

Analyses génétiques de contrôle à deux marqueurs:

1. Pour une recherche de corrélation avec la charge parasitaire (Val d'Ese et Calderamolla - Prunelli et Veraculongu - Taravo): rapport CORS2L3.

2. Stabilité du peuplement du lac de Ninu - Golu:
rapport CORS2L4.



UdC 5.00kV 9.8mm x450 SE 7/31/2015

100um

Gyrodactylus sp. de truite © Yann Quilichini

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

1. Introduction

Le rapport CORSTEST de 2010 avait montré que le couple de marqueurs microsattellites Sfo1, et Mst543 permettait à eux seuls de distinguer entre domestiques atlantiques et corses.

Ces deux marqueurs ont ensuite été utilisés avec succès dans les rapports CORS2L1 en 2011 (stations Varaculongu, Sant' Antone, Chjuvone, Ese et Manica) et CORS2L2 de 2012 (station Pozzi di Marmanu).

Dans les deux présents rapports jumelés, nous appliquons cette méthode "minimum" à

- des truites de zones parasitées dans le but ultérieur de rechercher une corrélation génétique/parasitologie (rapport CORS2L3);

- des truites du lac de Ninu dans le but de tester la stabilité de leur composition génétique (rapport CORS2L4).

2. Les échantillons analysés

Les 6 échantillons totalisant 71 morceaux de nageoires dans l'alcool ont été livrés à l'Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier (ISEM) de l'Université de Montpellier (UM) le 14 novembre 2016. Ils correspondent à deux projets, l'un commandé par l'Università di Corsica Pasquale Paoli (UC) et l'autre par la Fédération des Associations Agréées de Pêche et de Protection du Milieu Aquatique (AAPPMA) de Corse (FD20). Monsieur Yann Qulichini est le correspondant de l'UC et Monsieur Stéphane Muraccioli est le correspondant de la FD20 auprès de l'ISEM.

N° carte	Station	Bassin	Date	Effectif	N° ISEM échantillons	Rapport	Nbre de marqueurs	N° ISEM individus
1	Veraculongu (intermédiaire)	Taravu	05/10/2016	9	L735	CORS2L3	2	T30045-T30053
2	Veraculongu (aval)	Taravu	28/09/2016	10	L736	CORS2L3	2	T30054-T30063
3	Calderamolla	Prunelli	09/09/2016	9	L737	CORS2L3	2	T30064-T30072
4	Calderamolla (aval 2016)	Prunelli	18/02/2016	10	L738	CORS2L3	2	T30073-T30082
5	Ese	Prunelli	06/09/2016	12	L739	CORS2L3	2	T30083-T30094
6	Ninu (lac)	Tavignanu	02/09/2016	21	L740	CORS2L4	2	T30095-T30115
7	Val d'Ese (amont 1)	Prunelli	01/04/2007	20	L080	LIFE10	6	T10607-T10626
8	Pratelle	Golu	30/07/2014	21	L598	OEC2014	6	T26709-T26729
9	Ortolu	Ortolu	02/10/1996	20	F160	CORS04	6	T03800-T03819
10	pisciculture Isère	Dept. 38	2008	30	L266	GSALM2	12	T16926-T16955

Tableau 1 : Détail des échantillons analysés. En jaune les échantillons de 2016; en blanc les échantillons de référence servant aux comparaisons; en gris la référence domestique nationale de type atlantique.

Les analyses statistiques nécessitent de comparer les génotypes des truites des échantillons de 2016 avec des truites de type connu. Ainsi, aux échantillons de 2016 ont été rajoutés des échantillons représentatifs des lignées naturelles ancestrales corses et naturelles corses méditerranéennes; un échantillon de rivière corse entièrement remplacé par des truites domestiques atlantiques (Ortolu), enfin un échantillon de truites domestiques appartenant à la principale lignée commerciale française. Les caractéristiques des échantillons analysés sont détaillées au Tableau 1. Leurs localisations sont précisées à la Figure 1.

