

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
ET
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I

**DYNAMIQUE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET EFFETS
FONDATEURS: L'EXEMPLE DU MOUFLON (*OVIS ARIES*) DE
KERGUELEN**

THÈSE
PRÉSENTÉE EN COTUTELLE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
M. RENAUD KAEUFFER

MARS 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier les membres du jury, Pedro Peres-Neto et Sylvain Mousset d'avoir bien voulu juger ce travail et plus particulièrement Michael Bruford et Eric Petit pour la rédaction de leurs rapports.

Cette aventure a commencé en mai 2002. C'est à cette époque que j'envoyais un premier courriel rempli de questions sur la population de mouflons de Kerguelen, à un inconnu qui allait devenir mon co-directeur de thèse : Denis Réale. Nous avons alors, pendant plusieurs mois, correspondu et tergiversé sur l'organisation et les possibilités de financements d'une thèse. Nous avons abouti au début de l'année 2003 à la planification de cette thèse en cotutelle. Je veux donc tout d'abord remercier Denis de m'avoir fait confiance en acceptant de me superviser alors qu'il ne me connaissait que par le biais de mes courriels, puis de m'avoir laissé beaucoup de liberté dans les choix des thèmes et des sujets abordés dans cette thèse. Merci à Dominique Pontier d'avoir cru en moi, en ce projet de recherche qui paraissait un peu fou au premier abord, puis de m'avoir soutenu tout au long de cette thèse et plus particulièrement lors de mes errances administratives...

Un grand merci à Jean-Louis Chapuis, sur qui a reposé le projet de recherche sur le mouflon de Kerguelen. J'espère que cette thèse permettra de faire oublier les embûches politiques qui ont mis un terme de manière trop précoce au programme de recherche mout-mouf. Merci aussi à Benoît Pisanu pour son travail et son aide pour tout ce qui concerne la parasitologie.

Merci à Dave Coltman, de son accueil à Sheffield, de son aide technique et de ses précieux conseils qui auront permis d'approfondir mes connaissances de l'écologie moléculaire. Durant mon séjour en Angleterre, j'ai aussi pu bénéficier de l'aide de Amy Llewellyn et Andy Krupa et je les en remercie chaleureusement.

Je voudrai aussi remercier Nicolas Perrin, François Balloux, Jérôme Goudet pour les discussions que nous avons pu avoir, leurs conseils et la relecture de certains manuscrits.

Pour leur travail sur le terrain et le soutien logistique je tiens à remercier, Thierry Micol, Benoît Tollu, l'AMAPOF, l'IPEV ainsi que tous les VAT et VOC qui ont participé à la collecte des données.

Finalement je remercie tous mes amis qui ont su me soutenir et m'encourager avec une pensée particulière pour Sébastien, Frédérique, France, Kim, Valérie, Matthew, et bien sûr ma famille.

J'ai bénéficié du soutien financier de la Région Rhône Alpes, des Ministères Québécois et Français de Affaires Étrangères notamment par le biais du programme d'échange Égide.

« On a souvent dit que, pour faire des découvertes, il fallait être ignorant. Cette opinion fautive en elle-même cache cependant une vérité. Elle signifie qu'il vaut mieux ne rien savoir que d'avoir dans l'esprit des idées fixes appuyées sur de théories dont on cherche toujours la confirmation en négligeant tout ce qui ne s'y rapporte pas. »

Claude Bernard.

« Le vrai point d'honneur n'est pas d'être toujours dans le vrai. Il est d'oser, de proposer des idées neuves, et ensuite de les vérifier. Il est aussi bien sûr, de savoir reconnaître publiquement ses erreurs (...) L'honneur du scientifique est absolument à l'opposé de l'honneur de Don Diègue. Quand on a commis une erreur, il faut accepter de perdre la face »

Pierre-Gilles de Gennes

*How do you explain the genetic diversity of humanity given the relatively few chromosome pairs in Adam and Eve?
Study cited as part of the response: "Unexpected heterozygosity in an island mouflon population founded by a single pair of individuals." Kaeuffer et al.(2007)*

<http://www.reasons.org/> (site internet américain créationniste)

RÉSUMÉ

Le maintien de la diversité génétique des populations d'espèces fragiles, en voie de disparition, est un sujet primordial de la biologie de la conservation. Dans ce cadre, la compréhension des mécanismes qui vont affecter la diversité génétique au cours du temps est essentielle. Mon travail de doctorat a consisté en l'étude de la dynamique de la diversité génétique d'une population de mouflons *Ovis aries*, fondée en 1957 par un unique couple sur une île de l'archipel de Kerguelen (océan Indien). Durant cette étude, j'ai tout d'abord suivi les variations de l'hétérozygotie (H_e , évaluée à partir du typage génétique des individus à 25 marqueurs microsatellites) depuis la fondation jusqu'à 2003. J'ai montré que la valeur observée de H_e est supérieure à celle attendue à partir de modèles théoriques. Nos résultats, complétés par une étude par simulation, suggèrent que cette forte H_e pourrait être due à la sélection. Puis, pour mesurer la dérive, je me suis intéressé à la taille efficace de la population de mouflons. Malgré des conditions défavorables (démographie cyclique et système de reproduction de promiscuité caractérisé par une forte compétition entre les mâles), la dérive est apparue limitée. Mes résultats suggèrent que les variations de densité diminuent la compétition entre mâles, ce qui permet à la plupart de se reproduire, limitant ainsi la perte de la diversité génétique. La structure génétique des populations peut aussi influencer la perte de la diversité génétique. À partir d'un logiciel couramment utilisé (STRUCTURE, Pritchard et al. 2000), j'ai pu détecter une structure génétique dans la population de mouflons. Pourtant cette structure ne semble pas avoir de sens biologique et serait causée par des particularités des marqueurs génétiques utilisés. Enfin, j'ai mesuré les effets de la diversité génétique sur la valeur sélective des individus. J'ai tout d'abord pu révéler les effets négatifs de la diversité génétique et de la charge parasitaire sur la condition physique des femelles de mouflon, en mettant en évidence des effets simples de chacun de ces facteurs mais aussi en interaction. Contrairement à toutes les attentes, les femelles les plus consanguines ont une plus grande probabilité de donner naissance à des jumeaux. Des effets de sélection densité-dépendante à l'encontre des femelles seraient un des facteurs qui permettrait le maintien d'une forte hétérozygotie dans la population de mouflons de l'archipel de Kerguelen. Ces résultats originaux permettent de mieux comprendre l'évolution de la diversité génétique des populations.

MOTS CLÉS : Diversité génétique, structure génétique, taille efficace, démographie cyclique, *Ovis aries*

ABSTRACT

The maintenance of genetic diversity in small or endangered population is of primary importance in conservation biology. Within this framework, understanding the mechanisms that affect the changes in genetic diversity over time is essential. My PhD focused on the study of the dynamics of genetic diversity in a population of mouflons (*Ovis aries*) which was founded in 1957 by a single pair of individuals on an island in the Kerguelen archipelago (Indian Ocean). During this study, I first followed the variation in heterozygosity (H_e), estimated on 25 microsatellite markers, from the foundation of the population through to 2003. I show that the actual observed H_e value is higher than expected by neutral population genetics models. Our results, supplemented by a simulation study, suggest that this strong H_e may be due to selection. Next, to measure genetic drift, I estimated the effective mouflon population size. Despite unfavourable conditions including cyclic demography and a promiscuous mating system with strong competition between males, drift was found to be limited. These results suggest that variation in population density diminish competition between males, and therefore most males contribute to reproduction, limiting the loss of genetic diversity. The genetic structure of the populations can also influence H_e dynamics. Using a very popular population genetic software, (STRUCTURE, Pritchard and al. 2000), I detected genetic structure in the mouflon population. However this structure appears to have little biological relevance and may be due to characteristics of the genetic markers used. Finally I measured the effects of genetic diversity on individual fitness. I showed a negative effect of homozygosity and parasitic load on the physical condition of female mouflons. However, contrary to expectation, inbred females were found to have the highest probability of twinning. Effects of density-dependent selection acting on females may be a factor promoting the maintenance of strong heterozygosity in the mouflon population of the archipelago of Kerguelen. These novel results provide new information to allow us to better understand the evolution of population genetic diversity.

KEYWORDS: Genetic diversity, genetic structure, effective population size, cyclic demography, *Ovis aries*

TABLE DES MATIÈRES

<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	12
<i>LISTE DES FIGURES</i>	13

PARTIE I

<i>INTRODUCTION</i>	15
CHAPITRE I Introduction générale.....	17
CHAPITRE II La diversité génétique.....	25
II.1 Petite Histoire du concept de la diversité génétique	25
II.2 Définition de la diversité génétique	26
II.3 Mesurer la diversité génétique.....	26
II.3.1 Les marqueurs.....	26
II.3.2 Les mesures de la diversité génétique	34
II.4 Sur l'importance de la diversité génétique des populations	37
II.5 Diversité génétique individuelle : consanguinité et hétérozygotie (F , H , IR , d^2) 40	
CHAPITRE III La dynamique de la diversité génétique.....	49
III.1 Dynamique temporelle.....	50
III.1.1 Taux de mutation et neutralité : l'horloge moléculaire	50
III.1.2 Mutations et mesures de génétique des populations	53
III.1.3 La sélection.....	54
III.1.4 La dérive.....	57
III.2 Dynamique spatiale.....	57
III.2.1 Révélation de la structure	57
III.2.2 La migration et les flux géniques	61
III.3 Diversité et effets fondateurs.....	63
III.3.1 Effets fondateurs et consanguinité	63
III.3.2 Effets fondateurs et fréquence allélique	65
III.3.3 Effets fondateurs et génome : le déséquilibre de liaison	66
CHAPITRE IV Les modèles prédictifs	69
IV.1 La taille efficace.....	69
IV.2 L'hétérozygotie.....	74
CHAPITRE V Le cas du mouflon de Kerguelen.....	79
V.1 Le mouflon	79
V.2 La population de l'île Haute	80
CHAPITRE VI But de cette thèse.....	85

PARTIE II

DYNAMIQUE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE D'UNE POPULATION INSULAIRE DE MOUFLONS (OVIS ARIES)

87

CHAPITRE I Une hétérozygotie inattendue dans une population insulaire de mouflons fondée par un unique couple d'individus	89
I.1 Résumé.....	90
I.2 Introduction	92
I.3 Material and Methods.....	94
I.3.1 Population and study site.....	94
I.3.2 Genotyping	95
I.3.3 Heterozygosity	96

1.3.4	The population genetic model.....	97
1.3.5	Simulation.....	97
1.4	Results and Discussion.....	99
1.4.1	Theoretical expectations.....	99
1.4.2	Simulation results.....	101
1.4.3	Interaction with sex and cohort.....	102
1.4.4	Selection as a possible mechanism.....	103
1.4.5	Conclusion.....	105
1.5	Acknowledgments.....	106
1.6	Bibliography.....	106
CHAPITRE II Détecter la structure des populations à l'aide du logiciel		
STRUCTURE : effets du déséquilibre de liaison du type « arrière plan ».....		111
II.1	Résumé.....	112
II.2	Introduction.....	114
II.3	Material and Methods.....	117
II.3.1	Population and study site.....	117
II.3.2	Genotyping.....	117
II.3.3	Linkage disequilibrium.....	118
II.3.4	Population structure.....	118
II.4	Results.....	120
II.4.1	Heterozygosity.....	120
II.4.2	Linkage disequilibrium and the link with distance on the chromosome.....	120
II.4.3	Population structure.....	121
II.5	Discussion.....	123
II.6	Acknowledgements.....	127
II.7	Bibliography.....	128
CHAPITRE III Effets de la dynamique cyclique et du système de reproduction sur la taille efficace d'une population insulaire de mouflons.....		
		133
III.1	Résumé.....	134
III.2	Introduction.....	136
III.3	Material and Methods.....	138
III.3.1	Study population.....	138
III.3.2	Genetic analysis.....	139
III.3.3	Effective population size.....	140
III.3.4	Simulation.....	144
III.4	Results.....	146
III.5	Discussion.....	150
III.6	Acknowledgments.....	155
III.7	Bibliography.....	156
CHAPITRE IV Effets des nématodes, de la consanguinité et de l'effort reproducteur sur la condition physique des mouflons de la population de Kerguelen.....		
		163
IV.1	Résumé.....	164
IV.2	Introduction.....	166
IV.3	Material and Methods.....	168
IV.3.1	Study site and population.....	168
IV.3.2	Body condition and organ mass.....	169
IV.3.3	Parasite burden.....	170
IV.3.4	Genetic analysis and inbreeding.....	170
IV.3.5	Statistical analyses.....	171

IV.4	Results	172
IV.4.1	Molecular information and IR.....	172
IV.4.2	Body condition	172
IV.5	Discussion.....	174
IV.5.1	Body condition and parasite burden.....	175
IV.5.2	Body condition and internal relatedness.....	176
IV.5.3	Interactions.....	177
IV.6	Acknowledgments.....	179
IV.7	Bibliography	179
CHAPITRE V Effets locaux de consanguinité sur la fécondité et conséquences pour la diversité génétique de la population de mouflon de Kerguelen		187
V.1	Résumé	188
V.2	Introduction	189
V.3	Material and Methods.....	190
V.3.1	The population	190
V.3.2	Genetic analyses.....	191
V.3.3	Statistical analyses.....	191
V.4	Results	192
V.5	Discussion.....	193
V.6	Acknowledgments.....	195
V.7	Bibliography	195
<i>PARTIE III</i>		
CONCLUSION.....		199
I.1	Discussion générale.....	201
I.1.1	Sur le succès de l'introduction de la population de mouflons.....	204
I.1.2	Sur la relation entre la diversité génétique et la survie des populations..	205
I.1.3	Sur le rôle de la diversité génétique et le potentiel adaptatif.....	208
I.1.4	Sur la diversité génétique, la sélection et la dynamique fluctuante	211
I.1.5	Sur la validation des méthodes de génétiques des populations	213
I.1.6	Sur les simulations basées sur l'individu.....	215
I.2	Conclusion.....	217
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		219

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 CARACTÉRISTIQUES DES PRINCIPAUX MARQUEURS MOLÉCULAIRES UTILISÉS POUR ÉTUDIER LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE (MODIFIÉ D'AVISE 2004, FREELAND 2005)	33
TABLEAU 2 EXEMPLES DE TRAITS AFFECTÉS PAR LA DÉPRESSION DE CONSANGUINITÉ (D'APRÈS CRNOKRAK & ROFF 1999).....	42
TABLEAU 3 EXEMPLES ILLUSTRANT LA SUPÉRIORITÉ DE L'HÉTÉROZYGOTIE (« HETEROSIS ») FACE À L'HOMOZYGOTE (D'APRÈS GEMMELL & SLATE 2006).....	46
TABLEAU 4 EXEMPLES DE CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES RELIÉES AU SUCCÈS REPRODUCTEUR ET QUI SERAIENT CORRÉLÉES AU TAUX D'HÉTÉROZYGOTIE MESURÉ À L'AIDE DE MARQUEURS NEUTRES (D'APRÈS FREELAND, 2005).....	47
TABLE 5 HETEROZYGOSITY OBSERVED AND EXPECTED FOR EACH LOCI UNDER HARDY WEINBERG ASSUMPTION IN THE SEVENTIES, 1988 AND 2003. ONLY TWO LOCI (IN BOLD) IN THE SEVENTIES DEVIATED FROM THE HW EQUILIBRIUM AND SHOWED A DEFICIT OF HETEROZYGOSITY.	99
TABLE 6 COMPARISON OF HETEROZYGOSITY OBSERVED IN 2003 IN THE KERGUELEN MOUFLON POPULATION AND HETEROZYGOSITY ESTIMATED IN 2003 FROM DIFFERENT SIMULATIONS BASED ON THE POPULATION DEMOGRAPHY. INITIAL HETEROZYGOSITY WAS SET UP BY USING TWO FOUNDERS CHARACTERISED BY EITHER THE HIGHEST HETEROZYGOSITY LEVEL ($H = 1$) OR THE LOWEST POSSIBLE HETEROZYGOSITY ($H = 0.22$) GIVEN THE NUMBER OF ALLELES PER GENE OBSERVED IN THE KERGUELEN POPULATION. JUVENILE MORTALITY RATE OCCURS RANDOMLY ACCORDING TO JUVENILE CHARACTERISTICS. SELECTION LEVEL REPRESENTS THE MINIMUM H UNDER WHICH THE INDIVIDUAL DIES. COMPARISON BETWEEN SIMULATED AND OBSERVED H_{2003} ARE MADE WITH STUDENT'S T TESTS.....	101
TABLE 7 HETEROZYGOSITY ESTIMATED AFTER 47 YEARS (H_5) IN A SIMULATED POPULATION, USING A SUBSAMPLE OF LOCI THAT HAVE LOST OR NOT LOST ALLELES DURING THE HISTORY OF THE POPULATION. WILCOXON MATCHED PAIRED RANK TEST, WAS USED TO TEST FOR THE DIFFERENCE BETWEEN H_5 IN THE TWO CONDITIONS. T TEST WAS USED TO TEST THE SIGNIFICANCE OF THE DIFFERENCE BETWEEN H_0 IN THE MOUFLON POPULATION (I.E. $H_0 = 0.48$ AFTER 47 YEARS, IN 2003) AND H_5	104
TABLE 8 LINKAGE GROUPS, DISTANCE BETWEEN LOCI (IN CM), AND CORRELATIONS (R_{LD}) BETWEEN SYNTENOUS LOCI AND THEIR ASSOCIATE P VALUE	121
TABLE 9 NUMBER OF CLUSTERS INFERRED BY STRUCTURE FOR DIFFERENT COMBINATIONS OF LOCI. ALL LOCI = ALL THE 22 LOCI USED IN THE STUDY; SYNTENOUS = PAIRS OF SYNTENOUS LOCI ONLY; NON SYNTENOUS = PAIRS OF NON SYNTENOUS ONLY; LARGE DISTANCE = PAIRS OF SYNTENOUS LOCI SEPARATED BY DISTANCE ≥ 10.5 CM.	123
TABLE 10 NUMBER OF ALLELES PER LOCUS, EXPECTED (H_{exp}) AND OBSERVED (H_0) HETEROZYGOSITY, F_{is} AND PROBABILITY OF DEPARTURE (P) FROM HARDY-WEINBERG EQUILIBRIUM ESTIMATED FOR EACH LOCUS.	146
TABLE 11 EFFECTIVE POPULATION SIZE AND NE/N RATIO ESTIMATED BETWEEN 1989 AND 1995 IN THE HAUTE ISLAND MOUFLON POPULATION. NE_t IS THE EFFECTIVE POPULATION SIZE AT YEAR t ESTIMATED AS $NE_t = 4 N_{m,t} N_{f,t} / N_{t,t}$, WHERE N_m AND N_f ARE THE NUMBER OF MALES AND FEMALES RESPECTIVELY AND $N_t = N_m + N_f$ AT YEAR t . A REPRESENTS THE FACTOR OF REDUCTION OF NE CAUSED BY AN UNBALANCED SEX RATIO, ϕ THE FACTOR OF REDUCTION OF NE CAUSED BY POPULATION FLUCTUATIONS, AND B THE CUMULATIVE EFFECTS OF AN UNBALANCED SEX RATIO AND FLUCTUATING POPULATION SIZE (KALINOWSKI AND WAPLES 2002).	147
TABLE 12 MICROSATELLITE LOCUS NAME, AND STANDARDIZED VARIANCE IN ALLELE FREQUENCY CHANGE (F_{kt}), IN THE HAUTE ISLAND MOUFLON POPULATION. F_{kt} IS THE VALUE FOR EACH INDIVIDUAL LOCUS AND F_k REPRESENTS THE AVERAGE VALUE OVER ALL THE LOCI, RESPECTIVELY. F_{kt} AND F_k ARE CALCULATED FOLLOWING POLLAK (1983).	148
TABLE 13 VARIANCE IN ALLELIC CHANGE (F_k), NE RATIO ESTIMATED WITH WAPLES'S METHOD AND 95 % CI, FOR GENETIC DATA COLLECTED IN THE HAUTE ISLAND MOUFLON POPULATION AND FOR SIMULATED POPULATIONS (F_k AVERAGED OVER 1000 REPLICATES \pm SE) USING DIFFERENT COMBINATIONS OF MATING SYSTEM, GENERATION TIMES, LIFE SPANS, AND JUVENILE MORTALITY RATES. POLYGYNY REPRESENTS THE PROPORTION OF MALES IN THE POPULATION THAT REPRODUCE DURING A MATING SEASON.	149
TABLE 14 MEAN (\pm SD) BIOMETRICAL INDICES AND <i>TELADORSAGIA CIRCUMCINCTA</i> ABUNDANCE FROM MOUFLON EWES (<i>OVIS ARIES</i>) SAMPLED BETWEEN IN 1994 ON HAUTE ISLAND, SUB-ANTARCTIC KERGUELEN ARCHIPELAGO.....	173
TABLE 15 : SELECTED FACTORS AFFECTING BODY CONDITION, EFFECTS AND THEIR P -VALUES.	175

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 PRINCIPAUX FACTEURS INFLUENÇANT LE NIVEAU DE DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE D'UNE POPULATION (MODIFIÉ DE FREELAND 2005)	49
FIGURE 2 PROPORTIONS ET TYPES DE MUTATIONS SOUS LA THÉORIE DE LA SÉLECTION, LA THÉORIE NEUTRE ET PRESQUE NEUTRE (D'APRÈS OHTA 2002)	52
FIGURE 3 LES DIFFÉRENTS TYPES DE SÉLECTION. LA ZONE JAUNE REPRÉSENTE LE PHÉNOTYPE OPTIMAL.	55
FIGURE 4 CORRÉLATION GÉNÉTIQUE AU NIVEAU DE : L'INDIVIDU (F) DANS UNE SOUS POPULATION (θ) ET ENTRE SOUS-POPULATIONS (α).	60
FIGURE 5 HISTORIQUE DE LA POPULATION DE KERGUELEN. LA POPULATION DE VINCENNES EST À L'ORIGINE DE LA POPULATION DE CHAMBORD. LA POPULATION DE VINCENNES A ÉTÉ DÉPLACÉE EN 1970 POUR FONDER LA POPULATION DE LA HAUTE TOUCHE. LES TROIS POPULATIONS (KERGUELEN, HAUTE TOUCHE ET CHAMBORD) SONT TOUJOURS EXISTANTES À L'HEURE ACTUELLE.	81
FIGURE 6 NOMBRE D'INDIVIDUS ESTIMÉS DANS LES POPULATIONS DE MOUFLONS ET DE RENNES EN FONCTION DE L'ANNÉE, DE L'INTRODUCTION À 1990 (SELON BOUSSÈS ET AL. 1992).....	82
FIGURE 7 NOMBRE D'ÉCHANTILLONS DISPONIBLES EN FONCTION DE LA PÉRIODE ET DE LA POPULATION.	84
FIGURE 8 NUMBER OF INDIVIDUALS ESTIMATED ON THE KERGUELEN MOUFLON POPULATION.	94
FIGURE 9 AVERAGE COHORT HETEROZYGOSITY OBSERVED (AND STANDARD DEVIATION) ON KERGUELEN MOUFLON POPULATION. BLACK CIRCLES REPRESENT MALES AND WHITE CIRCLES, FEMALES. THE WHITE SQUARE REPRESENTS THE AVERAGE HETEROZYGOSITY OBSERVED IN THE ANCESTRAL POPULATION.	103
FIGURE 10 . APPROXIMATE POSITION AND CLUSTER MEMBERSHIP OF ALL LAMBS SAMPLED ON HAUTE ISLAND DETERMINED WITH STRUCTURE SOFTWARE USING THE WHOLE SET OF LOCI (FOR MAP READABILITY, INDIVIDUALS SAMPLED FROM SAME LOCATION WERE SLIGHTLY SHIFTED). CIRCLES AND SQUARES REPRESENT MEMBERSHIP OF EACH INDIVIDUAL.	122
FIGURE 11 R_{LD} AS A FUNCTION OF THE DISTANCE BETWEEN TWO SYNTENOUS MICROSATELLITE LOCI (IN CM) WITHIN A PAIR.	123
FIGURE 12 EFFECT OF R_{LD} BETWEEN TWO SYNTENIC LOCI ON THE OVERESTIMATION OF THE NUMBER OF POPULATIONS, USING THE SOFTWARE STRUCTURE AND DATA FROM THE HAUTE ISLAND POPULATION. THE MODEL WAS RUN USING A BIAS-ROBUST LOGISTIC REGRESSION (FOR MORE INFORMATION SEE TEXT) INCLUDING R_{LD} , NUMBER OF ALLELES PER LOCUS AND THEIR INTERACTION. ONLY R_{LD} HAD A SIGNIFICANT EFFECT ($\chi_1^2 = 18.5852, P < 0.0001$), AND THE INTERACTION AND THE NUMBER OF ALLELES PER LOCUS WERE NOT SIGNIFICANT ($\chi_1^2 = 0.0004, P = 0.984$ AND $\chi_1^2 = 0.0015, P = 0.9689$, RESPECTIVELY). NUMBER OF PAIRS OF SYNTENOUS LOCI = 18.	125
FIGURE 13 NUMBER OF INDIVIDUALS ESTIMATED FOR THE KERGUELEN MOUFLON POPULATION.	139
FIGURE 14 EFFECTIVE POPULATION SIZE AND 95%CI MEASURED FOR THE HAUTE ISLAND POPULATION USING WAPLES' (1989), BERTHIER'S ET AL. (2002) AND WANG'S (2001) METHODS FOR 3 GENERATIONS TIMES (2, 3 AND 4 YEARS).	150
FIGURE 15 CORRELATION BETWEEN EBW AND KFI	174
FIGURE 16 EFFECTS OF INTERACTION BETWEEN PARASITE BURDEN AND IR ON EBW (A) KFI (B) AND (C) EFFECTS OF INTERACTION OF PARASITE BURDEN AND SPLEEN SIZE ON EBW.	177
FIGURE 17 EFFECT OF STANDARDIZED MULTI-LOCUS STANDARDIZED HETEROZYGOSITY (MHL) ON THE PROBABILITY OF TWINNING IN THE KERGUELEN MOUFLON POPULATION.	193
FIGURE 18 EFFECT SIZE (AND THEIR SE) OF LOCI ON FECUNDITY ESTIMATED WITH A LOGISTIC REGRESSION, AND LINKAGE GROUP OF THE LOCI USED. THREE LOCI SHOWED A SIGNIFICANT EFFECT ON FECUNDITY (TEXAN4, BM848, DRBPs). LOCI LINKED TO TEXAN4 AND DRBPs, SHOW SIMILAR TRENDS IN THEIR EFFECT BUT ARE NON-SIGNIFICANT.	194

PARTIE I

INTRODUCTION

CHAPITRE I INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'anthropisation des milieux naturels a pour conséquence la réduction et la fragmentation de l'habitat de nombreuses espèces (Barbaut 1997, Reed 2004). Parallèlement à ces phénomènes, les changements climatiques actuels soumettent les espèces à de nouvelles et soudaines pressions de sélection (Warren et al. 2001, Thomas et al. 2004). Mais, les populations souvent isolées et d'effectif réduit (Soulé 1980) voient leur diversité génétique réduire de même que leurs capacités de répondre à ces changements environnementaux (Lacy 1997, Frankham et al. 1999, McKay & Latta 2002). De plus, les individus de ces petites populations isolées ont plus de chances de se reproduire avec des individus apparentés, avec pour conséquences attendues une augmentation de la consanguinité et de ses effets éventuellement néfastes (Soulé 1980, Lacy 1993, Newman & Pilson 1997).

La compréhension de la dynamique de la diversité génétique des populations est un sujet fondamental de la biologie évolutive et de la génétique des populations (Wright 1931). Plus récemment, aux vues des pressions humaines croissantes, l'étude de la diversité génétique et de sa dynamique dans l'espace et le temps est aussi devenue un aspect primordial de la biologie de la conservation et de la jeune science de la génétique de la conservation (Frankham et al. 2002).

Les études de biologie évolutive ou de génétique de la conservation sont exigeantes. Elles demandent des investissements importants sur le plan financier car les techniques moléculaires sont coûteuses, mais aussi en temps dans la mesure où elles demandent des suivis sur un long terme pour souligner certains processus évolutifs et recueillir les informations nécessaires à leur compréhension. Sans ces informations, le rôle de certains paramètres pourrait être sous estimé ou ignoré alors qu'ils jouent un rôle important dans les processus évolutifs. Par exemple, les études qui mesurent la diversité génétique des populations sont très souvent ponctuelles et ne tiennent pas compte de l'histoire de la population dans l'interprétation des résultats (Montgomery et al. 2000). Conformément aux attentes des modèles théoriques, les études empiriques montrent qu'à un instant

donné la diversité génétique des populations isolées et/ou de petites tailles est généralement réduite par rapport à des populations grandes ou non isolées (Frankham 1997 a, 1997 b, Montgomery et al. 2000, Leberg 2002). Pourtant, entre deux populations d'effectifs semblables, le niveau de diversité génétique peut varier pour diverses raisons. La sélection naturelle peut agir différemment selon les conditions environnementales rencontrées par les populations, éliminer certains allèles et affecter la dynamique des gènes (Charlesworth 1991, Coltman et al. 1999, Navaro & Barton 2002, Aguilar et al. 2004). D'un autre côté, les mutations peuvent accroître la diversité génétique (Falconer & Mackay 1996, Maruyama & Nei 1981), et contrer les effets réducteurs de la sélection mais le nombre de mutations est lié aux effectifs de la population. La démographie de la population influence donc la dynamique des gènes. Par exemple, un goulot d'étranglement réduit la diversité génétique (Gillespie 1999, Friar et al. 2000, Page et al. 2000, England et al. 2003), mais ses effets peuvent être limités s'il est suivi par un accroissement rapide de la population (Nei et al. 1975, Motro & Thomson 1982, Balanya et al. 1994, Zenger et al. 2003). D'autre part, les populations avec une dynamique fluctuante, sont généralement reconnues pour avoir une diversité génétique réduite par rapport à une population stable (Vucetich & Waite 1999, Izuka 2001, Izuka et al. 2002). Sans information concernant ces différents paramètres temporels il est peu aisé de comprendre les causes qui ont amené une population au niveau observé de diversité génétique à un instant t et de prédire ce qu'elle sera au temps $t+1$.

Il est souvent difficile d'affirmer qu'une population est complètement isolée de toute autre population. Dans des milieux même très fragmentés, il existe une probabilité non nulle qu'un individu issu d'une population, disperse et aille se reproduire dans une autre population. De tels échanges peuvent accroître la diversité génétique dans la population (Chesser 1991 a, 1991 b, Chesser et al. 1993, Chalersworth & Charlesworth 2003, Vila et al. 2003). Ainsi, sans un suivi et une identification des individus (visuelle ou à partir de typages moléculaires) de la population il est difficile de mettre en évidence les événements de migration. La biologie de l'espèce étudiée joue, elle aussi, un rôle primordial dans la compréhension de dynamique de la diversité génétique (Anthony & Blumstein 2000). Une bonne connaissance du système de reproduction, et plus

particulièrement de la variance du succès reproducteur des individus, est importante pour appréhender la dynamique des gènes. Les espèces avec des systèmes reproducteurs caractérisés par une forte variance perdent plus vite de leur variabilité que les systèmes avec une faible variance du succès reproducteur (polygamie vs. monogamie) (Nunney 1993). Les observations comportementales sont souvent insuffisantes pour déterminer quel est le type de système de reproduction. Des analyses de la paternité basées sur des informations moléculaires démontrent par exemple, que le succès reproducteur des individus n'est pas toujours en accord avec celui attendu par le système de reproduction décrit pour l'espèce (Coltman et al. 1999, Say et al. 2003, Mehranvar et al. 2004, Wilson & Martin-Smith 2007). Finalement, les effets des chevauchements de générations qui sont souvent ignorés dans les modèles théoriques de génétique des populations du fait de la complexité de leurs effets, jouent aussi un rôle sur les changements de fréquences des allèles au cours du temps (Ellner & Hairston 1994, Jorde & Ryman 1994, Waples & Yokota 2007). Si les générations se recouvrent, des individus de la même famille mais de générations différentes pourraient se reproduire entre eux. Mais pourtant, si plusieurs générations se chevauchent, la perte de la diversité génétique peut aussi être ralentie (Nunney 1993, 2002, Lippé et al. 2006).

La dynamique des allèles va donc être affectée par des effets spatiaux (structure des populations, migration) et temporels (mutation, dérive, sélection, chevauchements des générations). Devant l'importance de la diversité génétique dans le maintien des populations des espèces, il est nécessaire de bien saisir de quelle manière chacun de ces paramètres va affecter la dynamique de la diversité. Il apparaît aussi essentiel de ne pas tirer des conclusions quant à l'évolution de la diversité génétique d'une population en se basant sur la comparaison de populations qui **semblent** similaires mais en fait pourraient suivre des trajectoires de vie totalement différentes. Pour aider les chercheurs à mieux comprendre et estimer la dynamique de la diversité génétique, les modèles déterministes de génétique des populations sont un outil puissant.

Cependant, les modèles analytiques de génétique des populations, comme tout modèle, sont des simplifications de la réalité qui, en prenant compte un nombre

limité de paramètres biologiques, permettent d'obtenir une approximation de la diversité génétique attendue à un instant donné. Un « bon » modèle déterministe de génétique des populations résume l'essentiel des phénomènes biologiques dirigeant la dynamique de la diversité génétique des populations avec un nombre limité de paramètres. Ces modèles sont des outils importants mais ont leur limite car par définition ils ne prennent pas en compte l'ensemble de la complexité du fonctionnement des populations. D'autre part, l'utilisation de ces modèles se fait sous certaines hypothèses qui ne sont pas toujours réalistes par rapport à la biologie des espèces. La violation de ces hypothèses peut générer des estimations erronées sur le niveau de diversité génétique. Par exemple, les modèles supposent l'existence de générations annuelles, d'une fécondité distribuée selon une loi de Poisson, ou encore d'appariements aléatoires (Caballero 1994, Falconer & Mackay 1996), ce qui est rarement le cas dans les populations naturelles. De plus, la très grande majorité des modèles ne tiennent pas compte du chevauchement des générations, de la survie différentielle par classe d'âge ou de sexe, ou encore du système de reproduction de l'espèce ou de la population. Or les effets du non respect des hypothèses imposées par un modèle ont des effets peu connus sur les estimations. Par exemple, ce n'est que récemment que l'on s'est interrogé sur l'importance du chevauchement des générations sur la dérive (Jorde & Ryman 1995, Waples & Yokota 2007). Il est alors très difficile de savoir si le niveau de diversité génétique observé d'une population est cohérent avec les prédictions du modèle utilisé, et si il ne l'est pas, pourquoi. Est-ce que les différences entre les trajectoires observées et prédites sont causées par une limitation du modèle ou au contraire par des caractéristiques spécifiques non connues de la population étudiée.

Face aux limitations des modèles déterministes de génétique de population, les biologistes de la conservation restent relativement mal équipés pour comprendre la dynamique de la diversité génétique. Il apparaît nécessaire de connaître dans quelle mesure les modèles connus relativement simples vont être informatifs et refléter de manière cohérente la diversité génétique attendue dans les populations. Pour tester la validité de tel ou tel modèle théorique, des populations aux caractéristiques particulières sont élevées en laboratoire (Montgomery et al. 2000, England et al. 2003, Frankham 2005). Les espèces modèles utilisées sont souvent

choisies en fonction de la rapidité de leur cycle de vie et de la production d'un grand nombre d'individus à chaque événement de reproduction. Ce type d'espèces modèles permet d'obtenir un grand nombre de générations sur une courte période de temps. Pourtant, en biologie et génétique de la conservation, les espèces les plus fragiles sont caractérisées par une fécondité faible et une durée de vie longue avec pour conséquence un large chevauchement des générations. De plus, l'hypothèse de la panmixie décrite par les modèles est souvent peu réaliste dans les populations fragmentées par des barrières d'origine anthropique (Storz 1999). Enfin, le système de reproduction peut varier selon les conditions écologiques, de même que l'organisation sociale (Say et al. 1999, Say et al. 2002, Kyle et al. 2007). Il est donc probable que l'utilisation de modèles classiques de génétique des populations soit inadaptée aux études en conservation. Une meilleure appréhension de la dynamique des gènes passe par le développement de modèles de populations longévives (génération chevauchantes) qui intègrent notamment les structures spatiales et sociales de même que le système de reproduction.

La population de mouflon (*Ovis aries*) de l'île Haute représente une population modèle empirique. Cette population a été fondée par un unique couple provenant du zoo de Vincennes (Paris, France) et introduit en 1957 sur une petite île rocailleuse de l'archipel de Kerguelen (Chapuis et al. 1994). L'année suivant leur introduction, les deux individus commençaient à se reproduire. En 1970, la population atteignait une centaine d'individus avant d'entrer dans une phase exponentielle de croissance pour atteindre 700 individus en 1977. Depuis, l'effectif de la population fluctue entre 250 à 700 individus (Chapuis et al. 1994). Régulièrement, avec une période de 3 à 5 ans et lorsque le nombre d'individus excède 600, la population subit une forte réduction d'effectif au moment de l'hiver. Durant ces crashes hivernaux, la mortalité affecte fortement les mâles, dont la condition physique est réduite du fait de la forte compétition entre les mâles lors du rut. Dans le contexte défini précédemment, l'étude de cette population de mouflons présente deux avantages importants par rapport à bon nombre d'études jusqu'alors publiées. Tout d'abord, l'isolement extrême de la population interdit toute possibilité de flux génique avec un autre groupe d'individus, et les changements de la diversité génétique observés ne peuvent être dus qu'à des causes intrinsèques. Ensuite, la bonne connaissance de l'ensemble de l'histoire

démographique de la population permet d'avoir une vision très fine des événements qui auraient pu affecter la dynamique de la diversité. Enfin, le mouflon représente un modèle d'autant plus intéressant qu'il est considéré comme la même espèce que le mouflon (Opinion 3010) dont le génome a été très étudié (Maddox et al. 2001). La position et l'emplacement précis, sur les chromosomes des marqueurs moléculaires neutres sont connus, de même qu'un grand nombre de gènes potentiellement sous sélection. Ces informations sont très utiles car en observant la position respective des marqueurs neutres et des gènes sous des effets potentiels de la sélection, il est possible de faire le lien entre la dynamique de la diversité génétique des marqueurs et des effets de sélection sur les gènes. De plus, la biologie du mouflon a été déjà largement étudiée, notamment du fait de son intérêt cynégétique en Europe (Garel 2006).

Le succès de l'introduction du mouflon sur l'île Haute représente une histoire tout à fait singulière. Bien que fondée par un unique couple d'individus, la population s'est rapidement développée et elle semble actuellement en bonne santé. Les mouflons de Kerguelen sont caractérisés par un gabarit plus petit, un fort taux de gémeillarité et une proportion élevée de femelles cornues par rapport aux mouflons des populations européennes (Boussès & Réale 1996, 1998). Ces caractéristiques pourraient s'expliquer par les effets fondateurs et une adaptation à l'insularité (i.e., réduction de la taille des Mammifères les plus grands et accroissement de la taille des Micromammifères, Case 1978). D'autre part, aucune tare génétique n'est apparente : il n'a été décrit aucun type de malformation chez les individus, la population connaît un des plus forts d'accroissement intrinsèque pour l'espèce (Chapuis et al. 1994) et, en dépit de sa forte consanguinité potentielle, les femelles montrent une fécondité très élevée (Boussès & Réale 1998). Pourtant à la vue du faible nombre d'individus fondateurs, de la diversité génétique forcément réduite (avec un maximum de 4 allèles par loci) et de la reproduction entre individus apparentés, la population aurait pu montrer de forts effets de consanguinité qui auraient pu conduire à son extinction (Reed et al. 2003, Spielman et al. 2004).

En me basant sur une population dont nous avons une très bonne connaissance au niveau de l'historique, de l'espèce et de sa génétique, je me suis

attaché à comprendre la dynamique de la diversité génétique. J'ai notamment comparé la dynamique la diversité génétique mesurée à partir de marqueurs moléculaires neutres, aux modèles et prédictions couramment faites en génétique des populations.

Je diviserai ce travail en trois parties. La première est une introduction sous forme de synthèse bibliographique, la deuxième est constituée des différentes thématiques que j'ai développées au cours de ma thèse de doctorat enfin je conclurai par une discussion générale sur les différents thèmes abordés dans cette thèse.

Dans une partie introductive à mon travail, je ferai le bilan des connaissances dans les domaines qui touchent à l'étude de la diversité génétique. Ces domaines sont complexes et nombreux. De part le large panel des sujets d'études abordés ici et leur technicité, la compréhension de l'ensemble des ceux-ci a nécessité d'effectuer un large travail de recherche bibliographique. Tout d'abord, dans le premier chapitre je ferai un rappel sur ce qu'est la diversité génétique en partant des notions de base de la biologie moléculaire. J'aborderai également les différentes façons de mesurer la diversité et montrerai son importance au travers d'exemples tirés dans la littérature.

Dans le deuxième chapitre, je rappellerai les différents paramètres qui vont influencer la diversité génétique des populations et la dynamique des gènes. Le troisième chapitre sera consacré aux modèles et prédictions faites par les modèles couramment utilisés en génétique des populations. Enfin, dans le quatrième chapitre, je présenterai en détail la population étudiée et les différents thèmes que j'ai abordés durant ma thèse.

Dans une deuxième grande partie, je développerai cinq chapitres qui correspondent à cinq articles publiés ou soumis :

Le premier article portera sur l'évolution du niveau d'hétérozygotie au cours du temps dans la population de mouflons de Kerguelen (Kaeuffer et al. 2007a). Je confronterai ici l'évolution de la diversité observée dans la population à l'évolution attendue par un modèle théorique très largement utilisé et par une simulation prenant en compte le chevauchement de générations et les effets de la sélection.

Le deuxième chapitre aura pour sujet l'étude de la structure génétique de la population et s'appuiera sur les nouvelles méthodes Bayésiennes d'inférence de structure de populations (Kaeuffer et al. 2007b). Ces méthodes se basent sur l'équilibre d'Hardy-Weinberg et le déséquilibre de liaison, or ces équilibres peuvent être affectés par la dynamique de la population. Je testerai la robustesse de ces méthodes sous ces contraintes démographiques particulières.

Le troisième chapitre aura pour but de montrer les effets du système de reproduction et de la démographie sur la taille efficace (Kaeuffer et al. 2007c). Généralement ces effets sont étudiés de manière séparée, mais je montrerai ici, en utilisant une approche génétique et démographique, qu'ils peuvent être intimement liés.

Le quatrième chapitre porte sur la relation entre la consanguinité, la charge parasitaire et la condition physique chez les femelles mouflons (Kaeuffer et al., en préparation). La diversité génétique pouvant jouer un grand rôle dans la réaction immunitaire et la condition physique, on s'attend à ce que la diversité génétique soit négativement reliée à la charge parasitaire. Je testerai cette hypothèse dans ce chapitre.

Finalement le cinquième et dernier chapitre (Kaeuffer et al. soumis) décrit la relation entre l'hétérozygotie et la fécondité des femelles. Il est souvent admis que la fécondité est réduite pour les individus avec une plus faible hétérozygotie. Cette prédiction sera testée ici.

Je terminerai par une conclusion générale et des perspectives qui constitueront la troisième partie de cette thèse. Je replacerai ici les résultats décrits dans les différents chapitres dans un contexte plus général et les discuterai à la lumière des découvertes récentes sur les sujets abordés.

CHAPITRE II LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

II.1 PETITE HISTOIRE DU CONCEPT DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE*

La génétique est une science jeune, d'un peu plus d'un siècle. Dès ses premiers pas dans l'agriculture, l'Homme, par la sélection et le croisement d'espèces répondant à ses besoins, a illustré de manière fortuite les lois de l'hérédité et de la génétique. Il faudra attendre la deuxième moitié du 19ème siècle pour que les fondements scientifiques de la génétique soient mis en place. Darwin suggéra tout d'abord la présence de particules parentales, porteuses de l'information nécessaire à la genèse d'un nouvel individu. À la fin des années 1870, Herman Fol et Oskar Hertwigg confirment par l'observation la mise en commun du matériel contenu dans les gamètes mâles et femelles de l'oursin lors de la fécondation. En 1880, Oskar Hertwigg propose que le noyau des cellules soit le siège de l'hérédité. A la même époque, August Weissman allait plus loin encore en avançant que les chromosomes étaient les porteurs de l'information héréditaire. Parallèlement à ces travaux, Mendel publiait en 1865, dans un cadre d'une grande rigueur scientifique, une description théorique des mécanismes qui pouvaient expliquer la relation entre les caractéristiques phénotypiques d'une espèce, les fréquences des différents génotypes et leur maintien lors de la reproduction. Les expériences de Mendel sont finalement les premières qui font le lien entre la diversité génétique et les phénotypes d'une espèce. Les lois mendéliennes de l'hérédité tomberont pourtant dans l'oubli pendant plusieurs décennies et ne seront redécouvertes qu'au début du XX^{ème} siècle notamment par le Néerlandais Hugo de Vries.

Entre 1920 et 1940 naît la génétique des populations, qui en se basant sur les lois mendélienne de l'hérédité, étudie les fluctuations des fréquences des allèles au cours du temps dans les populations. La quasi-totalité des grands principes de la

* Les informations de ce paragraphe sont tirées des ouvrages suivant : Buican (1989, 1993) Gribbin & Hook (2004), Avise (2004), Freeland (2005)

génétique des populations seront décrits durant ces vingt années essentiellement par Sewall Wright, Ronald Fisher et John B. S. Haldane.

Vers le milieu du XX^{ème} siècle, un lien plus précis sera montré entre le gène, source de l'hérédité, et le gène en tant que molécule. La preuve formelle que l'ADN est porteur de l'information génétique sera faite en 1944 par Avery, McLeod et McCarty, et la structure de l'ADN sera découverte en 1953 par Watson et Crick. Quelques années plus tard, George Gamov fut le premier à proposer que l'enchaînement de trois nucléotides pouvait coder pour un acide aminé, mais ce n'est qu'en 1961 que Crick et ses collaborateurs le démontrèrent. L'étude du polymorphisme moléculaire prendra naissance en 1955 lorsque Smithies sépara des protéines par électrophorèse ; cette technique deviendra courante au cours des années soixante (Avisé 2004). Les méthodes d'étude du polymorphisme moléculaire vont alors se multiplier : séquençage (Maxam et Gilbert, 1977), étude de l'ADN mitochondrial (Avisé et Brown 1979), technique de la PCR (Kocher, 1989). En 1996, Avisé et Hamrick publiaient le premier livre sur l'utilisation des marqueurs moléculaires en biologie de la conservation. La génétique de la conservation qui étudie les mécanismes de maintien, de perte ou de restauration de la diversité génétique des populations, était née.

II.2 DÉFINITION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

La diversité génétique est l'étendue de la variabilité génétique mesurée dans un individu, une population, une métapopulation, une espèce ou un groupe d'espèces (Frankham 2002, Freeland 2005). John Avisé (2004) élargit le concept de la variabilité génétique et déclare « ... la biodiversité est la diversité génétique... ».

II.3 MESURER LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

II.3.1 Les marqueurs

L'information génétique se trouve dans un organisme sous plusieurs formes dépendant du stade de la transcription de l'ADN (ADN, ARN, protéines). L'ADN peut être codant ou non, d'origine nucléaire ou mitochondrial. Suivant son origine et

la forme de l'information étudiée, les effets de la sélection et des mutations sont différents et affectent l'étude et la compréhension de la dynamique de la diversité.

Dans les études de génétique des populations, il est préférable d'utiliser des marqueurs qui seront neutres, c'est-à-dire échappant aux contraintes sélectives. La sélection peut réduire la variabilité génétique et donc l'information portée par les marqueurs. Or, c'est la diversité génétique qui va permettre la détermination de parenté ou les liens entre les espèces dans les études de phylogénie. L'étude de la structuration génétique des populations utilise elle aussi la distribution de la variabilité génétique pour la détermination de groupe d'individus apparentés. L'utilisation de marqueurs sous effets de la sélection pourrait alors masquer la structure des populations.

Allozymes, ADN mitochondrial (étudié par séquençage), et microsatellites, sont les techniques les plus utilisées dans les études de la diversité génétique (Avisé 2004, Schlötterer 2004). D'autres techniques notamment AFLP, RAPD, SNP's sont elles moins couramment employés (Tableau 1)

- Les allozymes

Les allozymes ont été les premiers types de marqueur utilisés dans l'étude de diversité génétique (Avisé 2004). Cette technique ancienne se base sur le polymorphisme enzymatique. Ce n'est donc pas l'ADN en lui-même qui est observé, mais les protéines issues des gènes. D'un individu à l'autre, une enzyme peut légèrement varier dans sa constitution en acides aminés, ce qui va affecter sa charge électrique. Les différentes formes (allèles) de l'enzyme peuvent donc être séparées par électrophorèse (séparation des protéines en fonction de leur charge électrique) et sont appelées allozymes. Les deux principaux avantages des allozymes sont l'universalité des protocoles employés (Schlötterer 2004) et leur faible coût d'utilisation. Toutefois, l'emploi des allozymes dans les études sur la diversité génétique présente quelques problèmes. Tout d'abord, le faible nombre de marqueurs disponibles (limité par le nombre d'enzymes isolables) et le nombre relativement faible d'allozymes pour une enzyme donnée (Avisé 2004, Schlötterer 2004), limite la précision des études dont le but est par exemple, de distinguer des populations en fonction de leur particularité génétique. D'autre part, plusieurs allèles peuvent être associés à un même allozyme dans la mesure où ils peuvent être à l'origine des protéines composées d'acides

aminés différents, mais ayant la même charge électrique. De ce fait, les protéines ne seront pas séparées lors de l'électrophorèse. Le problème majeur des allozymes reste leur neutralité très relative à l'origine de biais dans l'étude de la structuration génétique ou des effets de dérive génétique (Avisé 2004). Les enzymes sont des molécules fonctionnelles et peuvent jouer un rôle important dans le métabolisme. Certains allozymes peuvent être plus efficaces dans leur fonction que d'autres. Ces formes allozymiques seront avantagées et auront tendance à limiter la variabilité de la protéine. Suivant l'importance du rôle de l'enzyme et sa spécificité, le nombre d'allozymes peut varier. Une enzyme agissant sur une large gamme de substrats aura une diversité plus importante qu'une enzyme très spécifique (Gillespie & Kojima 1968). Il a aussi été montré que la complexité structurale de l'enzyme jouait un rôle sur la diversité des allozymes et le nombre de sous-unités protéiques est inversement corrélé au nombre d'allozymes (Harris et al. 1977, Nei et al. 1978): les protéines monomériques ont une diversité plus importante que les protéines multimériques et plus le poids des sous-unités est élevé, plus le nombre d'allozymes est élevée. Finalement, du fait de leur taux de mutation très faible d'environ 10^{-6} à 10^{-8} (par nucléotide et par génération) et de l'effet de la sélection, les allozymes présentent un niveau de diversité génétique réduite comparé à d'autres marqueurs moléculaires.

- L'ADN mitochondrial

Beaucoup d'études sur la diversité génétique se basent sur l'ADN mitochondrial (Schlöterer 2004). Celui-ci possède un avantage majeur par rapport à l'ADN nucléaire: il est transmis d'une génération à l'autre uniquement par la mère (mitochondries présentes dans le cytoplasme de l'œuf) et limite la recombinaison génétique (sauf exception, Ladoukakis & Zouros 2001). Ainsi, contrairement aux séquences chromosomiques pouvant être affectées par les événements de recombinaison (crossing-overs), la différence entre deux séquences d'ADNm peut être interprétée comme la conséquence de la mutation seulement. Il a aussi été montré récemment que le manque d'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADNm, accélérât son évolution (mutation) comparée au reste du génome (Wilson et al. 1985, Avisé 2004). Certaines séquences à l'intérieur de la région de contrôle (région non codante) de l'ADNm, évoluent encore plus rapidement et la large diversité génétique observée à ces séquences permet des études très fines de phylogénie (Avisé 2004).

Enfin, l'ADNm est facilement amplifié car les séquences d'initiations (« primers ») sont quasiment les mêmes pour toutes les espèces (Kocher et al. 1989).

Certaines critiques ont toutefois été apportées à l'utilisation de cet ADN. Récemment Ballard & Kreitman (1995) se sont interrogés sur le rôle potentiel de la sélection sur son mode d'évolution. En effet, vu la faible taille du génome mitochondrial, la fixation de mutations avantageuses dans les séquences codantes de l'ADNm pourrait influencer la fréquence des allèles des zones dites neutres par le phénomène d'auto-stop (« hitchhiking » ou déséquilibre de liaison : situation dans laquelle deux allèles sont plus fréquemment associés que ne le voudrait le hasard ; voir Maynard-Smith et al. 1974). D'autre part, des tests de neutralité ont permis de montrer que la distribution des mutations de l'ADNm n'était pas consistante avec celle attendue par rapport à un modèle neutre (Whittam et al. 1986). Des résultats d'une étude sur le rat-trompe (mole-rat, *Heterocephalus glaber* ; Nevo et al. 1993) ont suggéré par ailleurs que le polymorphisme de l'ADNm serait sous la sélection d'effets climatiques. Pergams et al. (2003) ont aussi montré une évolution très rapide de la fréquence de différents haplotypes de l'ADNm dans une population de souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*). Il est également intéressant de noter que le rythme d'évolution de l'ADNm varie selon les groupes taxonomiques. Martin et al. (1993) ont montré une forte corrélation entre la taille des organismes, leur physiologie et le taux de mutation de l'ADNm ; les rongeurs ont, par exemple, un taux de mutation plus élevé que les cétacés, et les poïkilothermes ont un taux de mutation plus faible que les homéothermes. Martin et al. (1993) suggèrent un effet combiné du métabolisme et du temps de génération sur le taux de mutation de l'ADNm. Le taux de mutation de l'ADN mitochondrial chez les mammifères a été estimé à $5,7 \cdot 10^{-8}$ par nucléotide et par génération (Brown et al. 1982).

- Les microsatellites

Les microsatellites sont sans doute les marqueurs les plus employés dans les études de suivi de la diversité génétique. Les microsatellites sont des séquences d'ADN non codantes composées de motifs de 1 à 6 nucléotides qui se répètent (Oliveira et al. 2006), et qui sont disséminées dans l'ensemble du génome que cela soit chez les eucaryotes ou les procaryotes (Field & Willis 1998). Bien que présents

dans la plupart des organismes, les microsatellites sont répartis de manière irrégulière dans le génome. Leur nombre varie aussi d'un taxon à l'autre. Par exemple ils représentent 0,21% du génome chez le ver nématode *Caenorhabditis elegans* (Tòth et al. 2001) et 3,21% chez le poisson *Tetraodon nigroviridis* (Crollius et al. 2000).

Les marqueurs microsatellites sont largement utilisés en génétique des populations. Leur très fort taux de mutation (supérieur à celui de l'ADNm ; Jarne & Lagoda, 1996) les rend hautement variables. Leur grande diversité facilite la discrimination précise des individus ou des groupes, de même que les mesures de distances génétiques (Hedrick 2001). Bien que les microsatellites soient non codants, certains auteurs ont proposé qu'ils joueraient un rôle dans la régulation et le fonctionnement des gènes (O'Donnell et al. 1994, Kashi et Soller 1999). Les microsatellites ont aussi été associés aux effets de la virulence pathogène de certains micro-organismes (Jackson et al. 1997). Enfin il a été proposé que la présence de microsatellites composés de répétitions di-nucléotidiques, pourrait être des sites favorisant la recombinaison ou le repliement de l'ADN (Bailey et al. 1998, Wahls et al. 1990). Cette fonction pourrait jouer un rôle important dans le recouvrement de la diversité génétique (Foster & Trimarchi 1994, Rosenberg et al. 1994).

Comme les précédents marqueurs, on peut s'interroger sur la neutralité de leur mode d'évolution. De nombreuses études ont mis en relation la diversité génétique mesurée à partir des microsatellites (généralement l'hétérozygotie) et des mesures de l'aptitude adaptative (Coltman & Slate 2003). Il semblerait aussi que la taille du génome soit soumise à sélection (Gregory 2002). Dans ces conditions, les individus avec la plus courte longueur moyenne d'allèles pourraient être favorisés par la sélection. Il est également important de noter que les mécanismes de mutation des microsatellites sont encore discutés. Quatre modèles sont décrits : i) le modèle IAM (Infinite Allele Model, Kimura & Crow 1964), où le nombre de mutations d'un locus est illimité ; ii) le SMM (Stepwise Mutation Model, Otha & Kimura 1971), où la mutation ne peut que se faire par ajout ou suppression d'un motif nucléique ; iii) le KAM (K-Allele Model, Balloux et al. 2002), où le nombre d'allèles possible se limite à un nombre K et ; iv) le TPM (Two-Phase Model, Di-Rienzo et al. 1994) où la probabilité de mutation est liée aux nombres de nucléotides ajoutés/supprimés. Le mode de mutation peut avoir un rôle important dans les mesures de la diversité utilisées, notamment en modulant la probabilité d'homoplasie (site présentant des états moléculaires identiques, mais ayant subi différentes étapes évolutives ; Estoup et

al. 2002). Le taux de mutation varie selon les espèces et a été estimé entre 10^{-3} à 10^{-5} , mutation/nucléotide/génération.

Lors de l'analyse des microsatellites, une phase importante est l'amplification de la quantité d'ADN par la méthode de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Bien que de manière générale cette technique soit très précise, certaines erreurs peuvent se produire qui vont affecter les mesures de la diversité génétique. Ces erreurs sont d'autant plus probables que la qualité de l'ADN est mauvaise et/ou ancienne. Généralement deux types d'erreurs sont décrits (Taberlet et al. 1996, Pompanon et al. 2005) :

1. la non amplification d'un des brins de l'ADN: les allèles nuls ou « l'allelic drop out » (non amplification d'un des allèles à un locus donné chez un individu hétérozygote) a pour conséquence une sous-estimation de la diversité ;
2. l'erreur d'amplification de l'ADN (techniquement appelée décalage de la fenêtre de lecture) entraîne une surestimation de la diversité en générant des allèles qui n'existent pas.

- Les SNPs (Single Nucleotid Polymorphisms)

Avec les SNPs, l'étude de la diversité se fait sur des sites caractérisés par une seule paire de base (Brookes 1999, Avise 2004) et qui n'ont donc que deux états, homozygote ou hétérozygote, possibles. Les SNPs sont très nombreux dans le génome ; chez les humains, ils représenteraient 90 % de la variation génétique (Collins et al. 1998, Freeland 2005). Leur taux de mutation lent (10^{-8} à 10^{-9} Brumfield et al. 2003, Freeland 2005) les rendrait plus aptes à des études de phénomènes à long terme (Freeland 2005). Ces marqueurs relativement récents et encore peu utilisés sont prometteurs pour l'étude de la diversité génétique des populations (Morin et al. 2004).

- Les RAPD (Randomly Amplified Polymorphism DNA)

Comme les microsatellites, les RAPDs utilisent l'amplification de fragments non codants d'ADN pour mettre en évidence la diversité génétique inter individuelle

(Williams et al. 1990, Hadrys et al. 1992). A la différence des microsatellites, les amorces des RAPDs (les séquences qui permettent la reconnaissance et l'amplification de l'ADN) sont de petites tailles et non spécifiques. Les amorces vont donc se fixer de manière aléatoire dans le génome. Le nombre et la taille des segments amplifiés permettent de mettre en évidence les différences entre les individus. Bien que d'un coût peu élevé et permettant de mettre en évidence une large variabilité en un faible nombre de réactions, cette technique a un défaut majeur : sa faible reproductibilité d'une réaction à l'autre et plus généralement d'un laboratoire à un autre. D'autre part, il s'agit d'une technique dite dominante, ne permettant pas de mettre en évidence si un individu est homozygote ou non à un site donné.

