



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.**

LGENE15

Etude financée par :

L'Agence de l'Eau Adour-Garonne
La Région Limousin
Le Conseil Général de la Corrèze
L'ONEMA
La FNPF

**David CLAVE
Damien FILLOUX
Sébastien GRACIA**

Juin 2016



RESUME

Depuis 2007, pour la première fois en France, une étude utilisant les dernières innovations en matière de génie génétique est réalisée à l'échelle d'un bassin versant, celui de Gironde-Garonne-Dordogne. Elle est mise en œuvre dans le cadre d'un plan de restauration d'espèce. Les bénéfices pour le programme Saumon sont multiples :

- Evaluer la contribution de la reproduction naturelle au sein d'un échantillon de géniteurs migrants ;
- Evaluer le « succès » (en termes de représentation) 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.

L'analyse des premières données récoltées montre que :

- parmi les géniteurs testés, toutes les rivières identifiées comme à enjeu pour l'espèce sont représentées dans la détermination de l'origine ;
- un nombre significatif de géniteurs sont d'origine naturelle et donc nés dans le milieu naturel ;
- la part d'individus issus de la reproduction naturelle est étroitement liée aux migrations.

Ces résultats sont encourageants car ils signifient que non seulement les repeuplements fonctionnent mais, qu'en plus, la reproduction naturelle est effective.

SOMMAIRE

RESUME	I
SOMMAIRE.....	II
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	III
INTRODUCTION.....	1
DESCRIPTION DE L'ETUDE.....	2
1 LA TECHNIQUE D'ASSIGNATION PARENTALE.....	2
1.1 DEFINITION	2
1.2 METHODE	2
2 DESCRIPTIF DE L'ETUDE REALISEE PAR MIGADO	3
2.1 PRESENTATION	3
2.2 PARTENARIAT	3
2.3 DEMARCHE TECHNIQUE.....	4
2.3.1 Rappel de l'organisation de la production MIGADO (Fig. 2)	4
2.3.2 Constitution des familles	6
2.3.3 Déroulement des reproductions artificielles.....	7
2.3.4 Analyse génétique des parents élevés en pisciculture.....	8
3 PREMIERS RESULTATS ET PERSPECTIVES	10
3.1 GENOTYPAGE DES CHEPTELS DE GENITEURS	10
3.2 ASSIGNATION PARENTALE DES GENITEURS MIGRANT DANS LA DORDOGNE.....	11
CONCLUSION.....	12
BIBLIOGRAPHIE.....	13

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1 : Dynamique de la collaboration interstructures dans le projet.</i>	<i>4</i>
<i>Figure 2 : Organisation de la production de Saumon atlantique à Migado.</i>	<i>5</i>
<i>Figure 3 et Figure 4: Stripping pour la récolte des gamètes d'une femelle (à gauche) et d'un mâle (à droite)....</i>	<i>9</i>
<i>Figure 5: Stockage de la semence de 30 mâles avant fécondation des œufs.....</i>	<i>9</i>
<i>Figure 6 et Figure 7 : Pose d'une puce sous-cutanée (à gauche) pour identification et prélèvement d'un échantillon de nageoire pour génotypage (à droite).</i>	<i>9</i>
<i>Tableau 1 : En-tête de la base de données d'enregistrement des croisements de géniteurs.</i>	<i>6</i>
<i>Tableau 3 : Nombre de géniteurs prélevés sur les piscicultures qui produisent des œufs et des juvéniles pour le plan de restauration sur l'axe Dordogne et synthèse des valeurs enregistrées dans la base de données.....</i>	<i>10</i>

INTRODUCTION

Les campagnes de marquage par ablation d'adipeuse ou par micromarques nasales réalisées ces dernières années ont permis de confirmer le retour d'individus repeuplés sur le bassin. Cependant, il n'existe, à l'heure actuelle, sur le bassin Gironde-Garonne-Dordogne aucun moyen pour déterminer de façon indéniable si les saumons adultes remontant dans nos cours d'eau sont issus de reproduction naturelle. Cette question est d'autant plus importante que l'objectif du plan de restauration de l'espèce est en premier lieu de parvenir à amener un effectif suffisant de géniteurs adultes à se reproduire dans le milieu naturel et enfin de tendre à une autosuffisance de la population.