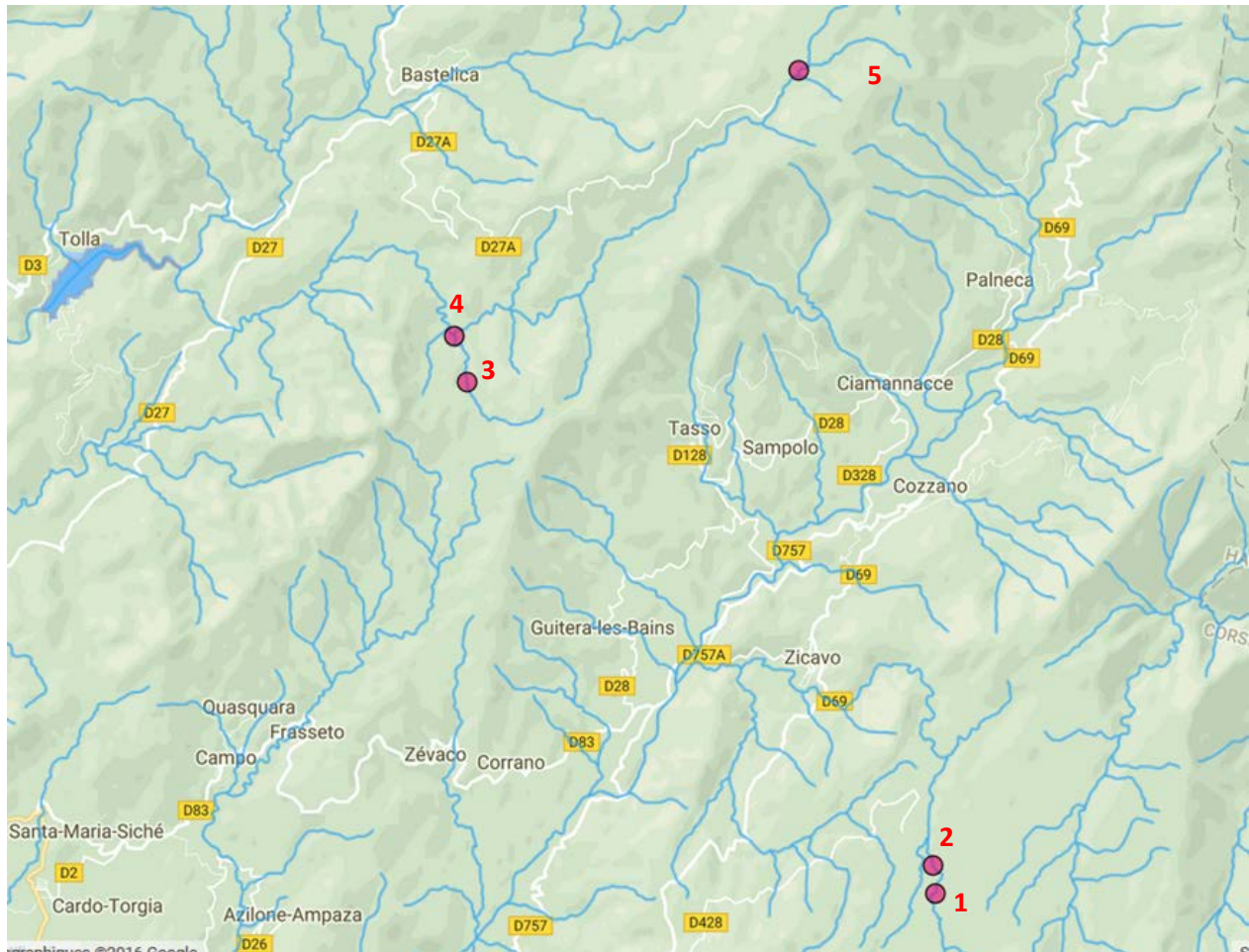


Figure 1 : Positionnement géographique des stations du Taravu et du Prunelli échantillonnées en 2016. La station Lac de Ninu et les échantillons de référence ne sont pas représentée. Les chiffres sont ceux du Tableau 1, première colonne.

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 analysé les truites au niveau de 2 locus microsatellites nommés Oneμ9 et Mst85. Leurs allèles constituent les génotypes des truites.

Les génotypages sont assurés par Genindexe (Labofarm), 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. La méthode choisie ici, l'analyse d'assignation, est d'une part efficace et très utilisée en génétique des populations, et d'autre part visuelle pour que le lecteur non spécialiste puisse suivre les résultats et le raisonnement: c'est l'analyse d'assignation.

Cette méthode permet de découper l'échantillonnage global en sous-groupes qui sont les lignées présentes. Elle 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

5. Résultats

L'analyse d'assignation permet de classer et de chiffrer la composition génétique de chaque échantillon. La meilleure représentation est l'histogramme de la Figure 3.

