

Etude génétique des truites de la Dourbie (affluent du Tarn) en Aveyron

Rapport AV1



La Dourbie près de St Jean du Bruel © saint-jean-du-bruel.stationverte.com

Analyses statistiques et rédaction: **Patrick BERREBI**

ISEM, Université Montpellier 2, cc065, place Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05

Tél: 04 67 14 37 32, Mél: patrick.berrebi@umontpellier.fr



Analyses moléculaires: **David SCHIKORSKI**

Laboratoire Genindexe, 4 Rue Théodore Botrel, 22603 Loudéac Cedex

Tél: 02 96 28 63 43, Mél: d.schikorski@genindexe.com



Opération réalisée avec le concours financier de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne et de la Région Midi-Pyrénées.

1. Introduction

La gestion de la truite est une activité complexe du fait de la multitude des pratiques passées et de la diversité naturelle de l'espèce. La gestion actuelle nécessite l'établissement d'un plan d'action justifié et la satisfaction des pêcheurs qui ont des points de vue parfois opposés. Les gestions halieutique ou patrimoniale s'appliquent en France en fonction de chaque situation. Les analyses génétiques peuvent aider à faire un choix. Elles procurent aux gestionnaires deux types d'information: la distribution géographique des lignées naturelles différenciées et le niveau d'hybridation entre lignées sauvages et domestiques. La première information permet de prévenir des mélanges inappropriés et la seconde permet d'adapter la gestion à l'état du cheptel.

2. Les échantillons analysés

Les 5 échantillons de 13 à 32 fragments de nageoires dans l'alcool représentent la première moitié d'un projet plus important prévoyant 10 localités d'échantillonnage du département de l'Aveyron. Ces 5 premiers échantillons ont été livrés à l'Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier (ISEM) à l'Université de Montpellier (UM) le 10 novembre 2015 par la Fédération des Associations Agréées de Pêche et de Protection du Milieu Aquatique (AAPPMA) de l'Aveyron (FD12). Madame Martine Guilmet est la correspondante de la FD12 auprès de l'ISEM.

N° carte	STATION	Nbre	Date	Dépt	Rapport	N° ISEM d'échantillon	N° ISEM d'individu
1	Dourbie (amont Tayrac)	32	08/09/2015	Aveyron	AV1	L684	T29061-T29092
2	Dourbie (moulin Bondon)	31	01/09/2015	Aveyron	AV1	L685	T28985-T29015
3	Dourbie (Dourbias)	32	01/09/2015	Aveyron	AV1	L686	T28953-T28984
4	Crozes	32	03/09/2015	Aveyron	AV1	L687	T29029-T29060
5	Viala (2015)	13	03/09/2015	Aveyron	AV1	L688	T29016-T29028
6	Dourbie	30	15/09/2010	Gard	GAR1	L300	T17918-T17947
7	Trévezel	29	15/09/2010	Gard	GAR1	L301	T17948-T17977
8	Béthuzon	29	2008	Lozère	GSALM2	L222	T15893-T15921
9	pisciculture nationale	30	2008	Isère	GSALM2	L266	T16926-T16955

Tableau 1 : Détail des échantillons analysés. En jaune les échantillons de la Dourbie de 2015; en blanc les échantillons de référence servant aux comparaisons; en gris la référence domestique de type atlantique.

Les analyses statistiques nécessitent de comparer les génotypes des truites des 5 échantillons de 2015 avec des truites de type connu. Les génotypes sont constitués par la liste des différents variants (mutations) que possède une truite et qui lui viennent de ses parents: on parle de génotype pour un marqueur ou pour l'ensemble des 6 marqueurs analysés. Ainsi, aux échantillons de 2015 ont été rajoutés les échantillons de l'amont du Tarn et de la Dourbie dans le Gard et la Lozère, déjà analysés par l'ISEM (Tableau 1). Cela permettra de décrire l'originalité éventuelle des 5 stations de 2015. Enfin un échantillon de truites domestiques appartenant à la principale lignée commerciale française permettra de détecter l'impact des repeuplements. Les caractéristiques des échantillons analysés sont détaillées au Tableau 1. Leurs localisations sont précisées à la Figure 1.



Figure 1 : Position géographique des stations échantillonnées en 2015 et des échantillons de référence. Leurs caractéristiques sont détaillées au Tableau 1. La rivière en rouge est le Tarn.

