

**Analyse génétique des truites du département du Tarn
(Gijou, Vèbre, Durenque et souches de la pisciculture de Pujol)
au niveau de 12 marqueurs microsatellites
(participant au projet GENETRUTTA 2012-2015)**

Projet TARN2
Rapport de mars 2013



Montroucouis

© FD81

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 campagne d'analyses génétiques entre dans le cadre de la description du cheptel salmonicole du département du Tarn, mené depuis 2010 par la Fédération Départementale de Pêche. En 2012, de nouvelles analyses génétiques ont concerné 3 nouveaux cours d'eau : la Vèbre, le Gijou et la Durenque, ainsi que 2 souches de géniteurs entretenues dans la pisciculture départementale.

2. Echantillonnage

Les 5 échantillons analysés dans le présent rapport sont détaillées dans le Tableau 1 et leur localisation dans la Figure 1. Les 100 échantillons de nageoires sont parvenus le 5 novembre 2012 au laboratoire de Montpellier. Bénédicte Prouff est la correspondante de la Fédération de Pêche 81 pour ce projet TARN2.

En plus des truites capturées en 2012, des échantillons de référence ont été ajoutés: des échantillons de rivières voisines déjà analysées (Dadou, Sorgue, Jonte) ainsi que des échantillons de truites domestiques commerciales françaises provenant de deux piscicultures (Seine Maritime et Pas de Calais) (Tableau 1).

| N° station | Cours d'eau | Localité | Réseau | N | Date | Rapport | N° éch. ISEM | N° individus ISEM | N° terrain | N° national |
|------------|----------------------------------|-------------------|---------------------|----|------------|----------|--------------|-------------------|--------------------|-------------|
| 1 | Rec Escur | La Salesse | Vèbre/Agout/Tarn | 20 | 30/10/2012 | TARN2 | L549 | T24197-T24216 | 2012-FD81-01 à 20 | GT.66 |
| 2 | Verdet | La Croix Jeannade | Durenque/Agout/Tarn | 20 | 30/10/2012 | TARN2 | L550 | T24217-T24236 | 2012-FD81-21 à 40 | GT.67 |
| 3 | Montroucoux | sources | Gijou/Agout/Tarn | 20 | 30/10/2012 | TARN2 | L551 | T24237-T24256 | 2012-FD81-41 à 60 | GT.68 |
| 4 | Pisciculture Pujol - Géniteurs 1 | - | (souche locale) | 20 | 09/10/2012 | TARN2 | L552 | T24257-T24276 | 2012-FD81-61 à 80 | GT.69 |
| 5 | Pisciculture Pujol - Géniteurs 2 | - | (souche Causerets) | 20 | 09/10/2012 | TARN2 | L553 | T24277-T24296 | 2012-FD81-81 à 100 | GT.70 |
| 6 | Arn | Moulin de Bonnet | Thoré/Agout/Tarn | 20 | 01/10/2010 | TARN1 | L323 | T18303-T18322 | Tarn2010-01 à 20 | GT.41 |
| 7 | Verdier | Brassac | Agout/Tarn | 20 | 22/10/2010 | TARN1 | L324 | T18323-T18342 | Tarn2010-21 à 40 | GT.45 |
| 8 | Thoré | Brugas | Agout/Tarn | 20 | 06/10/2010 | TARN1 | L325 | T18343-T18362 | Tarn2010-41 à 60 | GT.47 |
| 9 | Ayguebelle | Borie Grande | Sor/Agout/Tarn | 20 | 06/10/2010 | TARN1 | L326 | T18363-T18382 | Tarn2010-61 à 80 | GT.50 |
| 10 | Oulas | Paulinet | Dadou/Agout/Tarn | 20 | 2008 | GENSALM2 | L262 | T16835-T16854 | Str600 à 619 | GS-30 |
| 11 | Fouzette | - | Sorgues/Tarn | 20 | 19/11/2008 | GENSALM2 | L218 | T15786-T15800 | Str426 à 445 | GS-03 |
| 12 | Béthuzon | - | Jonte/Tarn | 20 | 2008 | GENSALM2 | L222 | T15893-T15912 | Str1017 à 1037 | GS-21 |
| 13 | Pisc. Seine Maritime | - | - | 20 | 2008 | GENSALM2 | L267 | T16956-T16975 | 108-221 à 240 | GS-36 |
| 14 | Pisc. Pas de Calais | - | - | 20 | 2008 | GENSALM2 | L268 | T16986-T17006 | 108-311 à 351 | GS-35 |

Tableau 1 : Caractéristiques des truites analysées dans ce rapport (lignes jaunes), de celles du projet TARN1 (en bleu) et des truites de référence servant aux comparaisons (en blanc) dont les truites domestiques atlantiques (en gris).