- Les AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism)

La technique des AFLPs (Zabeau et al. 1993, Vos et al. 1995) se décompose en deux temps. La première consiste à découper l'ADN grâce à des enzymes de restriction puis, après ligature d'amorces, à amplifier les séquences par PCR et à les séparer sur gel acrylamide. Le principal avantage de la technique AFLP est, comme le RAPD, la relative facilité de la mise au point des marqueurs qui ne demande pas de connaissance *a priori* du génome de l'espèce étudié. En revanche, cette méthode montre une reproductibilité élevée (mais voir Schlötterer 2004), mais nécessite un ADN de très bonne qualité (Avisé 2004). Cette technique est relativement peu utilisée dans les études sur la diversité génétique.

- Les RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism)

Les RFLPs (Bostein et al. 1980) ont été la première technique d'étude directe de l'ADN (Schlötterer 2004). Cette technique consiste à découper l'ADN à l'aide d'enzymes dites de restriction. Ces enzymes reconnaissent des sites spécifiques de l'ADN dont le nombre et l'emplacement peuvent varier du fait de la mutation, de l'insertion ou de la perte de bases (Schlötterer 2004). Bien que très prometteuse, les RFLPs sont de moins en moins utilisés (Schlötterer 2004) car des problèmes techniques sont rencontrés lors de la mise en place des protocoles pour chaque nouvelle espèce (Avisé 2004, Freeland 2005).

Tableau 1 Caractéristiques des principaux marqueurs moléculaires utilisés pour étudier la diversité génétique (modifié d’Avisé 2004, Freeland 2005)

Méthode	<i>Allozymes</i>	<i>Microsatellites</i>	<i>ADN mt- Séquençage</i>	<i>RAPD</i>	<i>AFLP</i>	<i>RFLP</i>	<i>SNP</i>
Côut	Faible	Modéré	Important	Faible-Modéré	Modéré-Important	Modéré	Modéré-Important
Facilité d'utilisation/développement	Facile	Modéré	Modéré	Facile	Facile-Modéré	Difficile	Difficile
Nature du marqueur	Co-dominant	Co-dominant	Dominant	Dominant	Dominant	Co-dominant	Co-dominant
Variabilité	Faible-Modéré	Haute	Faible-Modéré	Haute	Haute	Faible-Modéré	Modéré
Comparaison interspécifique	Difficile	Oui	Oui	Difficile	Difficile	Difficile	Oui
Soumis à sélection	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

11.3.2 Les mesures de la diversité génétique

La diversité génétique d'un individu se mesure généralement par son degré de consanguinité, qui correspond à la probabilité que deux allèles à un gène donné soient identiques et proviennent d'un ancêtre commun. Le taux moyen de consanguinité d'une population peut être calculé à partir de cette information. La plupart des mesures faites à partir des marqueurs moléculaires ont pour but d'estimer le degré de consanguinité des individus.

- La consanguinité absolue mesure la probabilité moyenne que deux allèles soient identiques par descendance au sein d'un individu. Elle est représentée par le

$$\text{coefficient de consanguinité } F_I \text{ de l'individu: } F_I = R_{xy} = \sum_A \left(\frac{1}{2}\right)^{n_1+n_2+1} (1 + F_A)$$

(Malecot, 1948) où R_{xy} est le coefficient de parenté de ses parents x et y , n_1 et n_2 sont le nombre de générations qui séparent chaque ancêtre commun du père et de la mère et F_A est le coefficient de consanguinité de l'ancêtre commun. L'estimation de la consanguinité par la formule de Malécot nécessite la connaissance du pedigree complet de la population qui est très difficile à obtenir dans des conditions naturelles.

- L'hétérozygotie observée (H_o) d'une population correspond au nombre d'individus hétérozygotes pour un locus, divisé par le nombre total d'individus étudiés. Lorsque l'on dispose de plusieurs loci, H_o est la somme du nombre d'individus hétérozygotes pour les différents loci observés, divisée par le nombre total d'individus étudiés. L'hétérozygotie individuelle observée représente le nombre de loci hétérozygotes divisé par le nombre total de loci étudiés pour un individu (i.e. Hansson et al. 2004). L'hétérozygotie est la mesure la plus ancienne et sans doute la plus utilisée pour les études sur la diversité génétique, que ce soit au niveau de la population ou de l'individu. Hardy et Weinberg ont démontré de manière indépendante (en 1908) que l'hétérozygotie attendue dans une population

pouvait s'estimer en fonction de la fréquence p et q des allèles observés (A et a) par : $p^2 + q^2 + 2pq = 1$ ou p^2 serait la fréquence des homozygotes AA , q^2 la fréquence des homozygotes aa et $2pq$ la fréquence des hétérozygotes Aa . En comparant les hétérozygoties attendues et observées, on peut estimer la consanguinité relative (Cf. paragraphe suivant).

Pour éviter un biais dans l'estimation de H causé par un nombre différent de loci analysés pour chaque individu, la valeur de H peut être standardisée (Coltman et al. 1999, Slate et al. 2002, 2004, Amos et al. 2001). L'hétérozygotie standardisée est la valeur de l'hétérozygotie individuelle observée, divisée par la moyenne de l'hétérozygotie attendue dans la population aux loci étudiés pour l'individu. L'hétérozygotie attendue pour plusieurs loci se mesure alors par :

$$H_{\text{exp}} = 1 - \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^k p_i^2$$

, où p_i est la fréquence de l'allèle i , k est le nombre total d'allèles et m est le nombre total de loci.

- La consanguinité relative peut se mesurer avec F , suivant la formule : $F = 1 - (H_o / H_i)$ où H_o est l'hétérozygotie observée et H_i l'hétérozygotie attendue suivant la loi d'Hardy-Weinberg, pour une population idéale se reproduisant de manière aléatoire (Hartl & Clark 1997, p. 136). Elle est souvent utilisée pour estimer l'effet du système de reproduction sur la diversité génétique.
- Le d^2 (Coulson et al. 1998) est calculé comme la différence, élevée au carré, du nombre de répétitions du motif microsatellite entre les deux allèles d'un loci. La valeur moyenne de d^2 se calcule sur l'ensemble des loci pour lesquels l'individu a été génotypé par la formule suivante : $d^2_{\text{moyen}} = \sum_{i=1}^n \frac{(i_a - i_b)^2}{n}$ où i_a et i_b sont les longueurs respectives des allèles a et b au locus i et n est le nombre total de loci pour lequel l'individu a été génotypé (Coulson et al. 1998). Il a été montré de manière théorique et empirique que le d^2 reflète très mal le degré de consanguinité d'un individu (Hedrick et al. 2001, Tsitrone et al. 2001, Goudet & Keller 2002). Par contre, le d^2 pourrait être d'une grande utilité dans les situations qui

impliqueraient des phénomènes de « mélange » de population (Pemberton et al. 1999).

- L'IR (ou Internal Relatedness ; Amos et al. 2001) est une mesure de la corrélation génétique entre deux allèles d'un locus donné. Cette mesure donnerait plus de poids à l'homozygotie causée par des allèles rares et reflèterait de manière plus précise les similarités génétiques (consanguinité) entre deux individus apparentés qu'une mesure classique de l'hétérozygotie (Amos et al. 2001). Lorsqu'estimé sur plusieurs loci, cet indice suivrait une loi normale centrée sur 0. Un individu avec un IR de zéro serait donc né de parents non apparentés, une valeur positive et proche de 1 révélerait un individu consanguin. Par contre, une valeur négative et proche de -1, reflèterait un appariement d'individus ne possédant aucun allèle en commun (« outbreed » en anglais) (Amos et al. 2001). L'IR se calcule de la manière suivante :
$$IR = \frac{(2H - \sum f_i)}{(2N - \sum f_i)}$$
 où H est le nombre de loci homozygotes, N est le nombre de loci, f_i est la fréquence de l'allèle i dans le génotype. Cette mesure a été récemment contestée par Aparicio et al. (2006) car l'IR sous-estimerait l'hétérozygotie d'un individu porteur d'allèles rares. Aparicio et al. (2006) propose donc un nouvel estimateur appelé « l'homozygotie par loci » ou HL qui reflèterait de meilleure manière la relation entre la mesure de l'hétérozygotie à certains loci et le degré de consanguinité d'un individu. Aparicio et al. (2006) montrent que HL est une meilleure mesure de la consanguinité dans le cas de population « ouverte » alors que IR donne de bonnes estimations dans les cas de population avec une faible diversité génétique et un fort taux de consanguinité.
- La manière la plus simple de mesurer la diversité génétique d'un site génétique donné est d'estimer la diversité allélique. La diversité allélique (NA) est très simplement la moyenne du nombre d'allèles observés par locus. D'autre part on dit d'un locus qu'il est polymorphe quand il a plus d'un allèle, c'est-à-dire que la fréquence de l'allèle le plus répandu est de moins de 99% (ou 95% selon les

études) (Frankham 2002). On peut alors donner la proportion de loci polymorphes, c'est-à-dire le nombre de loci polymorphes divisé par le nombre total de loci. Cette mesure a peu d'intérêt au niveau individuel et est plutôt employée pour donner une estimation de la diversité génétique au niveau populationnel notamment pour mettre en évidence les effets des goulots d'étranglement sur la diversité génétique. Il est important de noter que plus le NA est élevé dans une population plus le niveau de l'hétérozygotie attendue sera important.

- Pour les haplotypes provenant du séquençage de l'ADN mitochondrial, il est possible de calculer la diversité des haplotypes par la formule $h = 1 - \sum f_i^2$ ou f est la fréquence du $i^{\text{ème}}$ haplotypes (Nei 1987, Avise 2000). On peut aussi estimer la différence moyenne du nombre de nucléotides entre les séquences des individus par la formule $\bar{D} = \sum f_i f_j p_{ij}$ ou f_i et f_j sont les fréquences des haplotypes i et j respectivement et p_{ij} est le nombre de nucléotides différents entre les deux séquences (Nei 1987, Avise 2000).

Pour les microsatellites toutes les mesures décrites ci-dessus sont utilisées (l'hétérozygotie, hétérozygotie standardisée, la consanguinité relative (F), le d^2 , l'IR et NA). L'étude de la diversité protéique se limite à l'estimation de F de H et du NA . Finalement pour l'ADN mitochondrial qui est étudié par séquençage, le nombre d'haplotypes est employé pour estimer la diversité d'une population.

II.4 SUR L'IMPORTANCE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS

Nous venons de voir que le nombre d'allèles à un site génétique donné, et dénombré dans une population, est l'estimation la plus simple de la diversité génétique. Il est généralement admis que la diversité allélique d'une population est positivement liée à son potentiel adaptatif (i.e. Amos & Harwood 1998, Frankham et al. 1999, 2002, Hedrick 2001). En effet, on suppose qu'un NA élevé permet de générer un grand nombre de

génotypes et, par la même occasion, une large gamme de phénotypes. Ce grand nombre de phénotypes accroît la probabilité qu'au moins certains phénotypes passent au travers de la sélection nouvelle causée par un changement de l'environnement (Hedrick 2001, Frankham et al. 1999, 2002, Blows & Hoffman 2005). Pourtant, la relation directe entre le nombre d'allèles d'un gène présent dans une population et le potentiel adaptatif est difficile à faire (Butlin & Tregenza 1998, MacKay & Latta 2002). Selon Frankham (1999) « Une question non résolue à l'heure actuelle est la relation entre les mesures moléculaire de la diversité génétique et les variations génétiques des traits quantitatifs ». Ainsi, McKay et al. (2001) ont par exemple montré dans une étude de la Brassicaceae *Arabis fecunda*, qu'il n'existait pas de lien entre la taille efficace et le potentiel adaptatif. Bien que le niveau de la diversité génétique soit bas, il ne reflétait pas la variation observée des caractéristiques phénotypiques. Ces résultats, corroborent ceux d'autres études qui montraient l'absence de corrélation positive entre l'hétérozygotie et les paramètres de génétique quantitative (Waldmann & Andersson 1998, Lynch et al. 1999). Dans une méta-analyse basée sur plus de 70 études, Reed & Frankham (2001) démontrent qu'il ne semble pas y avoir de relation entre les variations du niveau de diversité génétique et les variations observées sur des caractères quantitatifs, soulignant une fois encore que la relation entre diversité génétique et potentiel adaptatif peut être discutée.

La diversité génétique jouerait un rôle du point de vue évolutif, mais aussi écologique. Dans un écosystème, une plus grande diversité génétique des espèces présentes, permettrait d'accroître le nombre d'interactions inter spécifiques. Crutsinger et al. (2006) ont ainsi montré une relation positive entre le nombre de génotypes présents dans une population de verges d'or (*Solidago altissima*), le nombre d'espèces d'arthropodes présents et la production primaire du système. Johnson et al. (2006) ont obtenu des résultats similaires chez l'onagre bisannuel (*Oenothera biennis*). De même, des populations de zostères (*Zostera marina*) possédant une plus grande diversité génétique ont aussi une résistance plus élevée aux perturbations (Hughes et al. 2004 ; Reusch et al. 2005). D'autre part, ces populations recouvrent plus rapidement leur densité d'origine après une perturbation.

Encart 1 :

Diversité allélique et CMH

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est une famille de protéines, formée par un complexe multi-géniques, qui intervient dans la réaction du système immunitaire aux agents infectieux. Il a été montré que la diversité génétique aux gènes CMH joue un rôle prépondérant dans la lutte contre les agents infectieux :

Les gènes codent pour tout un ensemble de récepteurs à la surface de certaines cellules immunitaires ou non. Le CMH comprend 2 grandes familles que l'on nomme classe I et classe II. Les gènes de la classe I expriment des protéines que l'on trouve à la surface de toutes les cellules somatiques. Elles jouent un rôle dans la défense intra cellulaire en fixant les peptides d'origines virales (Bernatchez & Landry 2003). Les gènes de la classe II codent pour des protéines membranaires des cellules immunitaires (lymphocytes B et macrophages notamment) et permettent la fixation d'agents exogènes (bactéries par exemple) qui seront par la suite présentés aux lymphocytes T.

Un nombre important de molécules CMH différentes permet la reconnaissance par le système immunitaire d'un plus grand nombre de pathogènes (Kurtz et al. 2004). En revanche, un trop grand nombre d'allèles est contre sélectionné car il se traduit par une trop forte reconnaissance des lymphocytes T et une auto réactivité néfaste au bon fonctionnement du système immunitaire et; les lymphocytes seront éliminés au niveau du thymus (Janeway 1999, 2001, Sebzda et al. 1999). Une sélection stabilisatrice se produit donc sur les complexes CMH, avec un nombre de molécules CMH optimum donnant la réponse immunitaire la plus efficace. Wegner et al. (2003) ont montré que pour un nombre possible de trois à neuf formes de molécules CMH (de la classe II), les individus possédant un nombre intermédiaire d'allèles ont la plus faible charge parasitaire. Hedrick (2004) confirme ces résultats par simulation. Les effets de la sélection sur le CMH peuvent avoir pour effet le maintien de la diversité génétique.

II.5 DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE INDIVIDUELLE : CONSANGUINITÉ ET HÉTÉROZYGOTIE (F , H , IR , D^2)

LA CONSANGUINITÉ

L'analyse du pedigree représenterait la méthode la plus fiable pour estimer le degré de consanguinité d'un individu (Slate et al. 2004). Cette approche exige néanmoins de reconstituer les relations de parenté entre individus ce qui nécessite une grande quantité d'information rarement disponible (notamment de connaître tous les parents potentiels de la population). C'est pourquoi beaucoup d'études se sont intéressées à une estimation de la consanguinité par l'hétérozygotie mesurée à l'aide de marqueurs neutres. Cette approche est cependant contestée (Balloux et al. 2004, Pemberton 2004, Coltman & Slate 2003).

La dépression de consanguinité représente la diminution de la valeur d'un caractère en lien avec la fitness chez des individus consanguins comparés à des individus non consanguins (Cnrokrak & Roff 1999). La dépression de consanguinité est parfois confondue avec le terme « fardeau génétique ». Ces deux expressions représentent toutefois deux concepts différents (Kirkpatrick & Jarne 2000). Le terme dépression de consanguinité ne devrait être employé que lorsque la diminution de la valeur phénotypique d'un caractère est due à la reproduction entre individus apparentés : les gènes homozygotes sont identiques par descendance et proviennent donc du même ancêtre. Par définition, un individu homozygote n'est donc pas forcément consanguin. L'expression fardeau génétique (« genetic load », Crow 1993) décrit la diminution de la valeur sélective moyenne d'une population dans laquelle des mutations délétères se seraient accumulées par rapport à une autre population. Une faible taille d'une population augmente la probabilité d'homozygotie et d'expression de certains caractères récessifs délétères. Le fardeau génétique serait donc responsable de la dépression de consanguinité (Keller et al. 1994, Saccheri et al. 1998).

En général, la mesure de la dépression de consanguinité se fait par comparaison des caractères étudiés entre des lignées consanguines et non consanguines (Lande & Schemske 1985, Cnrokrak & Roff 1999, DeRose & Roff 1999 ; voir Tableau 2 pour des exemples). On peut définir δ , le coefficient de dépression de consanguinité (Lande &

Schemske 1985), comme $\delta = 1 - (X_I / X_o)$ où X_I est la valeur du trait étudié pour la lignée consanguine et X_o pour la lignée qui ne l'est pas. Cette mesure est applicable pour des expérimentations durant lesquelles des lignées, avec des degrés de consanguinité différents, ont été créées. En revanche, elle ne peut pas être utilisée pour des populations naturelles pour lesquelles les croisements entre individus ne peuvent pas être contrôlés ou connus. Dans ces conditions, des approches moléculaires peuvent être utilisées (Hedrick & Kalinowski 2000).

L'HÉTÉROZYGOTIE

Il est généralement admis que l'hétérozygotie individuelle est un avantage (heterosis). Deux hypothèses permettent d'expliquer cette supposition (Crnokrak & Barret 2002):

1. Selon l'hypothèse de la **surdominance**, les génotypes hétérozygotes ont une valeur sélective plus élevée que les génotypes homozygotes. Un individu hétérozygote possédant deux isozymes, pourrait accroître l'efficacité de ses réactions enzymatiques, et donc faire face de manière plus efficace aux stress environnementaux, qu'un individu homozygote n'en possédant qu'une seule forme. Avec l'augmentation de la consanguinité, la fréquence des loci homozygotes s'accroît et se traduit par une diminution de la fitness.
2. L'hypothèse de la **dominance partielle** souligne l'avantage de l'hétérozygotie face aux potentiels effets néfastes de l'homozygotie qui permettrait l'expression d'allèles récessifs délétères.

Bien que l'hypothèse de la surdominance soit avancée pour expliquer le maintien de la diversité génétique d'une population par la survie des individus hétérozygotes par rapport aux individus homozygotes, ces deux hypothèses sont encore discutées (Charlesworth & Charlesworth 1999). De nombreuses études tendent à démontrer les avantages de l'hétérozygotie (voir Tableau 3), mais selon Gemmell & Slate (2006) ces avantages ne peuvent être affirmés que lorsque trois connaissances préalables sont réunies ;

Tableau 2 Exemples de traits affectés par la dépression de consanguinité (d'après Crnokrak & Roff 1999)

Espèces	Traits	Valeur du trait non consanguin	Valeur du trait consanguin	Références
Oiseaux				
<i>Aphelocoma ultramarina</i>	Taille de ponte	3,27	2,53	Brown & Brown (1998)
	Survie au nid	0,33	0,086	Brown & Brown (1998)
<i>Geospiza magnirostris</i>	Asymétrie fluctuante	-0,068	2,33	Grant & Grant (1995)
<i>Melospiza melodia</i>	Survie	135; 95	30; 5	Keller et al. (1994)
<i>Parus major</i>	Survie après l'envol	7,8	0	Bulmer (1973)
	Survie au nid	83,8	72,3	Greenwood et al. (1978)
	Survie à l'éclosion	0,963	0,8	Van Noodwijk & Schalroo (1981)
Mammifères				
<i>Leontopithecus rosalia</i>	Survie juvénile	0,829	0,474	Dietz & Baker (1993)
	Succès reproducteur	86	0	Dietz & Baker (1993)
<i>Panthera leo</i>	Volume de l'éjaculat	9,4	5,9	Wildt et al. (1987)
	Motilité spermatique	91	61	Wildt et al. (1987)
	Nombre d'anormalité spermatique	24,8	66,2	Wildt et al. (1987)
<i>Papio anubis</i>	Survie juvénile	84,2	50	Packer (1979)
<i>Papio cynocephalus</i>	Survie juvénile	81	0	Alberts & Altmann (1995)
<i>Peromyscus leucopus</i>	Survie	100	56	Jimenez et al. (1994)
	Masse corporelle	21,4	21,8	Jimenez et al. (1994)
<i>Sorex araneus</i>	Survie juvénile	0,35	0,28	Stockley et al. (1994)
Poïkilothermes				
<i>Arianta arbustorum</i>	Succès reproducteur	0,5	0,33	Chen (1993)
	Survie	0,8	0,58	Chen (1993)
<i>Salmo gardneri</i>	Survie des œufs	95,1; 94,5; 96,8	86,2; 79,3; 91	Gjerde et al. (1993)
	Survie des alevins	99; 98,4; 96,3	96,2; 90,1; 91,5	Gjerde et al. (1993)
	Survie des alevins	81,4; 72,7; 72,6	72,3; 67,1; 54	Gjerde et al. (1993)
<i>Vipera berus</i>	Taille de ponte	10	7	Madsen et al. (1996)
	Survie juvénile	91	68,4	Madsen et al. (1996)

1. les gènes et les différentes formes alléliques responsables de l'avantage de l'hétérozygotie doivent être connus ;
2. la valeur sélective (fitness) de chaque génotype doit être connue ;
3. le mécanisme de sélection doit être compris : il faut être capable d'expliquer pourquoi le génotype hétérozygote a une valeur sélective plus élevée que le génotype homozygote.

Dans les études mentionnées par Gemmell & Slate (2006) ou encore par Mitton (1997), l'hétérozygotie est mesurée au niveau des allozymes, avec des fonctions connues. Mais l'hétérozygotie mesurée à des sites génétiques ponctuelles ne reflètent pas forcément le niveau global d'hétérozygotie d'un individu et donc son niveau de consanguinité (Coltman & Slate 2003, Balloux et al. 2004).

Le niveau global de consanguinité pourrait être estimé par H , IR , d^2 , mesuré sur plusieurs loci (généralement allozymes ou microsatellites ; Hedrick & Kalinowski 2000). Trois hypothèses permettent d'interpréter la relation positive entre l'hétérozygotie mesurée sur plusieurs marqueurs et la fitness (David 1998, Hansson & Westberg 2002, Slate et al. 2004). Ces hypothèses sont toujours très discutées à l'heure actuelle (David 1998, Hansson & Westberg 2002, Slate & Pemberton 2002, Coltman et al. 2003, Balloux et al. 2004, Pemberton 2004, Slate et al. 2004) :

1. La relation entre le ou les marqueurs génétiques employés est directe, le génotype hétérozygote conférant un avantage sélectif par rapport aux homozygotes (hypothèse de la surdominance). Cette relation semble pouvoir être exclue pour des loci microsatellites puisqu'ils sont considérés comme non codants.
2. Le marqueur est lié de manière physique à un locus dominant ou surdominant donnant l'avantage de l'hétérozygotie. Les individus hétérozygotes pour ces

marqueurs tendent à l'être aussi pour les gènes affectant la fitness. Cette hypothèse est appelée « effet local ».

3. L'hétérozygotie aux loci étudiés reflète l'hétérozygotie globale de l'individu. Cette hypothèse est appelée « effet général ».

Balloux et al. (2004) montrent par des simulations que, pour obtenir une bonne corrélation entre l'hétérozygotie estimée à l'aide de marqueurs non codants et la valeur sélective, des conditions particulières sont requises : un très grand nombre de loci, une forte structuration de la population (population composée de groupes entre lesquels il y a peu d'échanges génétiques), couplée à une polygynie extrême (un mâle s'accouple avec plusieurs femelles, une femelle avec un seul mâle et très peu de mâles se reproduisent). D'autre part, la difficulté de la mise en évidence de cette relation est limitée par l'imprécision des mesures de valeurs sélective, les tailles des échantillons, les méthodes employés pour les analyses génétiques et les erreurs techniques qui leur sont propres (par exemple les allèles nuls pour les microsatellites) (David, 1998). Ainsi, pour les mesures de valeur sélective, il faudrait uniquement considérer, la fécondité, la survie ou des mesures de croissance des individus (David 1998). La corrélation entre hétérozygotie et valeur sélective est généralement faible ($r^2 < 0.01$ Coltman & Slate, 2003). Or dans un échantillon de N individus, même si la corrélation entre hétérozygotie et valeur sélective est nulle, il est attendu par chance un r^2 de $1 / (N-1)$ (Sokal & Rohlf 1995, David 1998). Lorsque l'on emploie L loci, le r^2 attendu par chance est alors de $L / (N-1)$ ce qui devient problématique si L n'est pas largement inférieur à N . Il faudrait alors considérer un minimum de 600 individus (Coltman & Slate 2003) voire 1000 (David 1998), pour que signal mesuré (r^2) soit de la même amplitude que le bruit. L'hétérozygotie multi-locus représenterait donc une estimation du taux de consanguinité des individus (Hedrick & Kalinowski 2000). Cependant, la présence d'allèles nuls ou l'emploi de marqueurs très polymorphes peut respectivement entraîner une sous-estimation ou une surestimation de la valeur de H biaisant ainsi l'estimation du taux de consanguinité (David 1998). D'autre part, compte tenu de la taille du génome, le faible nombre de locus généralement employés dans les études ne serait pas représentatif du niveau global de la consanguinité

(Slate et al. 2004, Pemberton 2004). Balloux et al. (2004) parlent de 200 marqueurs pour que l'hétérozygotie reflète la consanguinité réelle des individus.

Pourtant, de nombreuses publications ont montré une relation entre l'hétérozygotie et des caractères importants pour la survie des individus (Tableau 4) et cela pour plusieurs raisons possibles :

- La relation hétérozygotie/fitness serait renforcée dans des conditions qui favoriseraient la liaison entre loci neutres et loci sous sélection ; à savoir une population jeune, de petite taille, créée par un faible nombre d'individus (Hansson & Westerberg 2002, Hansson et al. 2004, Slate et al. 2004) ;
- Il existerait un biais dans les publications en faveur des études montrant une relation hétérozygotie/fitness (Coltman et al. 1999) ;
- Il existerait un biais pour les choix de marqueurs les plus polymorphes (Balloux et al. 2004).

Tableau 3 Exemples illustrant la supériorité de l'hétérozygotie (« heterosis ») face à l'homozygote (d'après Gemmell & Slate 2006)

Espèces	Locus	Avantage de l'hétérozygotie	Désavantage de l'homozygotie	Références
<i>H. sapiens</i>	HBB	Résistance à la malaria	Drépanocytose falciforme	Allison (1954)
	CFTR	Résistance au choléra	Mucoviscidose	Gabriel et al. (1994)
	HBA α -thalassémie	Résistance à la malaria	α -thalassémie	Flint et al. (1986)
	HBB β -thalassémie	Résistance à la malaria	β -thalassémie	Flint et al. (1986)
	HLA (CMH)	Accroissement de la résistance aux agents infectieux		Penn et al. (2002)
	HLA (CMH)	Avantage reproducteur (choix du partenaire)		Sauermann et al. (2001)
	TDS	Accroissement de la résistance à la tuberculose		Yokoyama (1979)
	TDS et GD	Faciliterait processus de la mise en réserve des graisses	Maladie de Tay-Sachs et Gaucher	Peleg et al. (1998)
	G6PD	Résistant à la malaria	Anémie hémolytique non sphérique	Luzatto et al. (1969); Ruwende et al. (1995)
	PRNP	Accroissement de la résistance au kuru		Hedrick (2003), Mead et al. (2003)
	GJB2	Accroissement de la survie des cellules et épiderme plus profond	Surdité	Common et al. (2004), Meyer et al. (2002)
	PAH	Résistance à l'Ochratoxine A (toxine produite par une levure trouvée dans les céréales)	Phénylcétonurie	Woolf(1986)
	CCR5	Limite la progression du VIH		Dean et al. (1996), Liu et al. (1996)
MEFV	Résistance à la tuberculose	Fièvre familiale méditerranéenne	Torosyan et al. (1999)	
<i>Rattus norvegicus</i>	RW	Résistance à la Coumaphène (pesticide)	Besoins accrus en vitamine K	Greaves et al. (1977)
<i>Colomba livia</i>	TF	Infection microbienne limitée et nombre d'œufs plus important qu'homozygotes		Frelinger (1972)
<i>Colias meadii</i>	PGI	Succès reproducteur des mâles plus élevé		Watt et al. (2003)
<i>Culex pipiens</i>	Acc. 1 Ester	Résistance aux pesticides		Lenormand et al. (1999)

Tableau 4 Exemples de caractéristiques spécifiques reliées à la survie ou succès reproducteur et qui seraient corrélées au taux d'hétérozygotie mesuré à l'aide de marqueurs neutres (d'après Freeland, 2005)

Espèces	Caractéristiques	Références
Mouton de Soay (<i>Ovis aries</i>)	Mortalité plus forte causée par le parasitisme sur les individus avec une faible hétérozygotie	Coltman et al. (2001)
Gaufre de Botta (<i>Thomomys bottae</i>)	Coût métabolique plus important lors du creusement des terriers pour les individus avec un faible H	Hildner & Soulé (2004)
Bonnet bleu (<i>Scabiosa columbaria</i>)	Populations avec faible H sont moins aptes à la compétition avec d'autres espèces de plantes	Pluess & Stocklin (2004)
Moule commune (<i>Mytilus edulis</i>)	Réponse immunitaire plus forte pour les individus avec une forte H	Carissan-Lloyd et al. (2004)
Châtaigner d'Amérique (<i>Castanea dentana</i>)	Taux d'accroissement plus fort pour les individus avec une forte H	Stilwell et al. (2003)
Agrion mignon (<i>Coenagrion scitulum</i>)	Taille du corps et succès reproducteur plus important pour individus avec une H élevée	Carchini et al. (2001)
Crapaud commun (<i>Bufo bufo</i>)	Relation négative entre H et le nombre d'anormalités chez les larves de crapaud	Hitchings & Beebee (1998)

CHAPITRE III LA DYNAMIQUE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

La dynamique de la diversité génétique des populations est sous l'influence de plusieurs facteurs présentés dans la Figure 1. On peut les séparer en deux catégories : les facteurs temporels (mutations, sélection, dérive) et les facteurs spatiaux (structure de la population, flux de gènes). Ci-dessous, je détaille ces deux types de facteurs.

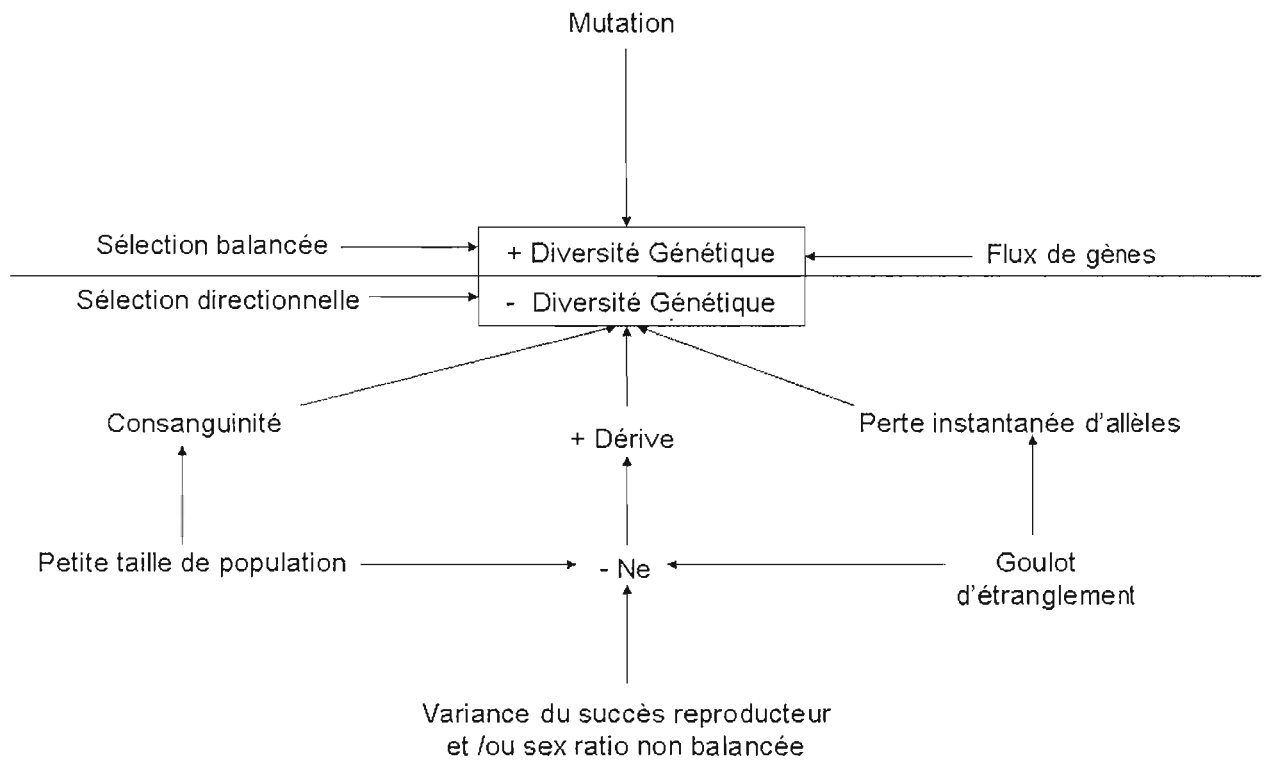


Figure 1 Principaux facteurs influençant le niveau de diversité génétique d'une population (Modifié de Freeland 2005)

III.1 DYNAMIQUE TEMPORELLE

III.1.1 Taux de mutation et neutralité : l'horloge moléculaire

Le principe de l'horloge moléculaire, proposé par Zuckerkandl & Pauling (1962), prédit que le rythme des mutations (Cf. Encart 2) se fait de manière constante au cours du temps (Avisé 2004). Cependant, ce principe est incompatible avec celui de la sélection naturelle dont l'intensité peut varier d'une période à l'autre et pourrait influencer le « tempo » des mutations. La théorie neutraliste proposée par Kimura & Ohta (1971) pourrait expliquer la constance du taux d'évolution de l'ADN. Cette théorie prédit que très peu de mutations sont avantageuses, que les mutations délétères sont très rapidement supprimées par la sélection et que la variabilité observée serait due uniquement à des mutations dites « neutres », c'est-à-dire aux acides aminés qui n'affectent pas le fonctionnement de la protéine. La vitesse d'évolution, peut quant à elle, varier selon la protéine ou la séquence d'ADN étudiée. Dickerson (1971) montre par exemple, que la vitesse d'évolution des protéines change selon la proportion de sites neutres qu'elles contiennent. Le même type de processus se retrouve au niveau de l'ADN, où le taux de mutation est plus rapide pour la troisième base du codon des acides aminés. En effet, il existe des codons dits synonymes qui codent pour le même acide aminé, mais qui diffèrent uniquement par leur troisième base (i.e. Hartl & Clark 1997). Une mutation sur la troisième base du codon n'affecte pas la composition de la protéine et n'est donc pas soumise à la sélection.

Encart 2 :

« Back to Basic »: Les mutations

Bien qu'il soit contrôlé par un certain nombre d'enzymes, le processus de réplication de l'ADN n'est pas fiable à cent pour cent, et certaines erreurs ou mutations ne sont pas éliminées. Ces mutations sont la seule possibilité d'accroître la diversité génétique des populations isolées. Les mutations sont des processus spontanés, cependant elles peuvent être accélérées par des agents mutagènes (ondes électro-magnétiques, agents chimiques).

Classiquement, deux catégories de mutations sont reconnues en fonction du type de bases affectées : on parle de transition lorsqu'une base est remplacée par une base du même type (purine par purine : A par G ou pyrimidine par pyrimidine : C par T) et de transversion lorsqu'il y a remplacement d'une base purine par une pyrimidine et inversement. D'autre part, les mutations sont classées en fonction de leurs effets sur les gènes. Si elles sont causées par le remplacement d'un nucléotide ou l'ajout/suppression de nucléotides, on considère alors :

Les mutations par substitution :

- *les mutations silencieuses : le codon formé par la mutation d'un nucléotide, code pour le même acide aminé que le codon original ;*
- *les mutations non-sens : le changement du nucléotide aboutit à la formation d'un codon stop qui va provoquer la production de protéines tronquées ;*
- *les mutations faux-sens : le nucléotide remplacé aboutit à la formation d'un codon qui code pour un autre acide aminé que le codon original. Ce type de mutations peut aboutir à la formation d'une nouvelle protéine qui peut avoir des conséquences importantes pour la survie de l'individu (et donc évolutives). Si les mutations touchent un nucléotide de la zone promotrice d'un gène cela peut affecter sa transcription.*

Les mutations par insertion :

- *les mutations décalantes : elles consistent en l'addition ou la délétion de nucléotides. Elles peuvent provoquer des décalages de la fenêtre de lecture (zone lue par l'ADN polymérase) et aboutir généralement à la production d'une protéine tronquée ;*

Seules les mutations affectant les protéines et/ou leur régulation peuvent avoir un effet sur la qualité du phénotype et donc jouer un rôle évolutif. Le rythme d'apparition des mutations et leur maintien dans une population ont été décrits par les principes de

l'horloge moléculaire et les théories de sélection moléculaire (Zuckerkandl & Pauling, 1962; Kimura & Ohta, 1971).

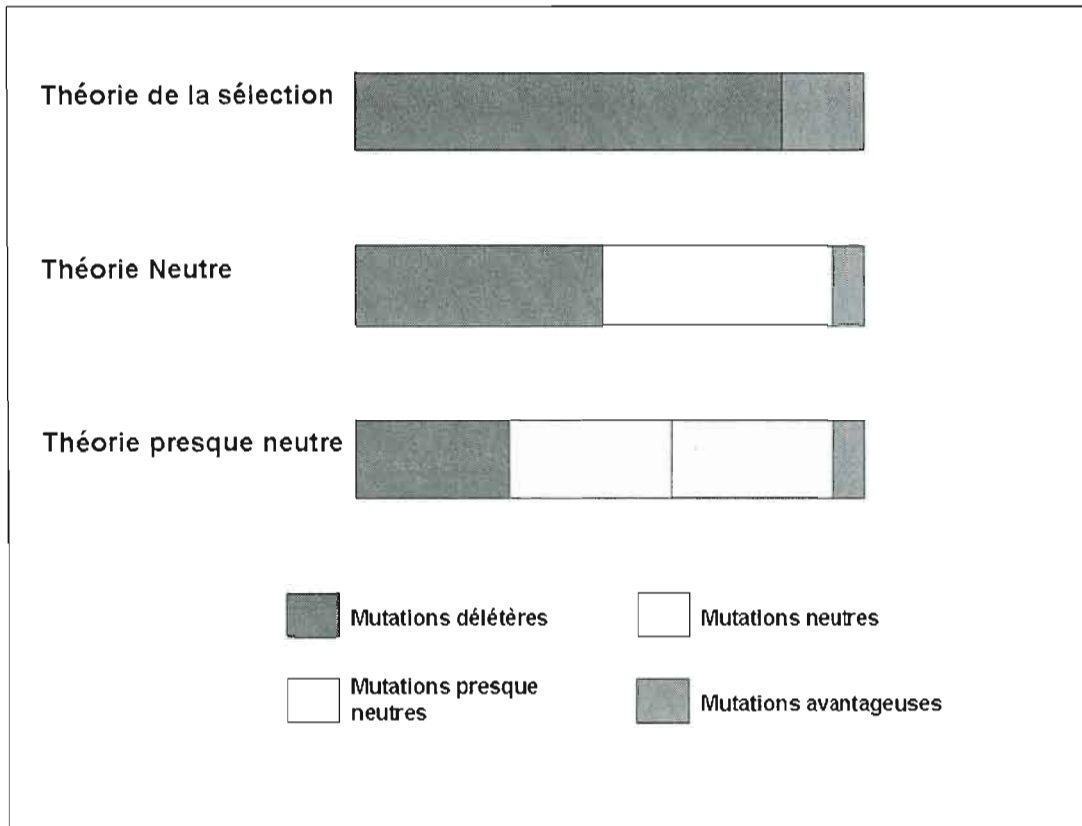


Figure 2 Proportions et types de mutations sous la théorie de la sélection, la théorie neutre et presque neutre (d'après Ohta 2002).

Une seconde théorie de l'évolution moléculaire prend en compte les effets de la sélection sur le taux de mutation et s'écarte de la théorie de l'horloge moléculaire. C'est la théorie « presque neutre » (« nearly neutral theory ») présentée par Ohta (1971,1992, 2002) qui est une extension de la théorie neutraliste. Elle représente une tentative d'explication des différences qui peuvent exister entre le nombre de mutations prédit par le modèle neutraliste, et celui observé dans une population. Dans ces travaux, Ohta souligne le rôle crucial de la taille efficace de la population dans les mécanismes de sélection de mutants. Dans les populations de grande taille les mutations faiblement délétères sont rapidement éliminées par la sélection. Au contraire, dans les petites populations, la sélection peut être contrée par les effets de la dérive et des mutations

faiblement délétères peuvent donc être fixées. Ohta définit trois catégories de mutations (Figure 2): les mutations qui sont soumises à la sélection, les mutations presque neutres qui sont soumises à la fois aux forces de la sélection et à celle de la dérive et enfin les mutations neutres qui ne sont soumises qu'à la dérive. La théorie neutre et presque neutre s'opposent à la théorie de la sélection (néo-Darwinienne; Ohta, 1995), où la plus grande proportion des mutations sont délétères, et seules quelques unes sont avantageuses (Figure 2). Comme précédemment mentionné, le principe de l'horloge moléculaire ne peut pas s'appliquer dans la cadre de la théorie de la sélection, puisque la fixation des nouvelles mutations se produirait à intervalles de temps variables et serait fortement dépendant de la valeur sélective de la mutation.

III.1.2 Mutations et mesures de génétique des populations

Précédemment, nous avons vu que le taux de mutation varie en fonction du marqueur moléculaire employé et peut donc affecter les mesures de diversité génétique. Ainsi, dans la mesure où les microsatellites ont un taux de mutation plus rapide que les allozymes, H et NA sont généralement plus élevés pour les premiers (Avisé 2004). La probabilité d'homoplasie (formes alléliques identiques à un gène donné obtenues par deux histoires évolutives différentes) est elle aussi plus élevée (Estoup et al. 1995, Ortì et al. 1997). La présence d'homoplasie conduit à sous-estimer le nombre total de mutations qui se sont produites au cours du temps. C'est un facteur qui peut être important dans les méthodes employant les technique de coalescence (par exemple pour mesurer la taille efficace : Berthier et al. 2002) dans la mesure ou le nombre d'événements de coalescence sera sous-estimer. Le fort taux de mutation peut aussi entraîner la sous-estimation des divergences génétiques entre populations (Hedrick 1999, Balloux et al. 2000).

La manière dont les marqueurs moléculaires mutent n'est pas bien connue. Comme nous l'avons vu, divers schémas de mutation ont été envisagés pour les microsatellites (KAM, IAM, SSM, TPM) qui ont pour conséquence une différence dans la distribution attendue de la fréquence des allèles. Or, certaines mesures en biologie évolutive, sont basées sur la comparaison entre cette distribution observée et celle

attendue à partir de modèles de génétique des populations. Si la distribution de la fréquence attendue est basée sur un mauvais schéma de mutation, ces tests deviennent alors peu utiles et peuvent mener à des conclusions erronées. Les tests de sélections tel celui d'Ewens-Watterson, ou bien la mise en évidence de goulots d'étranglements (Luikart & Cornuet 1998) qui se servent de ce type de comparaison, peuvent être affectés par le schéma de mutation.

La détection de la structure de population basée sur la distribution de la variance de la diversité génétique (F -statistiques, Wright 1931) est, elle aussi, sensible aux types de mutations et de marqueurs. Par exemple, Balloux et al. (2002 ; voir aussi Lehman et al. 1996, Hedrick 1999) montrent que les estimations à partir d'allozymes génèrent des structures plus fortes (population plus différenciée) que les estimations faites avec des microsatellites. Ces différences sont notamment causées par le taux de mutations plus rapide des microsatellites qui produisent de fortes mesures de H et la particularité du type de leurs mutations. Slatkin (1995) a ainsi décrit une méthode statistique plus adaptée qui tient compte d'un type de mutation SSM décrit parfois pour les microsatellites.

III.1.3 La sélection

La diversité génétique des populations est affectée par la sélection naturelle. Elle agit sur le succès reproducteur des individus d'une population, en fonction de leur génotype (Li, 1997). Les allèles qui contribuent à une plus forte fécondité et à une survie plus importante jusqu'à l'âge de reproduction, auront tendance à augmenter en fréquence dans une population. La fréquence d'un allèle change en fonction de l'intensité de la sélection qui s'exerce sur lui.

La sélection peut aussi bien agir dans le sens de l'accroissement de la diversité génétique que de sa réduction. De manière simplifiée, il est admis que **la sélection stabilisatrice** et **la sélection directionnelle** réduisent la diversité (Figure 3). La sélection directionnelle réduit généralement la diversité, soit par élimination des mutations délétères (**sélection négative**) soit par accroissement des fréquences de mutations avantageuses (**sélection positive**). Durant la période où la sélection positive agit, l'augmentation de la fréquence de certains allèles peut provoquer un accroissement

temporaire de la diversité génétique à un locus (polymorphisme transitoire). Une fois la mutation fixée dans la population, le locus devient monomorphe (Freeland 2005).

Avec la **sélection disruptive**, les phénotypes extrêmes sont favorisés par rapport (2005). Les phénotypes intermédiaires et leurs génotypes associés peuvent disparaître de la population.

La **sélection balancée** est le terme généralement employée pour le processus qui maintient la diversité quand certains allèles sont favorables dans un type d'environnement et d'autres, pour un autre type d'environnement. La super dominance est un type de sélection balancée (Cf. paragraphe précédent). Un exemple bien connu de sélection balancé est celui du CMH pour lequel il a été montré que la sélection agit de manière à maintenir la plus grande diversité génétique dans une population. Une étude de Aguilar et al. (2004) a ainsi illustré de manière saisissante les effets de la sélection sur la diversité génétique mesurée aux loci CMH et à des marqueurs neutres, dans des populations insulaires de « renards des îles » (*Urocyon littoralis*). La diversité génétique neutre était très faible, par contre aux loci CMH elle était maintenue à un niveau relativement élevé par les effets de la sélection. De nombreuses autres études vont dans le même sens (Hedrick & Kim 2000, Takahata & Mei 1990, Landry et al. 2001).

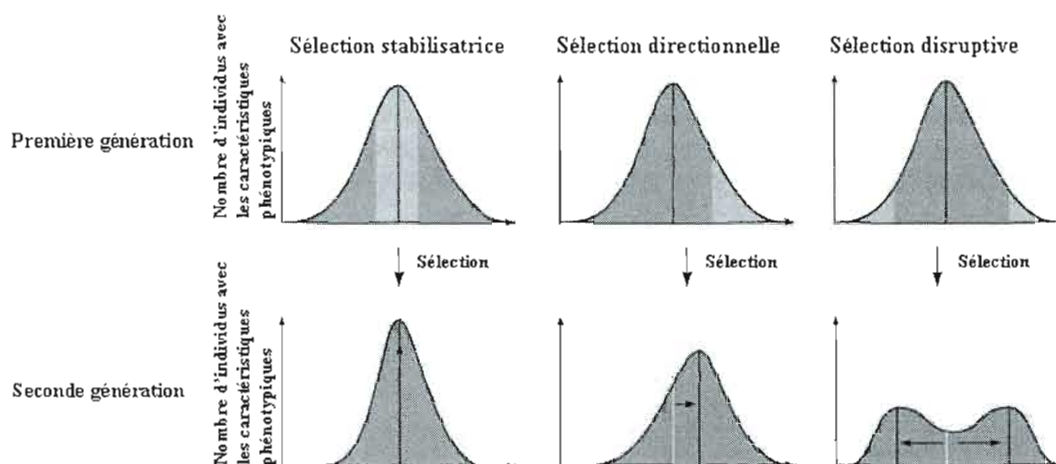


Figure 3 Les différents types de sélection. La zone jaune représente le phénotype optimal.

Il est souvent difficile de mettre en évidence les effets de la sélection sur la fréquence des allèles. Il faut noter que le test d'Hardy-Weinberg est de peu d'utilité dans les études de sélection, d'une part car il existe de nombreux paramètres pouvant

influencer l'équilibre d'Hardy-Weinberg (Li 1988, Stark 2006), d'autre part, car ce test serait utile uniquement durant la phase de polymorphisme transitoire (Manly 1985).

Ewens (1972) a proposé une méthode relativement simple basée sur la distribution de la fréquence des allèles :

Lorsque que la fréquence des allèles est à l'équilibre entre les nouvelles mutations et la dérive, l'hétérozygotie attendue est : $H = \frac{4N\mu}{1+4N\mu} = \frac{\theta}{\theta+1}$ où N est la taille de la

population et μ le taux de mutation et $\theta = 4N\mu$. Considérant cet état d'équilibre, Ewens (in Hartl & Clark 1997, Manly 1985) a démontré que le nombre d'allèles (k) attendu dans

un échantillon de taille n est de : $k = 1 + \frac{\theta}{\theta+1} + \frac{\theta}{\theta+2} + \dots + \frac{\theta}{\theta+n-1}$. Il est alors possible

de comparer la distribution du nombre d'allèles observée et attendue. La sélection peut agir en éliminant certains allèles délétères ou moins efficaces que d'autres, ce qui va générer des différences entre les distributions attendues et observées. Cette méthode a cependant quelques limitations dans la mesure où la distribution de la fréquence des allèles peut aussi être affectée par les fluctuations d'effectif de la population, par exemple (Manly 1985). D'autre part, cette méthode a été décrite pour un système de mutation IAM où le nombre d'allèles possible est infini, ce qui n'est pas le cas des allozymes où des microsatellites (Cf. paragraphe précédent). A partir d'estimations de la fréquence des allèles provenant d'échantillons dispersés soit dans l'espace, soit dans le temps, il est alors possible d'utiliser des méthodes basées sur la variance des fréquences telles que décrites par Lewontin & Krakauer (1973), Waples (1989) ou encore plus récemment par Goldringer & Bataillon (2004). Finalement, d'autres méthodes utilisent la fréquence d'apparition de mutations. En effet, un locus qui n'est pas soumis à la sélection aura un taux de mutation plus rapide que s'il est sous contraintes sélectives. Le nombre et la distribution des fréquences des mutations seront alors révélatrices de la sélection (Kimura 1983, Kimura & Crow 1964, Tajima 1989). Pour une revue plus complète, on se réfèrera par exemple à Skibinski (2000).

III.1.4 La dérive

La dérive génétique est le changement de la composition génétique d'une population de petite taille causé par des effets d'échantillonnage aléatoire. Il peut s'agir aussi bien de la perte, de la fixation de certains allèles ou du changement de leur fréquence (Falconer & Mackay 1996, Frankham 2002).

Un goulot d'étranglement, associé par exemple à la fondation d'une nouvelle population, provoque une très forte dérive, à savoir une composition génétique nouvelle due à l'échantillonnage aléatoire d'allèles de la population ancestrale. Frankham (1995), suivant les propositions de Soulé (1976), a montré plus généralement de quelle manière la taille de la population influence la diversité génétique. Frankham propose dix prédictions sur la composition génétique d'une population en relation avec sa taille. Il montre notamment que les populations insulaires ont en moyenne une diversité plus faible que les populations continentales. Les fluctuations des effectifs de la population peuvent aussi avoir des effets importants sur l'érosion de la diversité génétique (Vucetich et al. 1999) et seront variables selon la durée et le nombre d'individus résiduels dans la population et la dynamique de la population (Nei et al. 1975). Plus que l'effectif, la « taille efficace » de la population est importante pour expliquer ces effets sur la composition génétique de la population. La taille efficace représente le nombre d'individus d'une population qui contribuent à la reproduction et au pool génétique de la population (Wright 1931, Caballero 1994, Falconer & Mackay 1996) mais nous y reviendrons plus en détails au chapitre suivant.

III.2 DYNAMIQUE SPATIALE

III.2.1 Estimation de la structure

Les populations ne constituent pas uniquement de simples rassemblements d'individus d'une même espèce, mais sont souvent structurées à diverses échelles (Sugg et al. 1996, Stortz 1999). Ainsi, les populations peuvent être divisées en sous-populations,

qui peuvent être organisées en groupes sociaux, regroupant eux-mêmes différentes familles. Cette structuration peut être due à des causes environnementales telles que la répartition des ressources trophiques ou la fragmentation de l'habitat. Les groupes sociaux peuvent apporter les avantages de la coopération dans la défense contre les prédateurs, la chasse collective et les soins aux juvéniles (garderie). Enfin, les regroupements familiaux peuvent être dus au système de reproduction ou à la sélection de parentèle (Höglund et al. 1999, Russell & Hatchwell 2001). A l'inverse, l'évitement de la reproduction entre individus apparentés, pour diminuer le risque de dépression de consanguinité, se traduit par de la dispersion qui crée des mouvements limitant l'apparition de structures (Clobert et al. 2001).

Cette structuration fonctionnelle peut engendrer une structuration génétique, les sous-populations acquérant des caractéristiques génétiques particulières avec des fréquences alléliques propres (Sugg et al. 1996). La diversité génétique peut être limitée au sein d'un groupe ou d'une sous-population du fait de la dérive. Dans son ensemble, cependant, une population constituée de sous-groupes maintient une plus large diversité génétique qu'une population homogène comptant le même nombre d'individus. De plus, l'échange d'individus reproducteurs entre les sous-populations peut permettre le transfert d'allèles d'un groupe à l'autre (Frankham, 2002, Freeland 2005). La structuration génétique des populations joue donc un rôle important dans le maintien et la dynamique de la diversité génétique (Whitlock 2003, Chesser 1991 a,b). La structuration génétique peut se mesurer sur de très faibles distances géographiques, y compris dans des populations à forte densité. Coltman et al. (2003) ont pu, par exemple, mettre en évidence une structuration génétique dans la population de moutons de Soay de l'île Saint Kilda sur une faible distance et à forte densité de population. Cette structure est causée par l'attachement des femelles à leur site de naissance.

Les statistiques F sont généralement utiles pour étudier la structuration génétique de la population (i.e. Hartl & Clark 1997). Elles expriment la répartition de la variance génétique entre les différents niveaux de structure. Dans les modèles de Wright (1931) et Chesser (1991), la variance génétique est décomposée en trois composantes qui correspondent à trois niveaux de structure de population : l'individu, la sous-population

et la population (Figure 4). Dans ce modèle hiérarchique, trois niveaux de corrélation génétique peuvent être définis (Sugg et al. 1996, Balloux & Lugon-Moulin 2002) :

1. F , l'indice de fixation, exprime la corrélation entre les gènes dans un individu (si $F=1$ l'individu est entièrement homozygote) ;
2. θ , la corrélation génétique entre individus du même groupe (« coancestry ») ;
3. α , la corrélation génétique inter-groupe.

A ces trois niveaux de corrélation génétique correspondent trois niveaux d'hétérozygotie :

1. l'hétérozygotie observée dans un individu: $H_I = 1 - F$;
2. l'hétérozygotie attendue dans une sous-population : $H_S = 1 - \theta$;
3. l'hétérozygotie attendue dans la population totale : $H_T = 1 - \alpha$.

Enfin, pour décrire la distribution de la variance génétique entre les différents niveaux de structure, on peut définir les indices suivants:

$$F_{IS} = \frac{F - \theta}{1 - \theta} \approx \frac{H_S - H_I}{H_S}$$

$$F_{IT} = \frac{F - \alpha}{1 - \alpha} \approx \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

$$F_{ST} = \frac{\theta - \alpha}{1 - \alpha} \approx \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

Le F_{IS} est un coefficient de consanguinité des individus relatif à la population à laquelle ils appartiennent. Il peut être interprété comme la réduction de la variance intra-individuelle par rapport à la variance inter-individuelle dans le groupe ou bien comme la réduction de l'hétérozygotie des individus par rapport à l'hétérozygotie attendue dans la sous-population. Une valeur de F_{IS} positive indique un indice de fixation F élevé (donc un niveau d'hétérozygotie bas chez les individus) par rapport à θ (donc une valeur attendue d'hétérozygotie élevée dans la sous-population). En d'autres termes, la sous-population connaît un déficit en hétérozygotes. Si le F_{IS} est nul la sous-population est panmictique et à l'équilibre. Enfin, si le F_{IS} est négatif, il y a un excès d'hétérozygotes par rapport au nombre attendu.

Le F_{IT} représente la proportion de variance intra-individuelle relativement à la variance génétique totale de la population. Il peut être interprété comme un F_{IS} mais à un niveau de structure plus élevé.

Le F_{ST} exprime la proportion de variance dans les sous-populations par rapport à la population entière. Une valeur positive du F_{ST} indique donc une forte corrélation entre allèles dans les sous-populations relativement à la corrélation entre allèles dans l'ensemble de la population. Il peut être interprété comme une mesure de la différenciation entre populations.

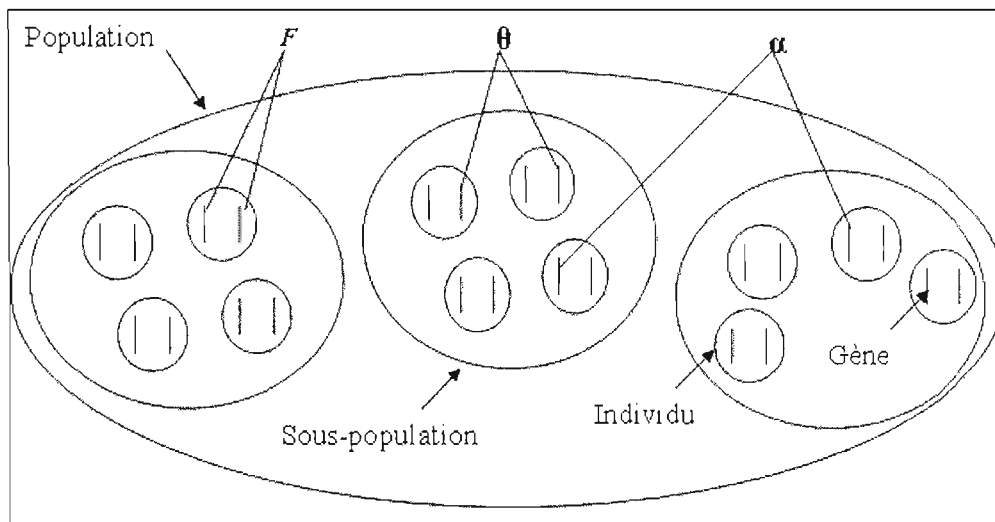


Figure 4 Corrélation génétique au niveau de : l'individu (F) dans une sous population (θ) et entre sous-populations (α).

