M I G A D O

Migrateurs Garonne Dordogne

EVALUATION DE LA CONTRIBUTION DES INDIVIDUS ISSUS DE REPRODUCTION NATURELLE AUX EFFECTIFS DE SAUMONS ATLANTIQUES ACCOMPLISSANT LEUR MIGRATION ANADROME SUR L'AXE DORDOGNE.

(ASSIGNATION PARENTALE, RAPPORT DESCRIPTIF ANNEE 2008.)

Etude financée par :

L'Union Européenne
L'Agence de l'Eau Adour-Garonne
La région Limousin
Le Conseil Général de Corrèze
L'ONEMA
La FNPF

David CLAVE
Stéphane BOSC

juillet 2009

MI.GA.DO. 20D-09-RT

Cette étude est cofinancée par l'Union européenne. L'Europe s'engage en Limousin avec le FEDER.

Association Migrateurs Garonne Dordogne – loi 1901 (JO du 29.03.89) – N°SIRET : 391 610 490 00065 – Site Internet : www.migado.fr
18 ter, rue de la Garonne – BP 95 – 47520 LE PASSAGE D'AGEN – Tél. 05 53 87 72 42 – Fax 05 53 87 00 99 – e-mail : migado@wanadoo.fr

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION 2

2. LA TECHNIQUE D'ASSIGNATION PARENTALE 3

2.1. DEFINITION 3
2.2. METHODE 3

3. DESCRIPTIF DE L'ETUDE REALISEE PAR MIGADO 3

3.1. PRESENTATION 3
3.2. PARTENARIAT 4
3.3. DEMARCHE TECHNIQUE 5
3.3.1. Rappel de l'organisation de production MIGADO (Fig 2) 5
3.3.2. Constitution des familles 7
3.3.3. Déroulement des reproductions artificielles 8
3.3.4. Analyse génétiques des parents élevés en pisciculture. 8
3.3.5. Analyse génétique de la descendance et calendrier d'échantillonnage 9
3.4. RESULTATS ATTENDUS 11

4. CONCLUSION 11

1. INTRODUCTION

Il n'existe pour l'heure aucun moyen sur le bassin Gironde-Garonne-Dordogne de déterminer l'origine des géniteurs de retour (repeuplement ou reproduction naturelle). Cette question est d'importance dans le cadre du plan de restauration de l'espèce, dont l'objectif est de parvenir à amener un effectif suffisant de géniteurs adultes à se reproduire dans le milieu naturel pour tendre vers l'autosuffisance de la population.

L'effort réalisé depuis une vingtaine d'année par les organismes travaillant à la protection des poissons migrateurs et notamment MIGADO permet aujourd'hui de cerner les menaces qui pèsent sur les Saumons durant leur phase dulçaquicole, elles sont nombreuses et touchent l'espèce à divers stade de son développement biologique. Elles sont de deux sortes : d'une part celles qui portent sur la phase embryo-larvaire et juvéniles (dégradation des habitats, éclusées) et d'autre part celles qui portent atteinte à la libre circulation de l'espèce (en l'occurrence à la dévalaison). Ainsi, l'impact cumulé de ces pressions d'origine anthropique nuit de façon récurrente à la survie des jeunes Saumons atlantiques né naturellement en rivière et par conséquent au nombre de Saumon adulte de retour. Et la question de leur participation réelle au renouvellement de la population demeure.

Pour obtenir des réponses, il était nécessaire de réaliser une étude portant sur les géniteurs qui nous permettrait de distinguer les individus né en rivière de ceux produits dans les piscicultures de MIGADO. Une méthode est particulièrement efficace pour ce type d'étude, c'est l'assignation de parenté ou « marquage génétique ».

Dans le présent rapport seront faits une présentation du protocole et de la technique mis en place dans les structures de MIGADO œuvrant sur l'axe Dordogne, ainsi que les résultats attendus et l'échéancier.

2. LA TECHNIQUE D'ASSIGNATION PARENTALE

2.1. DEFINITION

La technique d'assignation parentale permet de déterminer à partir d'échantillons d'ADN s'il existe une filiation directe entre des géniteurs et leur progéniture.
Ex : test de paternité chez l'homme.

2.2. METHODE

Elle repose sur des séquences particulières de l'ADN découvertes en 1989, les séquences microsatellites. Leurs structures varient beaucoup d'un individu à l'autre. Ainsi, ce sont de très bons marqueurs pour différencier des individus apparemment identiques entre eux, un peu comme si chacun possédait naturellement un « code barre » interne unique : l'empreinte génétique.

