

Structure génétique des truites du Parc du Mercantour. Complément d'analyses.

Projet MERC4

Analyses statistiques et rédaction: Patrick BERREBI*

Analyses moléculaires: Bernard LASSERRE**, Sophie DUBOIS*, Zhaojun SHAO*, David SCHIKORSKI***

* Institut des Sciences de l'Evolution (ISEM), Université Montpellier 2

Tel: 04 67 14 37 32; Mél: patrick.berrebi@univ-montp2.fr

** Laboratoire Ecologie des systèmes marins côtiers (ECOSYM), Université Montpellier 2

Tel: 04 67 14 47 69; Mél: bernard.lasserre@univ-montp2.fr

*** GENINDEXE, 6 rue des Sports, 17000 La Rochelle.

Tel: 05 46 30 69 66, Mél: d.schikorski@genindexe.com



© <http://lesdanjean.blogspot.fr>

La Tinée dans le Parc National du Mercantour

1. Introduction

Le projet MERC4 participe à la description génétique des truites du Parc National du Mercantour, entreprise commencée en septembre 2000 dont voici le quatrième épisode.

La description génétique des truites du Parc a donné lieu à trois rapports nommés MERC1 à MERC3 et publiés respectivement en 2001, 2006 et 2013. Ces rapports peuvent être obtenus sur le site http://data.oreme.org/trout/trout/visualisation_pub (fonctionne avec Firefox)

Les méthodes génétiques employées ont suivi les progrès scientifiques et ont changé de marqueurs moléculaires. Les allozymes, utilisées jusqu'en 2001, nécessitaient le sacrifice des truites. Dès que l'analyse directe sur l'ADN (microsatellites) a été développée à Montpellier, l'échantillonnage ne nécessitait plus que le prélèvement d'un demi-centimètre de nageoire (après anesthésie) et retour des truites à la rivière (rapports de 2006 et 2013).

Ce changement de marqueurs est un obstacle à un bilan global des 18 rivières échantillonnées. On ne peut pas utiliser des données aussi différentes (allozymes et microsatellites) dans la même analyse. C'est pourquoi le Parc a décidé de ré-analyser certaines truites de l'échantillonnage de 2000-2001 (rapport de 2001, en jaune dans le Tableau 1) avec les mêmes microsatellites que les analyses ultérieures. C'est l'objet de ce rapport. Ce rapport est aussi l'occasion de traiter 20 échantillons naturels dans la même analyse.

2. Echantillonnage

Le génotypage de 81 truites, fait spécialement pour cette étude, a été cofinancé par le Parc National du Mercantour (PNM) et l'Institut des Sciences de l'Evolution (ISEM) de l'Université Montpellier 2 (UM2, devenue UM en 2015). Ainsi 10 à 20 truites par station ont pu être traitées. Marie-France Leccia est la correspondante du PNM auprès de l'ISEM.

