

**Composition génétique (SNP) des truites de la Roya
Evolution des populations entre 2007 et 2017
Effet du barrage de Breil**

-
Rapport ROYEDF2



Pêche électrique dans la Roya le 7 août 2007 © PB

Analyses statistiques et rédaction: **Patrick BERREBI**
Genome-Recherche & Diagnostic, 8 rue des tilleuls, 34090 Montpellier
Messagerie: 04 67 52 47 82, Mél: patrick.berrebi@laposte.net
Site web: <https://webslf-genome-rd-64.webslf.net>

1. Introduction

1.1. Apports de la génétique

Distinguer truites sauvages et truites domestiques à l'œil nu est un exercice parfois aisé, mais parfois hasardeux tant la truite naturelle a une robe diversifiée, parfois différente entre deux affluents d'un même sous bassin. Les méthodes moléculaires sont alors précieuses.

Par ailleurs, l'effet des obstacles à la circulation des truites, qu'ils soient naturels ou créés par l'homme est difficile à estimer puisque ces obstacles peuvent être submergés lors des crues et parfois franchissables par les truites, au moins à la dévalaison. Plusieurs méthodes peuvent être employées pour les estimations de franchissabilité des obstacles : le marquage-recapture, l'analyse des otolithes et les diverses méthodes de génétique des populations.

1.2. Le site d'étude et les connaissances déjà acquises

La Roya est un fleuve côtier à la frontière entre la France et l'Italie. Le peuplement salmonicole de la Roya entre Tende et la frontière italienne au sud fait l'objet d'un suivi depuis plusieurs années, afin de comprendre la dynamique de la population, et l'effet que pourrait avoir le barrage de Breil sur cette dynamique. Y a-t-il un isolement génétique des populations amont / aval barrage ? Est-il susceptible de porter atteinte à la viabilité de la population ? Est-ce que les transparences de l'ouvrage, notamment lors des crues automnales sont susceptibles de favoriser un mélange « suffisant » du point de vue génétique en permettant la remontée de géniteurs ?

Une première étude basée sur l'analyse de 8 microsattellites d'échantillons de nageoires de 225 truites prélevées en Roya entre Tende et l'aval de Breil en 2007 avait montré (Berrebi & Dubois 2008) :

- la présence prédominante de truites méditerranéennes dans la partie la plus aval de la Roya (aval Fontan) et de truites atlantiques en amont ;
- que la population de truites en aval de Fontan était en équilibre panmictique sans différenciation amont/aval barrage de Breil.

Une seconde étude est en cours, co-financée par EDF R&D, CNRS et AFB (thèse de Kéoni Saint-Pé prévue pour 2019) concernant plusieurs bassins versants de cours d'eau salmonicole, dont la Roya. Sur la Roya, cette thèse utilise des échantillons prélevés en 2016 dans l'ensemble des affluents en plus de l'axe principal. Cette nouvelle étude utilise d'autres marqueurs génétiques, à savoir 162 SNPs issus d'un génotypage réalisé à l'aide de l'approche KASPAR.

Des analyses supplémentaires ont été réalisées sur des échantillons de 2014, 2015 et 2017 moins nombreux que ceux de 2016 mais qui apportent une vision interannuelle de la situation. Un rapport sur les résultats acquis sur ces années récentes a été rédigé en avril 2018 (Blanchet, Saint-Pé 2018). Cette étude conclut, comme la première, à une domination des truites méditerranéennes à partir de l'aval de Fontan, et à une non différenciation génétique de la population tout au long de la Roya de l'aval de Fontan jusqu'à la frontière italienne. Une différenciation génétique est par contre mise en évidence sur des échantillons issus d'affluents de la Roya.

L'échantillonnage de 2007 s'est fait à la suite de plusieurs années à faible hydrologie et sans crue. Depuis 2007, plusieurs événements majeurs se sont déroulés. L'enjeu est d'essayer de comprendre les conséquences qu'ils ont éventuellement eues sur la structuration génétique du peuplement de truite :

- La Roya a connu des crues hivernales entre 2008 et 2010, ainsi que d'autres crues d'importance, en novembre 2011 (le maximum était à 278 m³/s), le 25/12/2013 (maximum à 302 m³/s). Elle a aussi subi une crue très forte le 5 novembre 2014 (environ 800 à 900 m³/s en pointe) et enfin une crue de 436 m³/s en pointe le 25/11/2016. Ces crues ont à l'époque bien amoindri les populations (et notamment la reproduction de l'année).

- Des travaux sur l'aménagement de Breil ont eu lieu d'octobre 2012 (vidange de la retenue le 3/10) à mi-février 2015 (remise en exploitation de la centrale). Le barrage a été remis en eau fin octobre 2014. Pendant toute cette période (novembre 2012/octobre 2014), le débit naturel de la Roya transitait par les tunnels évacuateurs de crue (de l'amont du village vers l'aval du barrage, voir Figure 5), grâce à la mise en place d'un batardeau en rivière: ce dernier n'a laissé transiter qu'un débit réservé de 1200 l/s en rivière entre les points d'entrée et sortie des évacuateurs de crues.

Ces travaux de rénovation globale de l'ouvrage ont été motivés entre autres, par la nécessité de mettre en transparence le barrage dès 50 m³/s de débit entrant (au lieu de 100 m³/s précédemment) en raison d'un début de transport solide à ce débit, le charriage étant ensuite généralisé dès 80 m³/s. Ces mises en transparence sont effectives depuis 2008, mais la nouvelle vanne en rivière du barrage facilite les manœuvres depuis 2015. Enfin, une passe de dévalaison a été placée au barrage en 2015.

1.3. Objectifs de l'étude

La présente étude se propose de traiter ces sujets selon deux axes:

- que nous disent les deux types de marqueurs moléculaires disponibles (8 microsattellites versus 192 SNPs) sur la structuration des peuplements de truites tout au long de la Roya, et en particulier quelles sont les zones charnières entre différentes compositions?
- cette structure a-t-elle évolué entre 2007 et 2017.

Nous nous proposons de ré-analyser les échantillons de 2007 avec les marqueurs SNPs afin de répondre à ces questions.

2. Les échantillons analysés

Les analyses moléculaires à la base de la présente étude consistent en la ré-analyse de 253 tissus provenant des captures de 2007 (Berrebi & Dubois 2008). La liste des échantillons ainsi que leurs caractéristiques géographiques et biologiques sont réunis au Tableau 1 (lignes en jaune). Un échantillon de 30 tissus de la pisciculture de Roquebillière de 2008 a été aussi ré-analysé pour tester la stabilité de cette souche domestique méditerranéenne (ligne en jaune et gris). A ces données nouvelles, est jointe une petite partie des analyses effectuées à l'occasion de la thèse Saint-Pé (Tableau 1, lignes en blanc pour la Roya et en gris pour les piscicultures).

Le nombre de marqueurs SNP géotypés n'est pas identique pour tous ces échantillons, bien que les analyses aient toutes été faites par le laboratoire privé LGC Genomics basé à Herts en Grande Bretagne:

- les nouvelles analyses sur les échantillons de 2007-2008: 183 SNPs
- les données de la thèse Saint-Pé sur les piscicultures de Roquebillière et de Soueich en 2017: 159 SNPs
- les données de la thèse Saint-Pé sur les échantillons de 2016: 162 SNPs
- et de 2017: 191 SNPs.

