

UFR SCIENCES & TECHNIQUES COTE BASQUE

Université de Pau et des Pays de l'Adour

Licence Biologie des Organismes

**Diversité mitochondriale de la truite
Salmo trutta du Golfe de Gascogne &
tentative d'assignation des truites de
mer à leur population d'origine**

GOUAUX Mélanie

Stage effectué du 07/03/2016 au 04/05/2016 à

INRA – ECOBIOP, D918 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle

Sous la direction scientifique de Mme CHAT Joëlle



"Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil"

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Prévost Etienne, directeur du laboratoire ECOBIOP de l'INRA, pour son accueil dans le cadre de mon stage de 3^{ème} année de Licence de Biologie des Organismes.

Je remercie chaleureusement mon maître de stage, Chat Joëlle, ingénieur de recherche à l'INRA au sein de l'unité ECOBIOP pour m'avoir guidée et conseillée durant mon stage.

Mes remerciements vont également à Lepais Olivier, chargé de recherches au sein d'ECOBIOP à l'INRA, pour ses conseils et son aide, et Manicki Aurélie, assistante ingénieur à ECOBIOP-INRA, pour son accompagnement lors des manipulations en laboratoire, ses conseils lors l'écriture de mon rapport.

Pour finir, je souhaiterais adresser mes plus sincères remerciements à tous les collaborateurs de l'INRA, pour leur sympathie, leurs conseils et pour m'avoir également permis de découvrir les différentes activités pratiquées sur le site de l'INRA.

Avant-propos

Fondé en 1946, l'Institut National de la Recherche Agronomique, l'**INRA**, a pour objectif de mener des recherches afin d'améliorer les techniques d'agriculture et d'élevage en France.

L'Aquapôle, situé à Saint-Pée-sur-Nivelle (Pyrénées-Atlantiques), est composé de 3 unités : l'unité de recherche « **Nutrition, Métabolisme, Aquaculture** » (**NuMéA**), l'unité mixte de recherche « **Ecologie Comportementale et Biologie des Populations de Poissons** » (**ECOBIO**) et une unité d'appui à la recherche « Aquapôle ».

Les thématiques scientifiques sont différentes selon les unités. L'unité **NuMéA** a pour objectif de mieux comprendre le contrôle du métabolisme en étudiant le rôle de chaque nutriment, mais également le rôle des nutriments dans la croissance du poisson. Ces recherches devraient contribuer à une optimisation de la croissance et de l'alimentation dans le temps. Pour l'unité **ECOBIO**, leurs recherches visent à mieux comprendre le fonctionnement des populations naturelles de poissons. Pour cela, des populations sont étudiées sur leur évolution par rapport à des changements globaux mais aussi à des activités anthropiques.

L'**ECOBIO** comprend deux thématiques de recherche. La première est de comprendre, à travers l'étude de juvéniles mais également des adultes, les stratégies que les individus développent afin d'optimiser leurs chances pour la reproduction, la migration, la croissance.... Actuellement des recherches ciblent les salmonidés, comme le saumon et la truite fario, mais aussi l'anguille Européenne, cette dernière étant classée en danger critique d'extinction. Les études menées sur l'anguille Européenne ont pour objectif de rétablir le bon fonctionnement de cette espèce. Les recherches sur le saumon visent à comprendre le fonctionnement de celui-ci par rapport au changement climatique mais également à étudier pourquoi des saumons de différents âges peuvent participer à la reproduction et les impacts que cela a sur l'évolution de la population. Les études sur la truite commune ont pour objectif de maintenir la diversité intraspécifique dans les cours d'eau. Le dernier rapport **ONEMA** (janvier 2015), rédigé par J.Chat, A.Manicki, F.Guéraud et O.Lepais, intitulé Continuité écologique et conservation de la diversité génétique et écotypique d'un grand migrateur (*Salmo trutta*), conclut que la production de truites de mer (TRMs) dans l'Adour n'est pas homogène entre les différents cours d'eau mais que cependant les TRM ont tendance à pratiquer le homing, c'est-à-dire à revenir dans leur bassin d'origine après leur séjour en mer. Par contre, certains cours d'eau tels que les Nives et la Nivelle ont tendance à recevoir la visite de TRMs d'origine ibérique dans leur cours d'eau. Il faut également noter que les truites domestiques se différencient génétiquement des truites sauvages du Golfe de Gascogne.

Lors de mon stage, j'ai eu la chance de pouvoir participer à des pêches électriques même si elles n'avaient aucun lien avec les échantillons que j'ai manipulés. C'est dans une complète autonomie que j'ai procédé aux tests statistiques tout d'abord en essayant en vain sur Excel à cause d'un nombre trop conséquent d'individus, j'ai donc réussi sur R à déterminer le nombre d'haplotypes et à réaliser des tableaux de contingence sur R

Table des matières

1. Introduction	1
2. Matériel et Méthode	4
a. Echantillonnage	4
b. Extraction de l'ADN	5
c. Polymerase Chain Reaction (PCR)	5
d. Séquençage de l'ADN	6
e. Traitement des données	8
3. Résultats et Discussion	10
a. Arbre phylogénétique des haplogroupes	10
b. Diversité haplotypique dans les populations naturelles.....	13
c. Diversité haplotypique au sein des souches domestiques	16
d. Origine des TRM capturées par les professionnels	18
e. Individus originaux :	20
4. Conclusion.....	22
Références Bibliographiques.....	23
a. Ouvrages et Revues :.....	23
b. Sites internet:.....	24
Résumé	25
Annexes.....	26
Annexe 1 : arbre des haplotypes du bassin de l'Adour et certains petits fleuves côtiers	26
Annexe 2 : ScriptR_Haplotype.....	27
Annexe 3 : ScriptR_Tableaudecontingence	28
Annexe 4 : ScriptR_TestindépendanceX ² TRM.....	29
Annexe 5: ScriptR_TestindépendanceX ² TRM_Gaves.....	30

1. Introduction

La truite *Salmo trutta* est une espèce de la famille des Salmonidés (Keith et al, 2011). Elle est originaire d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie occidentale. Cette espèce est dotée d'une plasticité écologique étonnante (Reynaud et al, 2011) : en fonction de son environnement la truite peut avoir un phénotype tout à fait différent (Guyomard, 1989). Dans le passé, ceci a provoqué des confusions taxonomiques, tous les phénotypes étaient décrits comme des espèces différentes. Il a donc été mis en évidence que toutes ces truites, aux phénotypes différents, étaient de la même espèce mais appartenaient à des lignées évolutives différentes (Bernatchez, 2001). En Europe, il a été observée, grâce à des études antérieures, l'existence de 6 lignées évolutives (Cf Figure 1) : atlantique (AT), méditerranéenne (ME) (Marti Corteyet al, 2004), adriatique (AD), duero (DU), danubienne (DA) et *marmoratus* (MA) (E. Giuffra et al, 1994). Ces lignées vont nous permettre de déterminer la diversité d'un cours d'eau échantillonné.

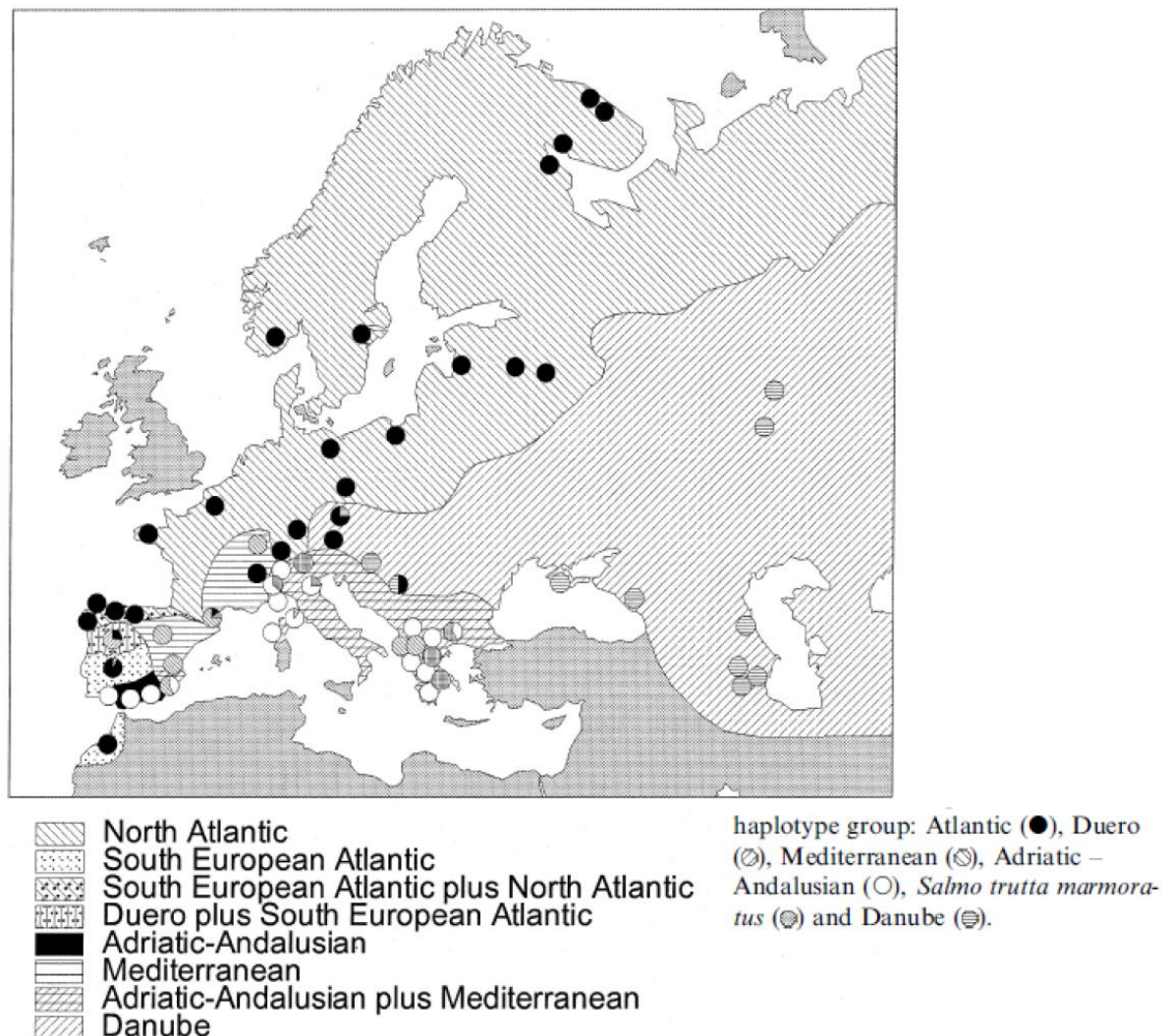


Figure 1. Localisation des différentes lignées évolutives de *Salmo trutta*. Source : J.Suarez et al, 2001

Salmo trutta est une espèce amphihaline anadrome facultative. En effet, toutes les truites naissent en rivière, certaines vont y rester et donc se sédentariser alors que d'autres vont migrer

en mer. Avec cette migration en mer, les truites vont acquérir un phénotype différent des sédentaires, leur robe devient argentée. Ces truites migratrices sont alors nommées truites de mer. Celles-ci remontent ensuite en rivière afin de se reproduire. (Cf Figure 2)

