

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

LGENE09



Etude financée par :
L'Union Européenne
L'Agence de l'Eau Adour-Garonne
La Région Limousin
Le Conseil Général de la Corrèze
L'ONEMA
La FNPF

CLAVE David

Mai 2010

MI.GA.DO. 15D-10-RT



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



SOMMAIRE

SOMMAIRE	II
TABLE DES ILLUSTRATIONS	III
INTRODUCTION	1
DESCRIPTION DE L’ETUDE	1
1 LA TECHNIQUE D’ASSIGNATION PARENTALE.....	2
1.1 DEFINITION	2
1.2 METHODE	2
2 DESCRIPTIF DE L’ETUDE REALISEE PAR MIGADO.....	2
2.1 PRESENTATION	3
2.2 PARTENARIAT	3
2.3 DEMARCHE TECHNIQUE	4
2.3.1 <i>Rappel de l’organisation de la production MIGADO (Fig 2).....</i>	<i>4</i>
2.3.2 <i>Constitution des familles.....</i>	<i>6</i>
2.3.3 <i>Déroulement des reproductions artificielles.....</i>	<i>7</i>
2.3.3.1 A Bergerac	7
2.3.3.2 A Castels	7
2.3.4 <i>Analyse génétiques des parents élevés en pisciculture.</i>	<i>8</i>
2.3.5 <i>Analyse génétique de la descendance et calendrier d’échantillonnage.....</i>	<i>8</i>
3 PREMIERS RESULTATS ET PERSPECTIVES.....	11
CONCLUSION	13
BIBLIOGRAPHIE.....	14

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : DYNAMIQUE DE LA COLLABORATION INTERSTRUCTURE DANS LE PROJET.....	4
FIGURE 2 : ORGANISATION DE LA PRODUCTION DE SAUMON ATLANTIQUE A MIGADO.	6
TABLEAU 1 : EN-TETE DE LA BASE DE DONNEES	6
TABLEAU 2 : CALENDRIER DE DEVALAISON ET DE MONTAISON DES SAUMONS PRODUITS PAR MIGADO.	9
FIGURE. 3 ET 4 : STRIPPING D’UNE FEMELLE (A GAUCHE) ET D’UN MALE (A DROITE).	9
FIGURE 5 : STOCKAGE DE LA SEMENCE DE 30 MALES AVANT FECONDATION DES ŒUFS.....	10
FIGURE 6 ET 7 : POSE D’UNE PUCE SOUS-CUTANEE (A GAUCHE) ET PRELEVEMENT D’UN ECHANTILLON DE NAGEOIRE (A DROITE).....	10
TABLEAU 3 : EFFECTIFS DE GENITEURS GENOTYPES EN 2008 ET 2009 EN FONCTION DE LA COHORTE ET DE L’AGE.	11
FIGURE 8 : SCHEMA DES DIFFERENTS NIVEAUX D’ASSIGNATION.....	12

INTRODUCTION

Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun moyen sur le bassin Gironde-Garonne-Dordogne de déterminer si les saumons adultes remontant dans nos cours d'eau sont issus de la reproduction naturelle. Seule des campagnes de marquage par ablation d'adipeuse ou par micromarques nasales réalisées ces dernières années ont permis d'identifier le retour d'individus issus des soutiens d'effectifs. Cette question est d'autant plus importante que l'objectif du plan de restauration de l'espèce est avant tout de parvenir à amener un effectif suffisant de géniteurs adultes à se reproduire dans le milieu naturel pour tendre à une autosuffisance de la population.

L'effort réalisé depuis une vingtaine d'année par les organismes travaillant à la protection des poissons migrateurs et notamment par l'association MIGADO, permet aujourd'hui de cerner les menaces qui pèsent sur les saumons durant leur phase dulçaquicole. Elles sont nombreuses et touchent l'espèce principalement au niveau des jeunes stades. Elles sont de deux sortes : d'une part celles qui portent atteintes au bon développement biologique, notamment lors de la phase embryo-larvaire et de la phase de croissance des juvéniles (dégradation des habitats, éclusées...) et d'autre part celles qui portent atteinte à la libre circulation de l'espèce (mortalités à la dévalaison). Ainsi, l'impact cumulé des pressions d'origine anthropique nuit de façon récurrente à la survie des jeunes saumons atlantiques et plus particulièrement à ceux nés naturellement en rivière donc, par conséquent, au nombre de saumons adultes de retour. La question de leur participation réelle au renouvellement de la population reste donc posée.

