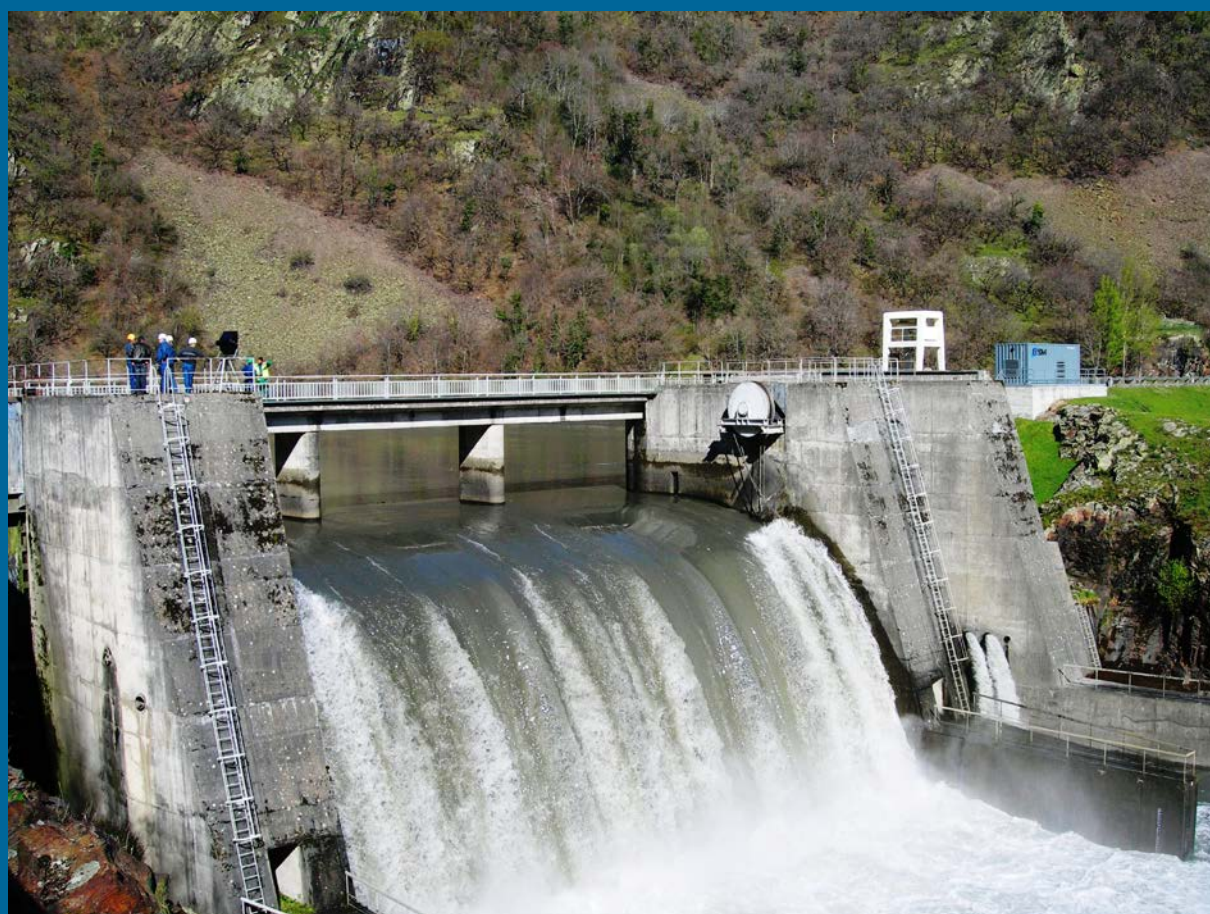


Analyse génétiques des truites du Canal d'Arlos et positionnement dans la diversité génétique locale (6 microsatellites)

Projet GARO1
Rapport de mars 2013



© FD31

Analyses statistiques, interprétation, rédaction: **Patrick Berrebi**
Analyses moléculaires: **Zhaojun Shao**

* Institut des Sciences de l'Evolution, UMR5554 UM2/CNRS/IRD, Université Montpellier 2, CC065,
place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex, tel: 04 67 14 37 32, patrick.berrebi@univ-montp2.fr

1. Introduction

Ce projet entre dans le cadre de l'analyse génétique des truites habitant l'amont de la Garonne, de la frontière espagnole (pays où la Garonne prend sa source) jusqu'à sa confluence avec le Salat.

Ces études ont fait l'objet de deux rapports: Berrebi & Cherbonnel (2011) nommé ENSAT2 et Berrebi & Genindexe (2012) ou ENSAT3, commandés par l'ENSAT. Ces études ont aussi aidé à un stage de Master 2 (Noël 2007). Plus récemment, la Fédération de Pêche de Haute Garonne a souhaité analyser la composition génétique des truites du lac d'Espingo (ESP1: Berrebi & Shao 2012).