L'effort réalisé depuis une vingtaine d'années par les organismes travaillant à la protection des poissons migrateurs, et notamment l'association MIGADO, permet aujourd'hui de commencer à cerner les menaces qui pèsent sur les saumons durant leur phase dulçaquicole. Celles-ci sont nombreuses et touchent l'espèce, principalement les jeunes stades et sont de deux sortes : d'une part, celles qui portent atteinte au bon déroulement des phases biologiques précoces (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 et inaccessibilité des habitats). Ainsi, l'impact des pressions cumulées d'origine anthropique nuit de façon récurrente à la survie des jeunes saumons atlantiques et, plus particulièrement, à ceux nés naturellement en rivière et, par conséquent, au nombre de saumons adultes de retour. De plus, demeure la question de leur participation réelle au renouvellement de la population.

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

Le présent rapport regroupe une présentation générale du protocole et de la technique mis en place à l'échelle du Bassin Garonne Dordogne dans les structures de MIGADO.

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, 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 donc de prélever un fragment de tissu (ex : nageoire) ou de cellules épithéliales (ex : frottis 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. Ainsi, dans le panel de couples parentaux possibles, seuls 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 *in fine* avec l'ensemble des génotypages réalisés pour le bassin Garonne Dordogne. En effet, bien que le saumon ait un homing strict, le phénomène d'égaré 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 ; ceci pouvant conduire à une sous-estimation de la contribution des poissons issus de repeuplement.

2.1 PRESENTATION

Cette étude a débuté en 2008. Durant les premières années, des échantillons de tissus sont prélevés sur tous les géniteurs utilisés lors des reproductions artificielles sur les sites MIGADO. Ainsi, nous connaissons l'empreinte génétique de tous les poissons ayant permis de produire les œufs, alevins, tacons et smolts de trois années de déversement. Puis, à partir de 2010 et jusqu'en 2017, des prélèvements de cellules épithéliales et d'écaillés seront réalisés sur les saumons adultes capturés au niveau des pièges de Tuilières et Mauzac sur la Dordogne et de 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. En 2011, il a été décidé de rajouter 2 années de prélèvements de géniteurs de pisciculture.

2.2 PARTENARIAT

Si l'étude est portée par Migado, il s'avérait néanmoins nécessaire au vu des techniques de pointe employées, 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 des 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 en pisciculture et, sur le terrain, participe à l'analyse des résultats, à leur restitution et mise en perspective vis-à-vis du contexte local.

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

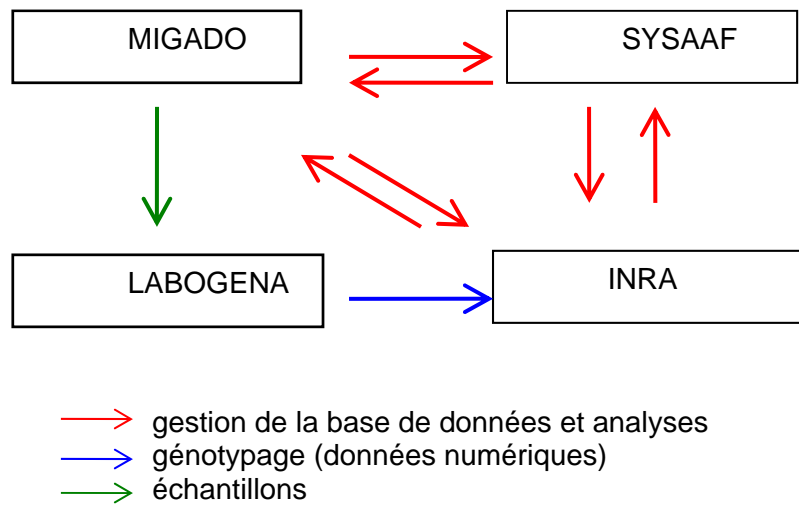


Figure 1 : Dynamique de la collaboration interstructures dans le projet.

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. Ces 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. Les 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) et par des géniteurs « enfermés de 1ère génération » 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, environ 500 000 individus déversés en moyenne par an. En termes de génétique (ou plutôt de généalogie), 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.

