. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **70**(344-45): 287-299.

Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**: 945-959.

She, J.X., Autem, M., Kotulas, N., Pasteur, N., and Bonhomme, F. 1987. Multivariate analysis of genetic exchanges between *Solea aegyptiaca* and *Solea senegalensis* (Teleosts, Soleidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **32**: 357-371.

Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, **22**: 2688-2690.

Takezaki, N, and Nei, M. 1996, Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, **144**: 389-399.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.

Uiblein, F., Jagsch, A., Honsig-Erlenburg, W., and Weiss, S. 2001. Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters. *Journal of Fish Biology* **59**(sA): 223-247.

van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., and Shipley P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**: 535-538.

Weiss S., Persat H., Eppe R., Schlötterer C., Uiblein F., 2002. Complex pattern of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region. *Molecular Ecology*, **11**: 1393-1407.

Tableau III : Résumé des résultats statistiques sur 12 microsatellites dans chaque population. Nombre d'individus (N), number d'allèles (AN), richesse allèlique (AR), amplitude allèlique (R), hétérozygotité observée (H_O) et théorique (H_E), et valeurs de F_{IS} values pour chaque population. Un astérisque * signale une déviation significative de l'équilibre d'Hardy-Weinberg calculé sur 12 000 permutations.

	N		Tar101	Tar106	Thy1	Thy62	Tth445	Tth447	Tar104	Tth213	Tth305	Tth414	Thy54	Tth446	Total
AIN Mollon	43	AN	14	10	10	5	23	8	20	15	15	19	11	8	158
		AR	14.0	9.8	9.9	5.0	22.6	7.6	19.4	14.7	14.7	18.5	10.7	7.9	12.9
		R	208-318	239-283	113-157	188-208	385-208	154-190	156-286	278-348	282-350	366-557	189-211	215-259	-
		H_O	0.711	0.698	0.821	0.333	0.902	0.293	0.738	0.829	0.829	0.781	0.833	0.738	0.709
		H_E	0.846	0.757	0.794	0.384	0.937	0.266	0.896	0.853	0.782	0.789	0.849	0.780	0.746
		F_{IS}	0.173	0.090	-0.021	0.145	0.049	-0.087	0.188	0.040	-0.048	0.024	0.030	0.089	0.062
BOURNE Canal	39	AN	7	6	5	6	8	4	8	6	5	4	5	4	68
		AR	7.0	6.0	4.9	5.8	7.8	4.0	7.8	5.8	4.9	3.9	4.8	3.9	5.6
		R	208-278	199-301	117-139	188-224	361-483	152-170	148-291	286-352	282-382	352-410	171-195	227-247	-
		H_O	0.486	0.897	0.231	0.744	0.821	0.564	0.684	0.539	0.605	0.744	0.211	0.282	0.567
		H_E	0.565	0.768	0.256	0.671	0.796	0.494	0.640	0.470	0.622	0.606	0.239	0.389	0.543
		F_{IS}	0.154	-0.156	0.111	-0.096	-0.018	-0.129	-0.057	-0.133	0.041	-0.214	0.131	0.287	-0.031
CHAZEY- BONS	45	AN	9	14	10	8	13	7	15	15	6	14	12	6	129
		AR	8.4	11.1	8.7	6.3	9.6	5.9	11.4	12.0	6.0	10.6	8.7	5.4	8.7
		R	200-322	175-293	109-157	188-230	365-525	156-188	148-277	278-348	284-382	348-538	173-231	227-279	-
		H_O	0.522	0.923	0.585	0.571	0.738	0.571	0.900	0.878	0.647	0.575	0.833	0.378	0.677
		H_E	0.819	0.862	0.800	0.609	0.797	0.624	0.874	0.885	0.794	0.814	0.776	0.742	0.783
		F_{IS}	0.382*	-0.058	0.280*	0.073	0.084	0.096	-0.017	0.020	0.214	0.305*	-0.061	0.500*	0.150*
DANUBE	29	AN	14	8	5	6	12	6	8	14	n.a	n.a	8	n.a	81
		AR	14.0	8.0	4.9	5.9	11.5	5.7	7.8	13.6	n.a	n.a	7.9	n.a	8.8
		R	208-354	175-215	109-141	202-224	357-427	152-176	148-255	318-376	n.a	n.a	171-229	n.a	-
		H_O	0.923	0.862	0.690	0.655	0.724	0.699	0.786	0.536	n.a	n.a	0.750	n.a	0.735
		H_E	0.888	0.831	0.606	0.698	0.726	0.565	0.674	0.854	n.a	n.a	0.727	n.a	0.730
		F_{IS}	-0.020	-0.020	-0.120	0.079	0.020	-0.203	-0.148	0.388*	n.a	n.a	-0.013	n.a	0.011
RHIN	54	AN	2	15	2	5	23	9	16	22	10	16	15	12	147
		AR	1.8	14.5	2.0	4.7	22.6	8.3	15.7	21.4	9.9	16.0	14.7	11.6	11.9
		R	208-256	195-305	113-115	202-212	467-593	152-196	148-261	278-352	374-422	402-506	175-233	215-279	-
		H_O	0.022	0.911	0.244	0.578	0.881	0.489	0.910	0.956	0.634	0.632	0.625	0.705	0.632
		H_E	0.022	0.868	0.247	0.613	0.933	0.545	0.896	0.927	0.827	0.867	0.838	0.684	0.689
		F_{IS}	0.000	-0.038	0.022	0.068	0.067	0.115	-0.003	-0.019	0.245	0.284*	0.266*	-0.018	0.094*

n.a: non applicable