Ainsi, pour K=2 (sauvages/domestiques), on découvre que les stations amont du Veraculongu, amont du Calderamolla et amont du Val d'Ese hébergent des populations de truites purement sauvages tandis que les stations plus aval du Veraculongu (à l'exception d'une truite sauvage) et l'aval du Calderamolla sont purement domestiques.

Le lac de Ninu présente 3 truites quasiment domestiques et deux truites hybridées à 50/50.

Les valeurs d'assignation sont données au tableau de l'Annexe 1.

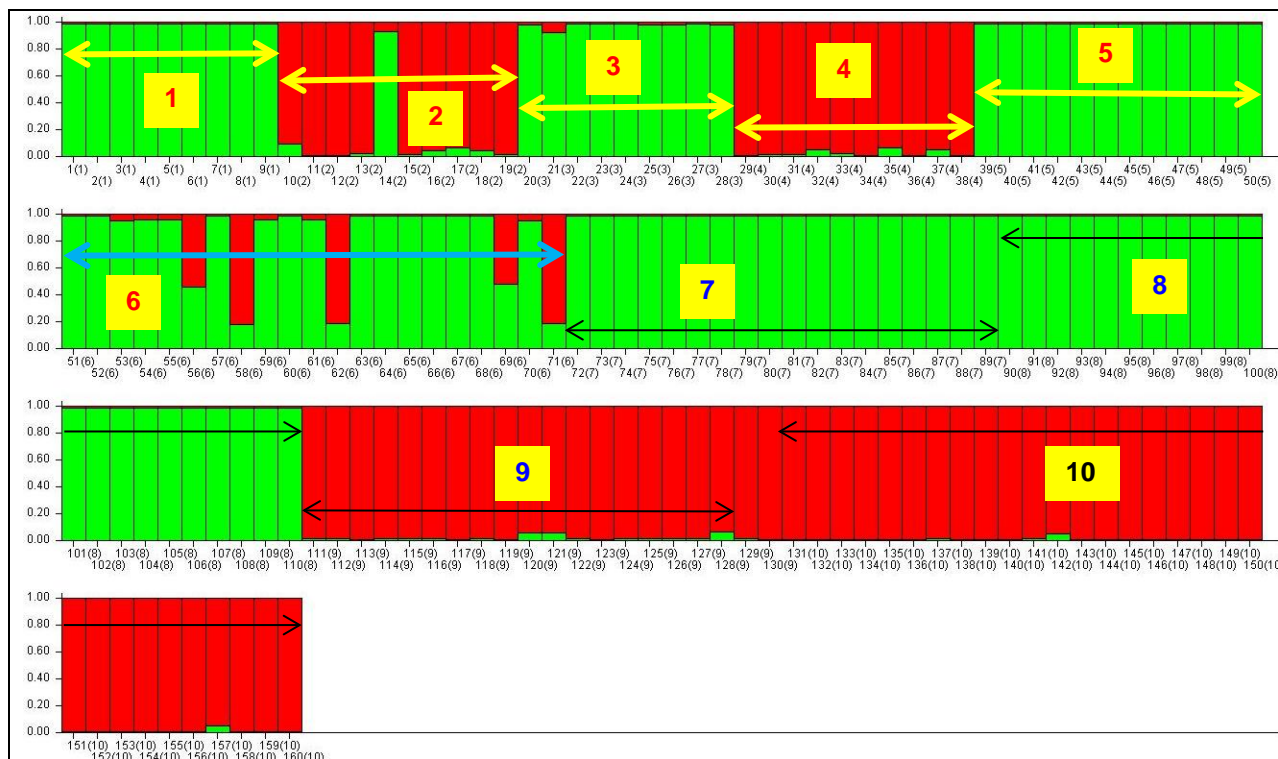


Figure 4 : Histogrammes de la composition génétique de chaque truite (fines barres verticales) et de chaque échantillon quand on subdivise l'échantillonnage total en 2 lignées (sauvages en vert et domestiques en rouge).

6. Interprétation et Discussion

Contrôle pour future recherche de corrélation parasitologique

Cette analyse de contrôle succincte (seulement deux marqueurs) a montré des résultats très contrastés. L'amont des trois rivières (Ese, Calderamolla et Veraculongu) sont purement sauvages alors que pour deux d'entre elles (Calderamolla et Veraculongu), la station aval est purement domestique. Il n'y a qu'une exception: la truite " T5AVERAV" (= T30058 selon la nomenclature ISEM) est purement sauvage dans une population par ailleurs purement domestique (l'échantillon 2: Veraculongu aval).