Rapports d'où sont tirées les données: GENESALM2 = Berrebi, Cherbonnel, 2009; TARN1 = Berrebi, Cherbonnel, 2011; TARN2 = Berrebi, Shao, 2013 (présent rapport).

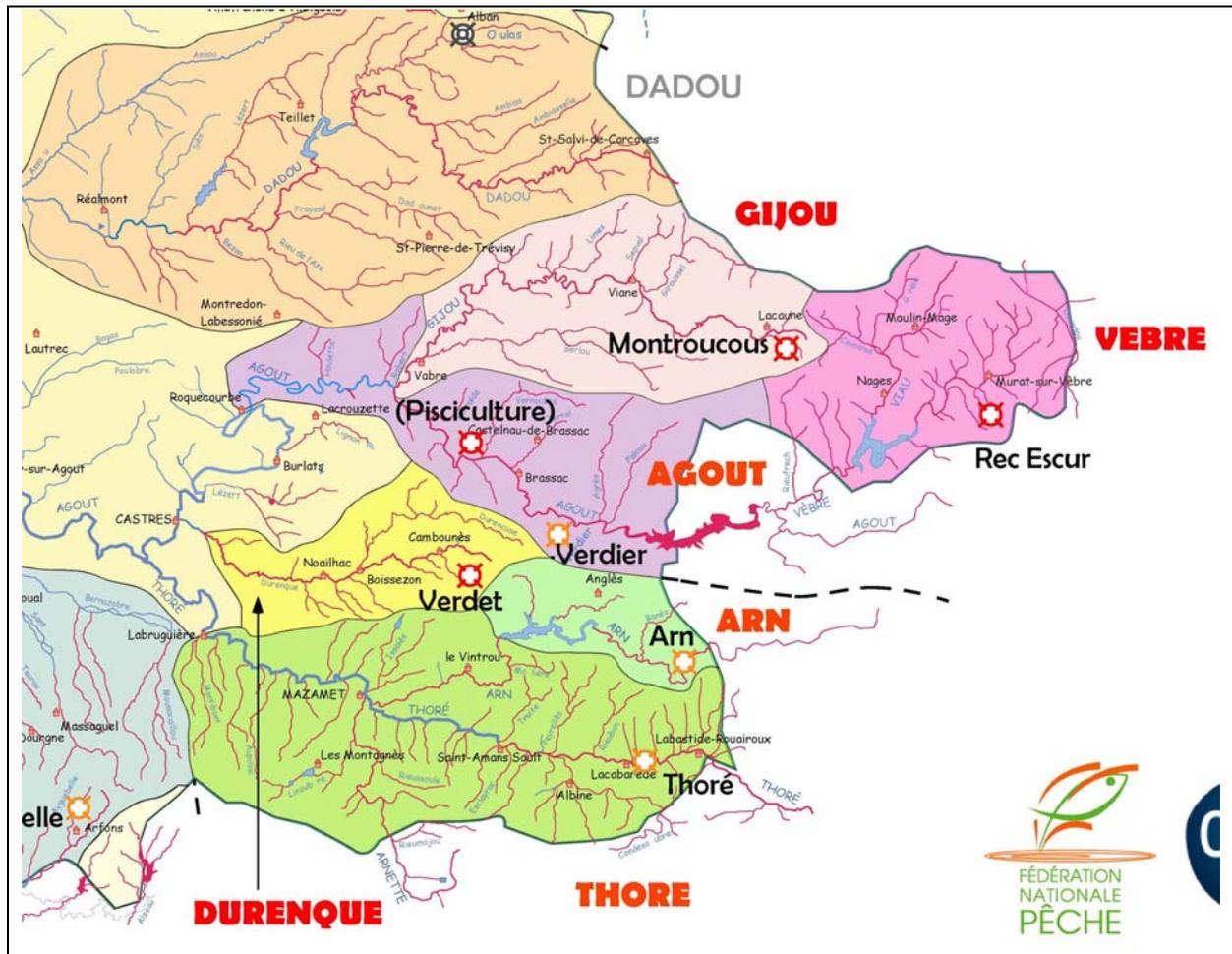


Figure 1 : Positionnement des échantillons analysés dans le présent rapport (marques rouges), dans le rapport précédent (TARN1, marques orange) et d'un échantillon de référence du réseau hydrographique local (marque noire). Les caractéristiques de ces échantillons et des autres échantillons de référence sont données au Tableau 1.