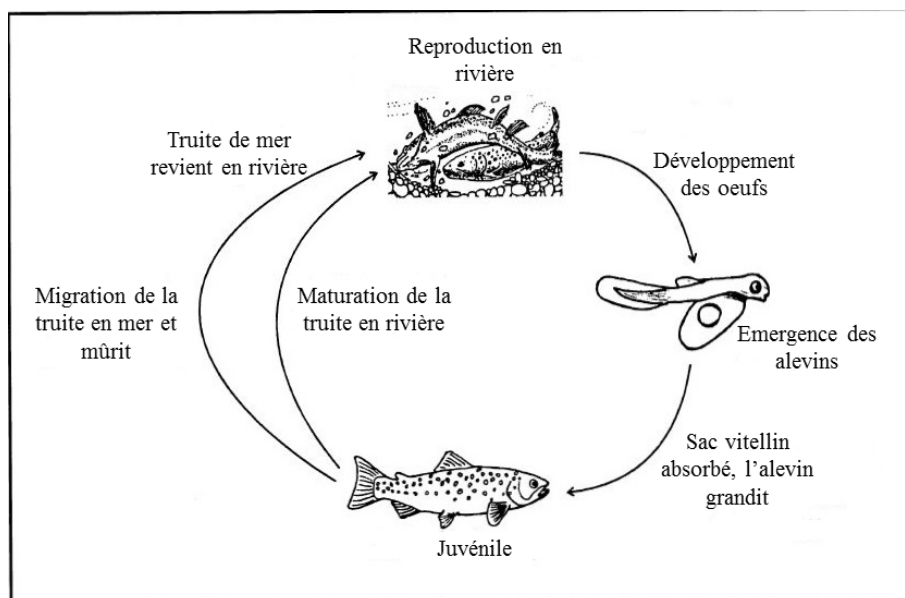


Figure 2. Cycle de vie de *Salmo trutta*

Le but du projet est de connaître la diversité intraspécifique de *Salmo trutta* sur le Golfe de Gascogne en étendant la zone d'étude du nord de l'Europe avec la Suède jusqu'au sud de l'Europe avec l'Espagne. Mais également d'essayer d'assigner les TRMs échantillonnées à leur population d'origine. Des études antérieures, basées sur l'étude de l'ADN nucléaire utilisant des microsatellites, ont montré que les TRMs adoptent préférentiellement un comportement de homing (remontée vers le bassin d'origine pour la reproduction). Notamment le projet ONEMA (J.Chat et al, 2015) a mis en évidence que les truites de mer échantillonnées au niveau de l'Adour, et plus précisément des Gaves, y sont originaires. Concernant la diversité génétique, cette étude a permis de montrer une diversité génétique structurée par les réseaux hydrographiques

Pour notre étude, nous allons utiliser la séquence de l'ADN mitochondriale (ADNmt) en nous focalisant sur la Dloop qui est la région la plus polymorphe de l'ADNmt. En effet, l'ADNmt est révélateur d'évènements phylogénétiques anciens (Berrebi et al. 2011) car cette séquence d'ADN a un plus faible taux de mutation que l'ADN nucléaire et il n'est transmis que par la mère lors de la fécondation et tous les descendants auront le même ADNmt (Cortey et al, 2002). L'étude de l'ADNmt en est d'autant plus intéressante et révélatrice. De plus, l'ADNmt est couramment utilisé en génétique des populations comme marqueur génétique pour la biologie évolutive.

Nous allons donc essayer de renseigner la population d'origine des truites de mer échantillonnées en utilisant la séquence de l'ADNmt. Si des résultats nous semblent aberrants, nous les comparerons avec les résultats de l'étude avec l'ADN nucléaire.

Dans un premier temps nous présenterons le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude. Dans un deuxième temps, nous présenterons et discuterons des résultats obtenus. Les résultats seront divisés en 4 parties : tout d'abord, l'arbre phylogénétique des haplotypes obtenu, puis la diversité haplotypique dans les populations naturelles, ensuite la diversité haplotypique au sein des souches domestiques et pour finir l'assignation des truites de mer à leur population d'origine.

L'objectif de la présente étude est d'analyser la diversité intraspécifique de la truite *Salmo trutta* du Golfe de Gascogne et d'assigner les truites de mer à leur population d'origine grâce à l'ADNmt (Dloop).

2. Matériel et Méthode

a. Echantillonnage

Chaque individu est anesthésié et mesuré. Des prélèvements sont ensuite effectués au niveau des nageoires pelviennes. Ces prélèvements sont ensuite conservés dans des tubes contenant de l'éthanol jusqu'à leur utilisation. Le poisson est alors mis dans un bac de réveil puis relâché. L'étude génétique de ces juvéniles (0+ et 1+) permet de caractériser génétiquement la population de truites nées dans le cours d'eau car ils caractérisent les populations de truites. L'ensemble des échantillons a été obtenu préalablement à mon stage.

Les échantillons ont été regroupés par zone géographique qui correspond à un ou plusieurs sous-bassins :

- Nives (151 individus)
- Lower Adour : l'Aran, l'Arday, la Bidouze, le Lihoury (64 individus)
- Gave d'Oloron (102 individus)
- Gave de Pau (101 individus)
- Upper Adour : les Léas, le Luy de France (118 individus)

D'autres fleuves du Pays Basque ont été également échantillonnés tels que la Bidasoa (48 individus), l'Untxin (17 individus), la Nivelle (77 individus) et l'Uhabia (7 individus).

La zone d'échantillonnage s'est étendue du nord de l'Europe avec un fleuve nommé Dalälven (2 individus) en Suède mais aussi la Slupia (2 individus) en Pologne jusqu'en Espagne avec différents fleuves comme Urumea (15 individus), Narcea (8 individus), Duero (15 individus) et Ebre (16 individus). En France, le nord a été échantillonné au niveau du Scorff (85 individus) et de la Selune (29 individus). Les échantillonnages ont été poursuivis au niveau de la Charente, de la Garonne et de Leyre. Ces échantillons supplémentaires pourront nous indiquer la présence de grands migrateurs.

Des piscicultures ont également été échantillonnées (Cf Figure 3) : la pisciculture de Cauterets qui sera divisée en deux pour la suite de l'étude. La pisciculture de Cauterets 1 représentera les truites fario sauvages (32 individus) et la pisciculture de Cauterets 2 les truites nommées « cheptel » (30 individus). Trois autres piscicultures ont été échantillonnées : la pisciculture de Less Athas, la pisciculture Peillen et la pisciculture Viviers de Sarrance qui représenteront une seule population de truites fario (93 individus).

L'échantillonnage comprend également 179 truites de mer. Celles-ci ont été pêchées par des pêcheurs professionnels à 2 localisations différentes en 2014 et 2015. 79 individus ont été prélevés au niveau de l'embouchure (estuaire) de l'Adour et 100 individus, plus en amont, au niveau des Gaves réunis (Cf Figure 3). Pour chaque individu un prélèvement génétique a été effectué et pour la plupart un prélèvement des otolithes afin d'obtenir divers renseignements sur l'individu.

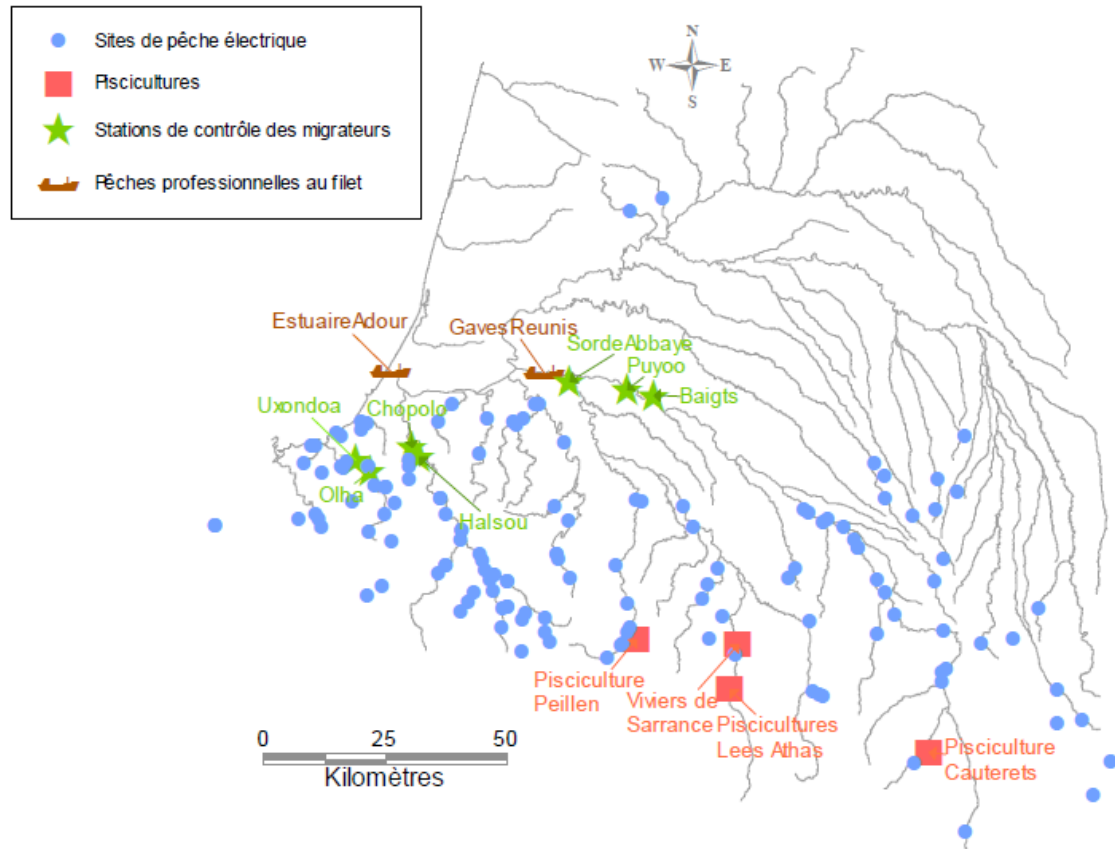


Figure 3. Carte d'échantillonnage des truites de mer et des truites fario dans différentes piscicultures

b. Extraction de l'ADN

L'objectif est d'extraire de l'ADN à partir des échantillons de tissus prélevés auparavant. Pour séparer l'ADN des protéines et lipides cellulaires, une lyse cellulaire est réalisée avec de la protéinase K puis mélangée avec une solution aqueuse de NaCl concentrée et un solvant organique le chloroforme. Après centrifugation, deux phases se distinguent : les protéines et les lipides se sont mélangés au chloroforme (phase inférieure) et l'ADN s'est mélangé avec la solution aqueuse (phase supérieure). La phase supérieure est alors récupérée, à laquelle est ajouté de l'isopropanol, qui est un autre solvant organique, ce qui fait apparaître l'ADN sous forme de pelote. Ce culot d'ADN obtenu est alors lavé à l'alcool puis mis dans un tampon aqueux contenant de l'EDTA 1X pour être conservé.

c. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Une PCR consiste à amplifier exponentiellement une région donnée de l'ADN double brin qui est délimitée par des amorces. Le choix des amorces est très important car celles-ci ne doivent pas s'hybrider entre elles et elles doivent avoir une température de fusion relativement proche pour que l'hybridation de chaque amorce sur l'ADN matrice se fasse correctement. Dans le cadre de mon stage, l'amplification de Dloop de l'ADNmt, 1013 pb (NCBI : GI 161333791),

s'est faite à partir d'amorces internes au laboratoire, qui se nomment Dloop-F et Dloop-R1. Toute cette réaction de PCR est catalysée par une ADN polymérase thermostable.

Ces amorces ont été conçues de façon à amplifier 1123 bp une séquence qui comprend le gène mitochondrial Dloop (DLoopSeq FR1) avec quelques nucléotides avant et quelques nucléotides après et ainsi amplifier la majorité des sites polymorphes informatifs (SNP, insertions, délétions) et ainsi déterminer le polymorphisme de séquence d'hérédité maternelle.

Le marqueur est amplifié dans un volume final de 40 µl en présence de 40 ng d'ADN (ADN dilué au 20^{ème}), 0.2 µM de chaque amorce, à l'aide du kit Hotstartaq Master Mix kit de Qiagen (0.05U/µL taq, 1.5mM de MgCl₂, 0.2mM dNTP). Le programme utilisé est le suivant : une activation de 15 minutes à 95°C, suivis de 30 cycles de dénaturation d'une minute à 95°C, d'hybridation des amorces d'un minute à 55°C, d'élongation d'une minute à 72°C, puis une élongation finale de 7 minutes à 72°C.