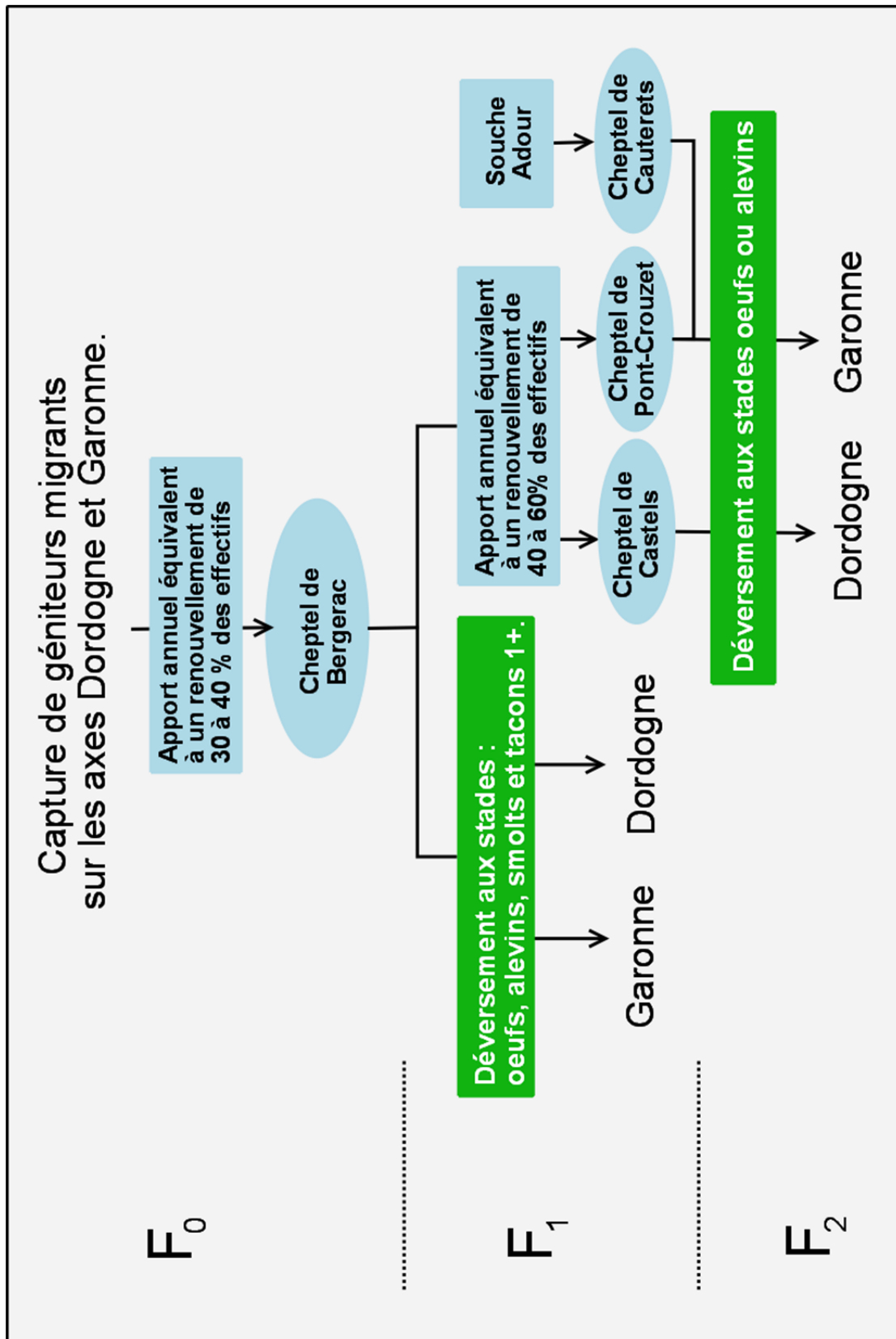


Figure 2 : Organisation de la production de Saumon atlantique à Migado.

