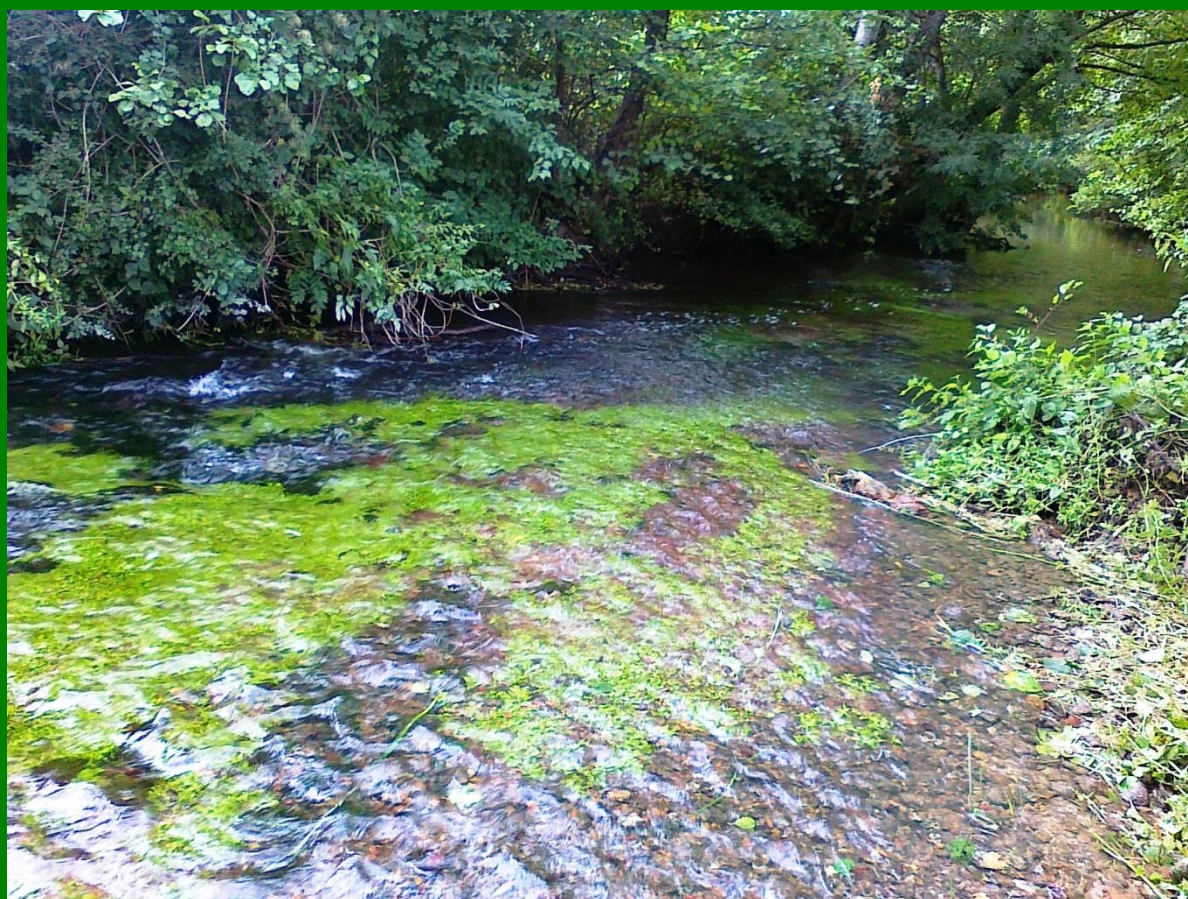


**Analyse génétique des truites de la Cléry,
affluent rive gauche de l'Axe Loing, bassin de la Seine (Loiret),
dans le cadre du programme national Genetrutta**

Projet GT-LOIRET
Rapport de janvier 2013



© FD45

Analyses statistiques, interprétation, rédaction: **Patrick Berrebi**
Analyses moléculaires: **Zhaojun Shao**

* Institut des Sciences de l'Evolution, UMR5554 UM2/CNRS/IRD, Université Montpellier 2, CC065,
place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex, tel: 04 67 14 37 32, patrick.berrebi@univ-montp2.fr

1. Introduction

Cette analyse entre dans le cadre du projet national Genetrutta qui doit, entre 2012 et 2015, établir une carte des lignées génétiques des truites françaises.