Cependant, durant la reproduction et la transmission des gènes parentaux à la descendance, celle-ci reçoit une partie de la structure microsatellite de chaque parent et il en résulte une troisième structure propre à cet individu mais dans laquelle transparait l'empreinte génétique des deux parents.

Pour définir l'empreinte génétique d'un individu, il faut préalablement choisir un « lot» de 10 à 12 séquences microsatellites aux caractéristiques particulières (Estoup et al., 1998). Pour le Saumon, dans la bibliographie 20 séquences sont connues et utilisées (Paterson et al, 2004 ; Herbinger et al, 2006 ; King et al, 2001), après leurs premiers tests les généticiens du laboratoire LABOGENA en ont choisis 12 parmi les 20.

D'un point de vue technique, il suffit donc de prélever un fragment de tissus (ex : nageoire) ou de cellules épithéliales (ex : frotti de l'opercule) d'un individu X, d'en purifier l'ADN, d'en extraire les séquences microsatellites et de les analyser. L'empreinte génétique de X est comparée à celles de ses parents potentiels dont l'empreinte génétique est connue. Ceci permettra de valider ou non la filiation et se fera par intégration. C'est-à-dire que dans le panel de couples parentaux possibles, seul celui correspondant à 100% sera retenu et si aucun couple n'est retenu… Cela signifie que l'individu X est issu d'une reproduction en milieux naturel (Araki et al 2006).

3. DESCRIPTIF DE L'ETUDE REALISEE PAR MIGADO

Afin de faciliter l'explication et la compréhension de l'étude, elle sera présentée dans sa globalité, c'est-à-dire en incluant le volet Garonne. Car même si l'accent sera mis sur le volet Dordogne il est difficile d'occulter le travail réalisé sur l'autre axe car il sera utilisé durant l'analyse des données. En effet, le phénomène d'égarement est possible entre les deux axes et certains poissons lâchés initialement en garonne peuvent remonter sur la Dordogne. Si le programme n'avait pas été conduit en parallèle sur les deux axes, certains égarés de leur rivière de déversement auraient pu être déclarés issus de reproduction naturelle car non assignés et nous conduire à une sous-estimation de la contribution des poissons issus de repeuplement.

3.1. PRESENTATION

Cette étude a débuté en 2008 et selon les prévisions initiales durera 6 ans. Durant les 3 premières années nous devrons prélever des échantillons de tissus sur tous les géniteurs utilisés lors des reproductions artificielles réalisées sur les sites MIGADO. Ainsi, nous

connaitrons l'empreinte génétique de tous les poissons ayant permis de produire les œufs, tacons et smolts de trois années de déversement. Puis à partir de 2010 et jusqu'en 2015, des Saumon adultes choisis au hasard se verrons amputer de quelques cellules épithéliales et d'écailles, avant de poursuivre leur migration. Ceci nous permettra de réaliser les tests d'assignation parentale, de connaître l'origine de ce Saumon et leur âge. Les premiers résultats seront disponibles en 2011.

3.2. PARTENARIAT

Si l'étude est portée par MIGADO, il s'avérait néanmoins nécessaire au vue des techniques mises en jeux de faire appel à des structures extérieures spécialisées. C'est pourquoi il a été fait appel à des structures extérieures tels que :

- Le SYSAAF (Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français) dont les compétences en matière d'élevage et de sélections ont permis d'assurer l'interface avec les généticiens pour la mise en place des protocoles ;
- L'INRA de Jouy-en-Josas qui nous apporte des compétences de pointe en matière d'analyse des données génétiques ;
- LABOGENA qui est le laboratoire qui assure toute la partie technique en matière génie-génétique.

MIGADO assure toute la partie échantillonnage en pisciculture et sur le terrain, participe à l'analyse des résultats et leur restitution.
Les échanges techniques entre les structures participant au projet sont décrits dans la figure 1.

