

Rapport de stage
Effectué du 1^{er} avril au 27 mai 2015
Au sein de l'Université de Bourgogne, Equipe Ecologie Evolutive
UMR CNRS 6282 Biogeosciences

Caractérisation génétique de deux sous-espèces de Bruants des roseaux (*Emberiza schoeniclus*) et évaluation des possibilités d'hybridation.

DURANTON Maud
Master EFCE, UFR SVE, Université Rennes 1, 35042 Rennes Cedex, France

Sous la direction de :

Monsieur Cezilly Frank : Tuteur professionnel
Monsieur Vollot Benjamin : Tuteur professionnel
Monsieur Madec Luc : Correspondant Universitaire



Soutenu à Rennes le 16 juin 2015

Année universitaire 2014 - 2015

Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps Mr Benjamin Vollot qui est à l'initiative de ce stage. Je le remercie de m'avoir laissé l'accompagner dans son travail, ce qui m'a permis de me confronter à la réalité du terrain. D'avoir eu la patience de m'initier à l'ornithologie et aux techniques de baguage des oiseaux.

Je remercie également Mme Marie-Jeanne Perrot-Minnot, pour m'avoir encadré tout au long de ce stage. Des premières manipulations de laboratoires jusqu'à l'utilisation des logiciels d'analyses. Je la remercie pour sa gentillesse et d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions.

Mr Frank Cezilly pour m'avoir accepté en stage et pour toutes les informations qu'il a pu me donner.

Je remercie l'équipe d'Ecologie Evolutive de l'UMR biogéosciences pour m'avoir accueillie pendant ce stage.

Mr Georges Olioso pour les renseignements sur l'historique des deux sous-espèces de Bruant des roseaux.

Je remercie également Maria, Julie et Adrien qui ont toujours été là pour répondre à mes questions sur les équipements du laboratoire.

L'équipe du parc ornithologique de pont de gau pour m'avoir accueillie et m'avoir donné l'opportunité de découvrir ce lieu.

Enfin je remercie Stéphanie, Laurent, Lisa et Baptiste pour leur nombreuses relectures de ce rapport et tous les conseils qui en ont découlé et surtout pour leur soutien tout au long de ce stage.

Sommaire

Introduction	3
Matériel et méthodes	6
1. Méthode d'échantillonnage	6
2. Biologie moléculaire	7
• Extraction de l'ADN	7
• Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)	8
• Electrophorèse	9
• Séquençage	9
3. Analyses génétiques	9
Résultats	10
1. Analyses du polymorphisme	10
2. Tests de neutralité	12
3. Relations phylogénétique	12
Discussion	14
1. Différenciation génétique entre les deux sous-espèces	14
2. Réseaux d'haplotypes	15
3. Relations phylogénétiques entre espèces d' <i>Emberiza</i>	15
4. Hypothèse d'une divergence récente	16
5. Hypothèse d'introgession	16
Conclusion	16

Introduction

Une espèce est classiquement définie comme un ensemble d'individus qui peuvent effectivement ou potentiellement se reproduire entre eux, mais sont isolés d'un point de vue reproductif d'individus d'autres espèces (Mayr 1982 dans Price, 2008). Deux facteurs principaux entrent en action pour permettre la spéciation, la présence d'une barrière géographique et des pressions de sélections différentes en lien avec les conditions écologiques (Price, 2008). Il y aura alors une diminution du flux de gènes entre les deux populations, ce qui va entraîner la fixation de différences par dérive génétique (Borge *et al.*, 2005). De plus, si une barrière reproductive se met en place, les différences vont se maintenir et il y aura alors deux espèces distinctes (Price, 2008). Pour comprendre la spéciation il faut donc savoir comment l'écologie et la génétique interagissent (Neto *et al.*, 2013). L'étude de sous-espèces a souvent permis de formuler de nouvelles théories de biologie évolutive (Winker, 2010). En effet, les sous-espèces représentent une étape intermédiaire du processus de spéciation. La divergence étant récente, les différences ne sont pas trop importantes et la barrière reproductive n'est pas toujours bien installée, ce qui laisse des possibilités d'hybridation (Winker, 2010 et Price, 2008).

Chez les oiseaux plusieurs facteurs peuvent favoriser l'isolement reproductif. Par exemple, le comportement migratoire (Rohwer & Irwin, 2011), le comportement alimentaire ou l'utilisation de niches écologiques différentes (Funk *et al.*, 2006). Ces facteurs sont directement liés aux caractères morphologiques des oiseaux qui sont souvent contrôlés génétiquement (Newton, 2010). Par exemple le comportement migratoire est lié à la taille des ailes, et à la masse corporelle des oiseaux. Les oiseaux migrants ayant généralement des ailes plus longues et une plus faible masse corporelle que les oiseaux sédentaires. Le comportement alimentaire est en lien direct avec la taille et la forme du bec des oiseaux, les oiseaux granivores ont un bec plus fort que les insectivores. De plus ce trait peut avoir une influence au moment de la reproduction. En effet le chant des oiseaux est conditionné par la forme du bec (Podos *et al.*, 2004). Or le chant est impliqué dans le choix du partenaire sexuel et représente donc un mécanisme d'isolement reproductif précopulatoire (Matessi *et al.*, 2001 et Matessi *et al.*, 2002). La forme du bec peut donc être considérée comme un « magic trait » (Price, 2008), c'est-à-dire un trait contribuant à la fois à l'isolement précopulatoire et diminuant la fitness des individus hybrides. En effet, on peut supposer que les individus hybrides auront un bec intermédiaire et donc plus de difficulté à trouver leur nourriture ce qui va diminuer leur fitness.

Chez plusieurs passereaux l'existence de sous-espèces différenciées morphologiquement et écologiquement, a été démontrée. C'est notamment le cas du Bruant des roseaux (*Emberiza schoeniclus*) qui est l'espèce la plus variable du genre des *Emberizidae*, avec de nombreuses sous-espèces décrites sur la base de critères morphologiques comme la taille du bec, la taille du corps et le plumage (Neto *et al.*, 2013). Depuis le milieu du XIX^{ème} siècle les ornithologues tel que Crespon, Jaubert et Barthélemy-Lapommeraye considèrent qu'il y a deux sous-espèces, voire deux espèces différentes présentes en Provence et en Languedoc. Le Bruant des roseaux appelé *Emberiza schoeniculus* chez Crespon, et *Schoenicola arundinacea* chez Jaubert, qui est présent dans la région méditerranéenne uniquement en dehors de la saison de reproduction. Le Bruant des marais, *Emberiza palustris* chez Crespon ou *Schoenicola pyrrhuloides* chez Jaubert avec un bec plus fort, considéré comme la seule espèce nicheuse des marais méditerranéens (commentaires Mr Georges Oliosio). Malgré des noms différents, les descriptions montrent bien que ces auteurs parlent des mêmes espèces qui correspondent aux deux sous-espèces de Bruant des roseaux actuellement présentes en France, *E. s. schoeniclus* et *E. s. witherbyi*. *E. s. schoeniclus* niche dans une grande variété d'habitats dans les deux tiers nord de la France et sur la côte atlantique ; elle est migratrice et hiverne du sud de la France jusqu'en Espagne. *E. s. witherbyi* est sédentaire et inféodée aux zones humides, elle se retrouve sur les étangs côtiers, de la Camargue aux Pyrénées-Orientales, en Espagne et au Nord du Maroc. (Neto *et al.*, 2013, Kvist *et al.*, 2011, Dubois *et al.*, 2001) Elles sont donc parapatriques pendant la saison de reproduction et sympatriques l'hiver (Grapputo *et al.*, 1998). Les deux sous-espèces sont insectivores pendant l'été mais l'hiver *E. s. schoeniclus* devient granivore alors que *E. s. witherbyi* utilise son bec plus fort pour casser les tiges de roseaux et se nourrir des insectes qui s'y trouvent, ce qui lui permet de rester dans la même zone géographique toute l'année (Orlowski *et al.*, 2013). Le Bruant des roseaux présente des enjeux de conservation majeurs. En effet, il est classé sur la liste rouge mondiale de l'Union International pour la Conservation de la Nature (UICN) car ses populations sont en déclin notamment en Angleterre (Peach *et al.*, 1999 et Brickle & Peach, 2004). De plus, *E. s. witherbyi* a un statut « données insuffisantes » (DD) sur la liste rouge des oiseaux nicheurs de France, d'où l'importance d'étudier plus en détail cette espèce inféodée au littoral méditerranéen. Une précédente étude réalisée en Languedoc Roussillon-PACA, régions dans lesquelles les deux sous-espèces sont en contact, a permis de caractériser *E. s. schoeniclus* et *E. s. witherbyi* d'un point de vue morphologique (Kilota, 2014). Cette étude a montré que *E. s. schoeniclus* a des ailes plus longues et un bec plus fin que *E. s. witherbyi*. Ainsi les mesures de la longueur des primaires

