

Analyse génétique de deux échantillons de truites de la Cère (Corrèze et Lot)

Rapport de novembre 2008



Truite n°20 présentant la robe typique de la Cère (© Cincle, Cournon d'Auvergne)

*Institut des Sciences de l'Evolution
UMR5554 CNRS/UM2*

Statistiques et rédaction : **Patrick Berrebi**, Dir. de recherche CNRS

Analyses bio-moléculaires : **Zhaojun Shao**, stagiaire post-doctoral

1. Introduction

Une analyse génétique des truites de la Cère a été demandée par EDF, dans le cadre du renouvellement de concession des aménagement de Lamativie et de Laval de Cère II (correspondante Laurence Lissalde Bonnet, EDF CIH Toulouse, service Environnement et Société).

Cette rivière de 120 km coule du Parc Naturel Régional des Volcans d'Auvergne, traverse les Monts du Cantal, passe près d'Aurillac et de Laroquebrou, puis forme des gorges dans la Xaintrie. Enfin elle se jette dans la Dordogne à l'aval de Bretenoux.

Deux stations ont été échantillonnées le 27 septembre 2008 par pêche électrique par le bureau d'étude "Cabinet d'INGénierie et de Conseil Limagne Environnement" (Cincle, correspondant Vincent Michel) situé à Cournon d'Auvergne. Les deux stations (une nommée amont, l'autre aval) sont situées dans le TCC (tronçon court-circuité) de Laval de Cère 1, dans les gorges de la Cère, entre le barrage de Camps à l'amont, et le seuil de Marconcelles à l'aval (figures 1 et 2). Les échantillons sont parvenus à l'Université Montpellier 2 le 1er octobre 2008.

