

**Analyse génétiques des truites de deux rivières d'Eure-et-Loir
dans le cadre du programme national Genetrutta (12 microsatellites)**

Programme GT-E&L
Rapport d'août 2013



© FD28

Analyses statistiques, interprétation, rédaction: Patrick Berrebi*
Analyses moléculaires: GENINDEXE**

* 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

** GENINDEXE, 6 rue des Sports, 17000 La Rochelle, tel: 05 46 30 69 66, contact@genindexe.com

1. Introduction

Ce projet d'analyse entre dans le cadre de la connaissance des lignées de truites de France. Ces échantillons d'Eure et Loir entrera dans le rapport national GENETRUTTA de juillet 2014. Les analyses génétiques sont interprétables en par comparaison: on ne peut comprendre la nature génétique d'un échantillon de truites que si nous disposons d'échantillons des sous-bassins et bassins voisin à titre de comparaison.

Dans son projet national GENETRUTTA (qui suit le programme national GENESALM 2006-2008), l'Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier (ISEM) ne dispose pas d'échantillons des cours d'eau Eure ou Loir. Le présent rapport rendra donc compte de la comparaison entre les deux échantillons de 2013 et de la comparaison de ces derniers avec les truites commerciales domestiques atlantiques françaises. Le positionnement des truites d'Eure et Loir dans la diversité française sera faite à l'occasion du prochain rapport GENETRUTTA de juillet 2014 GT2014 (le rapport GT2013 a déjà été rédigé).

2. Echantillonnage

Les deux stations analysées dans le présent rapport sont détaillées dans le Tableau 1. Les 56 échantillons de nageoires sont parvenus au laboratoire de Montpellier le 1er juillet 2013. Pierre Fetter est le correspondant de la Fédération de Pêche 28 (FD28) pour ce projet GT-E&L.

En plus des échantillons d'Eure et Loir de 2013, des échantillons de quatre piscicultures nationales élevant la souche commerciale la plus distribuée en France ont été pris pour référence (Tableau 1).

| Echantillon | Date | N° ISEM | lot ISEM | Nbre | N° terrain | Réseau hydrographique |
|------------------------------|------------|---------------|----------|------|-------------------|-------------------------|
| Thironne | 10/06/2013 | T25043-T25068 | L187 | 26 | FD28-2012-01 à 26 | Loir-Sarthe-Maine-Loire |
| Ruisseau Saint Martin | 13/06/2013 | T25069-T25098 | L196 | 30 | FD28-2012-27 à 56 | Blaise-Eure-Seine |
| Pisciculture Isère | 2008 | T16926-T16935 | L266 | 10 | 108-101 à 110 | - |
| Pisciculture Seine Maritime | 2008 | T16976-T16985 | L267 | 10 | 108-241 à 250 | - |
| Pisciculture Pas de Calais | 2008 | T16989-T16998 | L268 | 10 | 108-314 à 323 | - |
| Pisciculture Ain | 2008 | T17016-T17025 | L269 | 10 | 108-401 à 410 | - |

Tableau 1 : Caractéristiques des truites analysées dans ce rapport (lignes bleues) et des truites domestiques atlantiques de référence servant aux comparaisons (en gris).

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 extrait dans une mixture de protéinase K (détruit les protéines et libère

l'ADN) et de Chelex (chélateur des enzymes destructeurs 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 (deux allèles, chacun légué par un des parents de la 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 la longueur des fragments d'ADN, ces mesures sont contrôlées par un ingénieur expérimenté car elles comportent de nombreux pièges.

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) d'échantillons déjà analysés (voir Tableau 1), la matrice finale permet d'effectuer les traitements statistiques suivants, constitués de deux étapes principales.

L'**analyse multidimensionnelle** (ici un Analyse Factorielle des Correspondances ou AFC effectuée grâce au logiciel GENETIX) produit un diagramme où chaque truite est positionnée en fonction de son génotype à tous les marqueurs microsatellites. 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 et de comprendre de quel type sont les truites analysées. Cette méthode permet en particulier de détecter les hybrides entre formes naturelles et domestiques.