et de la longueur et hauteur du bec permettent de distinguer les individus des deux sous-espèces. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Neto *et al.* (2013). Cependant, aucune étude génétique n'a été réalisée sur les populations présentes en France.

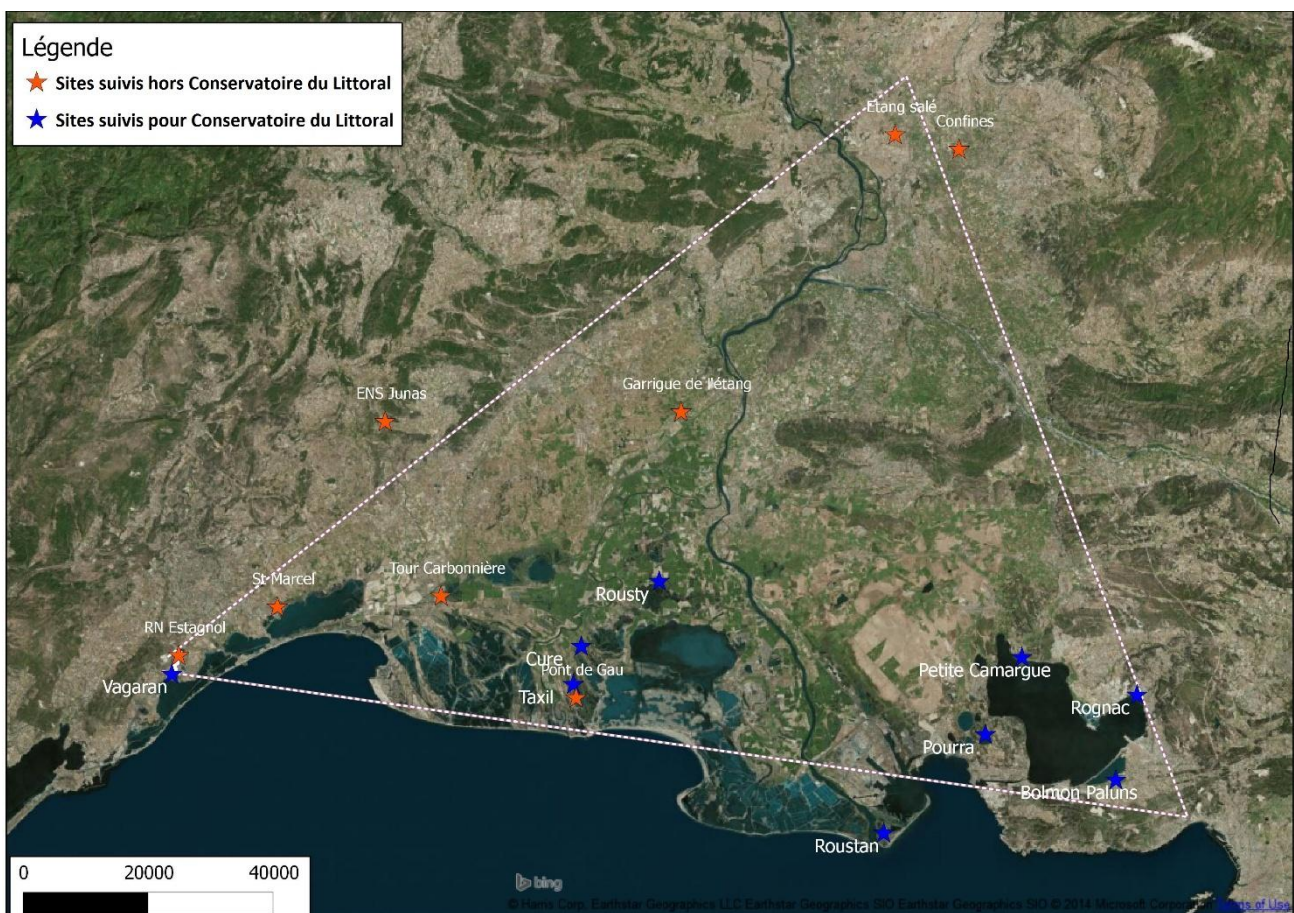
L'objectif est donc de caractériser génétiquement les deux sous-espèces et d'évaluer les possibilités d'hybridation. Pour cela l'ADN est extrait à partir de plumes, car comme l'ont montré Bellot *et al.* (2001), c'est une technique efficace et moins invasive. Nous savons qu'il peut y avoir une différence entre l'arbre des espèces et celui des gènes suite à des phénomènes tel que la duplications de gènes, l'hybridations ou la dérive génétique (Corl & Ellegren, 2013). Or quand il y a une probabilité de 0,95 que l'arbre corresponde à l'histoire des espèces avec un gène mitochondrial, elle n'est que de 0,62 avec un gène autosomique (Moore, 1995). Le génome mitochondrial présente également d'autres avantages, il est haploïde ce qui simplifie le séquençage, il est transmis uniquement par la mère et le nombre de ses recombinaisons est limité (Rubtsov & Opaev, 2012). C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier l'ADN mitochondrial. De plus, le temps de divergence entre deux sous-espèces étant court, le nombre de différences est faible (Funk *et al.*, 2006). Nous avons donc sélectionné deux gènes suffisamment variables pour pouvoir détecter des différences dans les séquences, les gènes ND1 et ND2, qui codent pour deux sous-unités de l'enzyme deshydrogenase NADH.

Il y a deux cas de figures possible, soit la différence entre les séquences des deux sous-espèces est suffisamment importante pour permettre de discriminer les individus. Dans ce cas-là cela signifierait que les *E. s. schoeniclus* et les *E. s. witherbyi* ont divergé depuis un temps assez long. Nous pourrions alors chercher à identifier des individus hybrides dans la population. En effet un individu classé morphologiquement dans une sous-espèce mais possédant un haplotype mitochondrial typique de l'autre sous-espèce pourra être considéré comme un hybride. Soit la différence entre les séquences est trop faible pour classer les individus, dans ce cas-là plusieurs explications sont possibles. Soit le temps de divergence des sous-espèces est beaucoup trop court pour avoir permis l'installation d'un nombre suffisent de mutations entre les gènes, ces deux sous-espèces seraient donc apparues récemment. Soit la similarité des séquences est lié à l'introgession de l'ADN mitochondrial d'une des sous-espèces dans l'autre.