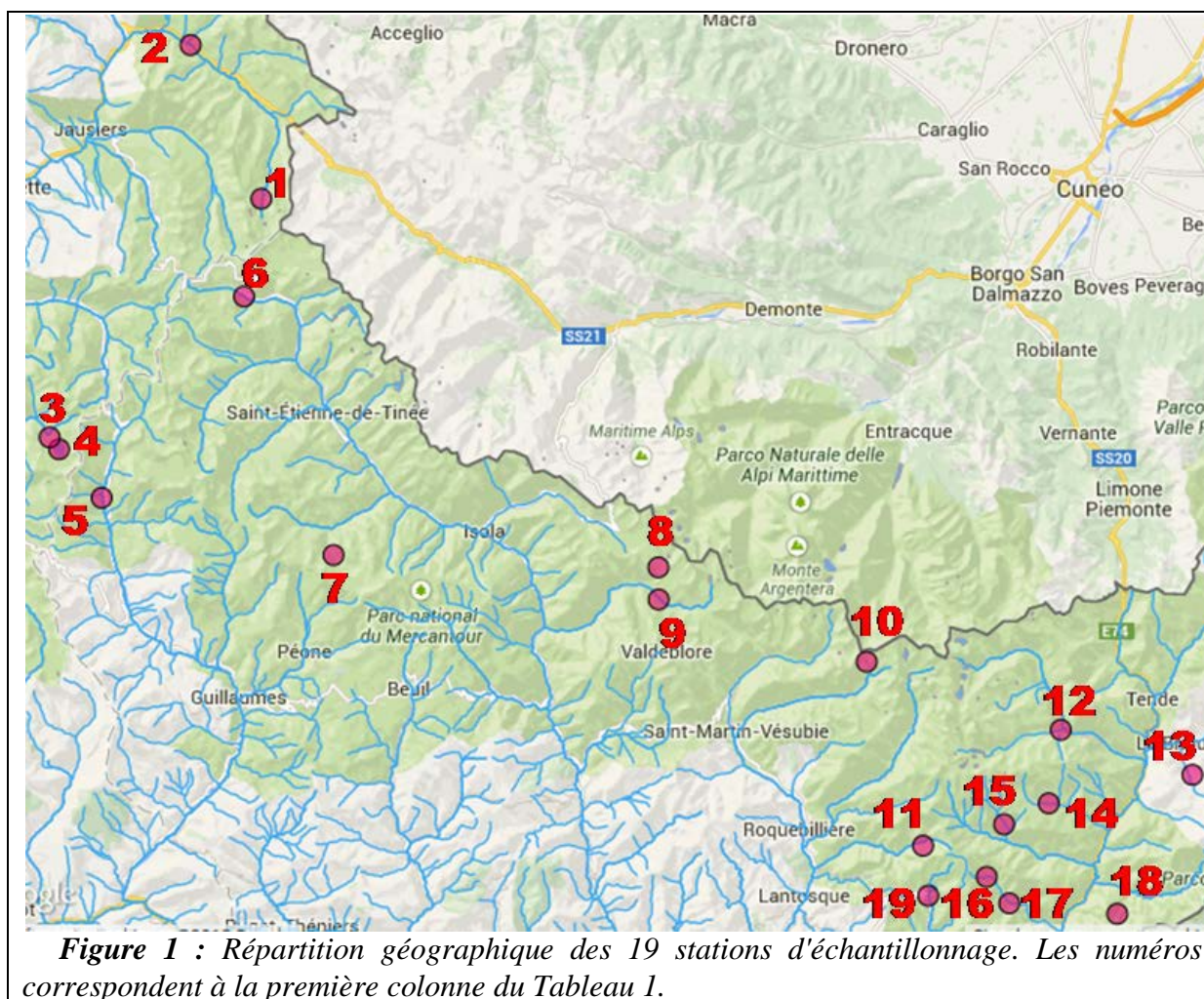
N° carte	Station	ss bassin	Localisation	Nbre	Année de capture	Rapport	N° ISEM individus	N° ISEM échantillon
1	Lac Lauzanier	Durance	dept. 04	4	2000	MERC1	T05068-T05072	F214
2	Ubayette	Durance	dept. 04	23	2000	MERC1	T05044-T05067	F213
3	Serpentine	Durance	dept. 04	9	2000	MERC1	T05019-T05028	F212
4	Lac d'Allos	Allos	dept. 04	21	2003	MERC3	T08578-T08598	F330-333
4	Lac d'Allos	Allos	dept. 04	19	2005	MERC2	T08613-T08631	L023
5	Var (amont Garretton)	Var	dept. 06	29	2005	MERC2	T08872-T08901	L032
6	Tinée (Rte Bousiéyas)	Var	dept. 06	30	2005	MERC2	T08812-T08841	L030
7	Salleveille	Var	dept. 06	30	2005	MERC2	T08842-T08871	L031
8	Tavel	Var	dept. 06	16	2005	MERC2	T08902-T08917	L033
9	Mollières (amont)	Var	dept. 06	30	2005	MERC2	T08782-T08811	L029
10	lac de Fenestre	Var	dept. 06	14	2003	MERC3	T08599-T08612	F334
11	Vallon Planchette	Var	dept. 06	9	2001	MERC1	T05187-T05196	F220
12	Minière	Roya	dept. 06	30	2005	MERC2	T08722-T08751	L027
13	Vallon du Prés	Roya	dept. 06	30	2005	MERC2	T08632-T08661	L024
14	Céva	Roya	dept. 06	30	2005	MERC2	T08662-T08691	L025
15	Mérim (Durmiöse)	Roya	dept. 06	30	2005	MERC2	T08692-T08721	L026
16	Vallon Maglia (Fontanas)	Roya	dept. 06	24	2000	MERC1	T05098-T05121	F216
17	Vallon Maglia (aval)	Roya	dept. 06	10	2000	MERC1	T05073-T05082	F215
18	Vallon de Grana	Roya	dept. 06	30	2005	MERC2	T08752-T08781	L028
19	Bévéra (Cabanes Vieilles)	Roya	dept. 06	9	2001	MERC1	T05167-T05176	F219
20	pisciculture Roquebillière (06)	-	dept. 06	20	2001	MERC1	T05147-T05166	F218
21	pisciculture commerciale Isère	-	dept. 38	30	2008	GSALM2	T16926-T16955	L266

