

Analyse génétique des 4 échantillons de truites des Pyrénées Orientales (Tech et Agly)

Projet PO7
Rapport de mai 2013



Le Grafouil © FD66

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



Introduction

Ce projet d'analyse entre dans le cadre de l'étude approfondie des lignées génétiques présentes dans les Pyrénées Orientales. Le présent opus est géré par la Fédération de Pêche des Pyrénées Orientales.

Ce type d'étude a débuté en 1993 avec la méthode des allozymes, réunissant des échantillons de l'Agly, de la Têt et du Tech (Berrebi 1995). Bien que plus grossiers que les microsatellites, ces marqueurs ont permis de distinguer les truites naturelles des introduites.

Les études basées sur les microsatellites ont été appliquées à cette région à partir de 2008, à l'initiative de la FD66 et de l'ONF, cumulant actuellement 29 stations si on compte les analyses faites également pour la Réserve Naturelle de l'Eyne, les prélèvements de souches de pisciculture ainsi que les 4 stations 2012 du présent rapport.

Ce rapport donne d'abord, dans une **première partie**, les résultats obtenus sur les 4 échantillons de 2012: le Tech à Prats de Mollo, la Soulanette et le Grafouil, et l'Agly dans son affluent la Boulzane. Ce dernier échantillon sera analysé au niveau de 12 marqueurs (au lieu de 6) et participera au projet national GENETRUTTA ayant pour objectif, à l'horizon 2015, de produire une carte nationale des lignées génétiques naturelles.

Il est également apparu que la complexité génétique découverte dans les P.O. au cours des différentes campagnes d'échantillonnage méritait une étude synthétique. Les marqueurs moléculaires ayant varié avec le temps (en particulier passage de 4 à 6 microsatellites), des analyses complémentaires ont été faites de manière à ce que tous les échantillons analysés depuis 2008 le soient avec le même jeu de 6 microsatellites.

Cette étude de synthèse générale fait l'objet d'une **seconde partie** du présent rapport, enrichie par l'emploi d'autres marqueurs moléculaires: les séquences d'ADN mitochondrial, marqueur dédié aux reconstitutions de l'histoire des peuplements.

PREMIERE PARTIE : LES 4 ECHANTILLONS DE 2012

1.1. Echantillonnage de 2012

Les 4 stations analysées dans le présent rapport sont détaillées au Tableau 1 et leur localisation est précisée dans la Figure 1. Les 50 échantillons de nageoires sont parvenus au laboratoire de Montpellier le 29 octobre 2012. Olivier Baudier est le correspondant de la Fédération de Pêche 66 pour ce projet PO7.

En plus des échantillons de 2012, des échantillons de référence ont été ajoutés: des localités voisines déjà analysées représentant les lignées déjà connues (Carança, Tech et Têt pour les principales lignées naturelles) ainsi que des échantillons de truites atlantiques domestiques commerciales françaises provenant de deux piscicultures (Isère et Seine-Maritime) et la souche méditerranéenne du Doubs (Roquebillière) (Tableau 1).

n° station	n° ISEM	éch. ISEM	station	bassin ou région	date	N	rapport	n° terrain
1	T13486 à T13495	L177	Lladure Estany (amont)	Aude	août-08	10	PO4	ONF-PO-71 à 80
2	T13476 à T13485	L176	Lladure refuge (aval)	Aude	août-08	10	PO4	ONF-PO-61 à 70
3	T13436 à T13445	L172	Lentilla Los Masos (amont)	Têt	août-08	10	PO4	ONF-PO-21 à 30
4	T13446 à T13455	L173	Lentilla passerelle (aval)	Têt	août-08	10	PO4	ONF-PO-31 à 40
5	T17252 à T17266	L277	Llech Mas Malet	Têt	août-08	15	PO5	Fédé66-31 à 45
6	T17267 à T17281	L278	Torrent de Salze	Têt	août-08	15	PO5	Fédé66-46 à 60
7	T13456 à T13465	L174	Nohède Pla del Gorg (amont)	Têt	août-08	10	PO4	ONF-PO-41 à 50
8	T13466 à T13475	L175	Nohède Pla del Mitg (aval)	Têt	août-08	10	PO4	ONF-PO-51 à 60
9	T13513 à T13520	L180	Cady	Têt	août-08	8	PO4	ONF-PO-101 à 108
10	T13426 à T13435	L171	Llipoudère parc contention (amont)	Têt	août-08	10	PO4	ONF-PO-11 à 20
11	T13416 à T13425	L170	Llipoudère confluence Cady (aval)	Têt	août-08	10	PO4	ONF-PO-01 à 10
12	T17192 à T17206	L273	pisciculture Sahorre (géniteurs)	Têt	août-10	15	PO5	-
13	T17192 à T17207	L274	pisciculture Sahorre (truitelles)	Têt	août-10	15	PO5	-
14	T17222 à T17236	L275	Carança cabanne ingénieurs (amont)	Têt	août-09	15	PO5	Fédé66-01 à 15
15	T17237 à T17251	L276	Carança passerelle Ras	Têt	août-09	15	PO5	Fédé66-16 à 30
16	T18288 à T18302	L321	Têt Pla dels Aveillans (amont)	Têt	août-10	15	PO5	Têt-2010-16 à 30
17	T18273 à T18287	L320	Têt Pla de Barrès (aval)	Têt	août-10	15	PO5	Têt-2010-01 à 15
18	T20022 à T20029	L401	Las Illas	Tech	août-11	15	PO6	PO-2011-31 à 38
19	T13506 à T13512	L179	Coumélade Troncasses	Tech	août-08	7	PO4	ONF-PO-91 à 97
20	T13496 à T13505	L178	Coumélade chapelle St Guillem	Tech	août-08	10	PO4	ONF-PO-81 à 90
21	T19992 à T20006	L399	Coumélade La Llau	Tech	août-11	15	PO6	PO-2011-01 à 15
22	T20007 à T20021	L400	Coumélade Banat	Tech	août-11	15	PO6	PO-2011-16 à 30
23	T24121 à T24130	L544	Grafouil	Tech	août-12	10	PO7	2012-FD66-01 à 10
24	T24137 à T24146	L545	Soulanette	Tech	août-12	10	PO7	2012-FD66-17 à 26
25	T24157 à T24166	L546	Tech Prats de Mollo	Tech	août-12	10	PO7	2012-FD66-37 à 46
26	T24167 à T24186	L547	Boulzane	Agly	août-12	20	PO7 + GT1	2012-FD66-47 à 66
27	T20030 à T20044	L402	Ruisseau Tassia	Tassia	août-11	15	PO6	PO-2011-46 à 60
28	T17784 à T17814	L294	Eyne amont Orri de Baix	Segre	août-10	30	EYN1	Eyne2010-01 à 31
29	T17815 à T17842	L295	Eyne aval Orri de Baix	Segre	août-10	30	EYN1	Eyne2010-32 à 60
30	T05147 à T05166	F218	pisciculture Roquebillière	Alpes Maritimes	sept-01	20	MERC1	-
31	T13061 à T13090	L156	pisciculture Roquebillière	Alpes Maritimes	févr-08	29	GENESALM2	G 0108-341 à 370
32	T16926 à T16955	L266	pisciculture	Isère	2008	30	GENESALM2	108-101 à 130
33	T16956 à T16985	L267	pisciculture	Seine Maritime	2008	30	GENESALM2	108-221 à 250
34	T16986 à T17015	L268	pisciculture	Pas de Calais	2008	30	GENESALM2	108-311 à 340
35	T17016 à T17045	L269	pisciculture	Ain	2008	30	GENESALM2	108-401 à 430