L'ensemble de ces recherches ont montré que d'une part la souche élevée dans la pisciculture départementale de Soueich, ayant largement servi aux alevinages de la zone étudiée, était légèrement différente mais très proche de la souche domestique atlantique nationale, commercialisée dans presque toutes les piscicultures françaises, et d'autre part que les populations de rivière présentaient un mélange (hybridation) variable entre cette souche domestique et une autre forme sauvage (qui a été considérée comme la souche naturelle de la Garonne).

La récente étude du lac d'Espingo a montré qu'il était peuplé de truites domestiques légèrement différentes de l'ensemble quasi homogène Soueich-piscicultures commerciales françaises, supposées issues de repeuplements plus anciens.

Cependant cette simplicité apparente de truites sauvages, de type Garonne, introgressées (= hybridées avec hybrides fertiles) par des truites domestiques (i) de type ancien (Espingo), (ii) dérivées de la domestique nationale (Soueich) ou (iii) commerciales actuelles (présentes dans la plupart des piscicultures françaises), est mise en doute par quelques observations:

- l'étude de la composition des truites de la même zone capturées en 2006-2007 et 2010 montre un changement énorme de la présence domestique commerciale: 1 à 12% en 2006-2007 et 35 à 65% en 2010, ce qui n'a presque jamais été observé ailleurs. La forte proportion de truites "sauvages" (99% à Caubous en 2010) est assez étonnante puisqu'il n'y a pratiquement pas de frayères fonctionnelles observées, et une très forte perturbation hydroélectrique de l'ensemble du bassin versant;

- une analyse scalimétrique faite récemment par l'ENSAT a montré qu'il était possible de distinguer les truites ayant grandi en pisciculture (même si elles sont relâchées précocement en rivière) de celles étant nées en rivière (ou déposées en boîtes Vibert) : le rayon allant du nucleus jusqu'au 1er annulus, et le nombre et l'espacement des circoli, sont différents, ces mesures étant supérieures en pisciculture que dans la Garonne. Or la comparaison entre la scalimétrie et la génétique n'a montré aucune corrélation. Serait-il possible que des truites que les études génétiques considèrent comme sauvages soient en réalité domestique?

- des prélèvements hivernaux en Garonne amont, depuis de nombreuses années, montrent 50 à 70 % d'adultes stériles (données FD31). Ces truites stériles pourraient être éventuellement triploïdes, ce qui n'aurait pas d'influence sur l'interprétation mais démontrerait qu'elles seraient le résultat de manipulations humaines. Il y a aussi la possibilité d'une présence de perturbateurs endocriniens qui pourraient expliquer cette stérilité (et l'absence quasi-totale de frayères et de comportement reproductif observé en Garonne amont). Depuis 2012, une thèse en pharmacie explore cette piste. Pour l'instant, les POCIS (ou *polar organic chemical integrative samplers* qui sont des capteurs cumulatifs laissés dans l'eau) ont indiqué quelques signes de présence significative de molécules actives (à confirmer).

Il faudrait donc tester l'hypothèse selon laquelle, le type "sauvage Garonne" mis en évidence dans les études génétiques, soit en fait des domestiques espagnoles ayant dévalé.

C'est pour essayer de résoudre cette question que la présente étude se propose d'analyser un échantillon de truites du canal d'Arlos, échantillonné à l'occasion d'une pêche de sauvetage. Ce canal de la centrale hydroélectrique est une structure en béton à l'aval de la frontière espagnole (Annexes 2 et 3), infranchissable à la remontée, dont le peuplement est représentatif de la composition salmonicole espagnole.

2. Echantillonnage

Les caractéristiques de l'échantillon du canal d'Arlos ainsi que des quatre autres échantillons utilisés comme références génétiques et analysés dans le présent rapport sont détaillées dans le Tableau 1. Les 30 échantillons de nageoires sont parvenus le 19 novembre 2012 au laboratoire de Montpellier. Gaël Durbe est le correspondant de la Fédération de Pêche 31 pour ce projet GARO1.

En plus de l'échantillon de 2012, des échantillons de référence ont été ajoutés: des localités aval connues pour être fortement "sauvages" (Fos et Caubous) ainsi que des échantillons de truites domestiques locales (pisciculture de Soueich) et commerciales françaises provenant de deux piscicultures (Seine-Maritime et Pas-de-Calais) (Tableau 1).

n° Fig. 2	échantillon	n° ISEM	n° échantillon	nombre	date
1	Canal d'Arlos	T24297 à T24326	L554	30	nov-12
2	Caubous	T19113 à T19134	L363	22	oct-10
3	Fos	T19038 à T19062	L360	25	oct-10
4	P. Soueich	T22251 à T22280	L495	30	juil-05
5	P. commerciales	T16971 à T17001	L267 & L268	30	juin-05

Tableau 1 : Caractéristiques des truites analysées dans ce rapport (ligne jaune) et des truites de référence servant aux comparaisons dont les truites domestiques atlantiques (en gris).