3. Les méthodes moléculaires

Les techniques biomoléculaires permettent d'extraire l'ADN contenu dans les nageoires. Par amplification et migration, sont révélés les variants héréditaires (allèles) portés par chaque truite au niveau d'endroits bien particuliers des chromosomes (les locus). Pour être informatifs, des locus hypervariables sont choisis, les microsatellites. Ici, nous avons choisi 6 locus

microsatellites nommés Onep9, Mst85, Ss0SL-311, Omy21DIAS, Mst543 et SSoSl-438. Leurs allèles (variants ou mutants) constituent les génotypes des truites.

Les génotypages sont assurés par Genindexe, laboratoire privé. Les résultats sont donnés sous la forme d'une matrice croisant locus et truites et indiquant un génotype à deux allèles à chaque intersection (un allèle du père et un allèle de la mère du poisson). Cette matrice de génotypes est le point de départ de toutes les analyses statistiques détaillées aux chapitres suivants.

4. Les méthodes statistiques

Il existe une multitude de méthodes statistiques permettant de faire parler la matrice de génotypes. Les méthodes choisies ici sont d'une part efficaces et très utilisées en génétique des populations, et d'autre part visuelle pour que le lecteur non spécialiste puisse suivre les résultats et le raisonnement.

- *L'analyse multidimensionnelle* permet de positionner sur un graphique chaque truite en fonction de l'ensemble de ses caractéristiques génétiques (génotypes). La méthode choisie est l'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) traitée avec le logiciel GENETIX. Les regroupements de points (= truites) sur le graphique, appelés "nuages", décrivent les différentes lignées présentes dans l'échantillonnage global. Cette méthode est considérée comme un débroussaillage des données moléculaires permettant de comprendre rapidement quelles sont les lignées en présence et leur éventuelle hybridation.

- *L'analyse d'assignation* permet de découper l'échantillonnage global en sous-groupes qui sont les lignées présentes. Cette méthode plus délicate d'emploi a l'avantage de chiffrer (%) la composition de chaque échantillon en différentes lignées. Elle permet aussi de décrire la composition en lignées de chaque truite (= taux d'hybridation). L'analyse d'assignation est faite avec le logiciel STRUCTURE. Le nombre objectif de sous-unités est déterminé par le logiciel STRUCTURE HARVESTER;

- les paramètres populationnels (ici la diversité génétique H_o et H_{nb} et la panmixie F_{is}) sont calculés avec le logiciel GENETIX et permettent d'interpréter les résultats en termes biologiques.

5. Résultats

5.1. Débroussaillage par AFC

La première image des analyses génétiques, par AFC (Figure 2), montre une masse compacte à droite (les truites qui nous intéressent) qui s'opposent aux truites domestiques représentées par les triangles à gauche. L'essentiel des truites du présent projet ainsi que les références sont donc sauvages.

Quelques exceptions tout de même: ce sont les truites de rivière (ronds et carrés) les plus à gauche: une truite de la Dourbie station 3 (Dorbias) et deux truites de la référence Trévezel. L'AFC ne permet pas de détecter à coup sûr les hybrides. Il y en a certainement dans la partie centrale du graphique. L'analyse d'assignation qui suit est très efficace pour les détecter et les chiffrer.