Amorces d'amplification :

DloopSeq_F : 5'_CCCACCCTTA ACTCCCAAAG_3'

DloopSeq_R1 : 5'_CGGGACTTTCTAGGGTCCAT_3'

Suite à la PCR, 10 µL de chaque échantillon sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3.5 % à l'aide du marqueur de taille Low DNA Mass Ladder. L'amplification est ensuite vérifiée avec la réalisation d'un gel d'agarose puis la visualisation du gel avec l'imager Quantum ST4 et le logiciel BIO1D. Ceci afin de déterminer la concentration des amplicons pour chaque échantillon. Les plaques PCR (30 µL minimum pour chaque puits) sont purifiées et séquencées par Beckman&Coulter.

d. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN avec la méthode de Sanger consiste à déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN donné.

Le principe de la méthode de Sanger se base sur l'utilisation d'un mélange de dNTP (désoxyribonucléotides) soit dATP, dCTP, dGTP et dTTP et de ddNTP (didésoxyribonucléotides) soit ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP. Chaque ddNTP est marqué avec un fluorochrome différent ; La différence entre un dNTP et un ddNTP est que le ddNTP est dépourvu d'OH à la région 3'. De ce fait quand l'ADN polymérase incorpore un ddNTP à la place d'un dNTP elle n'est plus capable de rajouter un nucléotide à la suite. Lors de l'élongation du nouveau brin synthétisé de 5' vers 3'-OH, l'ajout d'un ddNTP stoppe la polymérisation du brin. L'ADN polymérase se détache et recommence la polymérisation du début du brin jusqu'à réincorporer un ddNTP. Sont obtenus alors différents fragments d'ADN de différentes tailles. Une électrophorèse en gel permet alors de séparer tous ces fragments générés avec un courant électrique (l'ADN est chargé négativement). Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement dans le gel. Un laser émet alors de la lumière afin d'exciter les

fluorochromes. Ceux-ci vont émettre un signal lumineux différent en fonction de chacun d'eux (Cf Figure 4) ce qui permet de révéler les séquences des brins d'ADN.

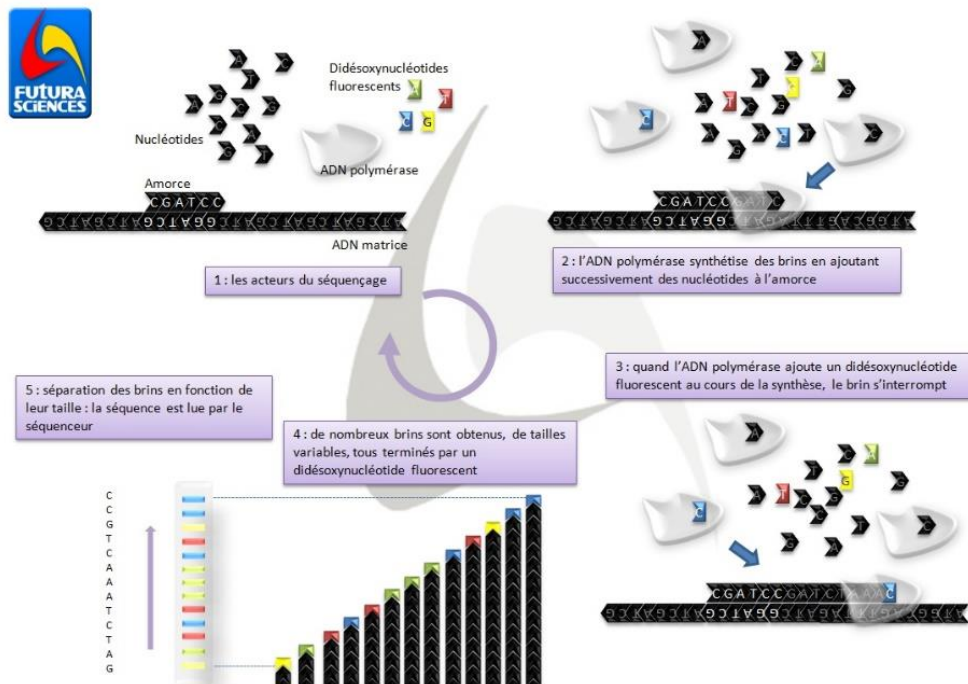


Figure 4. Schéma représentatif de la méthode de Sanger

Le séquençage de la région Dloop de l'ADNmt (CF Figure 5) a été réalisé à l'aide de deux amorces différentes : Dloop-F-4 et Dloop-R-3 (J.Chat).

Dloop-F-4 : 5'_CACCCCTTAACTCCCAAAGCTAA_ 3'

Dloop-R-3 : 5'_GGGACTTTCTAGGGTCCATCTT_ 3'

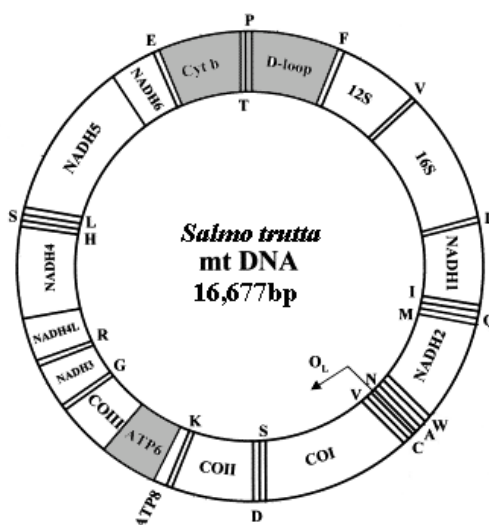


Figure 5. Représentation de l'ADN mitochondrial des truites

Cette méthode est limitée à quelques centaines de paires de bases, c'est pour cela que dans un premier temps les séquences Forward et Reverse sont exploitées indépendamment. Les séquences brutes livrées font environ 1000pb mais seules 500-600 pb seront exploitables (signal brouillé et faible au-delà).

e. Traitement des données
Relecture des séquences :

Les séquences brutes d'ADN de chaque individu sont alors traitées avec le logiciel SeqScanner2 (CF Figure 6). L'objectif est de supprimer les parties de séquence non utilisables par la suite. La zone poly A en Forward (poly T en reverse) correspondait à notre zone de coupure pour les deux brins soit 570 pour le Forward et 490pb pour le Reverse, le signal étant souvent très affaibli après cette zone. Les séquences retenues avec l'amorce Dloop-F-4, elles ne sont conservées qu'à partir de la région GTACAA (27 pb) et jusqu'au poly T. Pour celles avec l'amorce Dloop-R-3, elles sont conservées à partir de CTAGG (27 pb) et jusqu'au poly A.

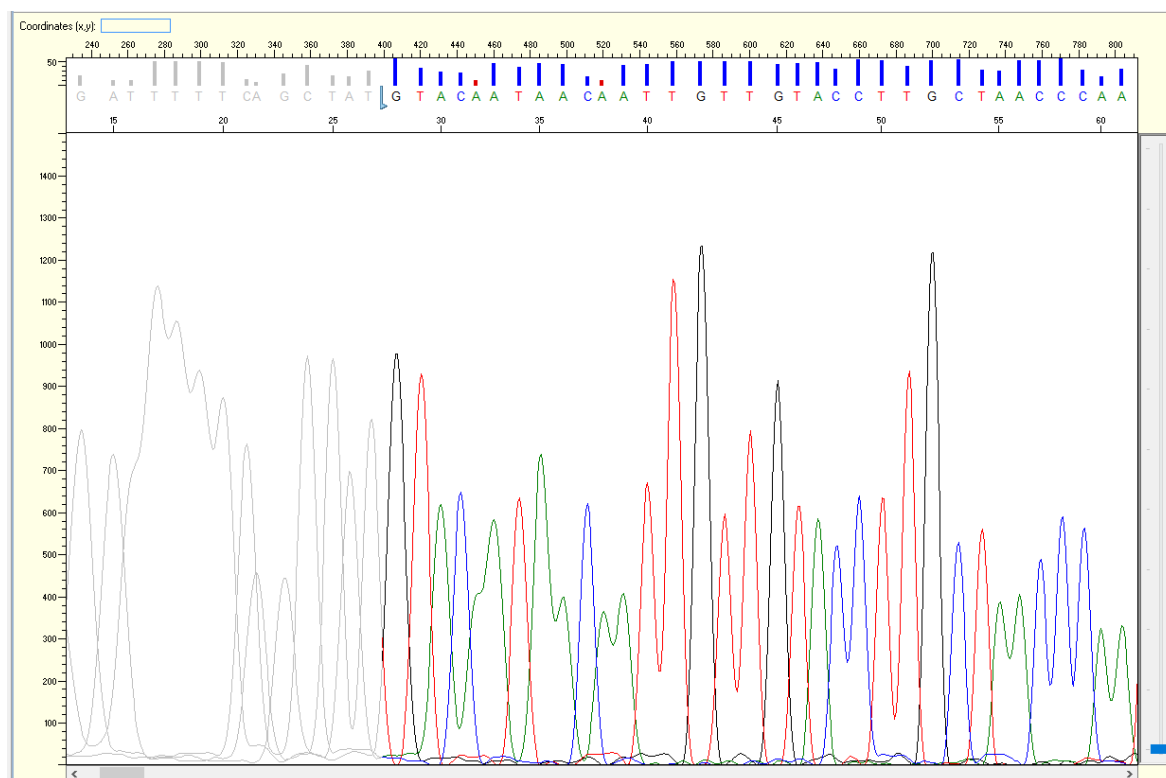


Figure 6. Exemple d'analyse d'une séquence avec le logiciel SeqScanner2 avec l'amorce Dloop-F-4

Après avoir procédé au nettoyage des séquences une par une, toutes les séquences reverses sont ouvertes dans ClustalX afin de les aligner les unes par rapport aux autres. De même avec les séquences Forward. Les séquences alignées sont alors insérées dans un tableur avec Excel afin de concatener les séquences Reverses et Forwards.

Assemblage des séquences :

L'assemblage des séquences permet d'avoir les séquences entières de la Dloop, pour chacun des individus. Les données de différentes manipulations sont alors compilées sous Excel, il y a donc 1978 séquences DLOOP. Certains individus ont été supprimés car ils n'ont pas leur séquence DLOOP entière. Dans la suite du traitement des données, 1315 individus ont été exploités.

Obtention des haplotypes :

Une fois les séquences vérifiées et assemblées sous Excel, celles-ci sont analysées sous R afin d'obtenir le nombre total d'haplotypes présents au sein de nos échantillons. (Cf : ScriptR_Haplotype en Annexe 2).

Construction d'Arbre phylogénétique :

Les haplotypes sont alors analysés sous MEGA, pour une analyse phylogénétique. Les séquences des haplotypes sont alignées, puis des modèles d'évolution sont testés pour au final créer un arbre phylogénétique, non enraciné et pleinement résolu, sous la méthode de Neighbour-Joining. A partir de l'arbre des haplogroupes, regroupements d'haplotypes ayant un ancêtre commun, ont été identifiés.

Sous Excel, chaque individu avec son haplotype a ensuite été classé en fonction de l'espèce échantillonnée, de son origine sauvage, domestique, de son lieu de capture, de son stade de développement et de son écotype : JUV (juvénile), TRF (truite fario), TRM (truite de mer), PISC (truite de pisciculture), SAT (saumon).

Un tableau de contingence des haplotypes en fonction des différents bassins a été créé avec R (Cf : ScriptR_TableauDeContingence en annexe 3).