Plus récemment, l'accroissement de la puissance de calcul des ordinateurs a permis le développement de méthodes d'assignation des individus par l'utilisation de principes de statistiques bayésiennes (Corander et al. 2003, Dawson & Belkhir 2003, Falush et al. 2003, Pritchard et al. 2000) ou de maximum de vraisemblance (Paetkau et al. 1995, Duchesne & Bernatchez 2002, Rannala & Mountain 1997, Cornuet et al. 1999, pour une revue plus complète voir Manel et al. 2005). Ces méthodes se basent sur l'information génétique des individus de manière à les regrouper selon leur degré d'apparentement. De plus, les groupes sont formés de façon à atteindre l'équilibre d'Hardy-Weinberg et à réduire le déséquilibre de liaison au maximum (Guillot et al.

2005, Pritchard et al. 2000). Les méthodes bayésiennes intègrent un « prior » (une connaissance préétablie) tel que la taille de la population (exemples : les méthodes Guillot et al. 2005 et de Pritchard et al. 2000). Le « prior » limite le nombre d'états statistiques possible et allège le calcul de l'assignation. Une des limitations de ces méthodes peut être la difficulté d'interprétation de certains résultats qui n'ont pas forcément de signification biologique (Pritchard et al. 2000) (ex: deux individus connus pour être d'origines différentes sont assignés au même groupe).

III.2.2 La migration et les flux géniques

Une forte migration inter démique limite la structure d'une population en homogénéisant la répartition des gènes entre les individus des différentes sous populations (Storz 1999). La migration limite donc les divergences génétiques entre les sous-populations. De manière réciproque, la perte de la diversité génétique dans une sous-population est ralentie par la migration d'individus qui proviennent d'une autre sous-population et apportent de nouveaux allèles (flux génique) (Sugg 1996, Storz 1999). Avec la mutation, la migration est le seul moyen d'augmenter la diversité génétique d'une population.

Plusieurs facteurs affectent les flux migratoires inter démiques. La capacité d'une espèce à disperser est sans doute le facteur le plus évident. Par exemple, la distance moyenne de migration est de 148,1 km (N= 77 espèces) chez les oiseaux, et de 74,6 km (N = 40 espèces) chez les mammifères (Sutherland et al. 2000). Le système de reproduction influence également le flux génique. Ainsi, Morjan & Rieseberg (2004) ont montré que les espèces avec un système de reproduction sexué ou mixte (sexué et clonal) ont des flux géniques plus élevés que des espèces qui se reproduisent uniquement par auto fécondation ou de manière clonale. Chez les plantes, les flux géniques sont aussi intimement liés à la manière dont sont dispersés les graines ou le pollen (Morjan & Rieseberg 2004). Hamrick & Godt (1990) ont mis en évidence une décroissance de la structure des populations pour des espèces dont les graines sont dispersées par gravitation, par des animaux, de manière explosive, par ingestion animale et enfin par le vent. Finalement, la fragmentation du milieu joue un rôle prépondérant dans la

structuration des populations en ralentissant ou en limitant les flux génétiques inter-démiques et en isolant les sous-populations (Freeland 2005).

Une migration très faible suffit à apporter la diversité génétique et à limiter la dérive génétique. Un cas très spectaculaire est celui de l'étude de Vilà et al. (2002) sur l'évolution de la diversité génétique d'une population de loup gris (*Canis lupus*) fondée par deux individus. Les auteurs montrent comment la migration d'un seul individu a accru l'hétérozygotie au sein de la population, a limité la consanguinité et aurait permis un accroissement rapide de la taille de la population.

Une grande capacité de migration pourrait aussi expliquer le succès des espèces invasives (Frankham 2005). Kolbe et al. (2004) ont montré que le succès d'invasion du lézard de Cuba (*Anolis sagrei*) en Floride était dû à des introductions répétées dans le temps qui ont pu accroître la diversité génétique.

Pour estimer et mesurer la dispersion plusieurs approches sont possibles. Dans le cas d'une espèce facilement capturable et observable, le marquage des individus puis le suivi de leur déplacement entre les populations, est sans doute la méthode la plus simple. Par extension des techniques de Capture-Marquage-Recapture (Lebreton et al. 1992), il est aussi possible d'estimer la proportion des individus d'une population qui dispersent (Devillard 2004).

Si l'on dispose de prélèvements de tissus sur lesquels des analyses génétiques sont possibles, les tests d'assignations décrits dans le paragraphe précédent peuvent être employés pour mettre en évidence la population d'origine des individus et donc estimer le nombre de migrants présents dans une population (i.e. Pritchard et al. 2000, Wilson & Rannala 2003). Ces mêmes informations génétiques peuvent être utilisées pour estimer le flux migratoire en employant une particularité de F_{ST} . Wright (1951) a montré qu'il existait une relation simple entre le F_{ST} et le flux génétique : $F_{ST} = \frac{1}{4Ne * m + 1}$ où Ne est la taille efficace de la population et m le taux de migration entre les populations. On peut alors estimer le nombre de migrants efficaces, les individus s'installant dans la population et s'y reproduisant, par $Ne * m = \frac{(1/F_{ST} - 1)}{4}$. Bien que le $Ne * m$ soit couramment utilisé (Hartl & Clark 1997), certains problèmes associés à cette

mesure doivent être rappelés. Cette estimation est valide si on suppose qu'il n'y a pas d'effet de sélection, de mutation, qu'il existe un nombre infini de sous-populations qui ont toutes la même taille et une probabilité identique d'obtenir de nouveaux migrants (Falconer & Mackay 1996). Ces hypothèses de travail, semblent éloignées de la réalité et rendent difficiles l'interprétation du $Ne*m$ (Whitlock & McCauley 1999).

III.3 DIVERSITÉ ET EFFETS FONDATEURS

III.3.1 Effets fondateurs et consanguinité

La fondation d'une population se fait généralement par l'installation d'un petit nombre d'individus dans une nouvelle localisation. Accompagnés de nombreux changements génétiques tels que la disparition d'allèles rares ou la réduction de la diversité génétique (Nei et al. 1975), les effets fondateurs jouent un grand rôle écologique et évolutif (Grant et al. 2001). Ainsi, le goulot d'étranglement, qui est réduction temporaire et brutale des effectifs d'une population, peut provoquer une augmentation du taux d'individus homozygotes issus des accouplements entre apparentés et aboutir à une diminution de leur aptitude adaptative (c.a.d. dépression de consanguinité ; Charlesworth & Charlesworth 1987, Saccheri et al. 1998, Keller & Waller 2002). De plus, cette réduction des effectifs s'accompagne d'une diminution de la diversité génétique et par conséquent d'une limitation du potentiel évolutif de la population (Hedrick et al. 2001). Par ailleurs, les effets fondateurs sont également supposés modifier l'architecture génétique des caractères phénotypiques de grande importance écologique et évolutive et être impliqués dans les processus de spéciation (Cheverud & Routman 1996) et d'invasion biologique (Lee 2002).

La présence de dépression de consanguinité, suite à un goulot d'étranglement, pourrait avoir de sérieuses conséquences sur les chances de maintien d'une population (Hedrick & Kalinowski 2000, Amos & Balmford 2001, Keller & Waller 2002). Cependant, les résultats de certaines études suggèrent l'existence de mécanismes de purge des effets délétères dus à la consanguinité (Templeton & Read 1984, Saccheri et al. 1996,

Kalinowski et al. 2000, Miller & Hedrick 2001). En l'absence de consensus sur l'existence et la généralité du phénomène de purge, plus d'études sont nécessaires sur les mécanismes génétiques associés à des changements démographiques (taille de la population notamment). A l'heure où l'accroissement des pressions anthropiques entraîne la fragmentation et la dégradation de l'habitat de nombreuses espèces, et réduit leurs effectifs de manière dramatique, la conservation et la gestion des petites populations isolées passent par une meilleure compréhension des mécanismes génétiques qui peuvent affecter leur maintien (Hedrick & Kalinowski 2000, Amos & Balmford 2001). D'autre part, Frankham (2005) rappelle le paradoxe des espèces envahissantes. Ces espèces, qui généralement subissent de forts goulots d'étranglement, ont une diversité génétique réduite et devraient donc subir les effets de la consanguinité et voir leur valeur sélective diminuée. Pourtant, on observe chez ces espèces une grande capacité d'invasion. Parmi les causes du succès de colonisation des espèces envahissantes, on peut citer: une forte fécondité, la purge des allèles délétères du génome, un fort taux de migration ou encore la possibilité de reproduction asexuée (Frankham 2005). Une meilleure compréhension des phénomènes génétiques liés à l'invasion pourrait permettre une meilleure gestion et un meilleur contrôle de ces espèces envahissantes (Frankham 2005).

La plasticité biodémographique des espèces peut aussi jouer un rôle essentiel dans la capacité d'envahir un nouveau milieu (Devillard 2004). Ainsi certaines espèces ont la capacité de changer rapidement leur stratégie de reproduction en fonction des conditions des exemples dont le système de reproduction varie en fonction de l'habitat et de la distribution des ressources trophiques (Allainé 2000, Say et al. 1999, 2002, Kyle et al. 2007).

Bien que les effets fondateurs soient courants, les processus génétiques accompagnant les goulots d'étranglement ont été, pour l'essentiel, étudiés en laboratoire car très peu d'études empiriques sur des populations naturelles ont encore permis de tester les modèles théoriques proposés. De même, notre compréhension des conséquences génétiques et démographiques des goulots d'étranglement sur les populations naturelles reste très fragmentaire. Ce constat est dû à la rareté des situations pour lesquelles nous disposons d'informations suffisantes sur la fondation, l'histoire, et la démographie des

populations (Groombridge et al. 2000, Grant et al. 2001, Keller et al. 2001). Des recherches détaillées sur des “populations modèles” sont donc nécessaires pour comprendre les phénomènes entourant la fondation et le maintien de populations naturelles.

III.3.2 Effets fondateurs et fréquence allélique

Lors de la fondation d'une population par un faible nombre d'individus, la diversité allélique (NA) est réduite de manière proportionnelle au nombre d'individus fondateurs (Montgomery et al. 2000, Leberg 2002). Les allèles rares de la population sont perdus les plus rapidement (Luikart & Cornuet 1998). Parallèlement à cette perte, augmente la fréquence des allèles caractérisés au départ par des fréquences moyennes à fortes. La distorsion de la distribution des fréquences des allèles permet la détection du goulot d'étranglement créé par l'effet fondateur (Luikart et al. 1998).

La diminution de NA entraîne aussi un changement du niveau d'hétérozygotie de la population. L'hétérozygotie diminue cependant moins rapidement que NA et peut apparaître en excès par rapport à l'hétérozygotie attendue pour un équilibre mutation-dérive (Hedrick et al. 1986, Luikart & Cornuet 1998). Il est également possible de mettre en évidence les effets du goulot d'étranglement, en comparant l' H observée à l' H attendue estimée par le nombre d'allèles sur les loci échantillonnés (Watterson 1986, Maruyama & Fuerst 1985, Cornuet & Luikart 1996). Ces effets s'amenuisent rapidement et ne sont plus détectables après 0,2 à $4*Ne$ générations (où Ne est la taille efficace de la population mesurée lors du goulot d'étranglement) (Luikart & Cornuet 1998). Il faut noter dans ces tests que l'estimation d' He attendue se fait en fonction du système de mutation (IAM, SSM, TPM) décrit précédemment. Le choix du système de mutation est donc primordial (Luikart et al. 1998) mais demeure contraint par les connaissances des marqueurs ou des sites géniques étudiés. Finalement, les goulots d'étranglement affectent la variance du changement des fréquences des allèles (Pollack 1983, Nei & Tajima 1981), ce qui peut être détecté en utilisant la méthode décrite par Luikart et al. (1998).

III.3.3 Effets fondateurs et génome : le déséquilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison, l'association non aléatoire de deux gènes au sein du génome, devrait augmenter lors de la fondation de nouvelle population (Ardlie et al. 2002, Jorde 2002, Kaessmann et al. 2002). En effet, la corrélation de la fréquence des allèles des différents marqueurs est accrue par la faible diversité créée par le goulot d'étranglement. Largement employé à l'heure actuelle pour la cartographie génomique, le déséquilibre de liaison est particulièrement utile à la localisation de complexes géniques intervenant dans des maladies (Jorde 2000) ou pour le positionnement précis de loci à caractères quantitatifs (QTL) (Stella & Boettcher 2004). Le déséquilibre de liaison joue également un rôle prépondérant dans la corrélation entre l'hétérozygotie multi-locus et la fitness (Hansson et al. 2004). Une forte liaison entre des marqueurs neutres et des loci sous sélection devrait accroître la corrélation entre l'hétérozygotie multi-locus et l'aptitude adaptative.

Le déséquilibre de liaison est affecté par différents paramètres dont certains sont génomiques. Par exemple, le taux de recombinaisons méiotiques s'accroît avec la distance qui sépare les loci et se traduit par une diminution du DL, de même, un taux de mutation élevé aux loci étudiés réduit la probabilité de mettre en évidence le déséquilibre. Sur le plan démographique, plusieurs facteurs affectent le DL par exemple : le nombre d'individus fondateurs de la population : plus le nombre d'individus est important plus le DL est faible ; la vitesse d'accroissement de la population : un accroissement rapide diminue le déséquilibre car les événements de recombinaison sont plus nombreux (Ardlie et al. 2002, Kaessmann et al. 2002). Le déséquilibre de liaison peut donc également être utilisé pour retracer l'histoire des populations (Kaessmann et al. 2002)

Le déséquilibre de liaison se mesure en comparant la fréquence des haplotypes observés pour deux loci par rapport à la fréquence attendue des haplotypes si l'association des allèles se faisait au hasard (Hartl & Clark 1997, Lynch & Walsh 1998). Prenons deux loci adjacents dont les allèles seraient respectivement A,a et B,b et où la fréquence de l'haplotype observé AB serait P_{AB} . La fréquence attendue de cet haplotype serait $P_A \times P_B$, où P_A et P_B sont les fréquences respectives des allèles A et B . Une mesure

simple du déséquilibre de liaison serait alors : $D = P_{AB} - (P_A \times P_B)$ (Lewontin 1964). Le déséquilibre de liaison est mis en évidence par une valeur de D significativement différente de 0. Une autre mesure du déséquilibre est $R = D / \sqrt{P_A P_B P_a P_b}$ (Hill and Roberston 1968, Hill 1981). Dans ces conditions, R (quelque fois appelé r ou r^2) est égal à $\sqrt{\chi^2 / N}$, où la valeur statistique χ^2 est obtenue par des tables 2 x 2 de la fréquence des allèles et N est la taille de la population ; on peut alors tester la significativité de R . La valeur de R varie entre -1 et 1. A chaque nouvelle génération, les effets de la recombinaison devraient diminuer la valeur de D . On peut donc décrire la diminution du déséquilibre de liaison pour deux loci, entre deux instants séparés par un nombre t de générations et ayant une probabilité de recombinaison r comme : $D_t = (1-r)^t D_0$ où D_0 est le déséquilibre de liaison à l'instant 0 et D_t , t générations plus tard. Le suivi des variations du DL au cours du temps est informatif pour plusieurs mesures en biologie évolutive (Slate & Pemberton 2007). En effet, le DL est important dans les mécanismes de corrélation génétique (Via & Hawthorne 2005), dans la relation hétérozygotie et valeur selective (Hansson & Westerberg 2002), dans les estimations de la taille efficace (Hill 1981) et aussi dans l'estimation de la structure et la dynamique de la population (Falush et al. 2003, Wang 2005).

L'association entre l'hétérozygotie mesurée à des marqueurs neutres et des gènes à caractère adaptatif est généralement faible (Coltman & Slate 2003, Slate et al. 2004). Cependant, dans le cas de population ayant subi un effet fondateur très fort, on peut s'attendre à une cohésion plus forte entre les gènes du fait d'un faible nombre d'haplotypes présents dans la population (Hansson et al. 2004). De plus, dans une population de taille réduite fondée par un faible nombre d'individus, le déséquilibre de liaison devrait être très fort (Lynch & Walsh 1998). Au fur et à mesure des générations et de l'augmentation de la taille de la population, le déséquilibre devrait diminuer du fait de la recombinaison et de la mutation.

CHAPITRE IV LES MODÈLES PRÉDICTIFS

IV.1 LA TAILLE EFFICACE

Le concept de taille efficace (Wright 1931, Falconer & Mackay 1996, Hartl & Clark 1997) a pris beaucoup d'importance ces dernières années en génétique de la conservation (Frankham 2002). Il permet une mesure compréhensible, en nombre d'individus, du potentiel de maintien de la diversité génétique d'une population. La perte de diversité génétique d'une population s'accroît avec la diminution de sa taille efficace, du fait de la dérive (fixation aléatoire d'un allèle) et de la reproduction entre individus apparentés entraînant un accroissement de la consanguinité (augmentation du taux d'homozygotie). La population idéale définie par Wright-Fisher consiste en *une infinité de populations panmictiques, chacune divisée en une infinité de sous-populations, avec un nombre d'individus reproducteurs N constant par génération. Dans chaque sous-population, les individus produisent un nombre infini de gamètes mâles et femelles (duquel un nombre $2N$ de gamètes est tiré au hasard) s'unissant pour produire N zygotes à la génération suivante* (Caballero 1994). Dans cette population idéale, on suppose qu'il n'y a pas de mutation, de migration, que l'union des gamètes se fait au hasard, et que la sexe-ratio est équilibrée. De plus, les générations sont non chevauchantes et les individus survivent de leur naissance à l'âge adulte.

La taille efficace (N_e) d'une population se définit alors comme la taille d'une population idéale qui maintiendrait la même diversité génétique que la population étudiée. De manière plus précise, on reconnaît deux grands types de taille efficace :

1. La taille efficace de variance

Elle peut être estimée à partir de la variance du changement de la fréquence génique pour une population idéale, selon la formule:

$$\sigma_{\Delta q}^2 = q(1-q)/2N,$$

où q est la fréquence d'un gène et N est la taille de la population (Caballero 1994). La variance de la fréquence ($\sigma_{\Delta q}^2$) diminue en fonction de la taille N de la population. En estimant $\sigma_{\Delta q}^2$ pour une population non idéale, on peut calculer N , la taille efficace de variance de la population étudiée. La taille efficace de variance est donc la taille d'une population idéale qui a la même variance génétique que la population étudiée.

2. La taille efficace de consanguinité:

Dans les mêmes conditions de population idéale, on peut définir l'indice de fixation F (coefficient de consanguinité) comme suit :

$$F_{t+1} = \frac{1}{2N} + \left(1 - \frac{1}{2N}\right)F_t$$

Le taux d'accroissement de consanguinité par génération est alors:

$$\Delta F = \frac{1}{2N}$$

où

$$\Delta F = \frac{F_T - F_{T-1}}{1 - F_{T-1}}$$

Le taux d'accroissement de la consanguinité dépend donc directement de la taille de la population, qui équivaut à la taille efficace de la population non idéale. Ainsi, la taille efficace de consanguinité est la taille d'une population idéale qui a le même taux d'accroissement de consanguinité que la population étudiée et donc $Ne = 1/2\Delta F$. Bien qu'à la fondation d'une population, la taille efficace de consanguinité et de variance peuvent être différentes, elles tendent à être asymptotiquement identiques (Chesser et al. 1993).

L'estimation de la taille efficace peut se faire soit directement à partir des fréquences des allèles mesurées dans la population par génotypage, soit indirectement par des modèles démographiques utilisant des données telles que le nombre d'individus, la sexe-ratio ou la variance du succès reproducteur. Ces informations sont alors utilisées pour estimer la variance du changement des fréquences (Caballero 1994, Falconer 1989, Hill 1972, 1979, Nunney 1991, 1993, Nunney & Elam 1994). Les méthodes de Hill

(1972, 1979), Nunney, (1991, 1993), et Nunney & Elam (1994) sont les principales méthodes démographiques.

La taille efficace de la population est directement liée à la taille de la population (e.g. Hartl & Clark 1997). Dans le cas où aucune autre information n'est disponible sur la démographie ou la biologie de la population, N représente une bonne approximation de N_e . Ainsi, selon Frankham (1995) et Vucetich et al. (1997), les variations importantes de la taille de la population seraient une des causes principales de la réduction de N_e/N . Les goulots d'étranglements provoquent une perte importante de la diversité génétique. Pour une population fluctuante, Vucetich et al. (1997, modifié par Nunney 2002), préconisent de mesurer la N_e , comme la moyenne harmonique ($\frac{1}{N_e} = \frac{1}{t} \sum_{i=1}^t \frac{1}{N_i}$) des tailles annuelles des populations (ou des générations).

N_e peut néanmoins largement différer de la taille de la population. N_e décrit la dynamique des gènes qui est elle-même intimement liée au système reproducteur de la population et plus précisément à la variance du succès reproducteur des individus (Wright 1938, Falconer & Mackay 1996). Par exemple une large variance du succès reproducteur des individus indique un système de reproduction polygame, dans lequel peu d'individus d'un sexe monopolisent l'accès à la reproduction. Dans un système polygame il peut y avoir perte de l'information génétique des individus qui ne se sont pas reproduits et un accroissement de la dérive. Pour prendre en compte ces effets, Wright propose en 1938 la formule suivante :

$$N_e = \frac{(4N - 2)}{(2 + V)}$$

où N est le nombre d'adultes de la population et V est la variance du

succès reproducteur. Cette première approche ne tient pas compte du fait que la variance du succès reproducteur peut être différente pour chacun des deux sexes, que la sexe-ratio peut générer une variance dans les succès reproducteurs entre les sexes et que les paramètres peuvent varier en fonction de l'âge des individus. Pour remédier à ces manquements, Hill (1972) développe une nouvelle formule :

$$Ne = \frac{(4r(1-r)NT)}{\left[A_m(1-r) + A_f r - \left(\frac{2r}{b_f} \right) + (I_{bm}(1-r) + I_{bf}r) + (A_m I_{Am}(1-r) + A_f I_{Af}r) \right]}$$

où T est le temps de génération, r la sexe-ratio, A_i et b_i , la longévité et la fécondité moyenne estimées respectivement pour le sexe i , et I_{Ai} et I_{bi} , la variance standardisée de la longévité et de la fécondité. Il faut noter que la fécondité est estimée pour l'ensemble de la durée de vie des individus. Cette équation représente l'estimation démographique la plus précise de la taille efficace, mais demande une très grande quantité d'informations qu'il est souvent difficile d'obtenir en milieu naturel. Nunney (1991) et Nunney & Elam (1994) proposeront d'utiliser des approximations de certains des paramètres nécessaires dans l'équation de Hill (1972), de manière à permettre une utilisation plus aisée dans les études de la Ne des populations naturelles. Cependant, ces approximations peuvent parfois générer des écarts importants entre les estimations obtenues par les méthodes de Hill (1972) et de Nunney & Elam (1994). Les interactions entre succès reproducteur, système de reproduction, longévité et dynamique de la population, peuvent aussi rendre difficile la prédiction de Ne (Coltman et al. 1999), de même que l'interprétation des résultats obtenus par ces méthodes complètes. De plus, un écart entre les estimations des paramètres peut très vite mener à une estimation erronée de Ne (i.e. Nunney 1991, Leberg 2005). Aux vues de ces remarques, et devant la difficulté d'obtenir des données précises sur chacun des paramètres des équations définies ci-dessus, on pourrait alors suggérer de suivre une démarche opposée : utiliser plusieurs estimateurs de Ne très simples qui vont chacun tenir compte d'un seul des paramètres démographiques. En comparant les résultats obtenus par chacune des méthodes d'estimations, il est alors possible d'estimer l'effet relatif de chacun des paramètres démographiques (i.e. : fluctuations de la taille de la population, sexe ratio ; Kalinowski & Waples 2002, chapitre 3 de cette thèse). D'autre part, dans la mesure où la structure de la population limite l'érosion générale de la diversité génétique par maintien d'allèles différents dans les sous-populations, il est important d'en tenir compte dans les estimations de la Ne . Pour souligner ces effets, il est possible d'employer les méthodes de Chesser (1991), Chesser et al. (1993), Nunney (1999), mais aussi de Crow & Denniston (1998).

La méthode génétique de Waples (1989), basée sur la variance des fréquences alléliques entre deux générations séparées par un temps t , reste à l'heure actuelle largement employée et est un modèle de référence (Tallmon et al. 2004). Plus récemment, d'autres modèles de type Bayésien; (Berthier et al. 2002, Laval et al. 2003, Beaumont 2003, Tallmon et al. 2004) ou de maximum de vraisemblance (Anderson et al. 2000, Laval et al. 2003, Wang, 2001, Wang & Whitlock, 2003) ont été développés. Du fait de la complexité des méthodes statistiques employées, il est difficile de bien cerner quels facteurs influencent leurs résultats ou d'estimer leur fiabilité et leur précision (Berthier et al. 2002, Tallmon et al. 2004, Waples & Yokota 2007). A l'heure actuelle, les résultats de ces méthodes sont encore très rarement confrontés les uns aux autres (Tallmon et al. 2004, Kaeuffer et al. 2004) et leur prolifération, avec l'accroissement des puissances de calcul des ordinateurs, ne rend le choix d'une méthode que plus compliqué. De plus, chacune des méthodes génétiques exige des conditions d'utilisation particulières, que ce soit le non chevauchement des générations (Waples, 1989 mais voir Jorde & Ryman 1995), une population stable (Berthier et al. 2002, Laval et al. 2003, mais voir Beaumont et al. 2003), l'absence de flux de gènes (pas de structure de population ; Wang 2001, Laval et al. 2003, mais voir Wang & Whitlock 2003). Un non respect de chacune de ces contraintes pourrait mener à des estimations de N_e différentes selon les méthodes (Leberg 2005). Malgré l'importance du choix de l'estimateur sur les résultats et donc pour la prise de décision en génétique de la conservation, aucune étude n'a comparée de manière exhaustive les différentes méthodes et n'a testé les biais causés par le non respect des conditions exigées par ces modèles.

Les méthodes démographiques et les méthodes génétiques d'estimation de la N_e ne prennent pas les mêmes paramètres en compte et une comparaison des valeurs obtenues par les deux types de méthodes permet de souligner l'importance relative des facteurs influençant la perte de la diversité génétique (Kaeuffer et al. 2004). Les méthodes démographiques apportent une mesure de N_e **attendue** par les observations démographiques, alors que les estimations génétiques mesurent la N_e **observée** causée par l'ensemble des paramètres pouvant affecter la diversité génétique, sans pour autant les distinguer. Là encore, devant la difficulté d'obtenir des données suffisamment

précises pour les méthodes démographiques, les études se limitent souvent à l'emploi des méthodes génétiques, ce qui peut rendre difficile l'interprétation des résultats.

Le rapport Ne/N est généralement utilisé pour estimer la perte attendue de diversité génétique dans une population (Frankham 1995, Nunney 1995). Ce ratio permet aussi une comparaison interspécifique ou entre populations de la même espèce mais de tailles différentes. Une méta-analyse effectuée par Frankham (1995) estime que le rapport Ne/N est en général de l'ordre de 0,1. Nunney (1995) a estimé de manière théorique ce ratio à une valeur proche de 0,5, mais n'a pas tenu compte des effets des fluctuations de la population. Dans ces conditions, une population, bien que constituée de 250 individus adultes aurait une Ne de 25, ce qui impliquerait la perte de la moitié de l'hétérozygotie en 34 générations (Frankham 2002). Il est intéressant de noter que dans les estimations de Ne/N utilisées dans sa méta-analyse, Frankham (1995) n'est pas en mesure de détecter de différences entre les méthodes démographiques et génétiques. Il est cependant difficile d'interpréter ces résultats dans la mesure où cette étude est conduite au niveau interspécifique. Il existe peu d'études comparant les résultats des deux méthodes au sein d'une même population (Kaeuffer et al. 2004). D'autre part, Frankham (1995) ne donne pas d'information quant aux marqueurs génétiques employés dans les différentes estimations génétiques de Ne qui ont été intégrées dans sa méta-analyse. Nous avons vu combien le taux de mutation et la sélection pouvaient être différents selon les marqueurs (notamment allozymes vs microsatellites). Dans la mesure où la sélection et la mutation affectent le changement des fréquences des allèles, toutes deux pourraient affecter les mesures génétiques de Ne (Leberg 2005). D'autre part, les estimations de Ne effectuées à partir de microsatellites pourraient être plus précises que celles effectuées à partir d'allozymes, du fait de leur plus grand polymorphisme (Waples 1989, Leberg 2005).

IV.2 L'HÉTÉROZYGOTIE

L'hétérozygotie est la mesure la plus courante de diversité génétique. Il est possible de prédire l'évolution du taux d'hétérozygotie de loci neutres dans une

population de taille constante, où la reproduction se fait de manière aléatoire, par la

formule :
$$H_t = H_0 \left(1 - \frac{1}{2N_e}\right)^t$$

où N_e est la taille efficace de la population estimée sur le « long terme », H_0 et H_t sont les hétérozygoties initiales et au temps t , respectivement. Ce premier modèle reste le modèle type cité pour décrire la perte attendue de l'hétérozygotie (Frankham 2002, Spielman et al. 2004). Pourtant, il ne tient compte ni des mutations qui peuvent affecter l'hétérozygotie, ni des potentiels changements dans la taille de la population qui vont affecter la taille efficace, comme nous venons de le voir. Il est néanmoins possible d'intégrer ces paramètres au modèle (Nei et al. 1975; Motro & Thomson 1981).

Nous avons vu précédemment que la consanguinité augmentait en suivant :

$$F_{t+1} = \frac{1}{2N_t} + \left(1 - \frac{1}{2N_t}\right)F_t,$$

Si l'on intègre la mutation dans cette équation on obtient :

$$F_{t+1} = \left[\frac{1}{2N_t} + \left(1 - \frac{1}{2N_t}\right)F_t \right] (1 - 2u) . F \text{ est aussi le degré d'homozygotie d'où } H=1-F.$$

Si on pose $y_t = (1 - 2u) \left(1 - \frac{1}{2N_t}\right)$ alors $H_{t+1} = 2u + y_t H_t$ et à chaque instant t on a :

$$H_t = 2u \left(1 + \sum_{j=1}^{t-1} \prod_{i=j}^{t-1} y_i\right) + H_0 \prod_{i=0}^{t-1} y_i \text{ où } H_0 \text{ est l'hétérozygotie initiale de la population}$$

(Motro & Thomson 1981). L'hétérozygotie à un instant donné dépend donc de la taille de la population aux générations précédentes, de l'hétérozygotie initiale ainsi que du taux de mutation u . Il faut aussi noter que N est en fait la taille efficace de la population décrite précédemment. Si la population fluctue, la moyenne harmonique des tailles efficaces des générations précédentes peut fournir une approximation de la taille efficace. En l'absence d'estimation démographique de la taille efficace qui intègre par exemple la variance du succès reproducteur ou la sexe-ratio, la taille efficace peut être remplacée par la taille de la population (i.e. Hartl & Clark 1997). Les modèles décrivant le changement d'hétérozygotie au cours du temps de Nei et al. (1975), Motro & Thomson (1981) ou encore Maruyama & Fuerst (1985 a, 1985 b), tiennent compte de l'effet des fluctuations

de taille de la population. De manière réciproque, les modèles de Vucetich (1997) et Mills & Smouse (1994) peuvent être employés pour voir les effets de l'hétérozygotie sur la dynamique de la population.

Ces modèles d'estimation de la dynamique de l'hétérozygotie au cours du temps sont relativement simples, et ne devraient s'appliquer qu'à des populations idéales où le système de reproduction est aléatoire et les générations non chevauchantes. Le non respect de conditions imposées par le modèle de population idéale peut générer un écart important entre le modèle et la population étudiée. Le non respect des conditions de panmixie, notamment, peut créer de gros biais dans les estimations d'hétérozygotie attendue (Balloux & Lehmann 2003, Kaeuffer et al. 2007). Le chevauchement des générations rend aussi l'estimation de H très difficile. En effet, dans ce cas, la reproduction entre individus de générations différentes peut accélérer la diminution de H ou la ralentir par rapport aux modèles neutres (Nunney, 1993, Lippé et al. 2006). D'autre part le succès reproducteur et la probabilité de survie peuvent dépendre de l'âge. Charlesworth (1994) propose un autre modèle intégrant la structure d'âge des populations. Cette approche matricielle tient compte de nombreux paramètres démographiques (fécondité, survie par classe d'âge) sans toutefois intégrer la structure des populations.

Tous les modèles présentés ci-dessus sont **déterministes**, c'est-à-dire qu'à un instant t , l'hétérozygotie sera entièrement prédictible par H à $t-1$. Aucun processus aléatoire n'entre en jeu dans ces modèles, pourtant les populations naturelles sont souvent soumises à des phénomènes imprévisibles notamment environnementaux et climatiques qui vont affecter la survie ou le succès reproducteur des individus et rapidement faire dévier les observations des prédictions des modèles. Ces effets aléatoires (stochastiques) sont d'autant plus importants dans les populations de petites tailles où l'on s'écarte très facilement des lois probabilistes des grands nombres qui sont sous-jacents aux modèles déterministes.

Pour permettre l'intégration des **phénomènes stochastiques** dans l'estimation de la dynamique de H , la simulation informatique de la génétique de populations est de plus en plus employée (Grimm 1999, Peck 2004). Il est en effet possible de simuler des populations virtuelles, en se basant sur le cycle de vie et la génétique de chaque individu

en intégrant à chaque instant du cycle des effets aléatoires sur la survie ou la fécondité. L'approche basée de la simulation basée sur l'individu est d'autant plus pertinente qu'elle permet de prendre en compte les effets de la variation inter individuelle et d'expliquer les propriétés du système biologique modélisé à partir des comportements et propriétés des individus (Kaiser 1979).

Un certain nombre de logiciels de simulation ont ainsi été développés ; on peut citer Easypop (Balloux 2001), Metasim un package de R (Strand 2002), Bottlesim (Kuo & Janzen, 2003), simuPOP (Peng & Kimmel, 2005), Nemo (Guillaume & Rougemont, 2006). La souplesse de ces modèles provient notamment de l'intégration d'un plus grand nombre de paramètres qui permettent de rendre le modèle plus réaliste par rapport aux modèles déterministes simples. Contrairement à l'approche déterministe, le nombre de paramètre n'est pas limité dans l'approche par simulation et permet de prendre en compte et d'adapter le modèle en fonction de l'ensemble de la connaissance du système biologique étudié (Grimm 1999). Cette approche par simulation stochastique permet de générer un grand nombre de trajectoires différentes (démographiques et génétiques) à partir des mêmes conditions initiales (un nombre de paramètres prédéfinis). En réalisant de nombreux réplicats, il est possible d'estimer une dynamique moyenne de H et sa variance en fonction de paramètres souhaités qui peut largement différer de l'hétérozygotie attendue par un modèle déterministe simple.

La faiblesse de ce type d'approche est que l'on peut très rapidement générer des trajectoires qui n'ont rien en commun avec celle de la population étudiée, si le modèle est mal construit ou les paramètres initiaux ont des valeurs déraisonnables par rapport à celles observées en milieux naturelles. Cette approche par simulation demande donc un minimum d'informations sur la biologie de l'espèce. D'un autre côté, il est aussi possible de faire varier les paramètres initiaux de manière à générer des trajectoires différentes puis de les comparer aux observations afin d'approcher le scénario le plus probable qui a permis d'aboutir celles-ci. La simulation peut donc être employée soit dans un rôle prédictif : du modèle vers le monde réel ; soit descriptif : du monde réel vers le modèle.

CHAPITRE V LE CAS DU MOUFLON DE KERGUELEN

V.1 LE MOUFLON

Le mouflon fait partie de l'ordre des Artiodactyles (nombre pair des doigts aux pattes), de la famille des Bovidés (ruminants, sabot à deux doigts, présence de cornes persistantes et creuses, absence de canine) et de la sous-famille des Caprinés (chèvres, moutons et chamois). Il est souvent décrit comme une espèce de mouton sauvage. Il aurait été introduit en Corse entre le V^{ème} et le VIII^{ème} millénaire avant notre ère par des nomades, comme une espèce domestique (Garel 2006). Certains individus redevinrent sauvages pour donner naissance au mouflon Corse (Garel 2006). Vu l'origine très proche entre le mouflon et le mouton, et le croisement possible entre ces deux espèces, les récentes révisions taxonomiques de la famille *Ovis*, ont attribué le même nom d'espèce : *aries* (Opinion 2027 (Case 3010), 2003). Ainsi, le nombre de chromosome de $2n = 54$, est identique pour mouflon et mouton ; de plus la carte génomique du mouton (et par extension celle du mouflon) est déterminée pour plus de 1000 sites et 150 gènes connus (Maddox et al. 2001).

Le mouflon de Corse est le plus petit mouflon d'Europe. Il présente un fort dimorphisme sexuel. Les mâles ont un poids compris entre 30 et 50 kg pour une longueur d'environ 130-140 cm et une hauteur au garrot de 75 cm. Les femelles sont plus petites et pèsent de 25 à 35 kg pour une longueur de 120 à 130 cm et une hauteur au garrot d'environ 65 cm (Source ONC). Chez le mouflon, les cornes des mâles sont symétriques et peuvent atteindre 85 cm de long. Les femelles ont des cornes, plus petites, dissymétriques et la proportion de femelles qui en portent, est variable selon les populations (10 % à 75%).

Dans les populations européennes, il est généralement admis que les femelles arrivent à maturité sexuelle vers l'âge de deux ou trois ans alors que pour les mâles l'âge de la maturité sexuelle est moins bien connu. Les mouflons vivent en groupes sociaux

matriarcaux, composés des femelles, de leurs agneaux de l'année et des jeunes de l'année précédente. La composition des groupes varie en fonction des saisons (Dubois et al. 1993, 1995). A l'époque du rut, les mâles d'âges divers rejoignent les groupes matriarcaux. Ils circulent alors de groupe en groupe mais ont tendance à revenir dans le groupe dont ils sont originaires (Dubois et al. 1995). A la fin du rut, les groupes matriarcaux se reforment et les mâles s'en écartent. Au moment de la mise bas, les femelles s'isolent en laissant leurs jeunes avec les autres femelles. Le système de reproduction est du type de promiscuité (Bon et al. 1992). Les femelles mettent bas une fois par an, généralement un seul agneau mais des disparités ont été observées dans le taux de géllarité au sein des populations européennes (Garel et al. 2005).

V.2 LA POPULATION DE L'ÎLE HAUTE

La population de mouflons de l'archipel de Kerguelen (Océan Indien, 48°25'-50° S ; 68°27'-70°35'E), a été fondée en 1957 (Chapuis et al. 1994) et représente un cas idéal pour l'étude des effets fondateurs. En effet, à l'origine, seuls deux individus âgés d'un an, provenant du zoo de Vincennes (Paris, France), ont été introduits sur une petite île (6,5 km²) de l'archipel, appelée île Haute (Cf. Figure 5 pour un historique de la population).

La population de Vincennes aurait été elle-même fondée en 1934 par des mouflons de diverses origines ; on peut noter des importations des zoos de Hagenbeck (Hambourg), et de celui de Ruhe (Hannovre) et mais aussi de Guidicelli (Corse) (communication personnelle, Bruno Lassalle curateur herbivore du zoo de Vincennes).

Les effets fondateurs pourraient être à l'origine de certaines des particularités de cette population. Les individus de la population de l'île Haute ont une taille légèrement inférieure (Boussès & Réale 1996) par rapport aux individus des populations européennes [mâles 127,6 cm ± 1,2 cm (erreur standard) en longueur pour une hauteur de 68,6 cm ± 0,8 cm et un poids de 28,7 kg ± 0,9; femelles 117,9 cm ± 0,5 cm en longueur, 63,7 cm ± 0,5 cm en hauteur et 19,8 kg ± 0,7 kg]. Le fort taux de géllarité qui peut atteindre 36% et qui est le plus fort observé pour cette espèce (Boussès & Réale 1998, Garel et al. 2005) est une autre particularité de cette population. D'autre part, une grande

proportion de femelles sont cornues (50%, Réale 1996). Un pelage légèrement bouclé et de couleur beige de certains individus ou encore l'absence de selle de certains mâles durant le rut (Réale obs. pers.) pourraient être des résurgences de croisements passés avec le mouton. Finalement, chez les moutons domestiques (Garel et al. 2005) comme dans la population de mouflons de Kerguelen (Réale, 1996) des comportements reproducteurs ont été observés chez des individus des deux sexes ayant moins d'un an.

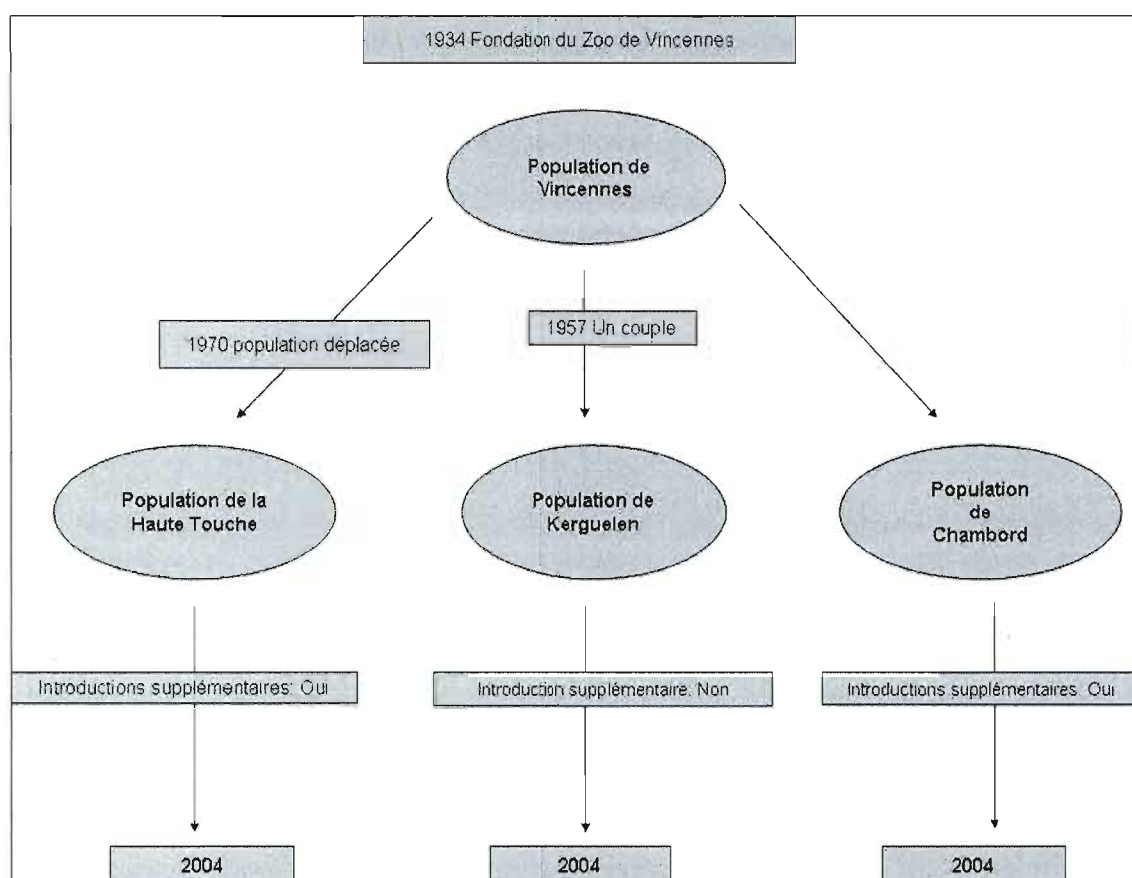


Figure 5 Historique de la population de Kerguelen. La population de Vincennes est à l'origine de la population de Chambord. La population de Vincennes a été déplacée en 1970 pour fonder la population de la Haute Touche. Les trois populations (Kerguelen, Haute Touche et Chambord) sont toujours existantes à l'heure actuelle.

Après avoir inversé son cycle de reproduction pour se synchroniser à la période de l'été austral, et dans ces nouvelles conditions environnementales (climat subantarctique rude ; absence de prédateurs ; réduction du cortège parasitaire ; fortes variations inter-saisonnières et inter-annuelles des disponibilités trophiques), la population a réussi à se

maintenir sur plus d'une quarantaine de générations et se maintient encore à l'heure actuelle.

Entre 1957 et la fin des années 80, des dénombrements réalisés par le personnel hivernant dans l'archipel, ont tout d'abord permis de noter un accroissement rapide de la population jusqu'à la fin des années soixante-dix, et ce malgré la compétition avec une population de rennes (*Rangifer tarandus*), elle-même introduite (Cf. Figure 6 : Dynamique de la population de mouflons et rennes depuis l'introduction à 1990). La population de rennes a été chassée par les hivernants et poussée à abandonner l'île pour rejoindre à la nage l'île principale (Grande Terre) au début des années 1980.

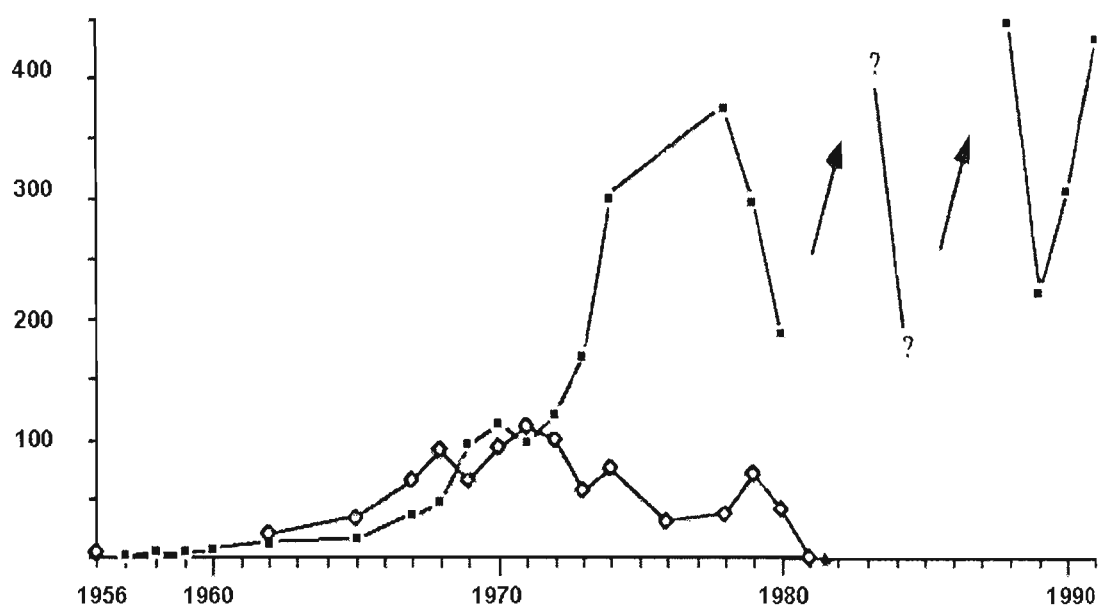


Figure 6 Nombre d'individus estimés dans les populations de mouflons et de Rennes en fonction de l'année, de l'introduction à 1990 (Selon Boussès et al. 1992)

Entre 1989 et 1995, une étude plus approfondie de la population a été mise en place par J.L. Chapuis (MNHN, Paris) et son équipe. Les estimations de la taille de la population ont alors mis en évidence l'existence de périodes d'accroissement intensif de l'effectif de la population sur 3 à 5 ans, suivies par un épisode de mortalité hivernale massive entraînant une chute brutale du nombre d'individus (Boussès et al. 1994). Ces variations cycliques sont une particularité essentielle de cette population. Durant les phases de forte mortalité, plus de 80% des mâles adultes disparaissent, créant un fort

déséquilibre de la sexe-ratio. La principale cause de ce déséquilibre de mortalité entre les sexes serait l'effort physique très important des mâles lors de la compétition pour l'accès aux femelles en phase de rut pré-hivernal. Cet effort, combiné à la rudesse du climat et la réduction des ressources trophiques à haute densité, provoquerait un affaiblissement physique fatal (Boussès et al. 1994). Ces diminutions d'effectifs, pourraient représenter des goulots d'étranglement de la population dont les conséquences génétiques sont encore inconnues et pourraient favoriser l'action de la sélection naturelle par élimination des mâles les plus faibles.

Dans une telle situation, la population de mouflons de Kerguelen devrait être caractérisée par une très faible hétérozygotie, une très faible adéquation adaptative, et une forte consanguinité. Pourtant, des analyses génétiques préliminaires, réalisées sur 5 individus, montraient que 6 des 7 marqueurs microsatellites utilisés étaient polymorphes, et une hétérozygotie moyenne de 0.36 (Dave Coltman ; communication personnelle). Ces chiffres indiquaient une variabilité génétique de la population faible, mais cependant non négligeable. Par ailleurs, il n'existait au début de ma thèse, aucune évidence de dépression de consanguinité sur les caractéristiques moyennes de la population. En revanche, la population montrait une fécondité plus élevée, une plus forte proportion de portées gémellaires que dans toute autre population de mouflons étudiée, ainsi qu'un âge précoce à maturité, ou une forte survie des juvéniles dans des conditions de très fortes densités par rapport aux populations Européennes (Boussès & Réale 1996, 1998, Réale et al. 1999). Ces premiers résultats laissent supposer l'existence de purge des allèles délétères avant ou après l'introduction à Kerguelen (Boussès & Réale 1996).

Durant l'étude entreprise par Jean-Louis Chapuis et son équipe, de nombreux prélèvements (sang, poils, os, cornes) ont été effectués sur la population. Ces prélèvements ont fourni une importante base d'échantillons qui a pu être utilisée pour des analyses moléculaires. D'autre part, des spécimens du Zoo du Vincennes préservés dans les collections du Muséum National d'Histoire Naturelle, et le troupeau actuel issu du Zoo, maintenu dans le parc animalier de la Haute Touche, ont servi de références aux études des mouflons de Kerguelen.

D'autres prélèvements ont pu être obtenus à partir des trophées collectés par les chasseurs ayant séjourné à Kerguelen entre 1970 et 1989. De plus, des contacts ont été pris avec l'Institut Polaire Paul Emile Victor (programmes de recherche n° 276 JL Chapuis & n° 279 D. Pontier) et l'administration des Terres Australes et Antarctiques Françaises pour entreprendre de nouvelles campagnes d'échantillonnages (Cf. Figure 7 : Échantillons disponibles par année et par population) et ont permis le prélèvement de 60 individus par la chasse en 2003.

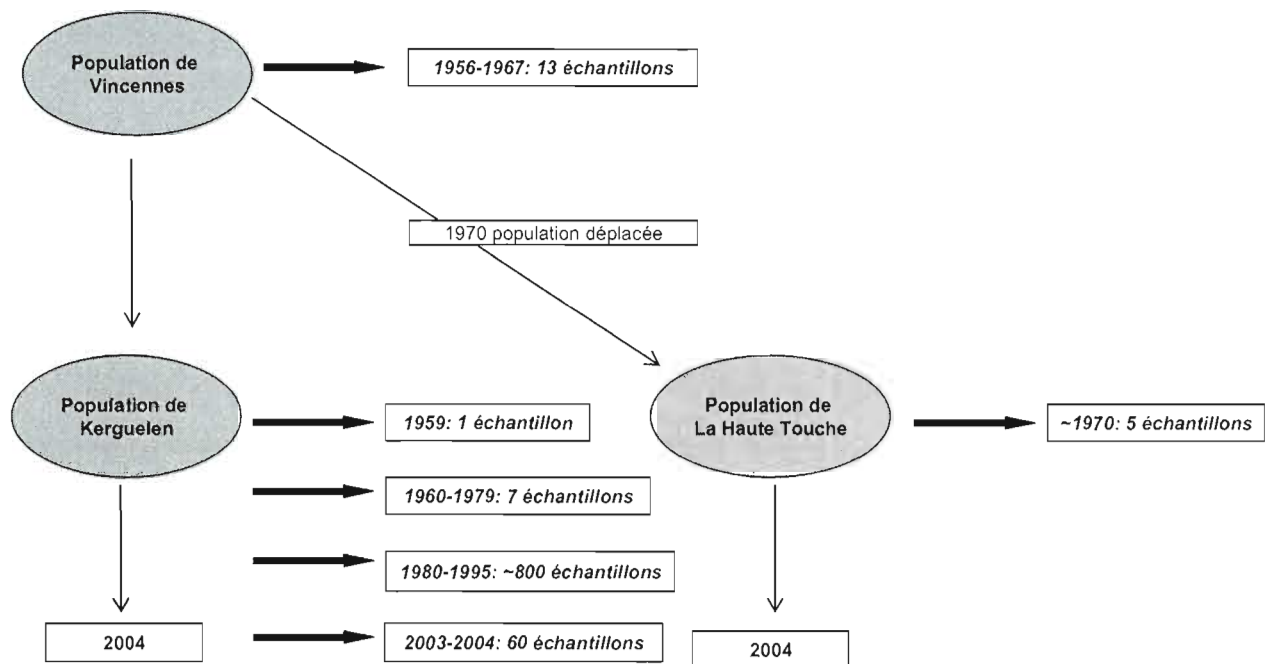


Figure 7 Nombre d'échantillons disponibles en fonction de la période et de la population.

CHAPITRE VI BUT DE CETTE THÈSE

L'importance de bien comprendre la dynamique de la diversité génétique n'est plus à démontrer, autant du point de vue évolutif que du point de vue de la génétique de la conservation. Pourtant du fait de sa complexité et de la difficulté d'étudier séparément les différents facteurs qui peuvent l'affecter, il est souvent mal aisé de comprendre son évolution dans les populations naturelles. Une solution consiste à étudier des systèmes biologiques les plus simples possibles tout en ayant la plus grande connaissance de ces systèmes. Par ses caractéristiques démographiques, son histoire, l'information recueillie lors des recherches antérieures, et le nombre important d'échantillons disponibles pour les analyses génétiques, la population de mouflon de Kerguelen présente donc une situation "modèle", unique et originale, pour l'étude des effets fondateurs et du suivi de la diversité génétique d'une population en milieu naturel.

Dans le premier chapitre nous nous sommes attachés à suivre l'évolution de la diversité génétique de la population de mouflons de Kerguelen depuis son introduction jusqu'à nos jours. Les prélèvements de cornes, poils et dents d'individus du zoo de Vincennes nous ont aussi permis d'estimer le niveau d'hétérozygotie de la population ancestrale. Nous avons alors comparé la dynamique de l'hétérozygotie au cours du temps avec l'hétérozygotie attendue selon les modèles théoriques et une approche par simulation.

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de la structure génétique de la population de mouflons. Un nombre croissant de méthodes d'inférence de la structure des populations sont développés. Parallèlement à ces développements peu d'études ont testé leurs limites respectives. Nous avons ici testé les effets du déséquilibre de liaison qui, accentué par l'effet fondateur de 1956, peut affecter la détection de la structure génétique des populations par des méthodes bayésiennes.

Le troisième chapitre porte sur l'estimation de la taille efficace de la population. En utilisant des méthodes démographiques et génétiques d'estimation de la taille efficace, nous avons étudié de quelle manière la dynamique de la population, par le truchement du système de reproduction, avait un effet sur la taille efficace. Nous avons aussi utilisé une approche par simulation pour appréhender le système de reproduction le plus probable au vu de la N_e estimée.

Le quatrième chapitre décrit les relations entre la condition physique, la charge parasitaire des mouflons Kerguelen, et le niveau de consanguinité estimée par des marqueurs génétique. La relation entre ces paramètres est difficile à mettre en évidence, du fait de nombreux facteurs confondant et de compromis potentiels avec l'investissement énergétique dans d'autres fonctions physiologiques. Pour la première fois, dans une étude de ces relations, nous avons intégré des mesures de l'effort reproducteur et du poids de la rate, un organe essentiel dans la réponse immunitaire.

Finalement le cinquième et dernier chapitre porte sur la relation entre la fécondité des mouflons et le niveau d'hétérozygotie individuelle. Il est généralement attendu une relation positive entre la fécondité et la diversité génétique des individus, nous avons testé cette hypothèse.

PARTIE II

*DYNAMIQUE
DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE
D'UNE POPULATION INSULAIRE
DE MOUFLONS (OVIS ARIES)*

*CHAPITRE I UNE HÉTÉROZYGOTIE INATTENDUE DANS UNE
POPULATION INSULAIRE DE MOUFLONS FONDÉE PAR UN UNIQUE
COUPLE D'INDIVIDUS*

Unexpected heterozygosity in an island mouflon population founded by a single pair of individuals

Renaud Kaeuffer^{1,2,*}, David W. Coltman³, Jean-Louis Chapuis⁴, Dominique Pontier² and Denis Réale¹

¹ *Canada Research Chair in Behavioural Ecology and GRÉCA, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, CP 8888 succursale centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada*

² *Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR-CNRS 5558, Université Claude Bernard Lyon I, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France*

³ *Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2E9, Canada*

⁴ *Département d'Écologie et Gestion de la Biodiversité, Unité 2699, UMR-CNRS 6553, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP 53, 36 rue Geoffroy Saint-Hilaire, 75005 Paris, France*

Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **274**, 527-533
(2007)

I.1 RÉSUMÉ

La petite taille des populations devrait conduire à une perte très rapide de diversité génétique du fait de la perte stochastique d'allèles sans que l'introduction de nouveaux allèles – par exemple par mutation – puisse freiner le processus. Plus formellement, l'hétérozygotie mesurée à des marqueurs génétiques neutres devrait diminuer à la vitesse de :

$$H_t = H_o \left(1 - \frac{1}{2Ne}\right)^t \quad (\text{i.e. Hedrick 2000}) \quad \text{où } H_t \text{ est l'hétérozygotie au temps } t, H_o$$

l'hétérozygotie initiale, t le nombre de générations séparant H_o et H_t , et Ne la taille efficace de la population.

Bien que cette formule soit très largement citée en génétique de la conservation (par exemple Frankham 2002, Spielman et al. 2004), comme la valeur attendue de perte de diversité génétique, il est fort probable que les hypothèses et contraintes posées par le modèle, les rendent peu adéquate dans de nombreux cas. Parmi les hypothèses de construction du modèle, on peut citer par exemple les générations non chevauchantes et le système d'appariement aléatoire. D'un autre côté, malgré sa simplicité, ce modèle pourrait, peut-être, permettre de rendre compte de la plus grande part de variance de la diversité génétique perdue dans les populations. Pourtant, peu d'études ont cherché à confronter la perte de la diversité génétique observée dans des populations naturelles à celle attendue par ce modèle de génétique des populations. L'une des raisons évoquée pour expliquer ce manquement est la rareté des bases de données longitudinales sur une période suffisamment longue et nécessaires à ce type d'étude.

La diversité génétique est garante de l'aptitude des populations à s'adapter aux changements environnementaux. Une bonne compréhension de la dynamique de la diversité génétique est donc essentielle dans la biologie de la conservation. Des modèles théorique de génétique des populations permettent de prédire la dynamique mais l'adéquation des modèles théoriques avec les observations en milieu naturel est essentielle et pourtant peu tester.

Dans ce premier chapitre, nous avons reconstitué l'évolution du taux d'hétérozygotie dans la population de mouflons de Kerguelen, depuis les premières années qui ont suivi la fondation jusqu'à nos jours. Compte tenu de l'événement de fondation et de la cyclicité des effectifs de la population, nous attendions une faible diversité génétique 12 générations plus tard. Le taux d'hétérozygotie individuel a été estimé à partir de 25 loci microsatellites. Nous avons alors comparé le niveau de la diversité génétique observé à celui attendu par un modèle classique de génétique des populations. Le niveau d'hétérozygotie de la population de mouflon de Kerguelen apparaissait très largement supérieur à celui prédit par le modèle.