Tableau 1 : Caractéristiques des échantillons analysés, classés par bassin versant. Les échantillons en jaune (analysés par allozymes en 2000-2001) font l'objet des nouvelles analyses présentées ici. Les autres sont des échantillons de référence dont des échantillons de pisciculture (en gris).

La répartition géographique des localités d'échantillonnage est présentée dans la Figure 1 et les caractéristiques des échantillons dans le Tableau 1.

Aux échantillons nouvellement analysés ont été joints ceux des rapports de 2006 et 2013, atteignant ainsi 19 stations dans le PNM.

Compte tenu de la possibilité d'introduction de truites domestiques dans le PNM (surtout il y a des décennies, mais des repeuplements ont continué jusqu'au début des années 80), ont été rajoutés des échantillons de référence, issus des deux lignées domestiques les plus probablement utilisées: la lignée commerciale atlantique utilisée au niveau national et la lignée méditerranéenne produite dans la pisciculture de Roquebillière (Alpes Maritimes) et dont la souche a pour origine le Doubs.



3. Analyses moléculaires

Les 81 truites ont été analysées au niveau de 6 marqueurs moléculaires, les microsatellites suivants: Oneµ9, MST85, SSOSL 311, Sfo1, Ssa197 et Omm1105.

Les génotypes obtenus additionnés des génotypes de référence ont permis de constituer une matrice de données à la base de tous les calculs statistiques qui suivent.

4. Analyses statistiques

Ces analyses consistent à permettre l'interprétation des données brutes (génotypes). Elles sont constituées ici de deux types de méthodes statistiques:

- les analyses multidimensionnelles (l'Analyse Factorielle des Correspondances ou AFC) traitées par le logiciel GENETIX permettent de visualiser les variations génétiques des truites analysées et de les positionner les unes par rapport aux autres dans un hyper-espace;

- les analyses d'assignation recherchent la meilleure partition en sous-unités homogènes dans la matrice de génotypes grâce au logiciel STRUCTURE. Le nombre objectif de sous-unités est déterminé par le logiciel STRUCTURE HARVESTER.