Tableau 1 : Caractéristiques des truites analysées dans ce rapport. Les échantillons sont numérotés par bassins puis par date. Les noms de stations indiqués **en bleu** sont ceux des échantillons analysés dans la première partie du rapport. La totalité des échantillons sert à la seconde partie.

Les échantillons de 2012 (première partie) sont **en jaune**. Les échantillons de piscicultures sont **en gris**.

La colonne "rapport" donne les références bibliographiques: PO4 = Berrebi, Shao, Reynaud, 2010; PO5 = Berrebi, Cherbonnel, Shao, 2011; PO6 = Berrebi, Shao, Cambon, Baudier, 2012; PO7 = présent rapport; GT1 = rapport Genetrutta-1 à venir pour l'été 2013; EYN1 = Berrebi, Cherbonnel, 2011 ; MERC1 = Berrebi, 2001; GENESALM2 = Berrebi, Cherbonnel, 2009.

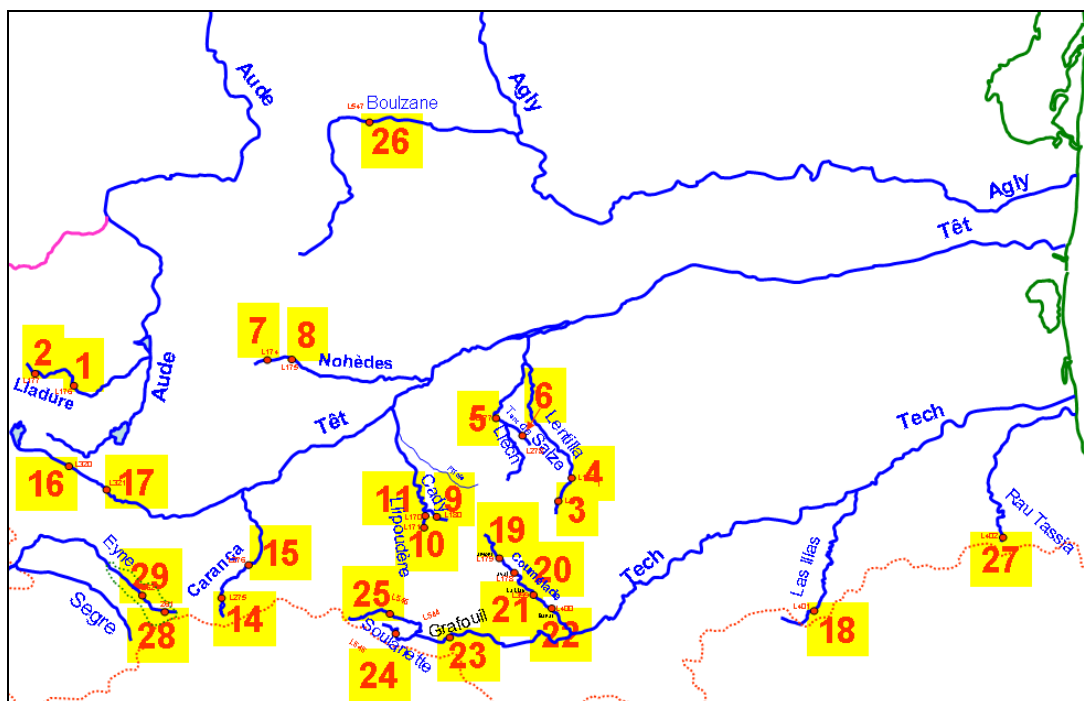


Figure 1 : Positionnement de la totalité des échantillons analysés dans le réseau hydrographique local (voir le Tableau 1 pour la signification des chiffres).

1.2. 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 de certains inhibiteurs et des enzymes destructrices naturelles de l'ADN) 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 mesurer leur taille, 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 longueur 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 analyse statistiques.

1.3. Méthode statistiques

Les données moléculaires (génotypes), une fois codées, permettent d'établir une matrice (tableau de données). Additionnée des échantillons de référence déjà analysés (pour les

comparaisons), la matrice finale permet d'effectuer les traitements statistiques qui suivent, 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 aidant à 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 leur génotype. 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 selon le cas. Il faut que la partition ait un sens biologique. Une truite donnée peut être assignée à plusieurs sous groupes (généralement 2) si elle est hybridée. Cette méthode, plus quantitative, permet de chiffrer la composition génétique d'un échantillon (par exemple les pourcentages de truites sauvages et domestiques dans un échantillon) ou d'une truite hybride. Cependant, il faut être conscient que ces calculs dépendent du choix des échantillons de référence et comportent un "bruit de fond" généralement estimé à 5% ou un peu plus, dû à divers phénomènes complexes.

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 (principalement H_o = hétérozygotie observée et H_{nb} = hétérozygotie théorique non biaisée). Les informations biologiques tirées de ces paramètres populationnels sont détaillées dans la discussion.