Tests statistiques :

Un premier test d'indépendance du khi deux a été réalisé, sous R (Cf : ScriptR_TestIndépendanceX²TRM en annexe 3), afin de comparer les deux lots de TRMs pêchées par les professionnels, en estuaire et au niveau des Gaves réunis. Le résultat de ce test déterminera si les distributions des haplotypes de ces pêches sont similaires ou non. Si la distribution des haplotypes est similaire pour les deux lots nous pourrions considérer ces TRM pêchées comme une seule population de TRM

Un second test d'indépendance du khi deux a été réalisé (Cf : ScriptR_TestIndépendanceX²TRM_Gaves en annexe 4), afin de comparer la distribution des haplotypes avec celle des truites de mer pêchées avec celle des juvéniles capturés sur les gaves (G.Oloron + G.Pau). Nous comparons ces populations car d'après le rapport PLAGEPOMI Adour, les Gaves sont des bassins de production massive de TRMs. Si la distribution haplotypique des TRM correspond à la distribution haplotypique des populations des truites dans les Gaves, cela pourrait signifier que ces TRM seraient originaires de ces Gaves. Dans un cas contraire, nous nous intéresserons aux individus non originaires des Gaves.

3. Résultats et Discussion

a. Arbre phylogénétique des haplogroupes

La figure 10 représente la répartition des 83 haplotypes obtenus à l'issue de l'analyse avec le logiciel MEGA. Les lignées évolutives de référence, ici représentées en rouge, ont été introduites à la création de l'arbre sur le logiciel MEGA. Elles correspondent aux séquences DLOOP du Saumon (SAT), de la truite de souche atlantique (AT), méditerranéenne (ME) (Marty Cortey et al, 2004), adriatique (AD), Danube (DA), Duero (DU) et également *Marmoratus* (MA). Elles permettent de repérer à quelle lignée appartiennent les différents haplotypes. Nous constatons que la majorité des haplotypes appartiennent à la lignée AT. 8 haplotypes appartiennent à la lignée DU, 2 haplotypes à la lignée AD, 2 haplotypes également à la lignée ME et 6 haplotypes aux saumons. Il n'y pas d'haplotypes appartenant aux lignées DA et MA à l'issue de cette étude.

Les haplotypes ont été répartis en 7 haplogroupes (A à G). L'haplogroupe A (gris) correspond aux haplotypes de saumons. L'haplogroupe B (vert) représente les haplotypes de la lignée ME, l'haplogroupe C (violet) ceux de la lignée AD et l'haplogroupe D (jaune) ceux de la lignée DU. Trois haplogroupes E (rouge), F (bleu) et G (rose) représentent la lignée AT. En effet, les haplotypes de cette lignée sont nombreux et relativement divers, et visuellement il est possible de distinguer trois groupes distincts dans cette même lignée, ce qui explique leur regroupement en 3 haplogroupes. L'haplogroupe A comprend 6 haplotypes, l'haplogroupe B en comprend 2, tout comme l'haplogroupe C. L'haplogroupe D comprend 8 haplotypes, l'haplogroupe E comprend 14 haplotypes, l'haplogroupe F comprend 24 haplotypes et l'haplogroupe G en comprend 26. Ce sont donc les haplogroupes E, F et G qui sont les plus diversifiés. Ces haplogroupes vont être utiles dans l'exploitation des résultats, afin de déterminer si des populations pourront être regroupées dans des haplogroupes.

Un haplotype très distinct des autres a pu être mis en évidence dans cet arbre. Il s'agit d'un haplotype correspondant à *Oncorhynchus mykiss*, soit la truite arc-en-ciel, originaire de l'Amérique du Nord. Dans cette étude nous avons eu une seule truite classée en truite arc-en-ciel. Phénotypiquement, elle diffère de la truite fario par un long trait rougeâtre sur le flan (Cf Figure 7). Cette truite a été introduite par l'homme en Europe et en France pour la pêche sportive mais également pour l'alimentation car elle s'élève facilement et rapidement. Elle ne menace pas la truite fario car il n'est pas possible pour ces 2 espèces de s'hybrider d'autant plus que le substrat des cours d'eaux français n'est pas adapté à la reproduction de la truite arc-en-ciel.



Figure 7. Illustration d'*Oncorhynchus mykiss*. Source : Wikipédia

Comme nous l'avons vu, l'haplogroupe A correspond au saumon (*Salmo salar*). La présence de cette espèce dans l'échantillonnage peut s'expliquer par la faible différence morphologique entre ces deux espèces. En effet, il est difficile de différencier ces deux espèces au stade juvénile (Figure 8). Seuls quelques caractéristiques, telles que la queue, la longueur de la mâchoire ou la largeur de nageoires pectorales peuvent les différencier. Le saumon a la queue plus échancrée et des nageoires pectorales plus larges et la truite a une mâchoire plus importante (elle dépasse l'œil).

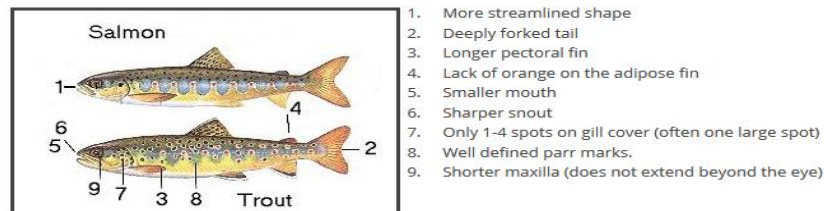


Figure 8. Différence morphologique entre la truite fario juvénile et le tacon (saumon juvénile) Source : <http://www.hameconversionnais.com/>

Cette faible différence morphologique est également observée chez les adultes partis en mer. En effet, comme cela peut être observé sur Figure 9, les 4 mêmes caractéristiques physiques qui différencient les deux espèces. Les pêcheurs professionnels ont également des difficultés à les différencier du fait qu'il existe des individus hybrides (saumon/truite) comme nous le verrons dans la dernière partie des résultats.

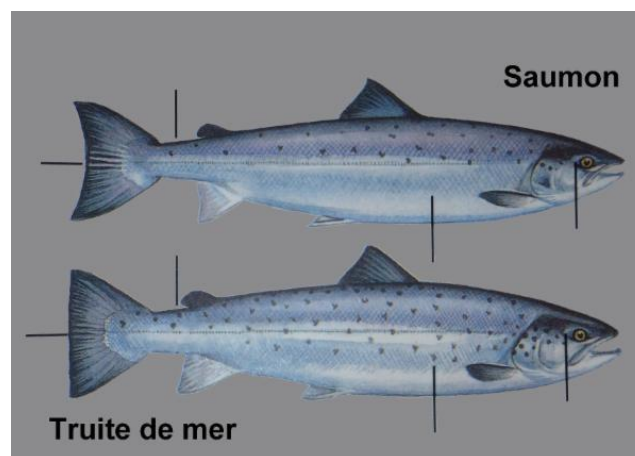


Figure 9. Différences morphologiques entre une truite de mer et un saumon. Source : <http://www.hameconversionnais.com/>

Par contre, il est facile de différencier une truite fario sédentaire avec un saumon et une truite de mer. En effet, la truite sédentaire ne se smoltifiant pas, elle conserve ses flancs garnis de points rouges et noirs qui ne se retrouvent pas chez le saumon et la truite de mer.

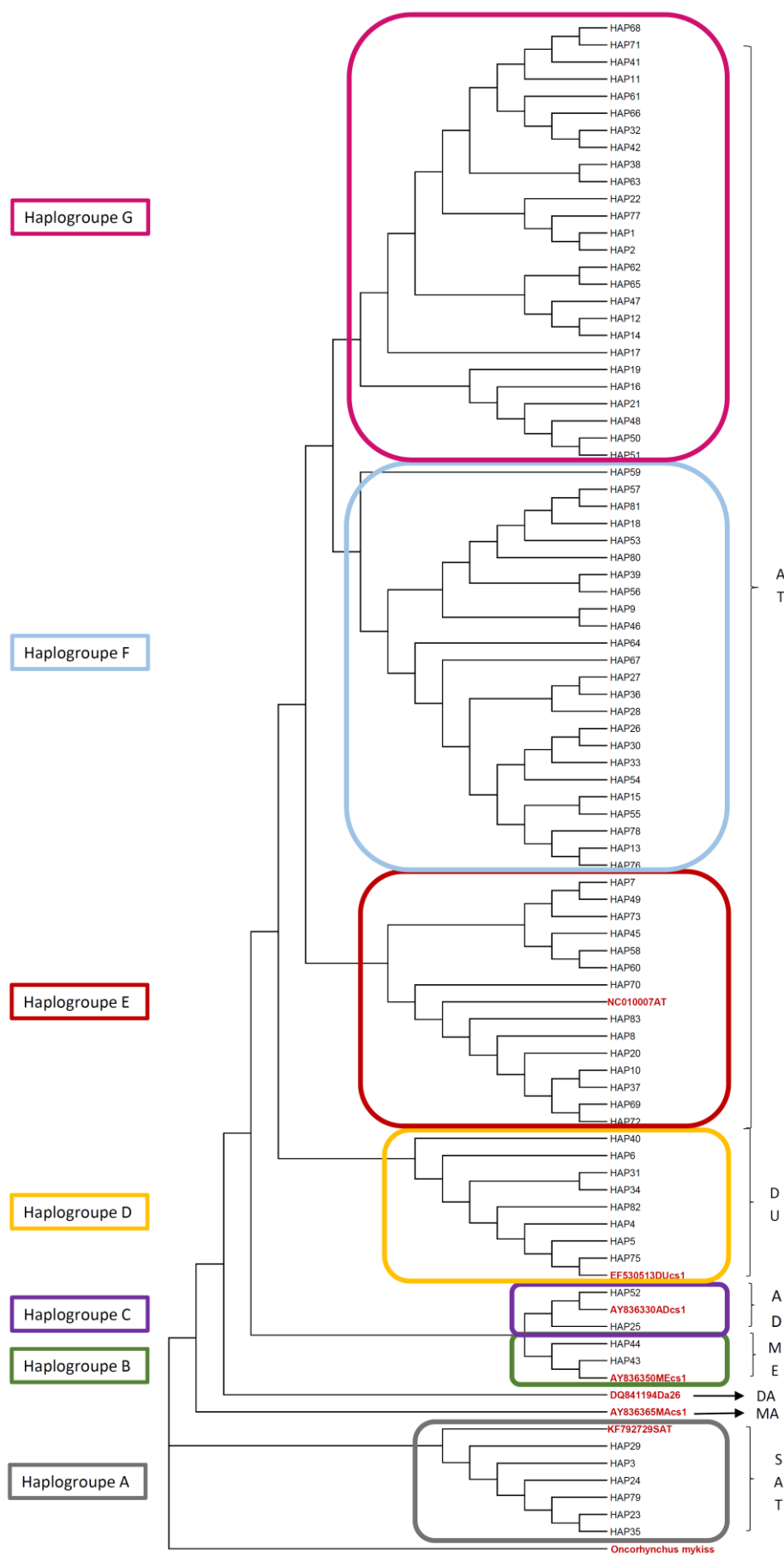


Figure 10. Arbre phylogénétique des haplotypes assignés à différentes lignées et des différents haplogroupes

b. Diversité haplotypique dans les populations naturelles

Les populations sauvages ont été rassemblées en 6 populations : la population Nord (Leyre, Garonne, Charente, Scorff, Selune, Slupia et Dalalven), la population Adour (Nives, LowerAdour, Gave d'Oloron, Gave de Pau et UpperAdour), la population des petits fleuves côtiers français, (PFC FR), (Untxin, Nivelle et Uhabia), la population des petits fleuves côtiers espagnols, (PFC ESP), (Urumea et Bidasoa), la population Sud (Duero et Narcea) et la population d'Ebre.

La figure 12 représente, les fréquences de chaque haplotype au sein de ces populations sauvages. La surface des disques est proportionnelle à la fréquence des haplotypes dans chaque population. Nous pouvons voir que la majorité de tous les échantillons ont un haplotype de la lignée AT.