5. Résultats

5.1. Analyses multidimensionnelles

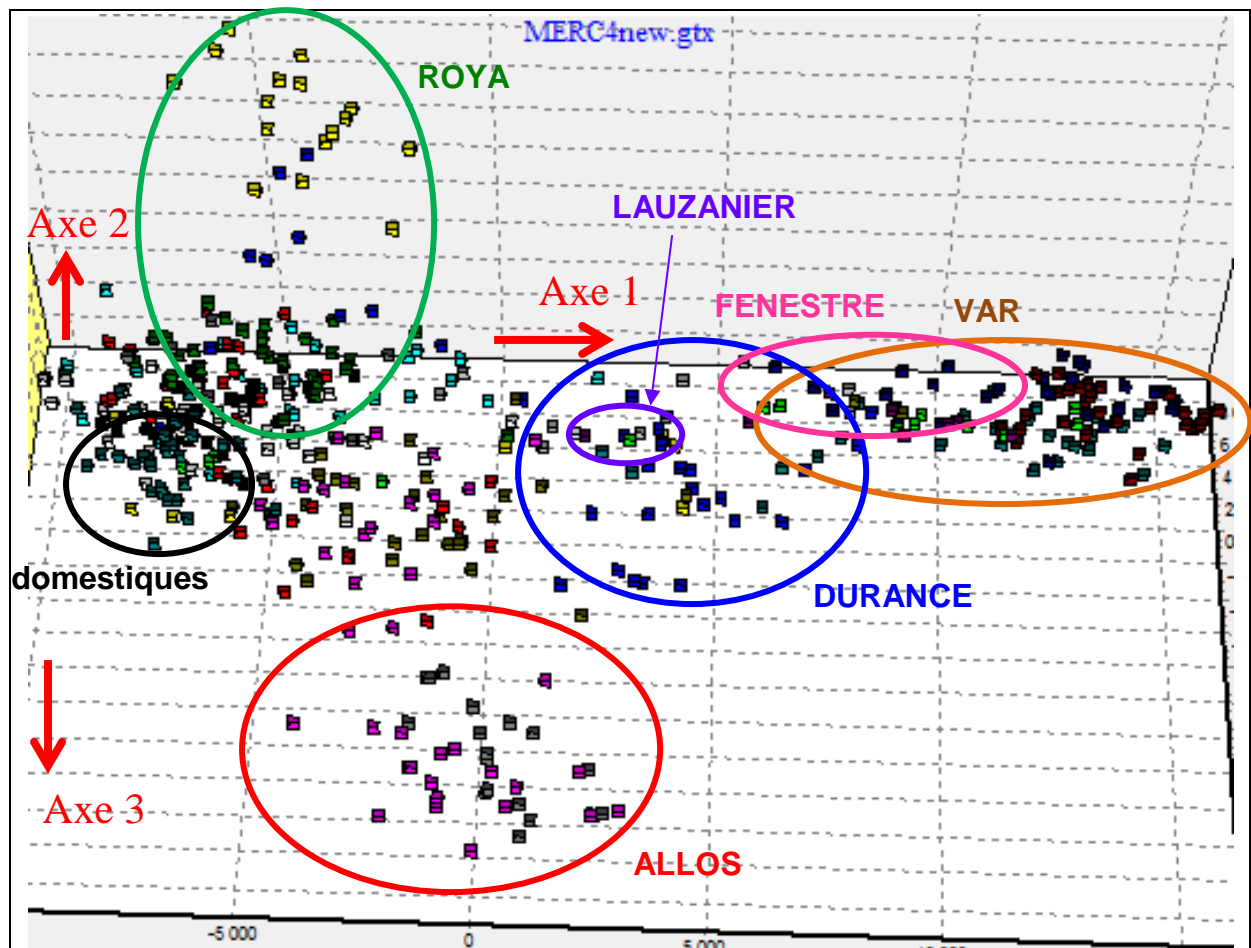


Figure 2a : Les enveloppes réunissent les truites de chaque bassin. Cette analyse multidimensionnelle (AFC) montre le **Var** qui s'isole dans les coordonnées positives de l'axe 1, la **Roya** dans les coordonnées positives de l'axe 2 et le **lac d'Allos** dans les coordonnées négatives de l'axe 3, loin des autres ensembles. La **Durance** reste centrale au graphique. La zone centre gauche du graphique correspond aux truites domestiques atlantiques (ellipse noire).