3. Méthode moléculaire

Les morceaux de nageoire de truites prélevées au bord du canal et mis immédiatement dans l'alcool peuvent être conservés ainsi plus de 10 années. L'ADN d'un minuscule morceau (1 mm x 2 mm) est **extraît** dans une mixture de protéinase K (détruit les protéines et libère l'ADN) et de Chelex (chélateur des enzymes destructeurs naturelles de l'ADN et de certains inhibiteurs) pendant au moins deux heures. Après centrifugation, le surnageant dilué sert d'extrait d'ADN.

Les extraits d'ADN sont rajoutés à un mélange réactionnel (le mix) capable d'**amplifier** le petit morceau d'ADN cible: le marqueur microsatellite (synthèse artificielle de l'ADN cible: ou PCR). Le milieu réactionnel se charge alors d'une très grande quantité de fragments d'ADN artificiel cible.

Les variants de longueur des microsatellites (les allèles) sont caractéristiques de chaque truite et sont la base des calculs futurs. Pour les mesurer, ils sont mis à migrer sous un champ électrique dans un gel d'acrylamide (la **migration**) puis scannés. Un analyseur d'image permet de mesurer automatiquement la longueur des fragments d'ADN, ces mesures sont contrôlées par un technicien expérimenté.

La matrice de génotypes est constituée à partir de ces mesures. Elle constitue la base de toutes les analyses statistiques qui suivent.

4. Méthode statistiques

Les données moléculaires (génotypes) obtenues, codées, permettent d'établir une matrice. Additionnée de la matrice des échantillons de référence (pour les comparaisons) d'échantillons déjà connues (voir Tableau 1), la matrice finale permet d'effectuer les traitements statistiques suivants, constitués de deux étapes principales.

L'**analyse multidimensionnelle** (ici un Analyse Factorielle des Correspondances ou AFC effectuée grâce au logiciel GENETIX) produit un diagramme qualitatif où chaque truite est positionnée en fonction de son génotype décrypté pour chaque marqueur microsatellite. Plus deux points sont rapprochés, plus les truites qu'ils représentent se ressemblent génétiquement. Plus ils sont éloignés et plus les truites sont différentes. Cela permet de détecter des "nuages" de points correspondant à des lignées génétiques permettant de comprendre de quel type sont les truites analysées.

L'**analyse d'assignation** (ici une méthode bayésienne appliquée avec le logiciel STRUCTURE) permet d'assigner chaque truite à un sous-groupe. La constitution de ces sous-groupes ne tient pas compte de l'origine des truites mais seulement de leur génotype. Le point le plus délicat est de savoir combien de sous groupes (k) sont contenus dans les truites analysées, aussi des essais avec k allant de 2 à 6 ou 10 sont nécessaires. Il faut que la partition ait un sens biologique. Les truites peuvent être assignées à plusieurs sous groupes (généralement 2) si elles sont hybridées. Cette méthode, plus quantitative, permet de chiffrer avec précision la composition génétique d'un échantillon (par exemple les pourcentages de truites sauvages et domestiques dans un échantillon) ou d'une truite hybride.

Une fois les lignées déterminées par les deux précédentes méthodes, une mesure de la **différentiation entre échantillon** pris 2 à 2 est faite (Fst) et la significativité de chaque différence est estimée par test de permutation. Les informations biologiques tirées de ces calculs sont détaillées dans la discussion.

5. Résultats

5.1 - Analyse multidimensionnelle

L'analyse multidimensionnelle présentée en Figure 1 doit être considérée comme un débroussaillage des données. Elle donne la meilleure représentation des ressemblances et dissemblances entre échantillons de référence et l'échantillon du canal d'Arlos.

Le diagramme nous montre qu'il y a une polarité entre les truites de type Garonne à droite, très homogènes (c'est pour cela qu'on a une forme en pointe vers la droite) et les formes domestiques plus diverses à gauche (c'est pour cela qu'il y a une sorte d'éventail vers la gauche).

D'après cette analyse, les truites du canal d'Arlos sont bien distincte de celles de l'amont français de la Garonne (Fos et Caubous) mais les trois souches (canal d'Arlos, domestiques nationales et domestiques de la pisciculture de Soueich) semblent globalement équidistantes. C'est trompeur parce qu'en regardant le détail des truites du canal (carrés jaunes) il y en a beaucoup à droite et peu à gauche.

Ces résultats généraux vont être précisés par l'analyse d'assignation qui suit ainsi que par le calcul des différenciations (Fst).