La Cléry, bassin de la Seine, axe Loing (affluent rive gauche) est un cours d'eau de nappe avec une des rares populations pérennes de truites dans sud-est du bassin parisien. C'est probablement une des vraies populations de truites sauvages dans la région du Gâtinais souvent peu considérée dans la bibliographie salmonicole française. C'est également sur cet axe que la FD 45 intensifie ses efforts de renaturation et de gestion piscicole depuis 15 ans.

2. Echantillonnage

Les caractéristiques de l'échantillon analysé dans le présent rapport sont détaillées au Tableau 1 et sa localisation à la Figure 1. Les 20 échantillons de nageoires sont parvenus au laboratoire de Montpellier le 18 octobre 2012. Laurent Delliaux est le correspondant de la Fédération de Pêche 45 pour ce projet nommé GT-LOIRET.

En plus de la Cléry échantillonnée en octobre 2012, des échantillons de référence ont été ajoutés: des populations voisines déjà analysées (*Mérantaise, Aulne, Aubette, Yonne, Aujon et Gland*) ainsi qu'un échantillon de truites domestiques commerciales françaises provenant d'une pisciculture de Seine-Maritime (Tableau 1). Le choix de ces stations a dépendu des acquis de l'ISEM: les échantillons locaux déjà analysés aux mêmes 12 marqueurs microsatellites.

N° échantillon	Rivière	Hydrographie	Date	Nbre	N° ISEM truites	N° ISEM échantillon
1	Cléry	Loing/Seine	03/10/2012	20	T24101-T24120	L543
2	Mérantaise	Yvette/Orge/Seine	2012	23	T23153-T23175	L065
3	Aulne	Rémarde/Orge/Seine	2012	16	T23176-T23191	L071
4	Aubette	Epte/Seine	2008	8	T16653-T16660	L252
5	Aujon	Aube/Seine	2011	22	T20301-T20321	L413
6	Yonne	Seine	2011	22	T21500-T21521	L467
7	Gland	Oise/Seine	2011	19	T21585-T21604	L470
8	Pisciculture	Seine Maritime	2008	30	T16956-T16985	L467

Tableau 1 : Caractéristiques des échantillons de truites analysés dans ce rapport (ligne jaune) et des truites de référence servant aux comparaisons dont les truites domestiques atlantiques (en gris).