Le **séquençage de l'ADN mitochondrial** est nécessaire quand des doutes subsistent sur la nature d'une lignée (c'est le cas pour la lignée P2, voir Berrebi, Shao, Cambon, Baudier, 2012). Ce marqueur est peu sensible et ne distinguera pas les lignées de toute une région, par contre il détecte les migrations et transplantations (il représente bien l'histoire ancienne des lignées). Il sera généralisé dans la présente étude (seconde partie) pour clarifier la nature des lignées génétiques du département.

1.4. Résultats

1.4.1 - 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 les échantillons de référence et ceux de 2012.

Le diagramme nous montre que les échantillons 23 et 24 du Tech (Grafouil et Soulanette) sont dans la zone des truites domestiques (atlantiques commerciales et peut-être Roquebillière) tandis que l'échantillon 25 (Tech à Prats de Mollo) est entièrement inclus dans la référence Tech (à l'exception d'un individu étrangement positionné avec Boulzane). Ce dernier échantillon n°26, la Boulzane, affluent de l'Agly, présente un type nouveau que nous appellerons type Med parce que présent dans plusieurs populations des P.O. (Tableaux 2 et 4), de lignée méditerranéenne selon le Tableau 5 (ME6) et d'origine inconnue). Mais cet échantillon, heureusement constitué de 20 truites (au lieu de 10 pour les autres échantillons), montre trois sous-unités: outre le type Med (environ 40%), nous trouvons des truites domestiques de type Roquebillière (environ 40%) et Carança (20%).

D'un point de vue statistique, l'hyperespace de cette analyse possède 198 axes (199 truites moins un). De ce fait, le pourcentage d'information que porterait chaque axe (inertie) s'il n'y avait pas de structure (points distribués au hasard, chaque truite étant génétiquement équivalente) serait de $100/198=0,5\%$ environ. Ici, la somme des inerties des trois axes servant à tracer le plan de la figure est de 11,79% soit presque 8 fois plus d'information que si les axes n'étaient pas informatifs. On peut conclure que cette analyse est très informative.

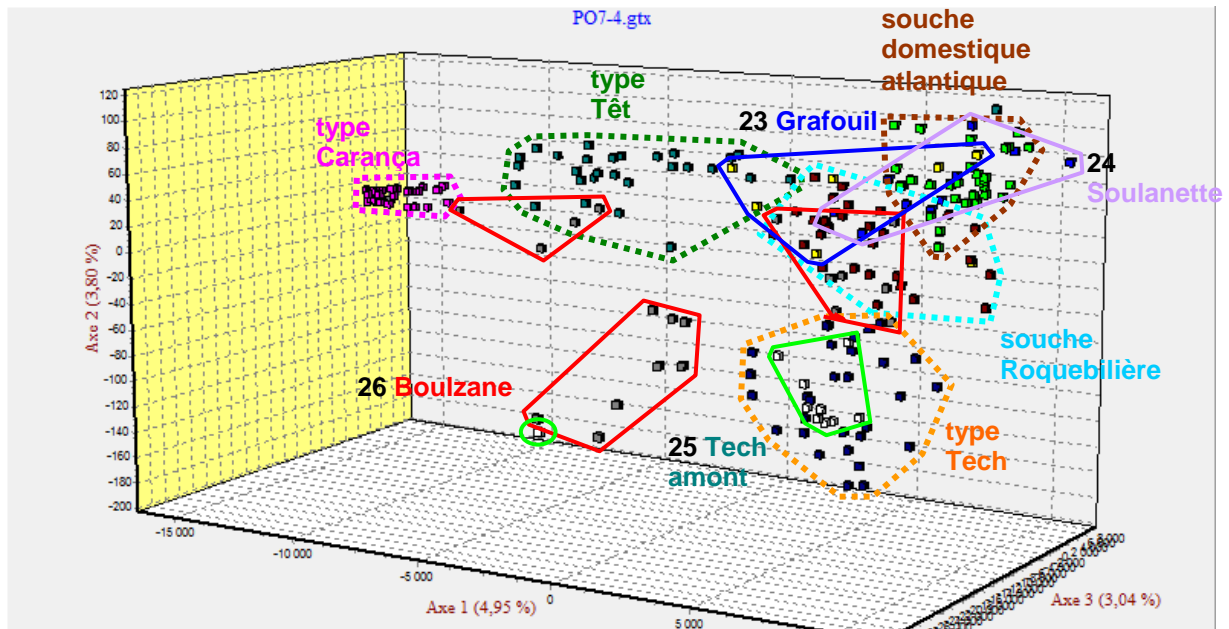


Figure 2 : Analyse multidimensionnelle (AFC) des génotypes des 4 échantillons de truites de 2012 (polygones en traits continus) ainsi que des types de référence (polygones en pointillés).

1.4.2 - Analyse d'assignation

L'analyse d'assignation a nécessité 30000 itérations d'exploration (burn-in) et 70000 itérations complémentaires. La Figure 3 confirme l'analyse multidimensionnelle de la Figure 2 avec deux différences notables: (i) le type domestique commercial, en vert ici (32 et 33), est doublé par une autre lignée domestique atlantique en bleu marine (23 et 24) que nous appellerons "**domestiques 2**" et (ii) les types Têt et Carança ne sont pas distingués (en jaune).

1.4.3. - Le point de vue de l'ADN mitochondrial

Les séquences mitochondriales ont été analysées surtout pour améliorer la compréhension de la diversité génétique observée dans le département. Les résultats obtenus sont concentrés dans le Tableau 5 (Deuxième partie du rapport). Ils nous permettent d'affirmer que:

- le type Carança est caractérisé par le groupe d'haplotypes méditerranéens ME3;
- la Boulzane est bien un mélange de truites de l'Agly (2 haplotypes sur les 5 analysés appartenant au groupe ME6 local), de truites de type Carança (1/5 ME3), et d'apport domestique atlantique (2/5 AT1 et AT3);
- le type Tech est bien une réalité avec, pour l'échantillon "Banat", 4/5 ME6 et 1/5 AT3.
- l'apport Roquebillière reste difficile à caractériser puisque composé, dans le prélèvement de 2008, de 2/5 ME6, 1/5 ME3 et 2/5 AT1 et AT3;

- les truites domestiques atlantiques nationales sont composées d'haplotypes atlantiques variés: 11/15 AT2 soit 73%, 1/15 AT3 soit 7% et 3/15 AT4 soit 20% montrant que cet apport domestique se reconnaît surtout par l'haplotype AT2.