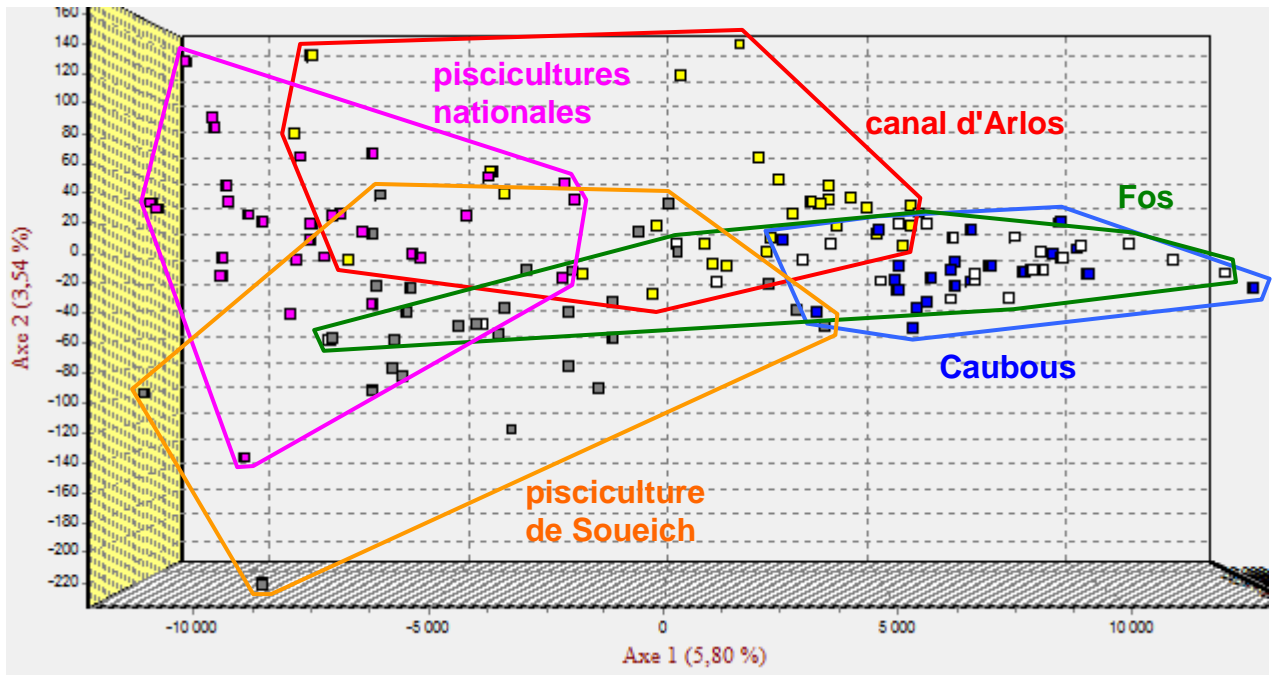


Figure 1 : Analyse multidimensionnelle (ici une AFC) montrant les ressemblances et dissemblances génétiques des 5 échantillons décrits au Tableau 1. Une polarité s'organise le long de l'axe 1 horizontal, avec le type sauvage Garonne à droite et les types domestiques à gauche.