N° sur carte	Station sur la Roya	Année de capture	Nombre retenu	Rapport	N° GRD station	N° GRD individus
1	Pont d'Ortiga	2016	30	ROYEDF2	X01	Moulis
2	Tende Maison de retraite	2016	29	ROYEDF2	X02	Moulis
3	St Dalmas amont	2007	27	ROYEDF	L111	T11752-T11781
4	St Dalmas aval	2016	30	ROYEDF2	X03	Moulis
5	Centrale EDF St Dalmas	2007	25	ROYEDF	L113	T11812-T11841
6	Fontan amont Scarassoui	2017	29	ROYEDF2	X04	Moulis
7	Viaduc de Scarassoui	2007	29	ROYEDF	L112	T11782-T11811
8	Fontan aval	2007	33	ROYEDF	L108	T11617-T11651
9	Pont d'Ambo	2017	30	ROYEDF2	X05	Moulis
10	Embarcadère	2015	23	ROYEDF2	X06	Moulis
11	Pont de Veil	2017	25	ROYEDF2	X07	Moulis
12	Breil amont	2007	43	ROYEDF	L109	T11652-T11701
13	TCC amont	2017	30	ROYEDF2	X09	Moulis
14	TCC Breil aval	2007	48	ROYEDF	L110	T11702-T11751
15	TCC aval	2017	29	ROYEDF2	X10	Moulis
16	pisciculture Roquebillière	2008	28	GSALM2	L156	T13061-T13090
17	pisciculture Roquebillière	2017	28	ROYEDF2	X11	Moulis
18	pisciculture Soueich	2017	30	ROYEDF2	X12	Moulis

Tableau 1 : Détail des échantillons analysés, d'amont en aval. En jaune les échantillons de 2007 et 2008; en blanc les échantillons de 2015-2016-2017; en gris les échantillons domestiques.

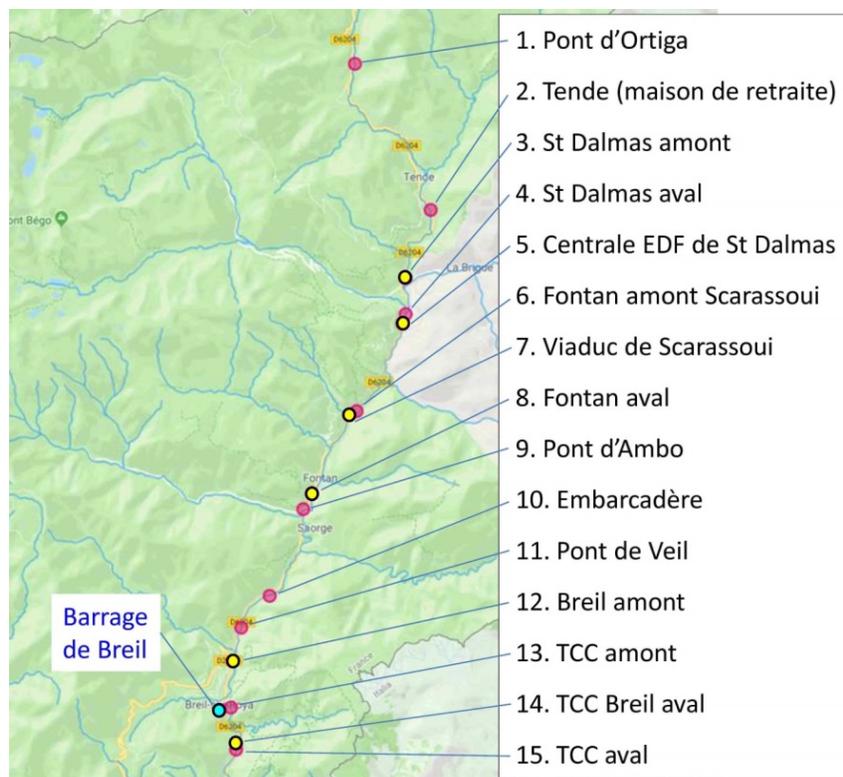


Figure 1 : Positionnement géographique des stations du lit de la Roya retenues pour l'analyse, échantillonnées en 2007 (ronds jaunes) et entre 2015 et 2017 (ronds roses).

Certains marqueurs accumulent un nombre important d'échecs d'amplification (= données manquantes). Les SNPs dépassant 10% de données manquantes ont été éliminés. De même, les individus présentant plus de 10% de données manquantes ont été retirés des calculs. C'est ce qui explique les tailles d'échantillons inférieures au nombre de tissus disponibles au Tableau 1.

Ces disparités ont nécessité des analyses statistiques doubles, basées sur deux matrices:

- une **matrice A** présentant un maximum de SNPs (ici 161 SNPs pour 399 truites dans 13 stations)
- une **matrice B** avec un maximum de stations (ici 18 stations pour 539 truites sur 143 SNPs).

3. Les méthodes moléculaires

Les marqueurs génétiques utilisés proviennent d'une carte génétique de la truite commune, créée par Leitwein et al. (2016) dans laquelle sont identifiés et cartographiés sur le génome de la truite plus de 190000 marqueurs SNPs répartis sur environ 48000 RAD (segments d'ADN découpés par des enzymes).

Parmi ces marqueurs, 192 SNPs ont été retenus pour les analyses de la thèse Saint-Pé et publiés (Saint-Pé et al. en prep.), mais des essais avec des nombres variables de marqueurs ont été faits.

Le génotypage a été réalisé par la méthode KASPAR (laboratoire privé LGC Genomics) donnant environ 6% d'échec (analyses faites pour le CNRS sur des tissus de 2014 à 2017) ou 4% (analyses faites pour Genome-R&D sur des tissus de 2007-2008). Les causes de ces échecs (amplifications avortées) sont soit de mauvaises définitions des amorces (quand un SNP présente

beaucoup plus d'échecs que la moyenne), soit à des ADN de mauvaise qualité (qualité du tissu ou de l'extraction, quand un individu présente beaucoup plus d'échecs que la moyenne).

4. Les méthodes statistiques

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

- *L'analyse multidimensionnelle* permet de positionner sur un graphique chaque truite en fonction de ses caractéristiques génétiques (génotype). La méthode choisie est l'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) traitée avec le logiciel GENETIX (Belkhir et al. 2004). Les regroupements de points (= truites) sur le graphique, appelés "nuages", correspondent aux différentes lignées présentes dans l'échantillonnage global. C'est une exploration des données moléculaires permettant de détecter rapidement les lignées et leur éventuelle hybridation.

- *L'analyse d'assignation* permet de découper l'échantillonnage global en sous-groupes représentant 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 échantillon et de chaque truite (= taux d'hybridation). L'analyse d'assignation est faite avec le logiciel STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). Le nombre objectif de sous-unités est suggéré selon la méthode d'Evanno et al. (2005) par le logiciel d'aide à la décision STRUCTURE HARVESTER (Earl & von Holdt 2012) disponible sur le Web.

- *Les paramètres populationnels* rendent compte de la diversité génétique (une des images de la santé des populations) et de la panmixie (détection des immigrations et perturbations).

5. Résultats

5.1. Exploration des données par AFC

L'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC, Benzécri 1973) est assez peu utilisée dans les publications de génétique des populations, bien qu'elle possède des qualités indéniables. Elle se nourrit d'une matrice disjonctive, ce qui s'adapte parfaitement aux données génétiques alléliques, chaque allèle constituant naturellement une variable.