A la vue des écarts entre l'hétérozygotie attendue et observée, nous nous sommes questionnés sur la validité du modèle employé et nous avons développé un logiciel de simulation permettant de recréer de manière plus réaliste la dynamique de l'hétérozygotie. Ce logiciel a été développé conformément à nos indications par un groupe d'étudiants en informatique. Les simulations permettaient, entre autres, d'inclure des générations chevauchantes, de choisir le système de reproduction, des taux variables de fécondité et de survie des individus et dépendant de la densité de la population (modèle densité-dépendant). Nous avons ajusté ces paramètres de manière cohérente avec la biologie de l'espèce et aux mesures faites dans la population de façon à obtenir une dynamique de la population identique à celle observée. Par cette approche, nous avons pu montrer que l'hétérozygotie calculée par le modèle classique de génétique des populations sous-estimait la valeur de H attendue. Les valeurs obtenues par simulations restaient toutefois inférieures à celle observées dans la population, quelles que soient la valeur données aux paramètres de base (en particulier concernant la longévité et la fécondité). Par contre, l'intégration dans les simulations d'un niveau de sélection contre des individus homozygotes, il était possible d'obtenir des estimations de H similaires à celles observées dans la population de Kerguelen. L'hétérozygotie observée dans la population pourrait donc être expliquée par une sélection contre les individus dont l'hétérozygotie est inférieure à 0,4.

Trois des loci employés dans l'estimation de l'hétérozygotie de la population de mouflons de l'île Haute, sont fortement liés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Or, il a été démontré l'importance de la diversité génétique au CMH dans une

réponse immunitaire adaptée (Kurtz et al. 2004) et des effets de la sélection sur le maintien d'un nombre important d'allèles par la sélection balancée à ces loci (Aguilar et al. 2004). L'accroissement de H observée à deux des trois loci microsatellites intégrés au CMH tend à confirmer les effets de la sélection sur la forte H mesurée dans la population de mouflons en 2003. Finalement, la faible corrélation observée de H entre les différents loci, suggère des effets de la sélection à des gènes en particuliers, plutôt que sur l'ensemble du génome.

Nos résultats démontrent l'importance des études longitudinales pour la compréhension de la dynamique de la diversité génétique. De plus, nous avons pu mettre en évidence les effets de la sélection sur H , effets qui sont souvent négligés dans les études de génétique de la conservation notamment lorsqu'elles sont basées sur des marqueurs dits « neutres ».

I.2 INTRODUCTION

In population and conservation genetics it is widely accepted that small, isolated populations rapidly lose genetic diversity as a result of genetic drift (Falconer & Mckay 1996; Frankham 1996; Keller & Waller 2002) which could drive the population to extinction (Spielman *et al.* 2004). The theoretical reduction in heterozygosity (H) in a closed random mating population is predicted by the classical formula (Hedrick 2000):

$$\frac{H_t}{H_0} = \left(1 - \frac{1}{2Ne}\right)^t, \quad (1)$$

where Ne is the effective population size, H_0 the heterozygosity at generation 0, H_t the heterozygosity expected at generation t , and t the number of generations. Because the loss of genetic diversity is faster in small than in large populations, a population experiencing a bottleneck or fluctuating dynamics is assumed to be subject to stronger drift than a stable population with a similar average population size (England *et al.* 2003; Groombridge *et al.* 2000; Motro & Thomson 1982; Nei *et al.* 1975; Vucetich & Waite 1999). The loss of H can be predicted in a cyclic fluctuating population using a more complex model (Motro & Thomson 1982).

In support of these population genetic models, numerous empirical studies have reported the loss of genetic diversity following a bottleneck (England *et al.* 2003), a positive relationship between diversity and population size (Frankham 1996), and the lower diversity in insular than in mainland populations (Frankham 1997). This support generally comes from transversal comparative studies of populations that may be characterised by different demographic characteristics and are often interpreted in the absence of detailed historical demographic data. Such “snapshot” studies may illustrate the global effect of drift on genetic diversity, but they do not capture the temporal dynamics of genetic diversity. A more appropriate way of testing for the loss of genetic diversity by genetic drift would be to use changes in H observed over time within the same population. However, longitudinal genetic data of natural populations are very scarce. Furthermore, migration or population demography may interfere with drift making genetic changes in natural populations difficult to predict. An insular population with well known history therefore provides an appropriate model for testing the predictions of population genetic theory with empirical data on gene dynamics.

In 1957, one yearling male and one yearling female mouflon (*Ovis aries*) were introduced onto Haute Island (6.5 km²) (Chapuis *et al.* 1994), one of the islands of the very remote Kerguelen archipelago located in the Sub-Antarctic Indian Ocean. The demographic history of the Kerguelen mouflon population is well documented from the introduction to the mid-nineties (Chapuis *et al.* 1994). The two founders originated from a captive population at Vincennes Zoo (Paris, France). The Kerguelen population reached 100 individuals at the beginning of the 1970s (Fig. 8), and then grew exponentially to culminate with 700 individuals in 1977. Since then the population has been characterised by cyclical dynamics, fluctuating between 250 and 700 individuals (Chapuis *et al.* 1994), with winter crashes occurring at a periodicity of 3-5 years after the number of individual exceeds about 600. Crash survival is female-biased due to the costs of inter-male competition during the pre-winter rut (Boussès *et al.* 1994). Given the strong founder effect, the cyclical population dynamics and the total isolation of the population, we expected very low heterozygosity in this population.

Here we combine longitudinal genetic data and detailed information on demographic history from an island population and its ancestral source to study changes

in genetic diversity over the time. Using simulations we also explore in more detail what would be the expected change of heterozygosity in the Kerguelen mouflon population under neutrality and the observed demographic history.

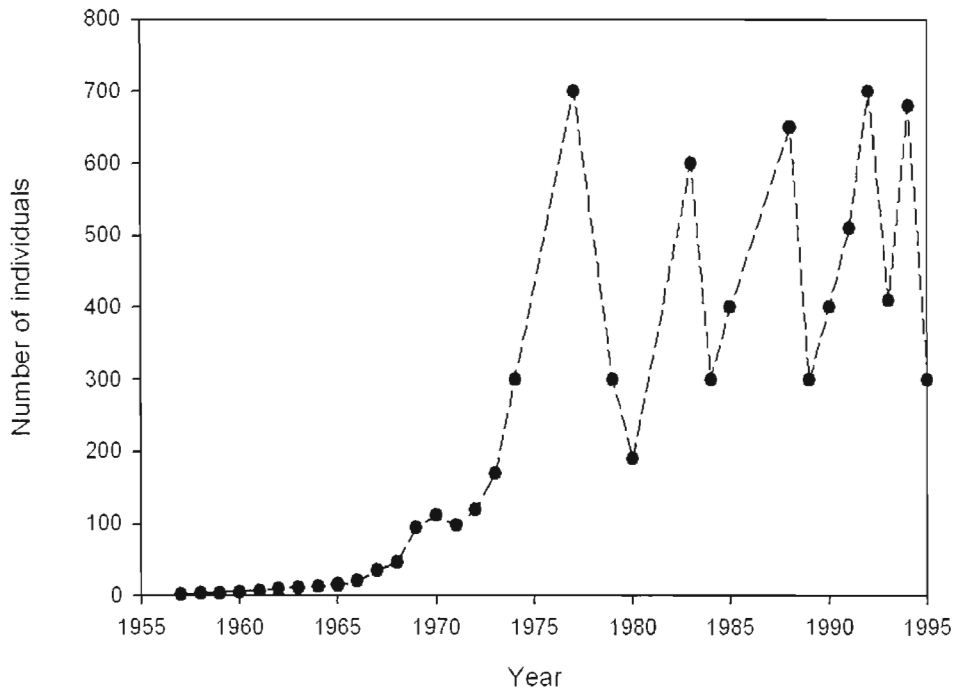


Figure 8 Number of individuals estimated on the Kerguelen mouflon population.

I.3 MATERIAL AND METHODS

I.3.1 Population and study site

The Kerguelen archipelago (48°25'-50°S, 68°27'-70°35'E) is very remote and only accessible by boat, usually from La Réunion Island 3000km away. The very limited access to the archipelago is under the supervision of the administration of the French Austral and Antarctic Territories (T.A.A.F.). The probability of an uncontrolled introduction or undetected migration of mouflons to the Haute Island is therefore negligible. The Sub-Antarctic climate of the archipelago is characterised by an average temperature of 1.9°C in winter and 7.4°C in summer. Haute Island is rocky with a weak grass cover (only 30% of the island), and in 1972 fodder grass was introduced to increase the foraging resources of the island. The population was founded by two lambs from the

Vincennes Zoo (Paris, France). The population was monitored with the help of scientists, hunters, the administration of the T.A.A.F., and an intensive scientific research program between 1988 and 1996 (Chapuis *et al.* 1994; Boussès *et al.* 1994; Boussès & Réale 1996). Mouflon (*Ovis aries*) exhibit a promiscuous mating system and strong sexual dimorphism (Bon *et al.* 1992), males being heavier than females (male carcass weight = 28.7 ± 0.9 kg; female carcass weight = 19.5 ± 0.5 kg; Boussès & Réale 1996). In the Kerguelen population female annual fecundity averaged 1.1 and the variance in fecundity equals 0.7 (data obtained from 100 females culled in 1994). In male ovids age can be estimated precisely by using the number of horn segments (Geist 1971). Age in females in this population could be approximated by counting the number and wear of definite incisors (Boussès & Réale 1994). We estimated the average adult lifespan to be 3.5 years, using the average age of adult carcasses found between 1993 and 1995 (N= 412). Given the low adult life span and the early age at first reproduction in that population (Boussès & Réale 1998) we estimated the generation time to be close to 2.

1.3.2 Genotyping

Most of the tissue samples (hair, skin, and horns) from the Kerguelen population come from hunted individuals. Between 1960 and 2003, 144 samples were collected from the Haute Island population. A few horns were collected from carcasses found on the ground. Year of birth (cohort) was determined by subtracting the individual's age from the year of death. Tissue samples (teeth and dry tissues) from seven individuals born between 1959 and 1970 at the Vincennes Zoo, and kept at the Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris, France), allowed us to genotype the population of origin. At the time of the introduction on Haute Island the Vincennes population was composed of about 40 individuals (Boussès & Réale 1998).

Tissue samples were kept in 95% ethanol. Horns were drilled, teeth smashed, and the dust was used for DNA extraction with the QIAamp tissue extraction mini kit (Qiagen Inc., Mississauga Ontario). Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed at the following 25 ungulate-derived microsatellite loci: ARO28, HEL10,

MCM64, MCM152, BM3413, BM848, HUI177, MAF64, MCM527, TGLA13, Ilsts059, TGLA176, RT1, AGLA226, Il2ra, MCM218, NRAMP, OarCP49, TEXAN4, DRBps, INRA26, oMHC1, TGLA387, CSSM022 and MAF33 (see Maddox *et al.* 2001 for details). Reaction conditions (see <http://www.thearkdb.org/>) were optimized using temperature and MgCl₂ gradient PCR. PCR products were analysed with an automatic sequencer (ABI 3730, Applied Biosystems). We tested primers for 100 different microsatellite loci on 6 historical (i.e. collected prior to 1970, both at Kerguelen and at Vincennes), and 6 contemporary samples (i.e. collected in 2003). Sixty-six of the 100 microsatellite loci amplified products of the expected size range. We selected 25 loci primers among the 66 tested, based on their readability and a minimum allelic diversity of 2 (i.e. 16 loci with 2 alleles, 7 with 3 alleles and two with 4 alleles, the average for both new and old samples equals 2.44). The oldest samples used may have been of low quality or may have contained a small amount of DNA (Lindhal 1993), which could have decreased H estimated as a result of allelic dropout (i.e. the random amplification of only one of the two alleles at a heterozygous locus (Taberlet *et al.* 1996)). This effect can inflate the difference between H at the introduction and 2003. To limit this potential bias, DNA extractions were repeated three times and PCR three to seven times for the oldest samples to ensure reliable genotyping. The deviation from Hardy-Weinberg for each locus was tested using Genepop 3.4 (Raymond & Rousset 2003).

I.3.3 Heterozygosity

Average individual heterozygosity is estimated by the number of heterozygote loci observed divided by the total number of loci used for an individual. We denote H_O as the average individual heterozygosity observed in the population and H_E as the expected heterozygosity under Hardy-Weinberg assumptions.

We calculated H_O for each cohort. We analysed the change in H_O with time from introduction to 2003 using an ANCOVA, where the mean value of H_O (log transformed for normality) per cohort was regressed as a function of cohort, sex, and the interaction between cohort and sex. Because cohorts differed in the number of individuals used to

calculate H_O we used a weighted least square method, where the weight equals the sample size of each cohort.

I.3.4 The population genetic model

Motro and Thomson's model (Motro & Thomson 1982) describes the change in heterozygosity over time in a population subject to fluctuations in size. Expected value of $H(H_E)$ at generation t is:

$$H_t = 2u \left(1 + \sum_{j=1}^{t-1} \prod_{i=j}^{t-1} y_i \right) + H_0 \prod_{i=0}^{t-1} y_i \quad (2),$$

where

$$y_i = (1 - 2u) \left(1 - \frac{1}{2Ne_i} \right) \quad (3),$$

where u is the mutation rate (fixed at 0.001, Weber & Wong 1993) and Ne_t is the effective population size at generation t . From equation (2) we estimated the initial heterozygosity in the Haute Island population given H observed in the ancestral population. As mentioned above, we chose an average generation time of 2 and therefore approximated the effective population size at generation t , by using the harmonic mean population size (Motro & Thomson 1982; Hartl & Clark 1997) over two consecutive years.

I.3.5 Simulation

We simulated the demography and the genealogy of a population using individual based models. The genetic composition of the founder individuals was created by randomly combining alleles at 25 loci (i.e. 2 loci with 4 alleles, 7 with 3 alleles and 16 with 2 alleles; similar to the composition of loci observed in the population). The genotype of a newborn individual was produced by the random combination of 2 alleles at each locus, one coming from a male and one from a female randomly chosen from the previous generations. The individual heterozygosity was estimated as the number of

heterozygous loci divided by the total number of loci. We fixed several demographic parameters based on empirical observations of the population (Chapuis *et al.* 1994). The demographic model was density-dependent and the carrying capacity was fixed at 600 individuals and survival rate above the carrying capacity was set to 0.7. We used a model with two age classes because ungulates generally have a stable adult survival rate (Gaillard *et al.* 2000). We also integrated juvenile mortality rate (0.2 and 0.35) and adult maximum lifespan (3 and 4 years). These values were chosen to produce a demography similar to the one observed on the island (Fig. 8).

We investigated the effect of initial heterozygosity at the foundation of the population on subsequent gene dynamics by using two founder individuals characterised by either the highest heterozygosity level ($H = 1$) or the lowest possible heterozygosity ($H = 0.22$) given the number of alleles per gene observed in the Kerguelen population. Under each set of conditions, we created 1000 population replicates and calculated the mean heterozygosity from 60 individuals randomly sampled from the population at year 47 (i.e. the equivalent of year 2003). The simulated heterozygosity denoted as " H_S " can differ from H_E (H expected under Hardy-Weinberg assumptions).

In our simulation model, selection was mimicked by removing from the population all the newborns with an H lower than a threshold value (i.e. $H = 0.2, 0.3$ and 0.4). For simulations with selection juvenile mortality rate was fixed to 0.3 and maximum lifespan to 4. Selection had a negligible effect on the demography of the population, although it slightly increased juvenile mortality rate.

Table 5 Heterozygosity observed and expected for each loci under Hardy Weinberg assumption in the seventies, 1988 and 2003. Only two loci (in bold) in the seventies deviated from the HW equilibrium and showed a deficit of heterozygosity.

Microsatellites ID	Seventies		1988		2003	
	<i>H obs</i>	<i>H exp</i>	<i>H obs</i>	<i>H exp</i>	<i>H obs</i>	<i>H exp</i>
ARO28	0.428	0.337	0.277	0.323	0.381	0.444
HEL10	0.625	0.594	0.638	0.548	0.571	0.578
MCM64	0.571	0.571	0.533	0.615	0.619	0.661
MCM152	0.75	0.469	0.457	0.460	0.452	0.500
BM3413	0.428	0.5	0.478	0.466	0.524	0.499
BM848	0.375	0.43	0.311	0.369	0.476	0.472
HUJ177	0	0.5	0.383	0.472	0.429	0.482
MAF64	0.143	0.133	0.149	0.173	0.238	0.210
MCM 527	0.142	0.337	0.404	0.370	0.429	0.408
TGLA13	0.25	0.656	0.745	0.691	0.643	0.672
Ilsts059	0.167	0.375	0.390	0.450	0.405	0.436
TGLA176	0.5	0.656	0.587	0.619	0.595	0.632
RT1	0.143	0.336	0.152	0.211	0.238	0.210
AGLA226	0.5	0.65	0.630	0.665	0.595	0.610
Il2ra	0.375	0.492	0.532	0.456	0.429	0.496
MCM218	0.625	0.586	0.596	0.490	0.548	0.511
NRAMP	0.5	0.5	0.361	0.361	0.357	0.452
OarCP49	0.571	0.49	0.556	0.533	0.548	0.589
TEXAN4	0.571	0.49	0.340	0.400	0.381	0.444
DRBps	0.286	0.49	0.333	0.459	0.595	0.486
INRA26	0.125	0.117	0.255	0.254	0.238	0.210
oMHC1	0.5	0.531	0.488	0.603	0.595	0.513
TGLA387	0.571	0.408	0.565	0.496	0.524	0.482
CSSM022	0.428	0.459	0.489	0.456	0.429	0.408
MAF33	0.714	0.724	0.732	0.701	0.714	0.721
Average	0.411	0.473	0.455	0.466	0.478	0.485
(SE)	0.204	0.147	0.162	0.141	0.135	0.133

I.4 RESULTS AND DISCUSSION

I.4.1 Theoretical expectations

Historical samples from Vincennes Zoo allowed us to estimate the observed heterozygosity of the ancestral population ($H_{Oa} = 0.45 \pm 0.12$ SD) which we used as the initial heterozygosity of the Kerguelen population. Using Motro and Thomson's model for a fluctuating population allowing mutation (Motro & Thomson 1982), we predicted a

remaining H_E of 0.12 in 1995, the last year for which we have accurate demographic data. Heterozygosity predicted for the first generation after introduction ($H_{E1} = 0.34$) matched that observed for the first individual sampled ($H_{O1} = 0.31$), a male collected in 1966 and estimated to be born in 1960. Because the initial H could be underestimated we also predicted the expected H_E in 1995 assuming the highest possible initial heterozygosity (i.e. $H = 1$). Given this initial value, heterozygosity predicted for 1995 was 0.26. Motro and Thomson's model therefore predicts a decrease of 73 % of H . Average individual heterozygosity observed (H_O) in the population in 2003 was 0.48 ± 0.11 SD, which is 1.8 to 4 times that expected by Motro and Thomson's model. Furthermore, in 2003, the absence of any excess or lack of heterozygosity (Table 5) shows that the population has probably reached the Hardy-Weinberg equilibrium. Our observations therefore differ dramatically from the model predictions, even though the mouflon population is in many ways ideally suited for that model (i.e. isolation, no mutation).

Several factors may explain the difference between expected and observed H . On one hand, using the harmonic mean as an estimate of N_e has been shown to overestimate the temporal decrease of H when the population experiences a strong founder effect (Caballero 1994; Motro & Thomson 1982). On the other hand, we have not included in our estimate of N_e effects such as a skewed sex-ratio or a high variation in family size, which could further increase the reduction of H . Furthermore, Motro and Thomson model's as most of the population genetic models widely used in studies of wild populations do not consider overlapping generations (Waples 2005). The rate of decrease of H per generation equal to $1/(2N_e)$ predicted by these models is not valid when generations overlap (Johnson 1977; Nunney 1993). Our results show a simple example where the reduction in H can be overestimated and illustrate how classical population genetic models may produce biased predictions when their underlying assumptions are violated.

I.4.2 Simulation results

Given the potential limitations of the applicability of Motro and Thomson's model to the Kerguelen mouflon population, we performed stochastic simulations to predict the impact of initial heterozygosity, lifespan and juvenile mortality rate on gene diversity dynamics. Heterozygosity predicted by simulations (H_S) ranged from 0.33 to 0.4 (initial $H = 1$).

Table 6 Comparison of heterozygosity observed in 2003 in the Kerguelen mouflon population and heterozygosity estimated in 2003 from different simulations based on the population demography. Initial heterozygosity was set up by using two founders characterised by either the highest heterozygosity level ($H = 1$) or the lowest possible heterozygosity ($H = 0.22$) given the number of alleles per gene observed in the Kerguelen population. Juvenile mortality rate occurs randomly according to juvenile characteristics. Selection level represents the minimum H under which the individual dies. Comparison between simulated and observed H_{2003} are made with Student's t tests.

	$H_{initial}$	Maximum Lifespan	Juvenile mortality rate	Selection level	H_{2003}	t	P
Observed values	0.45 ± 0.12 SD	-	-	-	0.48 ± 0.11 SD	-	-
Simulations	1	4	0.35	-	0.37	6.275	0.001
	1	4	0.3	-	0.38	5.699	0.001
	1	3	0.25	-	0.33	8.439	0.001
	1	3	0.2	-	0.35	7.306	0.001
	0.22	4	0.35	-	0.38	5.384	0.001
	0.22	4	0.3	-	0.39	4.801	0.001
	0.22	3	0.25	-	0.36	6.650	0.001
	0.22	3	0.2	-	0.34	7.662	0.001
	1	4	0.3	0.2	0.39	5.001	0.001
	1	4	0.3	0.3	0.43	2.730	>0.01
	1	4	0.3	0.4	0.50	1.244	>0.2

The initial value of H had a weak effect on contemporary H_S ; with two different homozygous individuals at the first generation individuals were completely heterozygous at the second generation ($H = 1$). Heterozygosity ($H_O = 0.48$) observed in the Kerguelen population was still higher than the values predicted by simulations (Table 6; in all the cases; $P < 0.001$; $N = 42$; t test). Simulations mimicked the demography of the mouflon population (year and duration of the exponential growth, number of demographic peaks and crashes). Although they are probably more appropriate than Motro and Thomson's model for predicting the dynamics of H for populations with overlapping generations, simulations may still be conservative. In our simulations, in the absence of information

on the variance of reproductive success among males, we used a random mating system. Mouflons, however, are characterised by a promiscuous mating system which could increase the loss of H (Nunney 1991; Nunney 1993). Furthermore, H_S increases with maximum lifespan and our highest value of heterozygosity ($H_S = 0.39$) corresponds to a maximum lifespan of 4 years, which overestimates the lifespan in the Haute Island population.

1.4.3 Interaction with sex and cohort

In order to better understand the gene diversity dynamics we analysed the change in H_O per cohort by sex between the introduction and 2003 (Fig. 9). We found a significant interaction between sex and cohort ($F_{1,27} = 6.784$, $P = 0.015$). H_O significantly increased with time only for males, but not for females (Fig. 9), probably because we did not have data for females during the early years. These results suggest that some other mechanisms may promote heterozygosity in the Kerguelen population. Despite a strong founder effect and a strong potential for genetic drift, heterozygosity has increased over time. This increase could be explained by selection in favour of heterozygous individuals. Two hypotheses can explain the evolutionary advantage of heterozygosity: 1) the overdominance hypothesis, according to which the fitness of the heterozygote is superior to that of both homozygotes; 2) the dominance hypothesis, which implies that heterozygosity prevents the expression of deleterious recessive alleles (Charlesworth & Charlesworth 1987).

With the exception of HUI177 and TGLA13 in the 70s the loci did not show any departure from the Hardy-Weinberg expectation (Table 5; all $P > 0.05$). The average heterozygosity estimated at each locus increased from 0.41 to 0.48 over the three periods 1970s, 1988 and 2003 (Table 5). However, given the large SEs associated with the heterozygosity estimates we could not show significant differences between these three periods (Table 5; Friedman $\chi^2 = 2.686$; $df = 2$; $P = 0.26$).

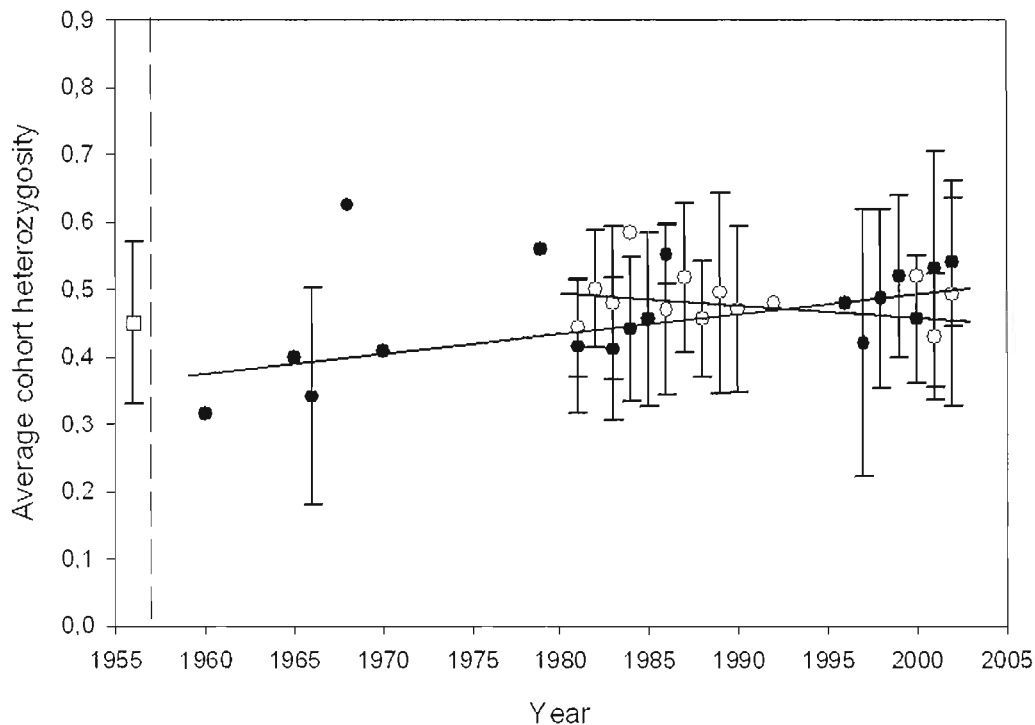


Figure 9 Average cohort heterozygosity observed (and standard deviation) on Kerguelen mouflon population. Black circles represent males and white circles, females. The white square represents the average heterozygosity observed in the ancestral population.

I.4.4 Selection as a possible mechanism

We therefore used the simulation approach to identify the range of demographic parameters that could explain the high H observed in the population, under neutral conditions. We extended the simulations by using a larger panel of demographic parameters (i.e. range: life span = 3-8 years; juveniles mortality = 0.2-0.6). It should be noted that these new parameters exceeded the plausible range of demographic parameters observed in the population, but that they permitted to keep the dynamics observed (Fig. 8). None of the heterozygosity values obtained with these simulations exceeded 0.43, and all them were significantly lower than the observed H in the population in 2003 (all $P < 0.05$) (data not shown, but see Table 7).

The use of loci that had not lost alleles during the history of the population (average number of allele = 2.44) could generate ascertainment bias and potentially explain the high H_0 observed. We therefore simulated 50 populations and estimated H_5 after 47 years

(i.e. equivalent of 2003 on Haute Island; see method) from a data set that includes all the loci or loci that have not lost alleles alone. Using loci that have not lost any alleles can lead to some ascertainment bias in H_O (Wilcoxon matched paired rank test, all $P < 0.001$, Table 7). Comparisons between H_S after 47 years and H_O in 2003 in the mouflon population (t test, all $P < 0.01$, Table 7), however, reveal that ascertainment bias alone can not explain the increase in heterozygosity over time in the Haute Island population. It is interesting to note that the ascertainment bias is reduced when generation time increases because longer generations limit the loss of genetic diversity.

Table 7 Heterozygosity estimated after 47 years (H_S) in a simulated population, using a subsample of loci that have lost or not lost alleles during the history of the population. Wilcoxon matched paired rank test, was used to test for the difference between H_S in the two conditions. T test was used to test the significance of the difference between H_O in the mouflon population (i.e. $H_O = 0.48$ after 47 years, in 2003) and H_S .

Maximum lifespan	Juveniles mortality rates	H_S loss	H_S no loss	W	P_w	T	P_t
3	0.25	0.33	0.38	1247	<0.0001	5.569	<0.001
4	0.35	0.36	0.40	1154.5	<0.0001	4.434	<0.001
5	0.45	0.39	0.41	1080	<0.0001	3.866	<0.001
6	0.5	0.40	0.42	891	<0.001	3.298	<0.01
7	0.5	0.41	0.42	1026	<0.0001	3.298	<0.01

Simulations including selection in favour of heterozygotes (see method; Table 6) showed that under the conditions tested (H_O initial of 1, maximum lifespan of 4 years and juvenile mortality rate of 0.3) selection against individuals with a heterozygosity under or equal to 0.4 led to an increase of the H_S up to 0.5 in 2003. These results are therefore consistent with selection as a possible mechanism for the maintenance or the increase of heterozygosity over time. In these simulations, however, we used a simple model with a constant rate of selection on newborns, when selection in the Kerguelen population could have been more complex. For example mortality rate varies between year, sex and age classes (Boussès *et al.* 1994), suggesting that selection could fluctuate over time. Fluctuating selection may be less efficient at increasing H than consistent selection. It is worth noting that these simulation models did not allow us to answer the question of whether selection acts as a genome-wide process or by local effects at some specific loci.

Three of our loci (DRBPs, TGLA387, oMHC1) are known to be closely linked to the MHC gene complex (Maddox *et al.* 2001) which is involved in resistance to disease and are known to be under strong overdominance selection (Aguilar *et al.* 2004). Two of these loci (DRBPs and oMHC1) show an increase of H between 1988 and 2003 (Table 5). It is therefore possible that selection at some loci in LD with our microsatellites could explain the increase in H over time in the Kerguelen mouflon population (Charlesworth 1991). The maintenance of heterozygosity at neutral microsatellite markers reported here should be attributed to a combination of LD and selection at linked loci (i.e. “local effects” (Hansson *et al.* 2004)). Alternatively, the maintenance of heterozygosity could be attributed to the effects of selection against inbreeding across the whole genome (“general effects” (Hansson *et al.* 2004)). Balloux *et al.* (2004) have suggested that a strong H - H correlation is required in order for average H to reflect whole genome heterozygosity under inbreeding. We followed Balloux *et al.* (2004) by calculating the average correlation between the mean H calculated from two random subsets of markers, over a 1000 replicates. The low H - H correlation (Balloux *et al.* 2004) ($r = 0.149 \pm 0.002$ SE) observed among our loci suggests that our observed changes in H are less likely explained by genome wide processes than by local effects.

1.4.5 Conclusion

The quasi-experimental situation and the longitudinal data of the Kerguelen mouflon population allowed us to detect an increase in individual heterozygosity over time. Our results suggest that selection is the likely mechanism responsible for the increase in H in an insular population founded by two individuals. These results raise the question of the generality of this process in other populations under different conditions. In some populations selection may affect H , but may be hidden by the effect of genetic drift. Selection, on the other hand, may lower the impact of drift on the loss of genetic diversity. Information from longitudinal studies such as the Kerguelen mouflon population are therefore needed to help us understand the respective roles of selection and drift on the change in genetic diversity in small isolated populations.

I.5 ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Boussès, T. Micol (TAAF), B. Tollu, the Amical des Missions Australes et Polaires Françaises and all field workers who collected mouflon samples and data, A. Krupa and A. Llewellyn for their help with molecular analyses, O. Gingras for programming, F. Balloux, T. Coulson, S. Devillard, J.M. Gaillard, B. Hansson and D. Waller for discussions. This work was supported by the Institut Polaire Français Paul-Emile Victor and the Centre National de la Recherche Scientifique to J.L. Chapuis and D. Pontier, the Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canadian Foundation for Innovation to D. Réale, and the Royal Society to D. Coltman.

I.6 BIBLIOGRAPHY

- Aguilar, A., Roemer, G., Debenham, S., Binns, M., Garcelon, D. & Wayne, R. K. 2004 High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3490-3494.
- Balloux, F., Amos, W. & Coulson, T. 2004 Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? *Mol. Ecol.* **13**, 3021-3031.
- Bon, R., Gonzalez, G., Bosch, M.A. & Cugnasse, J.-M. 1992 Ram rut-involvement in a hunted population of mouflons. *Acta Theriol.* **37**,63-71.
- Boussès, P. & Réale, D. 1994 Valeur du masque facial comme critère d'âge des femelles de mouflons Corse (*Ovis musimon*) dans la population de Kerguelen. *Mammalia* **58**, 301-304.
- Boussès, P., Réale, D. & J.L.Chapuis. 1994 Mortalité hivernale massive dans la population de mouflons Corse (*Ovis musimon*) de l'archipel subantarctique de Kerguelen. *Mammalia* **58**, 211-223.
- Boussès P, Réale D (1996) Syndrome d'insularité dans une population récente de mouflon (*Ovis musimon*) des îles Kerguelen. *Vie Milieu* **46**, 285-290.
- Boussès, P. & Réale, D. 1998 Biology of twinning and origin of an unusually high twinning rate in an insular mouflon population. *Z. Säuget.* **63**, 147-153.

- Caballero, A. 1994 Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* **73**, 657-679.
- Chapuis, J. L., Boussès, P. & Barnaud, G. 1994 Alien mammals, impact and management in the French Subantarctic islands. *Biol. Conserv.* **67**, 97-104.
- Charlesworth, D., & B. Charlesworth 1987 Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 237-28
- Charlesworth, D. 1991 The Apparent Selection on Neutral Marker Loci in Partially Inbreeding Populations. *Genet. Res.* **57**, 159-175.
- England, P. R., Osler, G. H. R., Woodworth, L. M., Montgomery, M. E., Briscoe, D. A. & Frankham, R. 2003 Effects of intense versus diffuse population bottlenecks on microsatellite genetic diversity and evolutionary potential. *Conserv. Genet.* **4**, 595-604.
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. 1996 *Introduction to quantitative genetics*. Harlow, UK: Longman.
- Frankham, R. 1996 Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv. Biol.* **10**, 1500-1508.
- Frankham, R. 1997 Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* **78**, 311-327.
- Gaillard, J. M., Festa-Bianchet, M., Yoccoz, N. G., Loison, A. & Toigo, C. 2000 Temporal variation in fitness components and population dynamics of large herbivores. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **31**, 367-393.
- Geist, V. 1971 *Mountain sheep: a study behavior and evolution*. Chicago: Chicago University Press.
- Groombridge, J. J., Jones, C. G., Bruford, M. W. & Nichols, R. A. 2000 Conservation biology - 'Ghost' alleles of the Mauritius kestrel. *Nature* **403**, 616-616.

- Hansson, B., Westerdahl, H., Hasselquist, D., Akesson, M. & Bensch, S. 2004 Does linkage disequilibrium generate heterozygosity-fitness correlations in great reed warblers? *Evolution* **58**, 870-879.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. 1997 *Principles of Population genetics*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Hedrick, P. W. 2000 *Genetics of Populations*. Boston, MA: Jones and Bartlett.
- Johnson, D. L. 1977 Inbreeding in populations with overlapping generations. *Genetics* **87**, 581-591.
- Keller, L. F. & Waller, D. M. 2002 Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* **17**, 230-241.
- Lindahl, T. 1993 Instability and Decay of the Primary Structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Maddox, J. F., Davies, K. P., Crawford, A. M., Hulme, D. J., Vaiman, D., Cribiu, E. P., Freking, B. A., Beh, K. J., Cockett, N. E., Kang, N., Riffkin, C. D., Drinkwater, R., Moore, S. S., Dodds, K. G., Lumsden, J. M., van Stijn, T. C., Phua, S. H., Adelson, D. L., Burkin, H. R., Broom, J. E., Buitkamp, J., Cambridge, L., Cushwa, W. T., Gerard, E., Galloway, S. M., Harrison, B., Hawken, R. J., Hiendleder, S., Henry, H. M., Medrano, J. F., Paterson, K. A., Schibler, L., Stone, R. T. & van Hest, B. 2001 An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.* **11**, 1275-1289.
- Maruyama, T. & Nei, M. 1981 Genetic variability maintained by mutation and overdominant selection in finite population. *Genetics* **98**, 441-459.
- Motro, U. & Thomson, G. 1982 On Heterozygosity and the effective size of populations subject to size changes. *Evolution* **36**, 1059-1066.
- Nei, M., Maruyama, T. & Chakraborty, R. 1975 The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1-10.

- Nunney, L. 1991 The influence of age structure and fecundity on the effective population size. *Proc. R. Soc. Lond. B* **246**, 71-76.
- Nunney, L. 1993 The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution* **47**, 1329-1341.
- Raymond M., Rousset F. 2003 *GENEPOP, version 3.4: Population genetics software for exact tests and ecumenicism*. Montpellier, France.
- Spielman, D., Brook, B. W. & Frankham, R. 2004 Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15261-15264.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L. P. & Bouvet, J. 1996 Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3189-3194.
- Vucetich, J. A. & Waite, T. A. 1999 Erosion of heterozygosity in fluctuating populations. *Conserv. Biol.* **13**, 860-868.
- Waples, R. S. 2005 Genetic estimates of contemporary effective population size: to what time periods do the estimates apply? *Mol. Ecol.* **14**, 3335-3352.
- Weber, J. L. & Wong, C. 1993 Mutation of Human Short Tandem Repeats. *Hum. Mol. Gen.* **2**, 1123-1128.

*CHAPITRE II DÉTECTER LA STRUCTURE DES POPULATIONS À
L'AIDE DU LOGICIEL STRUCTURE : EFFETS DU DÉSÉQUILIBRE
DE LIAISON DU TYPE « ARRIÈRE PLAN »*

Detecting population structure using STRUCTURE software: effect of background linkage disequilibrium

R Kaeuffer^{1,2}, D Réale¹, DW Coltman³ and D Pontier²

¹*Canada Research Chair in Behavioural Ecology and GRÉCA, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

²*Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR-CNRS 5558, Université de Lyon, Université Lyon I, Villeurbanne cedex, France*

³*Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada*

Heredity **99**, 374-380 (2007)

II.1 RÉSUMÉ

A la vue de l'importance de la structure des populations dans la dynamique des gènes, Wright, en 1931, proposait les statistiques F qui mesurent la distribution de la variance génétique entre les différents niveaux de structure génétique (individus, sous-populations, populations). L'utilisation des statistiques F est limitée par la nécessité de la connaissance *a priori* de la structure des populations. Avec l'accroissement des puissances de calculs des ordinateurs, de nouvelles méthodes statistiques d'assignation des individus se sont développées et permettent de s'affranchir des connaissances *a priori* jusqu'alors indispensables. Ces méthodes utilisent l'information génétique de manière à regrouper les individus dans des populations, au sein desquelles l'équilibre d'Hardy-Weinberg est respecté et le déséquilibre de liaison (DL) minimisé (Manel et al. 2005). Elles permettent pour la plupart de mesurer la dispersion, l'hybridation, ou de mettre en évidence la population d'origine d'un individu et la structure des populations (Pritchard et al. 2000, Dawson & Belkhir 2001, Corander et al. 2003, Falush et al. 2003)

L'utilisation de ces méthodes nécessite pourtant un certain nombre de précautions. D'une part, à la vue des nombreuses méthodes et options pour chacune d'elles, il faut être sûr d'appliquer la bonne méthode suivant la question biologique posée (Manel et al. 2005). D'autre part, chaque méthode possède ses propres algorithmes dont la sensibilité peut varier pour certains paramètres tel le niveau de structuration des populations et de migration (Berry et al. 2004, Waples & Gaggiotti 2006) ou encore de déséquilibre de liaison (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003). Les auteurs de ces méthodes en fournissent souvent les conditions générales d'emploi. Cependant, à la vue de la complexité et du nombre des méthodes, les utilisateurs restent généralement mal renseignés. Ainsi, le modèle développé par Pritchard et al. (2000) est, à l'heure actuelle, le plus employé bien que peu d'études aient testé ses limites d'utilisation.

Le déséquilibre de liaison est un élément clé utilisé pour l'inférence des individus dans le processus Bayésien décrit par Pritchard et al. (2000) et Falush et al (2003). Il existe plusieurs types de déséquilibre. Tout d'abord, le déséquilibre de liaison de « mélange » (« mixture LD ») se traduit par la corrélation entre la fréquence d'allèles non

liés (sur des chromosomes différents) causée par le fait que les migrants ont des combinaisons d'allèles différentes de la population dans laquelle ils arrivent (Falush et al. 2003). Ensuite, le déséquilibre de type admixture (« admixture LD ») est la corrélation entre la fréquence d'allèles liés physiquement mais qui peuvent être séparés par de large distance (Pritchard & Wen 2004). Le dernier type de DL est de type structurel (« background LD ») qui est causé par la corrélation entre loci physiquement liés et séparés par des faibles distances chromosomiques (Falush et al. 2003).

Le logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003), emploie ces deux types de DL pour établir des groupes dans lesquels le déséquilibre est minimal. La présence de déséquilibre de liaison au sein des populations permet un accroissement de la précision dans l'assignation des individus à leur groupe respectif. La force du DL de type mixture, qui varie notamment en fonction de la distance séparant les loci, pourrait toutefois affecter les résultats obtenus par ce logiciel. Falush et al. (2003) soulèvent ce problème en signalant aux auteurs de ne pas utiliser, dans leur analyse, de loci séparés par de faibles distances en déséquilibre de type structurel (distance entre loci inférieur à 1 cM pour les populations humaines selon Pritchard & Wen 2004). Cependant, la carte génomique n'est connue que pour quelques espèces et la force du déséquilibre de liaison peut varier en fonction de l'histoire démographique de la population étudiée (Jorde 2000, Peltonen 2000, Puffenberger et al. 1994), rendant les conseils de Falush et al. (2003) et Pritchard & Wen (2004) peu appropriés.

Dans ce chapitre nous avons testé l'effet du déséquilibre de liaison des différents types (mixture, admixture et structurel) sur le processus d'inférence de la structure génétique de la population de mouflon de l'île Haute à l'aide du logiciel STRUCTURE. La population de mouflons de Kerguelen ayant été fondée par un unique couple d'individus, nous supposons que le fort effet fondateur a favorisé un important déséquilibre de liaison. De plus, la carte génomique du mouton nous renseigne sur la position exacte de chacun des loci utilisés, nous permettant de déterminer à la fois la distance qui les sépare et le type de déséquilibre de liaison. Pour effectuer nos analyses nous nous sommes servis de prélèvements effectués sur une centaine de cadavre d'agneaux dont la localisation précise était connue. Nous avons typés ces individus sur 24

loci microsatellites et estimés le DL entre eux. A la vue de la forte densité de la population, des observations faites sur le déplacement des individus, la structuration spatiale de la population est peu probable.

En utilisant STRUCTURE, nous avons montré que l'utilisation de loci séparés par une faible distance et donc en fort déséquilibre de liaison conduisait à déterminer une structure génétique incompatible avec les localisations des animaux étudiés. Pour confirmer ce résultat, nous avons effectué de nouvelles analyses avec le logiciel de détection de structure de population : Geneland (Guillot et al. 2005 a,b) dont les algorithmes n'intègrent pas les effets du DL, mais qui tiennent compte de la distance géographique séparant les individus. Les résultats obtenus par Geneland confirment qu'il n'y a probablement pas de structure génétique de la population.

Dans la mesure où les cartes génomiques sont encore peu fréquentes, nous suggérons aux utilisateurs d'estimer la force du déséquilibre de liaison à l'aide par exemple du r_{LD} (Hill & Robertson 1968) entre les loci avant d'utiliser le logiciel STRUCTURE. Dans notre cas, l'utilisation de loci séparés par une distance de 3 cM et $r_{LD} = 0,6$ (soit trois fois la distance minimale suggérée par Pritchard & Wen, (2004)) est suffisante pour générer des structures de population erronées. Nos résultats confirment la sensibilité de STRUCTURE au déséquilibre de liaison de type « background ». Les loci en fort déséquilibre de liaison ne devraient donc pas être employés pour l'inférence de la structure des populations à l'aide de STRUCTURE.

II.2 INTRODUCTION

STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) is the most widely used clustering software applied to detect population genetic structure, with more than 1000 citations for its first version (Pritchard et al. 2000) and more than 170 citations for its recent enhanced version (Falush et al. 2003) (source: ISI Web of Science database). STRUCTURE generates clusters based on both transient Hardy –Weinberg disequilibrium (HWD) and linkage disequilibrium (LD) caused by admixture between populations. The program works by clustering individuals in groups where both linkage and Hardy-Weinberg disequilibrium

are minimized, and therefore, the presence of LD in the data improves clustering results (Falush et al. 2003). On the other hand, “strong” linkage disequilibrium or departure from H-W equilibrium could lead to an overestimation of the number of clusters detected (Falush et al. 2003).

STRUCTURE deals with two kinds of LD: the first is mixture LD, which occurs across loci even if they are *unlinked* due to the correlation of allele frequencies “because individuals with a large component of ancestry in population *k* have an excess of alleles that are common in *k*” (Falush et al. 2003). The second is admixture LD which is “the correlation that arises between *linked* markers in recently admixed populations” (Pritchard & Wen, 2004). This LD occurs because markers are on the same “chunk” of chromosome that derives from an ancestral population. The “admixture model” implemented in the latest version of STRUCTURE (STRUCTURE 2.1; Falush et al. 2003) combines admixture LD with map distances between markers to improve clustering results.

Falush et al. (2003) defined a third kind of LD: the background LD measured between syntenous loci separated by a few cM. Background LD is generated by genetic drift, is expected to be strong at short distance, and can generate spurious clustering (Falush et al. 2003). However, the authors have not implemented a way to take that LD into account during clustering yet, and they advise users to avoid too closely linked markers that could be in background LD (Falush et al. 2003). Pritchard & Wen (2004) suggested that the distance between markers should not be below 1 cM for humans, although they did not provide empirical evidence in support of this advice. For many species, however, the lack of a genomic map leads to an inability to separate background LD from other types of LD. Furthermore, events other than admixture such as population bottlenecks (Lynch and Walsh 1998) or important demographic changes could also generate strong LD and increase the occurrence of background LD (Jorde 2000, Peltonen 2000, Puffenberg et al. 1994). In this situation, users should not rely on the genomic map alone to decide which loci to use or not. A measure of the “strength” of linkage between loci such as the correlation r_{LD} (Hill & Robertson 1968) may therefore be more informative than the genomic map to decide which pairs of loci could be used.

Although STRUCTURE is the most widely used program to identify clusters, only a few studies have tested its sensitivity to ecological or genetical constraints. For example Berry et al. (2004) and Rosenberg et al. (2001) tested the effect of the number of loci on clustering results, whereas Evanno et al. (2005) and Waples & Gaggioti (2006) tested the effects of variation in dispersal rates among populations on the reliability of the number of clusters detected. Furthermore, no study has tested the effect of the strength of LD on clustering results. In this paper we use knowledge of both the complete history of a mouflon (*Ovis aries*) population and genomic information about the species to study the potential bias caused by strong LD on clustering with STRUCTURE 2.1. The Kerguelen mouflon population was founded in 1957 by two individuals originating from the Vincennes Zoo (Paris). In 1958, the mouflon started to reproduce and the population reached the size of 100 individuals at the beginning of the 1970s. The population then grew exponentially, reaching about 700 individuals in 1977, corresponding to a density of about 100 individuals per Ha. Since then, the population has been characterised by cyclical dynamics, fluctuating between 250 and 650 individuals, with winter crashes occurring every 3-5 years (Chapuis et al. 1994).

Given the high densities reached during peaks, the low genetic diversity observed (Kaeuffer et al. 2007), the small size of the island, and the young age of the population, we do not expect that the population is genetically structured. Furthermore, the strong founder effect in that population has potentially generated strong background LD. This situation favours the possibility of empirically testing for the effect of background linkage on clustering. Finally, we could calculate the distance between syntenous loci based on a genomic map of *Ovis aries* (Maddox et al. 2001) and link this distance to the correlation between loci.

In 1993 we sampled 106 individuals that died during the winter crash and for which we knew their exact geographical position. These individuals were genotyped at 22 microsatellite loci: 18 from five linkage groups and seven that were unlinked. We used STRUCTURE 2.1 to estimate the population genetic structure. Using different combinations of loci with variable r_{LD} , we obtained different clustering results and compared them with geographical positions. We then assessed the relationship between

the map distance between loci and the strength of LD (i.e. r_{LD} , a correlation coefficient estimated between pair of loci, Hill & Robertson 1968), and tested the effects of distance and r_{LD} on the clustering results. We hypothesise that a high r_{LD} value between loci could indicate a potential for the pair of loci to generate spurious clustering with STRUCTURE.

II.3 MATERIAL AND METHODS

II.3.1 Population and study site

The population is located on Haute Island, a small island (6.5 km²) of the Kerguelen archipelago. Kerguelen is a very remote Subantarctic archipelago located in the Southern Indian Ocean (49°20' S, 70°20' E). The climate is Subantarctic, with high precipitation, strong winds and average temperature ranging from 1°C during the winter to 8°C in summer. Rocky landscapes dominate Haute Island, with sparse vegetation cover (about 40%) composed of a few endemic species (i.e. *Azorella selago*, *Agrostis magellanica*) and introduced forage species (i.e. *Poa* sp. and *Festuca* sp.) (Chapuis et al. 1994). The central part of the island is composed by rocky mountains, reaching 321 meters high. Mouflons are restricted to shores and low altitude prairies protected from the dominant winds. In 1993 tissues samples were collected from 106 lambs carcasses from both sexes found on the ground. Positions were recorded using a 125 m² grid map of Haute Island.

II.3.2 Genotyping

The samples were kept in 95% ethanol. DNA was extracted using the QIAamp tissue extraction mini kit (Qiagen Inc., Mississauga Ontario). Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed at the following 22 ungulate-derived microsatellite loci: ARO28, HEL10, MCM64, MCM152, BM3413, HUI177, MAF64, MCM527, TGLA13, Ilsts059, TGLA176, RT1, AGLA226, Il2ra, MCM218, NRAMP, OarCP49, TEXAN4, DRBps, INRA26, oMHC1 and TGLA387 (see Maddox *et al.* 2001 for details).

Reaction conditions (see <http://www.thearkdb.org/>) were optimized using temperature and MgCl₂ gradient PCR. PCR products were analysed with an automatic sequencer (ABI 3730, Applied Biosystems) and read using GENEMAPPER 3.5 software (Applied Biosystems).

We characterized variation at each locus, and also tested for departures Hardy–Weinberg equilibrium, using Genepop (Raymond & Rousset 1995) available at http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/genepop_op1.html. Distances between loci were estimated using the SM3 BestPositions, sex averaged on the Arkdb data base (<http://www.thearkdb.org/>).

II.3.3 Linkage disequilibrium

We estimated LD between the 22 loci using the correlation coefficient r_{LD} (Hill & Roberston 1968). The LD correlation coefficient between all pairs of loci was computed using Linkdos software (Garniergere & Dillmann 1992) (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/linkdos.html>). Then, we used Fisher's exact test available in Genepop (Raymond & Rousset 1995) (http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/genepop_op2.html) to test if genotypes at one locus are independent from genotypes at other loci. Founder events (Walsh and Lynch 1998) and population dynamics (Slatkin 1994) can affect LD. We examined the nature of the relationship between r_{LD} and the distance in cM between two loci in the mouflon population.

II.3.4 Population structure

We used STRUCTURE 2.1 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) to infer Haute Island population structure. To infer the number of groups, a fully Bayesian process describe in Pritchard et al. (2000) was run with different values of number of clusters (K). STRUCTURE would attribute a probability $\Pr(X | K)$ given the data (X), and the log $\Pr(X | K)$ is used to determine the more likely number of clusters (Pritchard

et al. 2000). However, $\Pr(X | K)$ is computationally difficult to estimate, and Prichard et al. (2000; p. 948 and p. 958) have proposed an *ad hoc* way to approximate the probability of K given the genotyped data. Prichard et al. (2000) warned users that the estimated probabilities should be considered as “a guide to which models are consistent rather than accurate estimates of the posterior probabilities” of K (Pritchard et al. 2000, p. 950).

STRUCTURE software gives also the assignment probabilities of each individual for each cluster. We used these probabilities to infer the membership of each individual at their most probable groups.

We referred to the sheep genomic map (Maddox et al. 2001) for distances between loci for use in the linkage model. The population was young (less than 50 years since the introduction), and we expected to find no population structure or a weak structure. Allele frequencies should probably be correlated between groups and thus we used the “correlated allele frequencies” option in the linkage model. The K value that provided the maximum likelihood over the runs was retained as the most probable number of clusters (Pritchard & Wen 2004). We first ran a series of models with K ranging from 1 to 10, using all loci. We fixed the burn-in period to 500 000 and the running length to 1 000 000 to give consistent results over runs. In order to verify the consistency of the results we performed 10 independent runs for each K. Running this first series took us more than 100 hours, and we limited the following models to 3 runs and to a K ranging from 1 to 5. We ran these analyses using 3 different combinations of selected loci: 1) syntenous loci, 2) non-syntenous loci, and 3) syntenous loci separated by large distance ($> 3\text{cM}$). We finally ran STRUCTURE using all the different possible pairs of syntenous loci and estimated the number of clusters for each of these pairs.

We analysed the relationship between the distance separating two syntenous loci and their r_{LD} . Given the non linear link between the two variables, we fitted a non linear regression model of the form $y = b_0 + b_1 * e^{(-x/10)}$, using the *selfStart* procedure in the package MASS in R (Venables and Ripley 2000), where y is the r_{LD} and x is the distance between two loci. We used a generalized linear model (logit link function and binomial distribution) to analyse the effect of r_{LD} on the probability of detecting more than one cluster with STRUCTURE. The number of alleles can affect clustering results (Rosenberg et al. 2001), and was thus included in the model. Two groups of pairs of

syntenous loci (i.e. with an $r_{LD} < 0.3$ and with an $r_{LD} > 0.5$, respectively) provided completely separated number of estimated clusters (i.e. 1 or >1 cluster, respectively). In order to account for the bias caused by the complete separation between these two groups we ran a bias-robust logistic regression that uses a Maximum Penalized likelihood estimation (Firth, 1993). We used the package *logistf* in R (Heinze and Schemper, 2002).

II.4 RESULTS

II.4.1 Heterozygosity

The mean number of alleles per locus was 2.5 and ranged from 2 to 4. The average heterozygosity observed is 0.47 ± 0.012 SE. None of the 22 loci showed any departure from Hardy-Weinberg equilibrium (exact test $P = 0.05$).

II.4.2 Linkage disequilibrium and the link with distance on the chromosome

Thirty six of the 231 pairs of loci showed significant linkage disequilibrium ($P < 0.05$). The average r_{LD} over the whole set of loci was 0.112 (range: 0.0005-0.878). Of these 36 pairs, eight were from syntenous loci and showed an r_{LD} averaging 0.64, (Table 8). The 28 other pairs in LD were on different chromosomes and were characterised by an average r_{LD} of 0.09. Only ten pairs of loci, including the eight pairs from syntenous loci were still in significant LD after correcting for multiple testing (Benjamini & Hochberg 1995). The average r_{LD} of the two non-syntenous pairs in significant LD after correcting for multiple testing was 0.25. Ten other syntenous loci showed a non significant LD (Table 8).

The correlation coefficient (r_{LD}) between syntenous loci decreased significantly with the distance between them and reached a minimum of 0.08 for distances greater than 30 cM (Fig. 11; non linear regression; best fitted model parameters: $b_0 \pm se = 0.08 \pm 0.03$ ($t = 2.444$; $P = 0.027$), $b_1 \pm se = 0.80 \pm 0.09$ ($t = 9.438$; $P < 0.0001$), and $th \pm se = 5.26 \pm 1.83$ ($t = 2.873$; $P = 0.012$)).

Table 8 Linkage groups, distance between loci (in cM), and correlations (r_{LD}) between syntenous loci and their associate P value

Chromosome	Linkage group	Locus Pair	Distance (cM)	r_{LD}	P Value
1	1	HUJ177 - MAF64	107.3	0.138	0.13
2	2	MCM64 - TGLA 13	11.5	0.113	0.068
2	2	MCM64 - NRAMP	186.7	0.122	0.226
2	2	MCM64 - ARO28	186.7	0.065	0.736
2	2	MCM64 - TEXAN4	189.2	0.051	0.775
2	2	TGLA13 - NRAMP	175.2	0.092	0.921
2	2	TGLA13 - ARO28	175.2	0.047	0.888
2	2	TGLA13 - TEXAN4	177.7	0.062	0.994
2	2	NRAMP - ARO28	1	0.878	< 0.0001
2	2	NRAMP - TEXAN4	2.5	0.851	< 0.0001
2	2	ARO28 - TEXAN4	2.5	0.756	< 0.0001
5	3	TGLA176 - MCM527	105	0.176	0.004
13	4	Il2ra - MCM152	42.8	0.034	0.322
13	4	Il2ra - Ilst059	44.4	0.051	0.512
13	4	MCM152 - Ilst059	1.6	0.57	< 0.0001
20	5	oMCH1 - DRBps	3	0.6	< 0.0001
20	5	oMCH1 - TGLA387	0.5	0.667	< 0.0001
20	5	DRBps - TGLA387	2.5	0.701	< 0.0001

II.4.3 Population structure

Different combinations of loci provided different clustering results (Table 9). Using the whole set of loci, the best fitted model provided two clusters ($K = 2$; Table 9). The estimated membership of each individual in each cluster did not correspond to any obvious geographical structure on the island (Fig. 10), suggesting that the number of clusters was overestimated here. Analyses run with combination of syntenous loci alone also provided an estimate of two clusters (Table 9). In contrast, both analyses that used only non-syntenous loci or syntenous loci separated by more than 3 cM provided only one cluster.

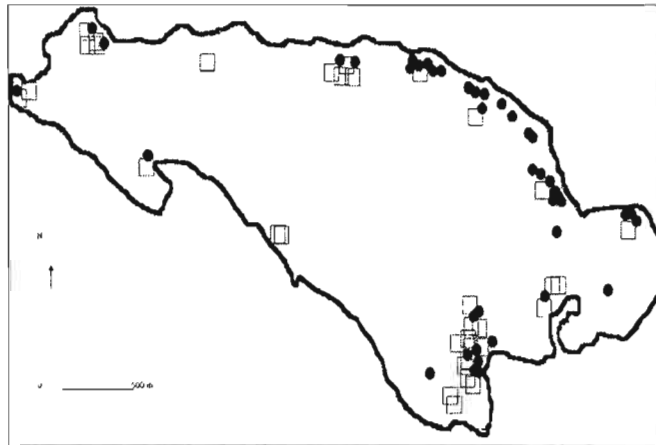


Figure 10 . Approximate position and cluster membership of all lambs sampled on Haute Island determined with STRUCTURE software using the whole set of loci (for map readability, individuals sampled from same location were slightly shifted). Circles and squares represent membership of each individual.

