

Génétique des truites des lacs d'Allos et de Fenestre dans le Parc National du Mercantour

Projet MERC3
Rapport de novembre 2013

Lac d'Allos



© <http://www.mercantour-evasion.com/Randonnees-Mercantour-et,87>

Analyses statistiques, interprétation, rédaction: **Patrick Berrebi**
Analyses moléculaires: **David Schikorski**

* 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
** **Genindexe**, 6 rue des Sports, 17000 La Rochelle, tel: 05 46 30 69 66, d.schikorski@genindexe.com

1. Introduction

Les truites du Parc National du Mercantour ont fait l'objet de plusieurs études génétiques dans le passé, suivant l'évolution des techniques moléculaires, d'abord en employant les allozymes qui nécessitaient de sacrifier les poissons en 2000-2001 (rapport MERC1), puis les microsatellites demandant un petit morceau de nageoire, les truites étant relâchées (rapport MERC2). La Figure 1 renseigne sur les échantillons analysés.

Le lac d'Allos a fait l'objet d'une analyse génétique dans le rapport MERC2 arrivant à la conclusion que ce lac renfermait une population de truite particulière, plus proche des formes alpines de truites méditerranéennes que des truites domestiques classiques, bien qu'il ait subi des introductions, au moins en 1981.

La présente étude se concentre sur les lacs d'Allos et de Fenestre (Figure 2) afin de tenter de connaître l'origine des truites qui les habitent en augmentant le nombre de truites du lac d'Allos analysées (ici 40 au lieu de 19) et en changeant les marqueurs. Le lac de Fenestre est analysé pour la première fois.

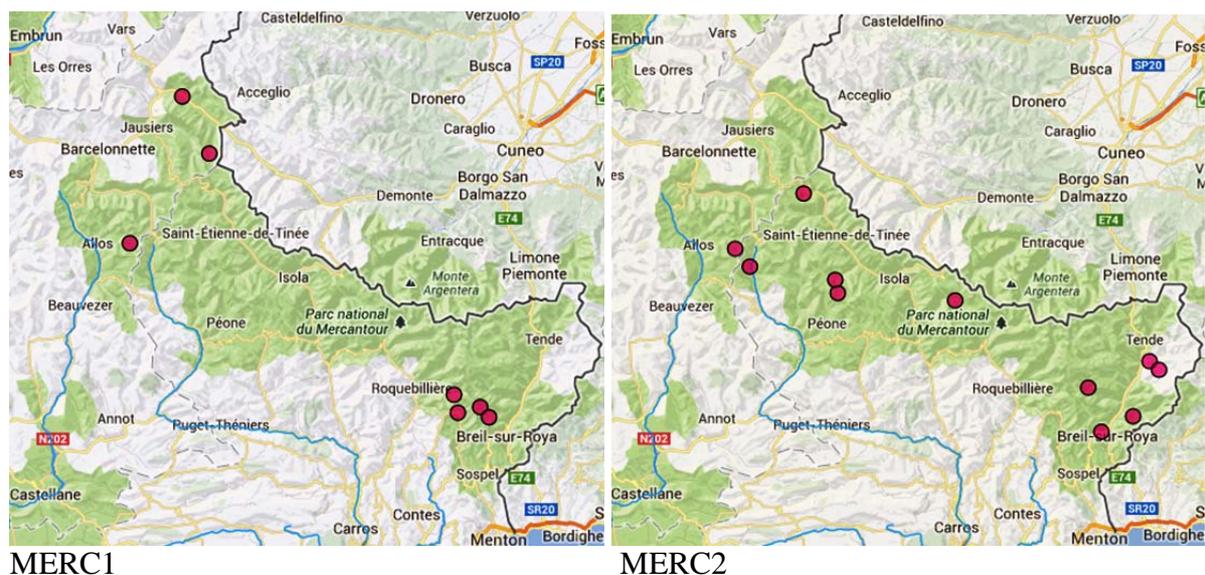


Figure 1 : Distribution des stations analysées dans le Parc en 2000-2001 (MERC1, allozymes) et en 2005 (MERC2, microsatellites)

2. Echantillonnage

Les deux stations analysées dans le présent rapport sont détaillées dans le Tableau 1 et leur localisation dans les Figures 2 et 3. Les 58 échantillons de nageoires sont parvenus au laboratoire de Montpellier (ISEM) en plusieurs petits lots en 2003, 2005 et 2012.

Dans la mesure où l'objectif de l'étude est de déterminer l'origine des habitants des deux lacs, plusieurs échantillons de référence, provenant d'études antérieures (Tableau 1) ont été

ajoutés (si les marqueurs utilisés étaient compatibles avec les 7 microsattellites utilisés ici). Ainsi 4 stations alpines voisines déjà analysées ainsi que 2 échantillons de truites domestiques de deux piscicultures (Isère et Alpes-Maritimes) (Tableau 1) sont nécessaire pour l'interprétation.