Afin de concentrer les données et de pouvoir utiliser le logiciel GENETIX qui fournit de nombreuses options pratiques, les 161 (matrice A) ou 143 (matrice B) SNPs ont été classés par ordre d'efficacité dans la distinction de la lignée sauvage Roya vis à vis des deux lignées domestiques (atlantique et méditerranéenne). Pour cela, le logiciel WHICHLOCI (Banks et al. 2003) a été employé. Les 60 premiers SNPs sont retenus.

La matrice B est utilisée afin de pouvoir analyser les 18 échantillons du Tableau 1. Chaque échantillon peut y être retrouvé, mais le but est surtout de déterminer les 3 lignées en jeu (Figure 2): la lignée naturelle méditerranéenne Roya, flèche verte en haut à droite, et les deux lignées domestiques atlantique (flèche noire à gauche) et méditerranéenne (flèche verte en bas). Cette diversité peut être représentée de façon plus synthétique grâce aux analyses d'assignation qui suivent et qui ont l'avantage de pouvoir chiffrer en pourcentages la composition de chaque échantillon et de chaque individu.

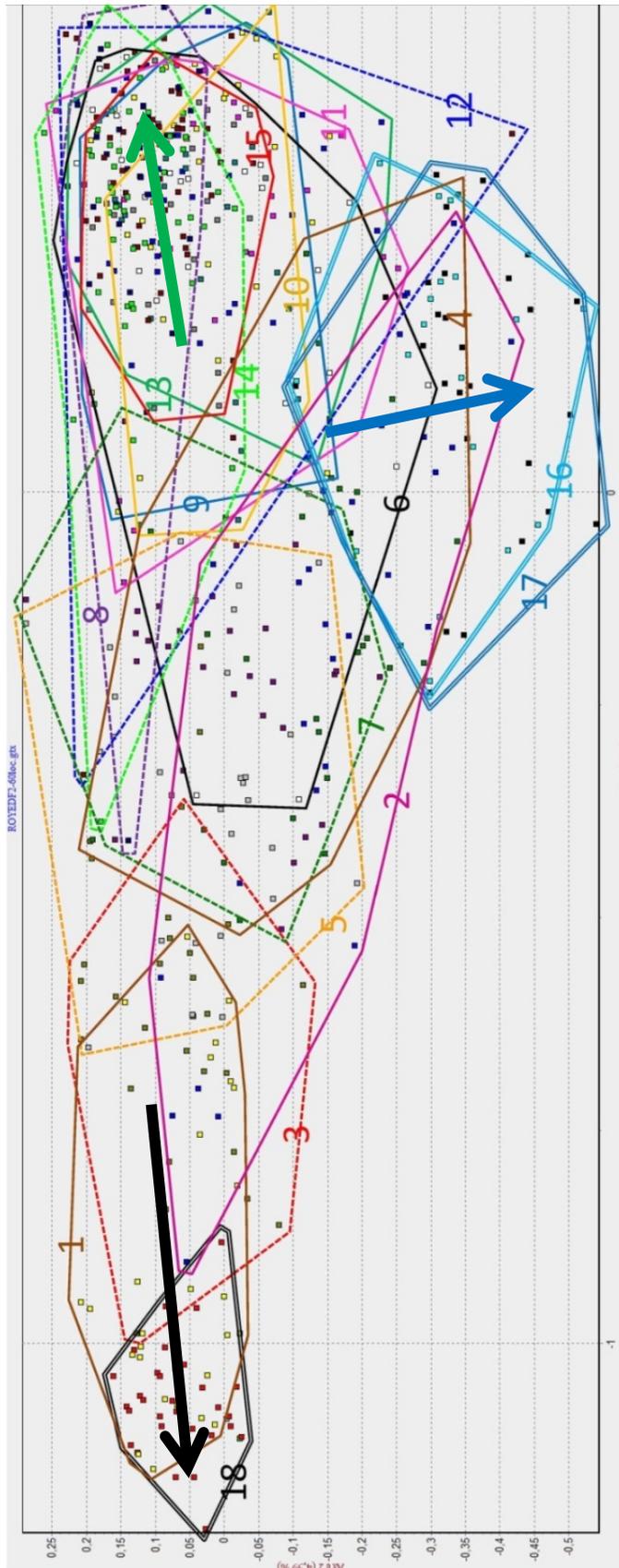


Figure 2: Cette figure a pour but de montrer l'organisation globale des truites analysées. Cette AFC positionne surtout des truites de rivière, mais aussi trois échantillons de pisciculture (polygones à traits doubles). D'autre part, les échantillons de rivière comportent des captures de 2007 (polygones en pointillés) et des captures de 2015-2017 (voir le Tableau 1 pour plus de détails).

Les chiffres sont ceux de la première colonne du Tableau 1 et figurent dans la carte de la Figure 1 (sauf les piscicultures).