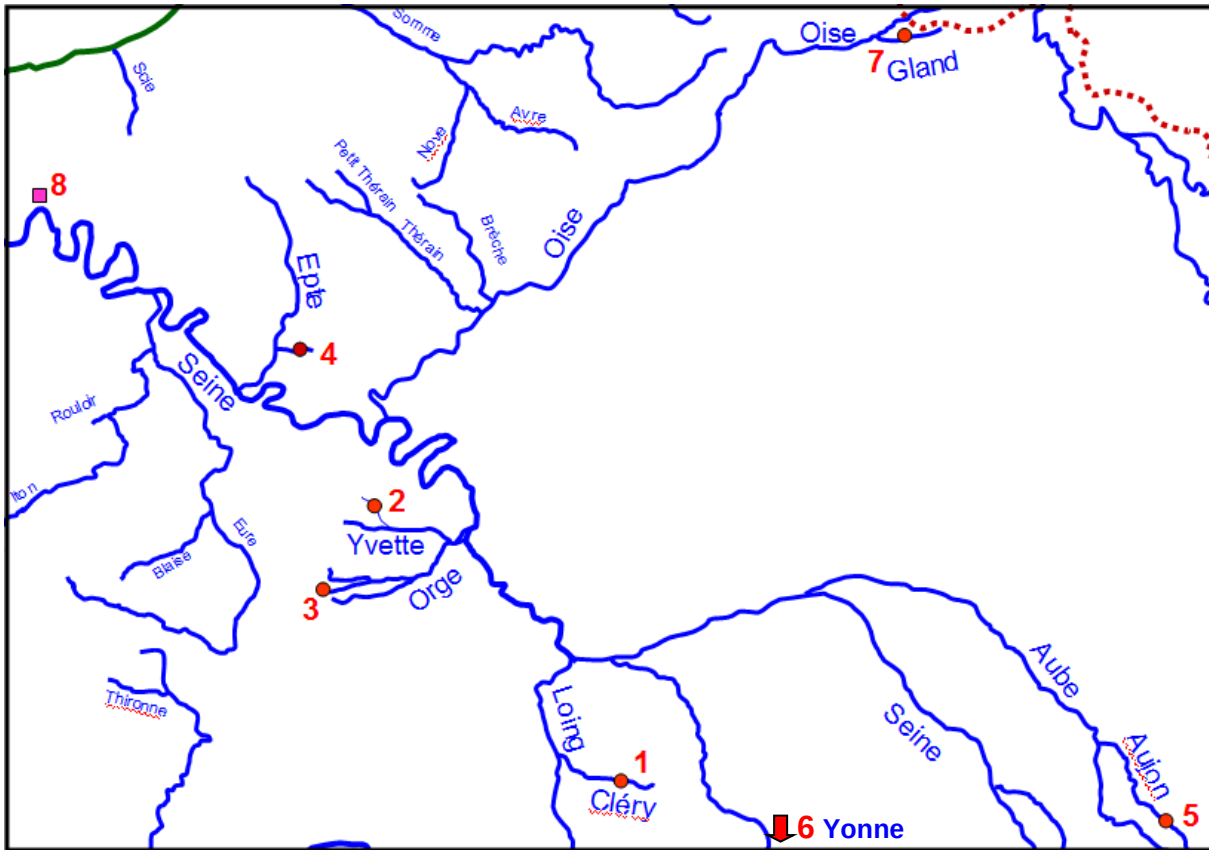


Figure 1 : Positionnement des échantillons analysés et de certains échantillons de référence dans le réseau hydrographique local (voir le Tableau 1 pour la signification des chiffres).

3. Méthode moléculaire

Les morceaux de nageoire de truites prélevés au bord de la rivière et mis immédiatement dans l'alcool peuvent être conservés ainsi plus de 10 années. L'ADN d'un minuscule morceau (1 mm x 2 mm) est **extraît** dans une mixture de protéinase K (détruit les protéines et libère l'ADN) et de Chelex (chélateur des enzymes destructrices naturelles de l'ADN et de certains inhibiteurs) pendant au moins deux heures. Après centrifugation, le surnageant dilué sert d'extrait d'ADN.

Les extraits d'ADN sont rajoutés à un mélange réactionnel (le mix) capable d'**amplifier** le petit morceau d'ADN cible: le marqueur microsatellite (synthèse artificielle de l'ADN cible ou PCR). Le milieu réactionnel se charge alors d'une très grande quantité de fragments d'ADN artificiel cible.

Les variants de longueur des microsatellites (les allèles) sont caractéristiques de chaque truite et sont la base des calculs futurs. Pour les mesurer, ils sont mis à migrer sous un champ électrique dans un gel d'acrylamide (la **migration**) puis scannés. Un analyseur d'image permet de mesurer automatiquement les longueurs des fragments d'ADN, ces mesures sont contrôlées par un technicien expérimenté.

La matrice de génotypes est constituée à partir de ces mesures. Elle constitue la base de toutes les analyses statistiques.

4. Méthode statistiques

Les données moléculaires (génotypes) obtenues, codées, permettent d'établir une matrice. Additionnée de la matrice des échantillons de référence (pour les comparaisons) déjà analysés (voir Tableau 1), la matrice finale permet d'effectuer les traitements statistiques suivants, constitués de trois étapes principales.

L'**analyse multidimensionnelle** (ici une Analyse Factorielle des Correspondances ou AFC effectuée grâce au logiciel GENETIX) produit un diagramme qualitatif où chaque truite est positionnée en fonction de son génotype décrypté pour chaque marqueur microsatellite. Plus deux points sont rapprochés, plus les truites qu'ils représentent se ressemblent génétiquement, plus ils sont éloignés et plus les truites sont différentes. Cela permet de détecter des "nuages" de points correspondant à des lignées génétiques cohérentes permettant de comprendre de quel type sont les truites analysées.

L'**analyse d'assignation** (ici une méthode bayésienne appliquée avec le logiciel STRUCTURE) permet d'assigner chaque truite à un sous-groupe. Ces sous-groupes ne tiennent pas compte de l'origine des truites mais seulement de leurs génotypes. Le point le plus délicat est de savoir combien de sous-groupes (k) sont contenus dans les truites analysées, aussi des essais avec k allant de 2 à 6 ou 10 sont nécessaires. Il faut que la partition ait un sens biologique. Les truites peuvent être assignées à plusieurs sous-groupes (généralement 2) si elles sont hybridées. Cette méthode, plus quantitative, permet de chiffrer avec précision la composition génétique d'un échantillon (par exemple les pourcentages de truites sauvages et domestiques) ou d'une truite hybride.