5.2 - Analyse d'assignation

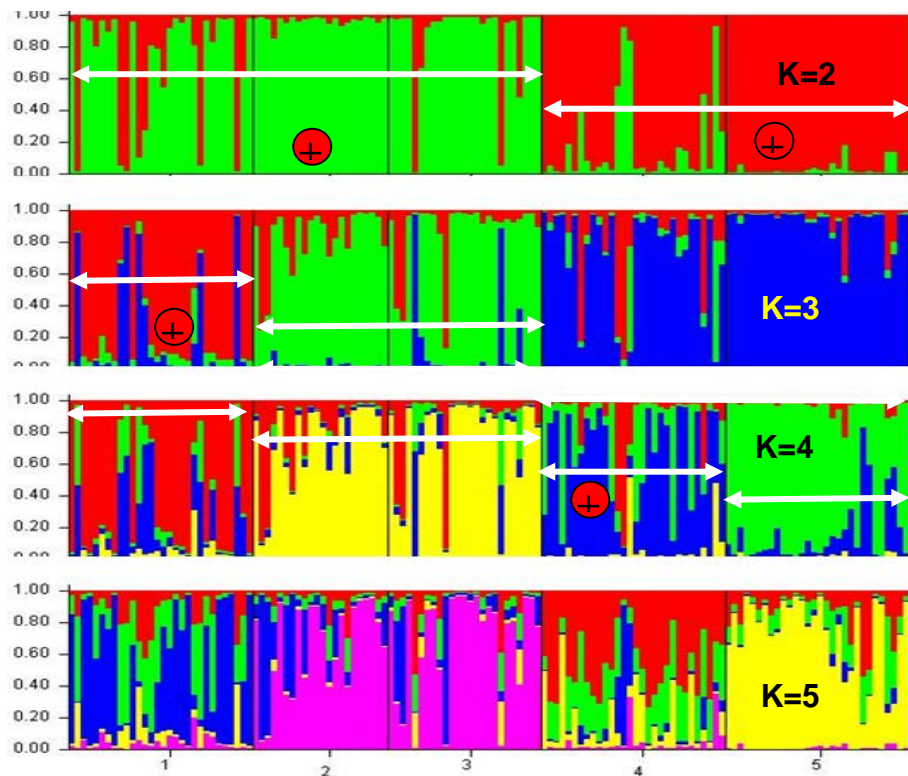


Figure 2 : Analyse d'assignation par le logiciel STRUCTURE. Les échantillons sont: 1 = canal d'Arlos; 2 et 3 = Caubous et Fos 2010; 4 = Soueich et 5 = domestiques.

Cette analyse d'assignation est représentée à 4 étapes successives, pour k=2, 3, 4 et 5. Les flèches blanches \longleftrightarrow montrent les sous-groupes objectifs que l'analyse a détectés, leur donnant une couleur dominante. Les signes (+) indiquent chaque fois qu'un nouveau sous-groupe est découvert. Nous voyons qu'après k=4, le nombre de sous-groupes n'augmente plus. Il y a bien 4 entités génétiques dans le jeu d'échantillons analysés ici: pour k=4, nous avons Canal d'Arlos en rouge, Caubous-Fos en jaune, Soueich en bleu et domestiques nationales en vert (en Annexe 1, en fin de rapport, une analyse plus large montre qu'il faut rajouter les truites d'Espingo comme entité génétique de plus).

n° station	échantillon	nombre	CA	G	S	P
1	Canal d'Arlos	30	64	5	19	12
2	Caubous	22	20	73	5	2
3	Fos	25	13	73	8	6
4	P. Soueich	30	11	6	59	24
5	P. commerciales	30	3	2	15	80

Tableau 2 : Conversion chiffrée de la figure 2 (valeurs moyennes sur trois tests parallèles). Les valeurs autour et en dessous de 5% peuvent être considérées comme du "bruit de fond" de la méthode. CA = canal d'Arlos; G = Garonne française; S = pisciculture de Soueich et P = deux piscicultures commerciales françaises. Les truites du canal d'Arlos sont composées à 65% d'un type nouveau et de 30% des divers types domestiques français.

5.3 - Mesure de la différenciation

	Caubous	Fos	Soueich	domestiques
canal d'Arlos	12% ***	13% ***	8% ***	10% ***
Caubous		1% ns	9% ***	18% ***
Fos			10% ***	17% ***
Soueich				5% ***

Tableau 3 : la différenciation est présentée là sous forme d'une matrice triangulaire. Chaque valeur, exprimée en pourcentage oppose l'échantillon indiqué à gauche sur la même ligne et celui indiqué en haut sur la même colonne. Ns = non significatif; *** = hautement significatif (5000 permutations)

Dans le Tableau 2, nous remarquons la proximité (quoi que la différence soit significative) entre la pisciculture de Soueich et les piscicultures commerciales (5%), la forte différence entre les truites du canal d'Arlos et celles de la Garonne juste à l'aval (12 à 13%) et la similitude entre les stations de la Garonne française (1%, non significatif).

6. Interprétation et discussion

La question posée est celle de l'influence, sur les truites de l'amont français de la Garonne, des truites qui nous viennent d'Espagne par le canal d'Arlos.

L'analyse de ces truites aboutit à la détection de 65% d'une forme nouvelle que nous appellerons "espagnole" avec environ 30% de formes domestiques diverses. L'observation attentive des gels de migration n'a permis de détecter aucun génotype triploïde. Cette détection est aisée pour les locus microsatellites les plus polymorphes (ce qui augmente la

probabilité d'observer 3 allèles pour le même individu): les locus SsoS1311 (29 allèles dont 18 dans l'échantillon du canal) et Omy21Dias (18 et 11) sont très favorables à l'observation de la triploïdie.

Si on suit cette lignée espagnole à l'aval, on se rend compte que sa présence s'élève à 20% à Caubous en 2010, 13% à Fos et plus de 10% dans la souche Soueich. Cette influence sur les populations de la Garonne française est au moins deux fois plus forte que celle de Soueich et des piscicultures commerciales réunies. L'effet de dévalaison est évident.

Une fois ceci constaté, il est bien difficile de discerner le naturel du domestique dans ces nombreuses lignées.

Pour répondre à l'autre question, celle de l'absence de corrélation entre scalimétrie et génétique, le diagramme d'assignation de l'Annexe 1 a été traduit en chiffres (pour K=5).