Il est intéressant de regarder les analyses antérieures de ces cours d'eau afin de trouver une logique d'invasion domestique:

D'amont en aval, les échantillons analysés dans le passé ont donné les résultats suivants:

- Veraculongu:

amont -----> aval	Station	Bassin	Date	Effectif	N° ISEM échantillons	Rapport	Nbre de marqueurs	N° ISEM individus	Lambert 2 ét. X	Lambert 2 ét. Y
	Veraculongu (amont 1)	Taravu	23/08/2011	20	L385	CORS2L1	2	T19762-T19781	1167439	1675930
	Veraculongu (amont 2)	Taravu	10/05/1996	22	F129	CORS06+CORS2016	7	T03118-T03139	1167382	1676160
	Veraculongu (intermédiaire)	Taravu	05/10/2016	9	L735	CORS2L3	2	T30045-T30053	1167430	1676262
	Veraculongu (amont 3)	Taravu	01/06/1993	12	F054	CORS01	allozymes	T01237-T01264	1167463	1676292
			01/06/2004	20	F312	LIFE07+CORS2016		T08114-T08133		
	Veraculongu (aval)	Taravu	28/09/2016	10	L736	CORS2L3	2	T30054-T30063	1167344	1676755
	Veraculongu (aval - Partuso)	Taravu	2006	20	L011	LIFE08+CORS2016	6	T07662-T07681	1167088	1679729

Tableau 2: d'amont en aval, 6 stations ont été analysées entre 1993 et 2016, soit avec des allozymes, soit avec 2 à 7 microsattellites. Les localités en vert se sont montrées entièrement sauvages, de la lignée corse ancestrale, la localité en rouge est 100% domestique et en orange 77% domestique.

- Calderamolla:

amont ----> aval	Station	Bassin	Date	Effectif	N° ISEM échantillons	Rapport	Nbre de marqueurs	N° ISEM individus	Lambert 2 ét. X	Lambert 2 ét. Y
	Calderamolla (amont)	Prunelli	10/05/1996	7	F407	CORS06	allozymes	T03140-T03146	1158328	1684601
			09/09/2016	9	L737	CORS2L3		T30064-T30072		
	Calderamolla (aval)	Prunelli	01/06/1993	34	F051	CORS01	allozymes	T01147-T01180	1158317	1684721
	Calderamolla (aval 2016)	Prunelli	18/02/2016	10	L738	CORS2L3	2	T30073-T30082	1158017	1685387

Tableau 3: même principe de synthèse avec les échantillons de la Calderamolla.

- Val d'Ese

amont -----> aval	Station	Bassin	Date	Effectif	N° ISEM échantillons	Rapport	Nbre de marqueurs	N° ISEM individus	Lambert 2 ét. X	Lambert 2 ét. Y
	Val d'Ese	Prunelli	28/08/2011	20	L388	CORS2L1	2	T19822-T19841	1164307	1690850
	Val d'Ese (station de ski)	Prunelli	12/09/1997	15	F194	CORS06	allozymes	T04584-T04598	1164075	1690776
			01/05/2004	20	F309	LIFE07+CORS2016		T08054-T08073		
	Ese	Prunelli	06/09/2016	12	L739	CORS2L3	2	T30083-T30094	1163735	1690611
	Val d'Ese (LIF39)	Prunelli	2006	20	L035	LIFE08+CORS2016	6	T09172-T09191	1163260	1689766
	Val d'Ese (amont 1)	Prunelli	01/04/2007	20	L080	LIFE10+CORS2016	6	T10607-T10626	1158442	1685701
	Val d'Ese (amont 2)	Prunelli	01/11/2006	20	L068	LIFE09+CORS2016	6	T10139-T10158	1158230	1685574
	Val d'Ese (aval)	Prunelli	2006	20	L036	LIFE08+CORS2016	6	T09192-T09211	1155725	1686526

Tableau 4: même principe de synthèse avec les échantillons de la Calderamolla. Les localités en vert sont habitées par des truites 100% sauvages de type ancestral corse, en orange = 60% (rapport LIFE09) à 75% (CORS2016), en jaune = 50% domestique (CORS2016) à 61% (LIFE08).