N° échantillon ISEM (Figure 3)	N° ISEM truites	nombre de truites	date	rapport	Station	confluences	nombre de microsattellites	code
F330	T08578-T08588	11	juin-03	MERC3	lac d'Allos	-	7	1
F331	T08589-T08591	3	juin-03	MERC3				
F332	T08592-T08593	2	juin-03	MERC3				
F333	T08594-T08598	5	juil.-03	MERC3				
L023	T08613-T08631	15	juin-05	MERC2+MERC3	lac de Fenestre	(Vésubie-Var)	7	2
F334	T08599-T08612	14	2005	MERC3				
L107	T07945-T07948	4	2012	MERC3				
L453	T21138-T21167	30	2010	AHP2	Vaïre	Coulomp-Var	4	3
L450	T21061-T21090	29	2010	AHP2	Coulomp	Var	4	3
L151	T24858-T24887	30	sept.-12	AHP3	Chasse	Verdon-Artuby-Durance-Rhône	4	5
L457	T21258-T21287	30	2011	AHP2	Bachelard	Ubaye-Durance-Rhône	4	6
L156	T13061-T13090	30	févr.-08	GSALM2	Pisciculture Roquebilière	-	7	7
L266	T16926-T16955	30	2008	GSALM2	Pisciculture commerciale Isère	-	7	8

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

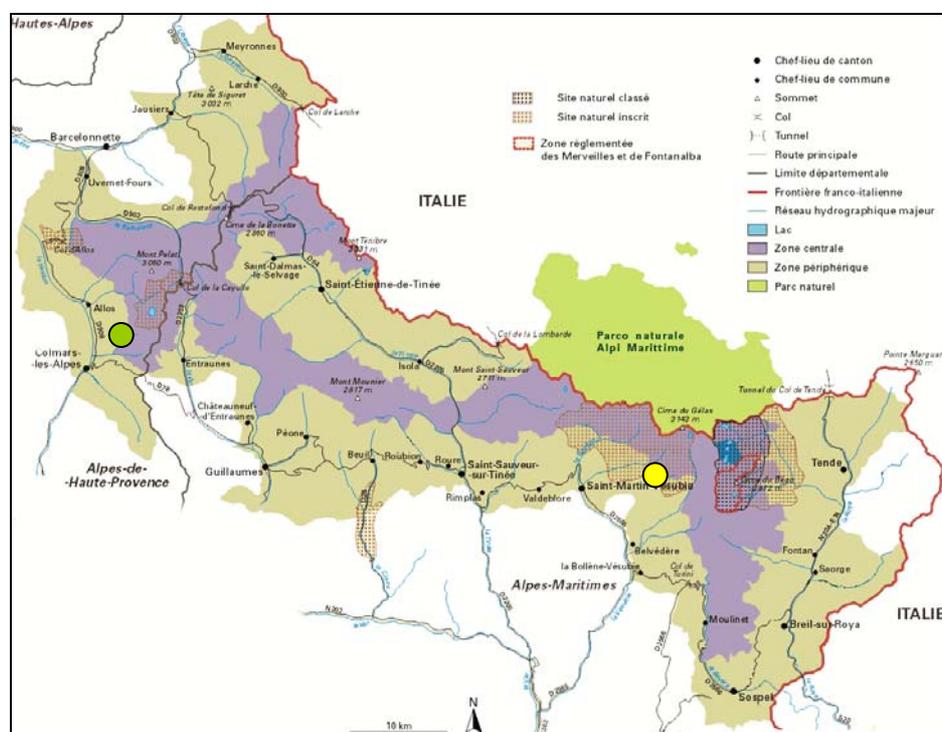


Figure 2 : Présentation du Parc National du Mercantour et positionnement des échantillons analysés dans le présent rapport: rond vert = lac d'Allos; rond jaune = lac de Fenestre (voir le Tableau 1).

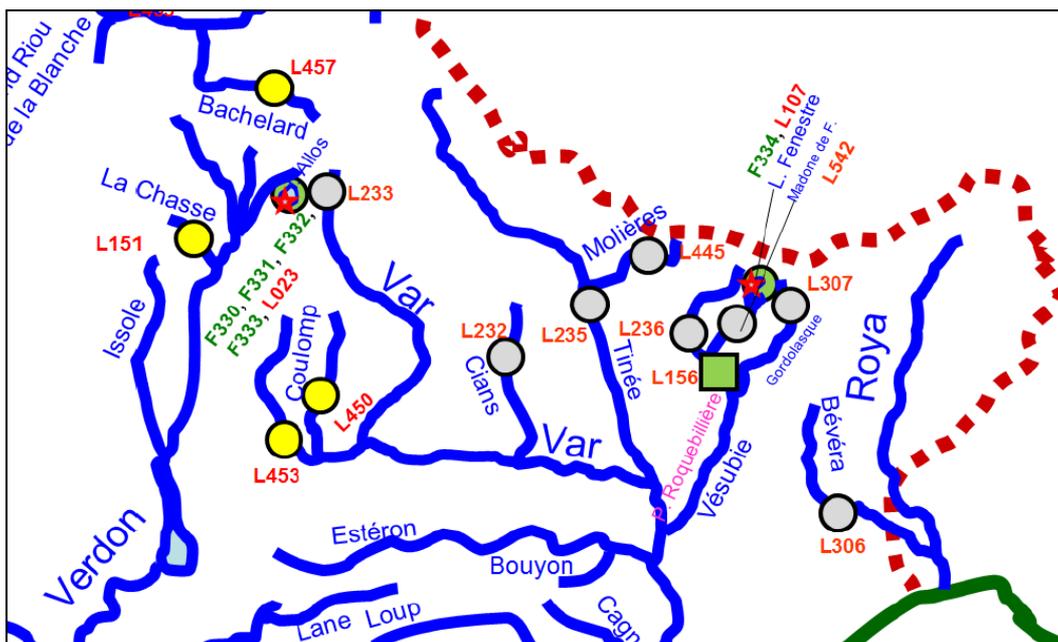


Figure 3 : Positionnement des échantillons des lacs d'Allos et de Fenestre ainsi que des échantillons de référence de la région (voir le Tableau 1). En vert les échantillons analysés avec 7 microsattellites; en jaune avec 4 marqueurs. Il n'a hélas pas été possible d'analyser les échantillons voisins en gris, les seuls 3 marqueurs communs aboutissant à des résultats aberrants (non montrés)