5.2. Chiffage par assignation

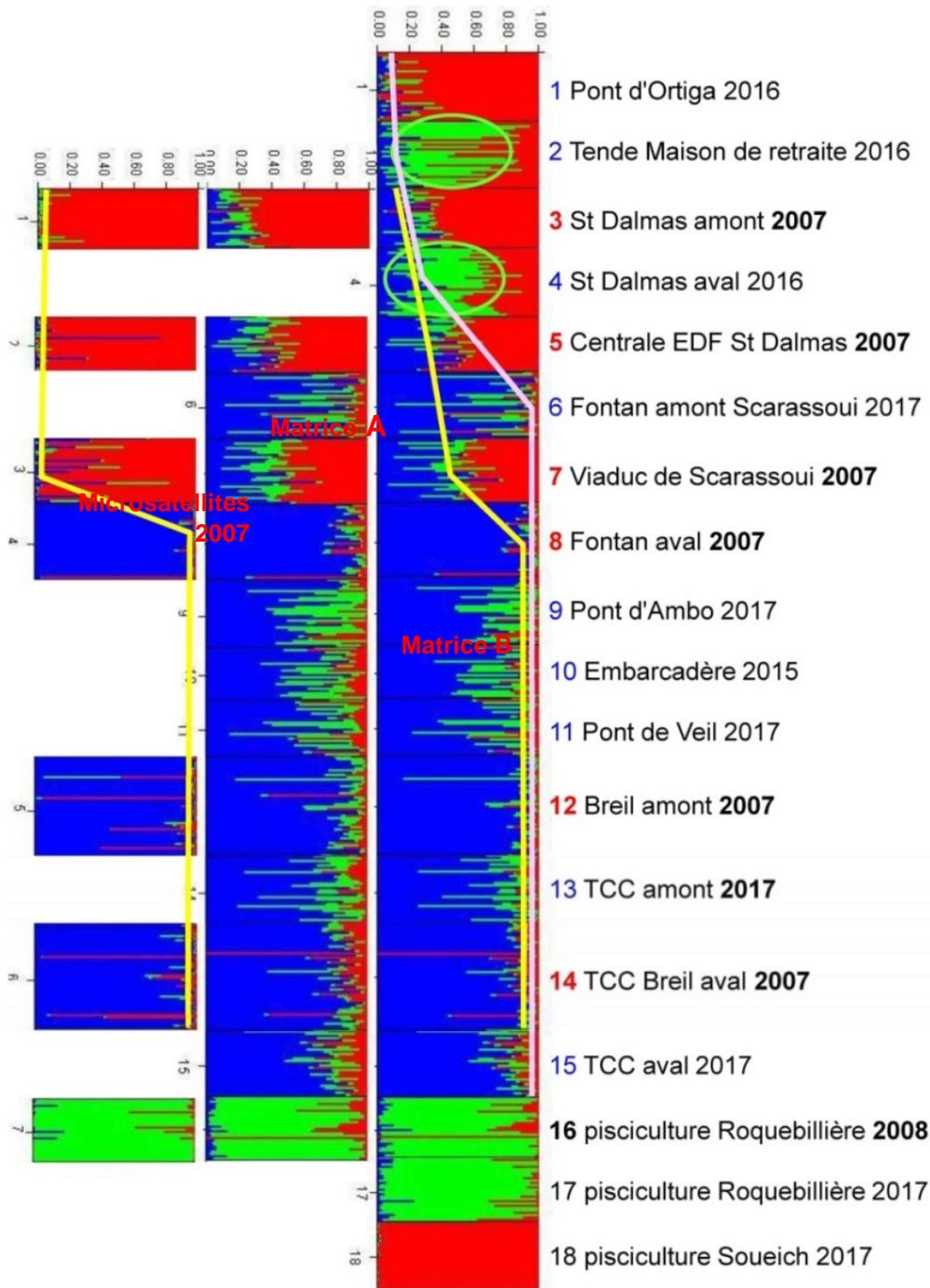


Figure 3: Synthèse des analyses d'assignation: à gauche sur données microsatellites des échantillons de 2007, au centre sur données SNPs de la matrice A (161 SNP, 13 stations) et à droite sur données SNPs de la matrice B (143 SNP, 18 stations). La ligne jaune représente le taux de présence sauvage (souche Roya) en 2007 et en rose en 2015-2017. Les ellipses vertes montrent des introductions tardives et localisées de truites domestiques de Roquebillière.

Le logiciel STRUCTURE a été appliqué successivement aux deux matrices A et B, pour K (nombre de sous-groupes) allant de 1 à 6. Chaque test (ou "run") comporte 100000 "burn'in" (apprentissage sans enregistrement) suivis de 200000 itérations prises en compte pour le découpage final. Les runs sont répétés 5 fois à la recherche d'un découpage majoritaire. L'aide à la décision (logiciel STRUCTURE HARVESTER) aboutit, pour les deux matrices, à considérer K=2 comme la partition la plus sûre, suivie de K=3. Par contre, K=4 est considéré comme sans intérêt, comme les valeurs supérieures à 4. Les résultats présentés à la Figure 3 comparent la meilleure partition pour la matrice A et la matrice B avec K=3, niveau de partition tenant compte de l'aide à la décision, mais aussi des connaissances en biologie de la truite afin de distinguer entre méditerranéennes naturelles et domestiques. Ils permettent aussi de tester l'effet de la réduction du nombre de SNPs (161 et 143 = matrices A et B). Cet effet étant négligeable, c'est le découpage de la matrice B qui est présenté au Tableau 2.

N° sur carte	Station sur la Roya	Année de capture	Lignée Roya	Lignée Roquebillière	Lignée domestique atlantique
1	Pont d'Ortiga	2016	6	6	87
2	Tende Maison de retraite	2016	12	51	37
3	St Dalmas amont	2007	21	11	68
4	St Dalmas aval	2016	19	47	35
5	Centrale EDF St Dalmas	2007	36	12	52
6	Fontan amont Scarassoui	2017	72	18	10
7	Viaduc de Scarassoui	2007	41	16	43
8	Fontan aval	2007	90	4	6
9	Pont d'Ambo	2017	73	21	7
10	Embarcadère	2015	69	21	10
11	Pont de Veil	2017	73	18	9
12	Breil amont	2007	89	8	4
13	TCC amont	2017	74	19	6
14	TCC Breil aval	2007	85	4	11
15	TCC aval	2017	78	11	11
16	pisciculture Roquebillière	2008	5	83	12
17	pisciculture Roquebillière	2017	5	88	8
18	pisciculture Soueich	2017	0	0	99

Tableau 2: Transposition de l'histogramme de droite de la Figure 3 (matrice B réunissant un maximum d'échantillons) sous forme de pourcentages (les valeurs correspondent à la moyenne des 5 "runs" d'assignation). Les couleurs orange et jaune des cellules montrent les lignées dominantes dans chaque échantillon.

5.3. Paramètres populationnels

Diversité génétique et panmixie.

La diversité génétique est considérée comme nécessaire à l'adaptation des populations aux changements écologiques, donc à leur survie. D'autre part, la mesure de la panmixie, qui caractérise une population en équilibre dont tous les membres se reproduisent au hasard, permet

de détecter des immigrations ou des conditions écologiques extrêmes. Ici c'est le paramètre Fis qui est utilisé pour mesurer l'écart à la panmixie.

Le paramètre Hnb (hétérozygotie non biaisée de Nei 1978) est la diversité théorique pondérée par la taille de chaque échantillon. Ce paramètre est considéré comme le meilleur pour mesurer la diversité génétique d'un échantillon. Ho (hétérozygotie observée) est la proportion observée de génotypes élémentaires hétérozygotes par rapport à la totalité des génotypes. Ce paramètre est utile car il représente la réalité des échantillons analysés et son écart par rapport à Hnb est la base du calcul du Fis. Ces paramètres ont été estimés grâce au logiciel GENETIX sur les 60 SNPs les plus informatifs. La significativité des Fis a été mesurée par 5000 permutations d'allèles à l'intérieur de chacun des 18 échantillons.

Globalement ces calculs montrent une diversité près de deux fois plus élevée dans les échantillons de pisciculture et les échantillons de rivière fortement introgressés par les lignées domestiques. Ils montrent aussi des déséquilibres panmictiques rares.

N° sur carte	Station sur la Roya	Année de capture	Hnb	Ho	Fis	signif.
1	Pont d'Ortiga	2016	0,27	0,28	-0,02	ns
2	Tende Maison de retraite	2016	0,44	0,42	0,04	def. *
3	St Dalmas amont	2007	0,39	0,40	-0,02	ns
4	St Dalmas aval	2016	0,43	0,42	0,02	ns
5	Centrale EDF St Dalmas	2007	0,42	0,43	-0,02	ns
6	Fontan amont Scarassoui	2017	0,28	0,28	0,00	ns
7	Viaduc de Scarassoui	2007	0,42	0,44	-0,04	ns
8	Fontan aval	2007	0,22	0,24	-0,06	exc. *
9	Pont d'Ambo	2017	0,24	0,25	-0,03	ns
10	Embarcadère	2015	0,29	0,31	-0,07	exc. *
11	Pont de Veil	2017	0,27	0,28	-0,03	ns
12	Breil amont	2007	0,23	0,23	-0,02	ns
13	TCC amont	2017	0,26	0,26	0,01	ns
14	TCC Breil aval	2007	0,27	0,26	0,04	def. *
15	TCC aval	2017	0,27	0,28	-0,03	ns
16	pisciculture Roquebillière	2008	0,35	0,35	0,02	ns
17	pisciculture Roquebillière	2017	0,33	0,34	-0,03	ns
18	pisciculture Soueich	2017	0,19	0,19	0,01	ns

Tableau 3: Résultats de l'estimation de deux paramètres de diversité génétique (entêtes bleues) et d'un paramètre de panmixie (entêtes saumon). Les cellules orange désignent les échantillons les plus polymorphes. Les déséquilibres panmictiques significatifs sont désignés soit par des cellules vertes (déficits en hétérozygotes), soit grises (excès d'hétérozygotes).