Il est donc aisé de détecter la zone au-dessous de laquelle la forme sauvage a été hybridée avec la fore domestique.

Contrôle du maintien de la population sauvage méditerranéenne du lac de Ninu

Le résultat de l'analyse d'assignation (Figure 4 et Annexe 1) nous indique que la population du lac était à 82% sauvage et 18% domestique.

Le rapport CORS06 datant de 1997 et analysant l'échantillon F191 avec des allozymes reconnaissait cette population comme 100% méditerranéenne (allèle 100 à la *LDH4** et allèle 100 à la *LDHC1**).

Le rapport OEC2011 basé sur 6 microsattellites donnait suivant deux méthodes différentes d'assignation 90 à 94% de type méditerranéen et 5 à 10% de type corse. La population était donc 100% sauvage.

Le problème est que chaque estimation est basée sur des marqueurs différents. Pour savoir si cette population avait perdu de sa pureté sauvage entre 2011 et 2016, il faudrait l'analyser avec les mêmes marqueurs.

C'est ce qui a été possible de faire avec les échantillons de 2011 et 2016. Une analyse d'assignation commune a été tentée et le résultat est donné à la Figure 5.

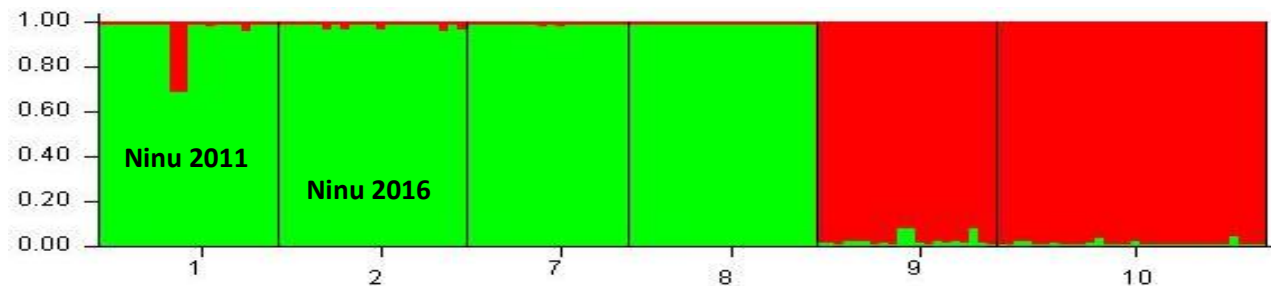


Figure 5: Nouvelle analyse de l'échantillon 2016 du lac de Ninu (n°2) confronté à l'échantillon de 2011 (n°1) et aux échantillons de référence (n°7 à 8: voir Tableau 1). Les deux échantillons du lac apparaissent comme purement sauvages (à l'exception d'un seule truite légèrement hybridée dans l'échantillon 2011).

Pour cette nouvelle analyse, les échantillons 2011 et 2016 du lac sont purement sauvages (et donc méditerranéens) à l'encontre des résultats de la première analyse (Figure 4) qui reconnaissait environ 18% de forme atlantique.

Il est difficile de départager les deux analyses (voir l'Annexe 2 qui explique pourquoi des résultats divergeant peuvent être donnés par des analyses sur le même échantillon). Par contre, une chose est sûre, c'est que la population du lac n'a pas évolué entre 2011 et 2016.

Fait à Montpellier le 24 novembre 2016

7. Références bibliographiques (les textes de tous ces rapports peuvent être téléchargés à partir du site: <http://data.oreme.org/trout/home> (utilisez Firefox).