3. Méthode moléculaire

Les morceaux de muscles (2003) et de nageoires (2005 et 2012) de truites prélevés sur le terrain 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 extrait dans une mixture de protéinase K (détruit les protéines et libère l'ADN) et de Chelex (chélateur des enzymes destructeurs naturels 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 microsattellite (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 microsattellites (les allèles) sont caractéristiques de chaque truite (deux allèles, chacun légué par un des parents de la truite) et sont la base des calculs du rapport. Pour mesurer la longueur des fragments d'ADN, 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 car elles comportent de nombreux pièges.

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

La présente étude devait comporter 6 marqueurs microsattellites (ONE μ 9, SSOSL311, OMY21DIAS, MST85, MST543 et SSOSL438). Par chance, le laboratoire d'analyse (Genindexe, La Rochelle) a proposé d'analyser un septième marqueur (SFO1) sans augmentation du coût, le lot analysé faisant partie d'une série plus importante.

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 analysés (voir Tableau 1), la matrice finale permet d'effectuer les traitements statistiques suivants, constitués de quatre étapes.

Les **analyses multidimensionnelles** (ici des Analyses Factorielles des Correspondances ou AFC effectuées grâce au logiciel GENETIX) produisent divers diagrammes où chaque truite est positionnée en fonction de son génotype à tous les marqueurs microsatellites. 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 et 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. Ces sous groupes ne tiennent 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 10 sont nécessaires. La méthode automatique d'Evanno et al. (2006) est appliquée, mais il faut que la partition automatique ait un sens biologique. Les truites peuvent être assignées à plusieurs sous groupes si elles sont hybridées. Cette méthode, plus quantitative que l'AFC peut chiffrer avec précision la composition génétique d'un échantillon (par exemple les pourcentages de truites sauvages et domestique) ou d'une truite hybride.

L'emploi de références géographiques indispensables à l'interprétation n'est pas simple. Parce que des séries différentes de marqueurs ont été utilisées dans les différentes études, les analyses aussi bien multidimensionnelles que d'assignation, ont dû porter successivement sur 7 et 4 microsatellites, doublant le nombre de diagrammes du rapport.

Les **distances génétiques** (ici la distance de Reynolds découlant des Fst, calculée avec le logiciel GENETIX) permettent de placer les échantillons dans un arbre phénétique (un arbre de Neighbour Joining produit par le logiciel MEGA 5.2) visualisant les couples ou ensembles d'échantillons qui se ressemblent le plus. Un test de fiabilité (un bootstrap réalisé grâce au logiciel PHYLIP) permet d'affirmer statistiquement ces ressemblances.

Les **paramètres populationnels standard** de la génétique des populations sont calculés pour chaque lignée et/ou chaque station: la diversité génétique (H_o = hétérozygotie observée et H_{nb} = hétérozygotie théorique non biaisée), la panmixie ou probabilité égale pour chaque membre d'une population de truites de se reproduire avec tout autre membre de sexe opposé (paramètre F_{is}). Les informations biologiques tirées de ces paramètres populationnels sont détaillées dans la discussion.

5. Résultats

5.1. Analyse multidimensionnelle

L'analyse multidimensionnelle présentée en Figure 4 utilise 7 microsatellites. Elle montre donc avec précision les ressemblances génétiques entre les deux populations de truites de lac et celles de deux souches de pisciculture. L'espace séparant les "nuages" de point montre qu'en aucun cas, des truites domestiques ont été récemment relâchées dans le lac. La présence d'hybrides avec ces souches domestiques est très peu probable dans les lacs.