Différentiation inter-échantillons. Cette quantité est mesurée ici par les Fst et leur significativité est estimée par 5000 permutations d'individus entre échantillons. Il apparaît que la majorité des comparaisons montre des différenciations hautement significatives (cellules saumon du Tableau 4). Une zone plus homogène (cellules blanches, beiges et du Tableau 3) correspond à l'aval de la Roya peuplée de truites naturelles en grand majorité: à l'aval de la station 8 en 2007 mais à l'aval de la station 6 en 2017 (la station 7 est passée de la frontière domestique/sauvage à la zone sauvage... voir le chapitre Discussion).

Station sur la Roya			Anné e de	N° sur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Pont d'Ortga			2016	1	0	0,27	0,08	0,29	0,18	0,53	0,25	0,59	0,57	0,52	0,54	0,60	0,56	0,54	0,55	0,44	0,47	0,05
Tende Maison de retraite			2016	2		0	0,10	0,00	0,03	0,13	0,02	0,21	0,17	0,13	0,14	0,21	0,17	0,17	0,15	0,05	0,07	0,37
St Dalmas amont			2007	3			0	0,12	0,04	0,34	0,08	0,41	0,39	0,33	0,35	0,42	0,37	0,36	0,36	0,27	0,30	0,15
St Dalmas aval			2016	4				0	0,04	0,11	0,02	0,18	0,15	0,10	0,12	0,18	0,14	0,15	0,13	0,05	0,06	0,39
Centrale EDF St Dalmas			2007	5					0	0,20	0,02	0,27	0,24	0,19	0,21	0,28	0,24	0,23	0,21	0,15	0,18	0,28
Fontan amont Scarassoui			2017	6						0	0,15	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,63
Viaduc de Scarassoui			2007	7							0	0,20	0,18	0,13	0,15	0,21	0,17	0,17	0,15	0,10	0,12	0,35
Fontan aval			2007	8								0	0,02	0,02	0,02	0,010	0,02	0,008	0,01	0,18	0,18	0,68
Pont d'Ambo			2017	9									0	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,13	0,13	0,67
Embarcadère			2015	10										0	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,10	0,10	0,63
Pont de Veil			2017	11											0	0,01	0,01	0,01	0,00	0,10	0,10	0,64
Breil amont			2007	12												0	0,01	0,007	0,00	0,17	0,17	0,68
TCC amont			2017	13													0	0,02	0,01	0,12	0,12	0,65
TCC Breil aval			2007	14														0	0,00	0,15	0,15	0,63
TCC aval			2017	15															0	0,12	0,12	0,64
pisciculture Roquebillière			2008	16																0	-0,01	0,54
pisciculture Roquebillière			2017	17																	0	0,57
pisciculture Soueich			2017	18																		0

Tableau 4: Mesure de la différenciation génétique entre échantillons (*Fst*). Les cellules saumon désignent des différences hautement significatives (***), tandis que les cellules blanches montrent les différences non significatives (les deux échantillons comparés peuvent alors être considérés comme appartenant à la même population). Les cellules en jaune correspondent à des différences significatives à $p > 0.99$ (**) et en beige à $p > 0.95$ (*) entre les échantillons pris en compte. Seules les cellules en saumon restent significatives après correction de Bonferroni.

6. Interprétation et Discussion

6.1. Evolution de la composition génétique après 10 ans le long de la Roya

2007. Les échantillons de 2007 répartis sur 6 stations le long de la Roya, analysés alors par microsatellites (Berrebi & Dubois 2008) ont été ré-analysés ici par assignation (la méthode n'avait pas été utilisée en 2008). Le transect génétique de la Roya, présenté Figure 3 à gauche, montre deux zones: (i) en 2007, l'amont était essentiellement peuplé de truites domestiques atlantiques depuis la confluence du Riou de Coué, en amont de St Dalmas (station 3) jusqu'au Viaduc de Scarassoui (station 7) et (ii) à l'aval, la rivière était peuplée essentiellement de truites locales (89 à 94%), dites de lignée Roya méditerranéenne, du moins entre la station 8 (entre les confluences des vallons de Pèvé et de Caïros, à l'aval de Fontan) et l'aval de Breil (stations 14). Le segment de rivière entre les stations 7 et 8 était donc le lieu d'une transition brusque (d'après les microsatellites) entre populations domestiques et sauvages (Figure 3, ligne jaune à gauche). La centrale hydroélectrique de Fontan et le village de Fontan peuvent constituer des obstacles d'ancrage de la transition.

La ré-analyse par SNP des mêmes échantillons de 2007 confirme la localisation de cette zone de transition, **entre les stations 7 et 8** (ligne jaune au centre de la Figure 3), mais la transition apparaît beaucoup plus douce, formant un cline plutôt qu'une frontière brusque (passage de 21 à 41% de la lignée Roya entre les stations 3 et 7, puis passage à environ 90% entre les stations 8 et 14). La zone de transition domestiques-sauvages se situe bien entre les stations 7 et 8 d'après les marqueurs SNPs.

2015-2017. Les stations analysées pour la thèse Saint-Pé sont nombreuses. Celles choisies pour la présente étude doublent au plus près les stations de 2007 et s'étendent, dans le lit de la Roya, plus en amont qu'en 2007. Ici aussi, on observe un contraste de présence domestique en

amont et sauvage en aval. Cependant, la zone de transition s'est déplacée: elle est remontée **entre les stations 4 et 6** (ligne rose de la Figure 3). La lignée domestique atlantique domine à la station 1 (87%), laisse la place à la lignée domestique méditerranéenne de Roquebillière aux stations 2 et 4 (environ 50%, la souche domestique atlantique y étant présente à environ 35%). Puis, à partir de la station 6, c'est la lignée naturelle Roya qui domine jusqu'en aval de Breil (environ 75%).

Cette remontée de la limite domestique/sauvage de près de 5 km vers l'amont en 10 ans est remarquable. Bien que des analyses beaucoup plus complexes soient nécessaires pour le démontrer, cela ressemble à une zone hybride, ce qui impliquerait que les hybrides domestiques/sauvages soient contre-sélectionnés (Hewitt 1988).

Dans cette tension entre lignées sauvage et domestique atlantique, la présence de la lignée domestique méditerranéenne de Roquebillière obéit à un processus différent: elle est fortement présente surtout aux stations 2 et 4 en 2016 (à environ 50%) mais varie sans logique apparente de 5 à 20% partout ailleurs: c'est la marque de gestions disparates par empoissonnement le long de la rivière. Cette présence de la lignée de Roquebillière s'est amplifiée en 10 ans, passant de 9 à 24% (ou 16% si on ne compte pas les stations particulières 2 et 4). Là encore, c'est la marque de l'évolution des pratiques de gestion dans le temps.

La différence de logique observée entre les impacts domestique atlantique et domestique méditerranéen peut s'expliquer grâce à un résultat obtenu dans la même région lors d'un autre projet de recherche (le projet MERC2, Berrebi et al. 2006). Une hypothèse émise dans cette publication propose que l'amont de plusieurs affluents de la Roya, isolé de l'aval par des ruptures de terrain, ait toujours été stérile en truites. Les repeuplements en truites atlantiques en tête de bassin, même très modestes, ont abouti à 100% de truites domestiques en amont. Cette présence peut expliquer un cline amont/aval par dévalaisons, alors que les repeuplements sporadiques en truites de Roquebillière ne peuvent pas former de cline.