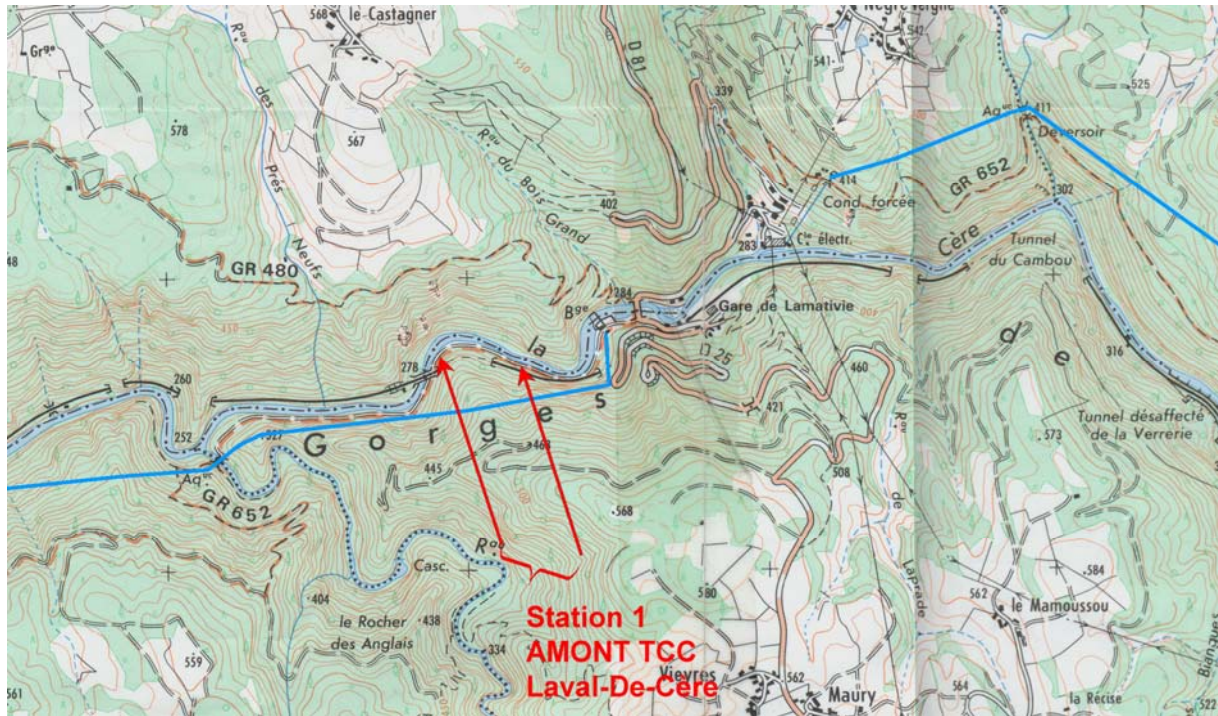


Figure 1: Localisation de la station amont (schéma Cincle), située sur les communes de Camps-Saint Mathurin-Leozabel (19) en rive droite et de Lamativie (46) en rive gauche. Le linéaire pêché mesure environ 315 m, et est localisé sur le fond IGN 1/25000 issu de la feuille 22360 "St Cère". Trente truites de 94 à 342 mm ont été capturées en 2 heures.

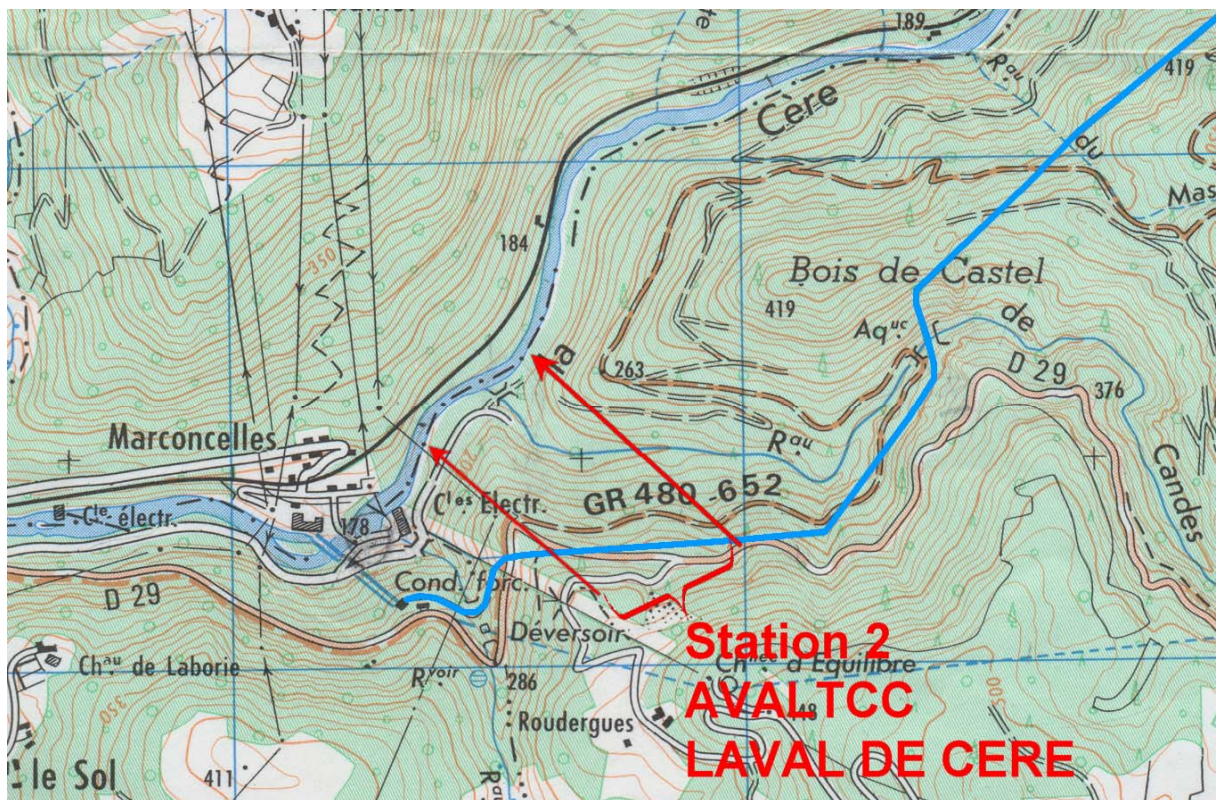


Figure 2: Localisation de la station aval (schéma Cincle) concerne les communes de Camps-Saint Mathurin-Leozabel (19), en rive droite et de Comiac (46) en rive gauche. Le linéaire pêché mesure environ 300 m, et est localisé sur le fond IGN 1/25000 issu de la feuille 2236E "Sousceyrac". Trente trois truites de 91 à 270 mm ont été capturées en 2h20.