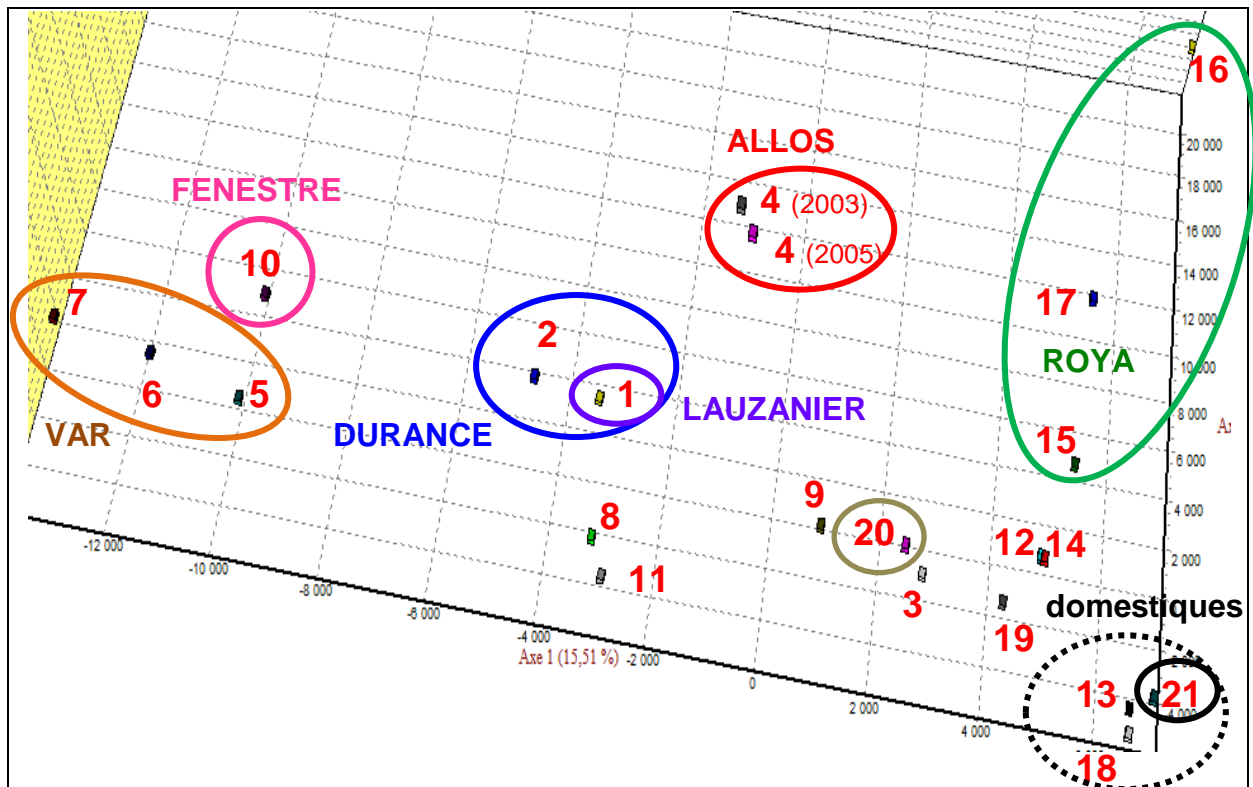
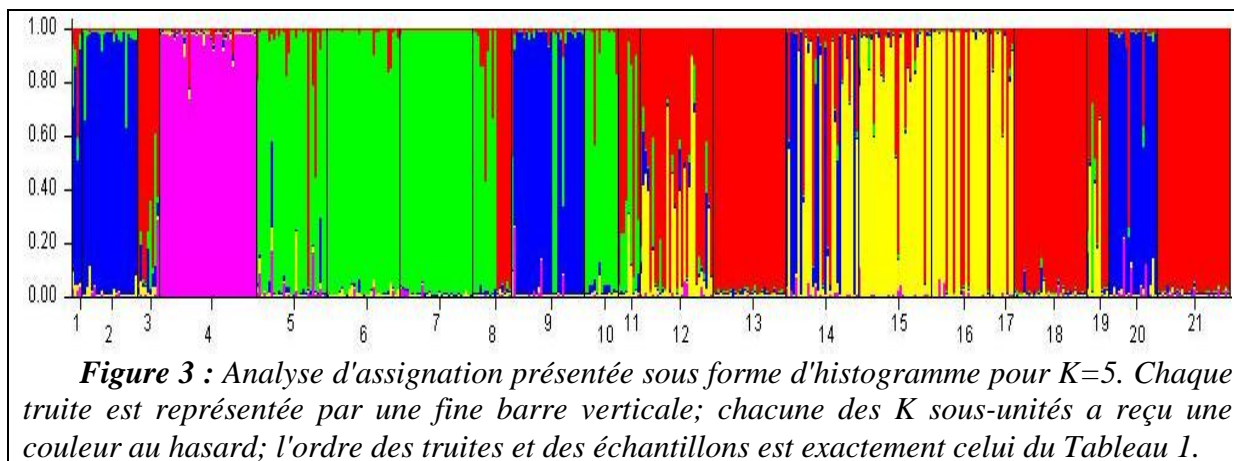


Figure 2b : Même analyse que dans la figure précédente (les axes 1 et 3 ont été inversés). Ici seuls les centres de gravité des échantillons sont représentés. Les ellipses désignent les ensembles géographiques. Les truites domestiques atlantiques sont en bas à droite: la pisciculture commerciale (Isère) est en trait noir plein, les échantillons de rivière identiques à la souche domestique (Vallons des Prés et de Grana, dans la Roya) en pointillés. Tout point hors de son ellipse géographique désigne une population modifiée par l'homme.