La population Nord (Leyre, Garonne, Charente, Scorff, Selune, Slupia et Dalalven) est représentée par des haplotypes appartenant pour la majorité à la lignée AT. La plupart des haplotypes présents dans cette population sont regroupés dans les haplogroupes E et G. Ceci pourrait traduire une diversité relativement faible dans cette population Nord. Il y a seulement un haplotype représentatif de la lignée adriatique (HAP25) mais il est dans de faible fréquence par rapport à certains haplotypes de la lignée AT qui semblent plus représentatifs de la population Nord. Nous pouvons donc faire l'hypothèse d'une possible origine adriatique pour quelques individus.

La population Adour (Nives, LowerAdour, Gave d'Oloron, Gave de Pau et UpperAdour) a des représentants dans les trois haplogroupes AT. De ce fait, la population de l'Adour est une population très diversifiée. En effet, elle est composée de nombreuses haplotypes qui sont, eux, regroupés dans les différents haplogroupes. Sauf l'haplogroupe D qui correspond à la lignée du Duero. L'haplogroupe A (individu saumon) qui est en faible proportion (sa présence est probablement due à une confusion dans l'identification de l'espèce lors de la pêche électrique), tous les haplogroupes sont représentés. Nous remarquons, au vu de la distribution haplotypes, que la lignée AT est plus représentée que les lignées AD et ME. Les individus ayant les haplotypes de lignées AD et ME peuvent être le résultat de repeuplement par les piscicultures.

La population des PFC FR, (Untxin, Nivelle et Uhabia) est répartie en majorité dans la lignée AT mais également, en faible fréquence, dans la lignée DU qui est typique des populations de Sud comme nous le verrons par la suite. En comparant la distribution des populations de PFC FR et Adour, nous pouvons voir qu'ils partagent certains haplotypes majoritaires comme le HAP11, HAP9, HAP22. De plus, l'haplotype HAP26 (en rouge sur la figure 11) qui ne semble pas présent dans la population de l'Adour, est représenté dans les PFC FR, avec une fréquence qui peut être prise en compte (Annexe 1) car elle est de 0.53 dans la Nivelle.

La population des PFC ESP, (Urumea et Bidasoa) est représenté exclusivement par des haplotypes inscrits dans la lignée AT et plus précisément dans les haplogroupes G et majoritairement F. Cette population a l'haplotype HAP26 largement représenté. Ce sont des individus de la Bidasoa qui possèdent cet haplotype (Annexe 1). Cet haplotype HAP26 est présent également dans la population de la Nivelle (PFC FR). Géographiquement la Nivelle et

la Bidasoa sont proches (Google Earth), cette proximité pourrait expliquer la répartition assez spécifique de cet haplotype HAP26 dans ces cours d'eau.

La population Sud (Duero et Narcea) est représentée en majorité par des haplotypes de la lignée DU et par des haplotypes de la lignée AT. Le fleuve du Duero est caractérisé par sa signature haplotypique qui appartient exclusivement à la lignée DU, baptisée du même nom que le fleuve. Les haplotypes représentés dans la lignée AT appartiennent à des individus du fleuve Narcea. Peu d'haplotypes y sont présents ce qui met en évidence une faible diversité.

Quant à la population Ebre, elle possède en majorité l'haplotype HAP25 de lignée AD avec une fréquence de 0.81. L'Ebre est le plus puissant fleuve espagnol et il est l'unique grand fleuve espagnol à se jeter dans la Méditerranée. Cependant, en se référant à la figure 11 ci-dessous, nous pouvons voir que le fleuve Ebre commence à un endroit où la lignée adriatique est fortement présente.

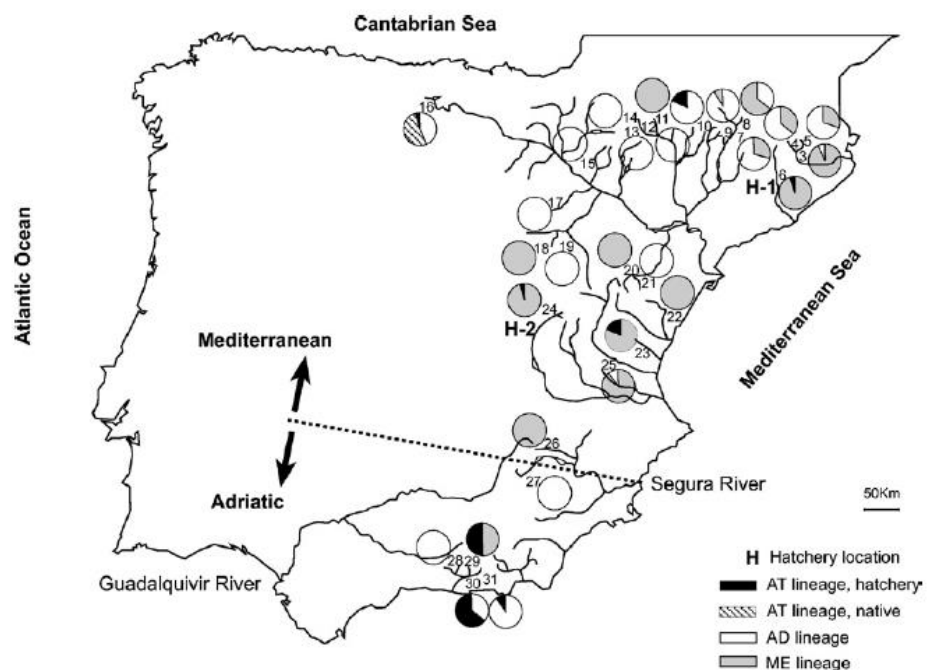


Figure 11. Carte représentant les différentes lignées présentes en Espagne et au niveau du fleuve de l'Ebre Source : Cortey et al, 2004.

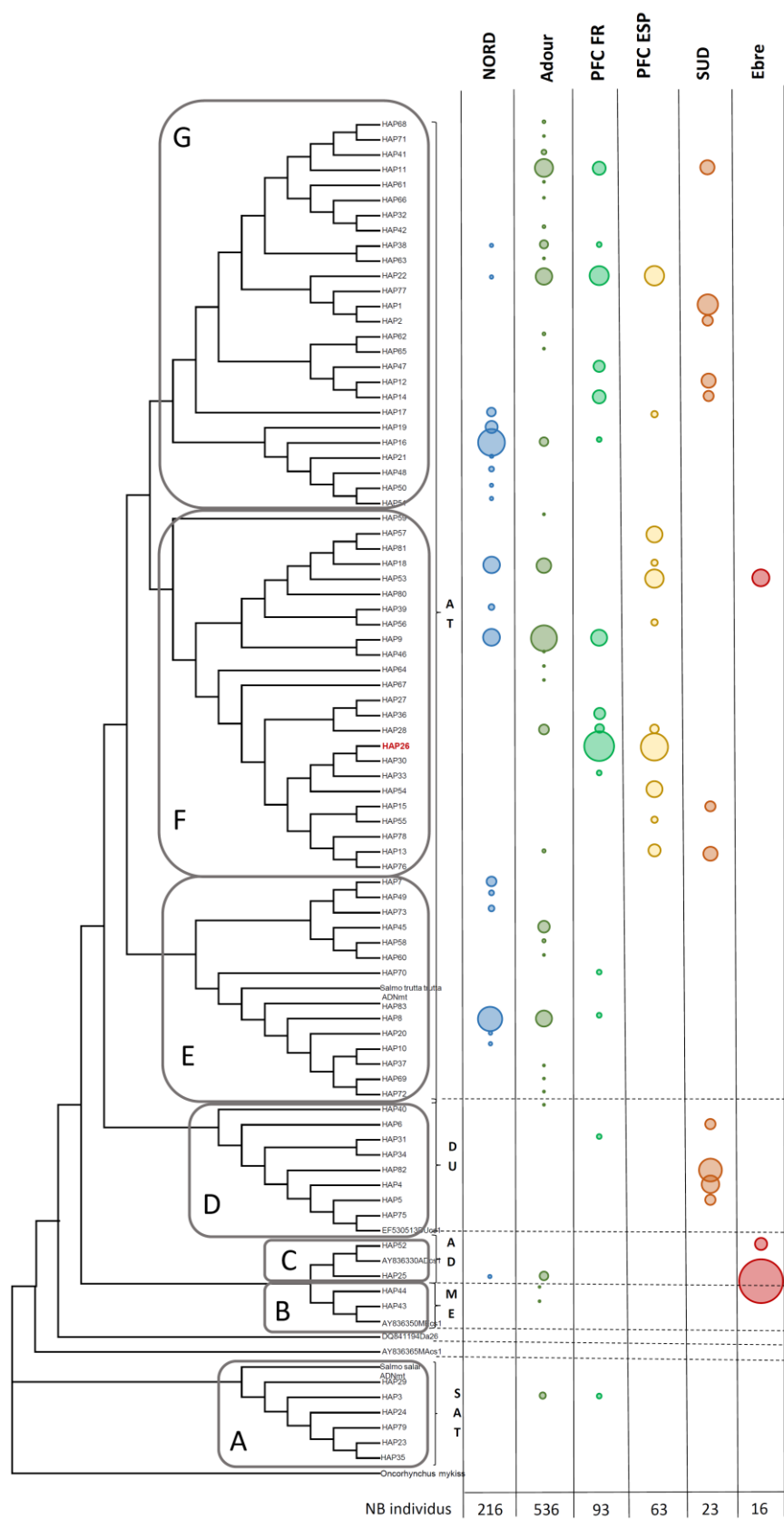


Figure 12. Graphique représentant la diversité haplotypique dans les populations naturelles

c. Diversité haplotypique au sein des souches domestiques

Les piscicultures « Autres Pisc » ont été rassemblées dans la présente étude car elles présentaient les mêmes haplotypes.

En s'intéressant à la composition globale de la figure 13, nous pouvons constater que les souches domestiques ont une diversité haplotypique beaucoup plus faible que les populations naturelles vues précédemment.

3 haplotypes de lignées AT sont communs à toutes les piscicultures échantillonnées : HAP18 (avec une fréquence de 0.28 pour Caut1, 0.4 pour Caut2 et de 0.5 pour Autres Pisc), HAP16 (avec une fréquence de 0.16 pour Caut1, 0.1 pour Caut2 et de 0.07 pour Autres Pisc) et HAP8 (avec une fréquence de 0.09 pour Caut1, 0.4 pour Caut2 et de 0.15 pour Autres Pisc).

Caut1 et Caut2 semblent relativement similaires, si ce n'est le fait que les fréquences pour certains haplotypes diffèrent. Caut1 est représenté, avec une fréquence de 0.47, par un haplotype HAP25 propre à la ligne Adriatique. Dans les populations sauvages, cet haplotype était déjà présent notamment au niveau de la population d'Ebre avec une fréquence de 0.81. Pour expliquer cette assignation adriatique de la part des individus de Caut1, il faut savoir que la pisciculture de Cauterets a utilisé des géniteurs issus de cours d'eau connus pour leur signature adriatique, comme le Gave de Cauterets en amont du Gave de Pau. De ce fait, il est cohérent de retrouver cet haplotype HAP25 au niveau de cette population. Caut2 a également cet haplotype mais en beaucoup plus faible fréquence, soit 0.033. Cette différence entre les deux échantillonnages peut s'expliquer par le fait que Caut1 utilise des truites fario sauvages, qui ont pu être prélevées au niveau de la frontière ibérique, alors que Caut2 utilise seulement des truites fario provenant de région du nord ou du centre de l'Europe.

La population de « Autres Pisc » n'a que 5 haplotypes de la lignée AT, avec des haplotypes peu variés. Cependant cette population est représentée par deux haplotypes HAP9 et HAP39, avec les fréquences respectives de 0.22 et 0.065, qui ne sont pas présents au niveau des autres populations domestiques. Le recours à des géniteurs d'origines différentes entre « Autres Pisc » et « Caut » expliquerait ce phénomène.