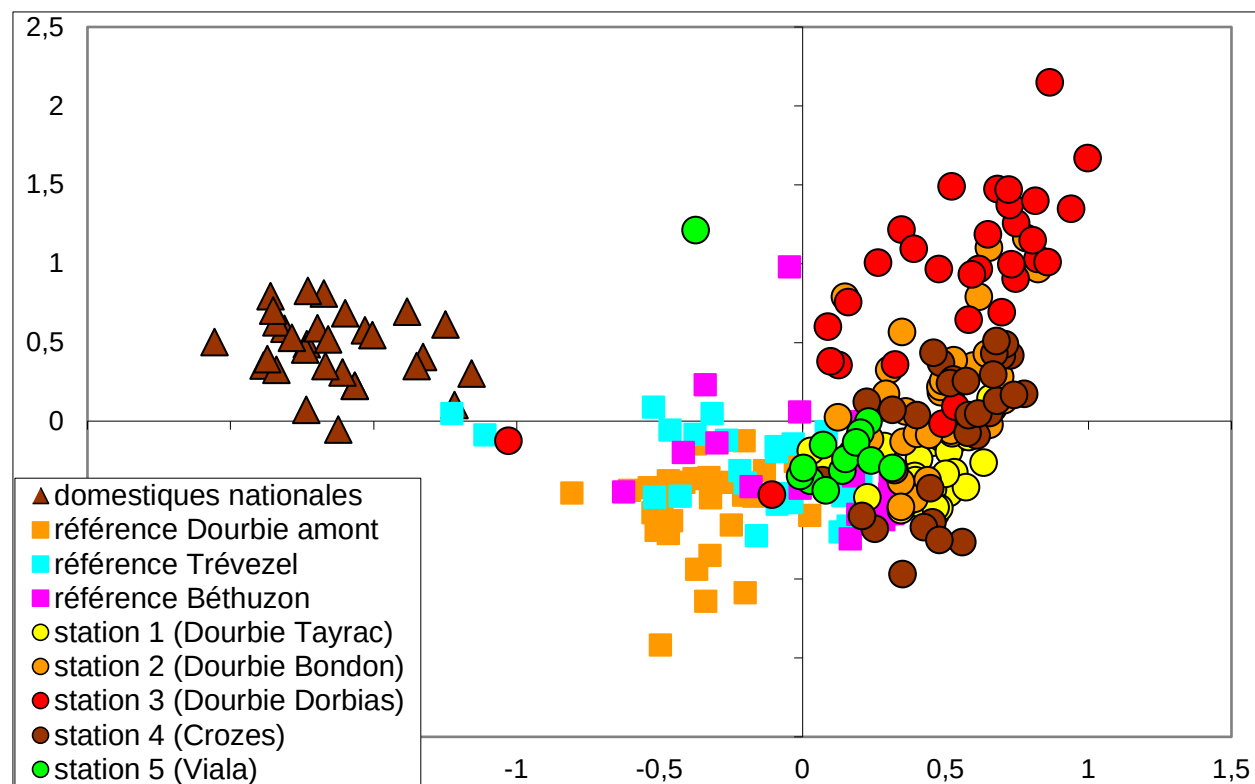


Figure 2 : Analyse multidimensionnelle (AFC) disposant toutes les truites considérées d'après leurs caractéristiques génétiques. Les truites domestiques de la souche nationale sont placées à gauche. L'ensemble des truites analysées dans la Dourbie sont très peu impactées par cette souche, à l'exception d'une truite de la station 3 (Dourbie Dorbias) et quelques truites des références probablement hybridées. L'analyse d'assignation pourra confirmer ces impressions.

5.2. Chiffrage par assignation

L'analyse d'assignation permet de classer et de chiffrer la composition génétique de chaque échantillon. Le logiciel d'aide à la décision indique que $K=3$ (découpage de l'échantillonnage en 3 lignées) est le plus informatif. La meilleure représentation est l'histogramme de la Figure 3. Le chiffrage est donné dans le Tableau 2 et la représentation géographique des deux lignées naturelles à la Figure 4.

Dans les histogrammes de la Figure 3 (représentation globale en haut, précise sur l'échantillonnage de la Dourbie de 2015 en bas), chaque truite est représentée par une fine barre verticale et chaque échantillon est repéré par un chiffre, les échantillons du présent rapport sont numérotés de 1 à 5 (première colonne du Tableau 1). Sans information sur l'origine de chaque truite, le logiciel d'assignation (STRUCTURE) est capable de découper l'échantillonnage total en K (ici 3) sous-groupes, chacun le plus homogène possible, et de les présenter avec des couleurs différentes dans l'histogramme. Ainsi, par exemple, en suivant le rouge (= échantillon 9 = truites domestiques) dans les échantillons 1 à 5, on sait où le logiciel a trouvé des truites domestiques dans les échantillons de la Dourbie de 2015. Si la couleur rouge occupe la moitié de la hauteur, c'est que c'est un hybride 50/50% entre sauvage et domestique: c'est le cas de la 8ème truite de l'échantillon 3 (truite Aveyron-008 de la Dourbie à Doubias) et de la dernière truite de l'échantillon 5 (truite Aveyron-076 du Viala).

