

Caractéristiques génétiques de la population d'alose feinte (*Alosa fallax rhodanensis*) du Tavignano (Corse)

Sophie Launey, Anne-Laure Besnard, Jean-Luc Baglinière
UMR ESE, INRA Agrocampus, 65 rue de Saint Brieuc, 35042 Rennes Cedex
Sophie.Launey@rennes.inra.fr

Une première analyse des caractéristiques morphologiques et écologiques des aloses capturées sur les fleuves Rhône, Aude, Hérault et Tavignano avait montré une homogénéité de ces populations méditerranéennes (Le Corre, 1999 ; Le Corre *et al.*, 2000). De même, une première analyse génétique utilisant les allozymes avait montré une homogénéité des populations du Rhône, de l'Aude et de l'Hérault, celle du Tavignano n'ayant pu être analysée (Le Corre *et al.*, 2005).

L'étude réalisée avait donc un double but

i) caractériser génétiquement la population du Tavignano en utilisant les outils actuels performants que sont les marqueurs microsatellites ; cette méthode permettant de caractériser avec précision la structure et la variabilité génétique de cette population

ii) revisiter l'homogénéité génétique des populations méditerranéennes françaises en intégrant la population du Tavignano et ainsi identifier son niveau de spécificité.

1. Matériel biologique et méthodes d'analyses moléculaires

a. Echantillonnage

Des prélèvements de tissus (nageoire) et écailles ont été réalisés au cours du printemps 2010 et 2011 par MRM sur 156 alose adultes et juvéniles. La répartition de ces échantillons a varié selon les stades de développement, les rivières et les sites :

- Tavignano : un échantillon de 50 juvéniles prélevés en 2010 au barrage de Cardicia, et un autre de 16 adultes prélevés en 2011 sur le site du Pont de Faïo
- Rhône : deux échantillons prélevés en 2010, l'un de 35 individus du site de Sauveterre Rive Gauche, et l'autre de 31 individus du site Usine-Ecluse de Vallabrègues Rive Droite
- Aude : 15 individus prélevés à Moussoulens (5 en 2010 et 10 en 2011, qui ont été regroupés pour avoir un échantillon de taille analysable)
- Vidourle : 10 individus prélevés à Saint Laurent d'Aigouze (4 en 2011 et 6 en 2010, regroupés également).

b. Marqueurs moléculaires utilisés

Les marqueurs moléculaires utilisés sont du type *microsatellite*. Un marqueur microsatellite est une séquence de l'ADN caractérisée par un motif de base très simple (2 à 4 paires de base) qui est répété un certain nombre de fois. Ce nombre de répétitions varie d'un individu à l'autre, ce qui permet de distinguer les individus entre eux. Ce sont des marqueurs adaptés pour la définition de génotypes individuels (= « empreinte génétique ») et pour l'étude des flux de gènes entre populations.

Pour chaque marqueur, on peut identifier les *allèles* portés par chaque individu. Un allèle est un variant du marqueur considéré : dans le cas des marqueurs microsatellites, un allèle est caractérisé par un nombre de répétition du motif de base, et deux allèles vont donc différer entre eux par le nombre de répétitions de ce motif. *Alosa fallax* est une espèce *diploïde*, c'est-à-dire qu'elle possède deux jeux de chromosomes identiques, l'un issu du père et l'autre de la mère. Chaque individu possède donc deux allèles pour chaque marqueur (un sur chaque chromosome homologue). Si les deux allèles sont identiques, on dit que l'individu est *homozygote*. Si les deux allèles sont différents, on dit qu'il est *hétérozygote*.

Dans cette étude, nous avons utilisé 14 marqueurs microsatellites différents, qui ont été développés au laboratoire dans le cadre du projet AARC (Atlantic Arc Resource Conservation), financé par le programme transnational Interreg IV (Atlantic Area, fonds FEDER).

c. Techniques de laboratoire

L'ADN de chaque individu a été extrait à partir d'un fragment de nageoire conservé dans l'alcool, à l'aide d'une technique express combinant de la protéinase K (permettant de digérer les tissus) et une résine chélatrice, le Chelex® (méthode dérivée d'Estoup *et al.* 1996). Cette méthode permet d'obtenir un ADN de qualité moyenne, mais suffisante pour l'analyse des marqueurs microsatellites. Chaque marqueur va être amplifié spécifiquement à l'aide de la technique de Réaction de Polymérisation en Chaîne (ou PCR, Polymerase Chain Reaction) qui permet d'obtenir rapidement un grand nombre de copie identique d'un petit fragment d'ADN. Ces fragments vont ensuite migrer dans un gel par technique d'électrophorèse (migration sous l'effet d'un courant électrique), et la taille du fragment (donc son nombre de répétition) est déterminée par sa vitesse de migration. On peut ainsi déterminer caratériser ?? rapidement le *génotype* de chaque individu (c'est-à-dire les allèles pour chacun des 14 marqueurs). Les analyses ont été réalisées à la plate-forme Biogenouest (Le Rheu, Rennes).