Pour répondre à ces interrogations, il était nécessaire de réaliser une étude qui permettrait de distinguer, parmi les géniteurs de retour, les individus nés en rivière de ceux produits dans les piscicultures de repeuplement gérées par MIGADO. Parmi les nouvelles techniques mises au point, la méthode la plus adaptée pour ce type d'étude est l'assignation de parenté ou « le marquage génétique ».

DESCRIPTION DE L'ETUDE

Dans le présent rapport, une présentation générale du protocole et de la technique mis en place à l'échelle du Bassin Garonne Dordogne dans les structures de MIGADO sera exposée. Le volet de l'étude concernant l'axe Dordogne, les résultats attendus et l'échéancier des différentes phases seront plus particulièrement développés.

1 LA TECHNIQUE D'ASSIGNATION PARENTALE

1.1 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.

1.2 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 morphologiquement identiques entre eux, un peu comme si chacun possédait naturellement un « code barre » interne unique : l'empreinte génétique.

Durant la reproduction et la transmission des gènes parentaux à la descendance, celle-ci reçoit une partie des séquences microsatellites de chaque parent. Il en résulte une combinaison de séquences qui lui est propre. Néanmoins, la progéniture conserve une part identifiable de 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). Parmi les 20 séquences connues et utilisées chez le saumon (Paterson et al, 2004 ; Herbinger et al, 2006 ; King et al, 2001), les généticiens du laboratoire LABOGENA en ont sélectionné 12.

D'un point de vue technique, il suffit de prélever un fragment de tissu (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 des parents potentiels ayant participé à la production en pisciculture et dont l'empreinte génétique est connue. Ceci permettra de valider ou non la filiation et cette étape se fera par intégration. C'est-à-dire, dans le panel de couples parentaux possibles, seul les individus correspondant à 100% seront identifiés comme issus de repeuplement et si aucun couple n'est retenu... Cela signifie que l'individu X est issu d'une reproduction en milieu naturel (Araki et al 2006).

2 DESCRIPTIF DE L'ETUDE REALISEE PAR MIGADO

Cette étude est présentée dans sa globalité, c'est-à-dire en incluant le volet Garonne, car l'analyse des données doit être faite avec l'ensemble des genotypages réalisés pour l'ensemble du bassin Garonne Dordogne. En effet, bien que le saumon ait un homing strict, 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.

2.1 PRESENTATION

Cette étude a débuté en 2008 et selon les prévisions initiales doit s'étendre sur 6 ans. Durant les 3 premières années, des échantillons de tissus doivent être prélevés sur tous les géniteurs utilisés lors des reproductions artificielles sur les sites MIGADO. Ainsi, l'empreinte génétique de tous les poissons ayant permis de produire les œufs, alevins, tacons et smolts de trois années de déversement pourra être identifiée. Puis, à partir de 2010 et jusqu'en 2015, des prélèvements de cellules épithéliales et d'écailles seront réalisés sur les saumons adultes capturés au niveau des pièges de Tuilières et de Mauzac sur la Dordogne et Golfech et Carbonne sur la Garonne. Les tests d'assignation parentale, effectués à partir de ces prélèvements, permettront de connaître l'origine de ces saumons et leur âge. Les premiers résultats seront disponibles en 2011.

2.2 PARTENARIAT

L'étude est portée par Migado, mais en raison des techniques de pointe employées, il était indispensable de faire appel à des structures extérieures spécialisées :

- Le SYSAAF (Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français) dont les compétences en matière d'élevage et de sélection ont permis d'assurer l'interface avec les généticiens pour la mise en place des protocoles ;

- L'INRA de Jouy-en-Josas qui apporte les compétences scientifiques en matière d'analyse des données génétiques ;

- LABOGENA, laboratoire qui assure toute la partie technique en matière de génie-génétique.

Migado assure toute la partie échantillonnage (pisciculture et terrain), participe à l'analyse des résultats ainsi qu'à leur restitution et à la mise en perspective dans le contexte local.

Les échanges techniques entre les structures participant au projet sont décrits dans la figure 1.