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 destructeurs naturels 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 la longueur des fragments d'ADN, ces mesures automatiques sont contrôlées et adaptées 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) d'échantillons déjà connues (voir Tableau 1), la matrice finale permet d'effectuer les traitements statistiques suivants, constitués de trois étapes principales.

L'**analyse multidimensionnelle** (ici un 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 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 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. 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 dans un échantillon) 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 génétiques entre truites.

Dans la Figure 2, nous voyons que la diversité due à certains échantillons de référence (spécialement Dadou et Agout) provoque une contraction de la zone intéressante vers le haut. La Figure 3 est débarrassée de certaines références trop différentes, ce qui permet de préciser le diagnostic.

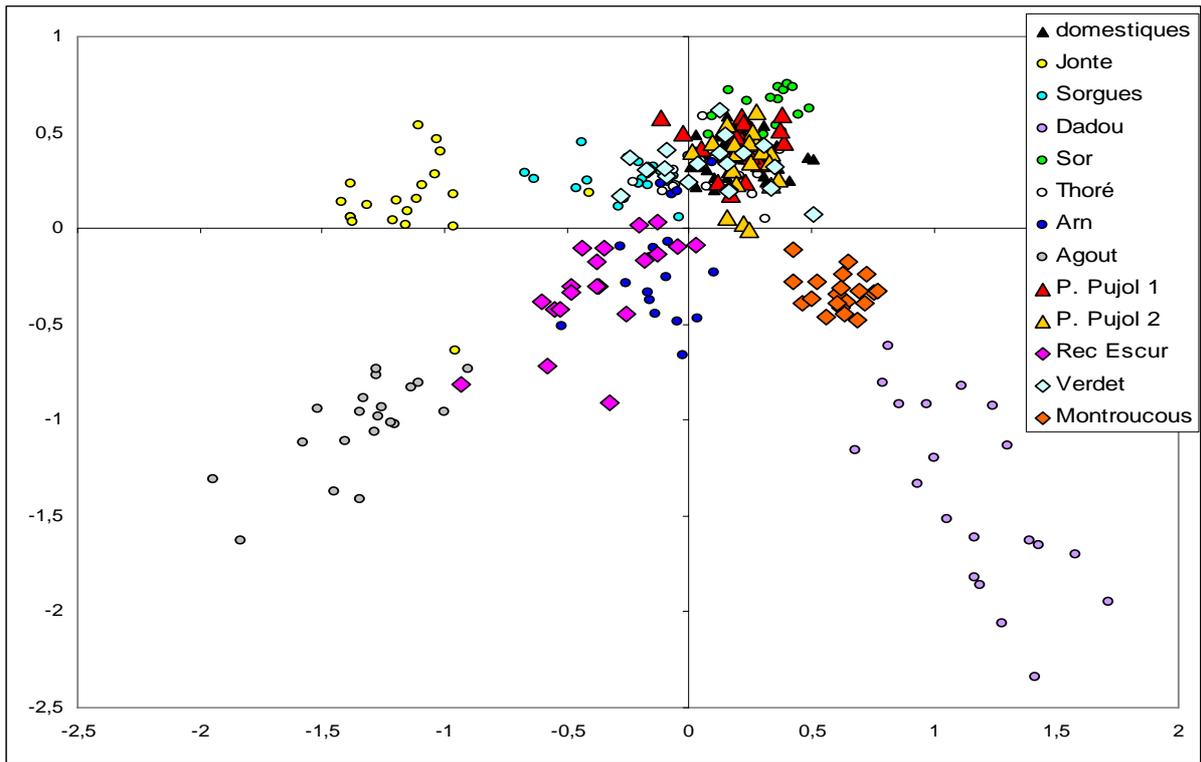


Figure 2 : Analyse multidimensionnelle de la totalité des échantillons du tableau 1. Les truites du Dadou et de l'Agout semblent les plus différenciées (pour une meilleure visibilité des couleurs, il suffit de grossir l'image sur votre écran).