Une fois les lignées déterminées par les deux précédentes méthodes, les **paramètres populationnels** classiques de la génétique des populations sont calculés pour chaque lignée et chaque station: la diversité génétique (H_o = hétérozygotie observée et H_{nb} = hétérozygotie théorique non biaisée), la panmixie ou probabilité égale de chaque membre d'une population de truite de se reproduire avec tout autre membre de sexe opposé (F_{is}), la différenciation entre échantillon (F_{st}). Les informations biologiques tirées de ces paramètres populationnels sont détaillées dans la discussion.

5. Résultats

5.1 - Analyse multidimensionnelle

L'analyse multidimensionnelle présentée en Figure 2 doit être considérée comme un débroussaillage des données. Elle donne la meilleure représentation des ressemblances et dissemblances entre échantillons de référence et l'échantillon de la Cléry.

Le diagramme nous montre qu'il y a très peu de similitude entre truites de la Cléry et les domestiques commerciales, et que la population de la Cléry est plus proche de celles de l'Aube et de l'Yonne (ce qui est logique: nous sommes dans la moitié amont du bassin), mais aussi de l'Oise. Par contre l'Orge semble bien distincte et l'Aubette est apparemment fortement influencée par la souche domestique nationale (dite INRA-SEMII).

Ces résultats généraux peuvent être précisés par l'analyse d'assignation qui suit.

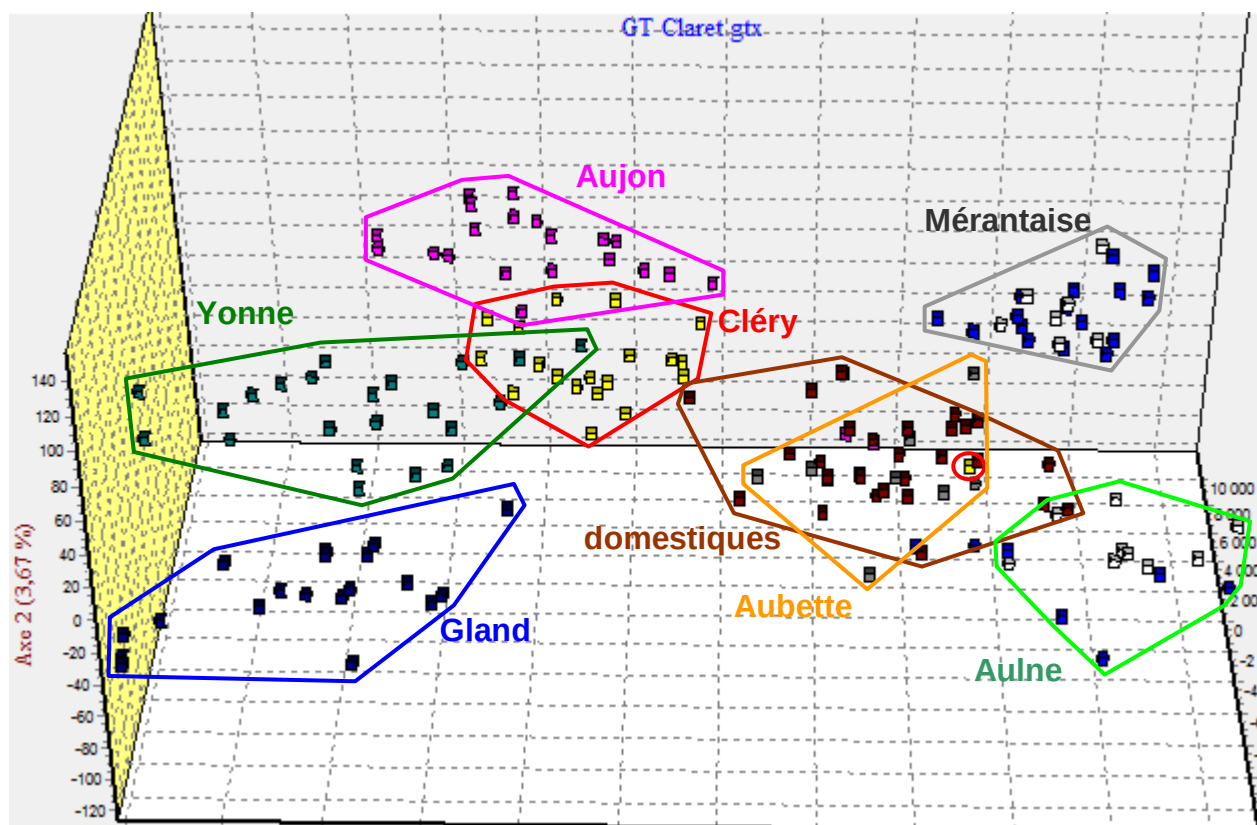


Figure 2 : Analyse multidimensionnelle (AFC) montrant les ressemblances et dissemblances de la Cléry vis à vis des échantillons locaux et des truites domestiques. On peut noter que la Cléry (en rouge) est bien différente de la souche domestique (en brun) à l'exception d'une truite clairement d'origine piscicole (petit cercle rouge vers la droite).