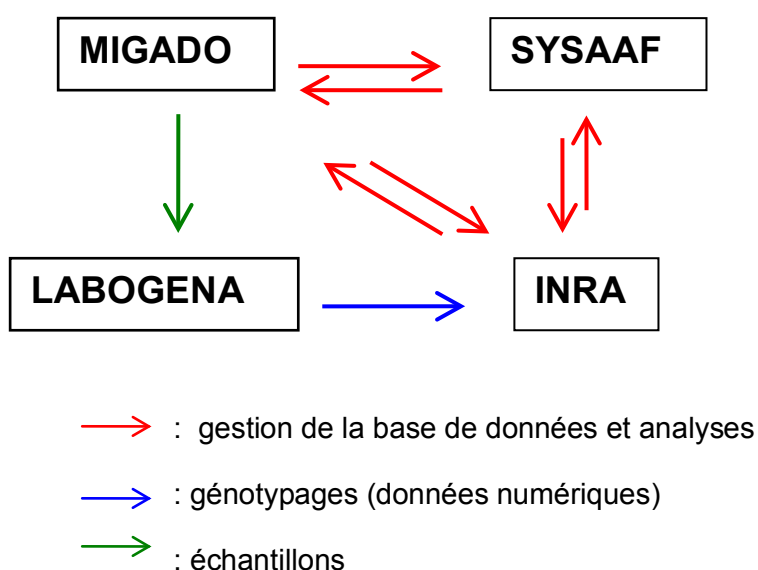


Figure 1 : Dynamique de la collaboration interstructure dans le projet.

2.3 DEMARCHE TECHNIQUE

2.3.1 Rappel de l’organisation de la production MIGADO (Fig 2)

Les cheptels de géniteurs servant à la production d’œufs de saumon 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 effectué un cycle biologique complet avec croissance dans les eaux froides de l’Atlantique Nord. Ses effectifs varient 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 essentiellement à partir d’œufs produits à Bergerac (F0) et à Pont-Crouzet (F1 idem Castels) et minoritairement à partir des géniteurs « enfermés de 1ère génération » de souche Adour.

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 donc de deux types :

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.