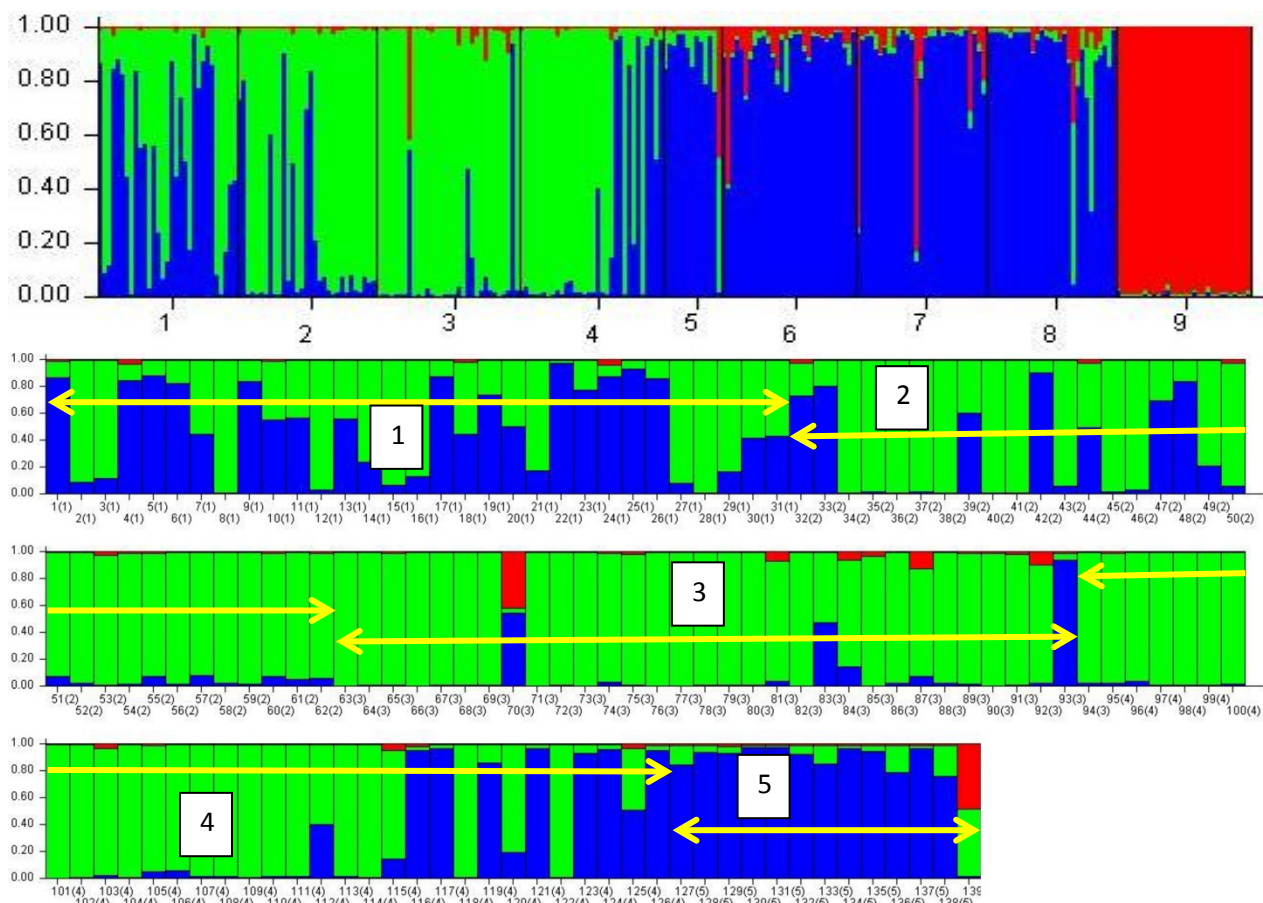


Figure 3 : Histogrammes de la composition génétique de chaque truite. En haut les 9 échantillons analysés, en bas seulement les échantillons de la Dourbie de 2015.

N° carte	STATION	Dourbie	Tarn	domestique
1	Dourbie (amont Tayrac)	50	49	1
2	Dourbie (moulin Bondon)	80	20	1
3	Dourbie (Dourbias)	89	8	3
4	Crozes	73	26	1
5	Viala (2015)	12	84	5
6	Dourbie	3	90	7
7	Trévezel	3	88	10
8	Béthuzon	8	88	4
9	pisciculture nationale	1	1	99

Tableau 2 : Pourcentage d'appartenance de chaque échantillon aux 3 lignées détectées obtenu en chiffrant la proportion des couleurs de la Figure 3. Il s'agit de la moyenne d'appartenance de chaque truite de chaque échantillon aux lignées détectées. Les valeurs égales ou inférieures à 5% sont considérées comme peu sûres (bruit de fond de la méthode).