Matériel et méthode

1. Méthode d'échantillonnage

Les Bruants des roseaux ont été capturés dans le cadre d'un projet plus large portant sur le suivi d'espèces paludicoles. Toutes les captures ont été réalisées par un bagueur, Mr Vollot Benjamin, possédant toutes les autorisations requises pour la capture ainsi que pour le prélèvement de plumes. Les oiseaux ont été échantillonnés entre le 13 février 2014 et le 26 octobre 2014 avec une pause pendant la saison de reproduction, c'est-à-dire de fin mars à début juillet. Des sessions de baguage ont également eu lieu entre le 13 avril et le 1^{er} mai 2015, mais n'ont pas permis la capture de bruants des roseaux. Les plumes ont été prélevées sur un total de 102 bruants des roseaux. La figure 1 indique la localisation géographique précise des 17 espaces naturels où le bagage a été effectué.



Les captures sont réalisées à l'aide de filets verticaux dits « japonais » mesurant 30m de long et 1,80m de haut, disposés dans la roselière dans des travées aménagées spécialement par le bagueur ou sur une butte à proximité. En fonction du site d'étude le nombre de filets montés est variable. Les filets sont installés au lever et au coucher du soleil quand les conditions météorologiques le permettent et restent en place pendant environ trois à quatre heures. Des dispositifs de repasse sont disposés régulièrement le long des filets et diffusent le chant d'oiseaux paludicoles potentiellement présents dans la zone. Régulièrement les oiseaux sont démaillés et emmenés à la station de bagage. Ils sont alors identifiés, bagués et le bagueur relève des informations importantes sur leur biologie (sexe, âge, niveau d'adiposité, poids et,



Figure 2 : Photographie d'un *E. s. witherbyi* à gauche et d'un *E. s. schoeniclus* à droite

au printemps, présence de plaques incubatrices et/ou protubérance cloacale) et sur leur morphologie (longueur des primaires). Pour les bruants des roseaux, les deux sous-espèces sont distinguées sur la base de critères morphologiques. Comme on peut le voir sur la figure 2 les *E. s. witherbyi* ont un bec plus fort que les *E. s. schoeniclus*. La longueur des primaires permet également de les distinguer, les *E. s. schoeniclus* possédant des ailes plus longues.

En moyenne trois plumes tertiaires par oiseaux sont prélevées puis stockées dans une enveloppe avant d'être envoyées au laboratoire. Ces plumes sont choisies car leur prélèvement n'impacte pas le vol de l'oiseau. Dans la suite du protocole tous les oiseaux sont identifiés précisément grâce à leur numéro de bague.

2. Biologie moléculaire

- Extraction de l'ADN

Le protocole d'extraction est dérivé de la méthode décrite par Hillis *et al.* (1996). L'extrémité d'une plume est coupée et déposée dans 200µl de tampon Queen's lysis buffer et

5,5µl de protéinase K, puis incubée sous agitation à 55°C pendant la nuit. Les échantillons sont vortexés deux fois la première heure à trente minutes d'intervalle. Le lendemain ils sont ramenés à température ambiante et centrifugés rapidement, puis 240µl de phénol-chloroforme isoamyl (24 : 1) y sont ajoutés. Les échantillons sont mélangés par inversion pendant 4-5 min puis centrifugés à 10000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est dilué dans 240µl de chloroforme-isoamyl puis mélangé par inversion pendant 3 min avant d'être centrifugé à 10000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est dilué dans 240µl d'isopropanol froid, les échantillons sont mélangés et stockés à -20°C pour précipitation pendant une durée minimum de 4h et idéalement toute la nuit. Le lendemain les échantillons sont centrifugés à 4°C à 15000 rpm pendant 30min. Les culots sont lavés deux fois avec 200µl d'EtOH 70° froid avec une centrifugation de 5-10 min à 4°C et 15000 rpm entre chaque lavage. Les culots sèchent ensuite à l'air libre avant d'être repris dans 50 µl de TE. Au total l'ADN de 100 oiseaux a été extrait : 59 *E. s. schoeniclus*, 36 *E. s. witherbyi* et 5 individus dont le statut taxonomique n'a pas pu être identifié.

- Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)

Les amorces ont été définies à partir des séquences du génome mitochondrial complet (environ 16800pb) de sept espèces de Bruant (Ren *et al.*, 2014, Kan *et al.*, 2013, Hu *et al.*, 2013, Pan *et al.*, 2013, (2) Pan *et al.*, 2013, Ren *et al.*, 2013 et Ren *et al.* non publié) Elles ont été définies dans des zones des gènes ND1 et ND2 suffisamment conservées entre ces espèces pour espérer le succès d'amplification sur nos deux sous-espèces. Elles sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Séquences, sens, position et température d'hybridation des amorces utilisées pour amplifier les

Gène	T° d'hybridation	Sens	Amorces
ND1 (1099 pb)	59°	Forward	786 : 5'-GGTTCAAATCCTCTCCCTAGCTT-3'
		Reverse	1884 : 5'-GTTAGGAAATGAGAGGGCTGGT-3'
ND2 (1032 pb)	55°	Forward	3951 : 5'- AAGCTAAACAAGCTATCGGGC -3'
		Reverse	5063: 5'- AGGCCTTCGGTTTGGGTAAT-3'

deux gènes mitochondriaux ND1 et ND2.

Le mix de PCR est constitué de tampon 1X, 200µM de dNTPs, 200nM de chaque amorce, et d'une unité de Hot Master Taq DNA polymérase (Eppendorf). 4µl d'ADN sont ensuite mélangés à 26µl de mix et déposés dans le thermocycleur. La PCR est réalisée de la façon suivante : une première phase de dénaturation à 94° pendant 1min30, puis 34 cycles avec une phase de dénaturation de 30 sec à 94°, une phase d'hybridation de 45sec avec une température

variable en fonction du gène (tableau 1), une phase d'élongation de 45 sec à 65°. A la fin des 34 cycles les échantillons sont maintenus à 65° pendant 10 min pour terminer l'élongation puis stockés à 10°.

- **Electrophorèse**

Une électrophorèse est réalisée pour vérifier que la PCR a fonctionné. Pour cela, un gel à 1,5% d'agarose est réalisé avec du tampon TE (1X). 3µl composés de 1µl de produit PCR, 0,5µl de bleu de charge et 2,5µl d'eau, sont déposés sur le gel avec un marqueur de taille. Les produits migrent pendant 30min à 100mV, puis le gel est déposé dans un bain de BET pendant environ 30min avant d'être révélé sous UV.

- **Séquençage**

Avant d'être envoyé pour le séquençage, les produits de PCR doivent être nettoyés des amorces. Pour cela, une purification enzymatique est réalisée avec un mélange contenant les enzymes Exonuclease I (ExoI) et Shrimps Alkaline Phosphatase (SAP), 2µl sont ajoutés à chaque échantillon de PCR. Les tubes sont ensuite incubés à 37° pendant 12 heures puis mis à l'étuve pour évaporation complète à 37°. Les échantillons sont ensuite repris dans 10µl de primer à une concentration de 2,5 µM pour le séquençage par la société Macrogen.