2. Analyses moléculaires

Les analyses moléculaires ont été effectuées par Zhaojun Shao, en stage post-doctoral à l'Université Montpellier 2, à l'Institut des Sciences de l'Evolution. Les analyses statistiques et le présent rapport ont été réalisés par Patrick Berrebi.

Les microsatellites sont des marqueurs hypervariables de l'ADN nucléaire sensibles à l'isolement. Ainsi, si deux populations de truites se trouvent séparées pendant une longue période, et surtout si elles ont subi des conditions écologiques très divergentes, leur composition génétique tend à diverger sous l'effet de la dérive (aléatoire) et de la sélection (adaptation au milieu). Il s'agit donc de décompter les variants (allèles) présents dans chaque échantillon. Toute différence de leur fréquence correspond à un isolement.

Techniquement, un très petit bout de nageoire caudale inférieure (2x2mm) est dégradé par la protéinase K et l'ADN ainsi libéré stabilisé par la méthode du Chelex. Ces extraits d'ADN font ensuite l'objet d'amplifications (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) pour synthétiser certaines zones de l'ADN : les microsatellites. Ces zones sont composées de la répétition (de 5 à 50 fois...) de 2 ou 4 nucléotides et c'est le nombre de répétitions, donc la longueur des molécules amplifiées, qui varie à cause des mutations.

Après PCR, les fragments d'ADN amplifiés sont mis à migrer sous l'action de l'électricité dans des gels d'acrylamide. Les molécules se décalent en fonction de leur longueur. Un scanner de gels permet enfin de "lire" les gels, c'est à dire de donner la composition en allèle de chaque truite : c'est le génotypage. Chaque génotype est composé de deux allèles, celui provenant de la mère et celui provenant du père de la truite analysée.

Dans notre cas, huit locus microsatellites sont analysés : Ssa197, Omm1105, Oneµ9, Omy21, SsaSL-311, Sfo1, MST543 et MST85. Le choix de ces marqueurs découle de la précision voulue pour l'analyse (8 marqueurs donnent des résultats de grande précision) et des possibilités de comparaison avec des données déjà disponibles au laboratoire (on ne peut comparer que des analyses réalisées sur les mêmes marqueurs: ici des truites de piscicultures analysées dans le cadre du projet GENESALM, qui est remercié ici).

Les analyses consistent donc à produire dans un premier temps un tableau (ou matrice) de génotypes (8 locus x 63 truites; voir Annexe 3) qui sera ensuite traité statistiquement pour l'interprétation.

3. Analyses statistiques

L'analyse statistique de la composition génétique de ces échantillons passe par plusieurs étapes.

Etape 1 - L'analyse statistique la plus adaptée à l'interprétation globale des données est l'AFC (Analyse Factorielle des Correspondances). Cette analyse multidimensionnelle effectuée par le logiciel GENETIX, permet de positionner chaque truite sur un graphique en fonction de la totalité de sa composition génétique. Sur le graphique figure 1, plus deux points seront rapprochés, plus les truites qu'ils représentent seront génétiquement semblables. Ainsi, les diverses souches formeront des "nuages" distincts et reconnaissables (bien visibles en ce qui concerne les nuages de "sauvages" à gauche et de "domestiques" à droite).

Etape 2 - La différenciation entre les populations échantillonnées, bien que déjà illustrée par l'étape 1, doit être statistiquement testée par les Fst qui permettent un calcul de

probabilité et donc l'estimation d'un niveau de significativité des différences observées. Ce test est surtout nécessaire pour comparer l'échantillon d'amont à celui d'aval.