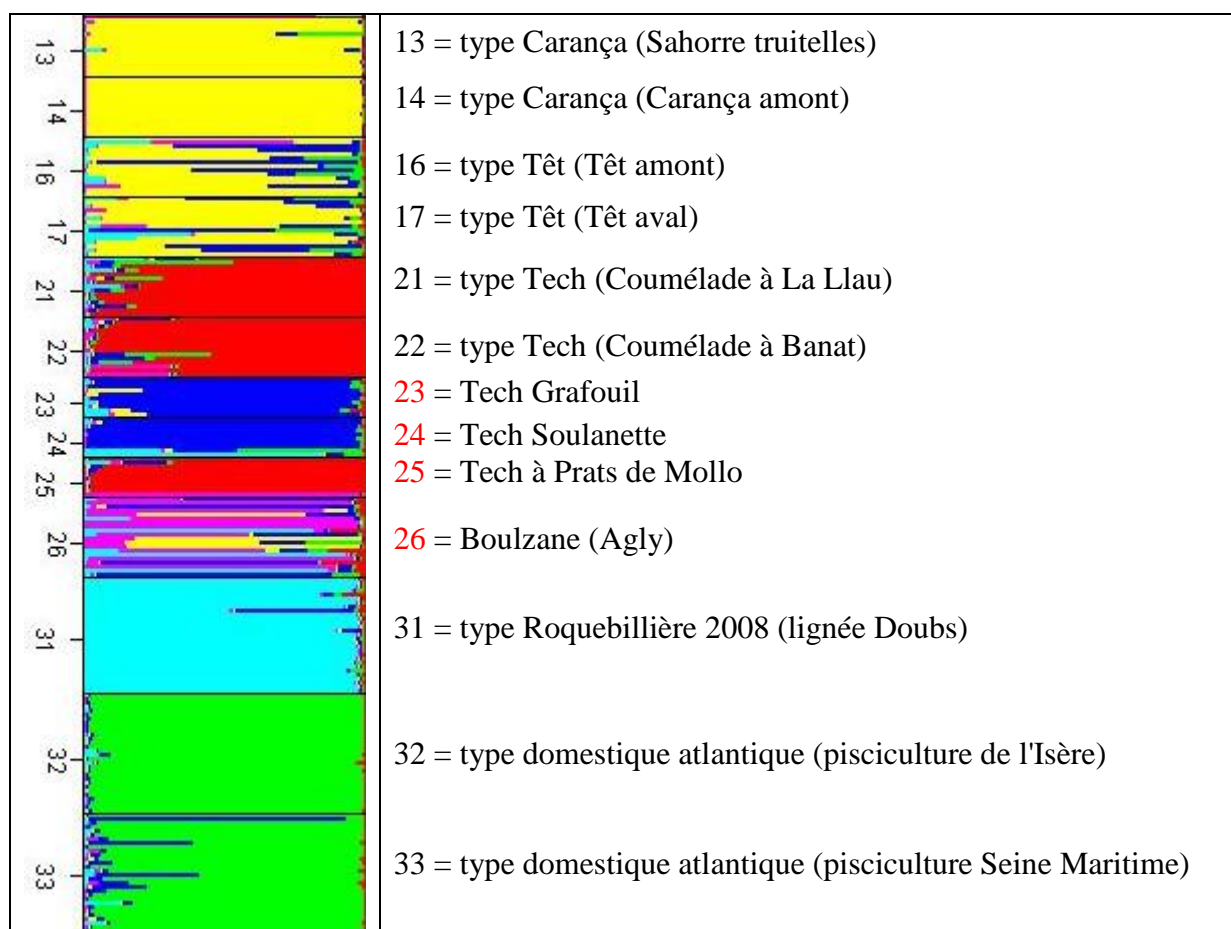


Figure 3 : Analyse d'assignation sous forme d'histogramme.

n° station	station	bassin ou région	Med	Tech	Car+Têt	Roq	P2	P1
13	pisciculture Sahorre (truitelles)	Têt	1	1	95	1	1	2
14	Carança réserve amont	Têt	1	1	98	0	0	0
16	Têt amont	Têt	5	1	64	4	22	5
17	Têt aval	Têt	2	1	64	6	20	6
21	Coumélade La Llau	Tech	1	84	1	4	4	6
22	Coumélade Banat	Tech	6	84	1	1	4	4
23	Grafouil	Tech	1	1	5	3	88	2
24	Soulanette	Tech	1	1	1	12	79	6
25	Tech à Prats de Mollo	Tech	11	84	1	1	3	1
26	Boulzane	Agly	43	4	15	16	21	3
31	pisciculture Roquebillière	Alpes Maritimes	1	1	1	94	3	1
32	pisciculture	Isère	0	1	0	1	1	97
33	pisciculture	Seine Maritime	1	1	1	2	8	88

Tableau 2 : Traduction en pourcentages de la figure 3, en respectant les couleurs données aux lignes. Les valeurs au dessus de 5 ou 6%, mises en gras, sont considérées comme sûres.

1.4.3. - Paramètres populationnels

n° station	station	He	Hnb	Ho	P(0,95)	P(0,99)	A
14	Carança réserve amont	0,36	0,36	0,37	0,83	0,83	3,17
16	Têt amont	0,67	0,68	0,57	1,00	1,00	10,17
21	Coumélade La Llau	0,70	0,71	0,69	1,00	1,00	11,50
23	Grafouil	0,79	0,83	0,72	1,00	1,00	7,67
24	Soulanette	0,78	0,82	0,67	1,00	1,00	7,50
25	Tech à Prats de Mollo	0,65	0,68	0,70	1,00	1,00	5,00
26	Boulzane	0,80	0,82	0,60	1,00	1,00	10,17
31	pisciculture Roquebillière	0,72	0,73	0,63	1,00	1,00	6,83
32	pisciculture	0,83	0,84	0,81	1,00	1,00	11,00

Tableau 3 : Analyse des paramètres populationnels de diversité génétique (Hnb étant le plus utilisé).