3. Analyses génétiques

L'ADN de 82 oiseaux dont 43 *E. s. schoeniclus*, 35 *E. s. witherbyi* et 4 individus dont le statut taxonomique n'a pas pu être identifié, a été séquencé. L'alignement des séquences est réalisé manuellement avec le logiciel BIOEDIT v7.2.5 (Hall, 1999). La diversité haplotypique (h) et nucléotidique (π), le nombre d'haplotypes (nh) et le nombre moyen de nucléotides différents (k) sont obtenus à partir du logiciel DnaSP v5.10.1 (Librado & Rozas, 2009). Les *E. s. witherbyi* étant sédentaires et provenant majoritairement de deux sites d'étude, Rousty et la Tour carbonière (Figure 1), nous avons également calculé la diversité nucléotidique (π) de ces deux populations. Ce logiciel a également permis de calculer le taux de divergence nucléotidiques entre les deux sous-espèces en fonction du gène étudié, en utilisant le modèle de mutation de jukes-cantor. Pour ces analyses, les individus non identifiés ne sont pas pris en compte. Deux tests de neutralités, le test de tajima (D) (Tajima, 1989) et le test de Fu (Fs) (Fu Y. X., 1997), sont réalisés pour évaluer le régime de sélection des deux gènes étudiés et l'histoire démographique des sous-espèces. Une valeur significativement négative ($p < 0,05$) de D et Fs est attendue en cas d'expansion de population, de sélection purifiante ou de balayage sélectif. Et inversement en cas de réduction de population ou de sélection balancée. Un réseau

d'haplotypes a été créé à l'aide du logiciel Network v4.613 en utilisant la méthode du median-joining (Bandelt H. J. *et al.* 1999). Le logiciel MEGA v6.0.6 (Tamura *et al.*, 2011) a été utilisé pour la reconstruction phylogénétique en utilisant la méthode de l'UPGMA avec bootstrap et 1000 tirages. Un arbre phylogénétique a également été construit en incluant les séquences de 7 espèces proches récupérées sur ncbi (*E. rutila*, *E. aureola*, *E. pusilla*, *E. spodocephala*, *E. cioides*, *E. tristrami* et *E. chrysophrys*)(Ren *et al.*, 2014, Kan *et al.*, 2013, Hu *et al.*, 2013, Pan *et al.*, 2013, (2) Pan *et al.*, 2013, Ren *et al.*, 2013 et Ren *et al.* non publiée). Pour évaluer le taux de divergence interspécifique au sein de ce groupe.

Résultats

1. Analyses du polymorphisme

Pour le gène ND1, un total de 932 sites a été étudié dont 20 variables, contre 921 pour le ND2 dont 19 variables. On retrouve 21 haplotypes dont 10 exclusifs aux *E. s. schoeniclus* et 7 aux *E. s. witherbyi*, pour le gène ND1 contre 18 avec 11 exclusifs aux *E. s. schoeniclus* et 4 aux *E. s. witherbyi* pour le ND2. Le tableau 2 présente les différents indices de diversité calculés pour l'ensemble des individus, et pour chaque sous-espèces. On constate que les deux sous-espèces présentent des niveaux de polymorphisme comparable, au gène ND1 comme au gène ND2. Pour les deux gènes, le taux de divergence nucléotidique entre les deux sous-espèces est de 0,001, et est comparable au niveau de polymorphisme intra-sous-espèce (π). Dans tous les cas, on retrouve une forte diversité haplotypique pour une faible diversité nucléotidique.

Tableau 2 : Nombre d'haplotype (nh), diversité haplotypique plus ou moins l'écart-type (h), diversité nucléotidique (π) et nombre moyen de nucléotides différents plus ou moins l'écart-type (k), au sein de chaque sous-espèce et

		<i>nh</i>	<i>h</i>	π	K
E. s. schoeniclus et E. s. witherbyi	ND1	21	0,66 ± 0,06	0,00098	0,91 ± 0,64
	ND2	18	0,70 ± 0,03	0,00115	1,06 ± 0,71
E. s. schoeniclus	ND1	14	0,55 ± 0,09	0,00079	0,74 ± 0,56
	ND2	14	0,74 ± 0,05	0,00131	1,21 ± 0,78
E. s. witherbyi	ND1	11	0,78 ± 0,05	0,00126	1,17 ± 0,77
	ND2	6	0,51 ± 0,09	0,00090	0,83 ± 0,60

les deux confondues en fonction du gène étudié

Pour la population de Rousty on trouve, pour le gène ND1 $\pi=0,00112$ et $h=0,78 \pm 0,08$ et pour le gène ND2 $\pi=0,00126$ et $h=0,61 \pm 0,12$. Pour la population de la Tour Carbonnière

on trouve une diversité nucléotidique $\pi=0,00140$ et $h=0,69 \pm 0,12$ pour le gène ND1 et $\pi=0,00045$ et $h=0,42 \pm 0,11$ pour le gène ND2. On constate que la diversité nucléotidique de la population de Rousty est toujours plus importante que celle de la population de la Tour Carbonnière. Pour chaque gènes on retrouve des individus issues des deux populations dans les haplotypes majoritaires.

2. Tests de neutralité

Le tableau 3 présente les résultats des différents tests de neutralités. Pour les *E. s. schoeniclus* les résultats des deux tests sont significativement négatif, alors que pour les *E. s. witherbyi* les deux tests sont négatif mais ne sont pas significatifs.

Tableau 3 : Résultats des deux tests de neutralité et leur niveau de significativité pour chaque sous-espèces

		Test de Tajima		Test de Fu	
E. s. schoeniclus	ND1	-2,405	P < 0,01	-4,496	P < 0,02
	ND2	-1,984	P < 0,05	-3,838	P < 0,02
E. s. witherbyi	ND1	-1,475	P > 0,10	-2,167	P > 0,10
	ND2	-1,429	P > 0,10	-2,454	0,10 > P > 0,05

3. Relations phylogénétiques

La figure 3 présente les réseaux d'haplotypes pour les deux gènes étudiés. Pour le gène ND1 on retrouve un haplotype majoritaire partagé par les deux sous-espèces. Les haplotypes les plus différents sont l'haplotype H5 (*E. s. schoeniclus*) séparé par 4 mutations de l'haplotype H14 (*E. s. schoeniclus*) et H13 (*E. s. witherbyi*). Pour le gène ND2 on retrouve deux haplotypes majoritaires partagés par les deux sous-espèces mais l'haplotype H1 est retrouvé majoritairement chez *E. s. witherbyi* et l'haplotype H2 retrouvé majoritairement chez les *E. s. schoeniclus*. Les deux haplotypes les plus différents sont l'haplotype H15 (*E. s. witherbyi*) et l'haplotype H13 (*E. s. schoeniclus*²) séparés par 6 mutations.