La principale observation pour ces populations, est la faible diversité haplotypique, du moins au point de vue de l'ADNmt, qui pourrait être causée par des échanges de géniteurs entre piscicultures. Il est possible de savoir de quelle lignée sont issues les géniteurs, qui ont été utilisés dans les années passées, grâce à la transmission de l'ADNmt par la femelle mère. Nous avons donc pu voir que la pisciculture de Cauterets a déjà utilisé des individus appartenant à la lignée adriatique pour la reproduction, ce qui explique la fréquence élevée de cette lignée dans nos résultats. Cependant nous pouvons faire d'autres hypothèses qui expliqueraient cette faible diversité haplotypique, par exemple un effet de goulot d'étranglement qui est lié à l'utilisation d'un petit nombre de géniteurs pour constituer le cheptel de départ ou encore la conséquence de la dérive génétique.

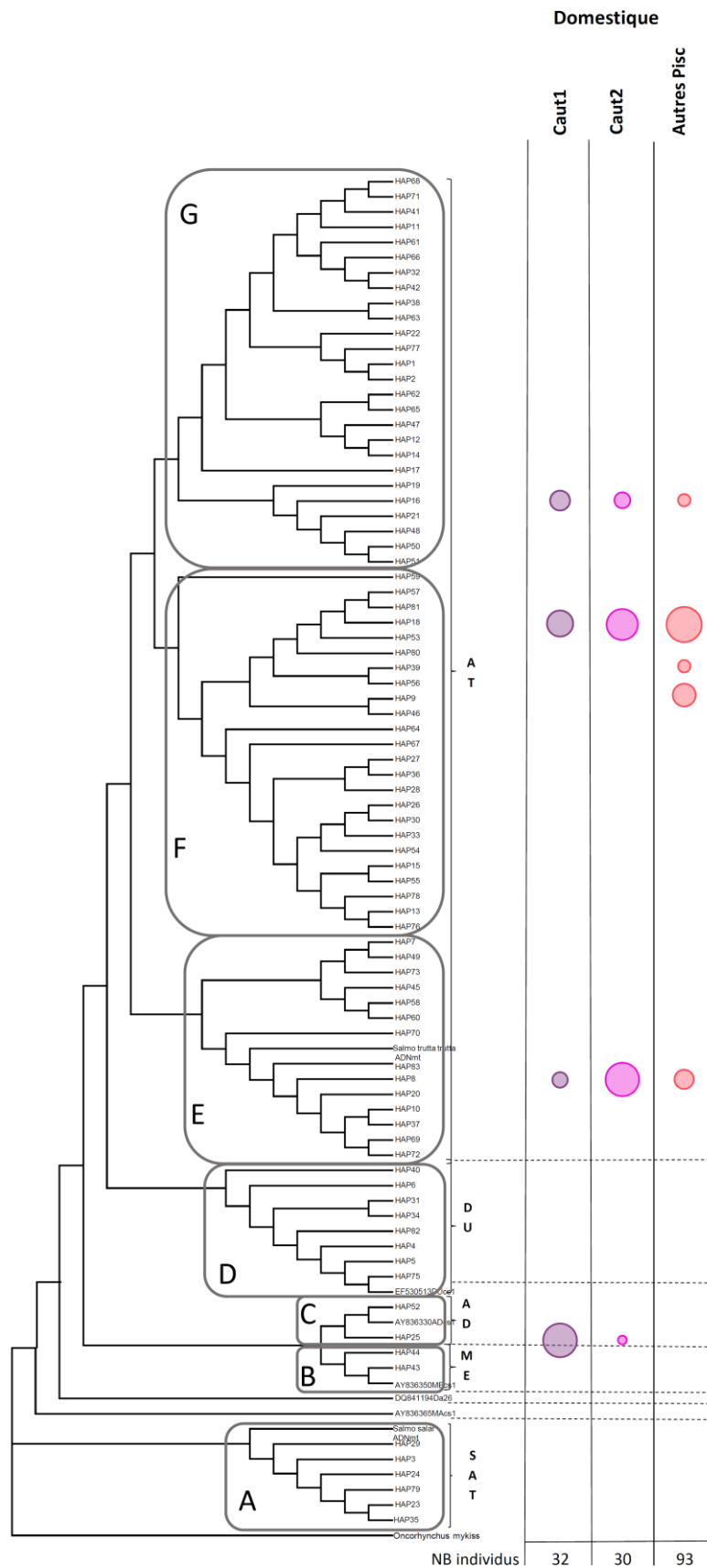


Figure 13. Graphique représentant la diversité haplotypique au sein des souches domestiques

d. Origine des TRM capturées par les professionnels

Dans la figure 14, sont représentées les fréquences des différents haplotypes au sein des TRMs pêchées au niveau de l'estuaire (EstuaireTRM) et au niveau des gaves réunis (GavesRéunisTRM), ces haplotypes indiqués sur un fond gris sur la figure. Pour essayer d'assigner les truites de mer à un bassin d'origine et ont été rajoutés les haplotypes des individus de l'Adour (Nives, LowerAdour, Gave d'Oloron, Gaves de Pau et UpperAdour) d'Uhabia, de la Nivelle, de l'Untxin et de la Bidasoa.

En premier lieu, nous pouvons observer que la diversité haplotypique des TRM pêchées que cela soit à l'embouchure de l'Adour ou au niveau des gaves réunis est relativement faible. En effet, nous ne pouvons comptabiliser que 17 haplotypes pour les TRM alors que les populations du bassin de l'Adour et de certains petits fleuves côtiers présents sur la figure 13 en dénombrent 44.

Tout d'abord, nous allons comparer les deux lots de TRMs. En effet, sur le graphique 13, nous pouvons observer que la plupart des haplotypes présents dans un lot de TRMs le sont également, sauf quelques cas originaux. De ce fait, il est intéressant de pouvoir comparer la distribution des haplotypes, à travers les haplogroupes, dans les deux populations de TRMs.

Test du khi-deux 1 : comparaison des 2 sites de pêches sur R (Cf annexe : ScriptR_TestIndependanceX²TRM en annexe 3)

Tableau 1. Répartition des effectifs des TRMs selon les sites de pêches et les haplogroupes

	haplogpesA+B+C+D+E	haplogpeF	haplogpeG
EstuaireTRM	12	41	26
GavesReunisTRM	15	55	30

Des haplogroupes ont été regroupés et leurs effectifs additionnés afin de respecter les conditions d'application de khi-deux (effectifs > 5)

X-squared = 0.19978 La valeur de l'indicateur de khi-deux est 0.19978

df = 2 Le nombre de degrés de liberté est 2

p-value = 0.9049 La probabilité d'avoir un indicateur de khi-deux de 0.19978 pour 2 degrés de liberté est de plus de 5%, p-valeur = 0.9049

D'après les résultats obtenus sur R, la p-valeur est supérieure à 0.05, de ce fait les distributions au sein des deux lots de TRMs (estuaire et Gaves réunis) n'ont pas de différences significatives. Les TRMs pêchées sur les 2 sites de pêches sont donc génétiquement similaires et peuvent être considérées comme une seule population.

Comme dit précédemment, de nombreux haplotypes sont communs aux TRMs et aux Gaves. Nous allons donc comparer, en utilisant le test du khi-deux, la distribution des haplotypes, à travers les haplogroupes, des populations réunies de TRM (EstuaireTRM + GavesReunisTRM) avec les populations réunies de truites sauvages des Gaves (G.DePau+G.Oloron). En effet nous pouvons faire l'hypothèse que les lots de TRMs sont issus des populations des Gaves (PLAGEPOMI Adour)

Test du khi-deux 2 : comparaison des 2 lots de TRMs réunies avec les juvéniles échantillonnés sur les Gaves sur R (Cf annexe : ScriptR_TestIndependanceX²TRM_Gaves en annexe 4)

Tableau 2. Répartition des effectifs de TRMs et des juvéniles en fonction des haplogroupes

	HaplogpeB+C	haplogpeE	haplogpeF	haplogpeG
TRM	7	18	96	56
Gaves	14	31	78	71

Dans le présent test, nous avons choisi d'écarter l'haplogroupe A correspondant aux populations de saumon pour se concentrer uniquement sur les truites mais également l'haplogroupe D qui ne présentait qu'un individu.

X-squared = 8.6552 La valeur de l'indicateur de khi-deux 8.6552

df = 3 Le nombre de degrés de liberté est 3

p-value = 0.03424 La probabilité d'avoir un indicateur de khi-deux de 8.6552 pour 3 degrés de liberté est de plus de 5%, p-valeur = 0.03424

D'après les résultats de R, la distribution des haplogroupes dans les populations de TRM et celle dans les populations de juvéniles des Gaves ne sont pas similaires. Ce qui signifie que les truites de mer pêchées au niveau des gaves ne sont pas originaires exclusivement des Gaves. En effet, sur la figure 14, nous pouvons voir que certains individus ont des haplotypes qui ne sont pas présents dans les populations des Gaves : HAP11, HAP39, HAP27 et HAP78. Nous allons donc maintenant discuter au cas par cas des individus originaux.

e. Individus originaux :

L'haplotype HAP11 a une fréquence la plus élevée au niveau des Nives et de la Nivelles. Des truites de mer pêchées à l'estuaire présentent aussi cet haplotype. L'hypothèse est donc que de certains individus originaires des Nives ou de la Nivelles remontent l'Adour. Dans le cas des TRMs des Nives, c'est normal puisque ces individus sont obligés d'emprunter l'estuaire de l'Adour dans sa partie aval pour rejoindre les Nives et peut donc être capturée au filet. Dans le cas des individus de mer de la Nivelles, cela peut mettre en évidence des individus migrants.

Dans le cas de l'haplotype HAP39, il est présent dans la population des TRM pêchées au niveau des Gaves réunis mais il ne l'est pas dans les autres populations de la figure 14. En se référant au graphique représentant la diversité haplotypique dans les populations naturelles, nous pouvons observer que cet haplotype est représenté au niveau de la population Nord mais également dans la population « Autres Pisc ». De ce fait, cet individu pêché peut être né dans une pisciculture puis avoir migré en mer, ou provenir de cours d'eau plus au nord de l'Adour et serait donc un migrateur de plus longue distance par rapport aux autres.

Deux haplotypes, HAP27 et HAP78 sont présents uniquement dans les populations de TRM et ne le sont dans aucune des populations sauvages étudiées. En effet en se référant, de nouveau, au graphique représentant la diversité haplotypique dans les populations naturelles (figure 11), ces deux haplotypes n'y sont pas représentés. Nous pouvons faire l'hypothèse que les individus avec ces haplotypes originaux sont des migrateurs longues distances originaires de bassin ou fleuves non échantillonnés. Alternativement, ce manque d'informations sur ces haplotypes peut être dû à un faible échantillonnage sur certains cours d'eau qui entraînent une fausse représentation haplotypique des individus du cours d'eau échantillonné.

Dans la figure 14, nous pouvons également observer des individus TRM qui sont représentées par des haplotypes des lignées AD, ME et SAT. En ce qui concerne les individus SAT, nous avons vu dans la première partie des résultats qu'il n'y avait qu'une faible différence phénotypique entre les TRM et les saumons, ce qui explique que nous retrouvons des saumons dans nos échantillons. Or si nous comparons nos résultats sur l'ADNmt avec les résultats antérieurs sur l'ADN nucléaire pour les mêmes individus, nous pouvons observer une différence pour certains individus. En effet, 2 individus avec l'ADNmt de type saumon mais « hybride » (issu d'une reproduction saumon/truite) avec l'ADN nucléaire. L'hypothèse la plus vraisemblable est qu'ils résultent de la reproduction entre une truite (de mer ?) mâle et un saumon femelle. Or pour 1 individu l'ADN nucléaire indique une truite et non pas un hybride alors que l'ADNmt indique, lui, un saumon. Dans ce cas-là, nous pouvons faire l'hypothèse que cet individu est un hybride mais pas de première génération. Cet individu serait la descendance d'un croisement entre une truite et un saumon mais il y a plusieurs générations ce qui expliquerait la disparition du génotype du saumon dans l'ADN nucléaire.