Fig 1 : Dynamique de la collaboration interstructure dans le projet

3.3. DEMARCHE TECHNIQUE

3.3.1. Rappel de l'organisation de production MIGADO (Fig 2)

Les cheptels de géniteurs servant à la production d'œufs dans les structures gérées par MIGADO sont de natures différentes :

1) le cheptel conservé à la pisciculture de Bergerac (dit F0) est constitué de géniteurs « sauvages » capturés dans le milieu naturel et ayant effectués un cycle biologique complet avec croissance dans les eaux froides de l'Atlantique Nord, ses effectifs vont de 80 à 140 individus selon les années ;

2) le cheptel élevé à la pisciculture de Castels (dit F1) a été produit à partir d'œufs issus de Bergerac. Ce sont des poissons dits « enfermés de 1ère génération » car ils sont issus de parents sauvages et ont atteint leur maturité sexuelle sans avoir migré en eau salée, ses effectifs sont de 800 à 1200 individus selon les années.

NB : côté Garonne les juvéniles déversés sont produits à partir d'œufs produits à Bergerac (F0), à Pont-Crouzet (F1 idem Castels) ou par des géniteurs de souche Adour, mais dont la contribution est minoritaire.

Les cheptels de Bergerac et de Castels sont à l'origine de tous les individus déversés sur le bassin de la Dordogne. Cela représente ces dernières années de l'ordre de 500 000 individus déversés en moyenne par an. En terme génétique (ou plutôt généalogique) les juvéniles repeuplés en Dordogne sont de deux type :
1/ de première génération (F1), c'est-à-dire qu'ils descendent directement de poissons « sauvages » ;
2/ de deuxième génération (F2), c'est-à-dire que leurs grands-parents étaient des poissons sauvages.

Fig 2 : organisation de la production de Saumon atlantiques à MIGADO

3.3.2. Constitution des familles

Nos cheptels sont constitués d'un ratio mâle/femelle de 0,66 environ, ce qui signifie que si l'on raisonne à l'échelle du cheptel, le nombre de couple ou de croisement possible à Bergerac est de l'ordre de 2200 et à Castels de 220000 (soit environ 450 000 à l'échelle du bassin). Aussi, pour limiter ces nombres et fiabiliser le processus d'assignation, nous avons constitué des « familles » de géniteurs au sein de chaque cheptel.

Le choix des poissons à l'intérieur de chaque famille a été fait dans un premier temps, pour les femelles en fonction de la synchronisation dans les dates de maturation et concernant les mâles ils ont été choisis en fonction de l'âge des femelles matures pour éviter des croisements de poissons potentiellement frères et sœurs. Cela nous a permis de contrôler et maximiser la diversité génétiques des produits, mais aussi d'établir des lots de juvéniles de parents connus dont la traçabilité nous a permis de choisir des lieux de déversement spécifique…

Structure quantitative d'une « famille » de géniteurs :

- Centre de Bergerac => 1 femelle est croisée avec 6 à 18 mâles ;
- Centre de Castels => 10 à 15 femelles sont croisées avec 6 mâles.

Les familles et les croisements qui en découlent ont été répertoriés dans une base de données générale sous format excel où apparaissent également les dates, lieux de pontes, etc.

Tab 1 : en-tête de la base de données

		F0 Garonne=1 F0 Dordogne=2 F1 Garonne/Dordogne=3 F1 Adour=4	enfermé Garonne-Dordogne=0 enfermé Adour=1 Castillon=2 PHM(2)=3 PHM(3)=4	M=1 F=2 I=3	première ponte=1 deuxième ponte=2 etc.	Pas de repro=0 famille=i		2008=1 2009=2 2010=3	Pont-Crouzet = 1 Cauterets = 2 Castels =3 Bergerac = 4		Inconnu=0 Garonne = 1 Ariège = 2 Dordogne =3 Vézère = 4
	N°analyseG	Origine géniteur	Qualité	Sexe	Cohorte	Unité génétique	Date de ponte	Année ponte	Lieu de ponte	Numéro de ponte	lieu d'alevinag
1	MISSAG000003	3	0	1	1	1	29/11/2007	1	1	1	2
2	MISSAG000011	3	0	1	1	1	29/11/2007	1	1	1	2
3	MISSAG000016	3	0	1	1	1	29/11/2007	1	1	1	2
4	MISSAG000019	3	0	1	1	1	29/11/2007	1	1	1	2
5	MISSAG000020	3	0	1	1	1	29/11/2007	1	1	1	2
6	MISSAG000021	3	0	1	1	1	29/11/2007	1	1	1	2
7	MISSAG000029	3	0	2	2	1	29/11/2007	1	1	1	2
8	MISSAG000030	3	0	2	2	1	29/11/2007	1	1	1	2
9	MISSAG000031	3	0	2	2	1	29/11/2007	1	1	1	2
10	MISSAG000032	3	0	2	2	1	29/11/2007	1	1	1	2
11	MISSAG000033	3	0	2	2	1	29/11/2007	1	1	1	2
12	MISSAG000034	3	0	2	2	1	29/11/2007	1	1	1	2