6.2 Impact du barrage EDF de Breil

Selon un rapport récent (Blanchet & Saint-Pé 2018), il n'y a pas d'impact du barrage de Breil et de ses aménagements (tronçon court-circuité, dérivations, travaux...) sur la continuité génétique des peuplements de truites en amont et en aval.

Le second objectif du présent projet consiste à vérifier cette observation:

- en 2007 (comparaison des stations 12 et 14, la station 8 servant de référent très en amont) et
- en 2017 (comparaison de la station 11 opposée à 13 et 15, la station 9 servant de référent très en amont)

La localisation des stations choisies est montrée en Figure 4. La prise en compte de deux stations à l'aval du barrage en 2017 (stations 13 et 15) est motivée par la position particulière de la station 13 (TCC amont) juste à l'aval du barrage mais au droit de la sortie des évacuateurs de crue (Figure 5).

Le calcul des F_{st} nous dit (Tableau 4) que les stations 12 et 14 de 2007, en amont et aval du barrage, étaient faiblement différenciées ($F_{st}=0,7\%$), différence faiblement significative (*). En 2017, le même Tableau 4 présente le même niveau de différenciation entre les stations 11/13 (1%*), un peu plus significatif pour 13/15 (1%***) et non différencié entre les stations 11/15. Les F_{st} montrent donc une faible différenciation, faiblement significative, qui devient non significative si on applique la correction de Bonferroni (prise en compte des tests multiples), confirmant les conclusions de Blanchet & Saint-Pé (2018).

Pour aller plus loin, des méthodes originales sont testées pour mettre d'éventuelles différences en évidence.

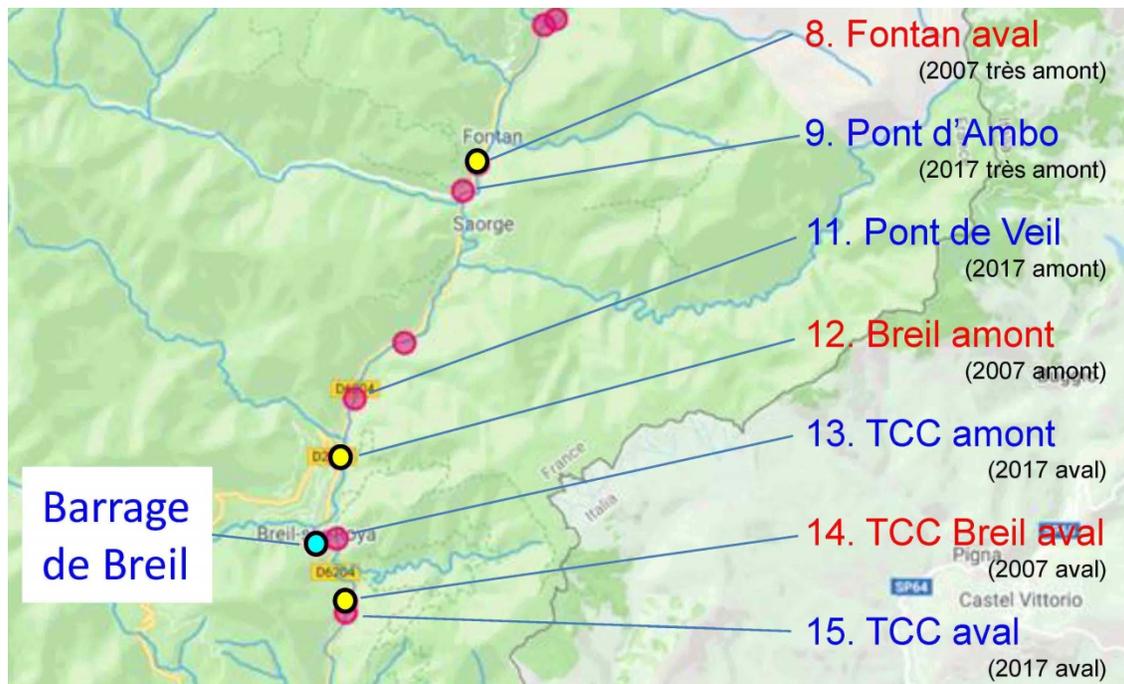


Figure 4: Localisation des stations servant à tester l'impact du barrage de Breil. Les échantillons de 2007 sont en rouge et ceux de 2017 en bleu.



Figure 5: Positionnement de la station 13 (rond rose) et des évacuateurs de crues utilisés comme passage de la Roya pendant la durée des travaux (flèche rouge) par rapport au barrage (flèches bleues).

La stratégie adoptée ici pour forcer les analyses à révéler au mieux l'impact éventuel du barrage de Breil se déroule en deux étapes:

1. Sélectionner les 30 SNP qui diffèrent le plus entre l'amont et l'aval du barrage (méthode WHICHLOCI exposée plus haut), ce qui devrait épurer le signal (si il existe) en éliminant le bruit de fond divergeant;

2. Effectuer des Analyse Factorielles des Correspondances sur les barycentres (centres de gravité) des échantillons de façon à orienter l'analyse sur les différences inter-stations plutôt que sur la diversité génétique globale des échantillons.

Ces analyses, aboutissant à des estimations rigoureusement exactes, limitent les données à celles qui vont dans le sens d'une différence amont/aval. Si aucune différence n'existe entre truites des deux localités comparées, il est impossible que les calculs révèlent des différences qui n'existent pas. Si des différences génétiques sont révélées entre l'amont et l'aval du barrage, deux hypothèses restent valables: ces différences peuvent être dues (i) à l'impact de l'obstacle sur des truites qui ne peuvent pas le franchir ou (ii) à la distance géographique entre l'amont et l'aval du fait de la probabilité que ces truites fréquentent des frayères différentes. C'est le cas, par exemples, des différences significatives avant correction de Bonferroni (Tableau 4) observées entre les stations 8 et 12 de 2007 (1% **), 9 et 11 (1%*) et 13 et 15 (1%***) en 2017.

1. AFC amont-aval du barrage.

2007. Les 161 SNPs de la matrice A ont été classés par ordre d'efficacité à distinguer les truites de l'amont de l'aval de 2007. Les 30 meilleurs marqueurs ont été conservés.

Cette nouvelle matrice A30 a permis de produire la projection d'AFC de la Figure 6 dans laquelle amont (en rouge) et aval (en vert) du barrage sont nettement décalés.