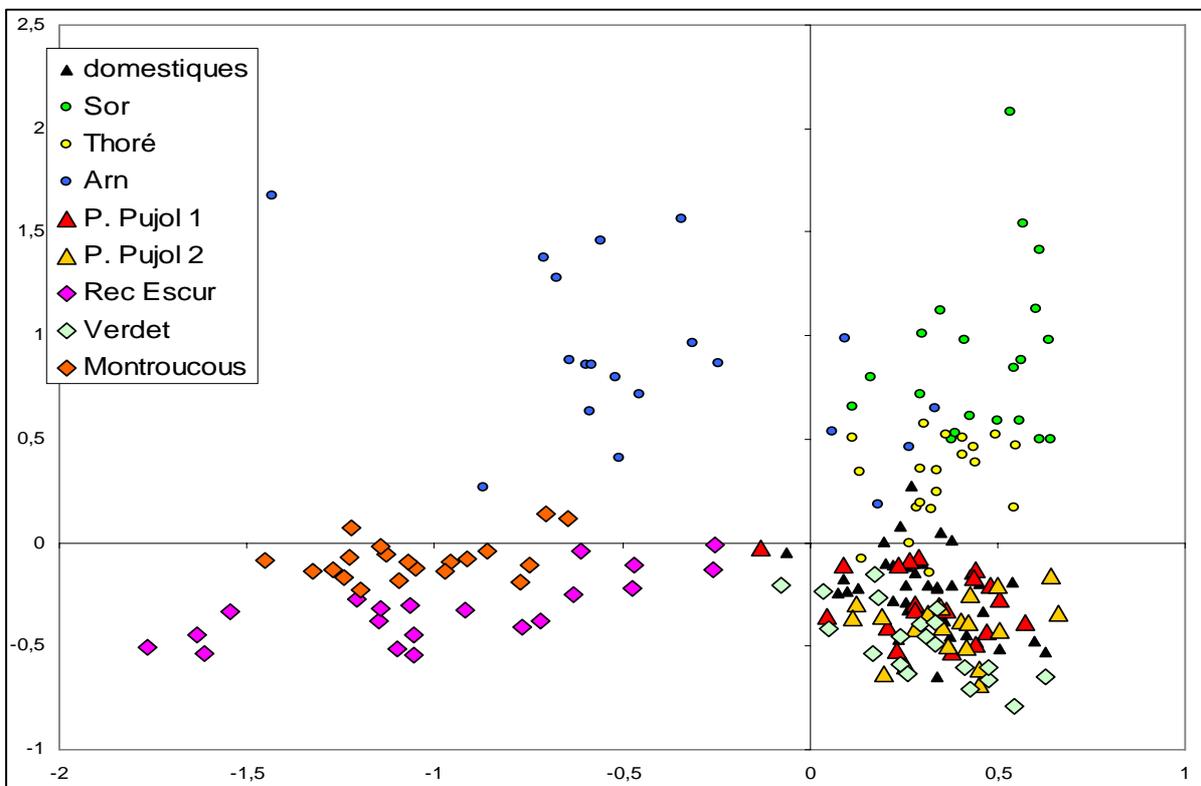


Figure 3 : Même analyse après avoir retiré les échantillons les plus différenciés.

Le diagramme nous montre d'abord que les truites domestiques sont très présentes dans la zone étudiée. Marquées par des triangles noirs, ces truites domestiques occupent la zone concentrée des deux graphiques présentés. On peut en déduire que les échantillons de la pisciculture de Pujol (les deux) sont essentiellement du même type domestique. Le cas du Verdet est plus complexe parce que ces truites se distinguent légèrement des truites domestiques le long du troisième axe (dans la profondeur du graphique). Les valeurs de F_{st} ($0,08 < F_{st} < 0,11$) nous diront que cette ressemblance n'est pas une identité. En ce qui concerne les échantillons de 2012, Rec Escur et Montroucoux semblent d'un type différent, la Figure 2 les différenciant bien. La Figure 3 montre bien que hors de la masse centrale des domestiques engluant les truites de la pisciculture de Pujol et celles de Verdet (Durenque) et seulement quelques truites du Thoré, toutes les autres truites semblent indemnes de présence domestique.