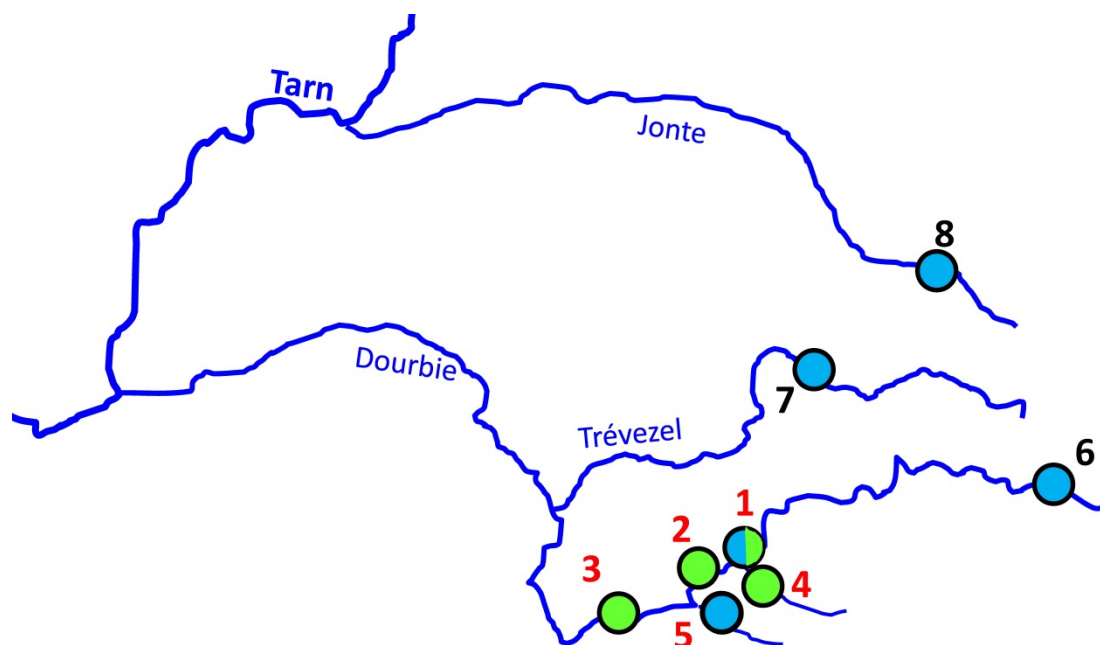


Figure 4 : Positionnement géographique des deux lignées naturelles dans les affluents du Tarn. Les numéros sont ceux de la première colonne des Tableaux 1 et 2. Ici, c'est la lignée dominante de chaque échantillon qui est indiqué; sauf pour l'échantillon 1 proche des 50/50%.

5.3. Paramètres populationnels

Les paramètres populationnels concernent les équilibres au niveau populationnel. Les paramètres retenus ici renseignent sur le polymorphisme (ou diversité) génétique. La diversité génétique est un paramètre important: plus il est élevé, plus la population possède de variants (mutants) et plus elle est protégée d'une modification écologique future. Il est normal que cette diversité diminue pour les populations plus petites de tête de bassin. Les populations à plus faible polymorphisme (Dourbie à l'amont de Tayrac et Viala) sont soit plus petites en effectif que les autres, soit limitée (peu de frayère, forte mortalité récente...). Cependant une valeur de Hnb ou de Ho de l'ordre de 0,6 est considéré comme largement suffisante pour la survie d'une population de truites.

Le meilleur descripteur de cette diversité est le paramètre Hnb, c'est l'hétérozygotie non biaisée: l'hétérozygotie est la proportion de génotypes issus de parents différents au marqueur considéré (par opposition à l'homozygotie qu'on obtient quand les deux parents sont identiques) et varie donc de 0 à 1. Hnb est dite "non biaisée" car son calcul comprend un paramètre qui pondère le résultat par le nombre de truite de l'échantillon. En effet, H est influencé par l'effectif de l'échantillon et a tendance à baisser artificiellement quand l'effectif est bas. Cette anomalie est ainsi corrigée.

Ho donne la proportion de génotypes hétérozygotes (les parents étaient différents à ce marqueur). Le paramètre A donne le nombre moyen d'allèles (ou variants, ou mutations) par marqueur. Ces trois paramètres doivent varier de la même façon.