5.2 - Analyse d'assignation

L'analyse d'assignation a nécessité une période de burn'in (sorte de préchauffage de l'analyse) de 20 000 répétitions suivies de 50 000 itérations pendant lesquelles le meilleur découpage en k sous-groupes est recherché par le logiciel STRUCTURE.

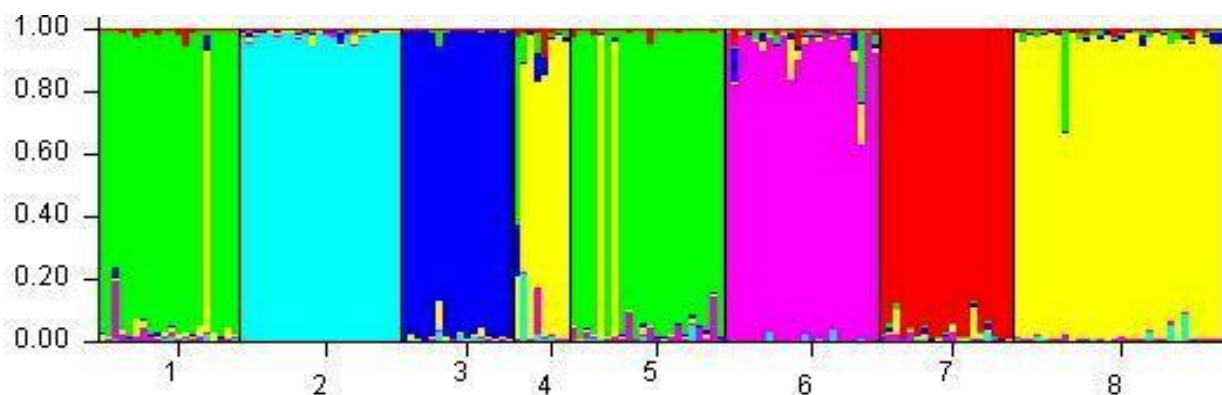


Figure 3 : Représentation graphique de l'analyse d'assignation au stade $k=6$ (analyse continuée jusqu'à $k=8$, voir Figure 4). Chaque truite est représentée par une barre verticale. L'échantillon de la Cléry contient une truite de pisciculture (barre jaune).

L'histogramme le plus représentatif est celui présenté en Figure 3 montrant que la population de l'Aujon (affluent de l'Aube) est la plus proche génétiquement de celle de la Cléry et que cette dernière n'a presque rien à voir avec la forme domestique.

Ce découpage, basé uniquement sur les génotypes, a été testé pour $k=2$ à 8 (ce qui a permis de créer l'arbre en Figure 4).