Une fois les lignées déterminées, les **paramètres populationnels** classiques de la génétique des populations sont calculés pour chaque lignée et chaque station: la diversité génétique (H_{nb} = hétérozygotie théorique non biaisée) et la panmixie ou probabilité égale pour chaque membre d'une population de truite de se reproduire avec tout autre membre de sexe opposé (F_{is}). 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 1 suffit amplement au diagnostic. Le fait que les deux échantillons naturels et les truites domestiques paraissent différents et totalement disjoints nous montre qu'il n'y a pas de similitude entre les trois entités analysées: la Thironne, le ruisseau Saint Martin et les truites domestiques (qui elles sont très semblables entre elles bien que provenant des quatre coins de France).

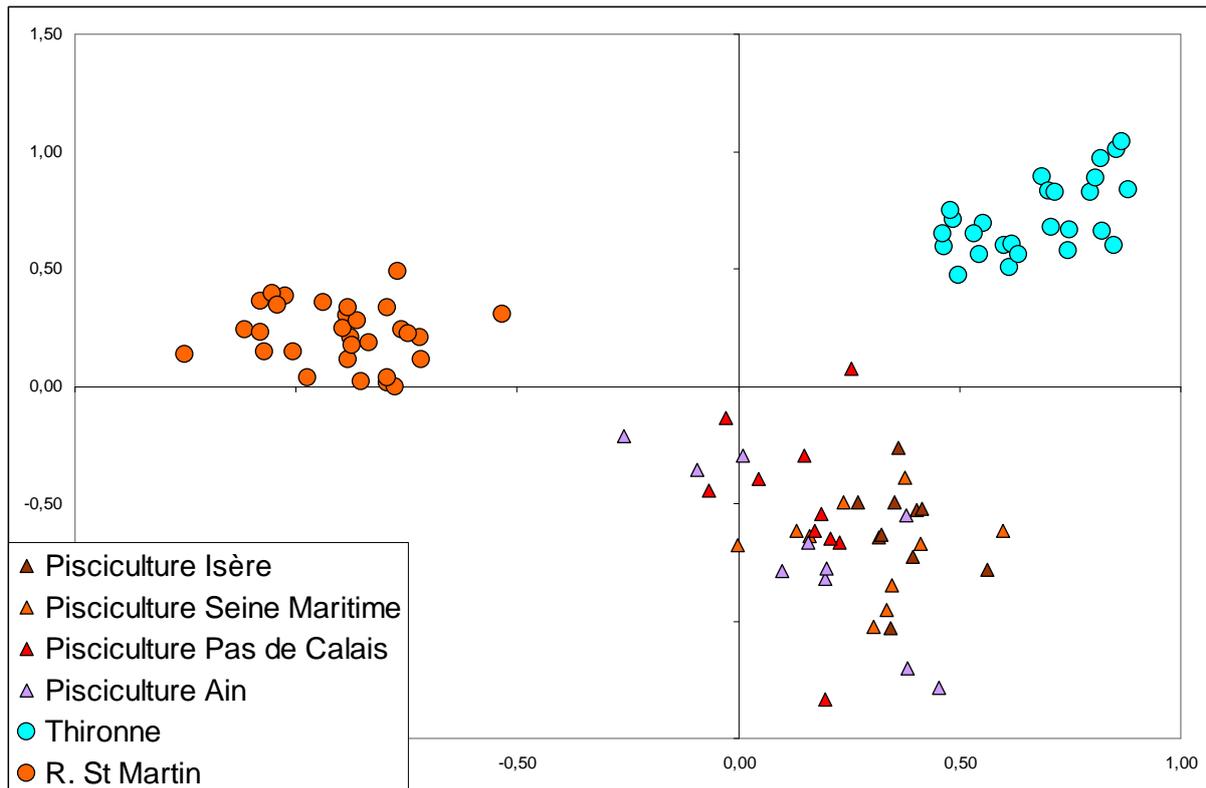


Figure 1: Analyse multidimensionnelle montrant que les deux échantillons naturels et les truites domestiques constituent trois entités génétiques distinctes (espace entre les nuages de points). Cela permet d'affirmer qu'aucune trace de truite domestiques n'est décelable dans ces échantillons naturels et que ces derniers sont fortement différents entre eux.

5.2. - Paramètres populationnels

Le calcul des paramètres de la **diversité génétique** a donné $H_{nb}=0,58$ pour la Thironne et $H_{nb}=0,61$ pour Saint Martin. Ces valeurs sont normales pour les petites populations naturelles. A titre de comparaison, les souches de pisciculture, issues de multiples croisements, présentent généralement une diversité H_{nb} de 0,7 à 0,8 qui sont considérées comme les valeurs quasi-maximales de l'espèce.