5.2 - Analyse d'assignation

Cette analyse a pour objectif de découper l'échantillon total (truites du Tarn de 2010 et 2010 et autres truites de référence) en k sous-groupes (ici $k=8$ et $k=10$ ont été testés) ressemblant le plus à des populations à l'équilibre génétique. Ce test se fait sans tenir compte de l'appartenance des truites à leur échantillon. Chaque sous-groupe prend une couleur différente.

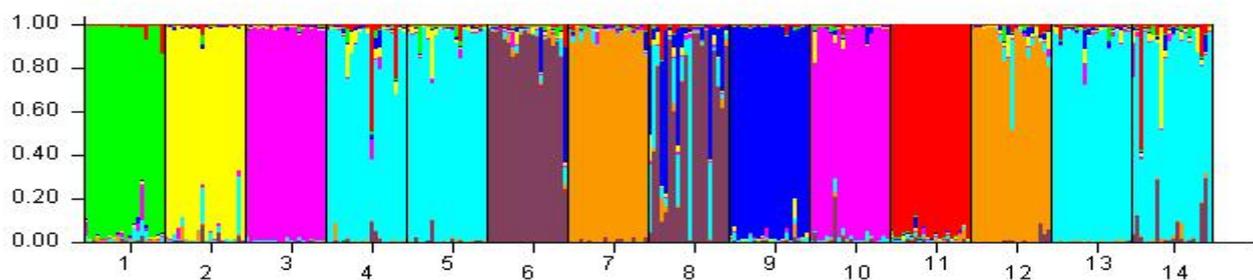


Figure 4 : Diagramme présentant la meilleure partition pour $k=8$. Les numéros du bas se rapportent au Tableau 1. On remarque (i) la similitude des souches de pisciculture en bleu clair (les deux souches de Pujol n°4 et 5 et celles des piscicultures atlantiques commerciales n°13 et 14); (ii) la ressemblance entre les populations de Montroucoux (3) et du Dadou (Oulas, 10); (iii) l'homogénéité du Thoré (8) et de son affluent l'Arn (6); (iv) le rapprochement Agout-Jonte (7 et 12).

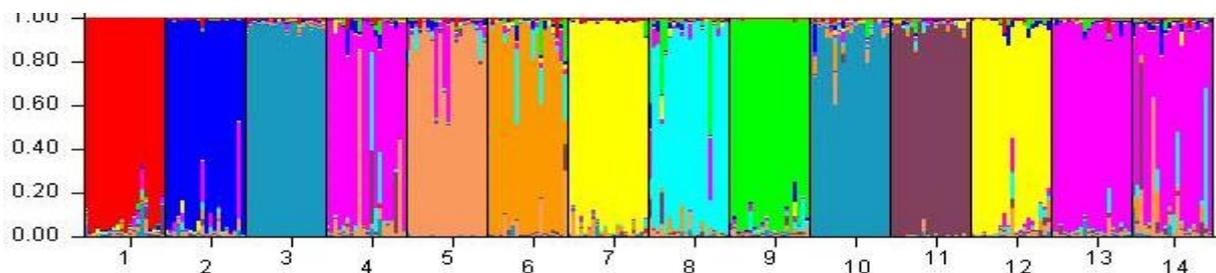


Figure 5 : Même analyse présentant la partition en 10 sous-groupes ($k=10$). Attention, les couleurs sont données au hasard par le logiciel STRUCTURE. Noter que 5 n'est pas de la même couleur que 6.

Les deux éléments nouveaux apportés par cette hypothèse à 10 sous-groupes sont (i) la distinction entre la souche Pujol-2 (échantillon 5) et la souche domestique nationale (13 &

14) similaire à la souche Pujol-1 (4); (ii) la différenciation entre le Thoré (8) et son affluent l'Arn (6).

En ce qui concerne les échantillons de 2012, l'analyse d'assignation pour $k=8$ (Figure 4) confirme et précise les analyses multidimensionnelles. La superposition centrale observée aux Figures 2 et 3 correspondait bien à la similitude entre formes domestiques locales (pisciculture de Pujol) et commerciales lointaines. Par contre le Verdet (2) est distinct des truites domestiques. Le rapprochement Gijou-Dadou, ne correspondant pas à un rapprochement géographique, est difficile à expliquer, surtout qu'il n'est pas confirmé par leur F_{st} (de l'ordre de 0,3... ce qui est considérable). Ces deux affluents de l'Agout échangeaient peut-être des migrants il y a quelques milliers d'années, mais les analyses sont assez contradictoires. Pour les autres populations, une forte différenciation est de mise: les couleurs verte et jaune de la Figure 4 ne sont partagées avec aucun échantillon de référence.