- Berrebi P. 1993. Rapport d'activité 1993 - Etude génétique de la truite corse, Université Montpellier 2. (**CORS01**)
- Berrebi P. 1996. Analyses allozymiques des truites corses dans le cadre du protocole n°1165 du CSP (8° délégation) : Etude de deux cours d'eau corses dévastés par les crues : la Solenzara et l'Ortolo. Suivi de la recolonisation par les populations de truite. Rapport décembre 1996, Université Montpellier II. (**CORS04**)
- Berrebi P. 1998. Structuration génétique des truites de Corse - Rapport 1998. Rapport de contrat, Université Montpellier II, 11 p. + annexes. (**CORS06**)
- Berrebi P., Lasserre B., Meldgaard T. 2005. LIFE Nature "macrostigma" - Rapport intermédiaire n°7 - octobre 2005 - Synthèse de la première année d'analyses. LIFE macrostigma. (**LIFE07**)
- Berrebi P., Dubois S. 2006. LIFE Nature "macrostigma" - Rapport n°8 - octobre 2006 - Synthèse de la seconde année d'analyses. LIFE macrostigma. (**LIFE08**)
- Berrebi P., Dubois S. 2007. LIFE Nature "macrostigma" - Rapport intermédiaire N°9 - janvier 2007. Université Montpellier, 6 p. (**LIFE09**)
- Berrebi P., Dubois S. 2007. LIFE Nature "macrostigma" - Rapport final n°10 - Juillet 2007 - Synthèse de trois années d'analyses, p. 9. Université Montpellier 2. (**LIFE10**)
- 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. 2010. Tests pour la détermination de l'analyse minimum pour distinguer les truites de types corse ancestral, méditerranéen et atlantique domestiques marqueurs microsatellites: 11p. Rapport de l'Université Montpellier 2. (**CORSTEST**)
- Berrebi P., Shao Z. 2011. Description génétique de cinq populations de truites corses basée sur six locus microsatellites - décembre 2011, p. 10. Marché **OEC2011**, Université Montpellier 2.
- Berrebi P., Shao Z. 2011. Test à deux marqueurs. Détermination rapide de la composition génétique des populations de truites de 5 stations 2011: Varaculongu, Sant' Antone, Chjuvone, Ese et Manica, 3p. Rapport d'étude pour la Fédération de Pêche de Corse. (**CORS2L1**)
- Berrebi P, Shao Z (2012) Analyse génétique de contrôle d'un échantillon de truites de Pozzi di Marmanu - Test à 2 marqueurs - Projet **CORS2L2** - Rapport de novembre 2012. Rapport de contrat pour la FD20 - Université Montpellier 2 - 4p.
- Berrebi P, and Shao Z. 2014. Analyse génétique des truites de Corse sur 15 sites. Etape 2014 : Prunicia, Albarelli, Vivaggiu, Vitalbetu, Valdu alle grotte & Pratelle - Projet **OEC2014**: Rapport d'étude pour l'OEC; Université Montpellier 2. 6p.
- Berrebi P. 2016. Méta-analyse génétique des populations de truites de Corse - Rapport **CORS2016**: Université de Montpellier. Rapport de synthèse pour la FD20.

8. Annexes

8.1. Annexe 1: valeurs d'assignation

Localité	Sigle	N° carte	sauvage	domestique	Moyenne
Veraculongu (intermédiaire)	V2-01	1	0,99	0,01	
	V2-02	1	0,99	0,01	
	V2-03	1	0,99	0,01	
	V2-04	1	0,99	0,01	
	V2-05	1	0,99	0,01	
	V2-06	1	0,99	0,01	
	V2-07	1	0,99	0,01	
	V2-08	1	0,99	0,01	
	V2-09	1	0,99	0,01	0,99
Veraculongu (aval)	V3-01	2	0,11	0,89	
	V3-02	2	0,01	0,99	
	V3-03	2	0,01	0,99	
	V3-04	2	0,03	0,97	
	V3-05	2	0,94	0,06	
	V3-06	2	0,02	0,98	
	V3-07	2	0,05	0,95	
	V3-08	2	0,07	0,94	
	V3-09	2	0,05	0,95	
	V3-10	2	0,02	0,98	0,13
Calderamolla	C1-01	3	0,98	0,02	
	C1-02	3	0,92	0,08	
	C1-03	3	0,99	0,01	
	C1-04	3	0,99	0,01	
	C1-05	3	0,99	0,02	
	C1-06	3	0,98	0,02	
	C1-07	3	0,98	0,02	
	C1-08	3	0,99	0,01	
	C1-09	3	0,99	0,02	0,98
Calderamolla (aval 2016)	C2-01	4	0,01	0,99	
	C2-02	4	0,02	0,98	
	C2-03	4	0,02	0,98	
	C2-04	4	0,05	0,95	
	C2-05	4	0,02	0,98	
	C2-06	4	0,01	0,99	
	C2-07	4	0,07	0,94	
	C2-08	4	0,01	0,99	
	C2-09	4	0,06	0,94	
	C2-10	4	0,01	0,99	0,03

Annexe 1: Valeurs d'assignation pour l'analyse globale parasitologie + Lac de Ninu (p.1)