L'interprétation de ces valeurs est donnée dans la discussion.

1.5. Interprétation de la première partie (échantillons 2012)

L'analyse des échantillons de 2012 fait réapparaître une lignée génétique qui avait été observée dans les rivières Nohède, Coumélade Troncasses, Cady et Llipoudère pour les principales: le type "**pisciculture ancienne**" ou **P2**.

Dans le rapport PO4 (Berrebi, Shao, Reynaud, 2010) sur les échantillons de 2008, cette lignée mystérieuse avait été nommée Têt parce qu'on la trouvait surtout dans des affluents de cette rivière. Ce type génétique était passé inaperçu dans les rapports PO5 (Berrebi, Cherbonnel, Shao, 2011) analysant les populations Carança-Sahorre, Llech, Salze et Têt amont. P2 était aussi inaperçu dans le rapport PO6 (Berrebi, Shao, Cambon, Baudier, 2012), traitant surtout des populations sauvages de lignée Tech ou domestiques locales (Carança) dans le ruisseau de Tassia. Ce rapport PO6 reprend cependant un échantillon de Nohède amont (96% P2) et montre que pour 5 de ces truites, le marqueur mitochondrial (DLoop) est du type ATcs2 homogène (ici groupe AT3, Tableau 5), c'est à dire issu de pisciculture atlantique.

Ce type P2 est retrouvé dans les échantillons de 2012, très dominant dans le Grafouil (88%) et la Soulanette (79%) et plus modestement dans la Boulzanne (21%). C'est donc là le résultat de repeuplements en truites domestiques atlantiques.

L'autre lignée de repeuplement, la souche **Roquebillière** d'origine du Doubs, est détectée dans la Soulanette (12%) et la Boulzane (16%).

Enfin, la souche locale de Sahorre (origine **Carança**), n'est observée que dans la Boulzane (15%). Reconnaître cette souche domestique locale est difficile puisque sa présence dans la région peut être aussi naturelle. Seule l'incohérence de sa détection dans l'Agly nous permet de dire que c'est une forme domestique.

La nouveauté de cette campagne d'analyses est la lignée nommée **Med** qu'on trouve à 43% dans la Boulzane. Ce serait la lignée naturelle de ce petit bassin. Cependant, on en retrouve 11% dans le Tech à Prats de Mollo, ce qui n'est pas logique (mais ça peut être une simple ressemblance). D'autres analyses de l'Agly seraient nécessaires pour être sûr de cette origine locale naturelle, mais déjà, à ces 43% de forme Med supposée correspondent les 40% d'haplotype mitochondrial ME6 (Tableau 5).

Dans l'analyse 2012, l'assignation (Figure 3 et Tableau 2) a du mal à séparer les lignées Têt et Carança. Ceci n'est pas surprenant parce que la distinction des lignées dans un jeu de données dépend des échantillons de référence ajoutés, et peut donc varier d'une analyse à l'autre: tout résultat est dû à des comparaisons donc relatif. Cette question sera reprise dans la seconde partie de ce rapport.

Le Tableau 3 nous enseigne que les 4 populations échantillonnées en 2012 présentent une diversité génétique assez élevée pour de petites stations de montagne (0,78 à 0,80). C'est lié aux divers apports artificiels. Seule la population du Tech à Prats de Mollo présente une valeur inférieure (0,65) alors qu'elle est purement sauvage. Les repeuplements et transplantations ont un effet complexe sur la biodiversité: elle augmente cette diversité dans les rivières où les truites introduites participent à la reproduction sans éliminer la forme sauvage (ont dit qu'il y a introgression) mais ils abaissent cette diversité au niveau de la région et de l'espèce.



Pêche dans la Soulanette, le 7 août 2012

SECONDE PARTIE: SYNTHÈSE DE 4 ANNEES (29 ÉCHANTILLONS)

2.1. Jeu de données

Cette seconde partie reprend l'ensemble des analyses réalisées dans les rapports PO4 à PO7 et EYN1 (voir liste des rapports dans la légende du Tableau 1 et les références bibliographiques en 3.).

Basées sur 4 marqueurs, les premières analyses ont été complétées par les deux microsatellites manquants à l'occasion de la présente étude.

Les séquences de l'ADN mitochondrial (zone de la DLoop), limitées jusqu'à présent à la seule station Nohède amont pour caractériser la lignée P2, ont été étendues à toutes les lignées détectées par les microsatellites et à de nombreux échantillons (total de 105 séquences supplémentaires si on inclut les échantillons domestiques).

2.2. Méthode

Ce grand jeu de données (556 truites, 6 microsatellites) a été traité par assignation. Cette méthode est capable de trier dans tous ces génotypes pour proposer un nombre k de lignées génétiques cohérentes.

Les séquences mitochondriales de 110 truites ont été compilées (16 échantillons capturés entre 2008 et 2012 et 5 échantillons de pisciculture). Ces données servent à discuter ou confirmer les interprétations des résultats microsatellites.

2.3. Résultats, interprétation et discussion

2.3.1. Génotypes microsatellites

La figure 4 restitue l'analyse d'assignation la plus cohérente obtenue avec $k=7$. Il y aurait donc 7 lignées génétiques en compétition en sympatrie (dans les mêmes rivières) ou en allopatrie (territoire différents).

Quatre lignées domestiques:

- la souche **atlantique commerciale nationale** (nommée ici P1) qu'on retrouve dans les piscicultures de toute la France (souche dite INRA-SEMII);

- la souche **atlantique domestique** d'origine inconnue, utilisée en abondance dans les P.O. dans le passé (c'est une simple hypothèse), très présente dans des rivières comme Nohède, Cady, Lipoudère, Coumélade, mais aussi dans la seule pisciculture du Pas de Calais à 20%;

- la souche de **Roquebillière**, méditerranéenne d'origine Doubs;

- la souche de **Sahorre**, identique à la lignée naturelle Carança.