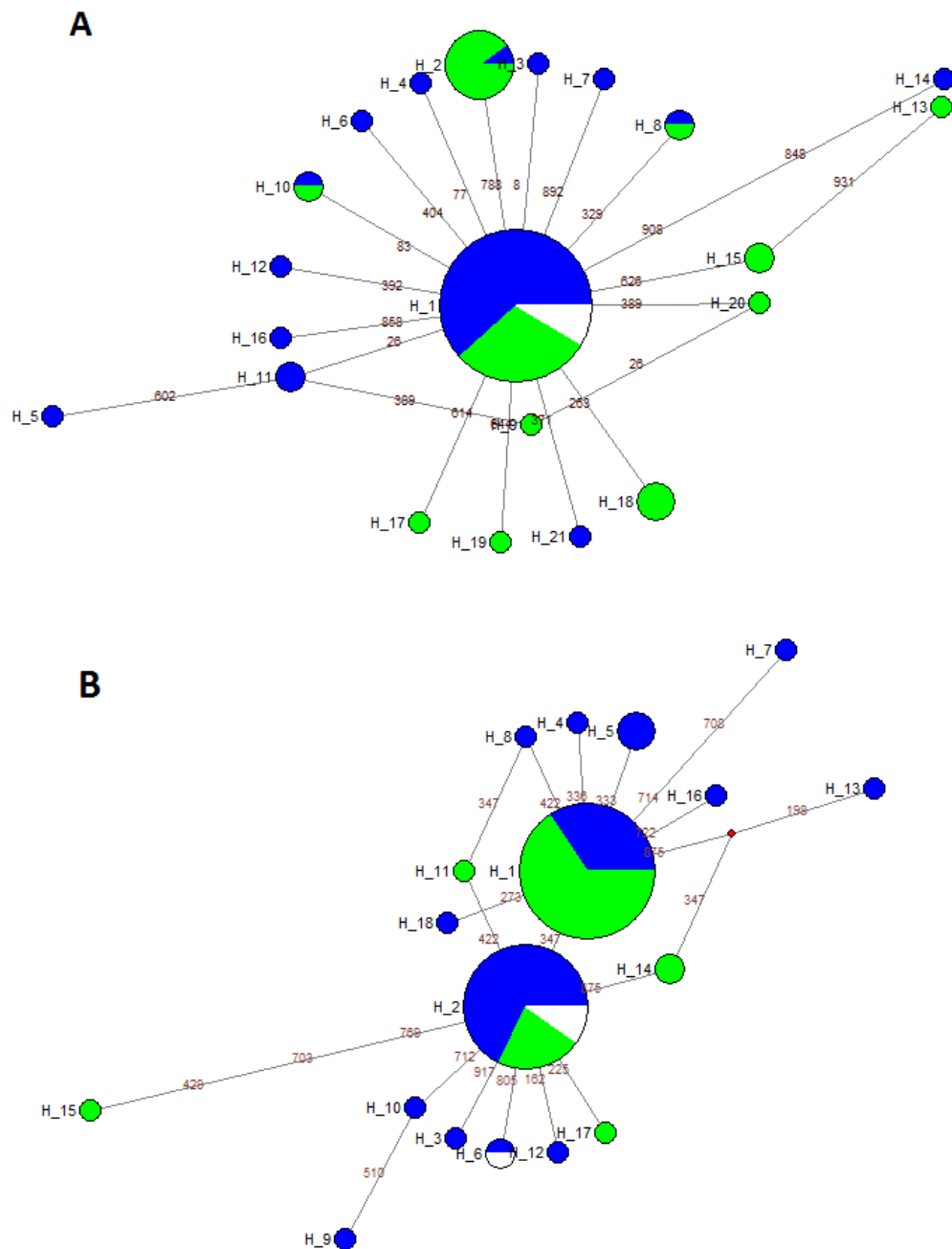


Figure 3 : réseaux d'haplotypes réalisé à partir du logiciel network en utilisant la méthode du median-joining. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus ayant cet haplotype avec la plus petite taille correspondant à un seul individu. Les couleurs indique les proportions de chaque haplotype possédé par chaque sous-espèce. La couleur verte correspond aux *E. s. witherbyi*, la bleue aux *E. s. schoeniclus* et le blanc correspond aux individus non identifiés. **A** réseau d'haplotypes du gène ND1, l'haplotype majoritaire est celui qui a été utilisé pour la phylogénie de la figure 4. **B** réseau d'haplotypes du gène ND2, l'haplotype majoritaire est celui qui a été utilisé pour la phylogénie de la figure 4. Le point rouge correspond à un haplotype intermédiaire pour passer de l'haplotype 14 à l'haplotype 13 mais qui n'a pas été retrouvé chez les individus échantonnés.

La figure 4 présente les deux arbres phylogénétiques incluant les sept espèces proche du Bruant des roseaux. Nous constatons que l'espèce la plus proche de *E. schoeniclus* est séparé par un taux de variation nucléotidique d'environ 0,06 pour le gène ND1 et environ 0,07 pour le gène ND2. Les deux espèces les plus proches *E. rutila* et *E. aureola* sont séparé sur le gène ND1 par un taux de variation nucléotidique compris entre 0 et 0,02 et d'environ 0,03 sur le gène ND2.

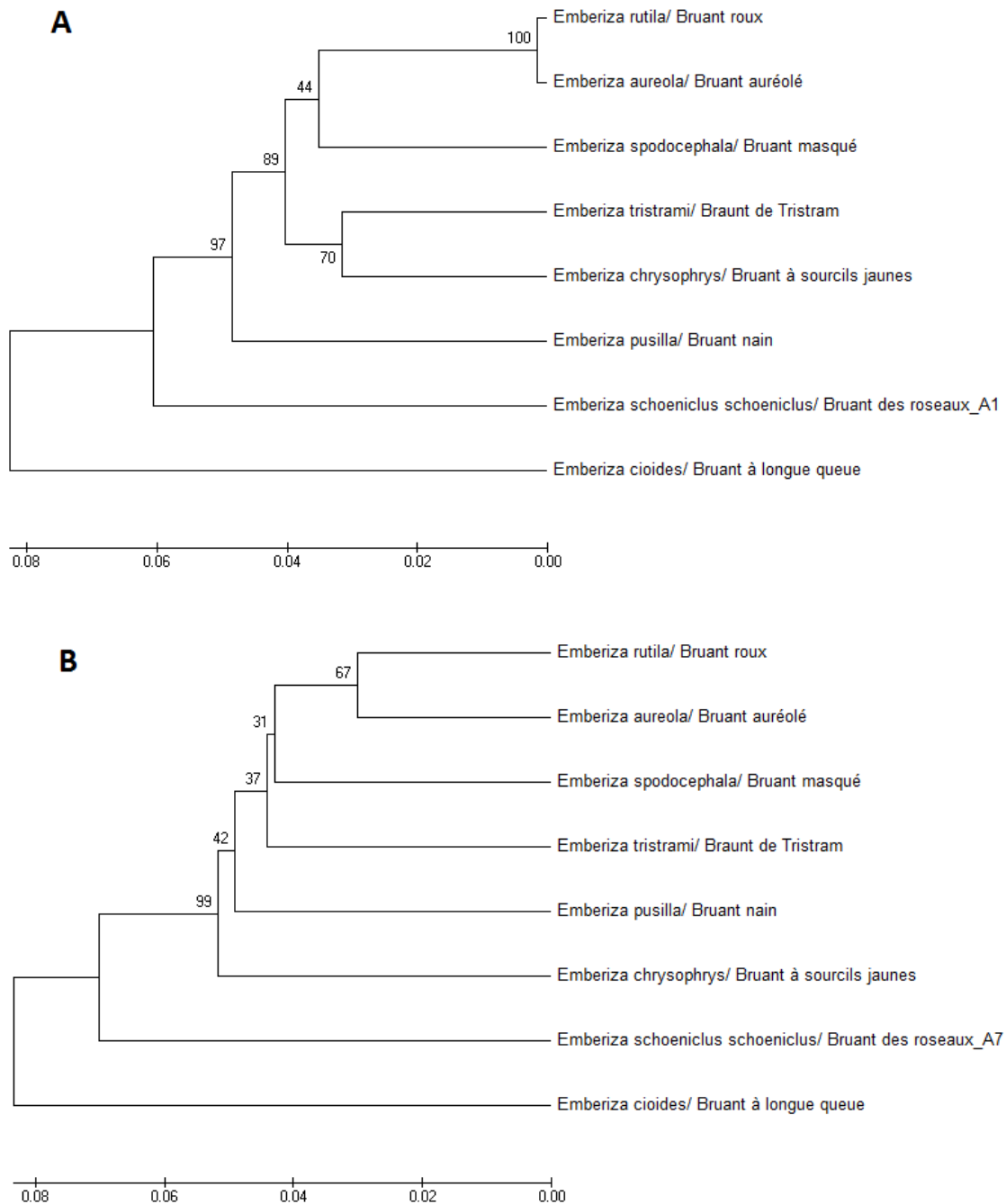


Figure 4 : arbres phylogénétiques des espèces d'*Emberiza* réalisés selon la méthode de l'UPGMA et basés sur **A** le gène ND1 et **B** le gène ND2. Les nombres sur la gauche représentent le niveau de confiance des branches suite au test phylogénétique du bootstrap avec 1000 tirages. L'échelle en bas indique le taux attendu de nucléotides divergents entre deux lignées.