Localité	Sigle	N° carte	sauvage	domestique	Moyenne
Ese	Ese-01	5	0,99	0,01	
	Ese-02	5	0,99	0,01	
	Ese-03	5	0,99	0,01	
	Ese-04	5	0,99	0,01	
	Ese-05	5	0,99	0,01	
	Ese-06	5	0,99	0,01	
	Ese-07	5	0,99	0,01	
	Ese-08	5	0,99	0,01	
	Ese-09	5	0,99	0,01	
	Ese-10	5	0,99	0,01	
	Ese-11	5	0,99	0,01	
	Ese-12	5	0,99	0,01	0,99
Ninu (lac)	Nin-01	6	0,99	0,01	
	Nin-02	6	0,99	0,01	
	Nin-03	6	0,96	0,04	
	Nin-04	6	0,96	0,04	
	Nin-05	6	0,96	0,04	
	Nin-06	6	0,47	0,53	
	Nin-07	6	0,99	0,01	
	Nin-08	6	0,22	0,78	
	Nin-09	6	0,96	0,04	
	Nin-10	6	0,99	0,01	
	Nin-11	6	0,96	0,04	
	Nin-12	6	0,23	0,78	
	Nin-13	6	0,99	0,01	
	Nin-14	6	0,99	0,01	
	Nin-15	6	0,99	0,01	
	Nin-16	6	0,99	0,01	
	Nin-17	6	0,99	0,01	
	Nin-18	6	0,99	0,01	
	Nin-19	6	0,50	0,50	
	Nin-20	6	0,96	0,04	
	Nin-21	6	0,22	0,78	0,82

Annexe 1: Valeurs d'assignation pour l'analyse globale parasitologie + Lac de Ninu (p.2)

8.2. Résultats divergents

Il arrive fréquemment que des pourcentages d'assignation du même échantillon varient d'un rapport à l'autre.

Les variations de pourcentages de lignées entre les mêmes échantillons dans l'analyse globale (Figure 4) et l'analyse partielle (Figure 5) du présent rapport sont inhérentes à la méthode relative utilisée (il n'y en a pas d'autres): ces pourcentages ne sont obtenus que par comparaison (méthode relative) et dépendent des autres truites mises dans l'analyse (= références). Les truites analysées ensemble dans les deux analyses d'assignation ont changé, les pourcentages aussi.

Voici deux images permettant de comprendre:

1 - On vous donne 10 truites de 10-12 cm et 10 truites de 20-22 cm et on vous demande de les classer en petites et grandes: vous le faites sans problème.

On rajoute 10 truites de 30 à 32 cm et on vous demande de classer l'ensemble en petites et grandes: après une petite hésitation vous placez les 30-32 dans les grandes et les autres dans les petites.

Donc en rajoutant d'autres échantillons, les 20-22 sont passées de grandes à petites!

2 - On vous montre les portraits de 10 suédois (yeux bleus et cheveux blonds) et de 10 italiens (yeux bruns et cheveux bruns) et on vous demande d'en faire deux catégories: vous le faites sans hésitation: un groupe du nord et un groupe du sud.

Je rajoute 10 portraits de sénégalais (peau noire, yeux bruns et cheveux bruns) et on vous demande d'en faire deux catégories: vous allez hésiter entre opposer les suédois à tous les autres (su/it+se) et opposer les sénégalais à tous les autres (su+it/se) mais probablement allez choisir le second découpage

Donc en rajoutant les portraits des sénégalais, les italiens changent de groupe et passent du groupe sud au groupe nord.

C'est la même chose avec les méthodes multidimensionnelle et d'assignation: les positions ou pourcentages changent parce que les références ont été changées. Les classements des truites sont bien sûr bien plus complexes que les deux exemples donnés car la génétique des truites est basée sur une multitude de marqueurs et de variants.

Pour résoudre ces contradictions, on considère :

- que l'analyse impliquant le plus d'échantillons est la plus sûre. Dans notre cas, cela nous pousserait à considérer la population du lac de Ninu comme légèrement hybridée.

- que l'analyse impliquant le plus de marqueurs est la plus sûre. Dans notre cas, la population du lac est purement méditerranéenne.

Avec les analyses relatives, il n'est pas possible (quelques fois seulement) de conclure. D'autres analyses, avec plus d'échantillons et plus de marqueurs peuvent (peut-être) résoudre le dilemme.