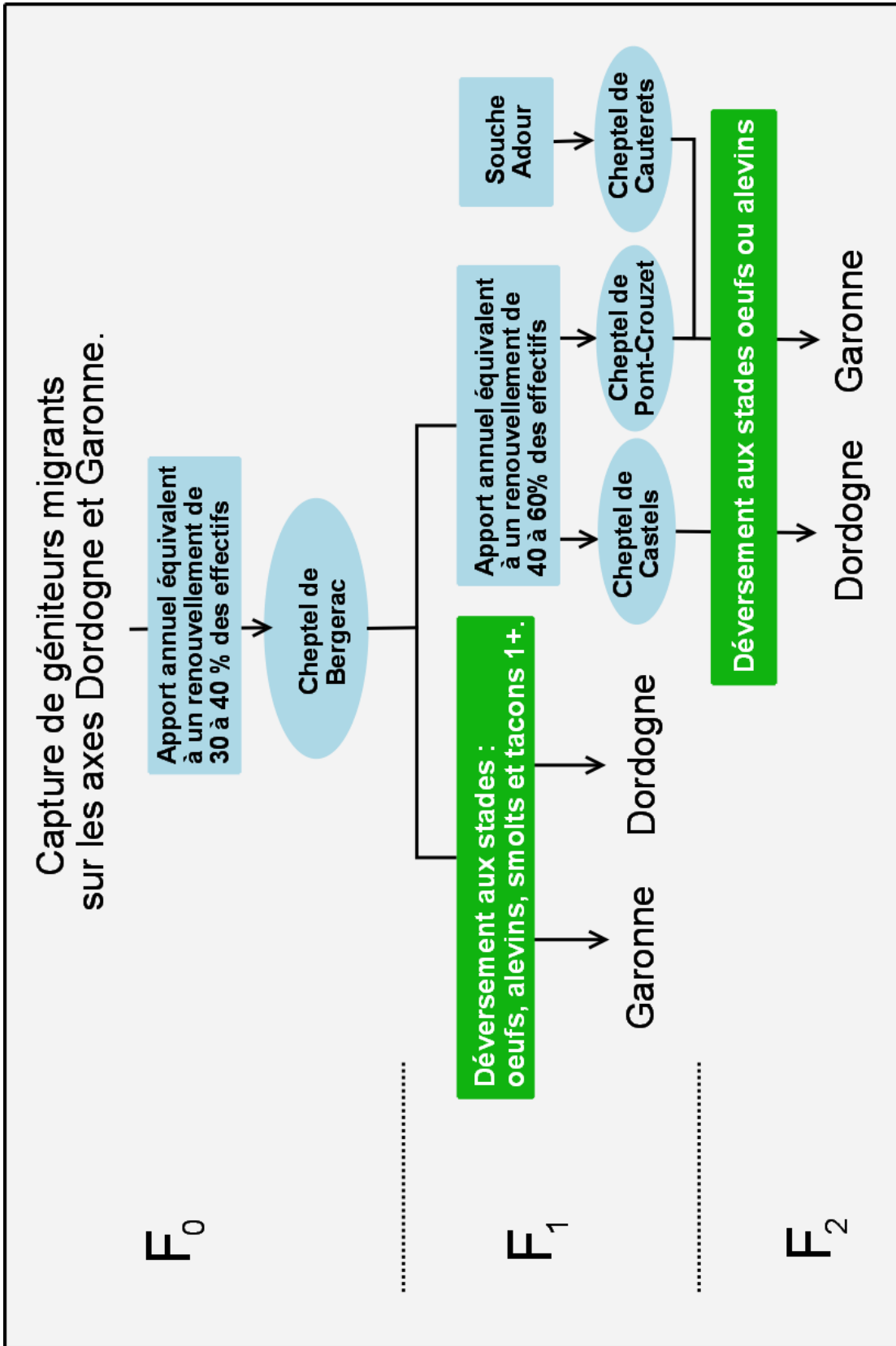


Figure 2 : Organisation de la production de Saumon atlantique à Migado.

2.3.2 Constitution des familles

Les cheptels du bassin Garonne-Dordogne 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 couples ou de croisements possibles à Bergerac est de l'ordre de 2 200 et à Castels de 220 000 (soit environ 450 000 à l'échelle du bassin). Aussi, pour limiter ces nombres et fiabiliser le processus d'assignation, des « familles » de géniteurs ont été constituées 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 pour les mâles en fonction de l'âge des femelles matures. Ceci afin d'éviter des croisements de poissons potentiellement frères et sœurs. Cette méthode permet non seulement de contrôler et maximiser la diversité génétique des produits, mais aussi d'établir des lots de juvéniles de parents connus. La traçabilité dans les élevages, permet ensuite de retrouver les sites de déversement des lots de juvéniles.

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 (cf tableau 1) où apparaissent également les dates, lieux de pontes, etc.

		FO Garonne=1 FO Dordogne=2 F1 Garonne/Dor dogne=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

Tableau 1 : En-tête de la base de données

2.3.3 Déroulement des reproductions artificielles

2.3.3.1 A Bergerac

Dans le centre de reconditionnement de Bergerac, une marque individuelle (transpondeur) qui permet de les reconnaître pendant toute la durée de leur conservation dans le centre est implantée sur les poissons dès leur arrivée.

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 leur semence prélevée ;
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 (anesthésiée) 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, ils constitueront ainsi 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.

2.3.3.2 A Castels

Une ponte classique se déroule ainsi :

1. Après test de maturité, un certain nombre de femelles sont déclarées matures ;
2. En fonction du nombre de femelle et de leur âge, des mâles sont choisis, anesthésiés et leur semence prélevée ;
3. Chaque récolte de semence est conservée individuellement dans un récipient stérile ;

4. Dix à quinze 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), répartie sur les œufs au moyen d'une seringue (fig 6) ;
6. Les sous-lots sont regroupés et mis à incuber ensemble, ils constitueront ainsi une famille ;
7. Avant de retourner dans l'étang d'élevage et de se nourrir à nouveau, les poissons sont, comme à Bergerac, 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.

2.3.4 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 réalisent le génotypage de chaque individu (1400 en 2008 pour les deux bassins) selon un protocole éprouvé.

Au terme des trois années de prélèvement, un fichier référence exhaustif répertoriant tout les croisements réalisés dans les piscicultures gérées par Migado sera disponible.

2.3.5 Analyse génétique de la descendance et calendrier d'échantillonnage

Considérant les hypothèses suivantes :

- La majorité des tacons évoluant dans la rivière Dordogne atteignent le stade smolt à 1ou 2 ans et dévalent alors vers l'océan (Helland, Dumas 1994);
- La majorité des saumons restent 1 à 3 ans en eau salée ;

Il est possible d'établir le tableau 2. Celui-ci permet de visualiser concrètement quelles seront les années durant lesquelles les échantillons doivent être prélevés pour trouver des géniteurs adultes dont les parents ont participé aux reproductions artificielles réalisées dans les structures de Migado en 2008, 2009, 2010.