Etape 3 - L'analyse permettant de tester l'état de chaque population consiste à calculer plusieurs paramètres tels que:

- les Fis testant la panmixie, c'est à dire le fait que tout individu de la population se croise au hasard avec tout autre. Cette panmixie est perturbée par divers facteurs comme les introductions, l'existence de sous-unités (voire d'espèces distinctes), un effectif de reproducteur trop faible (consanguinité)...

- H_e , l'hétérozygotie ou diversité génique qui dépend de la taille de la population ou du nombre de reproducteurs, mais aussi éventuellement de l'histoire de la fondation de la population avec un possible goulot d'étranglement originel ou accidentel (fait que l'effectif est passé, dans son histoire, par des valeurs de quelques individus reproducteurs seulement).

- A , le nombre moyen d'allèles (ou de mutation) par marqueur.

4. Résultats

4.1. Analyse multidimensionnelle: distinction entre truites sauvages et domestiques

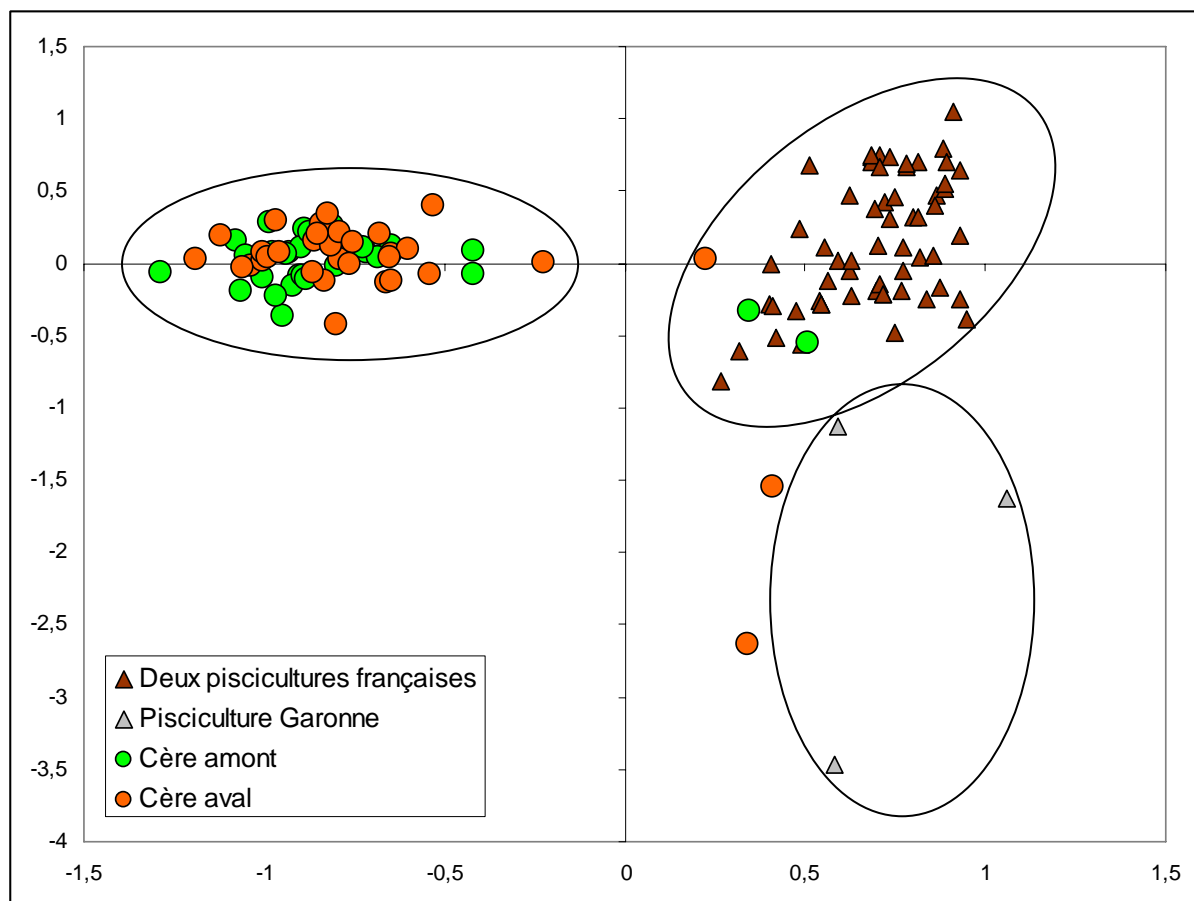


Figure 1: Sur cette AFC (Analyse Factorielle des Correspondances), chaque point représente une truite, positionné en fonction des 16 allèles déterminés par PCR au niveau de 8 locus microsatellites. L'ellipse de gauche englobe l'essentiel des truites de la Cère, bien distinctes des ellipses de droite correspondant aux truites domestiques (en haut deux piscicultures d'autres régions françaises entretenant la souche "INRA" la plus répandue en France, en bas

quelques individus d'une pisciculture servant à des repeuplements dans la Garonne). Il n'y a pas d'hybrides qui seraient situés entre les deux ellipses principales.

Les marqueurs moléculaires n'ont pas eu de mal à distinguer les formes sauvages (à gauche) des formes domestiques (à droite) le long de l'axe 1, horizontal. Toutes ces souches appartiennent à la lignée atlantique.

Pour mesurer le pourcentage d'hybridation, nous avons choisi une méthode simple qui consiste à considérer les poissons de la Cère qui se trouvent dans ou à proximité des ellipses de truites domestiques comme provenant de pisciculture, et les poissons placés entre les ellipses comme hybrides (mais ici il n'y en a pas).

La question de la détection des hybrides est importante. Pour cela, un test d'assignation a été effectué avec le logiciel PartitionML qui attribue à chaque poisson une probabilité d'être sauvage ou domestique. Ici seuls les 5 truites de la Cère placés à droite sont domestiques.