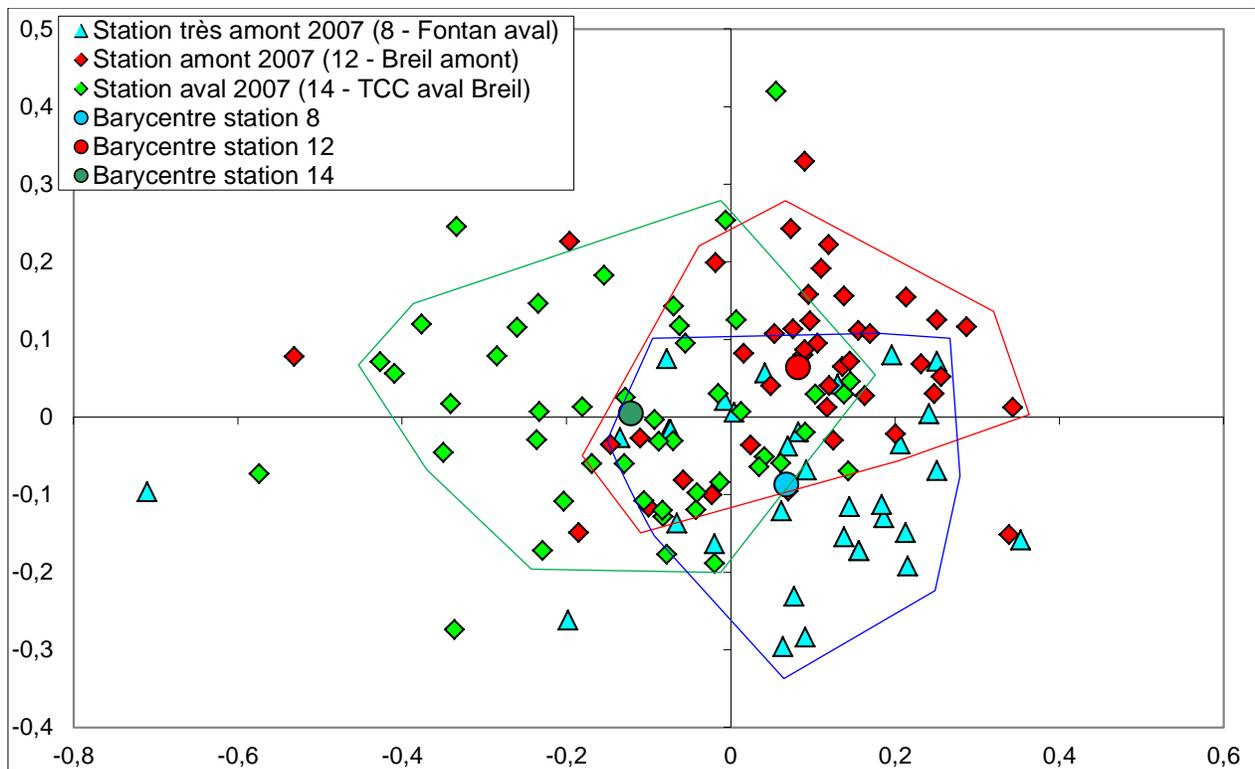


Figure 6: AFC des seuls échantillons 8, 12 et 14 de 2007 basée sur les barycentres (grands ronds). Les polygones renferment 90% des individus (afin d'écarter les génotypes rares).

2017. La même sélection des marqueurs a été effectuée sur les échantillons de 2017. Ce sont 30 SNPs partiellement différents de ceux sélectionnés pour 2007.

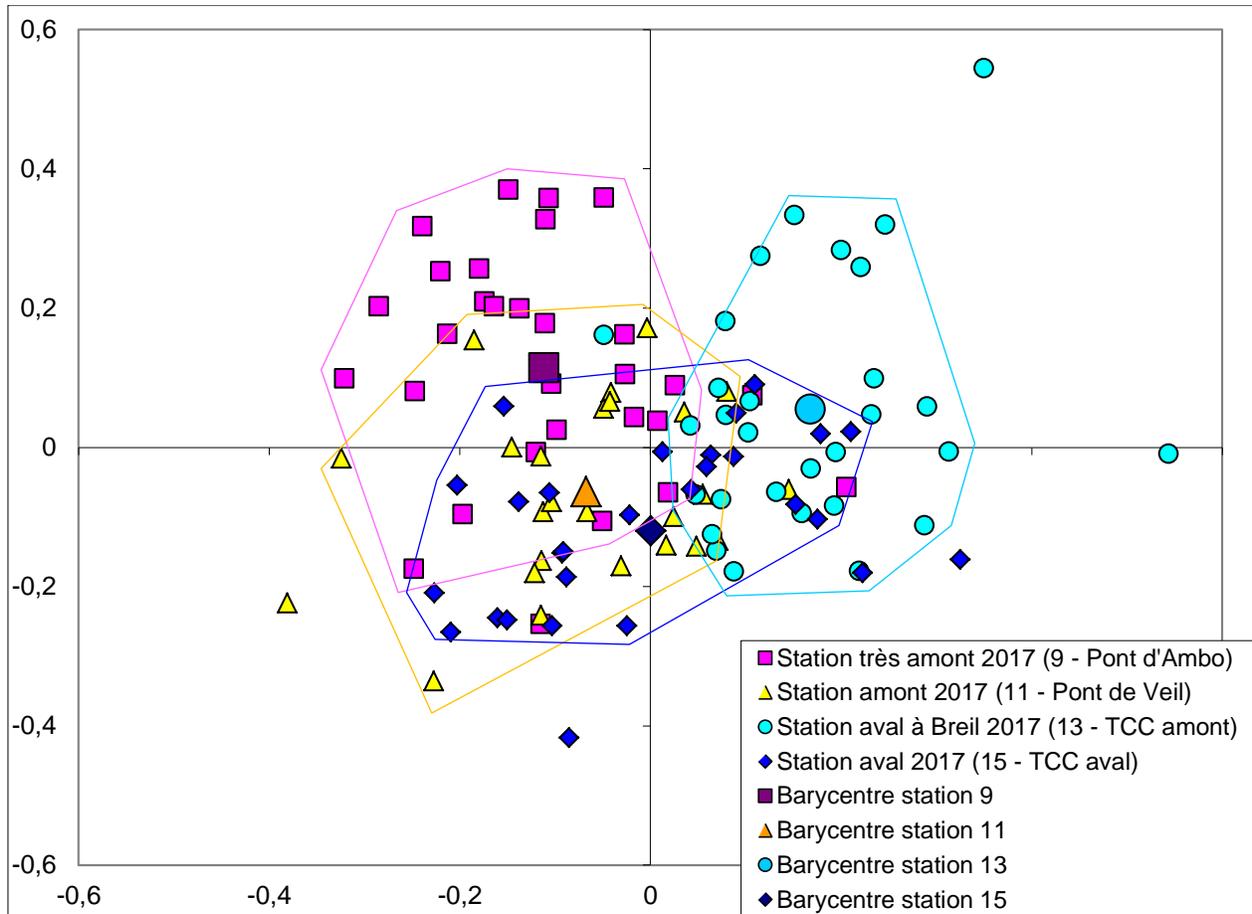


Figure 7: AFC des seuls échantillons 9, 11, 13 et 15 de 2017 basée sur les barycentres (grands signes). Les polygones renferment 90% des individus (afin d'écarter les génotypes rares). Le long de l'axe 1 (le plus informatif) la station 13 s'oppose aux deux autres.

2. Fst.

Les Tableaux 5 et 6 comparent les Fst mesurés entre les 3 ou 4 stations amont/aval du barrage en 2007 et 2017. La station très en amont pour les deux tests sert à relativiser le niveau de Fst de part et d'autre du barrage. Les valeurs à comparer sont les Fst entre la station amont et la (les) station aval.

2007 (Tableau 5). La comparaison amont/aval (stations 12 vs 14), favorisée par la sélection des SNPs, passe de faiblement significative au Tableau 4 (en beige dans le sous-tableau de droite = *) à hautement significative (en saumon, tableau de gauche = ***).