2.3.2 Constitution des familles

Les cheptels de MIGADO 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, ont été constituées des « familles » de géniteurs au sein de chaque cheptel. C'est-à-dire que les femelles sont croisées avec un nombre défini de mâles et que ces croisements sont enregistrés.


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 a pour but 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.

Tableau 1 : En-tête de la base de données d'enregistrement des croisements de géniteurs.

		FO Garonne=1 FO Dordogne=2 F1 Garonne/Dordogne=3 F1 Adour=4	enfermé Garonne=0 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'alevinage
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

2.3.3 Déroulement des reproductions artificielles

2.3.3.1 Bergerac

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

Une ponte classique se déroule ainsi :

1. Si après le 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 (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, 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.

2.3.3.2 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 femelles 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 ensemble, cela constituera 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 tissu est prélevé afin de caractériser leur empreinte génétique.

2.3.4 Analyse génétique 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). Ils sont ensuite 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, MIGADO disposera d'un fichier référence exhaustif répertoriant tous les croisements réalisés dans les piscicultures gérées par l'organisme.



Figure 3 et Figure 4: Stripping pour la récolte des gamètes 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 Figure 7 : Pose d'une puce sous-cutanée (à gauche) pour identification et prélèvement d'un échantillon de nageoire pour génotypage (à droite).

3 PREMIERS RESULTATS ET PERSPECTIVES

Initialement, seulement 3 années de génotypage du cheptel de géniteurs des piscicultures étaient prévues, accompagnées de 6 années de prélèvement de géniteurs migrants avec une année de chevauchement. Au vu des faibles effectifs migrants et de la quantité limitée de résultats, il a été décidé de prolonger de 2 ans les prélèvements sur le cheptel de géniteurs des piscicultures et donc des géniteurs migrants. Outre le marquage individuel de tous les géniteurs participant à la production de juvéniles, la réalisation de l'action LGENE a permis des améliorations en termes de technique de production.

3.1 Génotypage des cheptels de géniteurs

Le tableau ci-dessous présente les quantités de géniteurs génotypés lors de la production d'œufs 2014 (primo-reproducteurs) ainsi que le nombre de familles constituées et le nombre total de géniteurs ayant été utilisés sur chaque pisciculture. *A noter que les géniteurs de Bergerac ont été génotypés en 2014 pour être assignés et tester leur origine.*

Tableau 2 : Nombre de géniteurs prélevés sur les piscicultures qui produisent des œufs et des juvéniles pour le plan de restauration sur l'axe Dordogne et synthèse des valeurs enregistrées dans la base de données.

	Femelles	Mâles	plan de croisement
Castels	508	168	29
Bergerac	79	27	84

Pour la production 2015 de saumons atlantiques, 24 primo-reproducteurs ont été utilisés et génotypés, ce très faible chiffre s'explique par un incident à la pisciculture de Castels ayant pénalisé le renouvellement des géniteurs. A ces poissons, s'additionnent 652 géniteurs ayant déjà été utilisés les années précédentes. Lors des reproductions, 113 familles ont été enregistrées dans la base de données. *NB : 1 famille = 16 à 22 lignes de saisie de données.*

3.2 Assignation parentale des géniteurs migrant dans la Dordogne.

Les assignations parentales 2015 n'étaient pas disponibles à la rédaction du rapport pour cause de modification du protocole de prélèvement. En effet, afin de diminuer le coût individuel des analyses et d'améliorer leur prise en charge, il a fallu reconditionner plusieurs centaines d'échantillons, ce qui a entraîné beaucoup de retard dans leur prise en charge par le laboratoire et donc leur analyse.

CONCLUSION

Les génotypages des cheptels de géniteurs permettront d'assigner les saumons de montaison des années 2017, 2018 et 2019.

Un rapport spécifique sera prochainement édité en 2016 afin de reprendre les résultats d'assignation de tous les géniteurs migrants prélevés depuis 2010, soit 630 individus. Les résultats nous permettront d'évaluer les origines natales de ces poissons et d'en extrapoler les résultats à la population du bassin.

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. Piertney, D. Knox, J. Gilbey, E. Verspoor .Characterization and PCR mutliplexing of novel highly variable tetrnucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* 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. and Guyomar R. Parentage assignment using microsatellites in Turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow 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.