Le même cas fut observé avec 6 individus avec l'haplotype de la lignée ME. En effet, nous pouvons en retrouver 3% au niveau de la pêche en estuaire et 4% au niveau de la pêche aux gaves réunis. Dans ces cas-là, tout comme le deuxième cas de saumon, les individus ont un ADN nucléaire typique de la lignée AT. Ce qui indique alors une reproduction ancienne entre une truite de la lignée ME femelle et une truite de la lignée AT mâle.

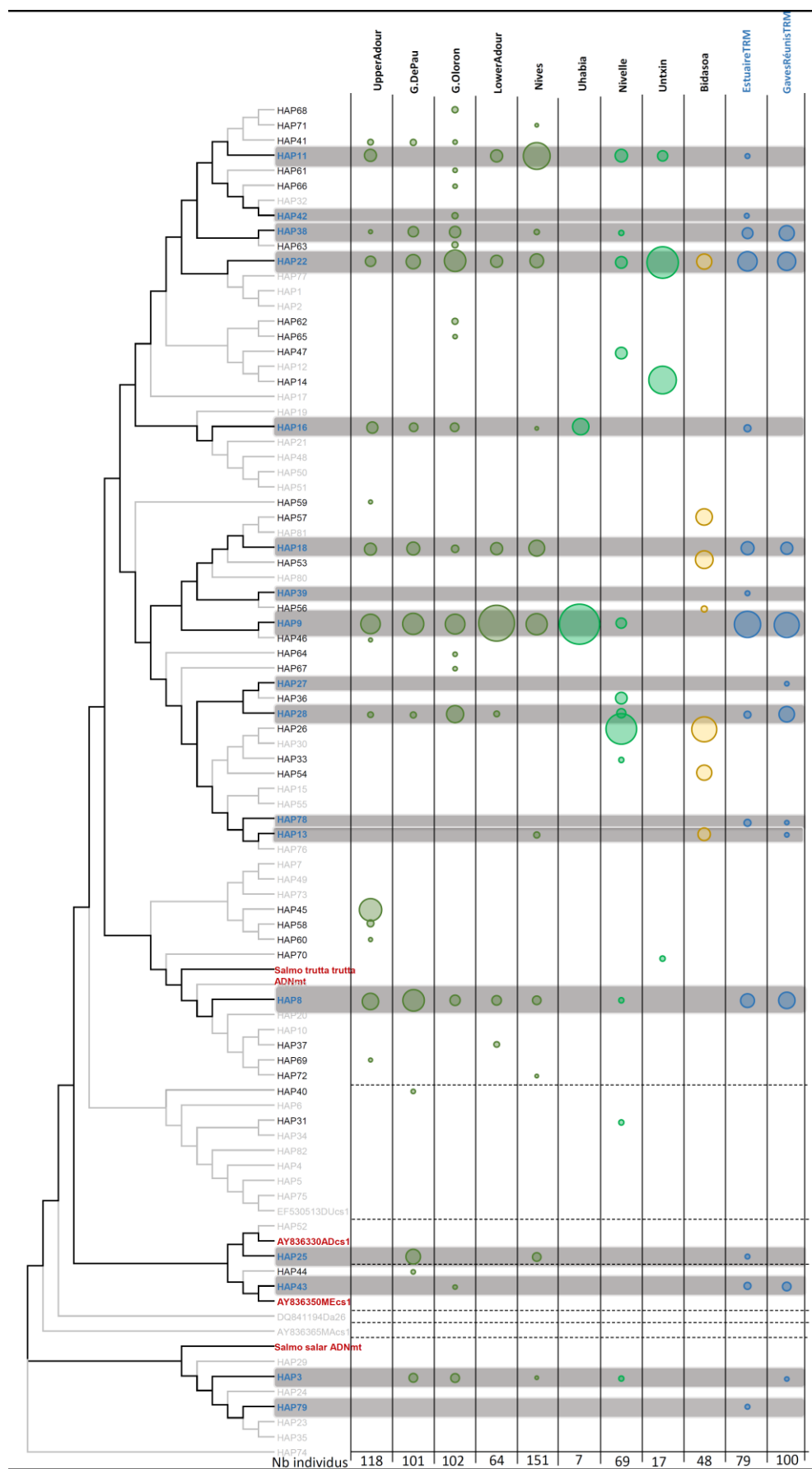


Figure 14. Graphique représentant les fréquences des différents haplotypes au sein des populations du bassin de l'Adour, et de certains petits fleuves côtiers et des TRMs pêchées par les pêcheurs professionnels.

4. Conclusion

La présente étude basée sur l'ADNmt (Dloop) a permis de révéler la diversité haplotypique des populations du Golfe de Gascogne et des populations domestiques utilisées pour le repeuplement. Cette étude montre une forte diversité haplotypique des populations naturelles de truites fario au niveau du Golfe de Gascogne. Nous avons mis en évidence la spécificité de lignées à des cours d'eau comme la lignée DU dans le fleuve le Duero en Espagne. Nous avons également révélé de fortes fréquences pour un haplotype particulier, comme le cas de l'haplotype HAP26, au niveau de deux petits fleuves côtiers, la Nivelle et la Bidasoa, seraient dues à une forte proximité géographique et donc une dispersion homogène de cet haplotype dans ces deux fleuves. La faible diversité haplotypique des souches domestiques a également été démontrée. Celle-ci pourrait être due à un échange de géniteurs entre les piscicultures. Il a également été mis en évidence l'utilisation de géniteurs issus de la lignée AD pour les deux de souches de Cauterets (Caut1 et Caut2).

Nous avons pu, dans un second temps, établir l'origine probable des truites de mer pêchées par les professionnels dans l'Adour. En effet, l'étude de la Dloop permet de retracer des événements à caractère ancien car c'est un marqueur direct et non ambigu. De ce fait nous avons pu déterminer l'origine maternelle des truites de mer pêchées et nous avons prouvé avec un test du khi-deux que les deux lots de TRMs étaient génétiquement proches. Si la plupart des truites de mer sont originaires des Gaves, et font donc un comportement de homing, un test statistique du khi-deux a permis de démontrer qu'il existait des différences entre les distributions des truites de mer pêchées et les alevins échantillonnés dans les Gaves. Cependant ce ne sont que des indications globales et non individuelles, cette étude n'a pas permis de mettre en avant des haplotypes spécifiques de certaines rivières et donc d'assigner des TRMs directement à une population d'origine. En outre, nous avons pu constater l'existence d'individus TRM migrants, provenant de bassins lointains non échantillonnés. D'autre part, certains individus TRM ont un haplotype de l'ADNmt représentatif de certaines lignées comme la lignée ME, alors que, leur ADN nucléaire (études précédentes) montre une lignée AT. Ces individus sont donc des descendants issus d'une reproduction ancienne avec une mère de lignée ME. Plusieurs générations de reproduction avec des individus de lignées AT expliquerait la disparition de la lignée ME dans l'ADN nucléaire. Nous pouvons alors faire l'hypothèse parcimonieuse d'un potentiel repeuplement par des truites issues de lignée maternelle ME.

Références Bibliographiques

a. Ouvrages et Revues :

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) 2001: 351-379

Berrebi P. Doucende D. Renaud N. & Cherbonnel C. 2011. Analyse génétique de la population de truite fario de la Durance en amont de Serre-Ponçon. Rapport 2011 Fédération de pêche région PACA.

Chat J. Manicki A. Guéraud F. & Lepais O. 2015. Continuité écologique et conservation de la diversité génétique et écotypique d'un grand migrateur (*Salmo trutta*). Rapport Final ONEMA.

Cortey M. & Garcia-Marin J-L. 2002. Evidence for phylogeographically informative sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout. *Journal of Fish Biology* (2002) 60: 1058-1063

Cortey M. Pla C. & Garcia-Marin J-L. 2004. Historical biogeography of Mediterranean trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 831-844

Giuffra E. Bernatchez L. & Guyomard R. 1994. Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown *Salmo trutta* from northern Italy. *Molecular Ecology* (1994) 3: 161-171

Guyomard R. 1989. Diversité génétique de la truite commune. *Bull. FR. Pêche Pisc*, 314 (Chapitre 3) 1989 : 118-135

Keith P. Persat H. Feunteun E. & Allardi J. 2011. Les Poissons d'eau douce en France. *Collection Inventaires & biodiversité. Biotope – Muséum national d'Histoire naturelle* 2011

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. Rapport 2011

Suarez J. Bautista J. Almodovar A. & Machordom A. 2001. Evolution of the mitochondrial control region in Palaearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Heredity* 97 (2001): 198-206

b. Sites internet:

Recherches pour les caractéristiques physiques des différentes truites des différentes truites :

<http://www.hameconversionnais.com/>

https://fr.wikipedia.org/wiki/Truite_arc-en-ciel

<http://www.arkive.org/brown-trout/salmo-trutta-fario/>

Recherches sur la région Dloop de l'ADNmt et l'ADNmt lui-même :

<http://genes.atspace.org/12.6.html>

<https://en.wikipedia.org/wiki/D-loop>

https://fr.wikipedia.org/wiki/G%C3%A9nome_mitochondrial

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Recherches sur le fleuve Ebre :

<http://www.ac-grenoble.fr/armorin.crest/beesip3/spip.php?article370>

<http://www.terresdelebre.travel/fr/Soport/recurso.php?id=1173#.Vx8ngkdqvcs>

Recherches sur PLAGEPOMI Adour :

http://www.aquitaine.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/PLAGEPOMI_ADOUR_entier-2_cle54891e.pdf

Résumé

La présente étude, basée sur l'ADNmt (Dloop), avait pour objectif de compléter les données obtenues dans l'étude sur l'ADN nucléaire dans le cadre du projet ONEMA (Chat et al. 2015). Elle a permis de mettre en évidence, une forte diversité haplotypique des populations naturelles de truites fario au niveau du Golfe de Gascogne. Au contraire les populations domestiques présentent une faible diversité haplotypique : 5 haplotypes au maximum sur les 83 haplotypes que compte l'étude. Un test statistique nous a permis de comparer les deux lots de TRMs, et de prouver qu'ils n'étaient pas statistiquement différents. L'ADNmt (Dloop) ne nous a pas permis d'assigner précisément et individuellement les TRMs, pêchées par des pêcheurs professionnels, à leur population et leur rivière d'origine. Néanmoins la plupart des TRMs pêchées semblent être originaires des Gaves. Cependant un second test du khi-deux a prouvé que la distribution haplotypique des lots de TRMs était différente de celle des populations des Gaves. Quelques individus originaux ont alors pu être identifiés comme des hybrides interspécifiques saumon-truite, en exploitant les résultats de l'ADN nucléaire. De plus certaines truites de mer étaient représentées par un haplotype typique de la lignée ME alors que l'ADN nucléaire relatait la lignée AT. Nous pouvons donc faire l'hypothèse d'un effet de repeuplement par des truites de lignée ME.