La Figure 2a positionne toutes les truites analysées en fonction de l'ensemble de leurs génotypes au niveau des 6 marqueurs microsatellites; la Figure 2b positionne leurs centres de gravité pour plus de lisibilité. Les stations et les bassins hydrographiques sont caractérisés globalement, mais l'analyse d'assignation est nécessaire pour obtenir des résultats chiffrés (%).

5.2. Analyses d'assignation

Les analyses d'assignation (logiciel STRUCTURE) permettent un découpage de l'échantillonnage global (nouveaux échantillons + échantillons de référence) en K sous-unités homogènes (= proche des caractéristiques de populations en équilibre). La valeur K a été estimée à 5 comme étant la plus informative et la plus stable (au-delà de 5, les associations de stations sont instables). Le logiciel d'assignation reconnaît, sans utiliser l'origine des truites, 5 lignées distinctes stables. A partir de la même analyse, la Figure 3 présente ces résultats sous forme d'un histogramme coloré, le Tableau 2 sous forme de pourcentages et la Figure 4 sous forme d'arbre.



N° carte	Station	ss bassin	Durance	Allos	Var	Roya	domestique atlantique
1	Lac Lauzanier	Durance	69	2	11	4	13
2	Ubayette	Durance	92	1	5	2	1
3	Serpentine	Durance	6	4	11	2	76
4	Lac d'Allos	Allos	1	97	1	1	1
5	Var (amont Garreton)	Var	3	2	84	2	9
6	Tinée (Rte Bousiéyas)	Var	1	1	96	1	2
7	Salleveille	Var	1	1	98	1	0
8	Tavel	Var	1	1	53	1	44
9	Mollières (amont)	Var	83	2	11	1	3
10	lac de Fenestre	Var	2	0	90	1	5
11	Vallon Planchette	Var	2	1	37	5	56
12	Minière	Roya	4	1	5	23	67
13	Vallon du Prés	Roya	1	0	1	1	97
14	Céva	Roya	34	1	1	41	22
15	Mérim (Durmiose)	Roya	1	1	2	83	13
16	Vallon Maglia (Fontanas)	Roya	1	1	1	73	25
17	Vallon Maglia (aval)	Roya	1	1	1	80	17
18	Vallon de Grana	Roya	1	1	1	1	97
19	Bévéra (Cabanes Vieilles)	Roya	2	1	10	20	67
20	pisciculture Roquebillière (06)	-	87	3	1	2	7
21	pisciculture commerciale Isère	-	1	1	0	1	97

Tableau 2 : Transposition de l'histogramme de la Figure 3 sous forme de pourcentage d'assignation de chaque échantillon analysé aux K (=5) sous-unités détectées. Ces pourcentages sont des moyennes de 4 tests successifs. Ils peuvent donc légèrement différer de la Figure 3 qui ne représente, elle, qu'un seul test.

Les estimations égales ou inférieures à 5% sont considérées comme du « bruit de fond » et mises en gris.

k=1	k=2	k=3	k=4	k=5	k=6	
		5-8 + 10	5-8 + 10	5-8 + 10	5-8 + 10	Var
	1-2 + 4-9 + 10 + 20					
				1-2 + 9 + 20	1-2 + 9 + 20	Durance
		1-2 + 4 + 9 + 20	1-2 + 4 + 9 + 20			
				4	4	Allos
					3 + 11-12 + 14-15 + 18-19	
			3 + 11-15 + 18-19 + 21	3 + 11-15 + 18-19 + 21		domestique atlantique
	3 + 11-19 + 21	3 + 11-19 + 21			13 + 21	
			16-17	16-17	16-17	Roya

Figure 4 : Reconstitution de l'assignation sous forme d'arbre présentant les liens entre les 5 lignées (K=5, au niveau de la barre jaune verticale). A droite de la barre jaune, les subdivisions, montrées à titre indicatif (K=6), ne sont pas significatives. Les couleurs sont celles des entêtes du Tableau 2.

6. Interprétation des résultats

6.1. Description de la structure génétique observée

Les deux méthodes statistiques employées (analyses multidimensionnelles et d'assignation) permettent de découper les échantillons analysés en lignées locales ou nationales.

L'analyse multidimensionnelle (Figure 2a) nous montre une structure "horizontale" le long de l'axe 1 avec les truites domestiques atlantiques à gauche, puis les échantillons de Durance, Fenestre et Var. Il y a une structure "verticale" qui dégage de toutes les autres les localités de la Roya vers le haut (valeurs positives de l'axe 2) et enfin une structure "en profondeur" (axe 3) montrant le lac d'Allos isolé par rapport à tous les autres échantillons.