2017 (Tableau 6). La mesure de la différenciation amont/aval (stations 11/13 ou 11/15), favorisée par la sélection des SNPs, ne progresse que très légèrement: la comparaison 11/13 passe de faiblement significatif (en beige, petit tableau de droite = *) à moyennement significatif en jaune dans le tableau de gauche = **).

Station sur la Roya en 2007	Année de capture	N° sur carte	8	12	14		8	12	14
Fontan aval	2007	8	0	0,004	0,009		0	0,010	0,008
Breil amont	2007	12		0	0,015			0	0,007
TCC Breil aval	2007	14			0				0

Tableau 5: Fst calculés entre les trois stations amont-aval du barrage en 2007 sur les 30 SNPs les plus discriminants. A droite, les mêmes comparaisons tirées du Tableau 4, basées sur 60 marqueurs choisis pour discriminer truites sauvages et domestiques.

Station sur la Roya	Année de capture	N° sur carte	9	11	13	15		9	11	13	15
Pont d'Ambo	2017	9	0	0,008	0,029	0,020		0	0,012	0,023	0,026
Pont de Veil	2017	11		0	0,020	0,000			0	0,010	0,004
TCC amont	2017	13			0	0,013				0	0,014
TCC aval	2017	15				0					0

Tableau 6: Fst calculés entre les quatre stations amont-aval du barrage en 2017 sur les 30 SNP les plus discriminants pour les échantillons de 2017. A droite, les mêmes comparaisons tirées du Tableau 4.

La différenciation des populations de truites entre l'amont et l'aval du barrage de Breil est réelle (et visible à l'œil nu: Figures 6 et 7) mais extrêmement faibles (de l'ordre de 1 à 2% de Fst). Cette différenciation est plus significative en 2007, mais cela peut s'expliquer par le nombre de truites considérées (43 à 48 en 2007, 25 à 30 en 2017). Cela peut aussi s'expliquer par la modification du site après 2012, la présence de l'écoulement permanent par l'évacuateur de crue entre 2012 et 2015 permettant peut-être un meilleur échange de truites entre amont et aval.

D'autre part, dans la mesure où des Fst significatifs ont été observés entre certaines stations dans la zone aval Fontan (majoritairement de lignée naturelle Roya) en 2017 (comparaisons 9/13 et 9/15, seuls les Fst hautement significatifs *** peuvent être pris en compte après le test de Bonferroni du fait des tirages multiples, Tableau 4) confirmés au Tableau 6, il peut ne s'agir que de l'effet de la distance, tel que détecté par Blanchet (2018) qui décrit un faible isolement par la distance au cours des quatre années d'étude (2014-2017).

Ainsi, parmi les stations non séparées par le barrage, entre les stations 8 et 12 de 2007, il y a environ 7 km et 1% de Fst de différenciation significative ** en employant les 30 SNPs les plus performants; environ 1% non significatifs et 6 km entre les stations 9 et 11 de 2017 et 1,5% significatif ** et 2 km entre les stations 13 et 15 à l'aval du barrage.

7. Principales conclusions

La présente étude de génétique des populations sort un peu de l'ordinaire. En général, ce genre de projet comprend de nouvelles analyses moléculaires pratiquées sur de nouveaux échantillons, produisant forcément de nouveaux résultats.

Ici, à l'opposé, des truites capturées il y a 10 ans sont ré-analysées avec de nouvelles méthodes. Les objectifs sont donc originaux: (i) quelle évolution les truites de la Roya ont subi depuis 10 ans et (ii) est-il possible de trouver un impact du barrage de Breil en 2007 et 2017 tout

en sachant qu'il a été jugée négligeable sur la période récente (2014-2017) (Blanchet & Saint-Pé 2018).

(i) Evolution sur 10 ans.

La structure longitudinale des peuplements de truites de la Roya n'a pas fondamentalement changé: dominance domestique en amont, dominance sauvage méditerranéenne à l'aval. Cependant, la limite entre les deux zones est remontée de 5 km au bénéfice des truites sauvages, suggérant l'existence d'une zone hybride de tension mobile.

En 2017, la détection de truites domestiques méditerranéennes de Roquebillière est nettement supérieure par rapport à 2007, dans deux stations, mais pas dans les autres.

Ces deux aspects sont probablement les conséquences de changements de gestion: baisse des introductions de truites domestiques atlantiques en amont et augmentation d'introductions sporadiques de truites domestiques méditerranéennes.

(ii) Impact du barrage de Breil

Plusieurs méthodes statistiques imbriquées ont essayé de mettre en relief l'effet perturbateur du barrage de Breil en l'amplifiant. Cet effet, assez faible, est observable les deux années, peut-être plus nettement en 2007 qu'en 2017. Toutefois l'impact du barrage sur la continuité des populations de truites n'est qu'une hypothèse: la simple distance le long de la rivière est aussi une explication plausible. Rien ne permet donc, à partir des données produites dans le présent travail, d'affirmer que le barrage de Breil fragilise, d'un point de vue génétique, les populations de truites.

Fait à Montpellier le 17 décembre 2018

7. Références bibliographiques citées

- Banks MA, Eichert W, Olsen JB. 2003. Which genetic loci have greater population assignment power? *Bioinformatics Applications Note* 19: 1436-1438.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Bonhomme F. 2004. GENETIX 4.05: logiciel sous Windows pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Population, CNRS-UPR, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Benzécri JP. 1973. L'analyse des données. Dunod, Paris.
- Berrebi P, Lasserre B, Dubois S. 2006. Structure génétiques de 10 populations de truites du Parc National du Mercantour, marqueurs microsatellites. Rapport final - novembre 2006: Université Montpellier 2. 26p. ([MERC2](#))
- Berrebi P, Dubois S. 2008. Etude génétique des truites de la Roya - Rapport final de janvier 2008: Rapport d'étude pour EDF, Université Montpellier 2. 15p. ([ROYEDF](#))
- Berrebi P., Cherbonnel C. 2009. Cartographie génétique des populations sauvages de truites françaises - Programme GENESALM - tome 1 - version du 15 décembre 2009. 22p. ([GSALM2](#))
- Blanchet S. 2018. Etude de la structuration génétique des populations de truites fario (*Salmo trutta*) du Thaurion (23) et de la basse Roya (06). Approches spatiales et temporelles: Rapport d'étude pour le LNHE d'EDF. 16p.
- Blanchet S, Saint-Pé K. 2018. Quantification in situ des mouvements de truite fario commune: l'apport des outils moléculaires - Résultats préliminaires des analyses génétiques sur le bassin de la Roya: Rapport d'analyse pour la R&D d'EDF et l'AFB. 10p.
- Earl DA, von Holdt BM. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Hewitt GM. 1988. Hybrid zones - Natural laboratories for evolutionary studies. *TREE* 3: 158-167.
- Leitwein M, Gagnaire P-A, Desmarais E, Guendouz S, Rohmer M, Berrebi P, Guinand B. 2016. Genome-wide nucleotide diversity of hatchery-reared Atlantic and Mediterranean strains of brown trout *Salmo trutta* compared to wild Mediterranean populations. *Journal of Fish Biology* 89: 2717-2734.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Saint-Pé, K., Leitwein, M., Gagnaire, P.-A., Tissot-Rey, L., Poulet, N., Berrebi, P., Barillier, A., Lascaux, J., Blanchet, S. (en préparation). A low density SNP array for brown trout (*Salmo trutta*) population genetics.