Le tableau 4 donne les estimations en pourcentages de la composition de chaque échantillon. Ces pourcentages sont parfois différents de ceux donnés au Tableau 2, ceci est dû au fait que d'autres échantillons ont été utilisés comme références, et surtout celui d'Espingo qui "capture" une partie des assignations du fait de sa ressemblance avec les formes domestiques actuelles.

n° station	échantillon	nombre	G	CA	Es	S	P
1	Canal d'Arlos	30	8	49	14	13	17
3	Fos	25	50	33	3	7	8
	Pont d'Ore	25	58	24	3	8	6
	Arlos	25	56	37	2	3	2
2	Caubous	22	48	43	2	6	2
4	P. Soueich	30	4	8	6	60	23
	écailles P	30	44	33	6	12	6
	écailles S	30	36	30	2	26	6
	Espingo	30	2	2	85	7	5
5	P. commerciales	30	1	2	4	10	82

Tableau 4 : Pourcentages des cinq lignées détectées dans l'analyse d'assignation montrée en Annexe 1. Ces estimations sont les moyennes de 3 tests pour k=5. Les échantillons sont pris dans le même ordre que le diagramme et les entêtes du tableau reprennent les couleurs que le logiciel STRUCTURE a utilisées. G = Garonne française; CA = canal d'Arlos; Es = Espingo; S = pisciculture de Soueich et P = deux piscicultures commerciales françaises.

En acceptant l'hypothèse selon laquelle le type espagnol serait un type domestique, il n'y a pas plus de corrélation entre scalimétrie et génétique (Tableau 4). En observant ces deux échantillons (lignes bleues au Tableau 4), et en considérant que seul le type Garonne (G) est sauvage, il y a une forte similitude dans la composition des deux groupes de truites à d'écailles différentes.

Il reste une hypothèse pour expliquer ces résultats inattendus: si toutes les truites analysées sont d'origine domestique, c'est à dire de lignées piscicultures commerciales, pisciculture de Soueich, pisciculture espagnole (canal d'Arlos) et même le type Espingo, auxquels il faudrait rajouter le type Garonne (G) qui serait une forme domestique d'origine inconnue mais fortement implantée... alors, la scalimétrie ne distinguerait pas entre sauvages et domestiques mais entre domestiques nées dans la rivières et domestiques alevinées. Si cette hypothèse était vraie, les études génétiques auraient simplement trié les lignées domestiques

utilisées de longue date dans la région. Aucune corrélation scalimétrie-génétique ne serait attendue.

Que penser de cette hypothèse du "tout domestique" et comment essayer de la tester:

POUR. Si le type Garonne (Caubous/Fos) est bien le type sauvage local, il est difficile d'expliquer qu'il soit quasi-absent de l'amont espagnol (canal d'Arlos). En revanche, si ce type Garonne était une souche de pisciculture introduite en aval de la frontière, donc uniquement en France et en aval du barrage frontalier de Plan d'Arem, il serait logique de ne pas le retrouver sur l'amont espagnol puisque le barrage est infranchissable à la remontée.

CONTRE. Le grand nombre d'analyses faites par le laboratoire de Montpellier à travers la France (actuellement, début 2013, environ 950 stations et 25000 truites) ne pousse pas vraiment à adopter cette hypothèse. Aucune région de France n'a montré un remplacement complet du peuplement naturel par des truites domestiques et jamais le type domestique ne s'est montré aussi structuré et différencié. La forme naturelle autochtone, adaptée de longue date au milieu, a toujours résisté (au niveau régional, pas dans toutes les rivières), avec encore, en général, une dominance globale des naturelles sur les domestiques.

Une échéance proche permettra peut-être de résoudre cette question: le projet GENETRUTTA. Par sa couverture géographique, l'étude apporte une puissante méthode de diagnostic: la structuration génétique géographique naturelle obéit à une logique de région, de bassin et de sous bassins. Par l'analyse de nombreuses stations de la Garonne, le vrai type Garonne (en fait de multiples sous-types légèrement différenciés) sera géographiquement déterminé. Nous verrons si le type Garonne de notre étude obéit à la logique géographique ou lui désobéit, marque de repeuplements ou de translocations.