N° carte	STATION	Hnb	Ho	A	Fis	signific.
1	Dourbie (amont Tayrac)	0,59	0,53	5,8	0,11	**
2	Dourbie (moulin Bondon)	0,71	0,63	6,3	0,11	**
3	Dourbie (Dourbias)	0,72	0,61	7,8	0,15	**
4	Crozes	0,73	0,63	7,0	0,14	**
5	Viala (2015)	0,60	0,60	5,0	-0,01	ns
6	Dourbie	0,77	0,72	9,0	0,07	*
7	Trévezel	0,67	0,61	7,3	0,09	*
8	Béthuzon	0,56	0,47	7,3	0,16	***
9	pisciculture nationale	0,66	0,64	6,0	0,04	ns

Tableau 3 : Paramètres populationnels donnant des informations sur le polymorphisme (entêtes orange), et la panmixie (entêtes vertes). ns = Fis non significatif (=population en panmixie), *, ** et *** = niveau de significativité ou de sûreté de l'écart à la panmixie.

Le paramètre Fis, qui varie de -1 (excès d'hétérozygotes) à 1 (déficit en hétérozygotes) renseigne sur la panmixie: une population est panmictique quand tous ses membres se reproduisent entre eux. Les écarts indiquent une migration, un repeuplement ou une forte sélection.

On considère une population comme panmictique quand son Fis est assimilable à zéro (Fis non significatif). Dès que ce paramètre est significatif, il n'y a plus panmixie. Toutefois, quand ce paramètre est faiblement significatif (*) le déséquilibre est considéré comme secondaire (structure en famille, migrations dans la zone étudiée...) alors que quand il est fortement significatif (***) on peut soupçonner un mélange de lignées différentes (repeuplement ou forte migration liée à un phénomène climatique...)

La sélection est aussi une cause de déséquilibre du Fis: quand les jeunes stades vivent dans un milieu différent de celui des adultes (très petits affluents), ils subissent une sélection différente de celle que subissent les adultes (vivant dans le cours principal). Le retour des jeunes sélectionnés ailleurs peut provoquer une hétérogénéité mesurée par le Fis.

Une valeur non significative de Fis (ns) signifie que toutes les truites de l'échantillon sont issues d'une seule population s'étant reproduite au hasard entre ses membres. L'introduction de truites domestiques ou l'immigration de truites venant d'un affluent génétiquement différent casse cet équilibre.

Le tableau 4 analyse les différences génétiques entre échantillons. Seules les cases blanches indiquent des comparaisons entre échantillons génétiquement proches (mais pas identiques). On ne les trouve qu'entre l'échantillon Dourbie-Bondon et toutes les autres stations de la présente étude et entre l'amont du Trévezel et de la Dourbie. Le Trévezel est donc la station hors étude la plus proche génétiquement des stations de l'étude.

Ce tableau nous montre qu'entre échantillons de l'étude, la différence génétique va de 0,07 à 0,21 (soit entre 7 et 21%). La différenciation moyenne dans tout le haut bassin du Tarn est de l'ordre de 12% (Fst autour de 0,12), le Viala est un peu plus distant (0,14). A l'inverse, la population Dourbie-Bondon semble entretenir certains échanges avec toutes les stations du rapport où la différenciation est maintenue basse (7% en moyenne, mais des migrations tout de même faibles ou exceptionnelles puisque tous les Fst sont significatifs).

N° carte	STATION	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Dourbie (amont Tayrac)	0	0,08	0,21	0,11	0,17	0,13	0,20	0,26	0,33
2	Dourbie (moulin Bondon)		0	0,07	0,07	0,07	0,13	0,14	0,15	0,25
3	Dourbie (Dourbias)			0	0,13	0,17	0,17	0,20	0,24	0,25
4	Crozes				0	0,16	0,14	0,18	0,20	0,27
5	Viala (2015)					0	0,14	0,15	0,20	0,25
6	Dourbie						0	0,09	0,22	0,17
7	Trévezet							0	0,12	0,19
8	Béthuzon								0	0,27
9	pisciculture nationale									0

Tableau 4 : Valeurs des *F_{st}*, paramètre populationnel donnant des informations sur les différences génétiques entre échantillons pris deux à deux. Un test a montré que toutes ces valeurs étaient significatives (même proches, il n'y a pas deux station génétiquement identiques). Les couleurs des cellules renseignent sur l'importance des différences génétiques.