The strength of the linkage correlation (i.e. r_{LD}) between two loci significantly increased the probability of overestimating the number of clusters, in an analysis performed with one pair of syntenous loci at a time (Fig. 11). The number of alleles in a pair of syntenous loci and the interaction between r_{LD} and the number of alleles did not affect the probability of overestimating the number of clusters (Fig. 11). Eleven out of 18 pairs of loci that estimated one cluster were characterised by a $r_{LD} < 0.12$ (mean \pm sd = 0.09 ± 0.05). Four analyses with pairs of loci with a r_{LD} ranging from 0.57 to 0.70 (mean \pm sd = 0.63 ± 0.06) provided an estimate of 2 clusters, and 3 analyses with pairs of loci with a r_{LD} higher than 0.75 (mean \pm sd = 0.83 ± 0.06) estimated 3 clusters. Finally, analyses using the two pairs non syntenous loci with a significant LD ($r_{LD} = 0.25$) gave an estimate of 1 cluster.

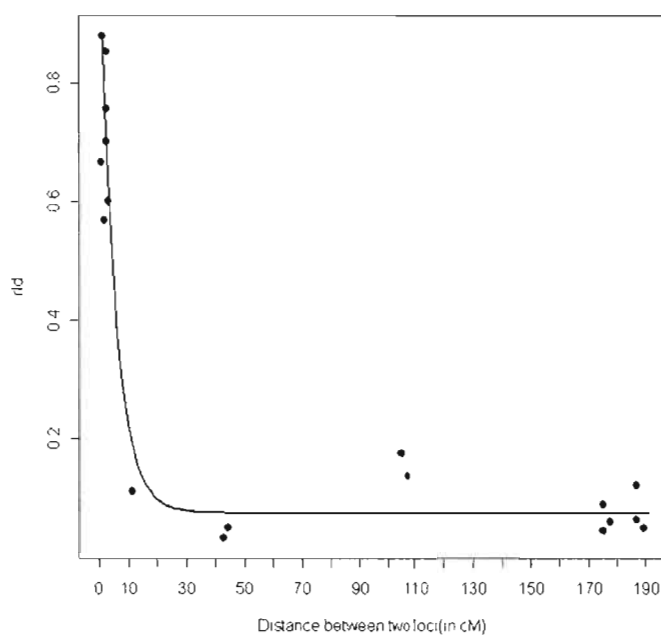


Figure 11 r_{LD} as a function of the distance between two syntenous microsatellite loci (in cM) within a pair.

Table 9 Number of clusters inferred by STRUCTURE for different combinations of loci. All loci = all the 22 loci used in the study; Syntenous = pairs of syntenous loci only; non syntenous = pairs of non syntenous only; large distance = pairs of syntenous loci separated by distance ≥ 10.5 cM.

K	All loci	Syntenous	Non Syntenous	Large distance
1	-3311.2	-1872.0	-1752.7	-2657.9
2	-3110.7	-1686.1	-1760.8	-2685.5
3	-3147.5	-1705.1	-1758.4	-2728.2
4	-3254.8	-1740.5	-1760.7	-2704.3
5	-3278.3	-1843.2	-1758.6	-2685.3
6	-3343.2	-	-	-
7	-3414.8	-	-	-
8	-3633.1	-	-	-
9	-3594.0	-	-	-
10	-3415.0	-	-	-

II.5 DISCUSSION

We detected two subpopulations in the Kerguelen mouflon population using our full dataset and the program STRUCTURE. On one hand, this result could be explained by the fact that groups of related individuals occupied restricted portions of the island. For example, observations on 18 marked individuals during their first year of life

(average number of observation per lamb = 13.6 and range = 10-32) showed that lambs occupied small home ranges (average \pm SE = 39.0 ± 7.0 Ha) relative to the size of the island (i.e. 650 Ha). Furthermore, male and female mouflon in Europe are known to be philopatric (Dubois 1993, 1996; Petit et al. 1997) and to reproduce in their natal area (Dubois et al. 1996). Coltman et al. (2003) have also found weak genetic structure on an insular population of sheep. On the other hand, several lines of evidence suggest this explanation is unlikely. First, the two clusters showed a completely overlapping spatial distribution (Fig. 10). Such an overlap of clusters could be explained by frequent dispersal or long movements of related individuals just prior to the winter crash. This explanation is, however, not consistent with behavioural observations made on the population. All the lambs that died during the winter crash were found within the boundaries of their home range. Furthermore, the population was characterised by a low genetic diversity (Kaeuffer et al. 2007) and a high density relative to other mouflon populations (Boussès and Réale 1996), which should increase the flow of individuals between areas. Finally, marked males moved easily from one area of the island to another during the rut (Réale et al. unpublished), suggesting an unrestricted gene flow within the population. Thus, it is unlikely for the Kerguelen mouflon population to exhibit genetic structure. As mentioned by Pritchard et al. (2000), the two clusters found in our analyses do not necessarily have a biological meaning and could be caused by LD between the markers used (Falush et al. 2003). In order to test for the potential bias in STRUCTURE, we used the program Geneland (Guillot et al. 2005a) implanted in the R program (R Development Core Team, 2005). This method consists of a Bayesian model implemented in a Markov Chain Monte Carlo that takes into account individual geographical positions, but that does not consider effect of linkage disequilibrium on the genetic correlation between populations. Following Guillot et al.'s (2005a,b) recommendations we first run a model to determine the most probable number of populations. Distribution of posterior probabilities showed a mode at $K = 2$ populations, although the frequency of $K = 1$ was also very high. However, after fixing $K = 2$ and running the model again, all the individuals were assigned to the same population. This result confirms that there is no population genetic structure in the Kerguelen mouflon population (for more discussion on Geneland vs STRUCTURE models see Coulon et al. 2006).

In support to the hypothesis that LD can generate spurious number of clusters, we showed that a high r_{LD} between loci strongly affects the probability of detecting more than one cluster in the Kerguelen population (Fig. 12). This high r_{LD} (> 0.56) was caused by pairs of syntenous loci with distance lower than 3 cM (Table 8 and Fig. 11). Our results also indicate that beyond this distance r_{LD} declined dramatically and did not bias the estimation of clusters (Fig. 11 and 12). Therefore, a distance higher than 3.0 cM generates one cluster. The impact of such a high r_{LD} between two closely linked loci support the hypothesis that background LD only is responsible for the overestimation of clusters (Falush et al 2003). This is also supported by the fact that the two pairs of unlinked loci that showed a r_{LD} of 0.25 provided only one cluster.

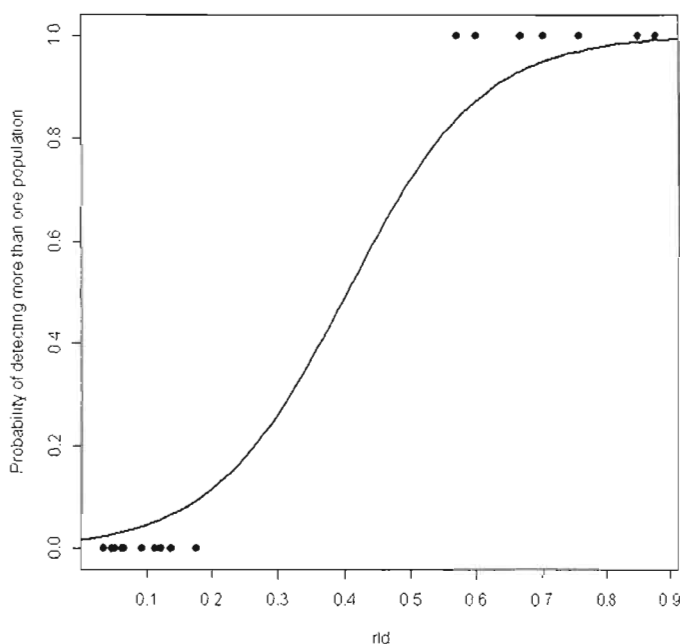


Figure 12 Effect of r_{LD} between two syntenic loci on the overestimation of the number of populations, using the software STRUCTURE and data from the Haute Island population. The model was run using a bias-robust logistic regression (for more information see text) including r_{LD} , number of alleles per locus and their interaction. Only r_{LD} had a significant effect ($\chi^2 = 18.5852$, $P < 0.0001$), and the interaction and the number of alleles per locus were not significant ($\chi^2 = 0.0004$, $P = 0.984$ and $\chi^2 = 0.0015$, $P = 0.9689$, respectively). Number of pairs of syntenous loci = 18.

Rosenberg et al. (2001) found that increasing the number of loci could improve their clustering results (but see Lecis et al. 2006). In our study, analyses using two loci differing in r_{LD} generated different numbers of clusters. This suggests that the strength of the r_{LD} rather than the low number of loci used is responsible for the biased clustering.

Moreover, when we used the 22 pairs of loci or only portions of our data set our results indicate that the presence of pairs of loci in strong LD within a sample can generate spurious results (Table 9; comparison of the whole 22 loci vs the non syntenous loci or loci with large distances), suggesting that STRUCTURE could be sensitive to even a rare pair of loci in strong LD. Our study could not detect an effect of the number of alleles in a pair of loci on the probability of detecting clusters. It should be noted, however, that the allelic diversity in the mouflon population is low and that a higher allelic diversity may have stronger effect.

Our results also indicate that other LD does not bias the clustering results. LD between unlinked loci following a founder event (Lynch and Walsh 1998) could be confounded with “mixture” or “admixture” LD (Falush et al. 2003). This could be the case on Haute Island. The population was founded by only two individuals, and some pairs of non syntenous loci showed stronger LD values than pairs of syntenous loci separated by a large distance. Linkage disequilibrium obtained from non syntenous loci or from syntenous loci separated by a large distance, however, did not seem strong enough to generate spurious clustering results (see Table 9).

Based on a human study Pritchard & Wen (2004) advised users against using loci separated by less than 1cM. However, in our study, all the loci that were separated by less than 3 cM were characterised by a r_{LD} higher than 0.55 and generated a clustering bias. Furthermore, the selection of loci based on map distance may not be the most efficient approach. First, the strength of LD is not always correlated to physical distance between loci (Jorde 1994, 2000; Jorde et al. 1995). Second genomic maps are still lacking for many species, and the distance between loci is available only for a few species. Finally, the distance per se is not responsible for the clustering, but it affects the strength of the linkage that in turn biases the estimation of the number of clusters. LD not only depends on the distance between two loci, but can also be increased by founder events or be decreased by population dynamics (Slatkin 1994) or number of allele at a given loci (Ott & Rabinowitz 1997). For all these reasons, we recommend researchers to rely on the r_{LD} to take their decision of using or not using a given pair of loci before running STRUCTURE.

We hope our results will convince researchers that a good knowledge of the LD between loci is an important step before starting analyses in STRUCTURE. As already mentioned by Manel et al. (2005) and Waples & Gaggioti (2006), and despite recommendations made by Pritchard et al. (2000) and Falush et al. (2003), some authors did not seem to consider LD as a potential issue in the study of population genetic structure. For example, some authors do not report any measure of LD between loci used in STRUCTURE (Kusumo et al. 2006). Others used some pairs of closely linked loci (i.e. about 3 cM in Verardi et al. 2006; > 0.5 cM in Lecis et al. 2006). We do not intend to say that these studies are biased. Results from Lecis et al. (2006), for instance, seem consistent to their expectations and the uses of very closely linked loci did not seem to affect their results, potentially because a short distance between two loci may not automatically translate into a strong LD (Peterson et al. 1995).

To conclude, our empirical study demonstrates how a strong background linkage disequilibrium can lead STRUCTURE to overestimate the number of clusters on a population genetic structure analysis. Therefore, rather than only simply testing for the presence of LD, studies using STRUCTURE should first estimate the r_{LD} between all the pairs of loci prior to running clustering analyses. This would permit to exclude pairs of loci that could potentially bias the clustering results. For example, in the presence of r_{LD} higher than 0.5 in a sample, one should run two analyses with and without loci with strong r_{LD} and compare the number of clusters detected by STRUCTURE. A different number of clusters may suggest a bias caused by background LD.

II.6 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank P. Boussès, J.L. Chapuis, T. Micol (TAAF), B. Tollu, the Amical des Missions Australes et Polaires Françaises and all field workers who collected mouflon samples and data, A. Krupa and A. Llewellyn for their help with molecular analyses. This work was supported by the Institut Polaire Français Paul-Emile Victor and the Centre National de la Recherche Scientifique to D. Pontier, the Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canadian Foundation for Innovation to D. Réale, and the Royal Society to D. Coltman. We thank R.A. Nichols and two anonymous reviewers for their comments.

II.7 BIBLIOGRAPHY

- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Meth* **57**: 289-300.
- Berry O, Tocher MD, Sarre SD (2004) Can assignment tests measure dispersal? *Mol Ecol* **13** : 551-561.
- Boussès P, Réale D (1996) Syndrome d'insularité dans une population récente de mouflon (*Ovis musimon*) des îles Kerguelen. *Vie Milieu* **46**: 285-290.
- Coltman DW, Pilkington JG, Pemberton JM (2003) Fine-scale genetic structure in a free-living ungulate population. *Mol Ecol* **12**, 733-742.
- Coulon A, Guillot G, Cosson JF, *et al.* (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: Empirical evidence from a roe deer population. *Mol Ecol* **15**, 1669-1679.
- Chapuis JL, Boussès P, Barnaud G (1994) Alien mammals, impact and management in the French Subantarctic islands. *Biol Cons* **67**: 97-104.
- Dubois M, Khazraie K, Guilhem C, Maublanc ML, LePendu Y (1995) Philopatry in mouflon rams during the rutting season: Psycho-ethological determinism and functional consequences. *Behav Processes* **35**: 93-100.
- Dubois M, Quenette PY, Bideau E, Magnac MP (1993) Seasonal Range Use By European Mouflon Rams In Medium Altitude Mountains. *Acta Theriol* **38**: 185-198.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* **14**: 2611-2620.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567-1587.
- Firth D (1993) Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika* **80**: 27-38.
- Garniergere P, Dillmann C (1992) A Computer-Program for Testing Pairwise Linkage Disequilibria in Subdivided Populations. *J Hered* **83**: 239-239.
- Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005a) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* **170**, 1261-1280.

- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005b) GENELAND: A computer package for landscape genetics. *Mol Ecol Notes* **5**, 712-715.
- Heinze G, Schemper M (2002) A solution to the problem of separation in logistic regression. *Stat Med* **21** : 2409-2419.
- Hill WG, Robertson A (1968) Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet* **38**: 226-231.
- Jorde LB (1995) Linkage Disequilibrium as a Gene-Mapping Tool. *Am J Hum Genet* **56**: 11-14.
- Jorde LB (2000) Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res* **10**: 1435-1444.
- Jorde LB, Watkins WS, Carlson M, Groden J, Albertsen H, Thliveris A *et al.* (1994) Linkage Disequilibrium Predicts Physical Distance in the Adenomatous Polyposis-Coli Region. *Am J Hum Genet* **54**: 884-898.
- Kaeuffer R, Coltman DW, Chapuis JL, Pontier D, Réale D (2007) Unexpected heterozygosity in an island mouflon population founded by a single pair of individuals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **274**, 527-533.
- Kusumo HT, Pfister CA, Wootton JT (2006) Small-scale genetic structure in the sea palm *Postelsia palmaeformis* Ruprecht (Phaeophyceae). *Mar Biol* **149**: 731-742.
- Lecis R, Pierpaoli M, Biro ZS, Szemethy L, Ragni B, Vercillo F *et al.*(2006) Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci. *Mol Ecol* **15** : 119-131.
- Lynch M, Walsh B (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits* Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, Hulme DJ, Vaiman D, Cribiu EP *et al.* (2001) An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res* **11**: 1275-1289.
- Manel S, Gaggiotti OE, Waples RS (2005) Assignment methods: matching biological questions techniques with appropriate. *Trends Ecol Evol* **20** : 136-142.
- Martins AG, Netto NT, Aulagnier S, Borges A, Dubois M, Vincente L *et al.* (2002) Population subdivision among mouflon sheep (*Ovis gmelini*) ewes and ranging behaviour of rams during the rut. *J Zool* **258**: 27-37.

- Ott J, Rabinowitz D (1997) The effect of marker heterozygosity on the power to detect linkage disequilibrium. *Genetics* **147**: 927-930.
- Peltonen L (2000) Positional cloning of disease genes: Advantages of genetic isolates. *Hum Hered* **50**: 66-75.
- Peterson AC, Dirienzo A, Lehesjoki AE, Delachapelle A, Slatkin M, Freimer NB (1995) The Distribution of Linkage Disequilibrium over Anonymous Genome Regions. *Hum Mol Genet* **4**: 887-894.
- Petit E, Aulagnier S, Bon R, Dubois M, Crouau-Roy B (1997) Genetic structure of population of the mediterranean mouflon (*Ovis gmelini*). *J Mammal* **78**: 459-567.
- Ploner M, Dunkler D, Southworth H, Heinze G (2005) logistf: Firth's bias reduced logistic regression. R package version 1.03
<http://www.meduniwien.ac.at/msi/biometrie/programme/fl/index.html>
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Pritchard, JK & Wen, W 2004 *Documentation for the STRUCTURE software Version 2*. Chicago. http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure2_1.html
- Puffenberger EG, Kauffman ER, Bolk S, Matise TC, Washington SS, Angrist M *et al.* (1994) Identity-by-Descent and Association Mapping of a Recessive Gene for Hirschsprung Disease on Human-Chromosome 13q22. *Hum Mol Genet* **3**: 1217-1225.
- R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered* **86**: 248-249.
- Rosenberg NA, Burke T, Elo K, Feldmann MW, Freidlin PJ, Groenen MAM *et al.* (2001) Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics* **159** : 699-713.
- Slatkin M (1994) Linkage Disequilibrium in Growing and Stable-Populations. *Genetics* **137**: 331-336.

Venables WN, Ripley BD (2002) *Modern Applied Statistics with S*, Fourth edn. Springer, New York.

Verardi A, Lucchini V, Randi E (2006) Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Mol Ecol* **15** : 2845-2855.

Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol* **15**: 1419-1439.

*CHAPITRE III EFFETS DE LA DYNAMIQUE CYCLIQUE ET DU
SYSTÈME DE REPRODUCTION SUR LA TAILLE EFFICACE D'UNE
POPULATION INSULAIRE DE MOUFLONS*

The effects of cyclic dynamics and mating system on the effective size of an island mouflon population

Renaud Kaeuffer^{1,2*}, David W. Coltman³, Jean-Louis Chapuis⁴, Denis Réale¹ & Dominique Pontier²

¹ *Canada Research Chair in Behavioural Ecology and GRÉCA, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, CP 8888 succursale centre-ville, Montréal, Québec H3B 3P8, Canada*

² *Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR-CNRS 5558, Université de Lyon, Université Lyon I, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France*

³ *Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, T6G 2E9, AB Canada*

⁴ *Département Écologie et Gestion de la Biodiversité, UMR 5173 MNHN-CNRS-P6, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP 53, 61 rue Buffon, 75005 Paris, France*

Sous presse dans Molecular Ecology

III.1 RÉSUMÉ

La taille efficace (N_e) d'une population représente le nombre d'individus qui contribuent réellement à la dynamique des gènes d'une population (Caballero 1994). Des méthodes génétiques temporelles permettent de l'estimer à partir de la variance du changement des fréquences entre deux instants (Waples 1989, Berthier et al. 2002). Ces mesures génétiques sont une mesure de la dérive observée entre deux instants, mais n'apportent aucune information sur les phénomènes qui génère N_e . Pour essayer de comprendre quels paramètres influencent la dérive, l'approche démographique est nécessaire. A partir de l'information démographique mesurée dans la population étudiée, il est possible d'estimer la perte de diversité génétique attendue (Hill 1972, 1979, Nunney 1991, 1993). Les estimations démographique et génétique de N_e peuvent donc différer et l'interprétation de ces différences permet de comprendre le fonctionnement de la population (Leberg 2005, Nunney & Elam 1994). Malgré l'importance de comparer les deux estimations de taille efficace, peu d'études sur le sujet ont été réalisées du fait de la difficulté d'obtenir des informations génétiques et démographiques sur une même population.

N_e est directement liée à la taille de la population mais aussi au système reproducteur de l'espèce étudiée. Dans les populations dont la taille fluctue au cours du temps, N_e devrait être réduite par rapport à une population de taille moyenne identique mais stable. D'autre part, N_e diminue dans une population dont le système de reproduction favorise une large variance dans le succès reproducteur intra ou inter-sexuel (Falconer & Mackay 1996). Ces deux effets sur la taille efficace sont connus et ont largement été étudiés. Kaeuffer et al. (2004) ont par exemple montré de quelle manière N_e diminuait suite aux effets du système de reproduction, dans deux populations de chats. Vucetich et al. (1997) et Kalinowski & Waples (2002) ont montré l'influence des fluctuations de la taille de la population sur N_e . Coltman et al. (1999), en revanche, ont proposé que les effets conjoints d'un système de reproduction polygyne et d'une dynamique cyclique pouvait limiter la dérive génétique et augmenter N_e . En effet, durant les phases de faible densité, la hiérarchie de dominance chez les mâles pourrait être moins rigide et permettre aux jeunes mâles de se reproduire. Malgré cette suggestion, et

du fait d'un manque d'informations sur la population étudiée, Coltman et al. (1999) n'ont pu démontrer cette hypothèse.

Dans ce chapitre nous avons étudié la taille efficace de la population de mouflons de l'île Haute. Nous avons d'abord utilisé une approche génétique temporelle qui nous a informés sur la taille efficace observée, sans tenir compte des différents paramètres qui peuvent l'affecter. Puis, nous avons utilisé une approche démographique qui nous a permis de décomposer les effets attendus des variations de la taille de la population et de la sexe-ratio sur N_e . Enfin, grâce à des simulations, nous avons comparé l'estimation génétique de N_e avec la valeur attendue sous différents types de systèmes de reproduction.

A partir de ces différentes approches, nous avons montré que la taille efficace était importante malgré la démographie fluctuante et le système de reproduction de promiscuité du mouflon. L'hypothèse proposée par Coltman et al. (1999) est confirmée : la dynamique fluctuante de la population permet le maintien de N_e car, à faible densité, les jeunes mâles ont plus d'opportunités de reproduction, ce qui limiterait la variance du succès reproducteur des mâles. A l'aide du logiciel de simulation que nous avons développé (Cf. Annexe 1), nous avons estimé le changement de la fréquence des allèles sous différents systèmes de reproduction (reproduction aléatoire ou polygyne, avec une proportion de mâles reproducteurs variant de 20 à 80%) et pour un temps de génération variant entre 3 et 5 ans. Grâce aux simulations nous avons montré que le changement de fréquence des allèles et donc N_e observée dans la population de l'île Haute correspondait à un système de reproduction aléatoire ou faiblement polygyne dans lequel 80% des mâles se reproduiraient.

Ces résultats apportent des nouvelles informations sur les mécanismes permettant le maintien de la diversité génétique dans la population de mouflons de l'île Haute, en plus de la sélection suggérée dans le chapitre 1.

III.2 INTRODUCTION

Effective population size (N_e), the size of an ideal population that would have the same rate of loss of genetic diversity as the studied population, is a measure largely used to quantify the loss of genetic diversity. “Ideal” here includes several features, such as random mating, balanced sex ratio, non-overlapping generations and an equal probability for all adults to contribute offspring to the next generation (Wright 1931, 1938, Kimura and Crow 1963, Caballero 1994). A small effective population size predicts a rapid loss of genetic diversity caused by genetic drift (Frankham et al. 2002). This loss is assumed to increase the genetic load, limit the evolutionary potential, and increase the risk of population extinction (Newman & Pilson 1997, Spielman et al. 2004).

Because N_e is strongly related to population size, the dynamics of the population is known to have a strong influence on N_e . For example, N_e is generally lower in fluctuating populations than in stable populations (Vucetich et al. 1997, Wright 1938). The mating system also strongly affects the dynamics of genetic diversity (Caballero 1994, Nunney 1991, 1993, Wright 1938); N_e should be lower for populations characterised by a large variance in reproductive success among individuals (i.e. promiscuous or polygynous populations) than for populations with a low inter-individual variance in reproductive success (i.e. monogamous populations).

The effects of population dynamics and size (Montgomery et al. 2000, Motro & Thomson 1982, Nei et al. 1975, Vucetich et al. 1997), or mating system (Kaeuffer et al. 2004, Matocq 2004) on N_e have largely been investigated separately, and their combined impact on N_e is not well understood and difficult to predict. For example, in Soay sheep on St. Kilda, a population characterised by a polygynous mating system and by fluctuating population density, when density is low or the sex ratio strongly biased in favour of females the decrease in inter-male reproductive competition allows juvenile males to achieve reproductive success (Pemberton et al. 1996, 1999). Coltman et al. (1999) suggested that this situation would reduce the between-male variance in reproductive success, which in turn would limit the potential negative impact of mating system and population fluctuation on N_e .

Here we use the well-documented history of an insular population, the Kerguelen mouflon (*Ovis aries*) population, to investigate the combined effect of mating system and population dynamics on N_e . In 1957, one male and one female mouflon lambs were introduced on a small island of the Kerguelen archipelago (Southern Indian Ocean, Chapuis et al. 1994). The two individuals started reproducing one year after their introduction, and the population grew rapidly during the subsequent 20 years. After reaching a size of 700 individuals the population entered a cycling phase, with fluctuations of large amplitude and frequent winter crashes affecting males more than females (Boussès et al. 1994, Chapuis et al. 1994). Given the cyclic demography of the population, the mating system of mouflons, and the highly female-biased sex ratio following winter crashes, we expected a small N_e , and thus, a high risk of extinction. Forty-six years after its introduction, however, the Kerguelen mouflon population persists with several hundred individuals.

In this paper, we compare estimates of effective population size obtained with different demographic and genetic models of the Kerguelen mouflon population. The estimation of N_e based on demographic information (i.e., population size, sex-ratio) allowed us to estimate the expected loss of genetic diversity given the demographic parameters observed (Caballerro 1994). The genetic approach uses information on changes in allele frequencies to estimate the rate of drift in the population (Waples 1989). This method reflects the observed effective size of the population, but does not provide insight into the causal factors underlying a particular value of N_e . By combining both methods, one can determine which factors are central to the dynamics of the genetic diversity of a given population. To understand the combined effects of population dynamics and mating system on N_e in the Kerguelen mouflon population, we use an individual-based simulation approach under a neutral genetic model (assuming no selection, no mutation, and no population structure).

III.3 MATERIAL AND METHODS

III.3.1 Study population

The population is located on Haute Island, a small island (6.5 km²) of the Kerguelen archipelago. Kerguelen is a very remote Subantarctic archipelago located in the Southern Indian Ocean (49°20' S, 70°20' E). The climate is Subantarctic, with high precipitation, strong winds and average temperature ranging from 2°C during the winter to 8°C during summer. Rocky landscapes dominate Haute Island, with sparse vegetation cover (about 40%) composed of a few endemic species (i.e. *Azorella selago*, *Agrostis magellanica*) and introduced forage species (i.e. *Poa annua* and *Dactylis glomerata* Chapuis et al. 1994).

The two founder individuals that arrived in 1957 originated from the Vincennes Zoo (Paris, France). The population reached 100 individuals at the beginning of the 1970s. The population then grew exponentially, reaching about 700 individuals in 1977, which corresponds to a density of 100 individuals per ha. Since then the population has been characterised by cyclical dynamics, fluctuating between 250 and 650 individuals, with winter crashes occurring at a periodicity of 3-5 years (Chapuis et al. 1994) (Fig.13). Winter crashes occurred after the population exceeded about 650 individuals. Males are affected by a crash more strongly than females because of the strong reproductive effort related to inter-male competition that occurs during the rut, just before winter (Boussès et al. 1994). This situation is similar to the Soay Sheep population, where the effect of population dynamics on individual reproductive success is well known (i.e. Pemberton et al. 1999, Coltman et al. 1999).

Three monthly surveys of the population were performed along a standard transect between 1989 and 1995. We used surveys done during the austral summer (a period of low mortality and that follows the births season) to estimate the number of mouflon in each sex and age class (i.e., three categories: lambs, yearlings and adults ≥ 2 years). The sex ratio (number of adult males / number of adults) was always female biased and varied from 0.02 to 0.37 from year to year (Table 11; Boussès et al. 1994; Réale 1996).

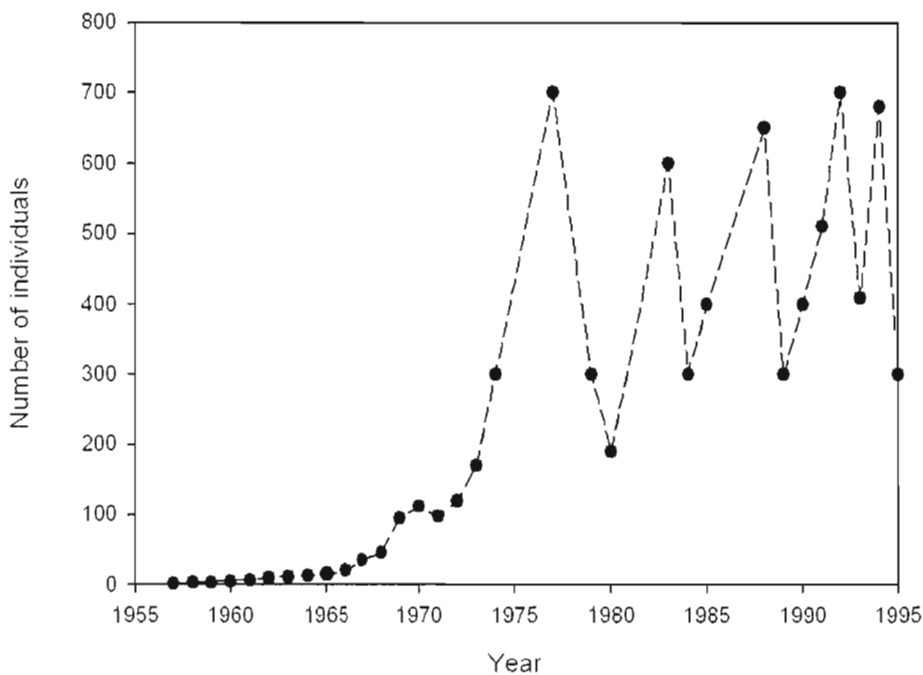


Figure 13 Number of individuals estimated for the Kerguelen mouflon population.

III.3.2 Genetic analysis

Seven lambs (5 male; 2 females), eight yearlings (4 males; 4 females) and 47 adults (31 males and 16 females; total = 62 individuals) were shot in 1988. Eight lambs (1 male; 4 females, 3 undetermined), eleven yearlings (six males; 5 females) and 39 adults (26 males and 13 females; total = 58 individuals) were shot in 2003. Tissue samples (i.e. ear punch) were collected on all the bodies and stored in 95% ethanol and DNA extraction was performed with the Qlamp tissue extraction mini kit (Quiagen Inc., Mississauga Ontario), following the instructions provided with the kits.

Genotypes were determined at 25 microsatellite loci amplified by polymerase chain reaction (PCR): ARO28, HEL10, MCM64, MCM152, BM3413, BM848, HUI177, MAF64, MCM527, TGLA13, Ilts059, TGLA176, RT1, AGLA226, Il2ra, MCM218, NRAMP, OarCP49, TEXAN4, DRBps, INRA26, oMHC1, TGLA387, CSSM022 and MAF33. PCR reactions were then carried out in 10 μ L reaction mixtures containing 0.8 μ L of dNTPs (2 mM each), 0.2-0.4 μ L of MgCl₂ (50mM), 0.08 μ L of forward and reverse

primers (20 μM), 1 μL of 10x buffer, 0.1 μL of BSA (30 mg/ml), 0.05 U/ μL *Taq* polymerase (Bioline), and 1 μL of the DNA extract (10 ng/ μL) . The thermal profile consisted of an initial DNA denaturation of 3 min at 95°C, followed by 44 cycles of 30 s DNA denaturation at 94°C, 30 s primer annealing at 49–62°C, and 30 s DNA extension at 72° C. To conclude PCR, the temperature was then increased to 72°C for 10 min, and then to 10°C during 10 min. For more detailed microsatellite primer information see Maddox et al. (2001) and <http://www.thearkdb.org/>. PCR products were visualized on an automated sequencer (ABI 3730, Applied Biosystems) and analysed using the software GENEMAPPER (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For each locus, we tested for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium by exact tests (Guo & Thompson 1992) using GENEPOP software (Raymond & Rousset 1995). A sequential Bonferroni correction for multiple tests was applied (Rice 1989). We also estimated F_{is} (Weir and Cockerham 1984) using GENEPOP, and the observed and expected heterozygosity using GENETIX software (Belkhir et al. 2000). Deviation from Hardy Weinberg equilibrium and a large F_{is} can indicate the presence of null alleles. Furthermore, to assess the reliability of our genotyping all of the samples were genotyped twice for 15 randomly chosen loci.

III.3.3 Effective population size

○ Demographic method

Detailed life history information from individuals (e.g. annual reproductive success for each sex) was not available in the Kerguelen population. However, based on the number of individuals in each sex and age class obtained from the monthly surveys over the period 1989-1995, we estimated annual values of reproductive effective population size following the formulae:

$$Ne_t = \frac{4NmNf}{Nm + Nf} \quad (1),$$

(Falconer and Mackay 1996) where N_{e_t} is the effective population size at year t and N_m and N_f are the number of adult males and females, respectively. We then estimated the demographic effective population size N_e as the harmonic mean of N_{e_t} values (e.g. Hartl & Clark 1997). Following Kalinowski and Waples (2002), we estimated the cumulative effect of the unbalanced sex ratio on the Kerguelen mouflon effective population size between 1989 to 1995 by calculating α_A , the ratio of our estimate of N_e to N_{Harm} , the harmonic mean adult population size. We also estimated the effect of population fluctuations on effective population size by calculating ϕ_A , the ratio of N_{Harm} on N_{Arit} , the arithmetic mean population size. Finally, we estimated the combined effect of an unbalanced sex ratio and of population fluctuation on the reduction of effective population size, by calculating the ratio $\beta_A = N_e / N_{Arit}$. In contrast with other wild ovid populations (Bon et al. 1992; Coltman et al. 2002), yearlings appeared to be involved in reproduction in the Haute Island population (Réale 1996; Boussès and Réale 1998). Thus we also provide estimates of α_Y , ϕ_Y and β_Y including yearlings. Although our estimation covers only a period of 7 years, Kalinowski and Waples (2002) have shown that α , ϕ and β can quickly reach an asymptotic value and can be representative of a long-term effective population size when the sampling period is representative of the dynamics of the population.

○ Genetic methods

N_e was estimated from the change in allele frequencies between 1988 and 2003 using Waples' (1989) moment estimator method and two recent temporal likelihood estimators proposed by Berthier et al. (2002) and by Wang (2001). For each of these three methods we used the allele frequencies measured at the 25 microsatellite loci.

Waples' (1989) method is based on changes in allele frequencies (e.g. F) between two samples separated by t generations. F is inversely proportional to effective population size (Caballero, 1994). We estimated the standardized variance of the change in allele frequencies F_k , for each locus using the equation given by Pollak (1993):

$$F_k = \frac{1}{K-1} \sum_{i=1}^K \frac{(x_i - y_i)^2}{\binom{x_i + y_i}{2}} \quad (2),$$

where K is the number of alleles, and i is the frequency of a given allele at times x and y , respectively. F_k was then averaged over all loci. Our samples were taken without replacement (see Waples 1989). Some individuals, however, could have reproduced before being sampled therefore the effective population size was estimated following Waples' (1989) equation (12):

$$N_e = \frac{t}{2[F_k - 1/(2S_0) - 1/(2S_t) + 1/N]} \quad (3),$$

where S_0 and S_t are sample sizes at time 0 and t , respectively, N is total number of individuals in the population at time t and t is the number of generations between the two samples. Ninety five percent confidence intervals were estimated following Waples (1989).

Temporal methods generally assume discrete generations (Waples 1989). When applied to species with overlapping generations these methods could bias estimates of N_e especially in the case of sampling bias towards a specific age class or cohort (Jorde & Ryman 1995; Hauser et al. 2002). A method using demographic information such as age-specific survival and birth rate from each cohort has been therefore proposed by Jorde and Ryman (1995). In the absence of appropriate demographic information we could not use this method. The large (> 4) number of generations between our two samples should limit the potential bias caused by overlapping generations (see Hauser et al. 2002, Miller & Kapuscinski 1997; Waples and Yokota 2007).

Wang's (2001) method is based on the idea that N_e can be estimated by maximum-likelihood, given the allelic frequencies observed at different times (Williamson and Slatkin, 1999). Wang's method performs similarly to Williamson & Slatkin's model (1999), although with less computation (i.e. MLNE software; Wang, 2001). Wang's method requires a fixed maximum N_e value. We fixed this value to 1000 individuals.

The estimator proposed by Berthier et al. (2002) uses the genealogical information rather than the change in gene frequencies. This method includes a Bayesian prior of the maximum N_e of the population (i.e. TM3 software; Berthier et al. 2002) which computes the maximum likelihood value as well as the 5% and 95% quantiles of the posterior distribution of N_e . We fixed the prior to 1000 individuals, and 50 000 replicates were made for each generation time.

The two likelihood methods (i.e. Berthier 2002 and Wang 2001) are expected to give more precise results (i.e., smallest C.I.) than Waples' method (Berthier 2002; Tallmon 2004; Wang 2001, but see Kaeuffer et al. 2004, Poulsen et al. 2006). However, in contrast to Waples' method (Waples 1989 and see above, equation 3), both Wang's and Berthier's methods do not incorporate a correction in sampling caused by individuals who reproduced before being sampled (for more general discussion see also Waples and Yokota 2007).

A central parameter in the three genetic methods is the number of generations between samples. Number of generations was estimated as the number of years between the two samples divided by the average generation time. In ovids, the age of each individual can be estimated precisely for males by using the number of horn segments (Geist 1971), and can be approximated for females by using the number and wear of definite incisors (Boussès & Réale 1994). In European populations mouflon life span can reach up to 13 years (Bon et al. 1992), and therefore a generation time of about 5 years is generally expected for this species. However, on Haute Island, only five males out of 388 exceeded the age of 5 years between 1993 and 1995, a period of intensive study of the population. Lamb males have been observed involved in the rutting groups (D. Réale pers. obs.), and a significant portion of females could get fertilized at 18 months of age (Boussès & Réale 1998). In the absence of precise information on the average age at reproduction we therefore used three different plausible values of generation time (2, 3 and 4 years).

III.3.4 Simulation

The individual-based approach simulated the demography and the genealogy of a population characterised by demographic parameters similar to those observed in the Kerguelen mouflon population. We considered the following parameters: mating system, female fecundity, variance in fecundity among females, juvenile mortality rate, adult life span, carrying capacity and mortality rate during a population crash as soon as the population size exceeds the carrying capacity of the environment (see below). The model considered a diploid population similar to the Kerguelen population, with an initial size of two (the founder individuals) at the initial time $t=0$, and no selection, mutation, or population structure. The genotypes of the two founder individuals (one male and one female) were constructed using the number of alleles (from 2 to 4) observed at each of the genotyped loci (see above). At each new generation individuals were randomly paired to produce offspring. The genotype of each individual was constructed by randomly selecting one allele at each of the 25 loci from each of the two parents. The gender of an individual was randomly assigned at birth, with a 0.5 probability for each sex.

Mouflons have a promiscuous mating system (Bon et al. 1992), but we do not know the proportion of males involved in mating on Haute Island. On one hand, competition might be restricted and mating could be considered as random. On the other hand, strong competition between males may limit the access to oestrus females to only a few males. We therefore investigated the effect of random and polygynous mating systems on the estimation of N_e . In the random mating system all individuals reproduced, and males and females were paired randomly. In the polygynous mating system, each year only a limited number of randomly chosen males reproduced with several females each, and all females reproduced. For the polygynous mating system, we used three different categories of proportions of males involved in mating (80, 50 and 20%). In our simulations, reproducers were randomly chosen from the entire male (age ≥ 1) population. Thus a given male could reproduce in two successive years just by chance. This mechanism could limit the variance in male lifetime reproductive success, especially in a polygynous mating system, and limit the decrease in N_e (Nunney 1993). Female fecundity was fixed to 1.1 (SD = 0.7), and was estimated from the number of embryos

per female counted in 69 culled females during winter 1994 (unpublished results). Based on demographic data (see Fig. 13; Boussès et al. 1994) we fixed the carrying capacity to 600 and the mortality rate during a crash to 70%.

To avoid adding too much complexity to the models and confounding factors in our results we simulated populations with equivalent mortality rates in both sexes. This reduced the bias in sex-ratio in favour of females in the population. Given that biased sex ratio plays a strong role on N_e (Nunney 1993) our simulated effective population size should be overestimated. The average adult life span estimated in the population is about 3.5 (median: 3; using the average age of adult carcasses found on the ground between 1993 and 1995; $N = 412$). To ensure that we did not underestimate life span we used values of life span ranging from 3 to 5 years. We simulated populations with different combinations of life span and juvenile mortality rate (0.25 to 0.45) to explore the potential effects of these parameters on N_e . We selected these demographic parameters to mimic the demography observed in the population (i.e. maximum population size, number of peaks and crashes). Each simulation was run for a period of 47 years. Sixty individuals ($\text{age} \geq 1$) were randomly chosen at years 32 and 47, to mimic the two samples collected in 1988 and 2003. From the genotypic information of the individuals sampled from the simulated populations, we calculated the variance of the change in allelic frequencies between the first and the second samples following Pollak (1983; see above). For each combination of demographic parameters (i.e., life span, juvenile mortality, and mating system), 1000 replicates were run to calculate the average value of the variance of the change in allelic frequencies. We then calculated N_e using Waples' (1989) method.

We investigated the effect of initial heterozygosity on N_e by using either completely heterozygous ($H = 1$) founder individuals or the minimally heterozygous founder individuals, given the number of alleles per gene measured ($H = 0.22$) on Haute Island at the origin. Results using both scenarios were very similar, and only the scenario with $H = 1$ is shown here.

III.4 RESULTS

Observed heterozygosity ranged from 0.18 to 0.73 (Table 10) and allelic diversity was low (2 to 4 alleles). Only one locus (MCM64) nominally departed from Hardy-Weinberg equilibrium. After corrections for multiple tests, however, the observed heterozygosity did not differ significantly from that expected under Hardy-Weinberg assumptions. F_{is} ranged between -0.101 and 0.181. The error rate observed during replicate genotyping of 15 loci was approximately 2-3% per genotype.

Table 10 Number of alleles per locus, Expected (H_{exp}) and observed (H_o) heterozygosity, F_{is} and probability of departure (P) from Hardy-Weinberg equilibrium estimated for each locus.

<i>Loci</i>	<i>No. of alleles</i>	H_{exp}	H_o	P	F_{is}
ARO28	2	0.36	0.31	0.2095	+0.127
HEL10	3	0.57	0.60	0.8141	-0.065
MCM64	3	0.64	0.57	0.0367	+0.105
MCM152	2	0.49	0.48	0.8511	+0.025
BM3413	2	0.49	0.47	0.6986	+0.046
BM848	2	0.44	0.42	0.6707	+0.056
HUJ177	2	0.47	0.38	0.0740	+0.181
MAF64	2	0.18	0.18	1	-0.015
MCM527	2	0.38	0.39	1	-0.021
TGLA13	4	0.67	0.72	0.0540	-0.049
Ilst059	2	0.42	0.39	0.4961	+0.082
TGLA176	3	0.62	0.64	0.6097	-0.029
RT1	2	0.19	0.19	0.6271	+0.053
AGLA226	3	0.65	0.60	0.2021	+0.087
Il2ra	2	0.48	0.48	1	+0.006
MCM218	3	0.51	0.56	0.6473	-0.101
NRAMP	2	0.38	0.35	0.3111	+0.104
OarCP49	3	0.55	0.53	0.8968	+0.035
TEXAN4	2	0.39	0.34	0.1114	+0.149
DRBps	2	0.50	0.49	0.8536	+0.022
INRA26	2	0.22	0.23	1	-0.057
oMHC1	3	0.56	0.52	0.1593	+0.074
TGLA387	2	0.49	0.56	0.1765	-0.140
CSSM022	2	0.45	0.48	0.5266	-0.077
MAF33	4	0.72	0.71	0.8355	+0.019

The exponential growth of the Kerguelen mouflon population following its introduction allowed the effective population size to increase rapidly. Under the demographic conditions observed on Haute Island (i.e., biased sex ratio and fluctuating

population) we estimated a N_e of 58 individuals when adults only were considered and a N_e of 147 when we included yearlings (Table 11). The unbalanced sex ratio reduced the effective population size by 76 % ($\alpha_A = 0.24$). Population fluctuations reduced N_e by 10 % ($\varphi_A = 0.90$). When combined these two factors reduced N_e by 79 % ($\beta_A = 0.21$). When we included yearlings in the pool of reproductively active individuals the unbalanced sex ratio reduced the effective population size by 49% ($\alpha_y = 0.51$). Population fluctuation reduced the effective population size by 13% ($\varphi_y = 0.87$), and their combined effect led to a reduction of N_e by 55% ($\beta_y = 0.45$).

Table 11 Effective population size and N_e/N ratio estimated between 1989 and 1995 in the Haute Island mouflon population. $N_{e,t}$ is the effective population size at year t estimated as $N_{e,t} = 4 N_m N_f / N_t$, where N_m and N_f are the number of males and females respectively and $N_t = N_m + N_f$ at year t . α represents the factor of reduction of N_e caused by an unbalanced sex ratio, φ the factor of reduction of N_e caused by population fluctuations, and β the cumulative effects of an unbalanced sex ratio and fluctuating population size (Kalinowski and Waples 2002).

Year	Adults						Including Yearlings					
	N_m	N_f	N_t	N_m/N_t	$N_{e,t}$	$N_{e,t}/N_t$	N_m	N_f	N_t	N_m/N_t	$N_{e,t}$	$N_{e,t}/N_t$
1989	3	133	136	0.02	12	0.09	14	141	155	0.09	51	0.33
1990	60	181	242	0.25	181	0.75	67	196	263	0.25	200	0.76
1991	47	181	228	0.21	149	0.66	127	230	356	0.36	327	0.92
1992	156	263	419	0.37	392	0.94	222	309	531	0.42	517	0.97
1993	46	225	271	0.17	153	0.56	49	232	282	0.18	163	0.58
1994	60	277	338	0.18	198	0.59	139	314	453	0.31	386	0.85
1995	30	228	258	0.11	105	0.41	31	235	265	0.12	109	0.41
N_e	58						147					
$\alpha = N_e / N_{Harm}$	0.24						0.51					
$\varphi = N_{Harm} / N_{Arit}$	0.9						0.87					
$\beta = N_e / N_{Arit}$	0.21						0.45					

The standardized variance of the change in allelic frequencies used in the Waples's method is given in table 12. The three genetic methods produced similar estimates of N_e (Fig. 14) ranging from 104 to 250, but Waples' estimates were the lowest. This difference may be partly attributable to the correction factor of $1/N$ used in the Waples' method to account for reproduction of individuals before sampling. N_e decreased with the increase in generation time (Fig. 14). All estimates from genetic methods were lower than the demographic value. Waples genetic methods provided N_e/N ratios ranging from 0.32 to 0.77 ($N = 270$ is the total number of adults), depending on the generation time used (Table 13). Large confidence intervals were associated with each

estimate, especially the likelihood based estimators Berthier et al. (2002) and Wang (2001).

Simulations gave variance in allelic frequencies and N_e values consistent with the values of N_e estimated using the genetic methods. N_e declined with increasing generation time and increasing polygyny (Table 13). Increasing life span increased N_e . For a given number of generations N_e observed in the Kerguelen population appeared simulated populations with a random or a weak polygynous (i.e. 80% of males involved in reproduction) mating system.

Table 12 Microsatellite locus name, and standardized variance in allele frequency change (F_{ki}), in the Haute Island mouflon population. F_{ki} is the value for each individual locus and F_k represents the average value over all the loci, respectively. F_{ki} and F_k are calculated following Pollak (1983).

<i>Locus name</i>	F_{ki}
ARO28	0.1106
HEL10	0.0197
MCM64	0.0287
MCM152	0.0413
BM3413	0.0542
BM848	0.0727
HUJ177	0.0163
MAF64	0.0061
MCM527	0.0004
TGLA13	0.0299
Ilst059	0.0001
TGLA176	0.0046
RT1	0.0072
AGLA226	0.0622
Il2ra	0.0491
MCM218	0.0194
NRAMP	0.0522
OarCP49	0.0143
TEXAN4	0.0133
DRBps	0.1807
INRA26	0.0034
oMHC1	0.0585
TGLA387	0.0049
CSSM 022	0.0006
MAF33	0.0134
F_k	0.0332

Table 13 Variance in allelic change (F_k), N_e ratio estimated with Waples's method and 95 % CI, for genetic data collected in the Haute Island mouflon population and for simulated populations (F_k averaged over 1000 replicates \pm SE) using different combinations of mating system, generation times, life spans, and juvenile mortality rates. Polygyny represents the proportion of males in the population that reproduce during a mating season.

	<i>Mating system</i>	<i>Life span</i>	<i>Juvenile mortality rate</i>	F_k	N_e		
					<i>2 gen</i>	<i>3 gen</i>	<i>4 gen</i>
<i>Observed</i>	-	-	-	0.0332	208 (110-427)	138 (74-285)	104 (55-213)
<i>Simulated</i>	<i>Random mating</i>	3	0.25	0.0336 \pm 0.0004	194 (104-364)		
		4	0.35	0.0315 \pm 0.0002	218 (114-431)	146 (73-289)	
		5	0.45	0.0308 \pm 0.0003	227 (118-454)	151 (69-242)	113 (52-182)
	<i>Polygyny 0.8</i>	3	0.25	0.0362 \pm 0.0004	171 (94-306)		
		4	0.35	0.0333 \pm 0.0003	197 (106-374)	131 (70-249)	
		5	0.45	0.0323 \pm 0.0005	208 (110-400)	139 (73-269)	104 (55-201)
	<i>Polygyny 0.5</i>	3	0.25	0.0395 \pm 0.0007	146 (83-252)		
		4	0.35	0.0349 \pm 0.0005	182 (99-334)	121 (66-222)	
		5	0.45	0.0331 \pm 0.0005	199 (106-377)	132 (71-251)	100 (53-189)
<i>Polygyny 0.2</i>	3	0.25	0.0485 \pm 0.0008	110 (64-176)			
	4	0.35	0.0419 \pm 0.0004	136 (77-230)	90 (52-153)		
	5	0.45	0.0385 \pm 0.0005	155 (87-271)	103 (58-180)	77 (43-135)	

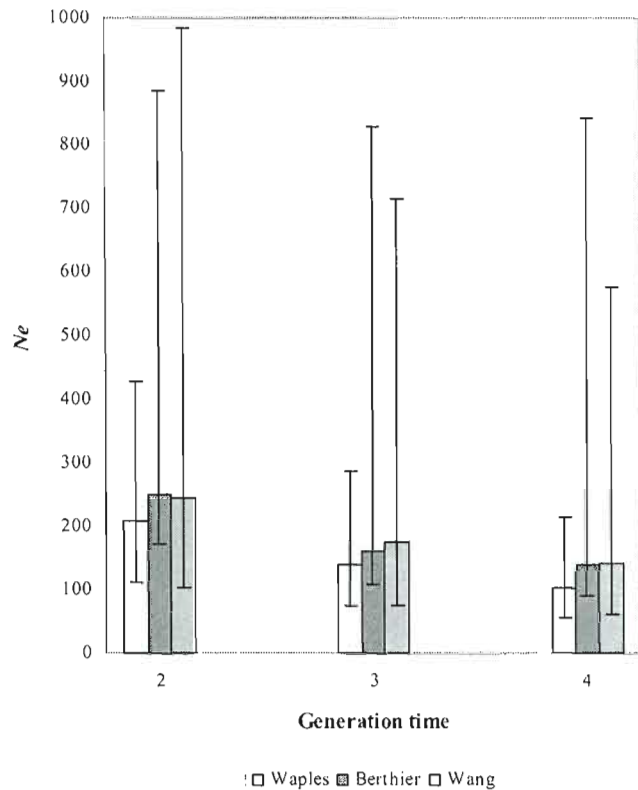


Figure 14 Effective population size and 95%CI measured for the Haute Island population using Waples' (1989), Berthier's et al. (2002) and Wang's (2001) methods for 3 generations times (2, 3 and 4 years).

III.5 DISCUSSION

The “observed” N_e (i.e., 104 to 250 individuals) measured with genetic methods were about two to three times higher than the “expected” N_e derived from demographic methods (i.e., 58 individuals; Fig. 14 and Table 11). Genotyping errors can generate spurious results in population genetic analyses (i.e. Chapuis & Esptoup, 2007, Pompanon et al. 2005). However, in our case it is unlikely that genotyping errors could have generated the difference between genetic and demographic estimates of N_e . We did not find evidence for departure from Hardy-Weinberg or large F_{is} that could indicate the presence of null alleles. Furthermore, analyses that use allele frequencies, such as the estimation of effective population size, are less sensitive to genotyping errors than analyses that use genotype information to identify individuals (Pompanon et al. 2005).

We also believe that genetic estimates of N_e based on the variance in allelic frequencies between temporal samples (Waples 1989) should be relatively robust to genotyping errors. This is because for a constant rate of genotyping errors at a given locus, errors should not substantially affect the change in allele frequency between samples. However greater typing errors in one of the samples (i.e. because of the lower quality of DNA in older samples) would increase the change in allelic frequencies between samples and therefore underestimate N_e .

Difference between genetic and demographics estimates could have been greater if we had been able to consider variance in the lifetime reproductive success of individuals caused by promiscuous mating system in the demographic method (Nunney 1993). Genetic estimates gave a high N_e/N ratio (0.38-0.77, Waples methods, N is the total number of adults; equivalent to β_A) despite the cyclic demography and the strongly female-biased sex ratio. Our lowest estimate of 0.38 could be explained by the fact that we overestimated the generation time: large values of generation time leads to a decrease in the number of generations between samples. The drift measured is thus distributed on a shorter period, leading to a smaller N_e . Using stable populations and the demographic method, Nunney (1991, 1993, 1995) predicted a theoretical value of N_e/N ratio close to 0.5. In contrast in his review on N_e/N , Frankham (1995) reported an average ratio of 0.11 in vertebrate species, including fluctuating populations. Our study shows that fluctuating population size reduces N_e estimate by only 10% ($\phi_A = 0.9$, Kalinowski and Waples 2002). This result may occur because minimum population sizes during the cyclic phase (see Fig. 13) were not small enough to create a real genetic bottleneck. Because the breeding season occurs before winter, many males may have transmitted their genes prior to the winter crash. Furthermore female survival and reproduction were not greatly affected by the crash (Boussès et al. 1996, Réale et al. 1999), and pregnant females could be considered as a reservoir of genetic diversity (Nunney 2002). These phenomena may have mitigated the loss of genetic diversity and therefore population dynamics could have a limited impact on the genetic estimates of N_e .

The interaction between mating system and population dynamics could have complex effects on N_e : the demographic composition of a population may influence the variance in reproductive success between individuals (Pemberton et al. 1996, Coltman et al. 1999, Kokko & Rankin 2006). As with other sheep species, the mouflon is characterised by a promiscuous mating system (Bon et al. 1992) with high male-male aggression leading to a biased reproductive success among males. Mature rams are expected to have greater reproductive success than yearlings and young adult males (Coltman et al. 2002, Bon et al. 1992) even though young males can efficiently fertilize females when old males are rare in the population (Bon et al. 1992). Such a mating system with a high variance in male reproductive success is expected to decrease N_e (Hill 1972, Nunney 1993, Falconer & MacKay 1996). In the Kerguelen mouflon population, males suffered higher mortality than females during a winter crash (Boussès et al. 1994), probably as a result of their high reproductive effort prior to winter (see Geist 1971, Festa-Bianchet 1987 for examples in bighorn sheep). This strong differential mortality between the sexes in the Kerguelen population created a strong bias in the secondary sex ratio. This type of pattern should increase the variance in reproductive success between the sexes, further reducing N_e (Falconer & MacKay 1996). Following the 1988 crash, the mouflon population declined from 650 to 300 individuals (Boussès et al. 1994). Only three males (1.3% of the population) older than two years of age survived the crash (Boussès et al. 1994). Assuming that the surviving adult males were the only males that contributed to reproduction the following breeding season, we estimated the effect of a biased sex ratio on the breeding effective population size using the formulae $N_e = (4NmNf)/(Nm+Nf)$ (Falconer & MacKay 1996). Based on the distribution of individuals per age and sex classes in 1989 (Boussès et al. 1994), we estimated that the breeder's effective population size would have been reduced by about 91% compared to a population with a balanced sex-ratio (Table 11). On a larger period, our study shows that the biased sex ratio should reduce the Kerguelen mouflon effective population size by 76 % ($\alpha_A = 0.24$). Combined with population fluctuations observed in the mouflon population, biased sex ratio should reduced N_e by 79 % ($\beta_A = 0.21$). However, after the inclusion of information on sex ratio and on population dynamics, N_e estimated with the demographic method still differed from the genetic estimates. The high genetic

estimation of N_e could therefore suggest that males less than 2 years old were involved in reproduction at low density population. Observations during the rutting periods of 1991 to 1994 supported the hypothesis that 6 month old lambs, yearlings and 2 year old males were behaviourally involved in reproduction on Haute Island (D.R. pers. obs.). These findings are supported by behavioural and paternity studies on other ovids that showed that yearling and sub-adult rams contribute to reproduction as soon as the competition between males decreases (Coltman et al. 1999, Stevenson & Bancroft 1995, Pemberton 1996). The mate guarding strategy primarily used by dominant male ovids, and the more efficient mate tactic in an aged-structured population (Hogg & Forbes 1997, Pelletier 2004), becomes inefficient with a highly female biased sex ratio (Clutton-Brock et al. 2004). Changes in demographic conditions favour mating tactics used by younger rams (i.e. “coursing”: fighting to gain access to a female or blocking: preventing a female to access a dominant male; Hogg & Forbes 1997) that are otherwise less efficient (Coltman et al. 2002, Hogg & Forbes 1997). Such an increase in the number of potential reproducing males after a crash would therefore limit the effects of the crash on N_e . When we included those yearlings in the number of potential reproducers, the demographic N_e went up to 147 individuals (Table 11). Including yearling and two-year-old rams that survived the 1988 winter crash and could reproduce in 1989 in our estimate of N_e , the sex ratio was less biased. N_e in 1989 was thus reduced by only 58%, and on average by 49 % on the whole study period ($\alpha_Y = 0.51$; Table 11). Adding young rams to the estimation did not affect the effect of population dynamics on the reduction in N_e ($\varphi_Y = 0.87$ vs $\varphi_A = 0.90$). However, the cumulative effect of population dynamics and biased sex ratio reduced N_e by only 55% ($\beta_Y = 0.45$) compared to the 79% observed when adults alone were used. The similarity between these demographic estimates of N_e and the genetic N_e suggests that yearlings were involved in the reproduction, and played a strong role in the dynamics of the genetic diversity in Kerguelen mouflon population.

To extend these results, we used a simulation approach that mimics the Kerguelen mouflon population. Our simulation results showed that the observed N_e/N ratio at Kerguelen is similar to a N_e/N ratio expected in a population under a random mating or with a slightly polygynous mating system (Table 13) (i.e. proportion of males that reproduce is > 0.5). About 50% of males may therefore be able to reproduce in the

Kerguelen population. The large range of life spans in the simulations allowed us to investigate the effect of overlapping generations on N_e . As predicted by Nunney (1993), the negative effect of high polygyny on N_e is dampened by a longer life span. In our simulated populations, where males breed at random, the increase in life span increases the chance that a male has to reproduce and therefore decreases the variance in lifetime reproductive success. One limitation of this simulation is caused by the large confidence interval observed for N_e estimations (for discussion see Waples 1989, Talmon et al. 2004).