A titre d'exemple, les produits de la ponte de 2009 dévaleront en 2010 et 2011 (croix bleu dans le tableau 2). Ils devraient être retrouvés lors des échantillonnages sur les adultes de retour de 2011 à 2014.

Donc, de 2010 à 2015, plusieurs dizaines de saumons adultes seront piégés à Tuilières, Golfech et Carbonne. Ces poissons seront anesthésiés, quelques écailles et cellules épithéliales sous l'opercule (pas de blessure) seront prélevées puis ils seront remis à l'eau en amont des barrages. Les échantillons ainsi collectés seront envoyés à Labogena.

		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 lors de la ponte 2008 ;

X : poissons dont les parents ont été génotypés lors de la ponte 2009 ;

X : poissons dont les parents ont été génotypés lors de la ponte 2010.

Tableau 2 : Calendrier de dévalaison et de montaison des saumons produits par Migado.



Figure. 3 et 4 : Stripping d'une femelle (à gauche) et d'un mâle (à droite).

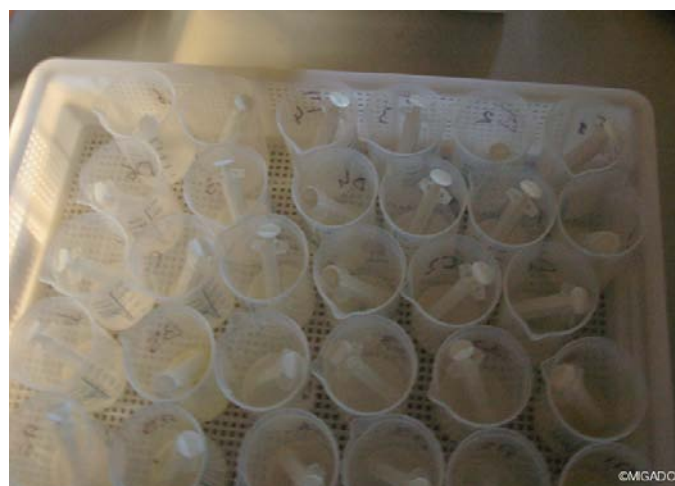


Figure 5 : Stockage de la semence de 30 mâles avant fécondation des œufs.



Figure 6 et 7 : Pose d'une puce sous-cutanée (à gauche) et prélèvement d'un échantillon de nageoire (à droite).

3 PREMIERS RESULTATS ET PERSPECTIVES

	Castels			Bergerac		
	Age	Mâle	Femelles	hiver de mer	Mâles	Femelles
2008	2	122	213	1	16	5
	3	25	137	2	5	31
	4	1	72	3	-	4
2009	2	186	215	1	2	-
				2	3	13
	Total	334	637	Total	26	53

Tableau 3 : Effectifs de géniteurs génotypés en 2008 et 2009 en fonction de la cohorte et de l'âge.

Au cours des années 2008 et 2009, outre les améliorations en terme de technique de production, la réalisation de l'action LGENE a consisté à génotyper et à marquer individuellement tous les géniteurs participant à la production de juvéniles. Au total, ce sont 1050 géniteurs conservés en pisciculture qui ont été génotypés en Dordogne.

A partir de 2010, les génotypages d'adultes piégés dans le milieu naturel en Dordogne ou en Garonne permettront de connaître leur origine (naturelle ou artificielle). De plus, grâce à la constitution et au suivi (ou la traçabilité) lors de l'incubation et de l'alevinage des « familles » issues des croisements contrôlés, les analyses pourront aller au-delà de ce premier niveau d'assignation (cf figure 9)

Si ce poisson est né en pisciculture, il sera possible de savoir si ses parents étaient des saumons du cheptel « sauvage » de Bergerac ou des saumons d'un cheptel « multiplication » de Castels, Pont-Crouzet ou Cauterets (fig 9, niveau 2). Puis, dernier niveau, il sera possible également d'identifier s'il est issu d'un cheptel « multiplication » et de savoir dans quelle rivière il a été lâché.