Discussion

1. Différenciation génétique entre les deux sous-espèces

Les *E. s. schoeniclus* et les *E. s. witherbyi* sont très différents morphologiquement et écologiquement. Notamment au niveau de la taille de leurs becs et de leurs ailes et de leurs plumages. Ils ont également une aire de répartition différente, une sous-espèce étant migratrice et l'autre non (Neto *et al.*, 2013). Un si fort niveau de différenciation phénotypique laisse penser qu'il y a eu une longue période de divergence allopatrique entre ces deux sous-espèces. Ainsi nous nous attendions à trouver une différence génétique relativement importante entre les *E. s. schoeniclus* et les *E. s. witherbyi*. Cependant nos résultats ne vont pas dans ce sens avec un taux de divergence sur les deux gènes étudiés de 0,001 ce qui est comparable à la diversité nucléotidique que l'on retrouve au sein de chaque sous-espèce (Tableau 2). Ainsi nous pouvons dire que le niveau de polymorphisme au sein de chaque sous-espèce est comparable au polymorphisme entre les sous-espèces. De plus nous retrouvons un grand nombre d'haplotypes partagés entre les deux sous-espèces. Les tests de neutralités sont significativement négatifs pour les *E. s. schoeniclus* (Tableau 3), ce qui peut indiquer que les gènes sont sous sélection ou qu'il y a une expansion géographique de la population (Irwin *et al.*, 2009). Cependant pour les *E. s. witherbyi*, les tests sont négatifs mais ne sont pas significatifs. Etant donné que le nombre d'oiseaux étudié pour chaque sous-espèce n'est pas très différent (43 *E. s. schoeniclus* et 35 *E. s. witherbyi*) nous pouvons supposer que ce n'est pas lié à un manque de puissance statistique mais à une réelle différence entre ces deux sous-espèces. Il est possible que les gènes aient une évolution différente chez les deux sous-espèces. En effet il a déjà été montré que les gènes codant pour l'enzyme déshydrogénase NADH pouvaient avoir des évolutions différentes au sein de sous-espèces proches (Marshall *et al.*, 2013). Ces résultats pourraient également indiquer que la population des *E. s. schoeniclus* est en expansion géographique. Nous constatons également (Tableau 1) que la diversité haplotypique est assez forte alors que la diversité nucléotidique est faible, ce qui peut également être interprété comme le résultat d'une expansion géographique de la population. Cependant les populations d'*E. s. schoeniclus* sont considérées comme en déclin (Peach *et al.*, 1999 et Brickle & Peach, 2004). Pour pouvoir valider cette hypothèse il faudrait étudier également les populations dans leur zone de reproduction, c'est-à-dire le nord de la France et éventuellement augmenter le nombre d'oiseaux étudié.

Nous avons également étudié plus en détail la population des *E. s. witherbyi* en tenant compte de leur site de capture, pour tenter de mettre en évidence une structuration des populations. Nous avons constaté que la population de Rousty présente pour les deux gènes une diversité nucléotidique et haplotypique plus importante que celle de la Tour Carbonnière. Les haplotypes majoritaires pour les deux gènes sont retrouvés chez des individus capturés sur les deux sites, nous ne pouvons donc pas mettre en évidence une nette différence entre les sites de captures. Ceci peut laisser penser, sachant que les deux sites ne sont séparés que de 34km, que des flux de gènes peuvent avoir lieu. Cependant étant donné le faible taux de différenciation entre les deux sous-espèces il n'est pas surprenant de ne pas trouver une réelle différence entre les deux sites de capture. Nous constatons également que la diversité haplotypique est élevée alors que la diversité nucléotidique est faible. Cependant il paraît difficile de conclure que la population de *E. s. witherbyi* est en expansion géographique, car les populations sont en net déclin dans cette région avec un nombre de captures en constante diminution ces dernières années (commentaire Mr Vollot Benjamin). Néanmoins la population de Rousty, qui possède une plus forte diversité nucléotidique semble être plus importante.

2. Réseau d'haplotypes

Sur le réseau d'haplotypes constitué à partir du gène ND1 (Figure 3A) , nous retrouvons un haplotype majoritaire partagé par les deux sous-espèces, et quelques haplotypes rares partagés ou exclusifs. Ce type de réseau en étoile, est également en faveur de l'hypothèse de l'expansion géographique. Sur le réseau d'haplotypes réalisé à partir du gène ND2 (Figure 3B), nous retrouvons deux haplotypes majoritaires. Bien que l'haplotype H1 soit majoritairement retrouvé chez les *E. s. witherbyi* et l'haplotype H2 chez les *E. s. schoeniclus*, il n'y a pas de différence nette entre les deux sous-espèces. Ce réseau peut être interprété de différentes façons, les deux haplotypes majoritaires pourraient représenter les haplotypes ancestraux des deux sous-espèces et le fait qu'ils soient partagés indiquerait qu'il y a eu hybridation entre les deux groupes (Irwin et *al.*, 2009). Ou alors ils pourraient montrer un début de différenciation dans l'ADN mitochondrial des oiseaux et donc être le témoin d'un début de spéciation.

3. Relations phylogénétiques entre espèces d'*Emberiza*

Les deux arbres phylogénétiques que nous avons construit (Figure 4 A et B) coïncident avec la phylogénie de la famille des *Emberiza* publiée par Alström *et al.* (2008). Ceci nous conforte dans l'idée que les résultats que nous avons trouvés avec ces deux gènes

mitochondriaux sont généralisables. Nous pouvons remarquer dans un premier temps que le taux de divergence nucléotidique estimé entre les espèces est toujours plus important pour le gène ND2 que pour le ND1 ce qui semble indiquer que celui-ci est plus variable, nous avons donc plus de chance de mettre en évidence une différence entre nos deux sous-espèces pour ce gène. Pour le gène ND2 les deux espèces les plus proches sont séparées d'un taux de variabilité nucléotidique de 0,03 et d'un taux inférieur à 0,01 pour le gène ND1. Il n'est donc pas étonnant de trouver un si faible taux de divergence nucléotidique entre les *E. s. schoeniclus* et les *E. s. witherbyi* sur le gène ND1 mais il est particulièrement faible pour le gène ND2.