3.3.3. Déroulement des reproductions artificielles

- Bergerac

Dans le centre de renditionnement de Bergerac, dès leur arrivée les poissons se voient administrer une petite puce qui permet de les reconnaître individuellement pour la durée de leur conservation dans le centre.
Une ponte classique se déroule ainsi :

1. Si après test de maturité, une femelle est déclarée mature, elle est sélectionnée et isolée ;
2. Par ailleurs, en fonction de l'âge de la femelle des mâles sont sélectionnés, anesthésiés et prélevés ;
3. La semence est récoltée (fig 4) dans un récipient stérile et conservée à 4°C à l'abri de la lumière ;
4. La femelle mature (anesthésiées) est strippée (fig 3) c'est-à-dire que l'on extrait les œufs de la cavité abdominale par des massages péristaltiques amples et lents ;
5. Les œufs sont collectés dans une bassine sèche puis égouttés et divisés en sous-lots d'environ 1000 unités ;
6. Chaque sous lot est fécondé par la semence de deux mâles injectée sur les œufs au moyen d'une seringue ;
7. les sous-lots sont regroupés et mis à incuber ensemble, cela constituera une famille ;
8. Avant de retourner dans leur bac d'élevage respectif, les poissons sont mesurés, pesés et un échantillon de tissus est prélevé (fig 8) afin de caractériser leur empreinte génétique.

- Castels

Une ponte classique se déroule ainsi :

1. Après test de maturité, un certain nombre de femelles est déclaré mature ;
2. En fonction du nombre de femelle et de leur âge, des mâles sont choisis, anesthésiés et prélevés ;
3. Chaque récolte de semence est conservée individuellement dans un récipient stérile ;
4. Dix à 15 femelles (anesthésiées) sont strippées, les œufs récoltés sont mélangés dans une grande bassine puis ce « pool » d'œufs est divisé en 3 sous-lots ;
5. Chaque sous-lot est fécondé par la semence de deux mâles soit 6 en tout, injectée sur les œufs au moyen d'une seringue (fig 6) ;
6. les sous-lots sont regroupés et mis à incuber ensembles, cela constituera une famille ;
7. Avant de retourner dans l'étang d'élevage et de se nourrir à nouveau, les poissons sont marqués individuellement avec une puce (fig 7) pour les reconnaître l'année suivante et un échantillon de tissus est prélevé afin de caractériser leur empreinte génétique.

3.3.4. Analyse génétiques des parents élevés en pisciculture.

Les échantillons prélevés (fig 8) durant la saison de ponte sont classés et étiquetés suivant la typologie définie dans la base de données (tab 1). Puis ils sont expédiés aux laboratoires de Labogena qui réalise le génotypage de chaque individu (1400 en 2008) selon un protocole éprouvé.

Au terme des trois années de prélèvement nous disposerons d'un fichier référence exhaustif répertoriant tout les croisements réalisés dans les piscicultures gérées par MIGADO.

3.3.5. Analyse génétique de la descendance et calendrier d'échantillonnage

Considérant les hypothèses suivantes :

- La majorité des tacons vivant en Dordogne atteignent le stade smolt à 1ou 2 ans et dévalent alors vers l'océan ;
- La majorité des Saumons restent 1 à 3 ans en eau salée ;

Il est possible d'établir le tableau 2. Celui-ci nous permet de visualiser concrètement quelle seront les années durant lesquelles nous devons échantillonner pour trouver des géniteurs adultes dont les parents ont participés aux reproductions artificielles réalisées dans les structures de MIGADO en 2008, 2009, 2010.

A titre d'exemple, les produits de la ponte de 2009 dévalerons en 2010 et 2011 et nous devrions en retrouver lors de nos échantillonnages sur les adultes de retour de 2011 à 2014.

Donc de 2010 à 2015, une cinquantaine de géniteurs adultes seront piégés à Tuilière et à Golfech. Ces poissons seront anesthésiés, quelques écailles et cellules épithéliales leurs seront prélevées sous l'opercule (pas de blessure) puis ils seront remis à l'eau à l'amont du barrage. Les échantillons ainsi collectés seront envoyé à Labogena.