4 lignées naturelles:

- la lignée **Med** vue dans la Boulzane à environ 45%; mais sa présence à 90% dans la Lladure (Aude) ou à 47% dans la Lentilla (affluent droit de la Têt) rend cette origine Med incertaine et en tout cas à confirmer;

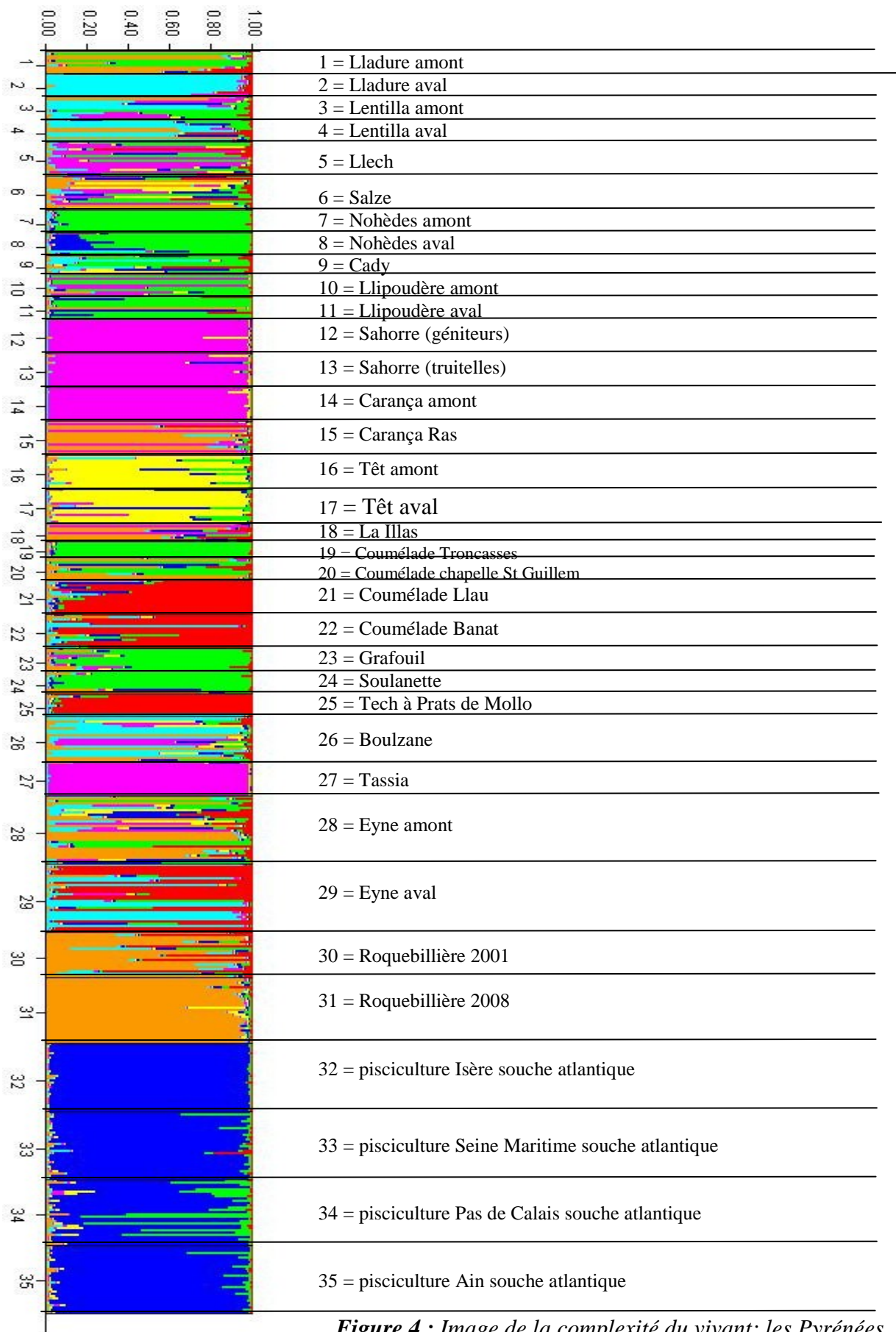


Figure 4 : Image de la complexité du vivant: les Pyrénées Orientales sont peuplées par des truites de 7 lignées.

- la lignée **Tech** est surtout trouvée en amont de cette rivière (échantillon 2012) et dans la moitié aval de la Coumélade;

- la lignée **Têt** se trouve abondamment en amont de cette rivière (environ 80%) mais est peu répandue ailleurs dans le département; confondue avec la lignée Carança dans la première partie (Figure 3 et Tableau 2), elle s'en distingue ici;

- la lignée **Carança** est naturellement présente dans cette rivière (mais plus vraiment au niveau de la passerelle du refuge du Ras où elle est remplacée par la souche Roquebillière). Ayant servi à la constitution de la souche domestique de Sahorre, sa présence dans la nature peut être naturelle ou artificielle (naturelle dans la Carança bien sur, et artificiellement implantée dans le ruisseau de Tassia et ailleurs).

N°	éch.	N	Med	Tech	Têt	Car.	Roq.	P2	P1
1	Lladure amont	10	2	6	2	2	51	35	2
2	Lladure aval	10	89	4	1	4	1	1	1
3	Lentilla amont	10	30	2	2	19	18	23	6
4	Lentilla aval	10	47	6	1	2	23	14	8
5	Llech Mas Malet	15	3	9	6	45	2	28	6
6	Torrent de Salze	15	3	7	23	17	21	18	11
7	Nohède amont	10	1	1	1	1	1	94	2
8	Nohède aval	10	5	1	1	3	1	72	17
9	Cady	8	20	8	10	1	8	42	11
10	Llipoudère amont	10	1	1	2	42	3	50	2
11	Llipoudère aval	10	1	5	1	0	11	67	16
12	pisciculture Sahorre (géniteurs)	15	1	1	2	96	1	0	0
13	pisciculture Sahorre (truitelles)	15	1	1	2	93	1	1	2
14	Carança réserve amont	15	1	1	2	96	1	0	0
15	Carança passerelle Ras	15	3	4	1	27	63	1	1
16	Têt amont	15	4	1	82	1	2	7	4
17	Têt aval	15	1	1	76	5	2	5	10
18	Las Illas	8	2	8	1	25	52	5	7
19	Coumélade Troncasses	7	1	1	1	1	1	95	1
20	Coumélade chapelle St Guillem	10	3	5	1	1	42	38	10
21	Coumélade La Llau	15	3	81	1	1	5	3	7
22	Coumélade Banat	15	13	73	1	1	4	6	3
23	Grafouil	10	1	2	2	7	7	78	3
24	Soulanette	10	1	1	1	1	12	77	6
25	Tech à Prats de Mollo	10	11	83	1	1	1	2	1
26	Boulzane	20	46	3	8	15	19	6	4
27	Ruisseau Tassia	15	1	1	1	95	1	1	1
28	Eyne amont	30	10	8	7	8	39	18	11
29	Eyne aval	30	34	53	1	2	2	5	2
30	pisciculture Roquebillière 2001	20	10	16	1	1	66	4	3
31	pisciculture Roquebillière 2008	29	1	1	2	1	93	1	1
32	pisciculture Isère	30	0	1	1	0	1	1	96
33	pisciculture Seine Maritime	30	1	1	1	1	2	4	91
34	pisciculture Pas de Calais	29	1	1	3	1	2	20	72
35	pisciculture Ain	30	1	1	1	1	1	4	92