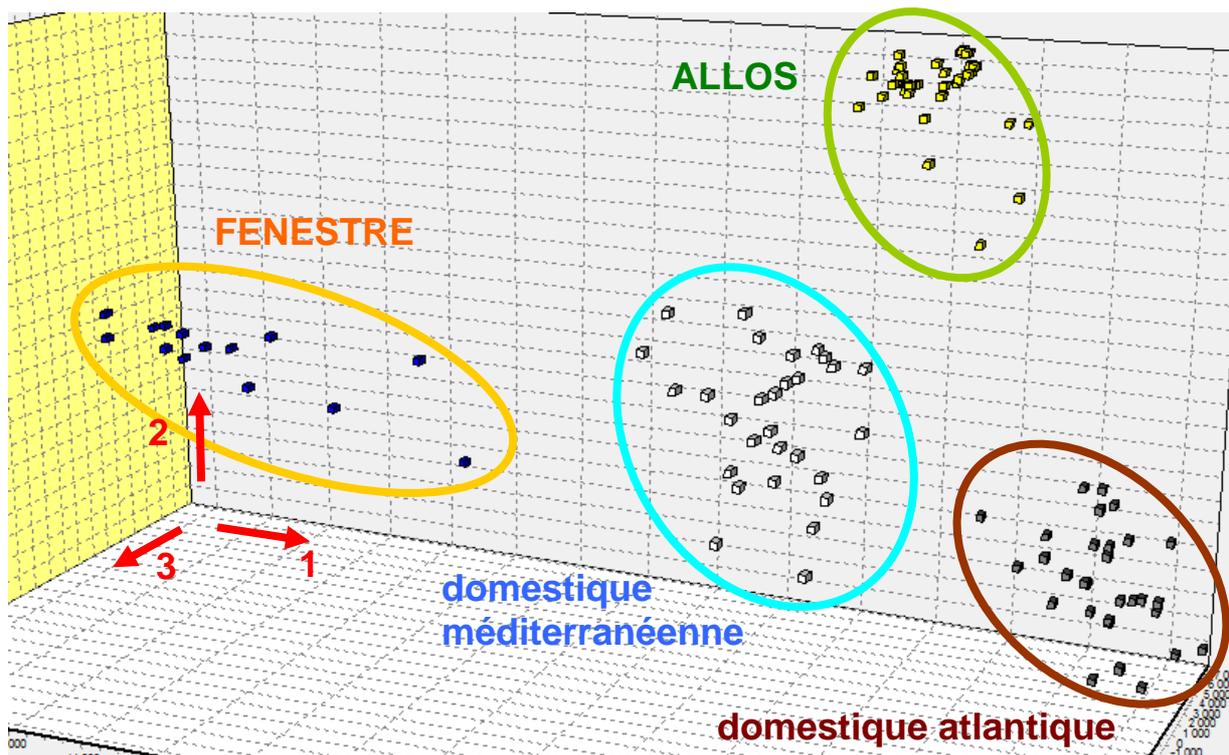


Figure 4 : Image 3D (description des axes en rouge) d'une analyse multidimensionnelle (AFC) basée sur 7 **microsatellites**. Le nombre limité de références disponibles (seulement deux souches domestiques) ne permet pas de relier les truites de lac à des populations sauvages voisines. Elle permet cependant de montrer que le peuplement actuel n'a rien à voir avec les souches domestiques locales (méditerranéenne) ou nationale (atlantique).

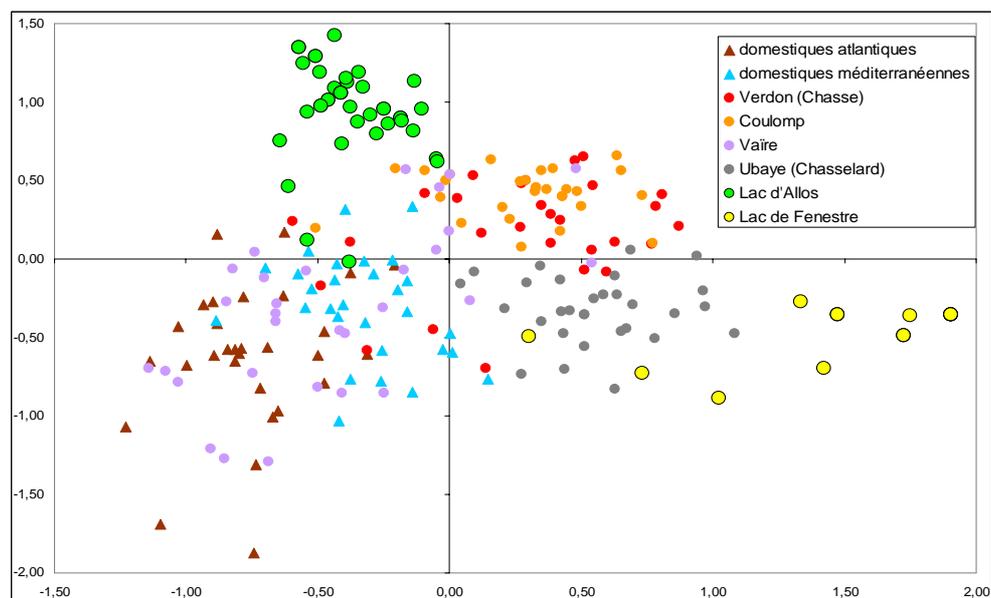


Figure 5 : Cette analyse basée sur 4 **marqueurs** permet d'introduire plus d'échantillons de références d'origine sauvage. L'axe 1 est horizontal et l'axe 2 vertical. Aucun lien fort ne relie les truites de lac aux truites de rivière. La zone séparant les deux lacs est occupée par l'échantillon de l'Ubaye coté Fenestre et Verdon + Coulomp coté Allos.

L'analyse de la Figure 5 comprend plus de populations de référence de rivière mais leur description est plus sommaire (4 marqueurs seulement). L'absence de lien entre lacs et piscicultures est confirmée. Des relations génétiques entre Allos, Verdon et Coulomp, ainsi qu'entre Fenestre et Ubaye sont suggérées mais nécessitent confirmation.

5.2. Analyse d'assignation

L'analyse s'est faite en 3 étapes: 7 microsatellites sur 4 échantillons, ce test sera appelé **7x4x117** correspondant respectivement au nombre de marqueurs, de stations et de truites; puis **4x8x236**.

7x4x117 : cette analyse nous montre que les truites des lacs n'ont pas grand chose à voir avec la souche domestiques nationale (atlantique) ni la souche locale (méditerranéenne).