Tab 2 : calendrier de dévalaison et de montaison des Saumons produits par MIGADO en 2008/2009/2010.

		année de dévalaison .			
		2009	2010	2011	2012
année de retour des adultes en rivière	2010	X			
	2011	X	X X		
	2012	X	X X	X X	
	2013		X X	X X	X
	2014			X X	X
	2015				X

X : poissons dont les parents ont été génotypés en 2008 ;
X : poissons dont les parents ont été génotypés en 2009 ;
X : poissons dont les parents ont été génotypés en 2010.

Fig 3 : stripping d'une femelle.

Fig 4 : stripping d'un mâle.

Fig 5 : constitution d'un lot d'œufs à partir de plusieurs femelles.

Fig 6 : stockage de la semence de 30 mâles pour fécondation.

Fig 7 : pose d'une puce en positionnement sous-cutanée (entre le derme et le muscle de l'animal).

Fig 8 : prélèvement d'une portion de nageoire pour génotypage.

3.4. RESULTATS ATTENDUS

A partir de 2010, les génotypages d'adultes piégés en Dordogne ou en Garonne permettront de connaître l'origine (naturelle ou artificielle) de celui-ci. De plus, grâce à la constitution et au suivi lors de l'incubation et de l'alevinage des « familles » issus des croisements contrôlés, nous pourrons aller au-delà du niveau d'assignation consistant à dire si un Saumon de retour est issu de parents élevés en pisciculture ou de parents ayant frayés dans le milieu naturel.

Si ce poisson est né en pisciculture, nous pourrons savoir si ces parents étaient des Saumons du cheptel « sauvage » de Bergerac ou des Saumons d'un cheptel « multiplication » de Castels, Pont-Crouzet ou Cauterets. Puis, dernier niveau, il sera possible s'il est issu d'un cheptel « multiplication », de savoir dans quelle rivière il a été lâché.

Fig 9 : schéma des différents niveaux d'assignation

4. CONCLUSION

C'est la première fois qu'en France, une telle étude, utilisant les dernières innovations en matière de géni-génétique, est mise en œuvre dans un plan de restauration d'espèce à l'échelle d'un bassin versant tel que celui de Gironde-Garonne-Dordogne. Et les bénéfices pour le programme Saumon sont multiples :

- Evaluer la contribution de la reproduction naturelle aux effectifs de géniteurs migrants ;
- Evaluer le « succès » (en terme de survie) des poissons déversés en fonction de leur site de production et/ou de déversement ;
- Améliorer les pratiques en cours dans nos centres de productions ;
- Mieux cerner les pistes de travail à privilégier pour les années à venir.

5. BIBLIOGRAPHIE

Araki H., Ardren W.R., Olsen E., Cooper B. and Blouin M.S.
Reproductive success of captive-bred stealhead trout in the wild : evaluation of three hatchery programs in the Hood river.
Conservation Biology (2006) Volume 21, No. 1, 181–190

Paterson S., S.B. Piertney, D. Knox, J. Gilbey, E. Verspoor
Characterization and PCR mutliplexing of novel highly variable tetrnucleotide Atlantic salmon (Salmo sala L.) microsatellites
Molecular Ecology Notes (2004) 4, 160-162

Herbinger C.M., P.T. O'Reilly, E. Verspoor
Unravelling first-generation pedigrees in wild endangered salmon populations using molecular genetic markers
Molecular Ecology (2006) 15, 2261-2275

King T.L., S.T. Kalinowski, W.B. Schill, A.P. Spidle, A. Lubinski
Population structure of Atlantic salmon (Salmo salar L.) : a range-wide perspective from microsatellite DNA variation
Molecular Ecology (2001) 10, 807-821

Estoup A., Gharbi K., Sanchristobal M., Chevalet C., Haffray P. ang Guyomar R.
Parentage assignment using microsatellites in Turbot (Scophthalmus maximus) and ainbow trout (Onchorynchus mykiss) hatchery population.
Can. J. fish Aquat. (1998) Sci 55 : 715-725

Les données figurant dans ce document ne pourront être exploitées de quelque manière que ce soit, sans l'autorisation écrite préalable de MI.GA.DO. et de ses partenaires financiers.