4. Hypothèse d'une divergence récente

Nos analyses ne permettent pas de distinguer les deux sous-espèces au niveau de leur ADN mitochondrial. Une première hypothèse pour l'expliquer serait que les deux sous-espèces ont divergé depuis un temps très court, et ont donc conservé un polymorphisme ancestral partagé sur les haplotypes majoritaires. Pour concilier cette hypothèse avec la différenciation morphologique marquée entre les deux sous-espèces, il faudrait supposer que l'ADN nucléaire a évolué plus vite que l'ADN mitochondrial. En effet nous pouvons supposer que les *E. s. witherbyi* qui ne migrent pas pendant la saison de reproduction subissent de fortes pressions de sélection sur la taille de leur bec, car si leur bec n'est pas suffisamment fort ils seront incapables de se nourrir. De plus les travaux de Marshall *et al.*, (2013) nous laissent penser que les gènes ND1 et ND2 pourraient être sous sélection ce qui ralentirait leur évolution. Certains modèles d'évolution indiquent que des pressions écologiques suffisamment importantes, notamment sur le régime alimentaire, peuvent permettre une spéciation en zone de sympatrie (Matessi *et al.*, 2001 et Orłowski *et al.*, 2013) ce qui est le cas pour ces deux sous-espèces. En effet bien qu'aujourd'hui les zones de reproduction semblent parapatriques (sans que cela ne soit clairement démontré), nous pouvons imaginer qu'avant de commencer à se différencier ces deux sous-espèces vivaient en sympatrie et utilisaient une niche écologique similaire. La taille plus importante du bec des *E. s. witherbyi* aurait permis l'apparition d'une innovation comportementale qui aurait conduit à un début de différenciation.

5. Hypothèse d'introgession

Une autre hypothèse serait qu'il y a, ou qu'il y a eu, de l'hybridation entre les deux groupes, qui aurait introduit de l'ADN mitochondrial d'une sous-espèce dans l'autre. En effet certaines observations semblent indiquer qu'une zone d'hybridation serait possible (Kilota,

2014). De plus il semblerait que les *E. s. witherbyi* présents dans le sud de la France possèdent un bec plus petit que ceux présents en Espagne (commentaire Mr Vollot Benjamin). Ceci pourrait indiquer que l'ADN des *E. s. witherbyi* du sud de la France est « pollué » par l'ADN des *E. s. schoeniclus*. Ce phénomène pourrait arriver assez facilement malgré de fortes pressions de sélection contre les hybrides (Irwin *et al.*, 2009) et serait assez fréquent entre espèces d'*Emberizidae* (Irwin *et al.*, 2009 et Rubtsov & Opaev, 2012).

Afin de trancher entre ces deux hypothèses il faudrait poursuivre en étudiant à la fois l'ADN mitochondrial et l'ADN nucléaire des oiseaux. En effet comme l'a montré Moore (1995) une étude combinée de l'ADN mitochondrial et nucléaire offre une plus grande probabilité de reconstruire fidèlement l'arbre phylogénétique des espèces. Une telle étude permettrait également de comparer le niveau de diversité de l'ADN nucléaire et mitochondrial et également de savoir si le régime de sélection est le même. De plus une étude basée sur les microsatellites permettrait de déceler les éventuels flux de gènes qui peuvent exister entre les sous-espèces et les populations d'oiseaux. Elle permettrait également d'étudier les populations sur la base de fréquences alléliques ce qui apporterai une information supplémentaire.

Conclusion

Zink (2004) considère que deux sous-espèces différenciées morphologiquement mais ne constituant pas deux groupes distinct d'un point de vue de l'ADN mitochondrial ne devrait pas être classées comme deux unités évolutives distinct. Cependant le fait que nous ne mettions pas en évidence de réelle différence au niveau de l'ADN mitochondrial entre les *E. s. schoeniclus* et les *E. s. witherbyi* ne nous permet pas d'arriver à une telle conclusion. En effet il est possible que les relations retrouvées avec l'ADN mitochondrial ne correspondent pas à celles de l'ADN nucléaire, et plusieurs phénomènes peuvent l'expliquer. Une étude plus poussée incluant de l'ADN nucléaire serait donc à envisager pour savoir réellement quel phénomène a conduit à une homogénéisation de l'ADN mitochondrial. Malgré tous, ces deux sous-espèces constituent un modèle intéressant pour l'étude de la spéciation en zone parapatrique. Car elles constituent un exemple montrant comment l'utilisation de niches écologiques différentes peut conduire à une spéciation sans la présence d'une barrière géographique.

Bibliographie

- Alström P., Olsson U., Lei F., Wang H. T., Gao W. & P. Sundberg**, 2008. Phylogeny and classification of the Old World *Emberizini* (Aves, Passeriformes). *Molecular phylogenetics and evolution*, **47**:960–973.
- Corl A., & H. Ellegren**, 2013. Sampling strategies for species trees : the effects on phylogenetic inference of the number of genes, number of individuals, and whether loci are mitochondrial, sex-linked, or autosomal. *Molecular phylogenetics and evolution*, **67**:358–366.
- Bandelt H. J., Forster P. & A. Röhl**, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.. *Molecular biology and evolution*, **16**:37–48.
- Bello N., Francino O. & A. Sanchez**, 2001. Isolation of genomic DNA from feathers. *Journal of Veterinary diagnostic investigation*, **13**:162–164.
- Borge T., Webster M. T., Andersson G. & G. P. Saetre**, 2005. Contrasting patterns of polymorphism and divergence on the Z chromosome and autosomes in two *Ficedula flycatcher* species. *Genetics*, **171**:1861–1873.
- Brickle N. W. & W. J. Peach**, 2004. The breeding ecology of Reed Buntings *Emberiza schoeniclus* in farmland and wetland habitats in lowland England. *Ibis*, **146**:69–77.
- Dubois P. J., Le Maréchal P., Oliosio G. & P. Yésou**. Inventaire des oiseaux de France : avifaune de la France métropolitaine. Paris : Nathan, 2001, 398 p.
- Fu Y. X.**, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**:915-925.
- Funk D. J., Nosil P. & W. J. Etges**, 2006. Ecological divergence exhibits consistently positive associations with reproductive isolation across disparate taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**:3209–3213.
- Grapputo A., Pilastro A. & G. Marin** 1998. Genetic variation and bill size dimorphism in a passerine bird, the reed bunting *Emberiza schoeniclus*. *Molecular Ecology*, **7**:1173–1182.
- Hall T. A.**, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, **41**:95–98.
- Hillis D. M., Moritz C. & B. K. Mable**, *Molecular Systematics*. Sunderland Massachusetts : Sinauer Associates, 1996, 467 p.
- Hu L., Pan T., Zhu X., Wang H., Hou Y., Yu L. & B. Zhang**, 2013. Mitochondrial genome of the black-faced bunting (*Emberiza spodocephala*). *Mitochondrial DNA*, **25**:165-166.
- Irwin D. E., Rubtsov A. S. & E. N. Panov**, 2009. Mitochondrial introgression and replacement between yellowhammers (*Emberiza citronella*) and pine buntings (*Emberiza leucocephalos*)(Aves : Passeriformes). *Biological Journal of the Linnean Society*, **98**:422–438.
- Librado P., & J. Rozas**, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**:1451–1452.
- Kan X., Yuan J., Zhang L., Li X., Yu L., Chen L., Guo Z. & J. Yang**, 2013. Complete mitochondrial genome of the Tristram's Bunting, *Emberiza tristrami* (Aves: Passeriformes) : The first representative of the family *Emberizidae* with six boxes in the central conserved domain II of control region. *Mitochondrial DNA*, **24**:648–650.