Ainsi, l'échantillon de la Cère amont est constitué de 28 sauvages + 2 domestiques soit 6,7% de présence domestique environ.

L'échantillon aval comprend 30 sauvages + 3 domestiques soit environ 9% de présence domestique.

4.2. Recherche de panmixie

La panmixie est la reproduction au hasard de toutes les truites analysées. Si l'échantillon est composé de truites sauvages et de truites domestiques récemment déversées, il ne peut pas y avoir panmixie puisque tous les individus analysés n'ont pas fait partie de la même reproduction. Si l'introduction est ancienne, il peut y avoir panmixie.

Pour estimer la panmixie, nous utiliserons le paramètre Fis, approché par la méthode de Weir et Cockerham (1984), dont la significativité est estimée par permutations de 5000 matrices reproduisant la panmixie.

Les calculs indiquent que les échantillons amont et aval sont en fort déséquilibre, hautement significatif:

Fis amont = 0,135, $p < 0.01$ (significativité **)

Fis aval = 0,139, $p < 0.0002$ (significativité ***)

Quand on retire les poissons domestiques, la valeur du paramètre baisse (0,123 et 0,128 respectivement) mais le déséquilibre persiste.

4.3. Recherche de différenciation, comparaison de richesse allélique

Peut-on cependant considérer que les deux stations de la Cère peuvent être assimilées à une seule population homogène?

Pour cela, le paramètre Fst est estimé entre les deux échantillons (sans les 5 truites domestiques), et la significativité de ces valeurs est estimée par 5000 permutations.

Les résultats montrent que les deux stations sont statistiquement identiques avec un Fst de 0,004, non significatif.

Le calcul de l'hétérozygotie (qui correspond à la diversité génétique d'un échantillon, ou richesse allélique) montre que la richesse augmente légèrement d'amont en aval:

He ou hétérozygotie calculée passe, d'amont en aval, de 0,718 à 0,756.

A ou nombre moyen de variants (allèles) par marqueur passe de 8,25 à 9,75.

4. Interprétation

L'analyse génétique de deux échantillons d'environ 30 truites provenant du tronçon court-circuité de Laval de Cère, dans les gorges de la Cère, l'un en amont et l'autre en aval, a montré qu'ils étaient essentiellement composés de **truites sauvages**, probablement de la souche naturelle de la lignée atlantique peuplant cet affluent de la Dordogne.