La même analyse peut être appréhendée par la position des seuls centres de gravité de chaque échantillon. La Figure 2b clarifie un peu la structure et nous montre la même image (inversée droite-gauche et haut-bas). Elle nous montre une série d'échantillons positionnés en dehors de l'enveloppe de leur sous bassin et décalés vers l'angle inférieur-droit du graphique. Il est très probable que ce soit une conséquence des repeuplements et introductions diverses puisque les références domestiques atlantiques et Roquebillière sont positionnés dans cet angle.

Bien que seulement qualitative, cette structure (Figures 2a et b) s'accorde avec les résultats quantitatifs obtenus par analyse d'assignation (Figure 3 et 4, Tableau 2) :

- la forme domestique atlantique est présente de façon modérée (moins de 25%) dans 6 des 19 échantillons sauvages; elle est fortement présente dans 3 autres échantillons (**Serpentine**, **Planchette** et **Bévéra**); enfin la souche atlantique a remplacé la forme locale dans deux localités: les **Vallons du Prés** et de **Grana** (bassin de la Roya).

- la forme domestique méditerranéenne (Roquebillière) est prépondérante dans la **Mollières** amont de 2005 et importante dans la **Céva** de la même année. Dans la partition présentée ici (Tableau 2), la lignée Roquebillière n'est pas séparée de la lignée Durance. Cette séparation s'observe cependant dans d'autres analyses présentées (Figure 2) et non représentées ici (assignation pour K=8).

Si ces truites domestiques avérées ou hypothétiques sont retirées, alors la structure génétique naturelle des truites du PNM apparaît clairement : le Tableau 2 nous localise les

lignées Durance, Var et Roya. Notons ici l'impossibilité de positionner le Lac d'Allos avec certitude par rapport aux autres lignées. Il apparaît "ailleurs" dans l'analyse des correspondances (Figure 2) et proche de la Durance dans l'analyse d'assignation (Figure 4).

6.2. Intérêt d'une étude de synthèse

Toutes les stations du PNM étudiées ici (19) l'ont déjà été dans le passé. Les études baptisées MERC1 (échantillons de 2000 et 2001), MERC2 (2005) et MERC3 (2003 et 2005) ont suivi l'évolution des techniques et des marqueurs, passant des allozymes (MERC1) aux microsatellites. Ré-analyser une partie des truites des années 2000 et 2001 (Lauzanier, Ubayette, Serpentine, Planchette, Maglia et Bévéra) a permis de mettre en évidence et de positionner les 4 lignées objectives qui se partagent les truites du PNM.

Les analyses génétiques du type de celle présentée ici (dite de « génétique des populations ») sont basées sur les comparaisons. Il n'est possible d'affirmer la présence de truites atlantiques dans la zone étudiée qu'en incluant un échantillon de ce type (échantillon n°21 de pisciculture atlantique) dans le processus statistique. Par conséquent le choix des échantillons de référence est la partie la plus délicate et déterminante du traitement statistique. Les rapports précédents ayant impliqué des échantillons de référence différents, il est intéressant de voir si il y a des différences avec les rapports précédents, toute contradiction serait révélatrice.

Domestiques atlantiques. MERC1 était basé sur les allozymes. Ces marqueurs nécessitaient de sacrifier les truites afin de prélever leurs organes contenant les divers allozymes. Ce marqueur est puissant pour distinguer les truites d'origine atlantique (donc domestiques) des truites méditerranéennes (donc sauvages mais aussi domestiques de Roquebillière). Les analyses MERC1 et MERC4 donnent des estimations de présence atlantique similaires (Tableau 3).

MERC2 et MERC3 ont utilisé les mêmes microsatellites que la présente étude, mais dans un contexte d'échantillons de référence différent. Ceci explique peut-être pourquoi deux désaccords apparaissent entre ces études pour les stations Céva et surtout Mollières (Tableau 3). Le taux de présence domestique diverge aussi pour Minière.