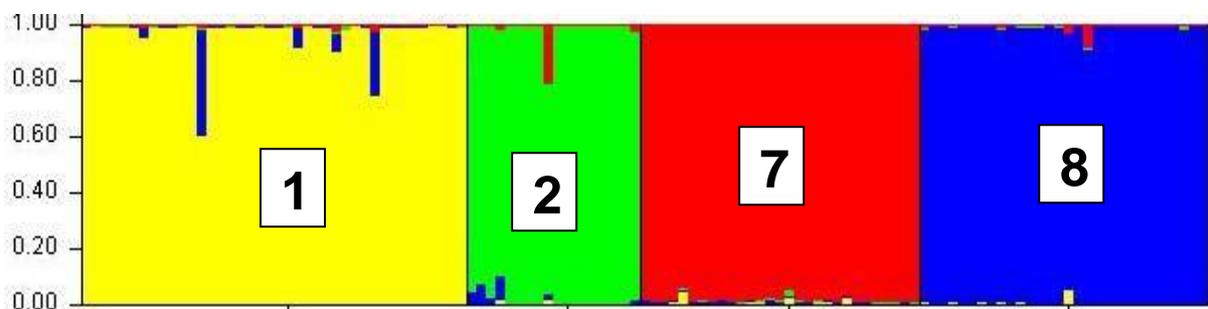


Figure 6 : Assignation basées sur 7 marqueurs (les chiffres sont les codes en vert du Tableau 1). Selon ce résultat, on ne détecte que des apports très limités de la souche commerciale atlantique (bleu) dans le lac d'Allos (jaune) et de souche méditerranéenne de Roquebillière (rouge) dans le lac de Fenestre (vert).

4x8x236 : cette analyse nous permet d'inclure plus de références locales, mais avec une précision moindre (4 marqueurs au lieu de 7). Quelques liens entre truites de lac et truites locales sont suggérés.

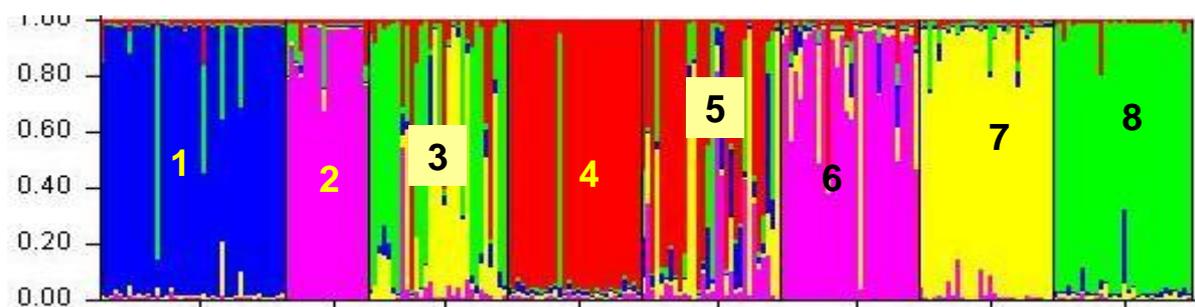


Figure 7 : Assignation basées sur 4 marqueurs. Le logiciel distribue les couleurs au hasard, elles n'ont pas de signification. Il propose 5 sous-groupes. La population d'Allos n'a aucune similitude avec les références. Les truites de Fenestre sont génétiquement proches de celles de l'Ubaye (code 63)

Les Figures 8 et 9 montrent les analyses d'assignation pratiquées sur les échantillons des deux lacs. Alors qu'Allos ne présente pas de subdivision, Fenestre montre bien l'existence de deux entités.

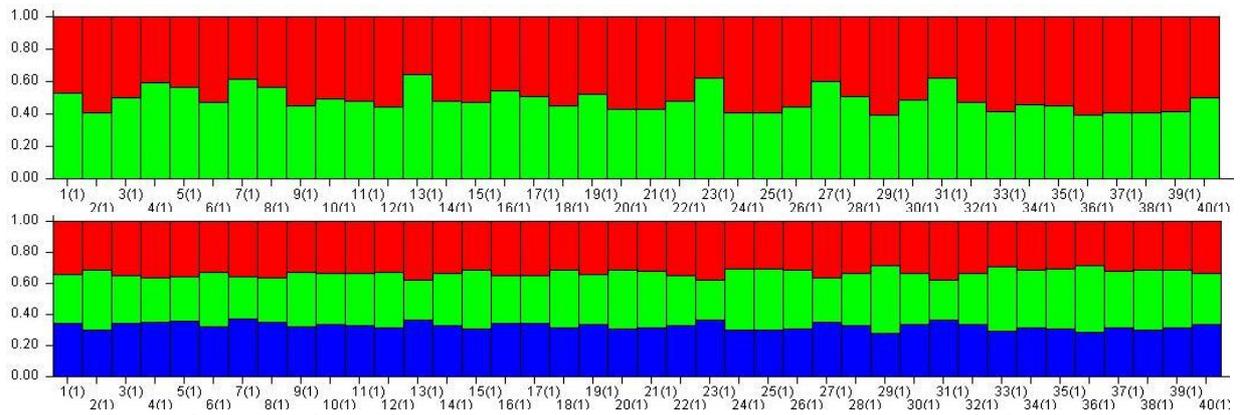


Figure 8 : Quand l'analyse d'assignation impose 2 (en haut) ou 3 (en bas) sous groupe dans l'échantillon du lac d'Allos, aucune truite ne se distingue de l'autre. Le découpage imposé se fait "dans" les truites et pas "entre". L'analyse est incapable de subdiviser l'échantillon. De plus la méthode "Evanno" nous suggère une seule entité dans le lac