Dans le travail de Lascaux et al. (2002) portant sur la robe des truites de la région, il est signalé *"une opposition très nette entre les positions moyennes [dans les graphiques] des truites des stations du bassin Allier-Alagnon et celles du bassin Lot (sous-bassin Célé et Truyère). Les truites des cours d'eau du bassin versant Dordogne [dont la Cère] ont des positions moyennes intermédiaires [la Cère étant caractérisée par une robe] très peu ponctuées de rouge et bien ponctuées de noir, notamment sous la ligne latérale."*

La **présence de truites domestiques** est démontrée, elles aussi de type atlantique. Il n'y a pas d'hybride entre sauvages et domestiques, malgré leur inter-fertilité connue, montrant que les repeuplements en truites domestiques sont soit très récents (moins d'une génération soit moins de 3-4 ans), soit que les repeuplements anciens n'ont jamais permis aux truites introduites de participer à la reproduction. L'une ou l'autre des hypothèses explique le **peu de présence domestique dans la rivière: entre 6 et 9%**, mais le stock sauvage n'est pas atteint (on dit qu'il n'est pas introgressé): **les deux souches coexistent mais ne se croisent pas**. Cette faible présence a également été notée à partir de la morphologie par Lascaux et al. (2002)

Les truites de la Cère de type domestique (il y en a 5) ont été comparées avec des truites de la souche "INRA" répandue dans la majorité des piscicultures de repeuplement français, mais aussi à une souche d'un type différent, d'une pisciculture dont le nom n'a pas été communiqué, utilisée pour des repeuplements dans la Garonne. Les truites domestiques trouvées dans la Cère se rapprochent des deux types domestiques, mais on ne peut pas l'affirmer (il faudrait analyser la diversité de toutes les piscicultures françaises!).

Il n'y a **pas de différence génétique** (Fst non significatif) entre échantillons amont et aval même si ce dernier est légèrement plus polymorphe. Il n'y a **pas de panmixie** (Fis significatifs), ce qui est fréquemment observé chez la truite dont les premiers stades (0+ et 1+) ne vivent pas avec les adultes provoquant un "effet Walhund", c'est du moins l'hypothèse généralement invoquée (Aurelle & Berrebi, 2002).

En conclusion, les deux échantillons analysés sont homogènes et essentiellement de type naturel.

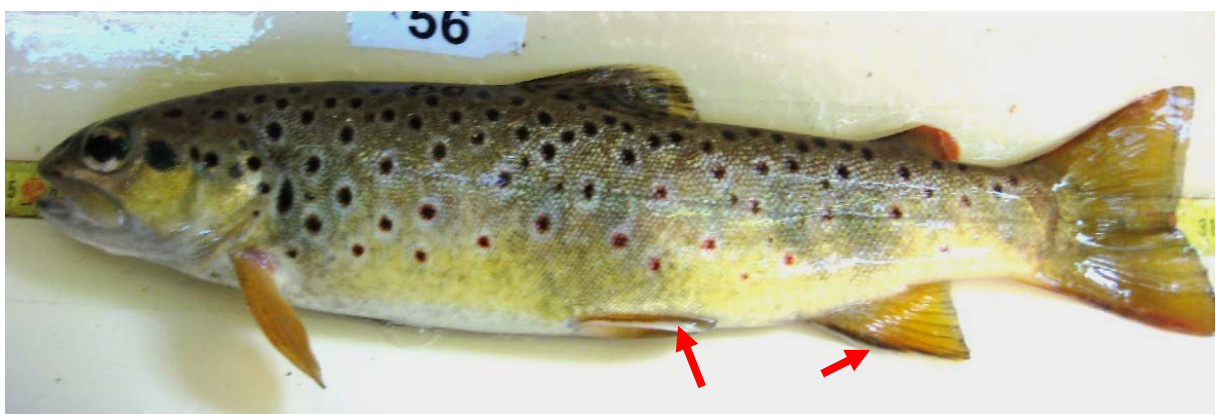
Fait à Montpellier le 14 novembre 2008

Références bibliographiques

- Lascaux J. M., Lagarrigue T. & Firmignac F. (2002) Variabilité de la ponctuation et des caractères ornementaux de la truite commune dans les cours d'eau du Cantal, p. 43, Rapport ECOGEA.
- Weir B. S. & Cockerham C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Aurelle D. & Berrebi P. (2002) Natural and artificial secondary contact in brown trout (*Salmo trutta*, L.) in the French western Pyrenees assessed by allozymes and microsatellites. *Heredity* **89**, 171-183.