Le test de panmixie a donné une valeur de F_{is} de -0.010 pour la Thironne et -0.025 pour Saint Martin. Ces deux valeurs ne sont pas significatives (par test de 5000 permutations), ces deux populations naturelles peuvent être considérées comme en équilibre panmictique, signe d'une absence d'immigrants naturels (provenant d'une autre rivière) ou artificiels (repeuplements).

6. Interprétation et discussion

Comme déjà indiqué, il n'est pas possible pour le présent rapport de positionner les deux populations échantillonnées dans la diversité naturelle des truites de France.

Ce sera l'objectif du programme GENETRUTTA et spécialement de son étape n°2 (le rapport de juillet 2014 ou GT2014).

Les présentes analyses nous donnent cependant des informations capitales: les truites des deux rivières échantillonnées n'ont aucune similitude avec la souche domestique commerciale nationale.

Elles n'ont pas plus de similitudes entre elles, ce qui était attendu puisque - la Thironne appartient à la Loire et St Martin à la Seine.

On remarque aussi que les robes sont très différentes:

- peu de ponctuations sombres sur le dos et rouge ocellé de blanc sur les flancs pour la Loire;

- très nombreux points noirs et pas de points rouges pour la Seine.

Il faut cependant être prudent: les truites modifient beaucoup leur robe en grandissant et les vieux spécimens ne ressemblent plus aux 2-3 ans. Ici les truites prises comme exemple (Annexe 2) ne sont pas de la même taille et les photos de St Martin ne sont pas nombreuses.

A notre connaissance, sur la Thironne, il n'y a plus d'empoissonnement depuis environ 20 ans (ils étaient très limités). La population peut se maintenir naturellement puisque de nombreux sites de reproduction ont été observés en amont du site d'échantillonnage (Chassant).

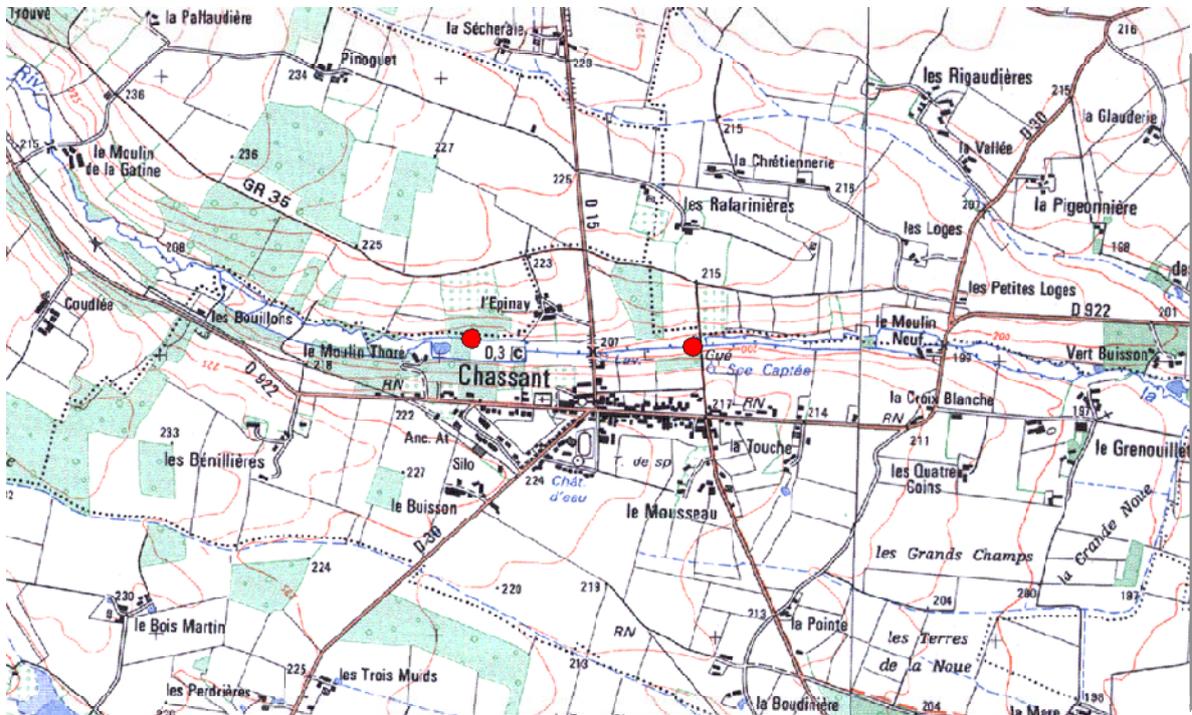
Sur le ruisseau Saint-Martin, les derniers alevinages connus sont ceux de la Fédération dans les années 80. Dans l'Eure (sous-bassin de la Seine où se trouve le ruisseau Saint Martin), des truitelles sont introduites, provenant de la pisciculture de la Fédération de l'Eure. Cette pisciculture entretient une souche locale avec des géniteurs prélevés dans l'Avre et l'Iton les deux affluents de l'Eure situés en aval immédiat de la Blaise. Bien que peu probable, si ces truites pénétraient le ruisseau Saint Martin, étant d'origine naturelle locale, il n'est pas sur que l'analyse génétique puisse les détecter.