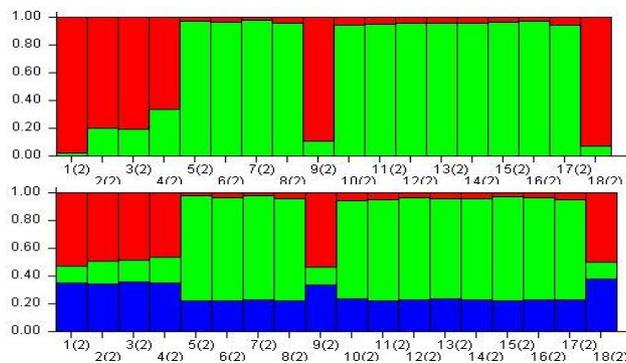


Figure 9 : C'est très différent avec le lac de Fenestre: le découpage en 2 est possible, le découpage en 3 rejoint le schéma de la Figure 8. Le test d'Evanno confirme: il ya bien deux entités dans ce lac.

5.3. Distances génétiques

Les distances inter-échantillons (ici la distance de Reynolds) ont été calculées et figurées sous forme d'un arbre de Neighbor Joining (Figure 10) grâce au logiciel PHYLIP. L'intérêt de cette construction est qu'il est possible de tester la significativité des assemblages de branches (technique du bootstrap, les valeurs au dessus de 70 sont dites "soutenues"). Ainsi seule l'association Fenestre-Ubaye est significative.

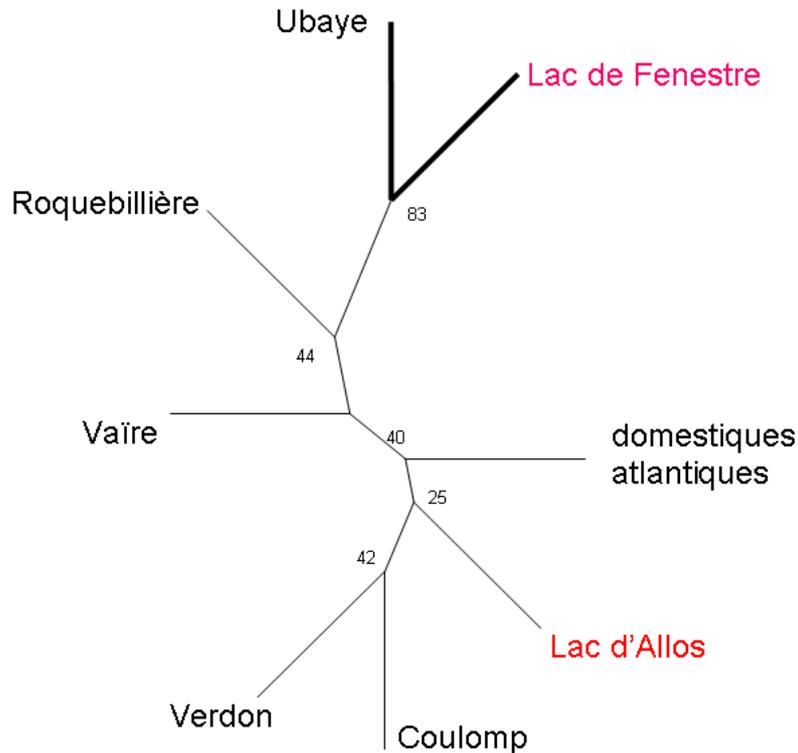


Figure 10 : Arbre de distances génétiques rassemblant les 8 échantillons au niveau de 4 microsatellites. Les valeurs de bootstrap (chiffres à la base des nœuds) sont significatives au dessus de 70 (branches épaisses).

5.3. - Paramètres populationnels

Le Tableau 2 donne les valeurs de diversité génétique (entêtes orange) et de panmixie (entête rose). Les truites de lac sont nettement moins polymorphes que les truites domestiques. Elles présentent des déséquilibres panmictiques signe de mélange.

	Hnb	Ho	A	Fis
Allos	0,394	0,424	3,857	-0,08(*)
Fenestre	0,332	0,294	4,143	0,12(*)
Roquebillière	0,696	0,652	6,429	0,06*
atlantiques	0,677	0,671	6,143	0,01ns

Tableau 2 : Paramètres de diversité génétique des échantillons des deux lacs et des deux piscicultures. Les lacs apparaissent comme deux fois moins diversifiés génétiquement que les souches de pisciculture

6. Interprétation et discussion

Le lac d'Allos a fait l'objet d'une analyse génétique dans le rapport MERC2 de 2006 arrivant à l'interprétation suivante:

Allos. Ce lac renferme une population de truite distincte des autres truites analysées dans le Parc du Mercantour. Plus proche des formes alpines de truites méditerranéennes que des truites domestiques, on peut conclure que ce lac ne contient pas de formes domestiques classiques, bien qu'il ait subi des introductions, au moins en 1981.

L'étude comparative de toutes les souches naturelles méditerranéennes présentes au laboratoire n'a pas permis de reconnaître précisément la souche d'Allos. D'autres analyses sont nécessaires, avec d'autres types de marqueurs comme la Dloop de l'ADN mitochondrial qui sert de référence pour le classement de souches au niveau européen. Pour l'instant, on peut considérer ce peuplement comme naturel et original, apparenté aux truites méditerranéennes et plus spécialement aux souches Ouvèze-Drôme.