6. Interprétation et Discussion

6.1. Impact des repeuplements.

Les analyses génétiques ne sont compréhensibles que par comparaison des truites de rivière, de nature inconnue (celles qui font l'objet de cette étude), avec les truites de référence connue. La présence de truites domestiques est détectée par ressemblance avec les truites de référence de pisciculture. Toutefois, si une autre souche inconnue (ou non signalée au laboratoire) a été utilisée dans la zone étudiée, les estimations peuvent être faussées sans que nous le sachions.

Dans la partie analysée de la Dourbie, l'impact des repeuplements est quasiment nul. La lignée domestique est d'origine atlantique du nord (en grande partie de Normandie, créée par l'INRA en 1992-94). La référence domestique choisie est un échantillon de cette lignée entretenue par la première pisciculture commerciale qui l'a développée, en Isère. Le pourcentage est de 1 à 5%, à la limite de détection. En regardant de plus près chaque truite (Figure 3, partie du bas) on remarque les truites 8 de l'échantillon 1 (étiquette Aveyron-008) et la truite 13 de l'échantillon 3 (Aveyron-076) sont hybridées à 50%.

Les stations analysées peuvent être considérées comme peuplées de truites entièrement sauvages.

6.2. Structure génétique naturelle des truites de la Dourbie.

Deux lignées naturelles ont été détectées, représentées en bleu et en vert dans les divers diagrammes. La carte de la Figure 4 détaille l'étendue géographique des deux lignées. Ces lignées sont atlantiques: la lignée "Tarn", en bleu, a déjà été rencontrée lors des études GSALM2 et GAR1. La lignée nommée ici Dourbie, en vert, est une nouveauté découverte lors de la présente étude.

La lignée "verte" étant limitée à la Dourbie, elle portera le nom de "Dourbie" pour des raisons pratiques. Cela ne signifie pas bien sûr que cette lignée soit originaire de la Dourbie ni qu'elle en occupe tout le linéaire, ni qu'on ne la trouve pas ailleurs. Cette lignée est concentrée en zone moyenne de la Dourbie, entre les stations 1, 2 et 4. La station 1 (amont Tayrac) sert de

transition entre les deux lignées le long de la Dourbie; la station 5 (Viala) semble enclavée car peuplée de truites amont (Tarn).

La lignée "bleue" se retrouve un peu partout dans la zone étudiée et a été baptisée "Tarn", bien qu'elle occupe l'amont de la Dourbie.

La structure génétique naturelle des truites habitant d'une portion du réseau hydrographique dépend de nombreux facteurs, et surtout l'historique des vagues de migration d'un passé ancien. Les truites ont remonté toutes les rivières de France il y a environ 10000 ans (réchauffement postglaciaire), mais ces mouvements se sont fortement étalés dans le temps en fonction des obstacles rencontrés. Dans cette problématique, seuls les obstacles naturels et anciens, ont pu influencer ces migrations et donc la structure génétique.

La carte donnée en Annexe 1 (produite par la FD12) positionne tous les obstacles de la zone étudiée. La lignée Dourbie (en vert sur la Figure 4) se trouve dans une zone fortement accidentée. Les hypothèses suivantes sont nécessaires:

- les obstacles séparant les stations 1 à 3 (et 4) se sont constitués récemment, ou alors ont laissé passer les jeunes poissons dévalant, autorisant une homogénéisation génétique locale;
- la présence de la lignée Tarn à la station 6 et partiellement à la station 1 montre que ces stations n'étaient pas fortement isolées de l'aval et que la lignée Tarn est antérieure chronologiquement à la lignée Dourbie

La poursuite de ces analyses en 2017 permettra de confirmer ou de contredire ces hypothèses et de les compléter par la description éventuelle d'autres lignées génétiques locales.

6.3. Apport des paramètres populationnels

Le Tableau 3 renseigne sur deux caractères: la diversité génétique et l'équilibre panmictique.

La diversité génétique des populations étudiées est élevée, Hnb allant de 0,59 à 0,73 soit parfois plus polymorphe que l'échantillon domestique, pourtant considéré comme très polymorphe (Hnb=0,66). C'est signe de bonne santé démographique. Les stations Dourbias et Viala sont moins polymorphes, correspondant à des populations plus petites ou limitées par un problème anthropique ou par manque de frayère.