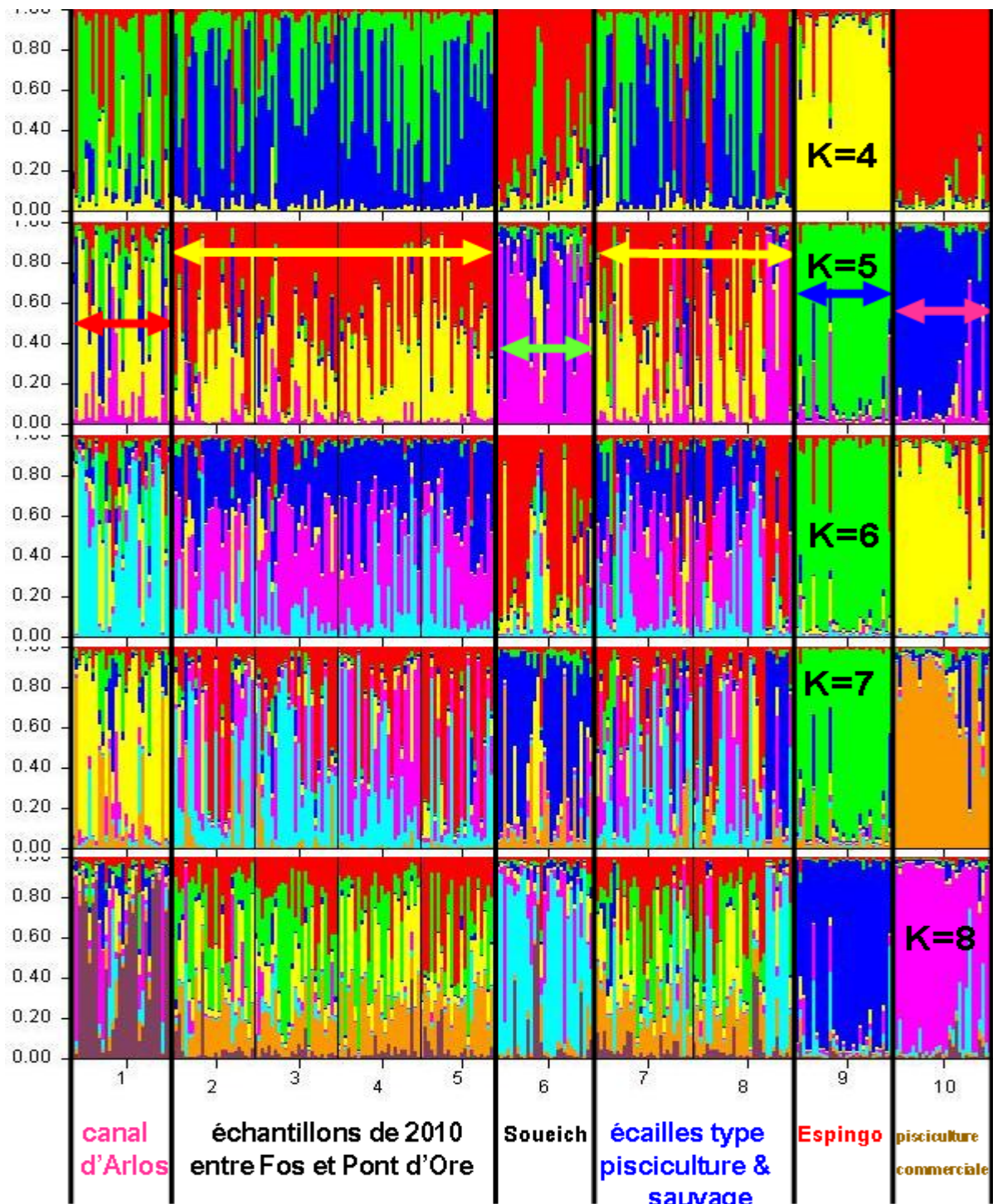
De façon plus locale (Haute-Garonne), échantillonner la Pique (principal affluent de la Garonne amont dans lequel se jette la Neste d'Oô qui traverse le lac d'Espingo déjà analysé) et ses trois principaux affluents (Neste d'Oô, Neste d'Oueil et Lys) permettrait, outre d'apporter des connaissances dans la structure génétique du cheptel de truites du département, de caractériser la souche sauvage de l'amont français de la Garonne. Une prospection du côté espagnol (Val d'Aran) serait aussi très informatif et pourrait s'organiser dans le cadre de l'association Truite Faro Pyrénéenne (TFP).

Fait à Montpellier le 28 mars 2013

7. Références bibliographiques

- Berrebi, P., & Cherbonnel, C. (2011). *Estimation de l'impact des repeuplements dans les populations de truites de la zone salmonicole de la Garonne. Rapport d'avril 2011: Rapport d'analyse pour l'ENSAT. Université Montpellier 2. (ENSAT2)*
- Berrebi, P., & Genindexe. (2012). *Caractéristiques génétiques des truites de la pisciculture de Soueich et de Garonne amont croisées avec l'étude ENSAT sur la scalimétrie: Rapport d'étude pour l'ENSAT, Université Montpellier 2. (ENSAT3)*
- Berrebi, P., & Shao, Z. (2012). *Analyse génétique des truites du lac d'Espingo et de son ruisseau afférent - Projet ESP1 - Rapport d'octobre 2012: 4p. Rapport pour la FD31, Université Montpellier 2. (ESP1)*
- Noel, D. (2007). *Etude de la dynamique de population et du potentiel de reproduction de Salmo trutta trutta fario dans la Garonne salmonicole (Master II Recherche : Ecosystèmes et Anthropisation). Toulouse: ENSAT, Equipe Interactions biologiques, Pelagos - Benthos.*