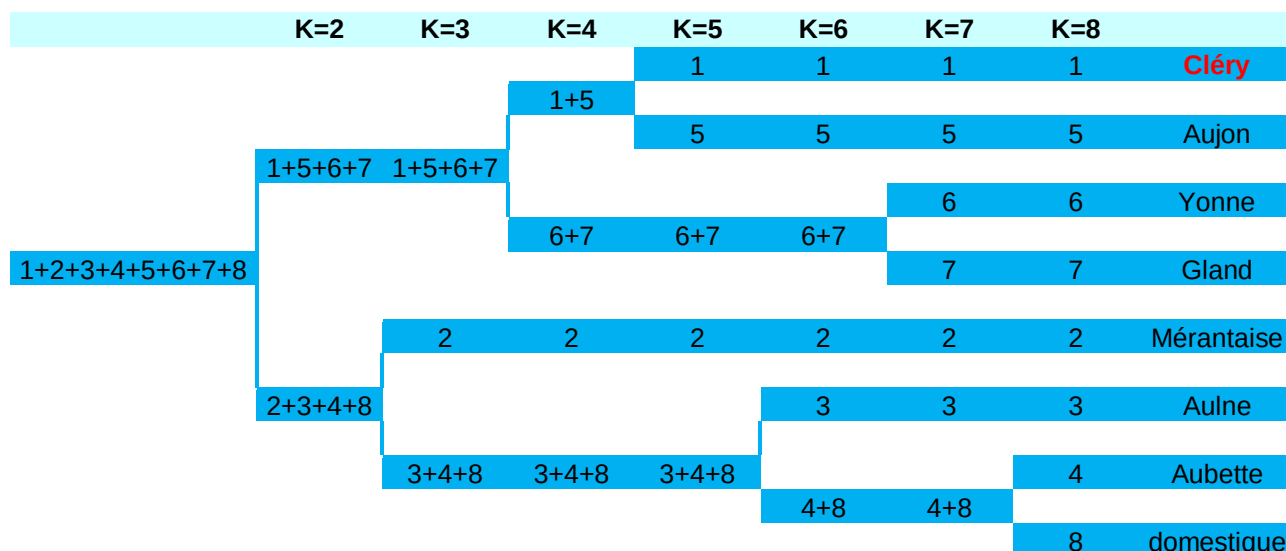


Figure 4 : Représentation des résultats de l'analyse d'assignation sous forme d'arbre à chaque étape de $k+1$. La Cléry est proche de l'Aujon puisque ces deux échantillons sont ensemble jusqu'à $k=4$. On ne peut cependant pas considérer que ces deux populations sont de même lignée puisque dès $k=5$ elles constituent des sous-groupes d'assignation distincts.

5.3. - Paramètres populationnels

Ces paramètres permettent de savoir si les populations dont sont issus les échantillons ont un polymorphisme génétique normal (H entre 0,6 et 0,7) et sont en équilibre panmictique. L'équilibre panmictique, mesuré avec le paramètre F_{is} , signifie que la population se reproduit au hasard entre tous ses membres. Divers phénomènes, dont les repeuplements, peuvent expliquer les F_{is} significatifs (dernière colonne du Tableau 2) qui signifierait que toutes les truites de l'échantillon ne se reproduisent pas au hasard dans la nature.

N° échantillon	Rivière	Nbre	Ho	Hnb	Fis	significativité
1	Cléry	20	0,65	0.67	0,02	ns
2	Mérantaise	23	0,57	0.70	0,19	***
3	Aulne	16	0,65	0.70	0,07	*
4	Aubette	8	0,74	0.74	0,01	ns
5	Aujon	22	0,61	0.64	0,04	ns
6	Yonne	22	0,45	0.52	0,13	***
7	Gland	19	0,53	0.54	0,03	ns
8	Pisciculture	30	0,73	0.75	0,02	ns

Tableau 2 : Valeurs des mesures de diversité génétique (H) et de l'écart à la panmixie (F_{is}) des truites analysées dans ce rapport (ligne jaune) et des truites de référence servant aux comparaisons dont les truites domestiques atlantiques (en gris). ns = non significatif; * = significatif à 5%, ** = significatif à 1%; *** = significatif à 0.1%.

6. Interprétation et discussion

Les analyses effectuées sur les 20 truites de l'échantillon de la Cléry confirment l'impression des gestionnaires:

- C'est une population naturelle, presque exempte de gènes domestiques. Les figures 2 et 3 nous montrent qu'une seule truite (il s'agit de la truite immatriculée 2012-FD45-16, qui n'a pas été photographiée) provient d'un déversement de truites domestiques de la souche commerciale nationale.

Le taux estimé de gènes domestiques dans la Cléry par méthode d'assignation est de 5.8%, ce qui est proche de 1/20. Cela signifie qu'en dehors de cette truite domestique, le peuplement est purement sauvage. Cela signifie aussi que si de temps en temps, des truites domestiques arrivent à l'âge de reproduction (le spécimen 16 mesure 266 mm pour 217 g, il a donc plus de 2 ans et peut être considéré comme un adulte), elles ne se reproduisent quasiment pas puisqu'aucune hybridation n'est décelable.

Il faut noter cependant que seule la souche domestique commerciale française a été testée. Si une autre souche artisanale a servi de façon importante dans le passé, il n'est pas possible de la déceler si elle est très différente de la souche commerciale de référence. Pour la mesurer il aurait fallu disposer d'un échantillon de cette souche.

Un point important: l'échantillon de la Cléry est monobloc (en vert dans la Figure 3). Si une souche inconnue avait été déversée de façon importante, cet échantillon aurait été hétérogène (deux couleurs). Ce n'est pas le cas à part l'unique truite domestique décelée. Il est donc très probable qu'en dehors de la truite 16, l'échantillon analysé soit purement sauvage.