Tableau 4 : Pourcentages estimés de la présence des 7 lignées détectées dans les P.O. dans la composition de chacun des 29 échantillons naturels (ou de souche locale) analysés et de 6 piscicultures de repeuplement.

2.3.2. Haplotypes mitochondriaux

Sa première utilisation (Reynaud et al. 2011) a permis de classer le type P2 parmi les truites domestiques atlantiques (haplotype ATcs2, ici dans le groupe AT3). Cet haplotype est minoritaire dans la souche commerciale nationale, il s'agit probablement d'une souche atlantique qui n'est pas (plus?) utilisée fréquemment.

n° station	station	bassin	ME2	ME3	ME6	DA	AT1	AT2	AT3	AT4
1	Lladure amont	Aude							5	
2	Lladure aval	Aude			5					
3	Lentilla amont	Têt			3				1	1
4	Lentilla aval	Têt			3		1		1	
5	Llech Mas Malet	Têt	3		2					
6	Torrent de Salze	Têt		1	1		1		1	1
7	Nohède amont	Têt					1		5	1
11	Llipoudère aval	Têt						1	4	
14	Carança réserve amont	Têt		5						
16	Têt amont	Têt				2	1			1
17	Têt aval	Têt			2	2			1	
18	Las Illas	Tech		2				3		
20	Coumélade chapelle St Guillem	Tech			1		1	2	1	
22	Coumélade Banat	Tech			4				1	
26	Boulzane	Agly		1	2		1		1	
28	Eyne amont	Segre					1	2	3	
29	Eyne aval	Segre			8					
31	Roquebillière 2008	Dept. 06		1	2		1		1	
32 à 35	piscicultures souche atl.	-						11	1	3

Tableau 5 : Résultats des analyses de séquences classées selon les principaux haplotypes (8 groupes) rencontrés.

Avec l'effort effectué pour le présent rapport (les séquences de 90 truites des Pyrénées Orientales sont à présent disponibles), les résultats des analyses microsatellites sont confirmés ou discutés:

Les 4 lignées domestiques sont confirmées:

- la souche **atlantique commerciale nationale** (P1) et la souche **atlantique domestique** d'origine inconnue (P2) sont dominées par le groupe d'haplotype AT3, montrant par là leur ressemblance;

- la souche de **Roquebillière** est un mélange d'haplotypes méditerranéens des types ME6 (comme dans les sauvages des PO) et ME3 (comme les truites de la Carança), mais aussi des haplotypes atlantiques AT1 et AT3;

- la souche de **Sahorre**, identique à la lignée naturelle Carança, ne possède que le type ME3.

Les 4 lignées naturelles se distinguent aussi par leurs haplotypes:

- la lignée **Med**, rencontrée surtout dans la Lladure aval, la Lentilla aval et la Boulzane, est logiquement de type ME6;

- la lignée **Tech** correspond aussi aux haplotypes du groupe ME6;

- la lignée **Têt** reste assez mystérieuse: si on cumule les analyses faites sur les échantillons amont et aval soit 9 séquences, la présence domestique est importante avec 33% de types atlantiques (AT1, AT3 et AT4). La partie sauvage est composée d'haplotypes classiques pour la région (ME6) mais il faut rajouter le type DA (44%), jamais vu en France jusqu'à présent. Il n'est pas possible d'expliquer la présence de ce groupe d'haplotypes du Danube, lignée mitochondriale occupant tout le Danube et l'est de ce bassin jusqu'en Chine (Bernatchez 2001). Ce type "exotique" associé aux types domestiques AT et au type local ME6 tend à montrer que c'est une population mélangée, contredisant un type Têt distinct.

- la lignée **Carança** se reconnaît au groupe d'haplotypes ME3.

2.3.3. Classer les échantillons d'après leur composition en types génétiques

L'impact de l'activité humaine a été exponentielle dans les rivières depuis la création de la première pisciculture commerciale à vocation nationale il y a un siècle et demi ("Piscifaculture de Huningue" ouverte en 1852). Dans d'autres milieux, une activité similaire a mené à l'extinction de nombreuses espèces et à la réduction de la biodiversité. Dans nos rivières, la truite, centre d'intérêt, a été préservée tandis que d'autres espèces sont en perte de vitesse. Parmi les truites, ce sont les formes naturelles locales, adaptées au milieu depuis plus de dix milliers d'années, qui sont menacées, pas l'espèce. Il est donc intéressant d'observer comment les formes introduites ont impacté les formes naturelles.

Les populations composées d'une seule lignée génétique sont rares... C'est la conséquence principale de cette activité humaine. Parmi les 29 échantillons naturels analysés ici, les populations non mélangées (ou très peu) sont la Carança amont (lignée Carança), le Tech à Prats de Mollo et la Coumélade La Llau (lignée Tech)... ce qui fait peu.

La Têt amont présente bien une "lignée Têt", mais son origine n'est plus considérée comme naturelle.

Il y a aussi la Lladure aval (89% du type Med pour les microsatellites et 100% du type PO pour l'ADN mitochondrial) dont il est difficile d'affirmer aujourd'hui que ce peuplement est naturel.