Mots clés : Truite fario (*Salmo trutta*) - Truite de mer (TRM) - Génétique des populations - Diversité haplotypique - ADN mitochondrial(Dloop)

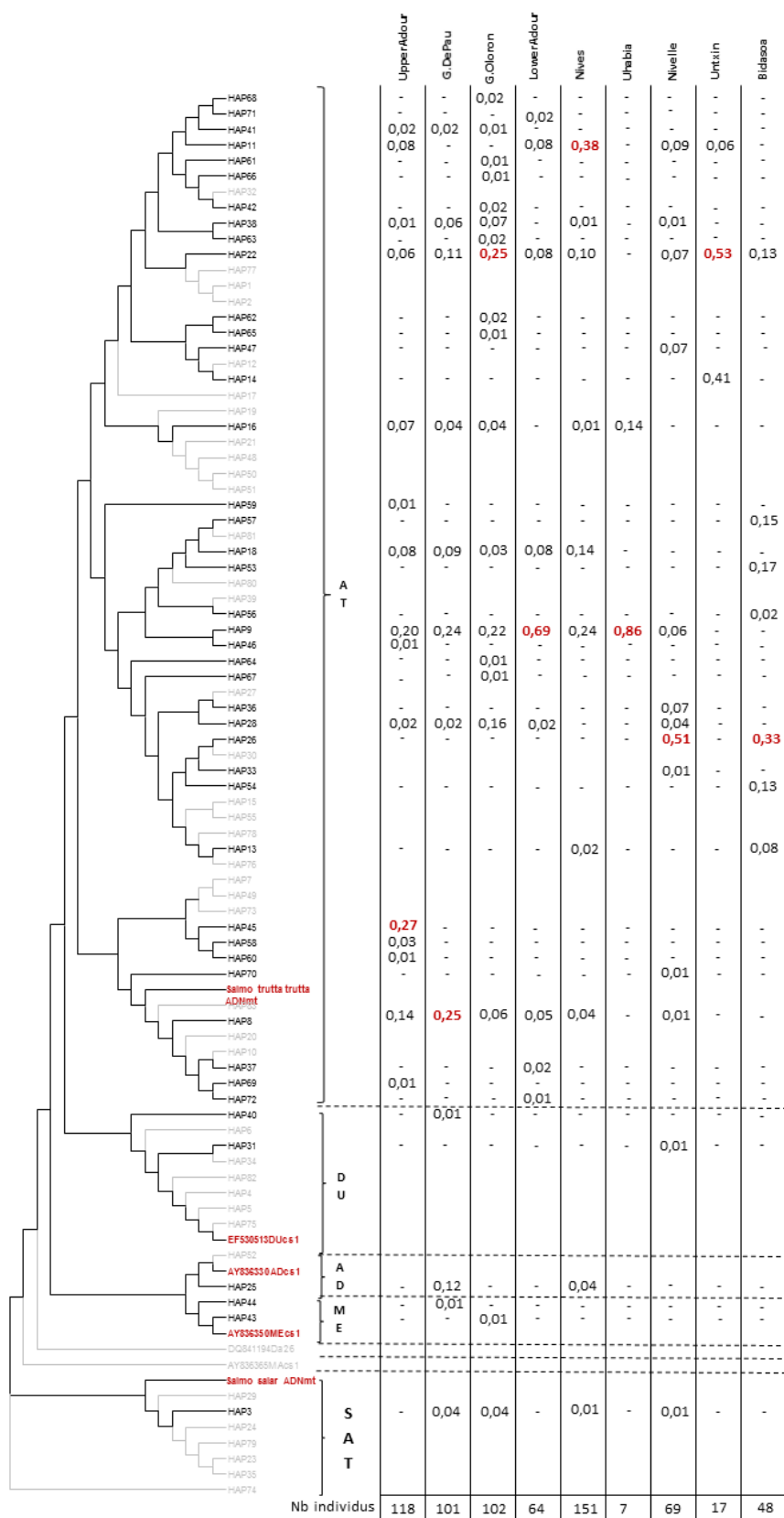
Abstract

The present study, based on DNAm (Dloop), aims to complete the DNA nuclear's data of ONEMA project (Chat et al. 2015). It highlights haplotypic diversity of brown natural trout populations in the Bay of Biscay. On the contrary, domestic populations present a low haplotypic diversity: 5 haplotypes at most over 83 haplotypes hap this study. A statistical test allows us to compare two packs of sea trouts and to prove they are not statistically different. DNAm (Dloop) unabled us to assign precisely and individually sea trouts, fished by professional fishermen, at their original population and river. However, majority of sea trouts fished seems to be natives from the Gaves. A second statistical test proved haplotypic distribution of sea trouts paks was different from Gaves's populations. Then, few original individuals can be identified like salmon-trout interspecific hybrids by exploiting nuclear's DNA results. Moreover, some sea trouts were represented by typic haplotypic of lineage ME whereas nuclear DN related lineage AT. We can make hypothesis of resettlement effect by lineage ME's brown trouts.

Keywords : Brown trout (*Salmo trutta*) – Sea trouts – Populations genetics - haplotypic diversity – mitochondrial DNA (Dloop)

Annexes

Annexe 1 : arbre des haplotypes du bassin de l'Adour et certains petits fleuves côtiers



Annexe 2 : ScriptR_Haplotype

ALIGNEMENT DES SEQUENCES : Sous station de calcul avec Olivier

FICHER : "E:\L3 Bio\STAGE INRA\seaview.fhfkuj.fasta"

Renommé "E:\L3 Bio\STAGE INRA\CompilSeq.bio"

Les id complets des individus ont été perdus et réattribués après alignement (l'ordre des lignes n'a pas été modifié au cours de l'alignement), le fichier a été baptisé CompilSeq1.xlsx

IDENTIFICATION DES HAPLOTYPES : Sous R par Mélanie et Olivier

```
SEQmt <- readXL("E:/L3 Bio/STAGE INRA/NEWanalysis/SEQmt.xlsx", rownames=FALSE,
header=FALSE, na="", sheet="+CodeIND", stringsAsFactors=TRUE)
showData(SEQmt, placement='-20+200', font=getRcmdr('logFont'), maxwidth=80, maxheight=30)
#col1 : nomINDividu
#col2 : codeINDividu (M0001 à M1972)
#col3 : sequences
```

```
summary(SEQmt$X2)
#donne le nombre d'occurrence de chaque haplotype
```

```
unique(SEQmt$X2)
#dénombrer le nombre d'haplotypes :96
```

```
write.table(unique(SEQmt$X2),"HAP")
#crée un tableau contenant les résultats de la fonction unique, tableau créé par défaut dans le répertoire
documents sous le nom "HAP"
```

```
NUM<-rep(1:96)
NUMHAP<-cbind(NUM,as.vector(HAP))
NUMHAP
write.table(NUMHAP,"NUMHAP")
```

```
HAP <- read.table("E:/L3 Bio/STAGE INRA/NEWanalysis/HAP", header=TRUE, sep="",
na.strings="NA", dec=".", strip.white=TRUE)
showData(HAP, placement='-20+200', font=getRcmdr('logFont'), maxwidth=80, maxheight=30)
```

```
haplotype<-cbind(as.character(SEQmt$X0),NUMHAP$NUM[match(SEQmt$X2,NUMHAP$x)])
haplotype
# formule equivalent du Recherchev dispo sous Excel, trouvé sur internet
```

```
showData(SEQmt, placement='-20+200', font=getRcmdr('logFont'), maxwidth=80, maxheight=30)
NUMHAP <- read.table("C:/Users/ecobiop/Documents/NUMHAP", header=TRUE, sep="",
na.strings="NA", dec=".", strip.white=TRUE)
showData(NUMHAP, placement='-20+200', font=getRcmdr('logFont'), maxwidth=80, maxheight=30)
```

```
haplotype<-cbind(as.character(SEQmt$X0),NUMHAP$NUM[match(SEQmt$X2,NUMHAP$x)])
haplotype
SOUS EXCEL:
Redonner les id des individus
```

Annexe 3 : ScriptR_Tableau de contingence

Script R : Crée un tableau de contingence à partir d'un fichier txt (Mélanie 05/04/2016)

```
HaploINDgeo <-
```

```
  read.table("E:/L3 Bio/STAGE INRA/NEWanalysis/NOaln/HaploINDgeo.txt",  
    header=TRUE, sep=" ", na.strings="NA", dec=".", strip.white=TRUE)
```

```
library(relimp, pos=14)
```

```
#importer de fichier HaploINDgeo.txt
```

```
HaploINDgeo <- within(HaploINDgeo, {
```

```
  Haplotypes <- as.factor(Haplotypes)
```

```
})
```

```
#déclarer la variable Haplotypes comme une variable qualitative
```

```
local({
```

```
  .Table <- xtabs(~bassin+Haplotypes, data=HaploINDgeo)
```

```
  cat("\nFrequency table:\n")
```

```
  print(.Table)
```

```
  .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

```
  print(.Test)
```

```
})
```

```
#Apparition du tableau de contingence des haplotypes en fonction des bassins
```

#Pour faire en fonction des sous bassins ou des rivières même manip juste changer à ce niveau et mettre sous bassin ou riviere à la place de bassin

```
Table <- xtabs(~bassin+Haplotypes, data=HaploINDgeo)
```

```
#recopier la ligne de commande contenant xtab et supprimer le point devant Table puis  
soumettre
```

```
class(Table)<-"matrix"
```

```
Table1<-as.data.frame(Table)
```

```
#tableau de contingence créée sous le nom Table1
```

```
write.table(Table1, "TabContHaplo")
```

```
#Exporter le tableau de contingence nommé TabContHaplo (mis dans documents)
```


Annexe 4 : ScriptR_TestindépendanceX²TRM

Test Indépendance X² TRM(Mélanie le 6/04/2016)

Trouvé sur internet au lien suivant : http://mehdikhaneboubi.free.fr/stat/co/khi_deux_r.html

Script R commander:

```
TestIndepTRM <-
```

```
  read.table("E:/L3 Bio/STAGE INRA/NEWanalysis/NOaln/TestIndepTRM.txt",
```

```
  header=TRUE, sep=";", na.strings="NA", dec=".", strip.white=TRUE)
```

```
#Importer le fichier txt TestIndepTRM
```

```
TestIndepTRM->tableau
```

```
#d'après des indications d'internet, mettre le tableau de contingence "TestIndepTRM" dans un  
objet nommé "tableau"
```

```
chisq.test(tableau)
```

```
#appliquer la commande chisq.test à "tableau" pour obtenir les résultats du test statistique  
d'indépendance du X2
```

Résultats R :

```
Pearson's Chi-squared test
```

```
#indique qu'il applique le test de khi deux de Karl Pearson qui est son "inventeur"
```

```
data: tableau
```

```
#indique qu'il applique le test à "tableau"
```

```
X-squared = 0.19978
```

```
# La valeur de l'indicateur de khideux est 0.19978
```

```
df = 2
```

```
# Le nombre de degrés de liberté est 2
```

```
p-value = 0.9049
```

```
#La probabilité d'avoir un indicateur de khi-deux de 0.19978 pour 2 degrés de liberté est de  
plus de 5%, p-valeur = 0.9049
```

➔ Hypothèse d'indépendance acceptée, il n'y a pas de lien entre les lignes et les colonnes.

Les deux pêches en estuaire et aux gaves réunis peuvent être exploitées indépendamment.

Annexe 5: ScriptR_TestindependanceX²TRM_Gaves

Test Independance X² TRM_Gaves(Mélanie le 11/04/2016)

Script R.:

```
> TestIndepTRM_Gaves <-  
+ read.table("E:/L3 Bio/STAGE INRA/NEWanalysis/NOaln/TestIndepTRM_Gaves.txt",  
+ header=TRUE, sep="", na.strings="NA", dec=".", strip.white=TRUE)
```

#importer fichier

```
> TestIndepTRM_Gaves
```

#visualiser fichier

	HaplogpeB.C	haplogpeE	haplogpeF	haplogpeG	Total
TRM	7	18	96	56	177
Gaves	14	31	78	71	194
Total	21	49	174	127	371

```
> TestIndepTRM_Gaves -> tab
```

#renommer fichier en variable plus courte "tab"

```
> tab[-3,-5]
```

	HaplogpeB.C	haplogpeE	haplogpeF	haplogpeG
TRM	7	18	96	56
Gaves	14	31	78	71

#supprimer les totaux sinon cela fausse les résultats

```
> tab[-3,-5]->tab
```

#mettre les résultats sans les totaux dans tab

```
> tab
```

	HaplogpeB.C	haplogpeE	haplogpeF	haplogpeG
TRM	7	18	96	56
Gaves	14	31	78	71

#visualiser tab

```
> chisq.test(tab)
```

#test X² de tab

X-squared = 8.6552, df = 3, **p-value = 0.03424**

#Distribution non similaire entre les TRM et Gaves -> les truites ne visent donc surement pas toutes des gaves -> interprétation des cas particuliers