The combination of population dynamics and mating system can, therefore, have more complex effects on the N_e than each factor considered separately. Our results support Kokko & Rankin's (2006) suggestion that population density plays an important role on mating strategies and their consequences on the dynamics of genetic diversity. Fluctuations in population structure and density can have a positive effect on N_e in a population characterised by a large variance in reproductive success between males, as exemplified in the Kerguelen mouflon population. Such a change in the variance in male reproductive success following demographic changes has been observed in similar conditions in the Soay sheep population (Coltman et al. 1999). Although they did not estimate N_e , Coltman et al. (1999) have suggested that under such conditions, the negative effect on N_e of polygynous mating system and population fluctuations could be minimized. Fluctuations in population density and structure may also affect N_e in other ways. For example population density affects birth sex ratio and sex-dependent mortality early in life in ungulates species (Clutton-Brock et al. 1982, Kruuk et al. 1999) but its effects on N_e have not yet been examined.

Fluctuation in operational sex ratio should decrease N_e in monogamous species, because it should increase the variance in reproductive success among individuals in the population (Nunney 1993). The impact on N_e in populations with a cyclical demography will differ between species as a result of different breeding phenologies (i.e. spring vs fall mating periods) or life cycles (Nunney 2002, Waples 2002).

Island populations are usually genetically depleted compared to mainland populations (Frankham 1997a, b). A high N_e/N would therefore limit drift and potential

for extinction (Newmann & Pilson 1997). In Ovids populations, dominant males generally monopolize the access to most oestrus females and sire a large proportion of the offspring produced each year (Coltman et al. 2002). Adult males generally prevent juvenile and young adult males from reproducing. Such a system is characterised by overt competition among males for access to oestrus females and sexual selection acts strongly on male fighting characteristics such as body or horn size (Coltman et al. 2002; Pelletier & Festa-Bianchet 2006). In the mouflon population, however, fluctuation in male age structure may have relaxed sexual selection pressures by allowing some males to contribute more than they could have done in a stable population. This decreased in selection pressures may therefore permit the maintenance of some deleterious alleles, which otherwise would have been eliminated (Whitlock 2000). From an evolutionary point of view, a small N_e illustrates increased risk of genetic drift and of inbreeding in a population (Newman & Pilson 1997), but is not always related to a lower evolutionary potential (McKay et al. 2001; Quader 2005). Ecological conditions favouring the reproduction of usual non-breeders will therefore increase N_e , but will also relax selection and drive the population characteristics away from the optimum (Eisen et al. 1973), at least on the short term.

III.6 ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Boussès, T. Micol (TAAF), B. Tollu, the Amicale des Missions Australes et Polaires Françaises and all field workers, A. Krupa and A. Llewellyn for their help with molecular analyses, O. Gingras for programming. This work was supported by the French Polar (IPEV) and the CNRS to J.-L. Chapuis and D. Pontier, the Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canadian Foundation for Innovation to D. Réale, and the Royal Society to D. Coltman. We thank S. Devillard, J.-M. Gaillard, C. Hall, K. Mathot, N. Perrin, R. Waples and two anonymous reviewers for their helpful comments.

III.7 BIBLIOGRAPHY

- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (2000) *GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université Montpellier II, Montpellier, France.
- Berthier P, Beaumont MA, Cornuet JM, Luikart G (2002) Likelihood-based estimation of the effective population size using temporal changes in allele frequencies: A genealogical approach. *Genetics* **160**, 741-751.
- Bon R, Gonzalez G, Bosch MD, Cugnasse JM (1992) Ram rut-involvement in a hunted population of mouflons. *Acta Theriologica* **37**, 63-71.
- Boussès P, Réale D (1994) Valeur du masque facial comme critère d'âge des femelles de mouflons de Corse (*Ovis musimon*) dans la population de Kerguelen. *Mammalia* **58**, 301-304.
- Boussès P, Réale D, JL Chapuis (1994) Mortalité hivernale massive dans la population de mouflons Corse (*Ovis musimon*) de l'archipel subantarctique de Kerguelen. *Mammalia* **58**, 211-223.
- Boussès P, Réale D (1998) Biology of twinning and origin of an unusually high twinning rate in an insular mouflon population. *Zeitschrift für Säugetierkunde-International Journal of Mammalian Biology* **63**, 147-153.
- Caballero A (1994) Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* **73**, 657-679.
- Chapuis JL, Boussès P, Barnaud G (1994) Alien mammals, impact and management in the French Subantarctic islands. *Biological Conservation* **67**, 97-104.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621-631.
- Clutton-Brock TH, Guinness FE, Albon SD (1982) *Red deer: behavior and ecology of two sexes* The University of Chicago Press, Chicago.
- Coltman DW, Festa-Bianchet M, Jorgenson JT, Strobeck C (2002) Age-dependent sexual selection in bighorn rams. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **269**, 165-172.

- Coltman DW, Smith JA, Bancroft DR, *et al.* (1999) Density-dependent variation in lifetime breeding success and natural and sexual selection in Soay rams. *American Naturalist* **154**, 730-746.
- Eisen EJ, Hanrahan JP, Legates JE (1973) Effects of population size and selection intensity on correlated responses to selection for postweaning gain in mice. *Genetics* **74**, 157-170.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetics*, 4th edn. Longman, Harlow, UK.
- Festa-Bianchet M (1987) Bighorn sheep, climbing accidents and implication for mating strategy. *Mammalia* **51**, 618-620.
- Frankham R (1995) Effective population-size adult-population size ratios in wildlife - a review. *Genetical Research* **66**, 95-107.
- Frankham R (1997) Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* **78**, 311-327.
- Frankham R (1997) Inbreeding and extinction: Island populations. *Conservation Biology* **12**, 665-675.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics* Cambridge University Press, Cambridge.
- Geist V (1971) *Mountain sheep: a study behavior and evolution* Chicago University Press, Chicago.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.
- Hartl DL, Clark GA (1997) *Principles of Population genetics*, Third edition edn. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Ramirez JHB, Carvalho GR (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11742-11747.
- Hill WG (1972) Effective size of population with overlapping generation. *Theoretical population biology* **3**, 278.

- Hogg JT, Forbes SH (1997) Mating in bighorn sheep: Frequent male reproduction via a high-risk "unconventional" tactic. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **41**, 33-48.
- Jorde PE, Ryman N (1994) Temporal allele frequency change and estimation of effective population size in population with overlapping generations. *Genetics* **139**, 1077-1090.
- Kaeuffer R, Pontier D, Devillard S, Perrin N (2004) Effective size of two feral domestic cat populations (*Felis catus* L.): effect of the mating system. *Molecular Ecology* **13**, 483-490.
- Kalinowski ST, Waples RS (2002) Relationship of effective to census size in fluctuating populations. *Conservation Biology* **16**, 129-136.
- Kimura M, Crow JF (1963) The measurement of effective population number. *Evolution* **17**, 279-288.
- Kokko H, Rankin DJ (2006) Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **361**, 319-334.
- Kruuk LEB, Clutton-Brock TH, Albon SD, Pemberton JM, Guinness FE (1999) Population density affects sex ratio variation in red deer. *Nature* **399**, 459-461.
- Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, *et al.* (2001) An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Research* **11**, 1275-1289.
- Matocq MD (2004) Reproductive success and effective population size in woodrats (*Neotoma macrotis*). *Molecular Ecology* **13**, 1635-1642.
- McKay JK, Bishop JG, Lin JZ, *et al.* (2001) Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**, 1715-1721.
- Miller LM, Kapuscinski AR (1997) Historical analysis of genetic variation reveals low effective population size in a northern pike (*Esox lucius*) population. *Genetics* **147**, 1249-1258.
- Montgomery ME, Woodworth LM, Nurthen RK, *et al.* (2000) Relationships between population size and loss of genetic diversity: comparisons of experimental results with theoretical predictions. *Conservation Genetics* **1**, 33-43.

- Motro U, Thomson G (1982) On heterozygosity and the effective size of populations subject to size changes. *Evolution* **36**, 1059-1066.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1-10.
- Newman D, Pilson D (1997) Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: Experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution* **51**, 354-362.
- Nunney L (1991) The influence of age structure and fecundity on the effective population size. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **246**, 71-76.
- Nunney L (1993) The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution* **47**, 1329-1341.
- Nunney L (1995) Measuring the ratio of effective population size to adult number using genetic and ecological data. *Evolution* **49**, 389-392.
- Nunney L (2002) The effective size of annual plant populations: The interaction of a seed bank with fluctuating population size in maintaining genetic variation. *American Naturalist* **160**, 195-204.
- Pelletier F, Festa-Bianchet M (2004) Effects of body mass, age, dominance and parasite load on foraging time of bighorn rams, *Ovis canadensis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **56**, 546-551.
- Pelletier F, Festa-Bianchet M (2006) Sexual selection and social rank in bighorn rams. *Animal Behaviour* **71**, 649-655.
- Pemberton JM, Coltman DW, Smith JA, Pilkington JG (1999) Molecular analysis of a promiscuous, fluctuating mating system. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 289-301.
- Pemberton JM, Smith JA, Coulson TN, *et al.* (1996) The maintenance of genetic polymorphism in small island populations: large mammals in the Hebrides. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **351**, 745-752.
- Pollak E (1983) A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes. *Genetics* **104**, 531-548.

- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* **6**, 847-859.
- Poulsen NA, Nielsen EE, Schierup MH, Loeschcke V, Gronkjaer P (2006) Long-term stability and effective population size in North Sea and Baltic Sea cod (*Gadus morhua*). *Molecular Ecology* **15**, 321-331.
- Quader S (2005) Mate choice and its implications for conservation and management. *Current Science* **89**, 1220-1229.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Réale D (1996) *Effets des contraintes environnementales sur la reproduction des femelles de deux populations d'ovins, le mouflon (Ovis musimon) et le mouton (Ovis aries), introduits dans l'archipel de Kerguelen*. PhD Thesis, Université de Rennes I.
- Réale D, Boussès P, JLChapuis (1999) Nursing behaviour and mother-lamb relationships in mouflon under fluctuating population densities. *Behavioural Processes* **47**, 81-94.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15261-15264.
- Stevenson IR, Bancroft DR (1995) Fluctuating trade-offs favour precocial maturity in male Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **262**, 267-275.
- Tallmon DA, Luikart G, Beaumont MA (2004) Comparative evaluation of a new effective population size estimator based on approximate Bayesian computation. *Genetics* **167**, 977-988.
- Vucetich JA, Waite TA, Nunney L (1997) Fluctuating population size and the ratio of effective to census population size. *Evolution* **51**, 2017-2021.
- Wang JL (2001) A pseudo-likelihood method for estimating effective population size from temporally spaced samples. *Genetical Research* **78**, 243-257.

- Waples RS (1989) A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* **121**, 379-391.
- Waples RS (2002) Effective size of fluctuating salmon populations. *Genetics* **161**, 783-791.
- Waples RS, Yokota M (2007) Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generations. *Genetics* **175**, 219-233
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Whitlock MC (2000) Fixation of new alleles and the extinction of small populations: Drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution* **54**, 1855-1861.
- Williamson EG, Slatkin M (1999) Using maximum likelihood to estimate population effective size from temporal changes in allele frequencies. *Genetics* **152**, 755-761.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Wright S (1938) Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science* **87**, 430-431.

*CHAPITRE IV · EFFETS DES NÉMATODES, DE LA CONSANGUINITÉ ET
DE L'EFFORT REPRODUCTEUR SUR LA CONDITION PHYSIQUE DES
MOUFLONS DE LA POPULATION DE KERGUELEN*

Effects of nematode parasites and internal relatedness on body condition in the Kerguelen mouflon population

Renaud Kaeuffer^{1,2}, Benoît Pisanu³, David W. Coltman⁴, Jean-Louis Chapuis³,
Dominique Pontier² & Denis Réale¹

¹ *Canada Research Chair in behavioural ecology and GRÉCA, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, CP 8888 succursale centre-ville, Montréal, Québec H3B 3P8, Canada*

² *Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR-CNRS 5558, Université de Lyon, Université Lyon I, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France*

³ *Département Écologie et Gestion de la Biodiversité, UMR 5173 MNHN-CNRS-P6, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP 53, 61 rue Buffon, 75005 Paris, France*

⁴ *Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, T6G 2E9, AB Canada*

Article en préparation

IV.1 RÉSUMÉ

La diversité génétique joue un rôle sur la condition physique des individus et leur développement (Pogson & Fevolden 1998, Frederikson & Hedrick 2002), mais aussi sur leur réponse immunitaire (O'brien & Evermann 1988, Luong et al. 2007). Les individus les plus consanguins sont généralement moins résistants aux parasites (Coltman et al. 1999). De plus, les individus porteurs de parasites sont généralement en moins bonne condition physique (Irvine et al. 2006). La présence de nématodes peut affecter l'appétit des individus et l'absorption des nutriments (Houdijk et al. 2001). Le coût énergétique de la réponse immunitaire peut lui aussi affecter le poids et la condition physique des individus infectés car sa mise en route peut nécessiter de puiser dans les réserves protéiques et lipidiques (Lochmiller & Deerenberg 2000).

Du fait de la complexité des relations entre diversité génétique, charge parasitaire et la condition physique, il est difficile de savoir quels paramètres agissent en amont et quels sont leurs « poids » respectifs. Ces relations sont d'autant plus difficiles à analyser que d'autres facteurs peuvent influencer à la fois la condition physique et la charge parasitaire. L'effort de reproduction peut limiter la réponse immunitaire, accroître la charge parasitaire et par conséquent limiter la condition physique générale des brebis.

Chez le mouton, une espèce similaire du mouflon, la présence d'helminthes du genre *Teladorsagia* est connue pour affecter la condition physique et accroître de manière significative la mortalité des individus parasités (Houdijk et al. 2001, Gulland 1992). Dans un inventaire exhaustif des macro-parasites des mouflons de l'île Haute, Pisanu et al. (1996) ont montré la présence en grande quantité de *Teladorsagia*. Ces parasites joueraient un rôle d'autant plus important dans la survie individuelle durant les périodes de fortes densités, où combinées à des hivers rigoureux et à la pauvreté des ressources trophiques, leur présence générerait des pressions de sélection très fortes sur la population (Boussès et al. 1994). Les individus avec une plus grande diversité génétique, capable de limiter la charge parasitaire, serait plus aptes à se maintenir dans de telles conditions et pourraient être sélectionnés (Coltman et al. 1999).

Dans ce chapitre, nous avons étudié la relation entre la consanguinité, la charge parasitaire et la condition physique. Nous avons utilisé deux mesures de condition physique : la masse de la carcasse éviscérée et l'indice de graisse rénale (Holand et al. 1991, Watkins et al. 1992). Le poids de la carcasse donne une estimation de la réserve protéique alors que l'indice de graisse rénale donne une estimation de la graisse disponible. Nous nous attendons à une différence de réponse pour ces deux indices dans la mesure où les lipides et les protéines jouent un rôle différent dans la réponse immunitaire. Les protéines sont nécessaires à la synthèse des anticorps et à la plasticité phénotypique de certains organes, alors que les lipides fourniraient l'énergie nécessaire pour la synthèse protéique (Lochmiller & Deerenberg 2000). Pour mieux comprendre la relation qui lie ces variables, nous avons intégré une mesure de l'effort reproducteur qui correspond à la masse totale des embryons et de l'utérus. Nous avons aussi pris en compte une mesure de l'investissement dans la réponse immunitaire en prenant compte la taille de la rate dans nos analyses (Morand & Poulin 2000).

Les analyses étant toujours en cours, je présente ici des résultats et une discussion préliminaires.

Nous avons montré un effet négatif de la consanguinité et de la charge parasitaire sur les deux mesures de la condition physique. Ces résultats tendent à démontrer l'hypothèse de la sélection à l'encontre des individus homozygotes comme mécanisme du maintien et de l'accroissement de hétérozygotie dans la population de mouflons de l'île Haute (Chapitre 1). Les individus les plus homozygotes en moins bonne condition physique et pourraient avoir une survie réduite (Gulland 1995, Coltman et al. 1999) en particulier du fait des rudes conditions environnementales rencontrées dans l'archipel de Kerguelen. Contrairement à ce que nous avons mentionné dans le Chapitre 1, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet de la diversité génétique aux loci CMH sur la condition physique.

Ces résultats préliminaires montrent qu'il existe des interactions entre la charge parasitaire et la consanguinité sur la condition physique mesurée par la graisse rénale et la masse de la carcasse. Par contre, les autres variables, telles la taille de la rate et l'effort

reproducteur, n'affectent pas de la même manière les deux indices de condition physique. Ainsi la masse de la carcasse est liée à la taille de la rate; de plus il existe une interaction entre la taille de la rate et la charge parasitaire.

Les différences obtenues entre les modèles décrivant les variations de la masse de la carcasse et de la graisse périnéale démontrent le rôle différent que ces paramètres jouent notamment dans la réponse immunitaire. Elles mettent aussi en évidence les effets négatifs directs d'une faible diversité génétique sur la condition physique de même qu'en interaction avec la charge parasitaire. Finalement, nos résultats montrent l'importance de tenir compte des interactions physiologiques dans l'estimation de la condition physique.

IV.2 INTRODUCTION

Body condition is a key trait from an evolutionary perspective that is involved in natural selection processes of vertebrates (Stearns 1992). For example, body condition is linked to early and adult survival (Festa-bianchet et al. 1997; Hanssen et al. 2003), fecundity (Newey & Thirgood 2004), reproductive success (Coltman et al. 2002, Festa-Bianchet et al. 2000), and parental effort (Raberg et al. 2003). Body condition can be influenced by intrinsic and extrinsic factors that are involved in metabolic costs. At the individual level, a complex set of interactions involving genetic diversity, reproductive status, and immunity can affect physical condition. Numerous studies have studied the effects of inbreeding (i.e. Coltman et al. 1999), parasitism (i.e Gulland 1992, Irvine et al. 2006), or reproductive effort (Festa-Bianchet et al. 2000) on body condition. However, to our knowledge, no one has explored the combined effects of these three parameters together.

Genetic diversity is known to play a central role on body condition (Crnokrak and Roff 1999). Several studies have shown negative effects of inbreeding on body growth and physical condition in animals (fish: Pogson & Fevolden 1998; mammals: Frederickson & Hedrick 2002, Jimenez et al. 1994; invertebrates: Zouros et al. 1998). Inbreeding also affects fecundity and reproductive effort (Keller & Waller 2002), and reduces resistance to parasites by altering immune responses (O'brien & Evermann 1988;

Coltman et al. 1999, Cassinelo et al. 2001; Arkrush et al. 2002, Luong et al. 2006). Inbred individuals could therefore show a higher rate of infection and sensitivity to parasites than non-inbred individuals.

Parasitic helminth infections are known to have a large impact on the physical condition of their host (Kyriazakis et al. 1996; 1998) for several reasons. Parasites use nutrients from their host to develop, reduce appetite and food assimilation (Gulland 1995, Houdijk et al. 2006), and metabolic costs related to immune response increases anorexia (Lochmiller and Deerenberg 2000). As a result, parasite infection can reduce host survival (Hanssen et al. 2003), parental effort (Raberg et al. 2003) or fecundity of their host (Newey & Thirgood 2004).

In pregnant females, endocrine-related production during breeding can reduce immune responses (McAnulty et al. 2001; Medina et al 1993; Roberts et al. 1996; Raghupathy 1997), and may increase host susceptibility to parasitism (Gustafsson et al. 1994). Parasite infection in pregnant females could therefore increase the reduction in their body condition caused by the investment in the development of the foetus, and other related breeding physiological mechanisms (i.e. lactation, Robbins 1993). Inbreeding, parasite infection and reproductive effort, are inter-related, which makes difficult to know how they affect body condition individually. For example, it has been suggested that a poor body condition may result from a high parasite load itself, but may also reflect the ability of a host to support a high parasite burden or an investment in other costly functions such as reproduction (Gulland 1995, Irvine et al. 2006).

In this article, we measure the relative effect of inbreeding, helminth parasite load, immune response, reproductive effort, and immunocompetence on body condition of ewes of the mouflon (*Ovis aries*) population introduced on an island of the Kerguelen Archipelago.

The studied population was founded by a single pair of individuals in 1957 on Haute Island, a small island (6.5 km²) of the Kerguelen archipelago (Chapuis 1994). Given the very strong bottleneck effect, the allelic diversity in the Kerguelen population is low with a maximum of four alleles per genes. Furthermore, given the small size of Haute Island and the high population density, the probability of reproduction between relatives is high and can increase inbreeding. We have analysed 23 microsatellite loci and calculated

internal relatedness (IR, Amos et al. 2001), a measure of genetic diversity that reflects individual inbreeding more appropriately than heterozygosity (Amos et al. 2001, Aparacio et al. 2006). During the early nineties, a parasitological survey showed the presence of *Teladorsagia circumcincta* a gastrointestinal nematode (Pisanu et al. 1996). Several studies have shown that *T. circumcincta* can cause important damages to the abomasum of domestic sheep, which leads to a loss of nutrients and protein deficiency in infested individuals (Coltman et al 1999; Gulland 1992). The number of worms was determined for each individual by exhaustive counting. To determine the immune response possibly related to count of *Teladorsagia*, we use the spleen mass, an important organ implicated in the immune defence. An increase in spleen size is associated with nematode burdens in birds (John 1994, 1995; Shutler et al. 1999), and small mammals (Kristan and Hammond 2001; Kristan 2002). Finally we determined the reproductive effort by the total mass of embryos and uterus.

Given the low genetic diversity measured in the population and the harsh environmental conditions of the Kerguelen archipelago, we expect a strong reduction in body condition with parasite burden (Gulland 1992) and inbreeding (Coltman et al. 1999). We also predict that reproductive effort and immune response may have limited effect on larger individuals that usually are in better condition (Festa-Bianchet et al. 1997).

IV.3 MATERIAL AND METHODS

IV.3.1 Study site and population

The Haute Island is located in the a very remote sub-Antarctic Kerguelen archipelago located in the Southern Indian Ocean (49°20' S, 70°20' E). The sub-Antarctic is characterised by an oceanic climate, with low monthly temperatures, high annual rainfall and strong winds. Between August and September 1994, mean monthly temperature ranged between 1.5° C and 2.9° C, total rainfall was 118 mm, and cumulated number of days with snow cover was 39 out off 61 (data collected at the Port-aux-Français meteorological station, located 30 km far west from the study site). Rocky landscapes dominate on Haute Island, with a weak vegetation cover (about 40%) composed of a few

endemic species (i.e. *Azorella selago*, *Agrostis magellanica*) and of introduced forage species (i.e. *Poa* sp and *Festuca* sp)(Chapuis et al. 1994).

The population was founded in 1957 by two individuals originated from the Vincennes Zoo (Paris, France). The population reached the size of 100 individuals at the beginning of the 1970s. Then the population grew in an exponential way reaching about 700 individuals in 1977. At that time the density reached about 100 individuals per ha. Since then the population has been characterised by a cyclical dynamics, fluctuating between 250 and 650 individuals, with winter crashes occurring every 3-5 years (Chapuis et al. 1994). Winter crashes occur after the population exceeds about 650 individuals. Males were more affected by the crash than females because of the strong reproductive effort related to inter-male competition during the rut, just before winter (Boussès et al. 1994).

IV.3.2 Body condition and organ mass

During the austral winter 1994 (August 10 and September 22), ewes were culled as part of population limitation program (Jean-Louis Chapuis, pers. obs.). The population was then at a high density (i.e. 600 individuals). Forty-seven Ewes were autopsied in the field, and their measures of body and organ mass or length, breeding status, and parasite burdens were collected directly. Two indices of body condition were assessed by the mean of eviscerated body weight (EBW; Watkins et al. 1991), and the kidney fat index (KFI; Holland, 1992). EBW is considered a measure of protein reserves (Watkins et al. 1991). EBW corresponded to the carcass mass minus all the internal organs (heart, lung, liver, total gut, kidneys, and uro-genital apparatus). EBW was measured with two spring balances (20 ± 0.1 kg or 100 ± 0.25 kg) depending on the size of the female. KFI, a measure of body fat reserves, was calculated as the ratio of the average mass of fat surrounding the kidneys on the average mass of the two kidneys (Holland 1992).

Spleen mass was used as an index of cellular immune response. The spleen is a major lymphoid organ in mammals; it is involved in maturation of lymphocytes and as a site for identifying and filtering antigens (John 1994, 1995, Zidan et al. 2000). Spleen mass can

be used as an index of the strength of the immune response mounted against parasites (John 1994, 1995; Shutler et al. 1999, Kristan and Hammond 2001, Kristan 2002, Smith & Hunt 2004)

Reproductive effort (Hirshfield & Tinkle 1975)) was estimated by weighing the total mass of reproductive tissues: embryos and the uterus using spring balance (100 ± 1 g or 500 ± 5 g).

Tibia length was measured to the nearest cm in order to get a body size index.

IV.3.3 Parasite burden

Only five species of gastro-intestinal nematodes formed the helminth cortege of mouflon on Haute Island (Pisanu et al. 1996). *Teladorsagia circumcincta*, a polymorphic nematode species (Cabaret & Durette-Desset 1991), dominated the helminth community. We focused on *Teladorsagia* sp., which is known to play a major role on individual survival in ungulates (Coltman et al. 1999, Gulland 1992 a b). The four other species were represented by less than a hundred of specimens in adult ewes (Pisanu et al. 1996). *T. circumcincta* worms were collected from the complete lumen content of the abomasum washed on a thin mesh sieve (36 μ m), and suspended in a volume of ethanol 70-80° ranging from 300 up to 900 ml according to the density in vegetal material. Then, depending on worm density, worm specimens were exhaustively counted within 3 to 5 aliquots representing 1/10th to 1/5th of the total volume (i.e. 100-300 ml). The total number of nematodes counted in total volume aliquots was then multiplied by 10 to 20, and was used as an estimate of worm burden (PB).

IV.3.4 Genetic analysis and inbreeding

Ear samples were collected for each female and stored in 95° ethanol. DNA extraction was made with the QIamp tissue extraction mini kit (Quiagen Inc., Mississauga Ontario) following their instructions. Genotypes were examined and amplified by polymerase chain reaction (PCR) at 23 microsatellite loci: ARO28, HEL10,

MCM64, MCM152, BM3413, BM848, HUI177, MAF64, MCM527, TGLA13, Ilsts059, TGLA176, RT1, AGLA226, I12ra, MCM218, NRAMP, OarCP49, TEXAN4, DRBps, INRA26, oMHC1, TGLA387, and. PCR condition and microsatellite information are accessible at <http://www.thearkdb.org/> and described elsewhere (Kaeuffer et al. 2007). PCR products were visualized on an automated sequencer (ABI 3730, Applied Biosystems) and analysed using the software GENEMAPPER (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The deviation from Hardy-Weinberg for each locus was tested using Genepop 3.4 (Raymond & Rousset 1995; for more details about the genetic history of the population see also Kaeuffer et al. 2007).

We used the internal relatedness (IR) as a measure of inbreeding. Compared to classical measures of heterozygosity IR gives more importance to homozygous loci caused by the presence of two copies of rare alleles. As a result, IR should better represent parental relatedness and provide a better estimate of individual level of inbreeding than heterozygosity (Amos et al. 2001). Aparicio et al. (2006) have shown that IR was particularly appropriate in the case of populations with a low genetic diversity or that went through a population bottleneck. The Kerguelen mouflon population satisfies both of these conditions (Kaeuffer et al. 2007). IR was estimated using the formula:

$$IR = \frac{(2H - \sum f_i)}{(2N - \sum f_i)},$$

where H was the number of homozygous loci, N was the total number of loci, and f_i was the frequency of the i^{th} allele contained in the genotype (Amos et al. 2001). Individual values of IR were calculated using “IRMACRO3”, an Excel macro in VISUAL BASIC, proposed by Amos and available at www.zoo.cam.ac.uk/zoostaff/amos.

IV.3.5 Statistical analyses

We ran linear models to investigate the effect of IR, parasite burden and reproductive effort on KFI and on EBW. Each model included IR, worm burden, reproductive effort and spleen mass. To get analyse body mass once corrected to variation in body size we included tibia length in the model. Given that ewes were killed

over two months, we also included date of culling in the model in order to control for time effect. The starting model included only main effects, and a limited number of two-way interactions for which we could *a priori* propose a biological explanation. The full model was:

Response \sim log PB+ IR+ tibia length + Rep. Effort + log spleen+ date+ log spleen*log PB + log PB*date + Rep. Effort *log PB+ IR*log PB+ IR* Rep. Effort + IR*tibia length.

Analyses were performed using the Anova function implemented in the car package in R software (R Development Core Team; 2005) using lm function. Worm burdens, KFI, spleen mass were log-transformed to take into account their skewed distribution.

IV.4 RESULTS

IV.4.1 Molecular information and IR

Mean number of alleles per locus was 2.4 and ranged from 2 to 4. The average heterozygosity observed was 0.47 ± 0.012 SE. None of the 23 loci showed any departure from Hardy-Weinberg equilibrium (exact test $P = 0.05$). IR was therefore estimated on the whole set of loci and range from -0.46 to 0.59.

IV.4.2 Body condition

Average biometricals indices are showed in the Table 14. There was a positive correlation between EBW and KFI ($n = 47$, $r = 0.38$, $p < 0.0001$)(Fig 15). EBW decreased significantly with IR, worm burden, spleen size and date, and increased with tibia length and reproductive effort (Table 15). We observed a significant interaction between IR and parasite burden (Table 15; Fig. 16a 16b). When parasite infection was low, a high level of inbreeding had a large negative impact on EBW. However, for high parasite burdens that reduced EBW, inbreeding effect on EBW was negligible. There was a significant interaction between spleen size and parasite burden (Table 15; Fig. 16c).

Spleen size was negatively related to EBW for low parasite loads but positively related to EBW for high parasite loads. The following interactions were not significant and therefore removed from the model: log PB*date, Rep. Effort *log PB, IR* Rep. Effort and IR*tibia length.

Table 14 Mean (\pm SD) biometrical indices and *Teladorsagia circumcincta* abundance from mouflon ewes (*Ovis aries*) sampled between in 1994 on Haute Island, sub-Antarctic Kerguelen archipelago

Statistics	Mean \pm SD
Samples size	47
Tibia length	21.2 cm \pm 6.3
Eviscerated body mass	15.9 kg \pm 2.1
Kidney Fat Index	107 g \pm 74
Status of pregnancy	1363 g \pm 730
Spleen mass	48.2 g \pm 20.5
Internal relatedness	0.02 \pm 0.22
<i>T. circumcincta</i> abundance	5907 id \pm 6003

There was a negative effect of parasite burden on KFI (Table 15). Highly inbred ewes (high IR) had a lower KFI than individuals with a negative IR. We also found a significant interaction between parasite burden and IR on KFI (Table 15 and Fig. 16c). For a given level of infection, inbred individuals had a lower KFI. For a high level of inbreeding, KFI remains constant and low whatever the parasite burden. KFI decreased over the winter (Table 15). We did not find any significant effect of the tibia length and spleen size as well as for the following interaction: log spleen*log PB, log PB*date, Rep. Effort *log PB, IR* Rep. Effort and IR*tibia length.

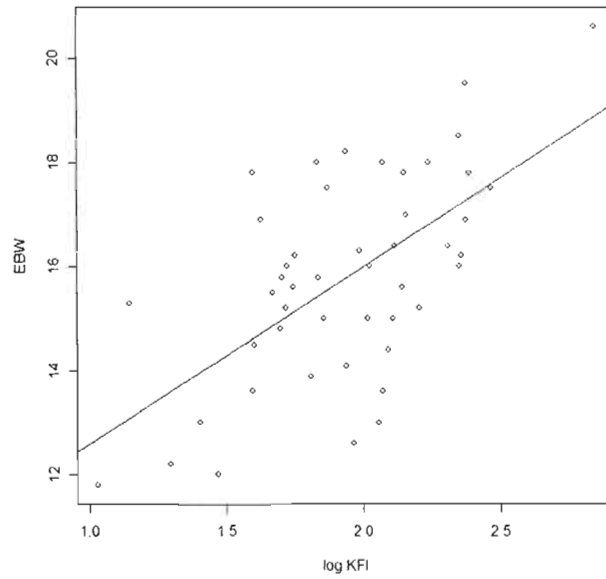


Figure 15 Correlation between EBW and KFI

IV.5 DISCUSSION

The originality of our study of mouflon body condition was to analyse together the effect of inbreeding, parasite burden and reproductive effort on protein and fat reserves. This allowed to show a direct and negative effect of these three parameters on both KFI and EBW (Table 15). More interestingly, we were able to detect some significant interaction between parasite burden and inbreeding, that are similar for both body condition indexes: when parasite burden is small, inbreeding has a large effect on EBW and KFI but when parasite burden is high, inbreeding has a limited impact on body condition. Finally, when inbreeding is high, the body condition is reduced whatever the parasite burden. We also showed a reduction in female body condition over the winter.

Table 15 : Selected factors affecting body condition, effects and their *p*-values.

Response	Term	Coefficient	s.e.	d.f.	<i>t</i>	<i>p</i> -value
EBW	Intercept	32.210	17.790	30	1.811	0.080
	Log PB	-12.610	4.532	30	-2.782	0.009
	IR	-20.150	7.581	30	-2.659	0.012
	Tibia length	0.099	0.036	30	2.762	0.010
	Reproductive effort	0.001	0.0003	30	4.169	<0.001
	Log spleen	-20.390	8.907	30	-2.289	0.029
	Date	-0.061	0.019	30	-3.087	0.004
	Log PB x Log spleen	6.976	2.608	30	2.675	0.012
	Log PB x IR	5.033	2.106	30	2.391	0.023
KFI	Intercept	2.804	0.321	33	8.704	< 0.001
	Log PB	-0.190	0.083	33	-2.295	0.028
	IR	-3.791	1.289	33	-2.942	0.006
	Reproductive effort	0.0002	0.0001	33	2.326	0.026
	Date	-0.018	0.004	33	-4.302	<0.001
	Log PB x IR	0.965	0.364	33	2.651	0.012

IV.5.1 Body condition and parasite burden

Overall, individuals with fewer parasites have a larger EBW and KFI. Although EBW and KFI are correlated (Fig.15), distinguishing between body protein (i.e. EBW) and fat (i.e. KFI) reserves may bring different information on relation between the body condition and parasitism, since they play different roles in immune response.

Protein reserves are essential for the defence against parasites, because many components from the immune system are composed by proteins that play a central role during infection (Houdjik et al. 2001, Lochmiller & Deerenberg 2000, MacRae 1993). In response to parasite infection, proteins could also be used in the increase of size of organs such as the mucosal mass of the small intestine (Kristan 2002; Kristan & Hammond 2000, Kristan & Hammond 2001, Liu 1965).

Fat is expected to satisfy energetic demands during parasite infection, especially because of the high metabolic cost of immune protein synthesis (Borel et al. 1998, Lochmiller & Deerenberg 2000 Houdjik et al. 2001, 2006, MacRae 1993). In support

what we expected KFI decreased with parasite burden. (Irvine et al. 2006, Mulvey et al. 1994).

IV.5.2 Body condition and internal relatedness

Lowly inbred (i.e. low IR) individuals were in better condition (i.e. larger EBW and KFI) than more homozygous individuals (Table 15). This negative effect of inbreeding is consistent with previous studies that showed that inbreeding affected body growth and body condition in other animals (Pogson & Fevolden 1998, Frederickson & Hedrick 2002, Jiminez et al. 1994). Different hypotheses have been proposed to explain the effect of inbreeding on body condition. For example, inbreeding could have a large impact on physiology. Mitton et al. (1986) showed that in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) more heterozygous individuals have a lower basal metabolic rate and therefore a higher growth rate. Furthermore, heterozygous individuals are characterised by a low protein turnover and could invest more energy in growth rate (Hawkins & Jay 1999). The limited protein turnover affects fat reserve that is used to provide energy to metabolise proteins (Lochmiller & Deerenberg 2000). Inbreeding can affect the expression of growth hormone and therefore limit development rate (Kosowska 1992), and this effect may be amplified under stressful environmental conditions (Kosowska 1992). This stress effect could be an important factor in the Kerguelen mouflon population that experiences particularly harsh environmental conditions (Boussès & Réale 1996).

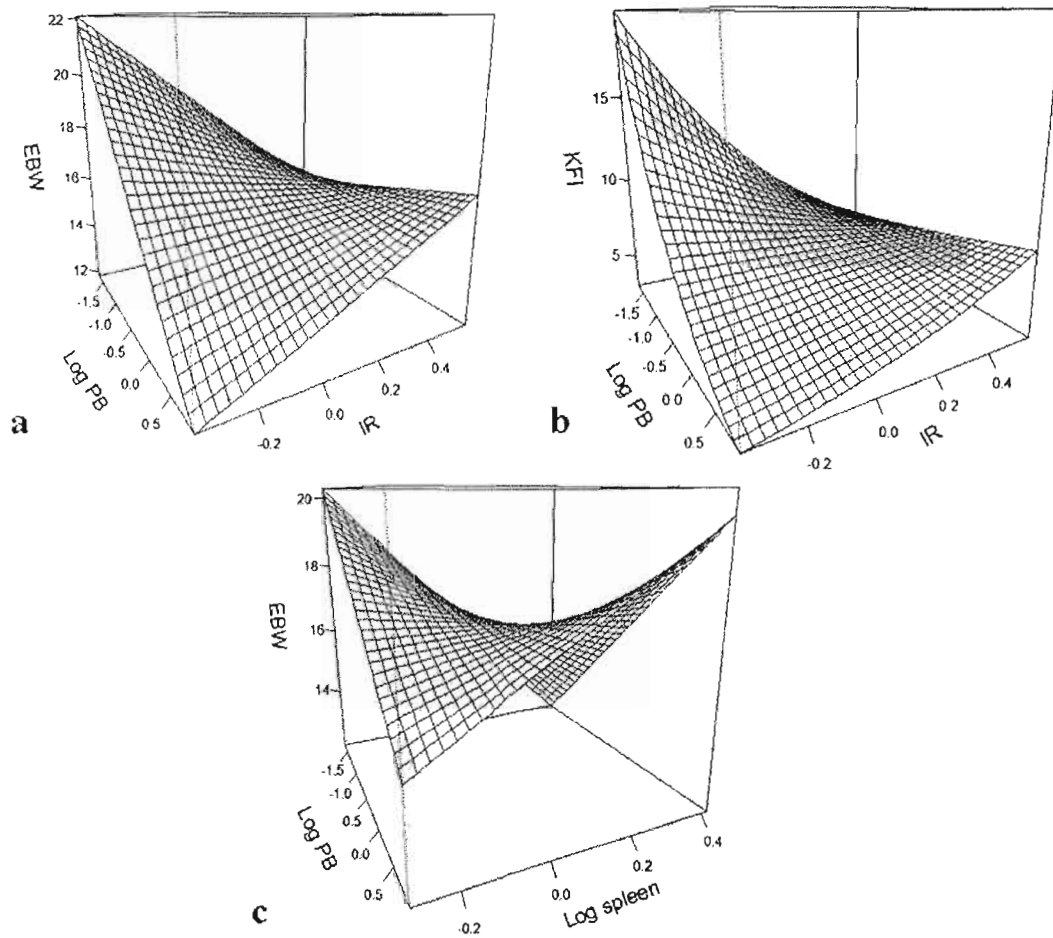


Figure 16 Effects of interaction between parasite burden and IR on EBW (a) KFI (b) and (c) effects of interaction of parasite burden and spleen size on EBW.

IV.5.3 Interactions

To our knowledge, this is the first study that tries to estimate the interaction of factors affecting body condition. We found significant interaction between IR and parasite burden on EBW (Table 15, Fig. 16a) and on KFI (Table 15, Fig. 16b). Whatever their parasite burden, highly inbred individuals had a low KFI (Fig. 16b). For EBW, (Fig. 16a) relative similar effects are observed supporting the hypothesis that the host genetic variability can limit the effect of parasite load on body condition. The negative effects of inbreeding and parasitism on body condition may impact individual survival and partly

explains the maintenance of heterozygosity in that population by strong selection against inbred individuals (Kaeuffer et al. 2007).

Usually a strong relation between parasite burden and genetic diversity is expected. One explanation of effect of IR on parasite burden is that inbreeding can decrease the genetic diversity at the MHC genes that encodes for peptide controlling the immunological recognition of pathogens (Bernatchez & Landry 2003). However in our study we did not find relation between level of inbreeding and parasite burden ($F_{1,45} = 0.375$; $P = 0.543$).

This observation may indicate that the relation between parasite burden and inbreeding is not direct but may be hidden by some other factors. For example we showed in a previous study that more inbred individuals females are more prone to give birth to twin and twinning ewes are also the heaviest; this observation may explain small increases of EBW with the increase of IR at high rate of infection (Fig. 16a).

Once taking into account variation in IR and in parasite burden, we also showed a positive effect of reproductive effort on physical condition. Ewes with the highest body condition are more prone to invest in reproduction and have slightly but significantly more developed uterus and embryos (Table 15) as suggested by previous studies (Festa-Bianchet 1998). We did not find any interaction between reproductive effort and parasite burden. Although the reallocation of metabolizable protein in reproduction and embryos development is usually assumed to make pregnant ewes more sensitive to parasitism than non pregnant females the genetic effect of twinning rate (Kaeuffer et al. submitted) may hide this relation.

We showed a negative effect of spleen on EBW. This negative relationship could be caused by the cost of the increase of spleen size and activity in response to parasite infection. Spleen is a central organ in immunity defences (John 1994), for birds, a positive correlation between spleen size and immunes system strength is generally observed (Morand & Poulin 2000 but see Smith and Hunt 1994). In mammals the relationship between spleen size and parasite burden is complex and still discussed (de Belloq et al. 2007), particularly because of the multiple function of the spleen (John 1994, Smith and Hunt 2004).

In our study we observed a significant interaction between spleen size and parasite burden on EBW, which underlines the role of spleen size in immune response in mammals. However, the pattern of interaction between spleen size and parasite burden on his effect on EBW is not obvious. A small EBW is observed when spleen is small and parasite burden is high, and for a large spleen combined with a low parasite burden. This result may indicate that some unidentified effects could play a role on spleen mass and under the effect of parasite burden.

One limitation of this study is that linear model does not allow do understand links between the factor studied and how they do inter-act each other. Linear model only shows that these factors affect significantly body condition. To better understand how these factors act on body condition, a path analysis that measure correlation between factors as well as their effect on response variable may be more appropriate and could be a tools to study investment trade-off between factor such as fecundity and immune response.

IV.6 ACKNOWLEDGMENTS

We thank all field workers who collected mouflon samples and data, A. Krupa and A. Llewellyn for their help with molecular analyses. This work was supported by the Institut Polaire Français Paul-Emile Victor and the Centre National de la Recherche Scientifique to D. Pontier, the Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canadian Foundation for Innovation to D. Réale, and the Royal Society to D. Coltman.

IV.7 BIBLIOGRAPHY

- Amos W, Worthington Wilmer J, Fullard K, *et al.* (2001) The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **268**, 2021-2027.
- Aparicio JM, Ortego J, Cordero PJ (2006) What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? *Molecular Ecology* **15**, 4659-4665.

- Arkush KD, Giese AR, Mendonca HL, *et al.* (2002) Resistance to three pathogens in the endangered winter-run chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): Effects of inbreeding and major histocompatibility complex genotypes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**, 966-975.
- Bernatchez L, Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology* **16**, 363-377.
- Bonneaud C, Mazuc J, Gonzalez G, *et al.* (2003) Assessing the cost of mounting an immune response. *American Naturalist* **161**, 367-379.
- Borel MJ, Buchowski MS, Turner EA, Goldstein RE, Flakoll PJ (1998) Protein turnover and energy expenditure increase during exogenous nutrient availability in sickle cell disease. *American Journal of Clinical Nutrition* **68**, 607-614.
- Boussès P, Réale D, J.L.Chapuis (1994) Mortalité hivernale massive dans la population de mouflons Corse (*Ovis musimon*) de l'archipel subantarctique de Kerguelen. *Mammalia* **58**, 211-223.
- Cabaret J, Durette-Desset MC (1991) Polymorphism of helminths: from morphology to genetics. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* **66 Suppl 1**, 17-22.
- Cassinello J, Gomendio M, Roldan ERS (2001) Relationship between coefficient of inbreeding and parasite burden in endangered gazelles. *Conservation Biology* **15**, 1171-1174.
- Chapuis JL, Boussès P, Barnaud G (1994) Alien mammals, impact and management in the French Subantarctic islands. *Biological Conservation* **67**, 97-104.
- Clutton-Brock TH, Major M, Albon SD, Guinness FE (1987) Early development and population dynamics in red deer. I. Density- dependent effects on juvenile survival. *Journal of Animal Ecology* **56**, 53-67.
- Coltman DW, Festa-Bianchet M, Jorgenson JT, Strobeck C (2002) Age-dependent sexual selection in bighorn rams. *Proc. R. Soc. Lond. B* **269**, 165-172.
- Coltman DW, Pilkington JG, Smith JA, Pemberton JM (1999) Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* **53**, 1259-1267.
- Crnokrak P, Roff DA (1999) Inbreeding depression in the wild. *Heredity* **83**, 260-270.

- Crnokrak P, Roff DA (1999) Inbreeding depression in the wild. *Heredity* **83**, 260-270.
- De Bellocq GJ, Porcherie A, Moulia C, Morand S (2007) Immunocompetence does not correlate with resistance to helminth parasites in house mouse subspecies and their hybrids. *Parasitology Research* **100**, 321-328.
- Festa-Bianchet M, Jorgenson JT, Berube CH, Portier C, Wishart WD (1997) Body mass and survival of bighorn sheep. *Canadian Journal of Zoology* **75**, 1372-1379.
- Festa-Bianchet M, Jorgenson JT, Réale D (2000) Early development, adult mass, and reproductive success in bighorn sheep. *Behavioral Ecology* **11**, 633-639.
- Fredrickson R, Hedrick P (2002) Body size in endangered Mexican wolves: Effects of inbreeding and cross-lineage matings. *Animal Conservation* **5**, 39-43.
- Gulland FMD (1992) The Role of Nematode Parasites in Soay Sheep (*Ovis-Aries* L) Mortality During a Population Crash. *Parasitology* **105**, 493-503.
- Gulland FMD (1995) The impact of infectious diseases on wild animal populations: a review. In: *Ecology and Infectious Diseases in Natural Populations* (eds. Dobson AP, Grenfell BT), pp. 20-51. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gustafsson L, Nordling D, Andersson MS, Sheldon BC, Qvarnstrom A (1994) Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philosophical Transactions - Royal Society of London, B* **346**, 323-331.
- Hanssen SA, Folstad I, Erikstad KE (2003) Reduced immunocompetence and cost of reproduction in common eiders. *Oecologia* **136**, 457-464.
- Hirshfield MF, Tinkle DW (1975) Natural-Selection and Evolution of Reproductive Effort. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 2227-2231.
- Holand O (1992) Fat indices versus ingesta-free body fat in European Roe Deer. . *The Journal of Wildlife Management* **56**, 241-245.
- Houdijk JGM, Jackson F, Coop RL, Kyriazakis I (2006) Rapid improvement of immunity to *Teladorsagia circumcincta* is achieved through a reduction in the demand for protein in lactating ewes. *International Journal for Parasitology* **36**, 219-227.
- Houdijk JGM, Kyriazakis I, Coop RL, Jackson F (2001) The expression of immunity to *Teladorsagia circumcincta* in ewes and its relationship to protein nutrition depend on body protein reserves. *Parasitology* **122**, 661-672.

- Houdijk JGM, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL (2001) The relationship between protein nutrition, reproductive effort and breakdown in immunity to *Teladorsagia circumcincta* in periparturient ewes. *Animal Science* **72**, 595-606.
- Irvine RJ, Corbishley H, Pilkington JG, Albon SD (2006) Low-level parasitic worm burdens may reduce body condition in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*). *Parasitology* **133**, 465-475.
- Jiménez JA, Hughes KA, Alaks G, Graham L, Lacy RC (1994) An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* **266**, 271-273.
- John JL (1994) The avian spleen: A neglected organ. *Q.REV.BIOL.* **69**, 327-351.
- John JL (1994) Nematodes and the spleen: An immunological relationship. *Experientia* **50**, 15-22.
- John JL (1995) Parasites and the avian spleen: Helminths. *Biological Journal of the Linnean Society* **54**, 87.
- Kaeuffer R, Coltman DW, Chapuis JL, Pontier D, Réale D (2007) Unexpected heterozygosity in an island mouflon population founded by a single pair of individuals. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **274**, 527-533.
- Kaeuffer R, Coltman DW, Chapuis JL, Réale D, Pontier D. Local effects of inbreeding on fecundity and consequence for genetic diversity in Kerguelen mouflon. Soumis à *Biology Letters*
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 230-241.
- Kosowska B (1992) The effect of genetic variability (degree of homozygosity) on serum levels of the anterior pituitary hormones prolactin, corticotropin, and growth hormone in rats. *Biochemical Genetics* **30**, 581-589.
- Kristan DM (2002) Effects of intestinal nematodes during lactation: Consequences for host morphology, physiology and offspring mass. *Journal of Experimental Biology* **205**, 3955-3965.
- Kristan DM, Hammond KA (2001) Parasite infection and caloric restriction induce physiological and morphological plasticity. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **281**, R502-R510.

- Kyriazakis I, Anderson DH, Oldham JD, Coop RL, Jackson F (1996) Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: Effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. *Veterinary Parasitology* **61**, 297-313.
- Kyriazakis I, Tolkamp BJ, Hutchings MR (1998) Towards a functional explanation for the occurrence of anorexia during parasitic infections. *Animal Behaviour* **56**, 265-274.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, *et al.* (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-377.
- Lochmiller RL, Deerenberg C (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: Just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**, 87-98.
- Luong LT, Heath BD, Polak M (2007) Host inbreeding increases susceptibility to ectoparasitism. *Journal of Evolutionary Biology* **20**, 79-86.
- MacRae JC (1993) Metabolic consequences of intestinal parasitism. *Proceedings of the Nutrition Society* **52**, 121-130.
- McAnulty RW, Familton AS, Sedcole RD, Sykes AR (2001) Changes in the resistance of the ewe to infection with *Teladorsagia circumcincta* during late pregnancy and lactation. *Animal Science* **72**, 159-168.
- Medina KL, Smithson G, Kincade PW (1993) Suppression of B-Lymphopoiesis During Normal-Pregnancy. *Journal of Experimental Medicine* **178**, 1507-1515.
- Mitton JB, Carey C, Kocher TD (1986) The relation of enzyme heterozygosity to standard and active oxygen consumption and body size of tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Physiol Zool* **59**, 574-582.
- Morand S, Poulin R (2000) Nematode parasite species richness and the evolution of spleen size in birds. *Canadian Journal of Zoology* **78**, 1356-1360.
- Mulvey M, Aho JM, Rhodes Jnr OE (1994) Parasitism and white-tailed deer: Timing and components of female reproduction. *Oikos* **70**, 177-182.
- Newey S, Thirgood S (2004) Parasite-mediated reduction in fecundity of mountain hares. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **271**, S413-S415.

- O'Brien SJ, Evermann JF (1988) Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution* **3**, 254-259.
- Pisanu B, Chapuis JL, Combes O, Durette-Desset MC (1996) Specific richness in gastrointestinal helminths from the domestic sheep (*Ovis aries*) and the Corsican mouflon (*Ovis musimon*) introduced onto the Kerguelen archipelago. *Richesse spécifique en helminthes gastro-intestinaux du mouton (*Ovis aries*) et du mouflon (*Ovis musimon*) introduits dans l'archipel de Kerguelen* **46**, 305-312.
- Pogson GH, Fevolden SE (1998) DNA heterozygosity and growth rate in the Atlantic cod *Gadus morhua* (L). *Evolution* **52**, 915-920.
- R Development Core Team (2005). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raberg L, Nilsson JA, Ilmonen P, Stjernman M, Hasselquist D (2000) The cost of an immune response: Vaccination reduces parental effort. *Ecology Letters* **3**, 382-386.
- Raghupathy R (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today* **18**, 478-482.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Roberts CW, Satoskar A, Alexander J (1996) Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitology Today* **12**, 382-388.
- Shutler D, Alisauskas RT, Dan McLaughlin J (1999) Mass dynamics of the spleen and other organs in geese: Measures of immune relationships to helminths? *Canadian Journal of Zoology* **77**, 351-359.
- Smith KG, Hunt JL (2004) On the use of spleen mass as a measure of avian immune system strength. *Oecologia* **138**, 28-31.
- Stearns SC (1992) *The Evolution of life histories* Oxford University Press.
- Watkins BE, Witham JH, Ullrey DE, Watkins DJ, Jones JM (1991) Body composition and condition evaluation of white-tailed deer fawns. *The Journal of Wildlife Management* **55**, 39-51.

- Zidan M, Schuberth HJ, Pabst R (2000) Immunohistology of the splenic compartments of the one humped camel (*Camelus dromedarius*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **74**, 17-29.
- Zouros E, Romero-Dorey M, Mallet AL (1988) Heterozygosity and Growth in Marine Bivalves: Further Data and Possible Explanations *Evolution* **42**, 1332-1341.

*CHAPITRE V EFFETS LOCAUX DE CONSANGUINITÉ SUR LA
FÉCONDITÉ ET CONSÉQUENCES POUR LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE
DE LA POPULATION DE MOUFLON DE KERGUELEN*

Local effects of inbreeding on fecundity and consequence for genetic diversity in Kerguelen mouflon.

Renaud Kaeuffer^{1,2*}, David W. Coltman³, Jean-Louis Chapuis⁴, Denis Réale¹ & Dominique Pontier²

¹ *Canada Research Chair in Behavioural Ecology and GRÉCA, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, CP 8888 succursale centre-ville, Montréal, Québec H3B 3P8, Canada*

² *Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR-CNRS 5558, Université de Lyon, Université Lyon I, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France*

³ *Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, T6G 2E9, AB Canada*

⁴ *Département Écologie et Gestion de la Biodiversité, UMR 5173 MNHN-CNRS-P6, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP 53, 61 rue Buffon, 75005 Paris, France*

Soumis à Biology Letters

V.1 RÉSUMÉ

Un paradigme classique en génétique de la conservation est l'effet négatif de l'homozygotie sur les caractéristiques biodémographiques des individus en lien direct avec leur valeur sélective (fitness). Ainsi les individus consanguins sont généralement caractérisés par une croissance, une reproduction et une survie moins bonne que les non consanguins. Deux hypothèses sont généralement avancées pour expliquer l'avantage de l'hétérozygotie (Crnokrak & Barret 2002):

- L'hypothèse de la **surdominance** soutient que les génotypes hétérozygotes ont une valeur sélective plus élevée que les génotypes homozygotes. Un individu hétérozygote possédant deux isozymes pourrait accroître l'efficacité de ses réactions enzymatiques, et donc faire face de manière plus efficace aux stress environnementaux, qu'un individu homozygote qui en possède une seule.
- L'hypothèse de la **dominance partielle** considère que l'état homozygote permettrait l'expression d'allèles récessifs délétères réduisant la fitness.

De nombreuses études ont ainsi pu montrer l'avantage de l'hétérozygotie, sur la fitness des individus, que ce soit au niveau d'un gène unique (Gemmell & Slate 2006) ou d'un ensemble de marqueurs représentant la consanguinité générale d'un individu (hétérozygotie multi-loci) (Hedrick & Kalinowski 2000). Pourtant, chez le mouton, certains gènes à l'état homozygote peuvent accroître la fécondité (Davis 2004). Il est d'ailleurs probable que l'on retrouve ce type d'effet pour d'autres gènes. De plus ces effets devraient être additifs, c'est-à-dire que l'expression de deux allèles identiques permettrait la production d'une plus grande quantité de certains enzymes par rapport à un hétérozygote et qui seraient impliqués dans la production d'embryons.

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la relation entre l'hétérozygotie, mesurée sur 25 loci microsatellites et la fécondité des brebis de l'île Haute.

Nous avons montré une relation négative entre l'hétérozygotie et le nombre d'embryons portés par les femelles. Les individus les plus homozygotes ont une plus grande probabilité de porter des jumeaux. En analysant ces résultats de manière plus fine, nous avons mis en évidence trois régions chromosomiques qui interviendraient dans la fécondité des femelles mouflons.

Le mouflon de l'île Haute est caractérisé par un très fort taux de gémellarité, largement supérieur à ceux des populations naturelles observés en métropole (Boussès & Réale 1998, Garel et al. 2005). Il avait été suggéré que ce taux résultait d'effets fondateurs (particularité génétique du couple fondateur), ce qui semble être confirmé par l'importance du génotype des individus sur leur fécondité.

Finalement, ces résultats suggèrent des effets de sélection densité dépendante qui pourraient affecter la diversité génétique de la population : à faible densité de population, les individus homozygotes auraient une plus grande valeur sélective en produisant des jumeaux. Par contre, à forte densité et dans des conditions environnementales difficiles, les femelles porteuses de jumeaux pourrait être limitée du fait des coûts importants liés à la production de jumeaux. La sélection densité dépendante liée au sexe pourrait être un mécanisme qui favoriserait le maintien de la diversité génétique dans la population de mouflons de Kerguelen.

V.2 INTRODUCTION

Inbreeding is known to affect individual fitness (Frankham et al. 2002) by the expression of deleterious recessive alleles and/or the loss of heterozygote advantage in homozygous, inbred individuals (Keller & Waller 2002). In several species, inbreeding has been found to reduce reproductive success characteristics such as fertility, litter or clutch size, and juvenile survival (Keller & Waller 2002). Individual inbreeding is best quantified using pedigree information (Pemberton 2004). However, in natural populations, pedigrees are often not available or difficult to obtain, and pedigree-based indices of inbreeding are often replaced by molecular indices, such as standardized multi-locus heterozygosity (*MLH*; Coltman et al. 1999). Average heterozygosity of an individual, however, may not accurately represent genome wide heterozygosity, and

therefore, may not reflect its general level of inbreeding appropriately (Balloux et al. 2004). The relation between heterozygosity measured by molecular markers and general level of inbreeding can be improved by using a very large number of loci (Balloux et al. 2004). Furthermore in small or recently bottlenecked populations, linkage disequilibrium increases the correlation between heterozygosity and inbreeding (Hansson & Westerberg 2002, see also Slate et al. 2004 for discussion).

Using data from an insular population of mouflon (*Ovis aries*) founded by a single pair of individuals (Chapuis et al. 1994) we compare litter size of ewes with different levels of inbreeding estimated by *MLH* from 24 microsatellite loci. About 34% of females produced twins in this population (Boussès & Réale 1998), which exceeds the twinning rate for European mouflon populations (2.5 to 20.7% Garel et al. 2005). We then tested if litter size was related to the overall level of inbreeding or local effects using a logistic regression approach and by calculating the *H-H* correlation (Balloux et al. 2004).