Annexe 1: Quelle est la robe typique des truites naturelles de la Cère?

Lors des pêches d'échantillonnage, le bureau d'études Cincle a photographié toutes les truites capturées. Jean Marc Lascaux qui a une vision régionale des types morphologiques après son étude des robes (Lascaux et al., 2002). Bien que les stations qu'il a analysées soient situées plus en amont que celles de la présente étude, il signale (communication personnelle) que la robe typique comporte "des points noirs (plutôt de grande taille) quasiment exclusifs sur un certain nombre de poissons et les points "rouges" lorsqu'ils sont présents sont plutôt grenats foncés (pas de points oranges). Les liserés blancs et noirs sont très nets aux nageoires pelviennes et annales"



Cette description correspond bien aux exemple ci-dessus (respectivement truites 20, 21 et 56): essentiellement des points noirs qui "virent" au grenat vers le bas et vers l'arrière, liserés blanc-noir aux pelviennes et annales (flèches).

Cependant, des exceptions existent:



La truite 9 présente très peu de points noirs et des taches grenat ocellées, tout en étant génétiquement sauvage



La truite 46, également génétiquement sauvage, présente des points oranges.

Mais ce sont des exceptions, et de toute façon la robe domestique est reconnaissable comme la truite 42 ci dessous, née en pisciculture



La truite 42 classée parmi les truites de piscicultures par l'étude génétique, présente de nombreux points rouge-orangés ocellés sur les flancs.

Un problème subsiste pour les jeunes truites comme le montrent les photographies de l'Annexe 2: en dessous de 15 cm, même les truites sauvages de la Cère présentent des points rouges nombreux et ocellés! Comme souvent observé, les jeunes sujets de taxons proches ont tendance à se ressembler (on dit que "l'ontogénie récapitule la phylogénie"). La robe caractéristique apparaîtrait donc surtout chez les adultes.



Annexe 2: Truites domestiques de la Cère (en orange dans l'Annexe 3) à gauche, truites sauvages de la Cère à droite.