En poussant plus loin le morcellement des truites analysées, un niveau de différenciation plus faible peut être décrit. Ainsi, tout en confirmant que les deux souches de la pisciculture de Pujol sont proches de la souche domestique nationale (Figure 4), nous voyons que la souche Pujol-2 (récemment importée de la pisciculture de Cauterets) s'en distingue légèrement mais pas la souche Pujol-1 (souche locale historique). De même, les parties amont du Thoré et de l'Arn se distinguent légèrement (plus il faut aller loin dans le nombre de sous-groupes, ici $k=10$, plus les structures décrites sont faibles).

6. Interprétation et discussion

Les analyses détaillées effectuées sur les échantillons de 2010 (Berrebi, Cherbonnel, 2011) et 2012 (présent rapport) nous montrent une région peuplée de truites isolées sans échange fréquents entre affluents. Le calcul des F_{st} (Tableau 2) nous permet de dire que tous les échantillons analysés sont génétiquement distincts, le test l'affirme avec une probabilité de plus de 999/1000 (on dit que cette probabilité est hautement significative ou ***). On peut en conclure que les ressemblances/dissimilitudes des populations sauvages sont l'image de l'ancienneté de leur isolement.

Par exemple, le Tableau 2 nous dit que le groupe d'échantillons naturels qui se ressemblent le plus sont ceux du Thoré, de l'Arn et du Sor ($0,07 < F_{st} < 0,11$ - cellules vertes). Ces populations se sont isolées relativement récemment. A l'inverse, les populations de truites du Béthuzon (Jonte) se distinguent fortement de toutes les truites du sous bassin de l'Agout ($0,25 < F_{st} < 0,46$ qui sont des valeurs très élevées - cellules jaunes). Ceci est dû à une forte sédentarité des truites accumulant de la différence génétique en fonction du temps d'isolement.

Selon l'analyse d'assignation à 8 sous-groupes ($k=8$, Figure 4), une nette ressemblance est démontrée entre truites de pisciculture locale (Pujol) et lointaines (Seine Maritime et Pas de Calais). Ceci est confirmé par des F_{st} très faibles entre ces établissements ($0,02 < F_{st} < 0,08$ - cellules bleues). Cette similitude permet de comptabiliser ces souches domestiques dans les populations sauvages comme étant l'influence des repeuplements qui sont localement pratiqués depuis des décennies à partir de piscicultures lointaines ou départementales.

L'analyse d'assignation suivante (Figure 5) basée sur une subdivision en 10 sous-groupes ($k=10$), montre que la souche Pujol-2 (origine Cauterets) se distingue légèrement de la souche domestique nationale. Le Tableau 2 confirme ces observations: Pujol-2 se distingue légèrement des souches nationales ($0,06 < F_{st} < 0,08$) mais pas Pujol-1 dont les valeurs de F_{st} ($0,02 < F_{st} < 0,03$) vis-à-vis des souches nationales sont inférieures à la différenciation entre

souches domestiques nationales de Seine-Maritime et du Pas de Calais (Fst=0,04 - cellule grise).

Dans tous les échantillons de rivière, l'impact domestique est quasi-nul (entre 1 et 4%, ce qui est en dessous de la limite de détection de la méthode) à la seule exception du Thoré hybridé à 15% (couleur bleue claire dans le brun de la station 8 de la Figure 4). On peut en conclure que quasiment tous les alevinages des zones prospectées ont été des échecs.