- Cette lignée génétique est proche de celle de l'Aube (plus précisément l'Aujon, station Gensalm, projet précurseur de Genetrutta), sans toutefois être identique; elle est par contre bien différente des populations de l'Orge, pourtant géographiquement plus proches.

- La diversité génétique de la population de la Cléry est dans la bonne moyenne: $H_{nb}=0,65$ (Tableau 2), ce qui est inférieur à la souche domestique piscicole (nourrie de nombreuses origines nord européennes), mais supérieur à plusieurs populations naturelles du bassin de la Seine. Malgré la présence de la truite domestique, la population est globalement panmictique, c'est à dire sans forte influence domestique ni immigrations de populations différenciées. On dit d'une telle population qu'elle est démographiquement stable et génétiquement à l'équilibre.

A titre de conclusion, on peut en déduire que les repeuplements passés (et partiellement actuels, voir Annexe 1) n'ont eu aucun impact sur la souche sauvage et donc aucun intérêt sensible pour le pêcheur sportif. Cette inefficacité signifie que tous ces efforts de repeuplement ont été vains. Il est urgent de passer à une gestion patrimoniale intégrale où les efforts doivent se porter sur la protection du milieu.

Enfin, cette analyse participe au projet national Genetrutta. Le premier rapport de juin 2013 placera la Cléry dans la diversité naturelle nationale. Chaque année, autour du mois de juin, de nouvelles analyses permettront de couvrir progressivement tout le territoire national jusqu'au terme du projet en juin 2015. A chaque échéance, la population de la Cléry sera positionnée avec plus de précision.

Fait à Montpellier le 26 janvier 2013

7. Annexes

Annexe 1 : *Eléments sur l'histoire des repeuplements en truite fario sur la Cléry – (informations rassemblées par les agents de la Fédération de Pêche du Loiret).*

Cinq AAPPMA sur la rivière ont pratiqué des repeuplements de manière non coordonnées d'origine souvent différentes pendant quelques décennies.

- Dans les années 1980, un pisciculteur de la Somme (80) fournit les AAPPMA du bassin en truitelles fario (pas de connaissance sur l'origine et la souche des poissons).

- Une autre pisciculteur installé à Nanteau /Lunain (77) (Le Lunain est un affluent du Loing en Seine & Marne) a fourni certaines des AAPPMA pendant de nombreuses années jusqu'en 2003.

- Dans le même temps, un pisciculteur extensif (*Ets François*) installé sur un cours d'eau voisin de la Cléry (Rivière Chantereine, affluent de l'Ouanne, elle même affluent du Loing) fait du grossissement à partir d'œufs, en provenance dans les premiers temps, de négociants qui se fournissent au Danemark et en Italie du Nord. Il livre aussi à certaines des APPMA des truitelles au printemps et des adultes dans la saison de pêche en première catégorie. Dans la deuxième partie de sa carrière jusqu'en 2007, ce pisciculteur s'est fourni en œufs de truite dans le Jura (*Ets Thierry Schwartz*). Après vérification auprès des collègues du département 39, la souche de truite des productions des *Ets Schwartz* est bien d'une lignée atlantique.

Depuis, son exploitation a été reprise par les *Ets Galichet* qui se fournissent en œufs au même endroit puis délocalise l'exploitation à quelques kilomètres sur un autre bassin versant voisin (« Le Vrin » affluent de l'Yonne).

- Depuis une dizaine d'année, les pratiques en matière de repeuplement ont évolué.... En résumant, les 5 APPMA se sont toutes fournies à partir de 2003 chez le même pisciculteur (donc les poissons issus des œufs produits dans le Jura).

- Deux AAPPMA ont maintenu le déversement en truites adultes malgré les injonctions de l'administration et de la Fédération (en même temps que notre connaissance du patrimoine salmonicole et des capacités de la rivière avançait).

- Une seule AAPPMA maintient le repeuplement à partir de truitelles de printemps.