V.3 MATERIAL AND METHODS

V.3.1 The population

The European mouflon has recently been classified as a feral form of the domestic sheep (*Ovis aries*) that separated about 8000 years ago (BZN, 2003). The study population was founded in 1957 by two individuals introduced on Haute Island, a small island (6.5 km²) of the Kerguelen Subantarctic archipelago (49°20' S, 70°20' E) from the Vincennes Zoo (Paris, France). The Vincennes Zoo population was created in 1934, probably with individuals from Hamburg and Hannover Zoos and from Corsica (Vincennes Zoo herbivore curator, Pers. Com.). The population grew exponentially to reach about 700 individuals in 1977. Since then the population has fluctuated cyclically varying between 250 and 650 individuals and with winter crashes occurring at a periodicity of 3-5 years (Chapuis et al. 1994). In 1994, 42 females were culled and the number of developed embryos counted. Based on the number of definite incisors, all these females were age two and older, but we could not determine the age of females

with precision. In other feral sheep, ewes between 2 to 6 years of age have identical fecundity (Clutton-Brock et al. 1996). Given the short life span observed here (Kaeuffer et al. 2007a), few ewes probably reached 6 years of age or more. We measured the total mass of carcass (i.e. mass without the internal organs).

V.3.2 Genetic analyses

We genotyped tissue samples collected from culled ewes at 24 microsatellites loci (ARO28, HEL10, MCM64, MCM152, BM3413, BM848, HUI177, MAF64, MCM527, TGLA13, Ilsts059, TGLA176, RT1, AGLA226, Il2ra, MCM218, NRAMP, OarCP49, TEXAN4, DRBps, INRA26, oMHC1, TGLA387, and MAF33; see Kaeuffer et al. 2007a, b for details) to estimate multi-locus standardized heterozygosity (*MLH*) (Coltman et al. 1999). We used the sheep genomic map published by Maddox et al. (2001) to determine the position of the loci used on their respective chromosome.

V.3.3 Statistical analyses

To test for the relative effect of *MLH* and body mass on litter size (i.e. singleton vs twin lambs) we ran a generalized linear model (with a binomial distribution and a log link function) including *MLH*, body mass, and their second order interaction. We then determined if litter size was related to the overall level of inbreeding or to local effects by modelling the probability of producing twins as a function of heterozygosity at each locus. We used the false discovery method (FDR; Benjamini & Yekutieli 2001) method to correct our results for multiple testing using the *fdrtool* function (Strimmer 2007) implemented in R (R Development Core Team 2007). We also estimated the *H-H* correlation (Balloux *et al.* 2004) in females with or without twins. The *H-H* correlation is the average correlation between the mean *H* calculated from two random subsets of twelve markers, over a 1000 replicates. A strong *H-H* correlation is required in order for average *H* to reflect whole genome heterozygosity under inbreeding (Balloux et al. 2004). A higher *H-H* correlation is also expected in groups enriched for inbred individuals

(Balloux et al. 2004), and therefore a different $H-H$ correlation for ewes with singleton and ewes with twins may also indicate that litter size is under the influence of a genome wide effect.

V.4 RESULTS

Average standardized heterozygosity was 0.99 ± 0.040 (average \pm SE: 0.46 ± 0.019 for non-standardized H). Females with a lower MLH and heavy females were more prone to have twins (Likelihood ratio test; MLH , LRT = 17.767, $df = 1$; $p < 0.001$; body mass, LRT = 6.126, $df = 1$, $p = 0.013$) (Fig. 17). Interaction between MLH and carcass mass was non-significant and removed from the model.

Among the 24 loci used, three showed significant effects (Likelihood ratio tests; TEXAN4: LRT = 7.058, $df = 1$, $p < 0.01$; DRBps: LRT = 8.413, $df = 1$, $p < 0.05$; BM848: LRT = 5.898, $df = 1$, $p = 0.015$) (Fig. 18). After False Discovery Rate correction the effects of TEXAN4, BM848, and DRBPs were significant at a level of 6%. Heterozygosity at the three loci significantly affected fecundity when tested together in a Generalized Linear Model (TEXAN4: LRT = 12.387, $df = 1$, $p < 0.001$; DRBps: LRT = 10.625, $df = 1$, $p = 0.001$; BM848: LRT = 5.138, $df = 1$, $p = 0.023$), showing that the link between each locus and fecundity was independent of the two other loci. Two groups of two loci, (NRAMP-ARO28 and TGLA387-oMHC1) linked to TEXAN4 and DRBps, respectively, and located within 3 centimorgans (Maddox et al. 2001), showed similar but non-significant effects on fecundity (Fig. 18). The NRAMP locus (not shown in the figure), was characterized by a particularly strong but non significant effect size (Effect = -9.544, s.e. 29.052, $p = 0.742$) due to the absence of heterozygous individuals with twins for that locus.

We observed a low $H-H$ correlation for twinning ewes ($r = 0.055 \pm 0.006$; average \pm SE) as well as for females with singleton ($r = 0.043 \pm 0.005$). The slight difference in the correlation was not significant (Student t test, $t = 1.575$, $df = 1998$, $P = 0.115$).

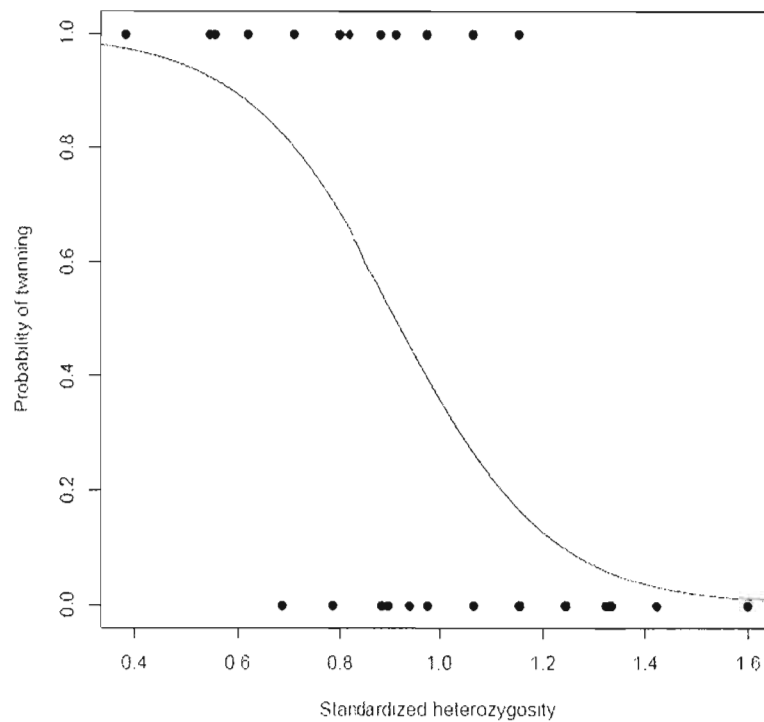


Figure 17 Effect of standardized multi-locus standardized heterozygosity (MHL) on the probability of twinning in the Kerguelen mouflon population.

V.5 DISCUSSION

Our study shows a clear and negative effect of *MLH* on fecundity in a natural population for the first time, and challenges the classical view in conservation genetics of a negative effect of homozygosity on fecundity (Keller & Waller 2002). However, the low *H-H* correlation suggests local effects rather than a genome wide effect of heterozygosity on fecundity. We also showed a positive effect of body mass on twinning rate as observed in feral sheep (Clutton-Brock et al. 1996). Our results are the first to report of a negative effect of heterozygosity on fecundity in a wild population. An increase in multiple births with inbreeding has been observed in captive chimpanzees, *Pan troglodytes* (Geismann 1990). Inbreeding, however, was estimated from pedigree information and could not separate genome wide effects and local effects.

We identified three chromosomal regions close to the loci *TEXAN4* (chromosome 2, Maddox et al. 2001), *DRBps* (chromosome 20, Maddox et al. 2001), and *BM848* (chromosome 10, Maddox et al. 2001) that may play a central role in sheep fecundity. This result indicates that some genes other than Booroola and Lacaune (chromosome 6

and 11 respectively, Davis 2005) influence fecundity in *Ovis aries*. Although the effects of these three loci was only significant at a level of 6% after FRD, the weak *H-H* correlation measured for both females with twins and singletons suggests that correlation between fecundity and *MHL* is caused by local effects (at specific loci) rather than general inbreeding level. Our results, therefore, give some new support to the idea that the relationship between *MLH* and fitness is caused by specific genes under selection (Hansson & Westerberg 2002) and linked to neutral genetic markers.

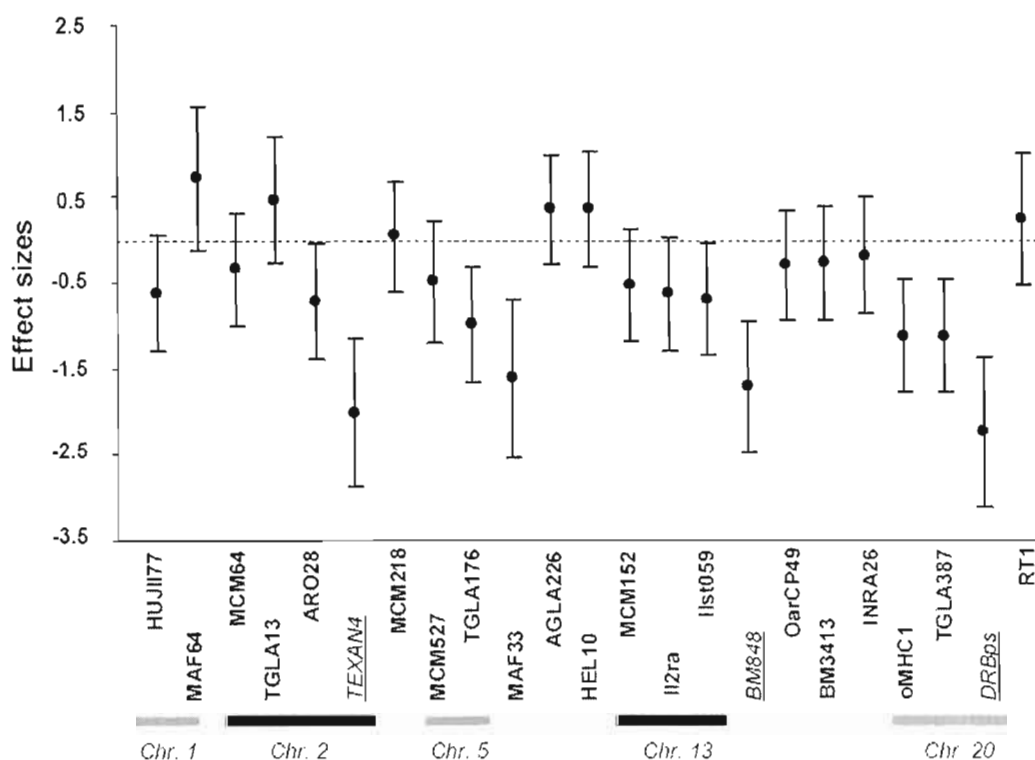


Figure 18 Effect size (and their SE) of loci on fecundity estimated with a logistic regression, and linkage group of the loci used. Three loci showed a significant effect on fecundity (TEXAN4, BM848, DRBps). Loci linked to TEXAN4 and DRBps, show similar trends in their effect but are non-significant.

We also observed a high level of dizygotic twins (at least 9 pairs on the 19 pairs observed) that underlines the importance of genetic factors on litter size. The exceptionally high twinning rate of the Kerguelen population (33.8 %) and of the ancestral population (Boussès & Réale 1998) suggests that the mutations were present in the island founders. The strong founder effect at Kerguelen, coupled with the isolation of

the population, has favoured the breeding among relatives and increased the frequency of recessive homozygous individuals at loci involved in twin production.

In this paper we used twinning rate as an index of fecundity. Although a single measure of fecundity may not be representative of a female's lifetime fitness (Boyce & Perrins 1987), recessive genes for twinning in the mouflon population may be strongly selectively favoured during consecutive years of low density population. However, during phases of very high population density (about 100 individuals/km²; Kaeuffer et al. 2007a), twinning could reduce the survival of both ewes and their lambs (Clutton-brock et al. 1996). Our finding that *MLH* affects fecundity may thus have fitness consequence in the mouflon population. We have previously reported an increase in heterozygosity over time in this population (Kaeuffer et al. 2007a). The genetics of litter size coupled with the cyclic dynamics could play a central role in promoting genetic variation through fluctuating sex-linked selection (Reinhold 2000, Axenovich et al. 2007, Hedrick 2007). During phases of population expansion, selection may favour homozygous twinning ewes, with a weak impact on genetic diversity. In contrast with other ungulate species, in sheep gestation costs can be higher than lactation costs (Clutton-Brock et al. 1996). Thus, homozygous twinning ewes may suffer higher costs of reproduction and increased mortality during populations crashes, which may increase average heterozygosity in the population over time.

V.6 ACKNOWLEDGMENTS

We thank all field workers who collected mouflon samples and data, A. Krupa and A. Llewellyn for their help with molecular analyses. This work was supported by the Institut Polaire Français Paul-Emile Victor and the Centre National de la Recherche Scientifique to D. Pontier, the Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canadian Foundation for Innovation to D. Réale, and the Royal Society to D. Coltman.

V.7 BIBLIOGRAPHY

- Axenovich, T.I., Zorkoltseva I.V., Akberdin, I.R., Beketov, S.V Kashtanov, S.N. Zakharov I.A., & Borodin P.M. 2007 Inheritance of litter size at birth in farmed arctic foxes (*Alopex lagopus*, Canidae, Carnivora). *Heredity* **98**:99-105.
- Balloux, F., Amos, W. & Coulson, T. 2004 Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? *Mol. Ecol.* **13**, 3021-3031.
- Benjamini, Y. & Yekutieli, D. 2001 The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Stat.* **29**, 1165-1188.
- Boussès, P. & Réale, D. 1998 Biology of twinning and origin of an unusually high twinning rate in an insular mouflon population. *Z. Saugetierkd.* **63**, 147-153.
- Boyce, M.S. & Perrins, C.M. 1987 Optimizing great tit clutch size in a fluctuating environment. *Ecology* **68**, 142-153.
- Chapuis, J.L., Boussès, P. & Barnaud, G. 1994 Alien mammals, impact and management in the French Subantarctic islands. *Biol. Cons.* **67**, 97-104.
- Clutton-Brock, T.H., Stevenson, I.R., Marrow, P., MacColl, A.D., Houston, A.I, & McNamara, J. M. 1996 Population fluctuations, reproductive costs and life-history tactics in female Soay sheep. *J. Anim. Ecol.* **65**:675-689.
- Coltman, D.W., Pilkington, J.G., Smith, J.A., & Pemberton, J.M. 1999 Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* **53**, 1259-1267.
- Davis, G.H. 2005 Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.* **37**, S11-S23.
- Frankham, R., Ballou, J.D., & Briscoe, D.A. 2002 *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Garel, M., Cugnasse, J.M., Gaillard, J.M., Loison, A., Gibert, P., Douvre, P. & Dubray, D. 2005 Reproductive output of female mouflon (*Ovis gmelini musimon* x *Ovis* sp.): A comparative analysis. *J. Zool.* **266**:65-71.
- Geissmann T (1990) Familial incidence of multiple births in a colony of chimpanzees (*Pan troglodytes*). *J. Med. Primatol.* **19**, 467-478.
- Hansson, B. & Westerberg, L. 2002 On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol. Ecol.* **11**, 2467-2474.

- Hedrick, P.W. 2007 Cyclic fitness variation and polymorphism: Cycling selection for litter size in arctic foxes. *Heredity* **98**, 339.
- Kaeuffer, R., Coltman, D.W., Chapuis, J.L., Pontier, D., & Réale, D. 2007a Unexpected heterozygosity in an island mouflon population founded by a single pair of individuals. *Proc. R. Soc. B* **274**, 527-533.
- Kaeuffer, R., Réale, D., Coltman, D.W. & Pontier, D. 2007b Detecting population structure using STRUCTURE software: effect of background linkage disequilibrium. *Heredity* doi:10.1038/sj.hdy.6801010.
- Keller, L.F., & Waller, D.M. 2002 Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* **17**, 230-241.
- Maddox, J.F., *et al.* 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.* **11**, 1275-1289.
- Opinion 2027 (Case 3010) 2003 Usage of 17 specific names based on wild species which are pre-dated by or contemporary with those based on domestic animals (Lepidoptera, Osteichthyes, Mammalia): conserved. *Bull. Zool. Nom.* **60**, 81-84.
- Pemberton, J. 2004 Measuring inbreeding depression in the wild: The old ways are the best. *Trends Ecol. Evol.* **19**, 613-615.
- R Development Core Team (2007). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reinhold, K. 2000 Maintenance of a genetic polymorphism by fluctuating selection on sex-limited traits. *J. Evol. Biol.* **13**, 1009-1014.
- Slate, J., David, P., Dodds, K.G., Veenvliet, B.A., Glass, B.C., Broad, T.E., & McEwan, J.C. 2004 Understanding the relationship between the inbreeding coefficient and multilocus heterozygosity: theoretical expectations and empirical data. *Heredity* **93**:255-265.
- Strimmer, K. 2007 fdrtool: Estimation and Control of (Local) False Discovery Rates. R package version 1.1.4.

PARTIE III

CONCLUSION

I.1 DISCUSSION GÉNÉRALE

Notre but était de comprendre la dynamique de la diversité génétique d'une population insulaire de mouflons pour laquelle nous disposions de l'historique complète et d'un jeu de données longitudinal important. Ces connaissances, la situation particulière de la population tels son isolement et la relative simplicité du système biologique, nous a donné l'opportunité de confronter les observations génétiques aux modèles et méthodes de la génétique de populations.

L'évolution de la diversité génétique de la population de mouflons de l'île Haute, dans des conditions qui semblent relativement simples (population isolée, pas de mutation, connaissance des effectifs depuis la fondation), ne suit pas les prédictions classiques des modèles neutres de génétique des populations. Du fait de son isolement et du fort effet fondateur, l'hétérozygotie (H) de cette population aurait dû être faible, mais nos observations ont montré que H est supérieure à celle attendue par les modèles de génétique des populations (Chapitre 1). A partir d'une approche par simulation stochastique basée sur l'individu, nous avons pu montrer que le maintien de l'hétérozygotie pourrait être dû à la sélection à l'encontre des individus les plus homozygotes (Chapitre 1). Il a été plusieurs fois suggéré que la relation entre la consanguinité approximée par H - mesurée à des marqueurs neutres - et différentes composantes de la valeur sélective (fécondité, condition physique) n'est pas facile à mettre en évidence (Cf. Introduction; Hansson & Westerberg 2002, Coltman & Slate 2003, Balloux et al. 2004, Slate et al. 2004); pourtant elle semble forte dans cette population de mouflons (Chapitre 4 et 5). Ce résultat pourrait être dû à l'effet fondateur qui aurait engendré de forts déséquilibres de liaison (Chapitre 2), accroissant la relation entre marqueurs neutres et marqueurs sous sélection (Chapitre 1,4 et 5).

Les liens entre marqueurs neutres et valeur sélective sont partiellement confirmés par la relation entre la condition physique des femelles, la charge parasitaire et la consanguinité (Chapitre 4). En effet, les individus les plus consanguins (caractérisés par

une hétérozygotie faible) sont en moins bonne condition physique, ont une charge parasitaire plus importante, et pourraient avoir une survie plus faible, notamment en phase de forte densité. Les effets de la forte densité de population sur le parasitisme pourraient d'ailleurs être doubles : d'une part, elle favoriserait la transmission des helminthes excrétés dans les fèces et faciliterait l'infection multiple des individus; d'autre part, les ressources trophiques limitées affecteraient directement la condition physique des individus. En moins bonne condition physique, ces individus seraient alors plus sensibles à l'infection parasitaire.

La relation entre H et la fécondité est plus complexe (Chapitre 5) mais souligne, elle aussi, un effet potentiel de la sélection. Les femelles les plus homozygotes mettent bas plus fréquemment des jumeaux. Celles-ci pourraient être avantagées lorsque les conditions environnementales sont bonnes car elles doubleraient leur valeur sélective par rapport aux femelles n'ayant qu'un jeune. Mais à forte densité de population et/ou durant les années où les conditions climatiques sont rudes, ce sont les individus hétérozygotes qui pourraient être avantagés en ne mettant bas qu'un seul jeune. Le fait d'avoir des jumeaux, lorsque les ressources trophiques sont insuffisantes, peut en effet devenir critique pour la survie des brebis (Clutton-Brock et al. 1996). Les femelles avec des jumeaux peuvent également les abandonner diminuant ainsi la probabilité de survie des agneaux et par conséquent la valeur sélective des mères (Réale et al. 1999). Il faudrait, pour appuyer ce scénario, vérifier le lien direct entre la fécondité et la valeur sélective en prenant compte la contribution reproductrice totale des femelles.

Le maintien de l'hétérozygotie dans la population de l'île Haute est aussi favorisé par une taille efficace relativement élevée (Chapitre 3) et donc une dérive génétique réduite. La dynamique cyclique de la population entraînerait une réduction de la compétition inter mâles à faible densité de population qui permettrait aux juvéniles d'accéder plus rapidement à la reproduction (Coltman et al. 1999). La participation des juvéniles à la reproduction diminuerait la variance du succès reproducteur des mâles.

Finalement, la structuration de la population aurait pu influencer la dynamique de l'hétérozygotie (Falconer & Mckay 1996). Dans les sous-populations de petites tailles, les accouplements entre individus apparentés sont généralement plus fréquents ce qui augmente l'homozygotie tandis que la migration entre les sous-populations accroît

l'hétérozygotie. Mais les observations comportementales et les estimations réalisées à partir d'approches Bayésiennes, nous ont montré que la population de mouflons n'était sans doute pas spatialement structurée (Chapitre 2). Ce facteur ne semble donc pas jouer sur la dynamique des gènes.

En résumé, les effets de la sélection accrus par les conditions environnementales difficiles et la dynamique cyclique de la population, seraient les principaux mécanismes qui ont permis le maintien voire l'augmentation de l'hétérozygotie de la population de mouflons de Kerguelen de son introduction à nos jours.

Certaines observations dans cette population de mouflons semblent aller à l'encontre des prédictions attendues par des modèles ou théories de génétique des populations. Je les énumère rapidement, puis les discute en détail plus loin:

- Le succès de la fondation d'une population à partir d'un seul couple d'individus est inattendu pour une espèce longévive avec une fécondité faible (Chapitre 1). En effet, une taille minimale de 100 voire 1000 individus est souvent décrite comme la règle pour assurer la persistance d'une population (Thomas 1990).
- Bien que l'hétérozygotie soit forte dans cette population de mouflons, le nombre d'allèles est faible. Alors qu'il est généralement attendu qu'une faible diversité génétique limite le potentiel adaptatif et peut mener les populations à l'extinction (Saccheri et al. 1998, Spielman et al. 2004), cette population semble en bonne santé (les phases d'accroissement exponentiel tendent à le montrer; Chapitre 1)
- Une démographie fluctuante aurait un impact sur la diversité génétique (Motro & Thomson 1982, Vucetich & Waite 1999). Ces effets sont néanmoins complexes et, en association avec d'autres facteurs, peuvent être contraires aux prédictions classiques (Chapitre 3). De plus, la sélection fluctuante associée aux changements démographiques pourrait générer une dynamique inattendue de la diversité génétique (Chapitre 5).
- Les modèles classiques de génétique des populations ne donnent pas de résultats concluants par rapport aux observations faites dans la population de l'île Haute. Ils ont montré leurs limites que ce soit au niveau prédictif pour l'évolution de H

(Chapitre 1), mais aussi au niveau méthodologique pour l'estimation de la structure génétique (Chapitre 2).

I.1.1 Sur le succès de l'introduction de la population de mouflons

Les différents processus décrits au cours de cette thèse (sélection, combinaison système reproducteur et dynamique de la population) auraient permis de limiter l'accroissement de l'homozygotie avec le temps dans cette population. Mais le succès de l'introduction est probablement dû à la combinaison de plusieurs facteurs qui ne sont pas tous d'ordre génétique.

Concernant le succès démographique de la population, il est important de considérer les effets stochastiques (Shaffer 1981). Le maintien de la population durant les premières années a pu être liée aux variations stochastiques temporelles de l'habitat. Par exemple, un hiver trop rude avec un manteau neigeux important durant les 2-3 premières années, aurait pu limiter la survie des individus fondateurs. La stochasticité des processus démographiques comme la mort accidentelle d'un individu, un avortement ou une maturité sexuelle trop tardive pour un individu, auraient pu être fatal au maintien de la population durant les premières années. Finalement des effets stochastiques sur la composition génétique des individus (i.e., au moment de la fondation) ont probablement joué un rôle important. En effet, même si une partie des allèles délétères ont pu être éliminés dans la population ancestrale du zoo de Vincennes, les deux individus fondateurs de la population de l'île Haute ont pu porter, par hasard, les allèles les plus favorables (où les moins délétères) pour les nouvelles conditions environnementales. La présence d'allèles ayant permis un fort taux de gémellarité a pu favoriser l'accroissement exponentiel de la population, limitant en quelques générations les effets stochastiques environnementaux et démographiques. Pour corroborer l'importance des effets stochastiques sur le succès de l'introduction du mouflon sur l'île Haute, on peut rappeler qu'un premier essai d'introduction en 1956 de trois mouflons issus de la même population (Zoo de Vincennes) sur l'île Blakeney (située en face de l'île Haute et présentant des caractéristiques relativement similaires) a été un échec (Chapuis et al. 1994).

La plasticité observée dans la physiologie de la reproduction du mouflon, qui a permis une inversion instantanée du cycle de reproduction après le passage dans l'Hémisphère Sud, est sans doute un élément clé du succès de l'introduction. Le mouflon est aussi cité pour sa plasticité alimentaire (Faliu et al. 1990, Matrai & Urr 2000) qui aurait favorisé le succès de son introduction dans 28 pays européens (Weller & Decker 2001) mais aussi à travers le monde (Hawaii, Texas, Iles Canaries, Nouvelle Zélande et Argentine ; Weller & Decker 2001). Cette plasticité pourrait être due au croisement du mouflon Corse avec des moutons domestiques et des mouflons d'origines diverses (Tchécoslovaquie par exemple, Garel 2006).

Mais comme le soulignait Frankham (2005), le succès de l'introduction des espèces dans un nouvel environnement est encore mal compris. Il représente pourtant une question essentielle en biologie de la conservation à la fois dans la réintroduction des espèces menacées mais aussi dans la lutte contre des espèces envahissantes.

I.1.2 Sur la relation entre la diversité génétique et la survie des populations

Malgré la faible diversité génétique observée dans la population de mouflons, de 2 à 4 allèles par locus (Chapitre 1), la population ne montre aucun signe apparent de dépression de consanguinité. Ces observations rappellent que le rôle de la diversité génétique sur le maintien des populations est toujours discuté (Spielman et al. 2004, Ficetola et al. 2007, Reed 2007 et Jamieson 2007). Frankham (2005b) affirmait d'ailleurs qu'à sa connaissance, aucune étude en milieu naturel n'avait fait le lien de manière rigoureuse entre la perte de diversité génétique et le risque d'extinction.

Le guépard (*Acinonyx jubatus*) est classiquement cité comme l'exemple d'une espèce particulièrement fragilisée du fait de son appauvrissement génétique (O'brien et al. 1985). Cependant, selon Merola (1994) et Wielebnowski (1996), les effets négatifs de la consanguinité sur la survie du guépard n'ont été démontrés qu'en captivité. D'autre part Wielebnowski (1996) met en avant que la mortalité observée en captivité ne serait pas plus élevée chez *Acinonyx jubatus* que chez d'autres espèces de félidés et qu'il montrerait

une taille de portée en moyenne plus grande. La mortalité dépendrait aussi fortement des centres zoologiques où sont maintenus les guépards. Ces observations tendraient à relativiser le rôle de la faible diversité génétique dans la survie de cette espèce (voir aussi Caro & Laurenson 1994, Caughley 1994).

Plus récemment, Milot et al. (2007) ont mesuré un très faible niveau de diversité génétique dans des populations de deux espèces d'albatros (*Diomedea exulans* et *Diomedea amsterdamensis*), sans que soit observée de dépression de consanguinité. Dans ces deux études (O'Brien et al. 1985 et Milot et al. 2007) l'interprétation du faible niveau de diversité génétique observée reste spéculative. Pour le guépard, il a longtemps été affirmé qu'un ou plusieurs goulots d'étranglement auraient pu être à l'origine de cette faible diversité mais cette hypothèse a été rejetée notamment par Merola (1994). La même hypothèse est proposée par Milot et al. (2007), mais d'autres scénarios possibles sont aussi décrits: des fluctuations temporelles de N_e qui la maintiendraient à un niveau bas ou encore un faible taux de mutation qui limiterait l'accroissement de la diversité génétique.

Ces deux études montrent essentiellement que, malgré les 20 années qui les séparent, la compréhension des liens entre la diversité génétique et le maintien des populations reste floue. Les mécanismes principaux qui affectent la dynamique de la diversité génétique de ces populations restent incompris. Des scénarios « catastrophes » sont quelque fois proposés pour expliquer le faible niveau de diversité génétique dans des espèces considérées comme fragiles. Pourtant si le niveau de diversité n'est pas étudié sur plusieurs périodes, et si aucune mesure de valeur selective individuelle n'est effectuée entre populations présentant des degrés variables de diversité génétique, l'interprétation des causes et des conséquences de la diversité génétique peut être délicate.

Certains mécanismes comportementaux limitent les effets potentiellement néfastes d'une faible diversité. Chez certaines espèces, les accouplements entre individus apparentés sont limités par la dispersion systématique des individus d'un des deux sexes (Pusey et Wolf 1996, Handley & Perrin 2007). C'est l'un des principaux mécanismes d'évitement de la reproduction entre individus apparentés. D'un autre côté, il a été proposé qu'en augmentant le lien de parenté entre individus la consanguinité pouvait

faciliter l'expression de soins de parentèle, bénéfiques aux individus (Waser et al. 1986). L'appariement entre individus apparentés pourrait apparaître si les coûts des mécanismes d'évitement de la consanguinité (tel la dispersion) sont trop élevés (Bengtsson 1978, Waser et al. 1986).

Il est souvent proposé que la dépression de consanguinité au sein d'une population peut être réduite par le phénomène de purge des allèles délétères (Crnokrak & Barret 2002, Byers & Waller 1999). La purge se produit par élimination des allèles délétères à la suite d'une sélection contre des individus qui portent ces allèles. Ce phénomène pourrait expliquer le maintien de populations de petites tailles avec une faible diversité génétique (Crnokrak & Barret 2002, Byers & Waller 1999). La purge dépend de deux facteurs principaux : 1) le caractère délétère de la mutation : les mutations faiblement délétères pouvant être maintenues si la dérive est forte (Hedrick 1994); 2) la taille de la population : la dérive est plus forte que la sélection dans les petites populations et empêche l'élimination des allèles délétères (Crnokrak & Barret 2002). Les grandes populations dont la diversité génétique est soudainement réduite pourraient subir des effets de dépression de consanguinité beaucoup plus importants (Milot et al. 2007).

Il faut aussi séparer les causes naturelles et artificielles qui affectent la dynamique de la diversité. Les causes naturelles sont généralement adaptatives et se déroulent sur une large échelle de temps. Les causes artificielles (comme la chasse ou la pêche) peuvent être contre-adaptatives et affecter la dynamique de la diversité très rapidement (Harris et al. 2002, Coltman et al. 2003).

Une faible diversité génétique peut être liée à la biologie de l'espèce : des individus longévifs, avec un système de reproduction de type polygyne extrême (où seul quelques mâles dominants se reproduisent à chaque saison de reproduction) perdent de la diversité plus rapidement que des espèces caractérisées par un système de reproduction aléatoire et des individus dont la durée de vie est d'un an (Nunney 1993, voir aussi Nevo 1978 pour une comparaison inter taxa et Mitton 1997). Mais une faible diversité peut aussi être causée par des facteurs anthropiques qui ont pu influencer la taille et la dynamique de la population. Ces facteurs anthropiques auront des effets d'autant plus

importants qu'ils peuvent aller à l'encontre de la sélection naturelle ou générer une sélection non adaptative : chez le mouflon d'Amérique (*Ovis canadensis*) par exemple, la chasse des individus à large trophée et porteurs de « bons gènes » permettant aux individus de moins bonne qualité de se reproduire (sélection en faveur des individus les moins adaptés, Coltman et al. 2003). Pour une synthèse des conséquences de la chasse sur la génétique des populations et la biologie évolutive, on pourra se référer à Harris et al. (2002). La surpêche entraîne aussi des réductions drastiques de la diversité génétique des populations de poissons (Hauser et al. 2002, Hoarau et al. 2005)

David (1998) et Coltman & Slate (2003) suggèrent l'existence d'un biais de publication en faveur d'articles qui démontrent une corrélation significative entre l'hétérozygotie et des traits reliés à la valeur selective. Il se pourrait que le même genre de biais de publication existe en biologie de la conservation où des études de plus en plus nombreuses relient la fragilité des espèces ayant une faible diversité génétique à la probabilité de survie. Par exemple, l'homme est cité comme le facteur d'extinction le plus important à l'heure actuelle; mais pour mettre en évidence les effets anthropiques sur la diminution de la diversité génétique et la probabilité d'extinction, des études longitudinales intégrant des mesures tout au long la vie des populations sont nécessaires. Or la plupart des études sont ponctuelles et transversales. Dans ces conditions, il est difficile de connaître les causes exactes qui ont amené à la diversité génétique observée: goulots d'étranglement, caractéristiques biologiques de l'espèce, ou causes anthropiques. A ma connaissance, seule l'étude de Goossens et al. (2006) sur l'Orang-outan (*Pongo pygmaeus*) met en relation les effets anthropiques, la diversité génétique et la survie des individus.

I.1.3 Sur le rôle de la diversité génétique et le potentiel adaptatif

La population de mouflons de l'île Haute se caractérise par un taux de gémellarité particulièrement élevé (Boussès et al. 1994) et une réduction de la taille des individus comparée aux populations Européennes. Le taux de gémellarité s'expliquerait par un effet

fondateur qui a permis l'introduction d'allèles liés à l'accroissement de la taille de portée. Ces effets aléatoires ne seraient pas forcément adaptés à l'environnement de l'île Haute (Chapitre 5). Par contre, pour la réduction de la taille des individus, il est plus difficile de séparer les effets fondateurs des effets d'une adaptation aux conditions insulaires, ou encore d'une limitation des ressources trophiques. Une étude de génétique quantitative serait utile pour estimer l'héritabilité de la taille des individus et distinguer les effets environnementaux et génétiques. Dans une population, l'héritabilité mesure la proportion de la variation phénotypique observée qui est causée par les variations génétiques entre individus (Falconer & Mackay 1996). Mais ce type d'étude nécessite de disposer du pedigree de la population, que nous n'avons pu construire dans la population de mouflons étudiée du fait de sa faible diversité génétique.

Pour comprendre la relation entre la diversité génétique et le potentiel adaptatif, les QTL (Quantitative Trait Loci) auraient pu être utiles dans cette étude. Les QTL sont des marqueurs associés aux gènes qui interviennent dans la régulation des caractères phénotypiques quantitatifs. Ils pourraient permettre par exemple de mieux comprendre et de mesurer les effets de la faible diversité génétique observée dans la population et les variations de taille individuelle (McKay & Latta 2002).

Le nombre de QTL et le nombre moyen d'allèles par QTL sont certainement déterminants dans la relation entre la diversité génétique d'une population et la variation des caractéristiques phénotypiques. On peut d'ailleurs penser que plus le nombre de QTL impliqués dans l'expression d'un caractère est grand, moins l'effet d'une faible diversité génétique à ces locus se fera ressentir. En effet, si le nombre de QTL est grand pour un caractère donné, les nombreuses possibilités de génotypes pourront générer une large gamme de phénotypes. Ainsi, plus l'architecture génétique d'un caractère est complexe, plus il devient difficile de prédire la direction et la force de la relation entre la diversité génétique et le caractère mesuré. A certains locus, les allèles pourront avoir des effets additifs alors que dans d'autres cas, il peut s'agir d'effets de dominance. Dans le Tableau 3 de l'introduction, quelques exemples montrent les effets des avantages de l'hétérozygotie sur certaines caractéristiques qualitatives. Cependant la plupart de ces

exemples s'intéressent à l'expression d'enzymes liées directement à la présence de certains allèles à un unique gène.

Par contre, lorsque l'on étudie des caractères quantitatifs complexes qui font intervenir beaucoup de gènes, il devient extrêmement difficile d'illustrer l'action de chacun des gènes, et par là-même les effets du niveau de diversité génétique à chacun des gènes sur l'expression d'un caractère. Lorsque l'on parle d'interaction entre les gènes on peut citer les interactions de type pléiotropique (un gène va affecter plusieurs traits) ou épistatique (l'action d'un gène est régulée de manière non additive, par un ou plusieurs gènes indépendants).

Les effets de la diversité génétique sur les caractéristiques qualitatives peuvent aussi être différents selon l'implication du trait étudié dans la valeur sélective d'un individu (Merilä & Sheldon 1999). Ainsi, Derose & Roff (1999) ont montré que les traits morphologiques sont moins affectés par la consanguinité que les caractéristiques biodémographiques. Cette différence serait due à l'architecture génétique des caractères; notamment la variance de dominance plus forte pour les caractéristiques biodémographiques, rendrait plus sensibles à la consanguinité que les traits morphologiques (Derose & Roff 1999). Les traits tels que les caractéristiques biodémographiques qui sont étroitement associés à la valeur sélective et soumis à une forte sélection directionnelle, devraient aussi avoir une variabilité génétique additive réduite de même qu'une variance de dominance proportionnellement plus élevée que les traits morphologiques généralement sujets à la sélection stabilisatrice (Merilä & Sheldon 1999).

Une autre approche possible dans le cadre d'une étude de la relation entre variabilité génétique et caractéristiques phénotypiques, consiste à comparer la diversité génétique et celle de traits quantitatifs entre plusieurs populations. L'étude des Qst , l'équivalents des Fst pour des caractères quantitatifs (Merilä & Crnokrak 2001), permet de mesurer la divergence phénotypique entre les populations. Les Fst sont estimés à partir de marqueurs neutres et donc soumis uniquement *a priori* à la dérive alors que le Qst est généré à la fois par la dérive génétique et la sélection naturelle. La comparaison des deux indices permet de mettre en évidence la contribution relative des effets de sélection et de

dérive sur la divergence phénotypique entre deux populations (Spitze 1993). Un Qst inférieur au Fst révèle un effet stabilisateur de la sélection sur la divergence phénotypique occasionnée par la dérive. A l'inverse, un Qst supérieur au Fst indique que la sélection accroît la divergence relativement aux effets de dérive. Enfin lorsque Qst et Fst sont égaux, les forces de sélection sont compensées par les effets de dérive. Une revue de Merilä & Crnokrak (2001) montre que la différenciation observée dans les Qst est généralement plus forte que celle des Fst , ce qui suggère des effets importants de la sélection sur la divergence phénotypique entre populations.

L'étude des Fst - Qst semble un outil puissant dans les études de biologie évolutive (McKay & Latta 2002), mais quelques problèmes ont été soulevés, notamment par rapport aux marqueurs utilisés. Ainsi, les Fst peuvent être calculés sur des locus soumis à la sélection, ce qui ne respecte pas les conditions nécessaires à la comparaison entre Qst et Fst . Latta (1998) a montré, à l'aide de simulations, que les valeurs de Fst mesurées aux QTL sont plus fortes que celles mesurées à des loci neutres. L'utilisation des microsatellites peut aussi générer des Fst qui sont plus faibles par rapport aux allozymes, et donc biaiser la comparaison Qst - Fst (Hendry, 2002).

L'existence d'autres populations de mouflons bien étudiées en France (Garel 2006) permettrait d'effectuer des études sur les Qst - Fst afin de mieux comprendre si la réduction de taille des individus observée dans la population de Kerguelen (Boussès & Réale 1996) est due aux effets de la sélection ou aux effets fondateurs (dérive génétique).

I.1.4 Sur la diversité génétique, la sélection et la dynamique fluctuante

La plupart des modèles de génétique ou de biologie de population considèrent des populations d'effectifs stables. Pourtant les fluctuations démographiques peuvent avoir des effets importants sur la diversité génétique et sont décrites comme un phénomène qui accélérerait la dérive. (Motro & Thomson 1985, Frankham 1995, Vucetich & Waite 1999). Pourtant, ces effets négatifs peuvent être tamponnés par des facteurs comportementaux comme nous l'avons observé dans le chapitre 3.

Il a aussi été montré que la sélection fluctuante générée par des conditions environnementales changeantes, permettait le maintien de la diversité génétique (Ellner & Sasaki, 1996, Moorcroft et al. 1996, Turelli et al. 2001). Dans le chapitre 5, la relation entre H et la propension à faire des jumeaux, pourrait illustrer un cas intéressant de sélection fluctuante : à forte densité de population, le coût de production des jumeaux serait trop important et pourrait limiter la survie des individus homozygotes. À l'inverse, à faible densité, lorsque les conditions de milieu permettent une bonne survie des jeunes et des femelles adultes, les homozygotes pourraient produire beaucoup plus de jeunes. Un cas relativement similaire a été observé chez le renard arctique (*Alopex lagopus*) pour lequel il a été démontré que la taille de portée est déterminée génétiquement (Axenovich et al. 2007). Un gène unique contrôlerait la fécondité des femelles avec un système d'allèles récessif/dominant. Les individus homozygotes porteurs de l'allèle récessif produiraient des petites portées alors que les individus porteurs de l'allèle dominant donneraient naissance à des grandes portées. Selon le modèle développé par Axenovich et al. (2007), le polymorphisme de cette population pourrait être maintenu si « (1) les fluctuations de la disponibilité des ressources sont régulières dans le temps et en amplitude, (2) si les variations de taille de portée à la naissance ne dépendent pas de la disponibilité des ressources ».

Dans la population de mouflons, ces effets de sélection fluctuante liés à des phénomènes de densité dépendance et à la cyclicité de la dynamique de populations, pourraient constituer un autre moteur du maintien du fort taux de H (Chapitre 1 et 5). Cet effet serait d'autant plus important que la sélection n'agit que sur les femelles, les mâles jouant le rôle de réservoir des allèles ne favorisant pas la fécondité multiple et permettrait de maintenir la diversité à ces gènes (Reinhold 2000)

Dans le chapitre 4 nous n'avons pu mettre en évidence de relation entre la diversité génétique aux locus CMH et la charge parasitaire. Ces résultats semblaient là aussi aller contre nos résultats du chapitre 1, où nous suggérions des effets de sélection au niveau des locus CMH. Mais en fait, il pourrait là encore s'agir d'effets combinés de la dynamique de la population et de la sélection fluctuante. En effet, selon la densité parasitaire rencontrée sur l'île Haute, le nombre de mouflons et les conditions

environnementales, la pression de sélection pour le maintien de la diversité génétique aux locus CMH pourrait varier au cours du temps. Les résultats obtenus dans le chapitre 1 pourraient souligner un effet moyen à long terme de la sélection. L'absence de relation entre charge parasitaire et diversité génétique aux locus CMH observée dans le chapitre 4 pourrait souligner une relaxation de la sélection du fait de bonnes conditions environnementales les années précédant le crash de la population.

Mais de manière plus générale il n'est pas toujours évident de mettre en évidence les effets de la sélection sur certains locus. Les tests permettant de mettre en évidence la sélection peuvent être sensibles à la dynamique de la population, aux processus de mutation, ou bien aux liens entre les marqueurs génétiques utilisés et les gènes sous effet de la sélection (i.e. Manly 1985 pour une revue; voir par exemple Skibinski, 2000). La difficulté à mettre en évidence un phénomène de sélection a pour conséquence une sous-estimation de son rôle dans la dynamique de la diversité génétique.

I.1.5 Sur la validation des méthodes de génétiques des populations

Le nombre de méthodes de génétique des populations est en pleine explosion, que cela soit au niveau des estimateurs de structure des populations, de la taille efficace, ou encore de l'inférence des processus démographiques (Excoffier & Heckel, 2006). Chacune d'elle, est basée sur des algorithmes et des hypothèses de travail différentes. De plus la validité des modèles face au non respect de certaines hypothèses est peu ou pas connue. Au vue de la complexité des modèles, il est très difficile de pouvoir faire un choix éclairé sur leur utilisation. Une très bonne connaissance de la statistique de la génétique des populations et quelquefois de la programmation, est nécessaire pour être capable de cerner les paramètres d'importance de ces modèles, ce qui sort souvent du domaine de compétence des utilisateurs. L'utilisation du logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) illustre ces propos. Bien que très largement utilisé (cité plus de 1300 fois; source Scopus), très peu d'études ont testé ses limites, que cela soit en conditions naturelles ou par simulation (Evanno et al. 2005, Berry et al. 2004, Waples & Gaggiotti 2006, Kaeuffer et al. 2007 c).

Au travers de cette thèse, j'ai plusieurs fois été confronté au manque d'informations sur les limitations des modèles/méthodes. Dans le chapitre 1, l'application des modèles classiques décrivant la dynamique de la diversité génétique des populations ne permet pas de décrire la dynamique de H de la population de mouflons, en partie du fait des hypothèses restrictives à la base du modèle de Wright-Fisher (Caballero 1994). Par exemple, l'hypothèse d'absence de recouvrement de générations rend ces modèles inappropriés pour de nombreuses espèces animales. Le chapitre 2 met à jour les problèmes que l'on peut potentiellement rencontrer dans le logiciel STRUCTURE lorsque le déséquilibre de liaison entre les locus est trop fort. Dans le chapitre 3, la forte variabilité des intervalles de confiance entre les méthodes d'estimation de la taille efficace, souligne un fort effet de la méthode sur les mesures de N_e , mais la complexité des méthodes ne permet pas de comprendre cette variabilité.

Certaines méthodes de génétique de population implémentées dans des logiciels faciles d'emploi et qui ne se basent que sur des informations génétiques, permettent d'obtenir des estimations de paramètres décrivant la biologie des populations (tels la structure génétique et la taille efficace) sans avoir à passer par l'observation *in situ*. Le danger devient alors de ne se fier qu'aux résultats théoriques sans confrontation avec la réalité biologique. En effet, les résultats statistiques n'ont pas toujours une signification biologique (Pritchard et al. 2000), d'autre part les résultats de ces méthodes dépendent largement des conditions d'utilisation (chapitre 2).

Deux études récentes illustrent les limites du « tout génétique ». Johnson et al. (2007) testent plusieurs méthodes utilisées pour l'inférence des processus démographiques des populations à partir de données génétiques actuelles (Tajima 1989, Rogers & Harpending 1992, Templeton et al. 1995, Nielsen & Wakeley 2001). Ils comparent la démographie réelle d'une population aux résultats obtenus par ces méthodes pour tester leur capacité à détecter les goulets d'étranglement et montrent alors que les méthodes de Templeton et al. (1995) et de Tajima (1989) sont bien moins performantes que celles de Nielsen & Wakeley (2001), bien que les deux premières soient largement utilisées en génétique de la conservation. Busch et al. (2007), dans une démarche relativement similaire, testent trois méthodes de détection des goulets d'étranglement à

partir de l'information génétique d'une population à un temps t (Cornuet & Luikart 1996, Luikart & Cornuet 1998, et Garza & Williamson 2001). Pour ce faire, ils utilisent une base de données sur des rats kangourous (*Dipodomys spectabilis*) ayant subi une très forte diminution de la taille de leur population. Aucune de ces méthodes n'a permis de mettre en évidence la réduction de la taille de population. Pour expliquer ces résultats, les auteurs évoquent la possibilité de l'arrivée d'individus externes à la population qui auraient pu gommer les effets du goulot d'étranglement. En conclusion de ces deux études, leurs auteurs soulignent l'importance de la connaissance de l'histoire et des suivis des populations, de la biologie de l'espèce. Dans ces deux cas d'espèces en déclin, l'unique référence aux données génétiques et à l'utilisation de ces méthodes auraient conduit à ignorer l'existence de goulots d'étranglement.

I.1.6 Sur les simulations basées sur l'individu

Pour aller plus loin dans la compréhension de la dynamique de la diversité génétique de la population de mouflons, nous avons développé une approche par simulation basée sur l'individu. Elle a permis de comparer l'évolution de la diversité génétique attendue par les modèles classiques de génétique des populations à celle attendue par simulation sous diverses contraintes. Nous avons pu alors mettre en évidence que la sélection jouait sûrement un rôle important dans cette dynamique (Chapitre 1), et de quelle manière la dynamique de la population tamponnait les effets du système de reproduction (Chapitre 3).

La démographie très particulière de la population et notamment la fondation par un couple unique rend inadéquate l'utilisation des modèles déterministes de génétique des populations, dans la prédiction de la dynamique de la diversité génétique. En effet, les effets stochastiques (démographique et génétique) très importants, générés par le faible nombre de fondateurs, ne permettent pas l'utilisation des modèles déterministes qui sont basés sur les lois probabilistes « des grands nombres » (Judson 1994). D'autre part, les modèles déterministes de génétique des populations requièrent quelquefois des simplifications qui ne sont pas compatibles avec la réalité des systèmes biologiques

(accouplements non aléatoires, pas de chevauchement des générations, production d'un nombre fini de gamètes par chaque individu) et ne peuvent prendre en compte qu'une part limitée de la complexité du système biologique (Cartwright 1999, Peck 2004). De plus, la modélisation déterministe implique de manière implicite que tous les individus au sein d'une catégorie (classe d'âge) sont équivalents et décrits par des constantes identiques (DeAngelis 1991). Cette simplification efface toutes les différences entre les individus, que cela soit au niveau de la reproduction ou de la survie, gommant toute la variance inter individuelle pourtant essentielle. Enfin, les effets « locaux » ou causés par des interactions entre les individus d'un même groupe social ne sont pas pris en compte (Judson 1994) alors qu'en génétique des populations, ils sont essentiels car ils affectent la dynamique des gènes comme nous l'avons vu dans l'introduction et le chapitre 3.

Les modèles par simulation basés sur l'individu sont très souples et peuvent être adaptés relativement facilement à chaque question biologique posée par leurs utilisateurs. Ils permettent de s'échapper des contraintes et hypothèses de travail imposées dans les modèles déterministes. Ils sont le nouvel outil des généticiens des populations (Balloux 2001, Strand 2002, Kuo & Janzen 2003, Peng & Kimmel 2005, Guillaume & Rougemont 2006). Dans la simulation, le nombre de paramètres n'est pas limité notamment grâce la puissance de calcul des ordinateurs (Grimm 1999), ce qui permet de prendre en compte, de manière aisée, la variabilité biologique et différents niveaux hiérarchiques, depuis le gène en passant par l'individu, la sous-population, la population et la métapopulation (Hutson et al. 1988). En contre partie, discerner l'effet relatif de chacun des paramètres peut devenir problématique (Grimm 1999). Pour qu'un modèle de simulation soit cohérent, sa construction demande de bien connaître la biologie et la génomique de l'espèce étudiée au risque de générer des trajectoires dénuées de tout sens biologique.

I.2 CONCLUSION

La très bonne connaissance de la population de mouflons de l'île Haute m'a permis de confronter les modèles et prédictions théoriques aux observations sur une population de mammifères en conditions naturelles. Tout au long de ce travail, j'ai montré, malgré une situation relativement proche de celle attendue pour appliquer les modèles classiques de génétique des populations (notamment isolement de la population, pas de mutation observée, population a priori non structurée), que les observations restent éloignées des prédictions des modèles. Ce qui tend à démontrer que nos connaissances en génétique des populations sont encore fragmentaires ou du moins que la complexité de la réalité biologique rendent les prédictions de modèles trop simples approximatives. Les outils conceptuels ne sont peut être pas encore à même de répondre aux besoins de la génétique de la conservation. L'approche par simulation pourrait constituer un outil de choix pour permettre de mieux cerner les facteurs importants dirigeant la diversité génétique des populations.

D'autre part, cette étude permet de soutenir l'importance des études à long terme en biologie évolutive. Ces études sont nécessaires pour mettre en évidence les paramètres essentiels qui ont dirigé la dynamique de la diversité génétique des populations au cours du temps. Mais la constitution de bases de données sur plusieurs générations prend beaucoup de temps et des moyens importants, ce qui s'oppose à l'approche actuelle qui consiste souvent à générer un grand nombre d'articles sur un laps de temps court avec des données qui peuvent parfois être incomplètes, conduisant parfois à des conclusions erronées. Enfin, le travail de biologiste de terrain est dénigré car peu productif en termes de publications ; les connaissances fondamentales du fonctionnement des populations et des espèces sont souvent mises de côté au profit de questions plus à la mode. La politique scientifique actuelle qui met l'emphase sur le tout génétique conduit donc à abandonner le travail certes lourd du terrain mais cependant indispensable. Pourtant l'interprétation de tout résultat ne peut se faire qu'à la lumière de la connaissance de la biologie de l'espèce. Il y a donc urgence à réhabiliter les études naturalistes si on veut gagner en compréhension des processus, et ne pas se méprendre dans l'interprétation des résultats.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguilar A, Roemer G, Debenham S, *et al.* (2004) High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3490-3494.
- Alberts SC, Altmann J (1995) Balancing costs and opportunities: Dispersal in male baboons. *American Naturalist* **145**, 279-306.
- Allaine D (2000) Sociality, mating system and reproductive skew in marmots: Evidence and hypotheses. *Behavioural Processes* **51**, 21-34.
- Allison AC (1954) Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J* **1**, 290-294.
- Amos W, Harwood J (1998) Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **353**, 177-186.
- Amos W, Balmford A (2001) When does conservation genetics matter? *Heredity* **87**, 257-265.
- Amos W, Worthington Wilmer J, Fullard K, *et al.* (2001) The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **268**, 2021-2027.
- Anderson EC, Williamson EG, Thompson EA (2000) Monte Carlo evaluation of the likelihood for Ne from temporally spaced samples. *Genetics* **156**, 2109-2118.
- Anthony LL, Blumstein DT (2000) Integrating behaviour into wildlife conservation: the multiple ways that behaviour can reduce Ne. *Biological Conservation* **95**, 303-315.
- Aparicio JM, Ortego J, Cordero PJ (2006) What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? *Molecular Ecology* **15**, 4659-4665.
- Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M (2002) Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics* **3**, 299-309.
- Arkush KD, Giese AR, Mendonca HL, *et al.* (2002) Resistance to three pathogens in the endangered winter-run chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): Effects of inbreeding and major histocompatibility complex genotypes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**, 966-975.

- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species* Harvard University Press, Cambridge.
- Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, second edition edn. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Avise JC, Hamrick JL (1996) *Conservation Genetics: case histories from nature* Chapman & Hall, New York.
- Axenovich TI, Zorkoltseva IV, Akberdin IR, *et al.* (2007) Inheritance of litter size at birth in farmed arctic foxes (*Alopex lagopus*, Canidae, Carnivora). *Heredity* **98**, 99-105.
- Bailey AD, Pavelitz T, Weiner AM (1998) The microsatellite sequence (CT)(n).(GA)(n) promotes stable chromosomal integration of large tandem arrays of functional human U2 small nuclear RNA genes. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 2262-2271.
- Balanya J, Segarra C, Prevosti A, Serra L (1994) Colonization of America by *Drosophila-Subobscura* - the Founder Event and a Rapid Expansion. *Journal of Heredity* **85**, 427-432.
- Ballard JW, Kreitman M (1995) Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trends in Ecology and Evolution* **10**, 485-488.
- Balloux F (2001) EASYPOP (version 1.7): A computer program for population genetics simulations. *Journal of Heredity* **92**, 301-302.
- Balloux F, Brunner H, Lugon-Moulin N, Hausser J, Goudet J (2000) Microsatellites can be misleading: An empirical and simulation study. *Evolution* **54**, 1414-1422.
- Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**, 155-165.
- Balloux F, Lehmann L (2003) Random Mating with a Finite Number of Matings. *Genetics* **165**, 2313-2315.
- Balloux F, Amos W, Coulson T (2004) Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? *Molecular Ecology* **13**, 3021-3031.
- Barbault R (1997) *Biodiversité, Introduction à la biologie de la Conservation* Hachette, Paris.

- Beaumont MA (2003) Estimation of population growth or decline in genetically monitored populations. *Genetics* **164**, 1139-1160.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (2000) GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations., Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université Montpellier II, Montpellier, France.
- Bengtsson BO (1978) Avoiding Inbreeding - at What Cost. *Journal of Theoretical Biology* **73**, 439-444.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* **57**, 289-300.
- Bernatchez L, Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology* **16**, 363-377.
- Berry O, Tocher MD, Sarre SD (2004) Can assignment tests measure dispersal? *Molecular Ecology* **13**, 551-561.
- Berryman AA (1991) Population theory: an essential ingredient in pest prediction, management and policy-making. *American Entomologist* **37**, 202-204.
- Berthier P, Beaumont MA, Cornuet J-M, Luikart G (2002) Likelihood-based estimation of the effective population size using temporal changes in allele frequencies: A genealogical approach. *Genetics* **160**, 741-751.
- Blows MW, Hoffmann AA (2005) A reassessment of genetic limits to evolutionary change. *Ecology* **86**, 1371-1384.
- Bon R, Gonzalez G, Bosch MD, Cugnasse JM (1992) Ram Rut-Involvement in a Hunted Population of Mouflons. *Acta Theriologica* **37**, 63-71.
- Bonneaud C, Mazuc J, Gonzalez G, *et al.* (2003) Assessing the cost of mounting an immune response. *American Naturalist* **161**, 367-379.
- Borel MJ, Buchowski MS, Turner EA, Goldstein RE, Flakoll PJ (1998) Protein turnover and energy expenditure increase during exogenous nutrient availability in sickle cell disease. *American Journal of Clinical Nutrition* **68**, 607-614.

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32**, 314-331.
- Boussès P, Reale D (1998) Biology of twinning and origin of an unusually high twinning rate in an insular mouflon population. *Zeitschrift Fur Säugetierkunde-International Journal of Mammalian Biology* **63**, 147-153.
- Boussès P, Réale D (1994) Valeur du masque facial comme critère d'âge des femelles de mouflons Corse (*Ovis musimon*) dans la population de Kerguelen. *Mammalia* **58**, 301-304.
- Boussès P, Réale D (1996) Syndrome d'insularité dans une population récente de mouflon (*Ovis musimon*) des îles Kerguelen. *Vie Milieu* **46**, 285-290.
- Boussès P, Réale D, J.L.Chapuis (1994) Mortalité hivernale massive dans la population de mouflons Corse (*Ovis musimon*) de l'archipel subantarctique de Kerguelen. *Mammalia* **58**, 211-223.
- Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* **234**, 177-186.
- Brown JL, Brown ER (1998) Are inbred offspring less fit? Survival in a natural population of Mexican jays. *Behavioral Ecology* **9**, 60-63.
- Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* **18**, 225-239.
- Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV (2003) The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 249-256.
- Buican D (1989) *L'évolution et les évolutionnismes* Presses Universitaires de France, Paris.
- Buican D (1993) *La génétique et l'évolution* Presses Universitaires de France, Paris.
- Bulmer MG (1973) Inbreeding in the Great Tit. *Heredity* **30**, 313-325.
- Busch JD, Waser PM, DeWoody JA (2007) Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Molecular Ecology* **16**, 2450-2462.