| 2 Ver | 3 Mon | 4 Pu1 | 5 Pu2 | 6 Arn | 7 Ago | 8 Tho | 9 Sor | 10 Oul | 11 Fou | 12 Bét | 13 PSM | 14 PPC | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|
| 0,24 | 0,33 | 0,17 | 0,18 | 0,17 | 0,25 | 0,20 | 0,17 | 0,26 | 0,17 | 0,29 | 0,17 | 0,17 | 1-REs |
| | 0,27 | 0,09 | 0,11 | 0,13 | 0,27 | 0,11 | 0,13 | 0,23 | 0,16 | 0,29 | 0,10 | 0,08 | 2-Ver |
| | | 0,23 | 0,28 | 0,23 | 0,39 | 0,29 | 0,28 | 0,29 | 0,28 | 0,46 | 0,26 | 0,27 | 3-Mon |
| | | | 0,05 | 0,10 | 0,25 | 0,07 | 0,08 | 0,18 | 0,10 | 0,24 | 0,03 | 0,02 | 4-Pu1 |
| | | | | 0,11 | 0,26 | 0,09 | 0,12 | 0,20 | 0,14 | 0,27 | 0,08 | 0,06 | 5-Pu2 |
| | | | | | 0,20 | 0,09 | 0,11 | 0,18 | 0,12 | 0,25 | 0,11 | 0,10 | 6-Arn |
| | | | | | | 0,25 | 0,27 | 0,32 | 0,23 | 0,34 | 0,25 | 0,24 | 7-Ago |
| | | | | | | | 0,07 | 0,21 | 0,14 | 0,27 | 0,08 | 0,07 | 8-Tho |
| | | | | | | | | 0,20 | 0,13 | 0,26 | 0,08 | 0,08 | 9-Sor |
| | | | | | | | | | 0,23 | 0,36 | 0,20 | 0,18 | 10-Oul |
| | | | | | | | | | | 0,25 | 0,12 | 0,10 | 11-Fou |
| | | | | | | | | | | | 0,28 | 0,23 | 12-Bét |
| | | | | | | | | | | | | 0,04 | 13-PSM |

Tableau 2 : Calcul des Fst, paramètre de différenciation entre échantillons deux à deux. Les valeurs calculées, à l'intersection d'une ligne et d'une colonne, correspondent à des pourcentages de différenciation. Toutes ces valeurs sont significatives, ce qui signifie qu'aucune paire d'échantillons ne peut provenir de la même population.

Les valeurs remarquables sont en couleur et expliquées dans la discussion.

Traités au niveau de 12 marqueurs microsatellites, les échantillons du Tarn vont être intégrés dans les analyses du projet GENETRUTTA (2012-2015). Ce projet national en continuité avec le projet GENESALM (2006-2008) doit établir la cartographie génétique des truites françaises. Il est probable que les différences observées entre affluent du Tarn ne soient pas perceptibles au niveau national et ne représenteront qu'un seul type génétique. Le premier des trois rapports est prévu pour fin juin 2013.

7. Conclusion

Les différentes méthodes d'interprétation des génotypes (AFC, assignation, Fst) servent à visualiser les résultats, mais surtout à s'assurer qu'une des méthodes ne nous induit pas en erreur: elles doivent converger.

L'AFC et le Fst nous donnent la **quantité de différence** génétique mesurée entre les échantillons (mais l'AFC a tendance à amplifier ces différences). Le Fst est le paramètre le plus fidèle à la réalité mais le moins visuel.

L'assignation ne dit pas si deux entités sont proches ou éloignées, mais plutôt **si deux échantillons sont assimilables à un seul ou pas**: que la différence soit faible ou forte, l'analyse se contente de dire que statistiquement c'est différent.

Ce rapport a établi que les deux souches de la pisciculture de Pujol à Castelnau de Brassac sont très proches de la souche domestique nationale telle qu'on la trouve dans des

piscicultures à grand débit en Seine Maritime ou dans le Pas de Calais, seule la souche Pujol-2 (origine Cauterets) s'en éloigne légèrement (F_{st} d'environ $0,08 = 8\%$).

Ces souches domestiques sont absentes des trois localités analysées dans le présent rapport. Ces localités présentent des truites génétiquement distinctes, donc sédentaires à long terme. A plus grande échelle géographique, les populations les plus ressemblantes sont celles du Thoré, de l'Arn et du Sor.

La ressemblance de l'échantillon du Verdet avec les souches domestiques est fortuite puisque la différence génétique, mesurée avec les F_{st} , est respectable (de l'ordre de 10%).

Dans une région où les repeuplements en souches domestiques ont été inefficaces (seules les truites du Thoré à Brugas accusent une présence de 15% de formes domestiques), une gestion patrimoniale est particulièrement indiquée, permettant le maintien de ces souches sauvages dont peu de départements français peuvent confirmer la présence.

8. Références bibliographiques citées

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., Cherbonnel C. 2011. Composition génétique des truites de l'Agout - Agout, Thoré, Arn et Sor - Génotypage de 16 microsatellites. Rapport d'analyse, Université Montpellier 2. 10p.

Fait à Montpellier le 31 mars 2013