- Kilota L.**, Etude sur les passereaux paludicoles : Comparaison de méthode de détection et focus sur la sous-espèce witherbyi du Bruant des roseaux (*Emberiza schoeniclus witherbyi*) : rapport de stage. Master 2 Ecologie Ethologie. Université Jean Monnet, Saint-Etienne, 2014, 58p.
- Kvist L., Ponnikas S., Belda E. J., Encabo I., Martínez E., Onrubia A., Hernandez J. M., Vera P., Neto J. M. & J. S. Monros**, 2011. Endangered subspecies of the Reed Bunting (and) in Iberian Peninsula have different genetic structures. *Journal of ornithology*, **152**:681–693.
- Marshall H. D., Baker A. J. & A. R. Grant**, 2013. Complete mitochondrial genomes from four subspecies of common chaffinch (*Fringilla coelebs*): New inferences about mitochondrial rate heterogeneity, neutral theory, and phylogenetic relationships within the order Passeriformes. *Geneo*, **517**:37–45.
- Matessi G., Dabelsteen T. & A. Pilastro**, 2001. Subspecies song discrimination in a Mediterranean population of the reed bunting *Emberiza schoeniclus intermedia*. *Italian Journal of Zoology*, **68**:311–314
- Matessi G., Griggio M. & A. Pilastro**, 2002. The geographical distribution of populations of the large-billed subspecies of reed bunting matches that of its main winter food. *Biological Journal of the Linnean Society*, **75**:21–26.
- Moore W. S.**, 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 718-726.
- Neto J., Gordinho L., Belda E. J., Marin M., Monros J. S., Fearon P. & R. Crates**, 2013. Phenotypic divergence among West European populations of reed bunting *Emberiza schoeniclus*: the effects of migratory and foraging behaviorus. *PloS one*, **8**:e63248.
- Newton I.** the migration ecology of birds. London : Academic Press, 2010, 976 p.
- Orlowski G., Karg J., & J. Czarnecka**, 2013. Substantial contribution of invertebrates to the diet of a winter seed-eater, the reed bunting *Emberiza schoeniclus*, wintering in a sewage farm in south-western Poland. *Biological Journal of the Linnean Society*, **108**:429–433.
- Pan T., Wang H., Zhu X., Zhou W., Hou Y., Yu L. & B. Zhang**, 2013. Mitochondrial genome of the *Emberiza pusilla* (Emberizidae: *Emberiza*). *Mitochondrial DNA*, **24**:382-384.
- (2) **Pan T., Ren L., Zhu X., Yan L., Hu C., Chang Q. & B. Zhang**, 2013. Mitochondrial genome of the *Emberiza aureola* (Emberizidae: *Emberiza*). *Mitochondrial DNA*, **1**:1-2.
- Peach W. J., Siriwardena G. M. & R. D. Gregory**, 1999. Long-term changes in over-winter survival rates explain the decline of reed buntings *Emberiza schoeniclus* in Britain. *Journal of Applied Ecology*, **36**:798–811.
- Podos J., Southall J. A. & M. R. Rossi-Santos** 2004. Vocal mechanics in Darwin’s finches: correlation of beak gape and song frequency. *The Journal of experimental biology*, **207**:607–619.
- Price T.**, Speciation in birds. Greenwood Village : Roberts and Company, 2008, 467 p.
- Ramos-Onsins S. E. & J. Rozas**, 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution*, **19**:2092-2100.
- Ren L., Pan T., Hu C., Chen C., Zhou Y. & B. Zhang**, 2013. Mitochondrial genome of the *Emberiza rutila* (Emberizidae: *Emberiza*). *Mitochondrial DNA*, **25**:359-360.
- Ren Q., Yuan J., Ren L., Zhang L., Zhang L., Jiang L., Chen D., Kan X. & B. Zhang**, 2014. The complete mitochondrial genome of the yellow-browed bunting, *Emberiza chrysophrys* (Passeriformes: *Emberizidae*), and phylogenetic relationships within the genus *Emberiza*. *Journal of genetics* **93**:699-707.
- Rohwer S. & D. E. Irwin**, 2011. Molt, orientation and avian speciation. *Ornithological Monographs*, **128**:419–425.
- Rubtsov A. S. & A. S. Opaev**, 2012. Phylogeny reconstruction of the yellowhammer (*Emberiza citronella*) and pine bunting (*Emberiza leucocephala*) based on song and morphological characters. *Biology Bulletin*, **39**:715–728.
- Sanchez-Gracia A. & J. Castresana**, 2012. Impact of deep coalescence on the reliability of species tree inference from different types of DNA markers in mammals. *PLOS One*, **7**:e30239.

- Tajima F.**, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**:585-595.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & S. Kumar**, 2011. MEGA5 : molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, **28**:2731-2739.
- Winker K.**, 2010. Subspecies represent geographically partitioned variation, a gold mine of evolutionary biology, and a challenge for conservation. *Ornithological Monographs*, **67**:6–23.
- Zink R. M.** 2004. The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **271**:561–564.

Résumé

Chez plusieurs passereaux l'existence de sous-espèces différenciées morphologiquement et écologiquement, a été démontrée. C'est notamment le cas du Bruant des roseaux (*Emberiza schoeniclus*) qui est l'espèce la plus variable du genre des *Emberizidae*. Dans cette étude nous présentons le cas de deux sous-espèces *E. s. schoeniclus* et *E. s. witherbyi*, très différentes phénotypiquement, notamment au niveau de leurs apparences et de leurs comportements alimentaire, mais pour lesquelles nous ne mettons pas en évidence de différences au niveau de leur ADN mitochondrial. Nous avons étudié deux gènes mitochondriaux ND1 et ND2, pour lesquels les niveaux de polymorphismes intra et inter spécifiques étaient comparable et très faible par rapport aux autres espèces du même genre. Nous retrouvons également un grand nombre d'haplotypes partagés par les deux sous-espèces pour les deux gènes. Nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle ces deux sous-espèces auraient divergé depuis un temps très court, qui n'aurait pas permis l'installation de suffisamment de mutations pour les discriminer. Cependant nous ne pouvons pas non plus valider l'hypothèse selon laquelle l'absence de différence serait liée à un phénomène d'introgression de l'ADN mitochondrial d'une sous-espèce dans l'autre. En effet pour pouvoir conclure il faudrait mener une étude incluant à la fois de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire pour connaître le taux de divergence des deux. Toute fois ces deux sous-espèces constituent un modèle intéressant pour étudier la spéciation par l'utilisation de niches écologiques différentes sans la présence d'une barrière géographique.

Mots-clés : spéciation, hybridation, divergence génétique, *Emberiza schoeniclus schoeniclus* et *Emberiza schoeniclus witherbyi*.

Abstract

Genetic characterization of two subspecies of Reed Buntings (*Emberiza schoeniclus*) from the study of their mitochondrial DNA.

In many sparrows the existence of subspecies differentiated morphologically and ecologically, was demonstrated. This is particularly the case of the Reed Bunting (*Emberiza schoeniclus*), which is the most variable species of the *Emberizidae's* family. This study presents the case of two subspecies *E. s. schoeniclus* and *E. s. witherbyi*, very different phenotypically, especially in their appearance and their food behaviors, but we do not find evidence of differences in their mitochondrial DNA. We investigated two mitochondrial genes ND1 and ND2, for which polymorphisms within and between specific levels were comparable and very low compared to other species of the same family. We also find a large number of haplotypes shared by both subspecies for both genes. We can not exclude the hypothesis that these two subspecies have diverged a very short time, which would not have allowed the installation of enough mutations to discriminate them. However we can not validate the hypothesis that the lack of difference may be related to a phenomenon of introgression of mitochondrial DNA of a subspecies in the other. In fact to conclude we should conduct a study including both the mitochondrial DNA and nuclear DNA to know the rate of divergence of the two. However these two subspecies are an interesting model to study speciation by the use of different ecological niches without the presence of a geographic barrier.

Keywords : speciation, hybridization, genetic divergence, *Emberiza schoeniclus schoeniclus* and *Emberiza schoeniclus witherbyi*.