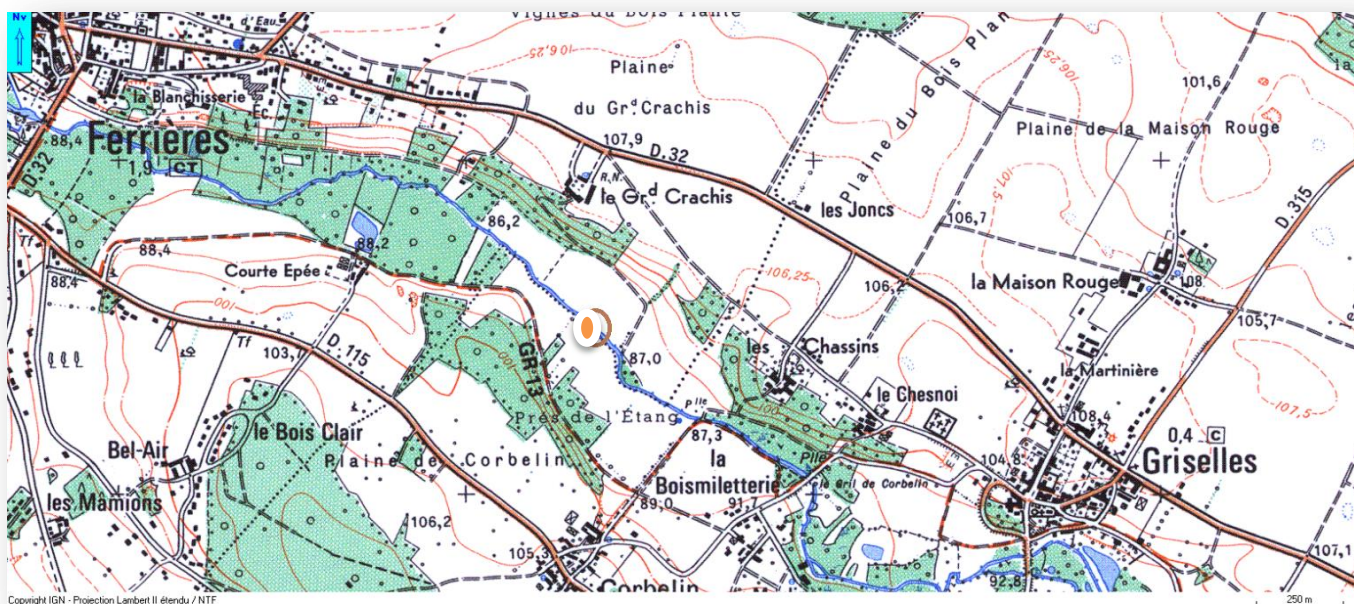
- L'APPMA de Ferrières en Gâtinais, où nous avons fait le prélèvement, gère la rivière de manière patrimoniale depuis quelques années: pas de déversement de truite fario.

Annexe 2 : observations de l'état écologique de la station et du peuplement piscicole fait par Laurent Delliaux lors de la pêche d'octobre 2012

Au-delà de l'objectif de prélèvement pour le programme Genetrutta, la pêche a permis de vérifier les résultats de la reproduction de la truite durant l'hiver 2011/2012 sur ce bassin (aucune autre pêche n'a eu lieu sur le bassin en 2012). Malgré les crues importantes de décembre 2011, il semble que les stades d'éclosion et d'émergence aient été efficaces puisqu'on retrouve une bonne densité de truitelles de l'année, tout en considérant que la station ne constitue pas une zone préférentielle de recrutement. La croissance quant à elle est très bonne puisque on dénombre des individus 0+ mesurant jusque 140 mm à la fin du premier été. Enfin la pyramide des âges semble conforme à une population de truites en bonne santé.

Autres espèces observées pendant la pêche : chabot, loche franche, vairon, spirilin, anguille, lamproie de planer, goujon, chevesne, quelques vandoises et un très gros barbeau. A noter que les cyprinidés rhéophiles (vandoise, barbeau et hotu) n'ont pas été observés en amont de « La Bonde », à Ferrières, depuis l'existence d'inventaires piscicoles. (« La Bonde » est un ouvrage du IX^{ème} siècle en travers de la vallée, qui semble être le front de migration sur la Cléry depuis des décennies pour ces espèces, excepté le spirilin qui a recolonisé le cours d'eau depuis 2005).

Annexe 3 : localisation précise du lieu de pêche, entre les communes de Ferrières et Griselles.



Annexe 4 : *spécimen représentatif d'une des truites de la Cléry capturés pour l'étude (ici le spécimen 8 - 36 cm et 480 g)*



Photo : TRF - 360 mm - Echantillon 8 / prélèvement Genetrutta BV Loing/Cléry

Annexe 5 : *phénotype majoritaire rencontré sur la Cléry*



Annexe 6 : gros plan adipeuse/caudale d'une truite de la Cléry stade 1+.



Annexe 7 : photo d'une partie des individus en balnéation/anesthésie préalable au prélèvement de tissus.



Annexe 8 : frayères observées le 30 novembre 2011 sur le secteur étudié.