- Butlin RK (1998) Levels of genetic polymorphism: Marker loci versus quantitative traits. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* **353**, 187-198.
- Byers DL, Waller DM (1999) Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**, 479-513.
- Caballero A (1994) Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* **73**, 657-679.
- Cabaret J, Durette-Desset MC (1991) Polymorphism of helminths: from morphology to genetics. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* **66 Suppl 1**, 17-22.
- Carchini G, Chiarotti F, Di Domenico M, Mattoccia M, Paganotti G (2001) Fluctuating asymmetry, mating success, body size and heterozygosity in *Coenagrion scitulum* (Rambur) (Odonata: Coenagrionidae). *Animal Behaviour* **61**, 661-669.
- Carissan-Lloyd FMM, Pipe RK, Beaumont AR (2004) Immunocompetence and heterozygosity in the mussel *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **84**, 377-382.
- Caro TM, Laurenson MK (1994) Ecological and Genetic-Factors in Conservation - a Cautionary Tale. *Science* **263**, 485-486.
- Cartwright N (1999) *The Dappled World: A Study of the Boundaries of Science* Cambridge University Press, Cambridge.
- Case TJ (1978) A general explanation for insular body size trends in terrestrial vertebrates. *Ecology* **59**, 1-18.
- Cassinello J, Gomendio M, Roldan ERS (2001) Relationship between coefficient of inbreeding and parasite burden in endangered gazelles. *Conservation Biology* **15**, 1171-1174.
- Caughley G (1994) Directions in Conservation Biology. *Journal of Animal Ecology* **63**, 215-244.
- Chapuis JL, Boussès P, Barnaud G (1994) Alien mammals, impact and management in the French Subantarctic islands. *Biological Conservation* **67**, 97-104.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621-631.

- Charlesworth B (1994) *Evolution in age-structured populations* Cambridge University Press, Cambridge.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1999) The genetic base of inbreeding depression. *Genetical Research* **74**, 329-340.
- Charlesworth B, Charlesworth D, Barton NH (2003) The effects of genetic and geographic structure on neutral variation. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **34**, 99-125.
- Charlesworth D (1991) The Apparent Selection on Neutral Marker Loci in Partially Inbreeding Populations. *Genetical Research* **57**, 159-175.
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **18**, 237-268.
- Chen X (1993) Comparison of inbreeding and outbreeding in hermaphroditic *Arianta arbustorum* (L.) (land snail). *Heredity* **71**, 456-461.
- Chesser RK (1991) Gene diversity and female philopatry. *Genetics* **127**, 437-447.
- Chesser RK (1991) Influence of gene flow and breeding tactics on gene diversity within populations. *Genetics* **129**, 573-583.
- Chesser RK, Rhodes OE, Sugg DW, Schnabel A (1993) Effective sizes for subdivided populations. *Genetics* **135**, 1221-1232.
- Cheverud JM, Routman EJ (1996) Epistasis as a source of increased additive genetic variance at population bottlenecks. *Evolution* **50**, 1042-1051.
- Clobert J, Danchin E, Nichols JD, Dhondt AA (2001) *Dispersal* Oxford University Press.
- Clutton-Brock TH (1988) Reproductive Success: Studies of Individual Variation in Contrasting Breeding Systems (ed. Clutton-Brock TH). The University of Chicago Press Chicago.
- Clutton-Brock TH, Guinness FE, Albon SD (1982) *Red Deer: Behavior and Ecology of Two Sexes* The University of Chicago Press, Chicago.
- Clutton-Brock TH, Major M, Albon SD, Guinness FE (1987) Early development and population dynamics in red deer. I. Density- dependent effects on juvenile survival. *Journal of Animal Ecology* **56**, 53-67.

- Clutton-Brock TH, Stevenson IR, Marrow P, *et al.* (1996) Population fluctuations, reproductive costs and life-history tactics in female Soay sheep. *Journal of Animal Ecology* **65**, 675-689.
- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A (1998) A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Research* **8**, 1229-1231.
- Coltman DW, Bancroft DR, Robertson A, *et al.* (1999) Male reproductive success in a promiscuous mammal: Behavioural estimates compared with genetic paternity. *Molecular Ecology* **8**, 1199-1209.
- Coltman DW, Pilkington JG, Smith JA, Pemberton JM (1999) Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* **53**, 1259-1267.
- Coltman DW, Smith JA, Bancroft DR, *et al.* (1999) Density-dependent variation in lifetime breeding success and natural and sexual selection in Soay rams. *American Naturalist* **154**, 730-746.
- Coltman DW, Pilkington J, Kruuk LEB, Wilson K, Pemberton JM (2001) Positive genetic correlation between parasite resistance and body size in a free-living ungulate population. *Evolution* **55**, 2116-2125
- Coltman DW, Festa-Bianchet M, Jorgenson JT, Strobeck C (2002) Age-dependent sexual selection in bighorn rams. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **269**, 165-172.
- Coltman DW, O'Donoghue P, Jorgenson JT, *et al.* (2003) Undesirable evolutionary consequences of trophy hunting. *Nature* **426**, 655-658.
- Coltman DW, Pilkington JG, Pemberton JM (2003) Fine-scale genetic structure in a free-living ungulate population. *Molecular Ecology* **12**, 733-742.
- Coltman DW, Slate J (2003) Microsatellite measures of inbreeding: A meta-analysis. *Evolution* **57**, 971-983.
- Common JEA, Di WL, Davies D, Kelsell DP (2004) Further evidence for heterozygote advantage of GJB2 deafness mutations: A link with cell survival. *Journal of Medical Genetics* **41**, 573-575.
- Cooper GJ (2003) *The Science of the Struggle for Existence: On the Foundation of Ecology* Cambridge University Press, Cambridge.

- Corander J, Waldmann P, Sillanpaa MJ (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* **163**, 367-374.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* **153**, 1989-2000.
- Coulon A, Guillot G, Cosson JF, *et al.* (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: Empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology* **15**, 1669-1679.
- Coulson TN, Pemberton JM, Albon SD, *et al.* (1998) Microsatellites reveal heterosis in red deer. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **265**, 489-495.
- Crnokrak P, Barret SCH (2002) Purging the genetic load: A review of the experimental evidence. *Evolution* **56**, 2347-2358.
- Crnokrak P, Roff DA (1999) Inbreeding depression in the wild. *Heredity* **83**, 260-270.
- Crollius HR, Jaillon O, Dasilva C, *et al.* (2000) Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Research* **10**, 939-949.
- Crow JF (1993) Mutation, mean fitness and genetic load. In: *Oxford Surveys of Evolutionary Biology*, pp. 9:3-42.
- Crow JF, Denniston C (1998) Inbreeding and variance effective population numbers. *Evolution* **42**, 482-495.
- Crutsinger GM, Collins MD, Fordyce JA, *et al.* (2006) Plant genotypic diversity predicts community structure and governs an ecosystem process. *Science* **313**, 966-968.
- David P (1998) Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity* **80**, 531-537.
- Dawson KJ, Belkhir K (2001) A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. *Genetical Research* **78**, 59-77.

- De Belloq GJ, Porcherie A, Moulia C, Morand S (2007) Immunocompetence does not correlate with resistance to helminth parasites in house mouse subspecies and their hybrids. *Parasitology Research* **100**, 321-328.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, *et al.* (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science* **273**, 1856-1862.
- DeAngelis DL, Gross LJ (1992) Preface. In: *Individual-based Models and Approaches in Ecology* (eds. DeAngelis DL, Gross LJ), pp. xv-xviii. Chapman & Hall, New York.
- DeRose MA, Roff DA (1999) A comparison of inbreeding depression in life-history and morphological traits in animals. *Evolution* **53**, 1288-1292.
- Devillard S (2004) *Importance des échelles spatio-temporelles dans la variabilité et l'évolution de la dispersion chez les mammifères. Les multiples visages du chat domestique (Felis catus L.)*, Thèse de Doctorat, Université Lyon I.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, *et al.* (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3166-3170.
- Dickerson RE (1971) The structure of cytochrome c and rates of molecular evolution. *Journal of Molecular Evolution* **1**, 26-45.
- Dietz JM, Baker AJ (1993) Polygyny and female reproductive success in golden lion tamarins, *Leontopithecus rosalia*. *Animal Behaviour* **46**, 1067-1078.
- Dubois M, Khazraie K, Guilhem C, Maublanc ML, LePendou Y (1995) Philopatry in mouflon rams during the rutting season: Psycho-ethological determinism and functional consequences. *Behavioural Processes* **35**, 93-100.
- Dubois M, Quenette PY, Bideau E, Magnac MP (1993) Seasonal Range Use By European Mouflon Rams In Medium Altitude Mountains. *Acta Theriologica* **38**, 185-198.
- Duchesne P, Bernatchez L (2002) AFLPOP: A computer program for simulated and real population allocation, based on AFLP data. *Molecular Ecology Notes* **2**, 380-383.

- Eisen EJ, Hanrahan JP, Legates JE (1973) Effects of population size and selection intensity on correlated responses to selection for postweaning gain in mice. *Genetics* **74**, 157-170.
- Ellner S, Hairston NG (1994) Role of Overlapping Generations in Maintaining Genetic-Variation in a Fluctuating Environment. *American Naturalist* **143**, 403-417.
- Ellner S, Sasaki A (1996) Patterns of genetic polymorphism maintained by fluctuating selection with overlapping generations. *Theoretical Population Biology* **50**, 31-65.
- England PR, Osler GHR, Woodworth LM, *et al.* (2003) Effects of intense versus diffuse population bottlenecks on microsatellite genetic diversity and evolutionary potential. *Conservation Genetics* **4**, 595-604.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* **11**, 1591-1604.
- Estoup A, Tailliez C, Cornuet JM, Solignac M (1995) Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution* **12**, 1074-1084.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Ewens WJ (1972) The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theoretical Population Biology* **3**, 87-112.
- Excoffier L, Heckel G (2006) Computer programs for population genetics data analysis: A survival guide. *Nature Reviews Genetics* **7**, 745-758.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetics*, 4th edn. Longman, Harlow, UK.
- Faliu L, Cugnasse JM, Auvray F, Orliac D, Rech J (1990) Le régime alimentaire du mouflon de Corse (*Ovis ammon musimon*) dans le massif du Carroux-Espinouse d'après l'analyse du contenu de 125 panses. *Revue Med. Vet.* **141**, 545-556.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567-1587.

- Festa-Bianchet M, Jorgenson JT, Berube CH, Portier C, Wishart WD (1997) Body mass and survival of bighorn sheep. *Canadian Journal of Zoology* **75**, 1372-1379.
- Festa-Bianchet M, Jorgenson JT, Réale D (2000) Early development, adult mass, and reproductive success in bighorn sheep. *Behavioral Ecology* **11**, 633-639.
- Ficetola GF, Garner TWJ, De Bernardi F (2007) Genetic diversity, but not hatching success, is jointly affected by postglacial colonization and isolation in the threatened frog, *Rana latastei*. *Molecular Ecology* **16**, 1787-1797.
- Field D, Wills C (1998) Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S-cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 1647-1652.
- Flint J, Hill AVS, Bowden DK (1986) High frequencies of thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature* **321**, 744-750.
- Foster PL, Trimarchi JM (1994) Adaptive Reversion of a Frameshift Mutation in Escherichia-Coli by Simple Base Deletions in Homopolymeric Runs. *Science* **265**, 407-409.
- Frankham R (1995) Effective Population-Size Adult-Population Size Ratios in Wildlife - a Review. *Genetical Research* **66**, 95-107.
- Frankham R (1995) Inbreeding and Extinction - a Threshold Effect. *Conservation Biology* **9**, 792-799.
- Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* **10**, 1500-1508.
- Frankham R (1997) Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* **78**, 311-327.
- Frankham R (1997) Inbreeding and extinction: Island populations. *Conservation Biology* **12**, 665-675.
- Frankham R (1999) Quantitative genetics in conservation biology. *Genetical Research, Camb.* **74**, 237-244.
- Frankham R, Lees K, Montgomery ME, *et al.* (1999) Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Animal Conservation* **2**, 255-260.

- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics* Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R (2005) Ecosystem recovery enhanced by genotypic diversity. *Heredity* **95**, 183.
- Frankham R (2005) Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity* **94**, 385.
- Frankham R (2005) Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 750-755.
- Fredrickson R, Hedrick P (2002) Body size in endangered Mexican wolves: Effects of inbreeding and cross-lineage matings. *Animal Conservation* **5**, 39-43.
- Freeland JR (2005) *Molecular Ecology* John Wiley & Sons Chichester.
- Frelinger JA (1972) The maintenance of transferrin polymorphism in pigeons (*Saccharomyces cerevisiae*-eggwhite). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 326-329.
- Friar EA, Ladoux T, Roalson EH, Robichaux RH (2000) Microsatellite analysis of a population crash and bottleneck in the Mauna Kea silversword, *Argyroxiphium sandwicense* ssp. *sandwicense* (Asteraceae), and its implications for reintroduction. *Molecular Ecology* **9**, 2027-2034.
- Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ (1994) Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* **266**, 107-109.
- Gaillard JM, Festa-Bianchet M, Yoccoz NG, Loison A, Toigo C (2000) Temporal variation in fitness components and population dynamics of large herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics* **31**, 367-393.
- Garel M (2006) *Conséquences de la chasse et des contraintes environnementales sur la démographie des populations d'ongulés : L'exemple du mouflon méditerranéen (Ovis gmelini musimon × Ovis sp.) en France et de l'élan (Alces alces) en Norvège*, Thèse de Doctorat Université Lyon I.
- Garel M, Cugnasse JM, Gaillard JM, *et al.* (2005) Reproductive output of female mouflon (*Ovis gmelini musimon* × *Ovis sp.*): A comparative analysis. *Journal of Zoology* **266**, 65-71.

- Garniergere P, Dillmann C (1992) A computer-program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. *Journal of Heredity* **83**, 239-239.
- Garza JC, Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* **10**, 305-318.
- Gavrilets S (2003) Perspective: Models of speciation - What have we learned in 40 years? *Evolution* **57**, 2197-2215.
- Geist V (1971) *Mountain sheep: a study behavior and evolution* Chicago University Press, Chicago.
- Gemmell NJ, Slate J (2006) Heterozygote advantage for fecundity. *PloS ONE* **1**. (1) e125
- Gillespie JH (1999) The role of population size in molecular evolution. *Theoretical Population Biology* **55**, 145-156.
- Gillespie JH, Kojima K-I (1968) The degree of polymorphisms in enzymes involved in energy production compared to that in nonspecific enzymes in two drosophila ananassae populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **61**, 582-585.
- Gjerde B, Gunnes K, Gjedrem T (1983) Effect of inbreeding on survival and growth in rainbow trout. *Aquaculture* **34**, 327-332.
- Goldringer I, Bataillon T (2004) On the distribution of temporal variations in allele frequency: Consequences for the estimation of effective population size and the detection of loci undergoing selection. *Genetics* **168**, 563-568.
- Goossens B, Chikhi L, Ancrenaz M, *et al.* (2006) Genetic signature of anthropogenic population collapse in orang-utans. *Plos Biology* **4**, 285-291.
- Goudet J, Keller L (2002) The correlation between inbreeding and fitness: does allele size matter? *Trends in ecology and evolution* **17**, 201-202.
- Grant PR, Grant BR (1995) The founding of a new population of Darwin's finches. *Evolution* **49**, 229-240.
- Grant PR, Grant BR, Petren K (2001) A population founded by a single pair of individuals: establishment, expansion and evolution. *Genetica* **112-113**, 359-382.
- Greaves JH, Redfern R, Ayres PB, Gill JE (1977) Warfarin resistance: a balanced polymorphism in the Norway rat. *Genetical Research* **30**, 257-263.

- Greenwood PJ, Harvey PH, Perrins CM (1978) Inbreeding and dispersal in the great tit. *Nature* **271**, 52-54.
- Gregory TR (2002) A bird's-eye view of the C-value enigma: Genome size, cell size, and metabolic rate in the class aves. *Evolution* **56**, 121-130.
- Gribbin J, Hook A (2004) *The Scientists: a History of Science Told Through the Lives of Its Greatest Inventors* Random House Trade Paperbacks New York.
- Grimm V (1999) Ten years of individual-based modelling in ecology: What have we learned and what could we learn in the future? *Ecological Modelling* **115**, 129-148.
- Groombridge JJ, Jones CG, Bruford MW, Nichols RA (2000) Conservation biology - 'Ghost' alleles of the Mauritius kestrel. *Nature* **403**, 616-616.
- Guillaume F, Rougemont J (2006) Nemo: An evolutionary and population genetics programming framework. *Bioinformatics* **22**, 2556-2557.
- Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* **170**, 1261-1280.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) GENELAND: A computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* **5**, 712-715.
- Gulland FMD (1992) The Role of Nematode Parasites in Soay Sheep (*Ovis aries* L.) Mortality During a Population Crash. *Parasitology* **105**, 493-503.
- Gulland FMD (1995) The impact of infectious diseases on wild animal populations: a review. In: *Ecology and Infectious Diseases in Natural Populations* (eds. Dobson AP, Grenfell BT), pp. 20-51. Cambridge University Press, Cambridge.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.
- Gustafsson L, Nordling D, Andersson MS, Sheldon BC, Qvarnstrom A (1994) Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philosophical Transactions - Royal Society of London, B* **346**, 323-331.
- Hadrys H, Balick M, Schierwater B (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular ecology* **1**, 55-63.

- Hamrick JL, Godt MJW (1990) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, breeding resources* (eds. Brown AHD, Clegg MT, Kahler ALBS, Weir BD). Sinauer Sunderland.
- Handley LJJ, Perrin N (2007) Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology* **16**, 1559-1578.
- Hanssen SA, Folstad I, Erikstad KE (2003) Reduced immunocompetence and cost of reproduction in common eiders. *Oecologia* **136**, 457-464.
- Hansson B, Westerberg L (2002) On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology* **11**, 2467-2474.
- Hansson B, Westerdahl H, Hasselquist D, Akesson M, Bensch S (2004) Does linkage disequilibrium generate heterozygosity-fitness correlations in great reed warblers? *Evolution* **58**, 870-879.
- Harris H, Hopkinson DA, Edwards YH (1977) Polymorphism and the subunit structure enzymes: A contribution to the neutralist-selection controversy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 698-701.
- Harris RB, Wall WA, Allendorf FW (2002) Genetic consequences of hunting: what do we know and what should we do? *Wildlife Society Bulletin* **30**, 634-643.
- Hartl DL, G.Clark A (1997) *Principles of Population genetics*, Third edition edn. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Ramirez JHB, Carvalho GR (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11742-11747.
- Hedrick PW (1994) Purging Inbreeding Depression and the Probability of Extinction - Full-Sib Mating. *Heredity* **73**, 363-372.
- Hedrick PW (1999) Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* **53**, 313-318.
- Hedrick PW (2000) *Genetics of Populations*, Second Edition edn. Jones and Bartlett, Boston, MA.
- Hedrick PW, Kalinowski ST (2000) Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **31**, 139-162.

- Hedrick PW, Kim TJ (2000) Genetics of complex polymorphisms: parasites and maintenance of MHC variation. In: *Evolutionary Genetics from Molecules to Morphology* (eds. Singh RS, Krimbas CK), pp. 204-234. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 629-636.
- Hedrick P, Fredrickson R, Ellegren H (2001) Evaluation of d2, a microsatellite measure of inbreeding and outbreeding, in wolves with a known pedigree. *Evolution* **55**, 1256-1260.
- Hedrick PW (2003) A heterozygote advantage. *Science* **302**, 57-57.
- Hedrick PW (2004) Comment on "Parasite selection for immunogenetic optimality". *Science* **303**.
- Heinze G, Schemper M (2002) A solution to the problem of separation in logistic regression. *Statistics in Medicine* **21**, 2409-2419.
- Hendry AP (2002) $Q(ST) \neq F(ST)$? *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 502-502.
- Hildner KK, Soule ME (2004) Relationship between the energetic cost of burrowing and genetic variability among populations of the pocket gopher, *T. bottae*: Does physiological fitness correlate with genetic variability? *Journal of Experimental Biology* **207**, 2221-2227.
- Hill WG (1972) Effective size of population with overlapping generation. *Theoretical population biology* **3**, 278.
- Hill WG (1979) A note on effective population size with overlapping generation. *Genetics* **92**, 317-322.
- Hill WG (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical research* **38**, 209-216.
- Hill WG, Robertson A (1968) Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics*. **38**, 226-231.
- Hirshfield MF, Tinkle DW (1975) Natural-Selection and Evolution of Reproductive Effort. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 2227-2231.

- Hitchings SP, Beebee TJC (1998) Loss of genetic diversity and fitness in Common Toad (*Bufo bufo*) populations isolated by inimical habitat. *Journal of Evolutionary Biology* **11**, 269-283.
- Hoarau G, Boon E, Jongma DN, *et al.* (2005) Low effective population size and evidence for inbreeding in an overexploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **272**, 497-503.
- Hogg JT, Forbes SH (1997) Mating in bighorn sheep: Frequent male reproduction via a high-risk "unconventional" tactic. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **41**, 33-48.
- Höglund J, Alatalo RV, Lundberg A, Rintamäki PT, Lindell J (1999) Microsatellite markers reveal the potential for kin selection on black grouse leks. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **266**, 813-816.
- Holand O (1992) Fat indices versus ingesta-free body fat in European Roe Deer. *The Journal of Wildlife Management* **56**, 241-245.
- Houdijk JGM, Jackson F, Coop RL, Kyriazakis I (2006) Rapid improvement of immunity to *Teladorsagia circumcincta* is achieved through a reduction in the demand for protein in lactating ewes. *International Journal for Parasitology* **36**, 219-227.
- Houdijk JGM, Kyriazakis I, Coop RL, Jackson F (2001) The expression of immunity to *Teladorsagia circumcincta* in ewes and its relationship to protein nutrition depend on body protein reserves. *Parasitology* **122**, 661-672.
- Houdijk JGM, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL (2001) The relationship between protein nutrition, reproductive effort and breakdown in immunity to *Teladorsagia circumcincta* in periparturient ewes. *Animal Science* **72**, 595-606.
- Hughes AR, Stachowicz JJ (2004) Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8998-9002.
- Huston M, DeAngelis DL, Post W (1988) New computers models unify ecological theory. *Bioscience* **38**, 682-691.
- Iizuka M (2001) The effective size of fluctuating populations. *Theoretical Population Biology* **59**, 281-286.

- Iizuka M, Tachida H, Matsuda H (2002) A neutral model with fluctuating population size and its effective size. *Genetics* **161**, 381-388.
- Irvine RJ, Corbishley H, Pilkington JG, Albon SD (2006) Low-level parasitic worm burdens may reduce body condition in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*). *Parasitology* **133**, 465-475.
- Jackson PJ, Walthers EA, Kalif AS, *et al.* (1997) Characterization of the variable-number tandem repeats in *vrrA* from different *Bacillus anthracis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1400-1405.
- Jamieson IG (2007) Has the debate over genetics and extinction of island endemics truly been resolved? *Animal Conservation* **10**, 139-144.
- Janeway CA, Jr. (1999) T-cell development. *Immunologist* **7**, 5-6.
- Janeway CA, Jr. (2001) How the immune system works to protect the host from infection: A personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7461-7468.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 424-429.
- Jiménez JA, Hughes KA, Alaks G, Graham L, Lacy RC (1994) An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* **266**, 271-273.
- John JL (1994) The avian spleen: A neglected organ. *The Quarterly Review of Biology*. **69**, 327-351.
- John JL (1994) Nematodes and the spleen: An immunological relationship. *Experientia* **50**, 15-22.
- John JL (1995) Parasites and the avian spleen: Helminths. *Biological Journal of the Linnean Society* **54**, 87.
- Johnson DL (1977) Inbreeding in populations with overlapping generations. *Genetics* **87**, 581-591.
- Johnson JA, Dunn PO, Bouzat JL (2007) Effects of recent population bottlenecks on reconstructing the demographic history of prairie-chickens. *Molecular Ecology* **16**, 2203-2222.

- Johnson MTJ, Agrawal AA (2005) Plant genotype and environment interact to shape a diverse arthropod community on evening primrose (*Oenothera biennis*). *Ecology* **86**, 874-885.
- Johnson MTJ, Lajeunesse MJ, Agrawal AA (2006) Additive and interactive effects of plant genotypic diversity on arthropod communities and plant fitness. *Ecology Letters* **9**, 24-34.
- Jorde LB (1995) Linkage Disequilibrium as a Gene-Mapping Tool. *American Journal of Human Genetics* **56**, 11-14.
- Jorde LB (2000) Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Research* **10**, 1435-1444.
- Jorde LB, Watkins WS, Carlson M, *et al.* (1994) Linkage Disequilibrium Predicts Physical Distance in the Adenomatous Polyposis-Coli Region. *American Journal of Human Genetics* **54**, 884-898.
- Jorde PE, Ryman N (1994) Temporal allele frequency change and estimation of effective population size in population with overlapping generations. *Genetics* **139**, 1077-1090.
- Judson OP (1994) The Rise of the Individual-Based Model in Ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **9**, 9-14.
- Kaessmann H, Zollner S, Gustafsson AC, *et al.* (2002) Extensive linkage disequilibrium in small human populations in Eurasia. *American Journal of Human Genetics* **70**, 673-685.
- Kaeuffer R, Pontier D, Devillard S, Perrin N (2004) Effective size of two feral domestic cat populations (*Felis catus* L.): effect of the mating system. *Molecular Ecology* **13**, 483-490.
- Kaeuffer R, Coltman DW, Chapuis JL, Pontier D, Réale D (2007) Unexpected heterozygosity in an island mouflon population founded by a single pair of individuals. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **274**, 527-533.
- Kaeuffer R, Reale D, Coltman DW, Pontier D (2007) Detecting population structure using STRUCTURE software: effect of background linkage disequilibrium. *Heredity* **99**, 374-380.

- Kaeuffer R, Coltman DW, Chapuis JL, Réale D, Pontier D (2007) The effects of cyclic dynamics and mating system on the effective size of an island mouflon population *Molecular Ecology*. Sous Presse.
- Kaeuffer R, Coltman DW, Chapuis JL, Réale D, Pontier D. Local effects of inbreeding on fecundity and consequence for genetic diversity in Kerguelen mouflon. Soumis à *Biology Letters*
- Kaiser H (1979) The dynamics of populations as result of the properties of individual animals. *Fortschritte der Zoologie* **25**, 109-136.
- Kalinowski ST, Hedrick PW, Miller PS (2000) Inbreeding depression in the Speke's gazelle captive breeding program. *Conservation Biology* **14**, 1375-1384.
- Kalinowski ST, Waples RS (2002) Relationship of effective to census size in fluctuating populations. *Conservation Biology* **16**, 129-136.
- Kashi Y, Soller M (1999) Functionnal roles of microsatellites and minisatellites. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (ed. Goldstein DBSC), pp. 10-23. Oxford University Press, New York.
- Keller LF, Arcese P, Smith JNM, Hochachka WM, Stearns SC (1994) Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature* **372**, 356-357.
- Keller LF, Jeffery KJ, Arcese P, *et al.* (2001) Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **268**, 1387-1394.
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 230-241.
- Kimura M (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintain in a finite populations. *Genetics* **49**, 725-738.
- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 2868-2872.

- Kimura M, Ohta T (1971) On the rate of molecular evolution. *Journal of Molecular Evolution* **1**, 1-17.
- Kirkpatrick M, Jarne P (2000) The effects of a bottleneck on inbreeding depression and the genetic load. *American Naturalist* **155**, 154-167.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, *et al.* (1989) Dynamics of Mitochondrial-DNA Evolution in Animals - Amplification and Sequencing with Conserved Primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 6196-6200.
- Kokko H, Rankin DJ (2006) Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. **361**, 319-334.
- Kolbe JJ, Glor RE, Schettino LR, *et al.* (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* **431**, 177-181.
- Kosowska B (1992) The effect of genetic variability (degree of homozygosity) on serum levels of the anterior pituitary hormones prolactin, corticotropin, and growth hormone in rats. *Biochemical Genetics* **30**, 581-589.
- Kristan DM (2002) Effects of intestinal nematodes during lactation: Consequences for host morphology, physiology and offspring mass. *Journal of Experimental Biology* **205**, 3955-3965.
- Kristan DM, Hammond KA (2001) Parasite infection and caloric restriction induce physiological and morphological plasticity. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **281**, R502-R510.
- Kruuk LEB, Clutton-Brock TH, Albon SD, Pemberton JM, Guinness FE (1999) Population density affects sex ratio variation in red deer. *Nature* **399**, 459-461.
- Kuo CH, Janzen FJ (2003) BOTTLESIM: A bottleneck simulation program for long-lived species with overlapping generations. *Molecular Ecology Notes* **3**, 669-673.
- Kurtz J, Kalbe M, Aeschlimann PB, *et al.* (2004) Major histocompatibility complex diversity influences parasite resistance and innate immunity in sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **271**, 197-204.
- Kusumo HT, Pfister CA, Wootton JT (2006) Small-scale genetic structure in the sea palm *Postelsia palmaeformis* Ruprecht (Phaeophyceae). *Marine Biology* **149**, 731-742.

- Kyle CJ, Karels TJ, Davis CS, *et al.* (2007) Social structure and facultative mating systems of hoary marmots (*Marmota caligata*). *Molecular Ecology* **16**, 1245-1255.
- Kyriazakis I, Anderson DH, Oldham JD, Coop RL, Jackson F (1996) Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: Effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. *Veterinary Parasitology* **61**, 297-313.
- Kyriazakis I, Tolkamp BJ, Hutchings MR (1998) Towards a functional explanation for the occurrence of anorexia during parasitic infections. *Animal Behaviour* **56**, 265-274.
- Lacy RC (1993) Impacts of inbreeding in natural and captive populations of vertebrates: Implications for conservation. *Perspectives in Biology and Medicine* **36**, 480-496.
- Lacy RC (1997) Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy* **78**, 320-335.
- Ladoukakis ED, Zouros E (2001) Recombination in animal mitochondrial DNA: Evidence from published sequences. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 2127-2131.
- Lande R, Schemske DW (1985) The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic Models. *Evolution* **39**, 24-40.
- Landry C, Garant D, Duchesne P, Bernatchez L (2001) 'Good genes as heterozygosity': The major histocompatibility complex and mate choice in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **268**, 1279-1285.
- Latta RG (1998) Differentiation of allelic frequencies at quantitative trait loci affecting locally adaptive traits. *American Naturalist* **151**, 283-292.
- Laval G, SanCristobal M, Chevalet C (2003) Maximum-likelihood and Markov chain Monte Carlo approaches to estimate inbreeding and effective size from allele frequency changes. *Genetics* **164**, 1189-1204.
- Leberg P (2005) Genetic approaches for estimating the effective size of populations. *Journal of Wildlife Management* **69**, 1385-1399.

- Leberg PL (2002) Estimating allelic richness: Effect of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* **11**, 2445-2449.
- Lebreton JD, Burnham KP, Clobert J, Anderson DR (1992) Modeling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecological Monographs* **62**, 67-118.
- Lecis R, Pierpaoli M, Biro ZS, *et al.* (2006) Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci. *Molecular Ecology* **15**, 119-131.
- Lee CE (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 386-391.
- Lehmann T, Hawley WA, Kamau L, *et al.* (1996) Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: Comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity* **77**, 192-200.
- Lenormand T, Bourguet D, Guillemaud T, Raymond M (1999) Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature* **400**, 861-864.
- Lewontin RC (1964) The interaction of selection and linkage. I General considerations; heterotic modes. *Genetics* **49**, 49-67.
- Lewontin RC, Krakauer J (1973) Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics* **74**, 175-195.
- Li CC (1988) Pseudo-random mating populations. In celebration of the 80th anniversary of the Hardy-Weinberg Law. *Genetics* **119**, 731-737.
- Li W-H (1997) *Molecular Evolution* Sinauer Associates, Sunderland.
- Lindahl T (1993) Instability and Decay of the Primary Structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Lippe C, Dumont P, Bernatchez L (2006) High genetic diversity and no inbreeding in the endangered copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Catostomidae, Pisces): The positive sides of a long generation time. *Molecular Ecology* **15**, 1769-1780.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, *et al.* (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-377.

- Lochmiller RL, Deerenberg C (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: Just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**, 87-98.
- Lott DF (1991) *Intraspecific variation in the social systems of wild vertebrates* Cambridge University Press.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* **89**, 238-247.
- Luikart G, Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* **12**, 228-237.
- Luikart G, Sherwin WB, Steele BM, Allendorf FW (1998) Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology* **7**, 963-974.
- Luong LT, Heath BD, Polak M (2007) Host inbreeding increases susceptibility to ectoparasitism. *Journal of Evolutionary Biology* **20**, 79-86.
- Luzzatto L, Usanga FA, Reddy S (1969) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science* **164**, 839-842.
- Lynch M, Pfrender M, Spitze K, *et al.* (1999) The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution* **53**, 100-110.
- Lynch M, Walsh B (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits* Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts.
- MacRae JC (1993) Metabolic consequences of intestinal parasitism. *Proceedings of the Nutrition Society* **52**, 121-130.
- Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, *et al.* (2001) An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Research* **11**, 1275-1289.
- Madsen T, Stillé B, Shine R (1996) Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation* **75**, 113-118.
- Malécot G (1948) *Les mathématiques de l'hérédité* Masson, Paris.
- Manel S, Gaggiotti OE, Waples RS (2005) Assignment methods: matching biological questions techniques with appropriate. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 136-142.

- Manly BFJ (1985) *The statistics of Natural Selection on Animals Populations* Chapman and Hall, London.
- Martin AP, Palumbi SR (1993) Body Size, Metabolic-Rate, Generation Time, and the Molecular Clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 4087-4091.
- Martins AG, Netto NT, Aulagnier S, *et al.* (2002) Population subdivision among mouflon sheep (*Ovis gmelini*) ewes and ranging behaviour of rams during the rut. *Journal of Zoology* **258**, 27-37.
- Maruyama T, Fuerst PA (1985) Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in small population that was formed by recent bottleneck. *Genetics* **111**, 675-689.
- Maruyama T, Fuerst PA (1985) Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. III. Genic homozygosity in populations which experience periodic bottlenecks. *Genetics* **111**, 691-703.
- Maruyama T, Nei M (1981) Genetic variability maintained by mutation and overdominant selection in finite population. *Genetics* **98**, 441-459.
- Matocq MD (2004) Reproductive success and effective population size in woodrats (*Neotoma macrotis*). *Molecular Ecology* **13**, 1635-1642.
- Matrai K, Urr A (2001) Effect of vegetation on mouflon habitat selection- A preliminary study. In: *Proceedings of the third international symposium mouflon*, Sopron, Hungary.
- Maxam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 560-564.
- Maynard-Smith J, Haigh J (1974) The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetic Research* **23**, 23-35.
- McAnulty RW, Familton AS, Sedcole RD, Sykes AR (2001) Changes in the resistance of the ewe to infection with *Teladorsagia circumcincta* during late pregnancy and lactation. *Animal Science* **72**, 159-168.
- McKay JK, Bishop JG, Lin JZ, *et al.* (2001) Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **268**, 1715-1721.

- McKay JK, Latta RG (2002) Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 285-291.
- Mead S, Stumpf MPH, Whitfield J, *et al.* (2003) Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric Kurulike epidemics. *Science* **300**, 640-643.
- Medina KL, Smithson G, Kincade PW (1993) Suppression of B-Lymphopoiesis During Normal-Pregnancy. *Journal of Experimental Medicine* **178**, 1507-1515.
- Mehranvar L, Healey M, Farrell A, Hinch S (2004) Social versus genetic measures of reproductive success in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Evolutionary Ecology Research* **6**, 1167-1181.
- Merila J, Cmokrak P (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 892-903.
- Merila J, Sheldon BC (1999) Genetic architecture of fitness and nonfitness traits: empirical patterns and development of ideas. *Heredity* **83**, 103-109.
- Merola M (1994) Reassessment of Homozygosity Acid the Case for Inbreeding Depression in the Cheetah, *Acinonyx-Jubatus* - Implications for Conservation. *Conservation Biology* **8**, 961-971.
- Meyer CG, Amedofu GK, Brandner JM, *et al.* (2002) Selection for deafness?. *Nature Medicine* **8**, 1332-1333.
- Miller LM, Kapuscinski AR (1997) Historical analysis of genetic variation reveals low effective population size in a northern pike (*Esox lucius*) population. *Genetics* **147**, 1249-1258.
- Miller PS, Hedrick PW (2001) Purging of inbreeding depression and fitness decline in bottlenecked populations of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 595-601.
- Mills LS, Smouse PE (1994) Demographic Consequences of Inbreeding in Remnant Populations. *American Naturalist* **144**, 412-431.
- Milot E, Weimerskirch H, Duchesne P, Bernatchez L (2007) Surviving with low genetic diversity: the case of albatrosses. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **274**, 779-787.
- Mitton JB (1997) *Selection in Natural Population* Oxford University Press, New York.

- Mitton JB, Carey C, Kocher TD (1986) The relation of enzyme heterozygosity to standard and active oxygen consumption and body size of tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Physiol Zool* **59**, 574-582.
- Montgomery ME, Woodworth LM, Nurthen RK, *et al.* (2000) Relationships between population size and loss of genetic diversity: comparisons of experimental results with theoretical predictions. *Conservation genetics* **1**, 33-43.
- Moorcroft PR, Albon SD, Pemberton JM, Stevenson IR, Clutton-Brock TH (1996) Density-dependent selection in a fluctuating ungulate population. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **263**, 31-38.
- Morand S, Poulin R (2000) Nematode parasite species richness and the evolution of spleen size in birds. *Canadian Journal of Zoology* **78**, 1356-1360.
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 208-216.
- Morjan CL, Rieseberg LH (2004) How species evolve collectively: Implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. *Molecular Ecology* **13**, 1341-1356.
- Motro U, Thomson G (1982) On Heterozygosity and the effective size of populations subject to size changes. *Evolution* **36**, 1059-1066.
- Mulvey M, Aho JM, Rhodes Jnr OE (1994) Parasitism and white-tailed deer: Timing and components of female reproduction. *Oikos* **70**, 177-182.
- Navarro A, Barton NH (2002) The effects of multilocus balancing selection on neutral variability. *Genetics* **161**, 849-863.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei M, Fuerst PA, Chakraborty R (1978) Subunit molecular weight and genetic variability of proteins in natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 3359-3362.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1-10.
- Nei M, Tajima F (1981) Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics* **98**, 625-640.

- Nevo E (1978) Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical Population Biology* **13**, 121-177.
- Nevo E, Honeycutt RL, Yonekawa H, Nelson K, Hanzawa N (1993) Mitochondrial-DNA Polymorphisms in Subterranean Mole-Rats of the *Spalax ehrenbergi* Superspecies in Israel, and Its Peripheral Isolates. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 590-604.
- Newey S, Thirgood S (2004) Parasite-mediated reduction in fecundity of mountain hares. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **271**, S413-S415.
- Newman D, Pilson D (1997) Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: Experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution* **51**, 354-362.
- Nielsen R, Wakeley J (2001) Distinguishing migration from isolation: A Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics* **158**, 885-896.
- Nunney L (1991) The influence of age structure and fecundity on the effective population size. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **246**, 71-76.
- Nunney L (1993) The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution* **47**, 1329-1341.
- Nunney L (1995) Measuring the ratio of effective population size to adult number using genetic and ecological data. *Evolution* **49**, 389-392.
- Nunney L (1999) The effective size of a hierarchically structured population. *Evolution* **53**, 1-10.
- Nunney L (2002) The effective size of annual plant populations: The interaction of a seed bank with fluctuating population size in maintaining genetic variation. *American Naturalist* **160**, 195-204.
- Nunney L, Elam DR (1994) Estimating the effective population size of conserved populations. *Conservation biology* **8**, 175-184.
- O'Brien SJ, Evermann JF (1988) Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution* **3**, 254-259.

- O'Brien SJ, Roelke ME, Marker L, *et al.* (1985) Genetic-Basis for Species Vulnerability in the Cheetah. *Science* **227**, 1428-1434.
- O'Donnell KH, Chen CT, Wensink PC (1994) Insulating DNA Directs Ubiquitous Transcription of the *Drosophila melanogaster* Alpha-1-Tubulin Gene. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 6398-6408.
- Ohta T (1992) The Nearly Neutral Theory of Molecular Evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* **23**, 263-286.
- Ohta T (1995) Synonymous and Nonsynonymous Substitutions in Mammalian Genes and the Nearly Neutral Theory. *Journal of Molecular Evolution* **40**, 56-63.
- Ohta T (2002) Near-neutrality in evolution of genes and gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16134-16137.
- Ohta T, Kimura M (1971) On the constancy of the evolutionary rate of cistron. *Journal of Molecular Evolution* **1**, 18-25.
- Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* **29**, 294-307.
- Opinion 3010 (2003) Usage of 17 specific names based on wild species which are predated by or contemporary with those based on domestic animals: conserved. *The Bulletin of Zoological nomenclature* **60**, 81-84.
- Orti G, Pearse DE, Avise JC (1997) Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10745-10749.
- Ott J, Rabinowitz D (1997) The effect of marker heterozygosity on the power to detect linkage disequilibrium. *Genetics* **147**, 927-930.
- Packer C (1979) Inter-Troop transfer and inbreed avoidance in *Papio anubis*. *Animal Behaviour* **27**, 1-36.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* **4**, 347-354.

- Page SLL, Livermore RA, Cooper DW, Taylor AC (2000) Genetic analysis of a documented population bottleneck: introduced Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in New Zealand. *Molecular Ecology* **9**, 753-763.
- Peck SL (2004) Simulation as experiment: A philosophical reassessment for biological modeling. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 530-534.
- Peck SL (2004) Simulation as experiment: a philosophical reassessment for biological modelling. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 530-534.
- Peleg L, Frisch A, Goldman B, *et al.* (1998) Lower frequency of gaucher disease carriers among Tay-Sachs disease carriers. *European Journal of Human Genetics* **6**, 185-186.
- Pelletier F, Festa-Bianchet M (2004) Effects of body mass, age, dominance and parasite load on foraging time of bighorn rams, *Ovis canadensis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **56**, 546-551.
- Pelletier F, Festa-Bianchet M (2006) Sexual selection and social rank in bighorn rams. *Animal Behaviour* **71**, 649-655.
- Peltonen L (2000) Positional cloning of disease genes: Advantages of genetic isolates. *Human Heredity* **50**, 66-75.
- Pemberton J (2004) Measuring inbreeding depression in the wild: The old ways are the best. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 613-615.
- Pemberton JM, Coltman DW, Smith JA, Pilkington JG (1999) Molecular analysis of a promiscuous, fluctuating mating system. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 289-301.
- Pemberton JM, Smith JA, Coulson TN, *et al.* (1996) The maintenance of genetic polymorphism in small island populations: Large mammals in the Hebrides. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **351**, 745-752.
- Peng B, Kimmel M (2005) simuPOP: A forward-time population genetics simulation environment. *Bioinformatics* **21**, 3686-3687.
- Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK (2002) MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11260-11264.

- Pergams ORW, Barnes WM, Nyberg D (2003) Rapid change in mouse mitochondrial DNA. *Nature* **423**, 397-397.
- Peterson AC, Dirienzo A, Lehesjoki AE, *et al.* (1995) The Distribution of Linkage Disequilibrium over Anonymous Genome Regions. *Human Molecular Genetics* **4**, 887-894.
- Petit E, Aulagnier S, Bon R, Dubois M, Crouau-Roy B (1997) Genetic structure of population of the mediterranean mouflon (*Ovis gmelini*). *Journal of Mammalogy* **78**, 459-567.
- Pisanu B, Chapuis JL, Combes O, Durette-Desset MC (1996) Specific richness in gastrointestinal helminths from the domestic sheep (*Ovis aries*) and the Corsican mouflon (*Ovis musimon*) introduced onto the Kerguelen archipelago. *Richesse spécifique en helminthes gastro-intestinaux du mouton (Ovis aries) et du mouflon (Ovis musimon) introduits dans l'archipel de Kerguelen* **46**, 305-312.
- Ploner M, Dunkler D, Southworth H, Heinze G (2005) logistf: Firth's bias reduced logistic regression.
- Pluess AR, Stocklin J (2004) Genetic diversity and fitness in *Scabiosa columbaria* in the Swiss Jura in relation to population size. *Conservation Genetics* **5**, 145-156.
- Pogson GH, Fevolden SE (1998) DNA heterozygosity and growth rate in the Atlantic cod *Gadus morhua* (L). *Evolution* **52**, 915-920.
- Pollak E (1983) A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes. *Genetics* **104**, 531-548.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* **6**, 847-859.
- Poulsen NA, Nielsen EE, Schierup MH, Loeschcke V, Gronkjaer P (2006) Long-term stability and effective population size in North Sea and Baltic Sea cod (*Gadus morhua*). **15**, 321-331.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Puffenberger EG, Kauffman ER, Bolk S, *et al.* (1994) Identity-by-Descent and Association Mapping of a Recessive Gene for Hirschsprung Disease on Human-Chromosome 13q22. *Human Molecular Genetics* **3**, 1217-1225.

- Pusey A, Wolf M (1996) Inbreeding avoidance in animals. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 201-206.
- Quader S (2005) Mate choice and its implications for conservation and management. *Current Science* **89**, 1220-1229.
- R Development Core Team (2007). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raberg L, Nilsson JA, Ilmonen P, Stjernman M, Hasselquist D (2000) The cost of an immune response: Vaccination reduces parental effort. *Ecology Letters* **3**, 382-386.
- Raghupathy R (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today* **18**, 478-482.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9197-9201.
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Réale D (1996) *Effets des contraintes environnementales sur la reproduction des femelles de deux populations d'ovins, le mouflon (Ovis musimon) et le mouton (Ovis aries), introduits dans l'archipel de Kerguelen*. Thèse de Doctorat, Université de Rennes I.
- Réale D, Boussès P, J.L.Chapuis (1999) Nursing behaviour and mother-lamb relationships in mouflon under fluctuating population densities. *Behavioural Processes* **47**, 81-94.
- Réale D, McAdam AG, Boutin S, Berteaux D (2003) Genetic and plastic responses of a northern mammal to climate change. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **270**, 591-596.
- Reed DH (2004) Extinction risk in fragmented habitats. *Animal Conservation* **7**, 181-191.
- Reed DH (2007) Extinction of island endemics: It is not inbreeding depression. *Animal Conservation* **10**, 145-146.
- Reed DH, Frankham R (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* **55**, 1095-1103.

- Reed DH, Lowe EH, Briscoe DA, Frankham R (2003) Fitness and adaptation in a novel environment: Effect of inbreeding, prior environment, and lineage. *Evolution* **57**, 1822-1828.
- Reinhold K (2000) Maintenance of a genetic polymorphism by fluctuating selection on sex-limited traits. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 1009-1014.
- Reusch TBH, Ehlers A, Hammerli A, Worm B (2005) Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2826-2831.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Roberts CW, Satoskar A, Alexander J (1996) Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitology Today* **12**, 382-388.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population-Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic-Differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 552-569.
- Rosenberg NA, Burke T, Elo K, *et al.* (2001) Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics* **159**, 699-713.
- Rosenberg SM, Longerich S, Gee P, Harris RS (1994) Adaptive mutation by deletions in small mononucleotide repeats. *Science* **265**, 405-407.
- Russell AF, Hatchwell BJ (2001) Experimental evidence for kin-biased helping in a cooperatively breeding vertebrate. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **268**, 2169-2174.
- Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, *et al.* (1995) Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* **376**, 246-249.
- Saccheri I, Kuusaari M, Kankare M, *et al.* (1998) Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* **392**, 491-494.
- Saccheri IJ, Brakefield PM, Nichols RA (1996) Severe inbreeding depression and rapid fitness rebound in the butterfly *Bicyclus anynana* (Satyridae). *Evolution* **50**, 2000-2013.

- Sauermann U, Nurnberg P, Bercovitch FB, *et al.* (2001) Increased reproductive success of MHC class II heterozygous males among free-ranging rhesus macaques. *Human Genetics* **108**, 249-254.
- Say L, Devillard S, Natoli E, Pontier D (2002) The mating system of feral cats (*Felis catus* L.) in a sub-Antarctic environment. *Polar Biology* **25**, 838-842.
- Say L, Naulty F, Hayden TJ (2003) Genetic and behavioural estimates of reproductive skew in male fallow deer. *Molecular Ecology* **12**, 2793-2800.
- Say L, Pontier D, Natoli E (1999) High variation in multiple paternity of domestic cats (*Felis catus* L.) in relation to environmental conditions. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **266**, 2071-2074.
- Schemske DW, Lande R (1985) The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* **39**, 41-52.
- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* **5**, 63-69.
- Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T, *et al.* (1999) Selection of the T cell repertoire. *Annual Review of Immunology* **17**, 829-874.
- Shaffer ML (1981) Minimum Population Sizes for Species Conservation. *Bioscience* **31**, 131-134.
- Shutler D, Alisaukas RT, Dan McLaughlin J (1999) Mass dynamics of the spleen and other organs in geese: Measures of immune relationships to helminths? *Canadian Journal of Zoology* **77**, 351-359.
- Skibinski DOF (2000) DNA tests of neutral theory: Applications in marine genetics. *Hydrobiologia* **420**, 137-152.
- Slate J, David P, Dodds KG, *et al.* (2004) Understanding the relationship between the inbreeding coefficient and multilocus heterozygosity: theoretical expectations and empirical data. *Heredity* **93**, 255-265.
- Slate J, Pemberton JM (2002) Comparing molecular measures for detecting inbreeding depression. *J. Evol. Biol.* **15**, 20-31.
- Slate J, Pemberton JM (2007) Admixture and patterns of linkage disequilibrium in a free-living vertebrate population. *Journal of Evolutionary Biology* **20**, 1415-1427.

- Slatkin M (1994) Linkage Disequilibrium in Growing and Stable-Populations. *Genetics* **137**, 331-336.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**.
- Smith KG, Hunt JL (2004) On the use of spleen mass as a measure of avian immune system strength. *Oecologia* **138**, 28-31.
- Soulé ME (1976) Allozyme variation, its determinants in space and time. In: *Molecular Evolution* (ed. J. AF), pp. 60-77. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Soulé ME (1980) The effects of fragmentation. In: *Conservation Biology the Science of Scarcity and Diversity* (ed. Soulé ME), pp. 233-236. Sinauer Associates, Sunderland.
- Spielman D, Brook BW, Briscoe DA, Frankham R (2004) Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? *Conservation Genetics* **5**, 439-448.
- Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15261-15264.
- Spitze K (1993) Population-Structure in *Daphnia-Obtusa* - Quantitative Genetic and Allozymic Variation. *Genetics* **135**, 367-374.
- Spyropoulos B, Moens PB, Davidson J, Lowden JA (1981) Heterozygote advantage in Tay-Sachs carriers? *American Journal of Human Genetics* **33**, 375-380.
- Stark AE (2006) A clarification of the Hardy-Weinberg law. *Genetics* **174**, 1695-1697.
- Stearns SC (1992) *The Evolution of life histories* Oxford University Press.
- Stella A, Boettcher PJ (2004) Optimal designs for linkage disequilibrium mapping and candidate gene association tests in livestock populations. *Genetics* **166**, 341-350.
- Stevenson IR, Bancroft DR (1995) Fluctuating trade-offs favour precocial maturity in male Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **262**, 267-275.
- Stilwell KL, Wilbur HM, Werth CR, Taylor DR (2003) Heterozygote advantage in the American chestnut, *Castanea dentata* (Fagaceae). *American Journal of Botany* **90**, 207-213.

- Stockley P, Searle JB, MacDonald DW, Jones CS (1993) Female multiple mating behaviour in the common shrew as a strategy to reduce inbreeding. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **254**, 173-179.
- Storz JF (1999) Genetic consequences of mammalian social structure. *Journal of Mammalogy* **80**, 553-569.
- Strand AE (2002) METASIM 1.0: An individual-based environment for simulating population genetics of complex population dynamics. *Molecular Ecology Notes* **2**, 373-376.
- Sugg DW, Chesser RK, Dobson FS, Hoogland JL (1996) Population genetics meets behavioral ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 338-342.
- Sutherland GD, Harestad AS, Price K, Lertzman KP (2000) Scaling of natal dispersal distances in terrestrial birds and mammals. *Conservation Ecology* **4**, 16.
- Swindell WR, Bouzat JL (2006) Reduced inbreeding depression due to historical inbreeding in *Drosophila melanogaster*: Evidence for purging. *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 1257-1264.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, *et al.* (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* **24**, 3189-3194.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.
- Takahata N, Nei M (1990) Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* **124**, 967-978.
- Tallmon DA, Luikart G, Beaumont MA (2004) Comparative evaluation of a new effective population size estimator based on approximate Bayesian computation. *Genetics* **167**, 977-988.
- Tarr CL, Conant S, Fleischer RC (1998) Founder events and variation at microsatellite loci in an insular passerine bird, the Laysan finch (*Telespiza cantans*). *Molecular Ecology* **7**, 719-731.
- Templeton AR, Read B (1998) Elimination of inbreeding depression from a captive population of Speke's gazelle: Validity of the original statistical analysis and confirmation by permutation testing. *Zoo Biology* **17**, 77-94.

- Templeton AR, Routman E, Phillips CA (1995) Separating Population-Structure from Population History - a Cladistic-Analysis of the Geographical-Distribution of Mitochondrial-DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* **140**, 767-782.
- Thomas CD (1990) What do real population dynamics tell us about minimum viable population sizes? *Conservation Biology* **4**, 324-327.
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, *et al.* (2004) Extinction risk from climate change. *Nature* **427**, 145-148.
- Torosyan Y, Aksentijevich I, Sarkisian T, *et al.* (1999) A population-based survey reveals an extremely high FMF carrier frequency in Armenia, suggesting heterozygote advantage. *American Journal of Human Genetics* **72**, 621-635.
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* **10**, 967-981.
- Tsitrone A, Rousset F, David P (2001) Heterosis, marker mutational processes and population inbreeding history. *Genetics* **159**, 1845-1859.
- Turelli M, Schmske DW, Bierzychudek P (2001) Stable two-allele polymorphisms maintained by fluctuating fitnesses and seed banks: Protecting the blues in *Linanthus parryae*. *Evolution* **55**, 1283-1298.
- Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1993) Allele frequencies at microsatellite loci: The stepwise mutation model revisited. *Genetics* **133**, 737-749.
- Van Noordwijk AJ, Scharloo W (1981) Inbreeding in an Island population of the great tit. *Evolution* **35**, 674-688.
- Venables WN, Ripley BD (2002) *Modern Applied Statistics with S*, Fourth edn. Springer, New York.
- Verardi A, Lucchini V, Randi E (2006) Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology* **15**, 2845-2855.
- Via S, Hawthorne DJ (2005) Back to the future: Genetic correlations, adaptation and speciation. *Genetica* **123**, 147-156.

- Vila C, Sundqvist AK, Flagstad O, *et al.* (2003) Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **270**, 91-97.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- Vucetich JA, Waite TA (1999) Erosion of heterozygosity in fluctuating populations. *Conservation Biology* **13**, 860-868.
- Vucetich JA, Waite TA, Nunney L (1997) Fluctuating population size and the ratio of effective to census population size. *Evolution* **51**, 2017-2021.
- Wahls WP, Wallace LJ, Moore PD (1990) The Z-DNA Motif D(Tg)₃₀ Promotes Reception of Information During Gene Conversion Events While Stimulating Homologous Recombination in Human-Cells in Culture. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 785-793.
- Waldmann P, Andersson S (1998) Comparison of quantitative genetic variation and allozyme diversity within and between populations of *Scabiosa canescens* and *S. columbaria*. *Heredity* **81**, 79-86.
- Wang J (2005) Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* **360**, 1395-1409.
- Wang J, Whitlock MC (2003) Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. *Genetics* **163**, 429-446.
- Wang JL (2001) A pseudo-likelihood method for estimating effective population size from temporally spaced samples. *Genetical Research* **78**, 243-257.
- Waples RS (1989) A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* **121**, 379-391.
- Waples RS (1989) Temporal variation in allele frequencies: Testing the right hypothesis. *Evolution* **43**, 1236-1251.
- Waples RS (2005) Genetic estimates of contemporary effective population size: to what time periods do the estimates apply? *Molecular Ecology* **14**, 3335-3352.

- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* **15**, 1419-1439.
- Waples RS, Yokota M (2007) Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generations. *Genetics* **175**, 219-233.
- Warren MS, Hill JK, Thomas JA, *et al.* (2001) Rapid responses of British butterflies to opposing forces of climate and habitat change. *Nature* **414**, 65-69.
- Waser PM, Austad SN, Keane B (1986) When Should Animals Tolerate Inbreeding. *American Naturalist* **128**, 529-537.
- Watkins BE, Witham JH, Ullrey DE, Watkins DJ, Jones JM (1991) Body composition and condition evaluation of white-tailed deer fawns. *The Journal of Wildlife Management* **55**, 39-51.
- Watt WB, Wheat CW, Meyer EH, Martin JF (2003) Adaptation at specific loci. VII. Natural selection, dispersal and the diversity of molecular-functional variation patterns among butterfly species complexes (Colias: Lepidoptera, Pieridae). *Molecular Ecology* **12**, 1265-1275.
- Watterson GA (1978) The homozygosity test of neutrality. *Genetics* **88**, 405-417.
- Watterson GA (1986) The homozygosity test after a change in population size. *Genetics* **112**, 899-907.
- Weber JL, Wong C (1993) Mutation of Human Short Tandem Repeats. *Human Molecular Genetics* **2**, 1123-1128.
- Wegner KM, Reusch TBH, Kalbe M (2003) Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *Journal of Evolutionary Biology* **16**, 224-232.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Weller KE, Decker E (2001) The status of mouflon (*Ovis musimon*) in Europe. In: *Proceedings of the third international symposium on mouflon*, Sopron, Hungary.
- Whitlock MC (2000) Fixation of new alleles and the extinction of small populations: Drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution* **54**, 1855-1861.

- Whitlock MC (2003) Fixation probability and time in subdivided populations. *Genetics* **164**, 767-779.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1/(4Nm + 1)$. *Heredity* **82**, 117-125.
- Whittam TS, Clark AG, Stoneking M, Cann RL, Wilson AC (1986) Allelic variation in human mitochondrial genes based on patterns of restriction site polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 9611-9615.
- Wielebnowski N (1996) Reassessing the relationship between juvenile mortality and genetic monomorphism in captive cheetahs. *Zoo Biology* **15**, 353-369.
- Wildt DE (1987) Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature* **329**, 328-331.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Williamson EG, Slatkin M (1999) Using maximum likelihood to estimate population effective size from temporal changes in allele frequencies. *Genetics* **152**, 755-761.
- Wilson AB, Martin-Smith KM (2007) Genetic monogamy despite social promiscuity in the pot-bellied seahorse (*Hippocampus abdominalis*). *Molecular Ecology* **16**, 2345-2352.
- Wilson AC (1985) The molecular basis of evolution. *Scientific American* **253**, 164-173.
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* **163**, 1177-1191.
- Wolf LI (1986) The heterozygote advantage in phenylketonuria. *American journal of human genetics* **38**, 773-775.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Wright S (1938) Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science* **87**, 430-431.
- Wright S (1951) The genetic structure of populations. *Annals of eugenics* **15**, 323-354.
- Yokoyama S (1979) Role of genetic drift in the high frequency of Tay-Sachs disease among Ashkenazic Jews. *Annals of Human Genetics* **43**, 133-136.

- Zabeau M, Vos P (1993) Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. EP534858A1, European Patent Application.
- Zenger KR, Richardson BJ, Vachot-Griffin A-M (2003) A rapid population expansion retains genetic diversity within European rabbits in Australia. *Molecular Ecology* **12**, 789-794.
- Zidan M, Schuberth HJ, Pabst R (2000) Immunohistology of the splenic compartments of the one humped camel (*Camelus dromedarius*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **74**, 17-29.
- Zouros E, Romero-Dorey M, Mallet AL (1988) Heterozygosity and Growth in Marine Bivalves: Further Data and Possible Explanations *Evolution* **42**, 1332-1341.
- Zuckerkindl E, Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: *Evolving Genes and Proteins* (ed. Bryson VV, H.J.), pp. 97-166. Academic Press, New York.