Les deux populations analysées sont parfaitement naturelles, avec une diversité génétique normale pour des populations de petite taille, et ne présentent aucun signe de perturbation (panmixie). Tout se passe comme si elles étaient gérées de façon patrimoniale.

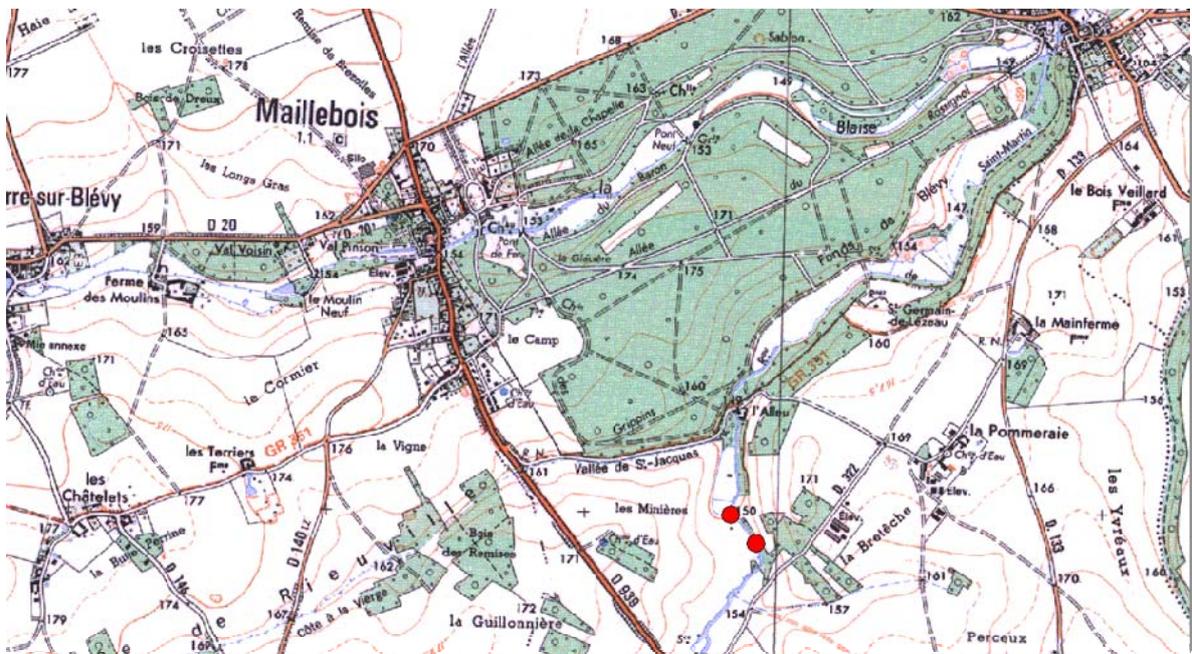
Fait à Montpellier le 09 août 2013

7. Annexes

Annexe 1: Positionnement précise des deux stations d'échantillonnage



7.1.1. Station Thironne



7.1.2. Station Saint Martin

Annexe 2: Types morphologiques



7.2.1. Type Thironne (truite 06, 340 mm)



7.2.2. Type Saint Martin (truite 27, 451 mm)