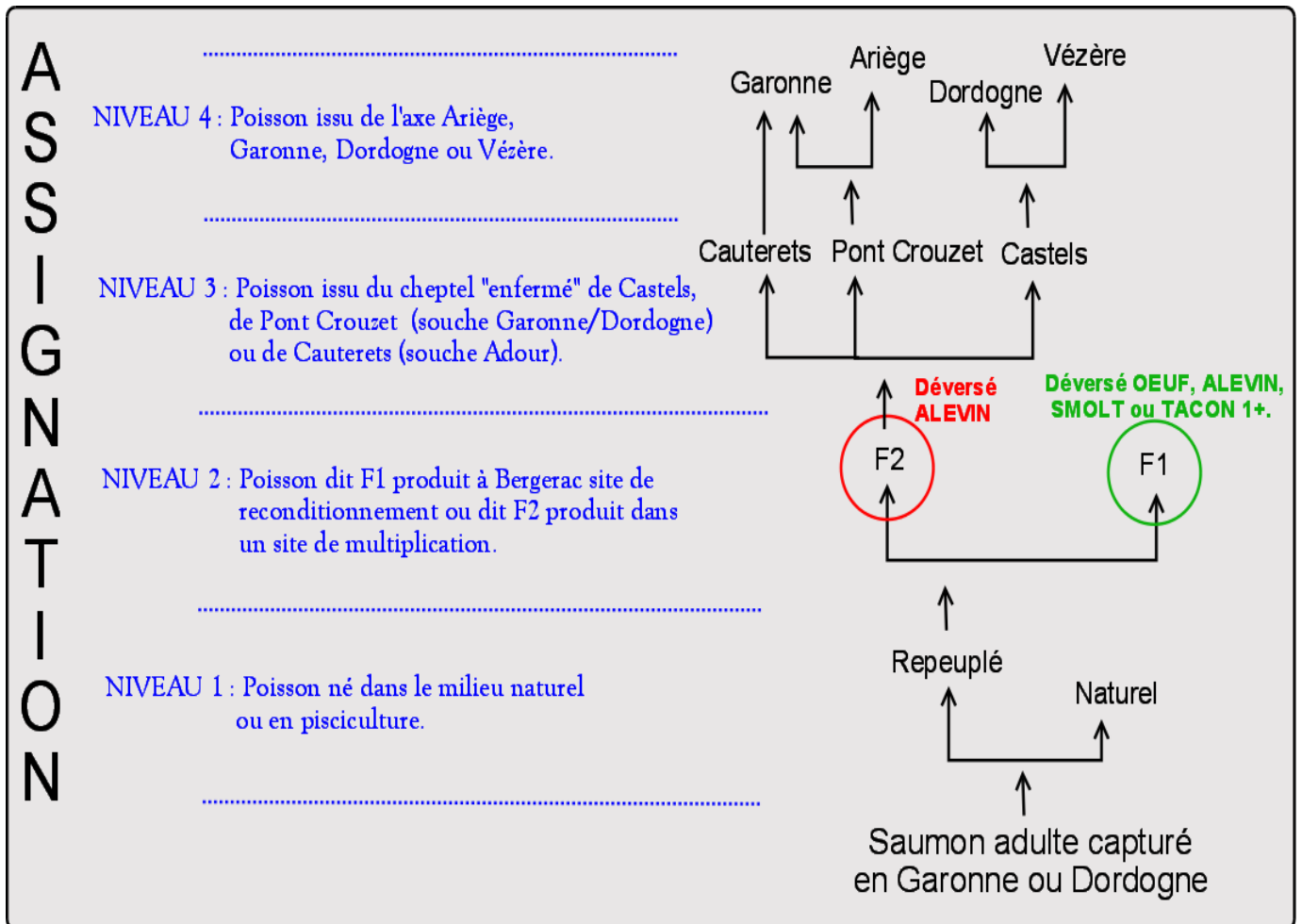


Figure 8 : Schéma des différents niveaux d'assignation.

CONCLUSION

C’est la première fois en France qu’une étude, utilisant les dernières innovations en matière de génie-génétique est mise en œuvre dans un plan de restauration d’espèces à l’échelle d’un bassin versant (ici celui de Gironde-Garonne-Dordogne). Les bénéfices dégagés pour le programme saumon seront multiples :

- Evaluer la contribution de la reproduction naturelle dans les 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 les centres de production ;

- Mieux cerner les pistes de travail à privilégier pour les années à venir.

BIBLIOGRAPHIE

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

Helland M., Dumas J. Ecologie et comportement des juvéniles. In Guegen J.C. et Prouzet P. *Le Saumon atlantique, biologie et gestion de la ressource*. IFREMER (1994), p.29-46.

Paterson S., S.B. Piernney, D. Knox, J. Gilbey, E. Verspoor. Characterization and PCR mutliplexing of novel highly variable tetrnucleotide Atlantic salmon (*Salmo sala* L.) microsatellites.v *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.