La présente étude confirme que le lac d'Allos, mais aussi le lac de Fenestre, ne sont pas peuplés de truites domestiques, du moins celles qui font actuellement l'objet d'échanges commerciaux internationaux et d'origine atlantique.

Aucune relation n'est non plus décelée entre ces populations lacustres et la pisciculture locale de Roquebillière élevant une souche du Doubs presque entièrement méditerranéenne (85%).

La recherche de l'origine des truites de ces lacs est une gageure: il n'est pas possible d'analyser toutes les rivières d'Europe pour trouver la population la plus proche. De plus, l'histoire forcément complexe de leur gestion a certainement fait que les truites actuelles sont des hybrides de tout ce qui a été introduit.

En ce qui concerne le **lac d'Allos**, les truites y sont isolées du réseau hydrographique proche et l'exutoire est souterrain, c'est une perte karstique. Il est donc très probable que c'était un lac sans truite (ni poisson) et que son peuplement ait toujours été artificiel. Ce lac n'est plus aleviné depuis 1982 (voir Figure 11 tirée des fiches du PNM).

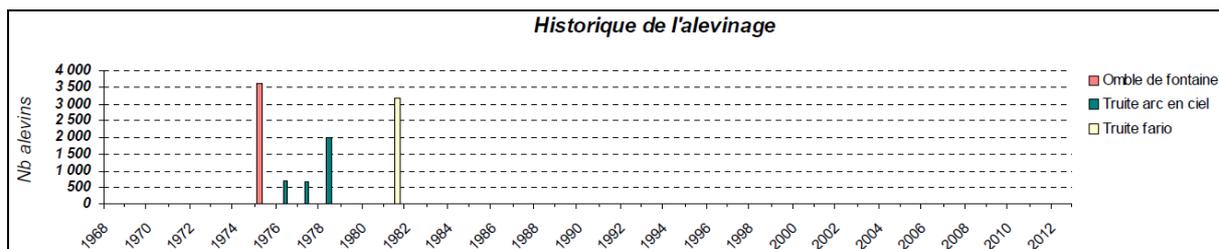


Figure 11 : Historique connu des alevinages dans le lac d'Allos (document PNM).

Les truites résidentes, si d'origines diverses, ont eu le temps de se mélanger pour former un tout presque homogène si elles ont trouvé le moyen de se reproduire. Ce n'est pas sûr puisque (i) la reproduction ne se fait pas en panmixie (voir Tableau 2) et (ii) selon les observations de l'Agence de l'Eau, "l'accomplissement de son cycle de vie est aléatoire et dépend des conditions hydro-climatiques (assec, gel) qui régissent l'accès aux frayères et la survie des alevins sur le lieu de ponte".

Le **lac de Fenestre** n'a pas été aleviné depuis 1982 (Figure 12). Il possède un émissaire (qui n'a pas de nom). D'après la fiche lac du PNM, l'émissaire est permanent, fait de blocs, en cascade probablement infranchissable pour la montaison. Il est signalé que les truites de

Fenestre se reproduisent naturellement. Ici aussi, il y a un léger déséquilibre panmictique (Tableau 2) pouvant s'expliquer soit par un déversement récent de truites, soit par une reproduction en plusieurs points du lac.

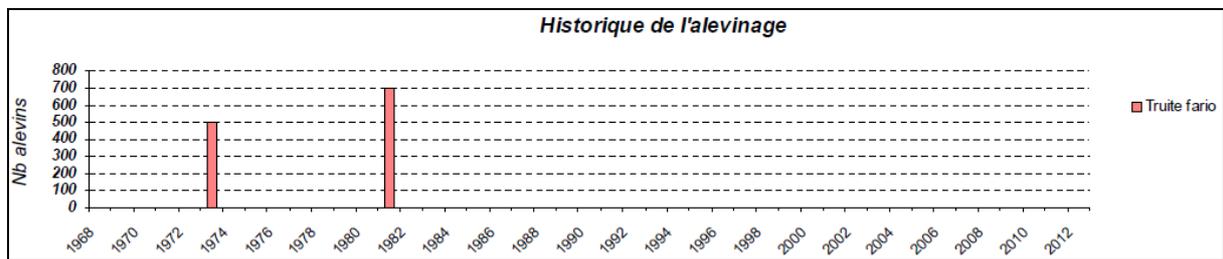


Figure 12 : Historique connu des alevinages dans le lac de Fenestre (document PNM).

Les Figures 8 et 9 montrent les analyses d'assignation pratiquées sur les échantillons des deux lacs. Alors qu'Allos ne présente pas de subdivision, Fenestre montre bien l'existence de deux entités: les truites 1 à 4, 9 et 18 s'opposent aux truites 5 à 8 et 10 à 17. Si les truites 1 à 4 sont bien distincte (capturées en 2005), toutes les autres sont de 2003. En 2003, les deux types étaient sympatriques. En 2005 seul un type subsiste (mais l'échantillonnage est trop limité pour l'affirmer).

Quelles peuvent être ces deux entités. Marcel Derrien (ancien personnel du PNM) avait bien observé deux types de robe, supposant la coexistence de deux souches distinctes dans le lac (dont une italienne?). Il faut rester prudent car la Figure 7 démontre que la différence génétique entre les deux entités de Fenestre est inférieure à la différence entre Fenestre et Ubaye. Les hypothèses les plus probables sont (i) que le lac de Fenestre possède deux zones de ponte et que les truites pratiquent un certain homing (ponte à l'endroit de naissance) ou (ii) qu'en 2003, une partie des truites du lac provenaient d'un déversement récent qui n'a pas subsisté jusqu'en 2005.