n° labo	n° terrain	Ssa197	Omm1105	Oneµ9	Omy21	SsaSL-311	Sfo1	MST543	MST85
T13121	amont01	127135	1098210	201205	094100	126144	106110	152154	167167
T13122	amont02	123127	234270	199203	094096	138152	110110	144144	169169
T13123	amont03	123143	242250	199199	096100	140142	106110	128154	167169
T13124	amont04	127135	170274	201205	106114	138150	116118	148150	147157
T13125	amont05	123143	210270	205205	098098	138140	110110	128152	167169
T13126	amont06	123139	270282	201201	096098	132142	110110	144144	169169
T13127	amont07	000000	250302	199199	096096	142144	110110	126154	000000
T13128	amont08	123139	242278	185203	100100	126138	110110	000000	169169
T13129	amont09	127127	098306	205205	100102	120130	110110	154154	167169
T13130	amont10	123127	210234	203205	096098	140140	110110	154154	167169
T13131	amont11	127127	246270	193199	094100	138140	106110	124126	167167
T13132	amont12	127131	214226	199203	098098	126140	130130	154154	167169
T13133	amont13	135135	234250	201205	094100	140144	106110	152152	169169
T13134	amont14	127135	234302	193199	096096	142144	110110	124144	167169
T13135	amont15	127127	270274	199199	098100	140152	110110	152152	167167
T13136	amont16	131134	094098	199199	096098	138140	098110	144144	167169
T13137	amont17	135139	218246	205205	094096	142142	110110	124124	147167
T13138	amont18	131135	210218	199201	094094	144154	130130	152152	163169
T13139	amont19	131139	218234	199199	094096	140152	110110	118152	167169
T13140	amont20	123127	194242	199201	094096	140144	110110	122144	167167
T13141	amont21	127127	218218	193199	094100	140140	110110	124154	167167
T13142	amont22	123127	210242	185189	094096	124142	106110	144144	169169
T13143	amont23	123127	218234	193199	094100	138140	110110	150154	167169
T13144	amont24	127139	210214	185185	094100	132138	110110	154154	167167
T13145	amont25	127127	194214	199199	094096	140140	110110	144152	167167
T13146	amont26	135135	250258	201201	106122	130136	122136	120148	167167
T13147	amont27	123127	210210	000000	094100	138150	106110	124144	169169
T13148	amont28	127135	234302	199199	096096	140142	106110	154154	167169
T13149	amont29	131135	210254	201205	096100	138142	106110	128154	169169
T13150	amont30	135135	246274	185185	096100	138140	106110	144152	163169
T13151	aval31	127127	242270	199203	094094	126140	110110	124124	163169
T13152	aval32	127127	302302	199203	096100	140140	110110	126126	163169
T13153	Aval33	127135	210234	199201	094096	130148	106118	000000	147167
T13154	Aval34	127135	270270	000000	094096	138142	110110	152152	167169
T13155	Aval35	123131	098242	000000	096098	140141	110110	144144	167169
T13156	Aval36	127143	222314	185203	096098	138144	110110	126126	169171
T13157	Aval37	123123	242250	185199	098098	138142	106110	144154	161169
T13158	Aval38	127131	254302	203207	096100	138140	106110	152152	167167
T13159	Aval39	123127	242246	199201	094096	138140	106110	152154	169169
T13160	Aval40	127131	278314	185199	096098	120140	000000	144154	167169
T13161	Aval41	123139	302342	199203	096096	120140	110110	120120	167167
T13162	Aval42	127135	254258	201205	104106	154156	116132	120148	167171
T13163	Aval43	127135	234310	185185	098108	134140	110122	128128	147163
T13164	Aval44	123127	214302	185187	096098	140142	106130	144152	163167
T13165	Aval45	123135	250294	000000	094094	126142	110110	000000	163169
T13166	Aval46	127131	286302	000000	096100	128128	106110	154154	167169
T13167	Aval47	123123	210210	199203	094098	140152	110110	154154	167169
T13168	Aval48	123143	238278	201201	094098	120140	110110	128154	000000
T13169	Aval49	123131	274278	185185	098098	138140	110110	144144	163167

n° labo	n° terrain	Ssa197	Omm1105	Oneμ9	Omy21	SsaSL-311	Sfo1	MST543	MST85
T13170	Aval50	135135	238302	205211	098100	144152	110110	000000	167169
T13171	Aval51	127127	226254	000000	094096	138138	110110	152154	000000
T13172	Aval52	123131	214274	203203	098100	150152	110110	152154	163169
T13173	Aval53	127127	242270	199203	094094	138138	110110	124152	163167
T13174	Aval54	135143	098098	199203	096100	120152	110128	120120	167167
T13175	Aval55	131135	218218	000000	094098	140142	106110	126126	163167
T13176	Aval56	123127	214242	199199	096100	138138	110110	144152	167169
T13177	Aval57	000000	250254	000000	096098	138140	128128	152152	000000
T13178	Aval58	135143	094222	199199	094096	120140	106130	152154	167167
T13179	Aval59	127131	218274	193211	096098	138138	110110	144144	167169
T13180	Aval60	123123	250306	185185	100106	136142	122130	144144	163167
T13181	Aval61	123139	250254	185199	096096	150166	110110	126126	163169
T13182	Aval62	131135	210286	000000	104106	132132	128156	148152	165171
T13183	Aval63	123127	286318	201201	098106	142150	130130	148148	163167

Annexe 3: Matrice de génotypes des 63 truites de la Cère analysées au niveau de 8 locus. microsatellites. En orange, les truites domestiques trouvées dans la Cère.