Domestiques méditerranéennes. MERC2 montre des différences dans les estimations par rapport à MERC4. Ceci est en grande partie dû à l'absence de la référence Roquebillière dans l'analyse principale de MERC2 (d'où l'importance d'informer le généticien des repeuplements ou translocations connus). Il est intéressant de noter que dans ce rapport MERC2, Roquebillière n'est pas utilisée dans l'analyse principale (partie 1) mais employé par hasard dans l'analyse globale méditerranéenne (partie 2) : or Roquebillière y est proche de Céva et surtout de Mollières dans l'arbre de la Figure 6 de MERC2, ce qui est dû à la forte présence de ces truites domestiques comme décrit dans le Tableau 2 du présent travail.

6.3. Conclusion

Les truites du PNM nous montrent une structure génétique naturelle très simple: une lignée par bassin: Durance, Var et Roya. Cependant l'action humaine s'avère très complexe par repeuplements (souches domestiques de plusieurs types) ou translocations (déplacement de parties de populations), éventuellement il y a longtemps. Ces interventions multiples sur les rivières rendent ce rapport MERC4 compliqué, aboutissant à des hypothèses nécessitant confirmation.

			MERC1	MERC2	MERC4
N° carte	Station	ss bassin	LDH	microsatellites	microsatellites
1	Lac Lauzanier	Durance	30	-	13
2	Ubayette	Durance	6	-	1
3	Serpentine	Durance	62	-	76
4	Lac d'Allos	Allos	-	-	1
5	Var (amont Garreton)	Var	-	15	9
6	Tinée (Rte Bousiéyas)	Var	-	2	2
7	Salleveille	Var	-	1	0
8	Tavel	Var	-	41	44
9	Mollières (amont)	Var	-	85	3
10	lac de Fenestre	Var	-	0	5
11	Vallon Planchette	Var	46	-	56
12	Minière	Roya	-	95	67
13	Vallon du Prés	Roya	-	99	97
14	Céva	Roya	-	98	22
15	Mérim (Durmiose)	Roya	-	99	13
16	Vallon Maglia (Fontanas)	Roya	22	-	25
17	Vallon Maglia (aval)	Roya	46	-	17
18	Vallon de Grana	Roya	-	99	97
19	Bévéra (Cabanes Vieilles)	Roya	75	-	67
20	pisciculture Roquebillière (06)	-	-	-	7
21	pisciculture commerciale Isère	-	-	-	97

Tableau 3 : Synthèse des hypothèses issues de l'étude MERC4 concernant les truites domestiques probablement d'origine atlantique (Roquebillière exclu). Ce tableau présente les résultats obtenus à ce sujet lors des études MERC1 (allozymes) et MERC2 (microsatellites) comparés à MERC4. Une assez bonne cohérence des résultats est observée, sauf pour 3 (ou 4) stations et surtout pour Mollières (voir discussion).

Les résultats de ce rapport nous poussent donc à envisager une mise en commun de toutes les études génétiques effectuées sur les trois bassins impliqués afin de redéfinir les lignées naturelles et les multiples formes domestiques sur un maximum d'échantillons et donc de diversité. Une telle étude nécessiterait une "remise à niveau" des analyses faites pour le PNM, mais aussi pour les Fédérations des AAPPMA des **Alpes Maritimes**, des **Alpes de Haute Provence** et une partie de celles des **Hautes Alpes**. Cette remise à niveau est nécessaire car ces analyses ont été pratiquées sur les marqueurs différents et une stricte homologation d'analyse est nécessaire pour les statistiques.

Ce projet est en discussion.

Fait à Montpellier le 6 mars 2015

7. Littérature citée

- Berrebi P. 2001.** Etude génétique de la truite commune (*Salmo trutta*) dans quelques sites du Parc national du Mercantour (marqueurs allozymiques). Rapport de contrat, Université Montpellier II, 19 p. + annexe. ([MERC1](#))
- Berrebi P., Lasserre B., Dubois S. 2006.** Analyse génétique (microsatellites) des truites du Parc du Mercantour - Rapport final, novembre 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. 22p. ([GSALM2](#))
- Berrebi P., Schikorski D. 2013.** Génétique des truites des lacs d'Allos et de Fenestre dans le Parc National du Mercantour - Projet MERC3 - Rapport de novembre 2013: Rapport pour le Parc du Mercantour, Université Montpellier 2. 12p. ([MERC3](#))



Truite du lac d'Allos (© Benjamin Isouard)



Truite du lac du Lauzanier (© Patrick Berrebi)



Truite du lac de Fenestre (© Franck Guigo)