D'où proviennent la souche d'Allos et les deux souches de Fenestre?

Les truites d'Allos ne présentent pas de ressemblance avec les souches domestiques et naturelles comparées (rapports MERC2 et MERC3 présent). Son isolement total vis à vis du réseau hydrographique nous permet de supposer que ce peuplement est entièrement artificiel et qu'avant l'intervention de l'homme, aucune truite n'y séjournait. Si c'est bien exact, la recherche des origines de ces truites représente un travail "quantitatif", toutes les rivières et piscicultures d'Europe pouvant être testées. De plus, s'il y a eu hybridation multiples (à supposer qu'une reproduction est possible dans le lac), cette recherche est quasiment impossible.

Les truites du lac de Fenestre formaient deux sous-unités en 2003, probablement plus qu'une depuis 2005, mais ces différences sont mineures. Ce lac a un émissaire, bien que difficile à remonter pour les truites. Cependant, la ressemblance avec les truites de l'Ubaye, bien que surprenante, est un signe de présence de truites naturelles. Il en faut pas considérer que les analyses décrivent un lien direct entre Fenestre et Ubaye. Elles indiquent seulement que "parmi les rivières comparées" (et il y en a peu), la plus ressemblante au lac est l'Ubaye. Probablement, d'autres populations sauvages non analysées sont plus proches. Nous savons que le lac a été aleviné dans le passé. On ne peut donc pas espérer une identité entre les truites du lac et une population sauvage. Il est donc probable que les truites du lac de Fenestre sont des hybrides entre une forme sauvage originelle et plusieurs souches de repeuplement.

Le polymorphisme assez bas des truites de lac (la moitié de celui des souches domestiques) indique que ces populations ont un très petit nombre de reproducteurs, en lien avec les conditions de reproduction difficiles.

Afin d'apporter un nouvel élément décisif, un complément (gracieux) sera apporté à cette étude: une analyse de l'ADN mitochondrial des truites des deux lacs sera menée début 2014 pour savoir définitivement si ce sont bien des truites méditerranéennes comme suggéré par l'étude de 2006. Ici aussi, l'analyse sur ADN mitochondrial permettra au moins de savoir si le peuplement est atlantique, méditerranéen ou mélangé comme probable.

Fait à Montpellier le 13 novembre 2013

7. Références bibliographiques (ordre chronologique)

- Berrebi P, Cattaneo-Berrebi G. 2002.** Etude génétique de la truite commune (*Salmo trutta*) dans quelques sites du Parc national du Mercantour (marqueurs allozymiques): Rapport de contrat avec le Parc National du Mercantour, Université Montpellier 2. 20p. ([MERC1](#))
- Evanno G, S. Regnaut, J. Goudet. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620.
- Berrebi P, Lasserre B, Dubois S. 2006.** Analyse génétique (microsatellites) des truites du Parc du Mercantour - Rapport final, août 2006: Université Montpellier 2. ([MERC2](#))
- Berrebi P, Cherbonnel C. 2009.** Cartographie génétique des populations sauvages de truites françaises - Programme Genesalm - tome 1 - version du 15 décembre 2009: Université Montpellier 2, rapport de contrat du projet Genesalm, 22p. ([GSALM2](#))
- Berrebi P, Shao Z, Reynaud N, Barla C. 2010.** Composition génétique des truites du Haut Var et du Loup (Alpes Maritimes) - microsatellites et ADNmt. Rapport de décembre 2010: Université Montpellier 2. 10p. ([AM2](#))
- Berrebi P, Cherbonnel C, Barla C. 2011.** Composition génétique des truites des Alpes Maritimes (Siagne, Cagne, Estéron, Gordolasque et Bévéra) - Mars 2011: Rapport d'analyses pour la Fédération de Pêche des Alpes Maritimes (06). Université Montpellier 2. 14p. ([AM3](#))
- Berrebi P, Shao Z. 2012.** Caractérisation génétique des truites des Alpes Maritimes (Mollières, Gordolasque, Bouyon et Artuby) - Janvier 2012: Rapport d'analyse pour la Fédération 06. Université Montpellier 2. 11. ([AM4](#))
- Berrebi P, Barla C, Shao Z. 2012.** Composition génétique des truites des Alpes Maritimes - Cinquième campagne 2012 (Gordolasque, Lane, Estéron, Bévéra et Madone des Fenestres) - Projet AM5 - Rapport de novembre 2012: Rapport pour la Fédération de Pêche des Alpes Maritimes. Université Montpellier 2. 15p. ([AM5](#))
- Berrebi P, Shao Z. 2012.** Etude génétique des truites des bassins versants du Coulomp et de l'Ubaye (campagnes 2010 et 2011) - Projet AHP2: Rapport d'étude n°1 pour la Fédération de Pêche des Alpes de Haute Provence. Université Montpellier 2. 10p. ([AHP2](#))
- Berrebi P, Genindex. 2013.** Etude génétique des truites du bassin du Verdon (campagne 2012) - Projet AHP3 - Rapport de juillet 2013: Rapport d'étude pour la FD04. 17p. ([AHP3](#))