Le ruisseau de Tassia (type Carança pur) était vide de truites avant les années 70. Il a été repeuplé par les truitelles de Sahorre à plus de 95%.

Enfin, les populations Nohède amont et aval et Coumélade Troncasses, et dans une moindre mesure Soulanette et Grafouil sont composées de truites atlantiques domestiques.

Toutes les autres stations sont des mélanges entre forme naturelle et une ou plusieurs souches domestiques (Atlantique P2 ou P1, Roquebillière et Carança... et leurs correspondants en haplotypes mitochondriaux). Il est probable qu'après quelques dizaines de croisements, ces populations composites produisent une robe propre aux hybrides, complexifiant l'estimation visuelle intuitive de la composition d'une population.

Les résultats génétiques améliorent la compréhension du processus complexe d'introduction de multiples formes domestiques ou naturelles (translocations) étagées sur presque deux siècles. Quelques cas inexpliqués persistent pour l'instant:

- Nous avons la Coumélade à Banat avec 13% de Med sur 73% du type Tech attendu... et de manière générale il est difficile de comprendre l'origine de cette lignée Med caractérisée très probablement par l'haplotype mitochondrial ME6 et donc naturelle.

- Il y a l'Eyne aval cumulant 34% du type Med et 53% du type Tech, du coup le type Eyne (défini en 2011: Berrebi & Cherbonnel, 2011) ne se distingue plus dans la présente analyse: par comparaison des assignations des deux analyses (celle des projets EYN1 et PO7),

l'essentiel du type Eyne de EYN1 devient le type Tech dans PO7. Dans la mesure où une analyse complémentaire des truites de l'Eyne est prévue en 2013, cette question est remise à la prochaine étape.

L'information apportée par l'ADN mitochondrial a eu pour conséquence une confirmation des hypothèses expliquant les résultats microsattellites. La présence d'un haplotype de type DA dans la Têt n'est pas explicable mais permet de caractériser cette lignée. Malgré une impression de complexification, l'apport de ce marqueur a fixé les idées pour plusieurs hypothèses importantes (type P2, type Têt, description de l'échantillon Boulzane...)

Fait à Montpellier le 15 mai 2013

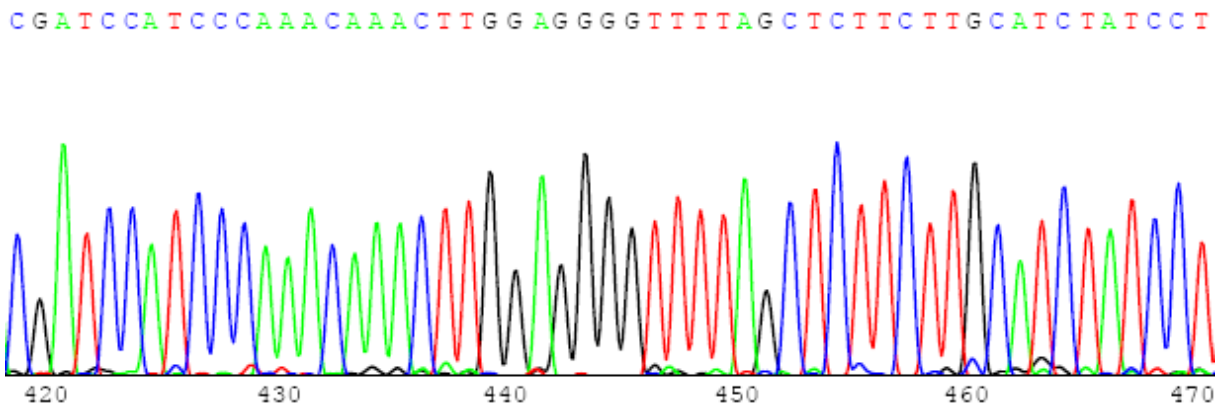
3. Références bibliographiques

- Bernatchez L. 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55(2), 351-379.
- Berrebi P. 1995. Analyse génétique des truites fario des rivières méditerranéennes des Pyrénées françaises. Marqueurs enzymatiques. Rapport de contrat TFP, CSP, CEE, Club Halieutique, mars 1995, 17p. + annexes.
- Berrebi P. 2001. Etude génétique de la truite commune (*Salmo trutta*) dans quelques sites du Parc national du Mercantour (marqueurs allozymiques). *Rapport de contrat*, Université Montpellier II, 19 p. + annexe (MERC1).
- Berrebi P., Cherbonnel C. 2009. Cartographie génétique des populations sauvages de truites françaises - Programme GENESALM - tome 1 - version du 15 décembre 2009. 22p (GENESALM2).
- Berrebi P., Shao Z., Reynaud N. 2010. Rapport d'analyse des truites des Pyrénées Orientales - microsattellites et séquençage de la Dloop - mai 2010, 10p. Université Montpellier 2 (PO4).
- Berrebi P., Cherbonnel C., Shao Z. 2011. Analyse génétique des truites des Pyrénées Orientales - Etape 2 - Têt, Carança, Llech, Prat d'En Salze - Rapport de juin 2011: 14p. Université Montpellier 2, Rapport d'analyses pour la Fédération de Pêche 66 et l'ONF (PO5).

Berrebi P., Cherbonnel C. 2011. Etude génétique de l'origine des truites de l'Eyne, rivière des Pyrénées Orientales, dans la Réserve Naturelle d'Eyne - Rapport de février 2011: 14p. Université de Montpellier 2 (EYN1).

Berrebi P., Shao Z., Cambon D., Baudier O. 2012. Analyse génétique des truites des Pyrénées Orientales - Etape 3 - Tech (Coumélade, Las Illas, Tassia) - Rapport de mars 2012. Rapport d'étude pour la FD66 et l'ONF. 14p. Université Montpellier 2 (PO6).

Reynaud N., Tougard C., Berrebi P. (2011) Structuration géographique de la truite commune (*Salmo trutta* L.) en France basée sur le séquençage de la région de contrôle mitochondriale, p. 45p. Rapport d'étude pour l'OSU OREME, Université Montpellier 2.



Exemple de séquence de l'ADN mitochondrial tel que produite par un séquenceur automatique. Les courbes de mesure permettent de déduire les séquences composées des quatre nucléotides du code universel: C, G, T et A.