Le déséquilibre panmictique est généralisé (à l'exception de l'échantillon Viala, mais d'effectif faible). Ce déséquilibre est difficile à expliquer puisque ces populations sont toutes naturelles avec quasiment aucune influence des repeuplements. Ce cas a déjà été observé dans le Pays Basque et a été interprété comme au retour des F1 parmi les adultes (Aurelle et Berrebi 1998). Cependant il n'est pas possible d'affirmer qu'un tel mécanisme explique les observations faites dans la Dourbie. Ce déséquilibre structurel reste inexpliqué.

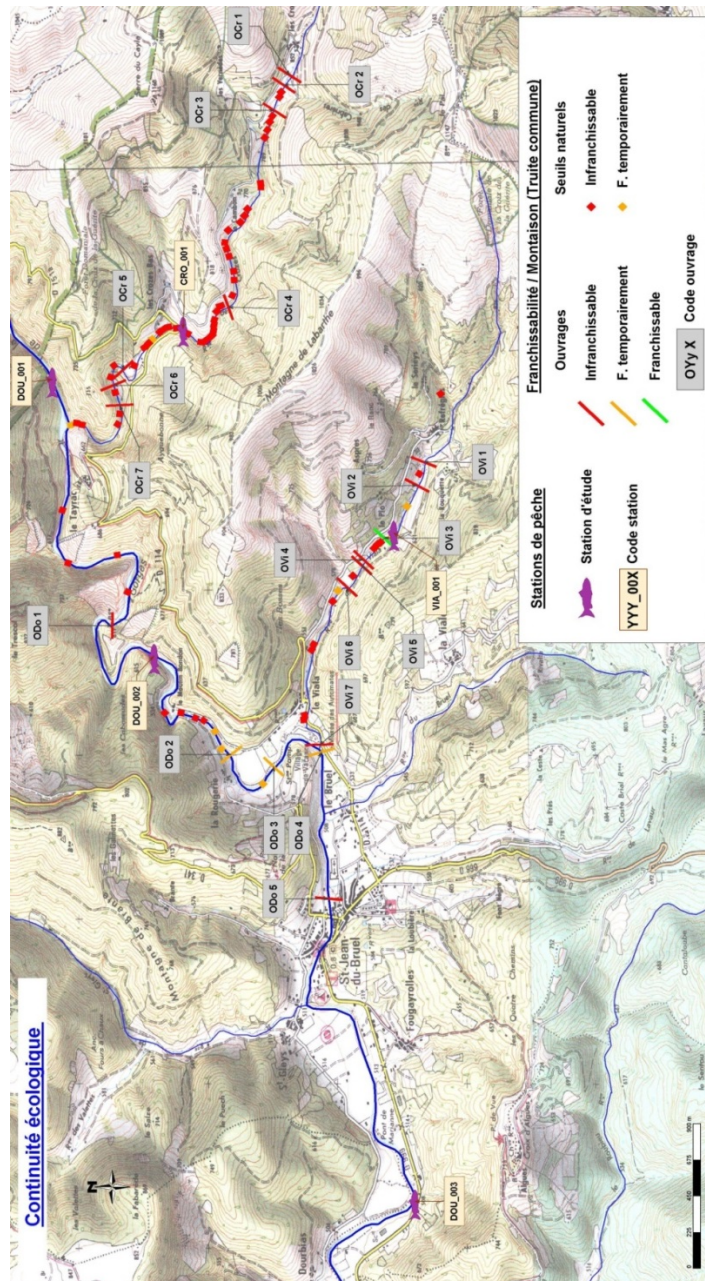
6.4. Conclusion provisoire.

Cette conclusion ne sera définitive qu'à la fin de la seconde année de campagne. Pour l'instant le principal résultat est que les 5 stations échantillonnées ne présentent quasiment que des truites sauvages qui méritent donc une gestion patrimoniale puisqu'elles présentent une belle santé (Hnb élevé) sans apport de truites domestiques.

Fait à Montpellier le 27 février 2016

7. Références bibliographiques

- Aurelle D., Berrebi P. 1998.** Microsatellite markers and management of brown trout *Salmo trutta fario* populations in southwestern France. *Génétique Sélection Evolution* 30 (suppl. 1):S75-S90.
- 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., Cherbonnel C. 2010.** Analyses génétiques des truites du bassin versant atlantique de la Dourbie - rapport d'octobre 2010. Pour la Fédération de Pêche du Gard, Université Montpellier 2, 8p. ([GAR1](#))



Annexe 1: Topographie des obstacles à la circulation des truites dans la zone analysée.

© FD12