8. Annexes

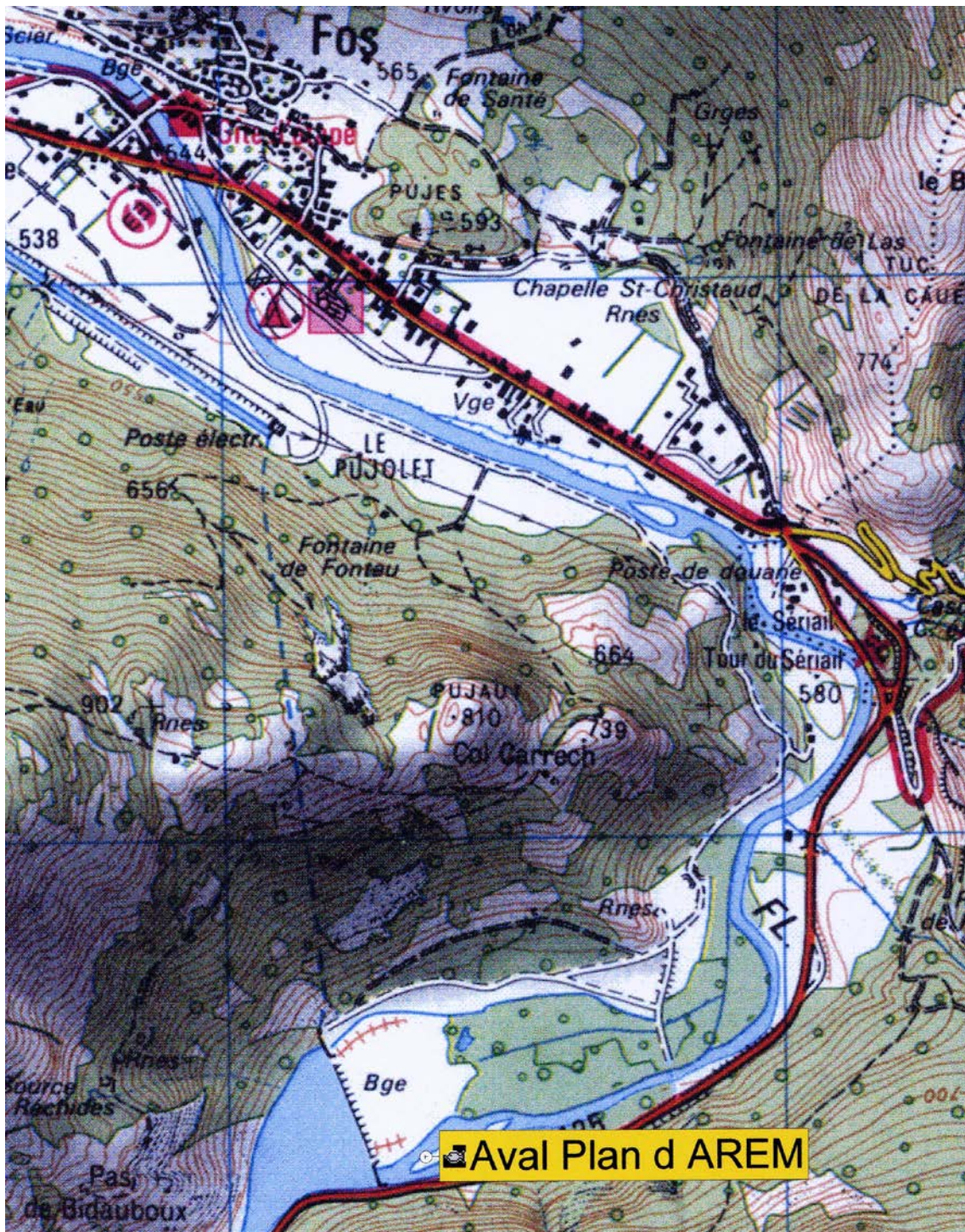


Annexe 1 : Cette analyse d'assignation reprend l'ensemble des échantillons analysés lors des projets ENSAT2, ENSAT3, ESP1 et GARO1 (voir liste et caractéristiques au Tableau 1). Nous voyons qu'à partir de $K=5$, il n'y a plus d'augmentation du nombre de sous-groupes, mais le logiciel, obligé de subdiviser en 6, 7 ou 8 sous-groupes, découpe dans les individus et non entre eux. Il est clair qu'il n'y a que 5 entités dans la zone étudiée: Canal d'Arlos (flèche rouge), Garonne (jaunes), pisciculture de Soueich (verte), Espingo (bleue) et souche nationale domestique (rose).



© FD31

Annexe 2 : Vue du canal d'Arlos entre



Annexe 3 : Carte d'état major de la zone échantillonnée.