2. Résultats

a. Variabilité génétique à l'intérieur de chaque population

La variabilité génétique à l'intérieur de chaque population a été caractérisée à l'aide des descripteurs standards de la génétique des populations : nombre d'allèles moyen par population, et hétérozygotie observée (= fréquence moyenne des génotypes hétérozygotes). Comme le nombre d'allèles dans un échantillon dépend également de la taille de celui-ci, nous avons utilisé une méthode appelée « raréfaction » (El Mousadik & Petit, 1996) pour comparer la richesse allélique dans nos échantillons, qui sont de taille différente. Par ailleurs, nous avons également calculé l'indice de fixation F_{is} (d'après Wright, 1969). Cet indice sera égal à 0 dans une population dite « à l'équilibre de Hardy Weinberg », c'est-à-dire se rapprochant d'une population idéale de taille infinie, où les croisements se font au hasard (panmixie), et qui n'est pas soumise à la migration ou à la sélection. Les calculs ont été faits à l'aide du logiciel Genetix 4.02 (Belhir *et al.* 1996) et Fstat 2.9.3 (Goudet, 1995).

Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : variabilité génétique dans les populations d'*Alosa fallax* étudiées

Population	N	Na	Ra	Ho	Fis
Tavignano 2010	50	4.36	3.44	0.516	0.041 ^{ns}
Tavignano 2010	16	3.86	3.49	0.551	0.046 ^{ns}
Rhône Sauveterre	35	6.34	4.37	0.544	0.048 ^{ns}
Rhône Vallabrègues	31	6.71	4.58	0.570	0.020 ^{ns}
Aude	15	4.43	3.93	0.542	0.071 ^{ns}
Vidourle	10	5.43	5.22	0.587	0.047 ^{ns}

N : taille de l'échantillon analysé ; Na : nombre moyen d'allèles observé ; Ra : nombre moyen d'allèles rapporté à une taille d'échantillon identique selon la méthode de la raréfaction ; Ho : hétérozygotie observée ; Fis : indice de fixation (ns = non significativement différent de 0).

Les deux échantillons du Tavignano révèlent une variabilité génétique plus faible que les autres échantillons. En particulier, la richesse allélique (Ra ?) dans ces deux échantillons est significativement inférieure à la richesse allélique moyenne des autres échantillons ($p=0.034$).

Tous les échantillons sont à l'équilibre de Hardy Weinberg (les valeurs de Fis calculées ne sont pas significativement différentes de 0). Ceci est particulièrement intéressant dans le cas de l'échantillon de juvéniles du Tavignano. En effet, l'échantillonnage de juvéniles sur un site unique est parfois associé au risque de prélever des individus issus de familles (plein frères ou demi-frères par exemple), ce qui se serait caractérisé par un Fis significativement non nul. Ceci suggère que l'échantillon de juvéniles prélevé est issu d'un nombre de parents relativement important.

b. Structure génétique et flux de gènes entre les populations

La structure génétique des différentes populations a été étudiée avec plusieurs approches, dont les résultats sont concordants.

- Tout d'abord, nous avons calculé l'indice *Fst* (Wright 1969) entre chaque paire de population. Cet indice permet de quantifier le niveau de différenciation entre groupes, et il peut se définir par la proportion de diversité génétique qui est due aux différences alléliques entre populations. Cet indice est compris entre 0 (les populations ne sont pas différenciées et s'entrecroisent librement) et 1 (les populations sont complètement séparées).

Il est ensuite possible d'avoir une estimation de *Nm*, nombre efficace de migrants par génération, à l'aide de la formule $Nm = (1-Fst)/4*Fst$. Plus la valeur de *Nm* est supérieure à 1, et plus l'échange est important. Cette valeur de 1 est considérée comme la valeur seuil au dessus de laquelle les populations ne vont pas diverger génétiquement l'une de l'autre sous l'effet de la *dérive* (= évolution des fréquences alléliques d'une génération à l'autre sous l'effet du hasard d'échantillonnage des gènes au moment de la reproduction). Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel Genetix 4.02 (Tab. 2).

Tableau 2 : structure génétique (valeur de Fst) entre les populations d'*Alosa fallax* étudiées

	Tavignano 2010	Tavignano 2011	Rhône Sauveterre	Rhône Vallabrègues	Aude	Vidourle
Tavignano 2010		0.013 ^{ns}	0.245***	0.247***	0.230***	0.230***
Tavignano 2011	19.69		0.249***	0.252***	0.237***	0.234***
Rhône Sauveterre	0.77	0.75		-0.003 ^{ns}	0.013 ^{ns}	0.005 ^{ns}
Rhône Vallabrègues	0.76	0.74	(+++)		0.015 ^{ns}	0.011 ^{ns}
Aude	0.84	0.81	20.16	16.38		0.013 ^{ns}
Vidourle	0.83	0.82	48.38	23.34	18.29	

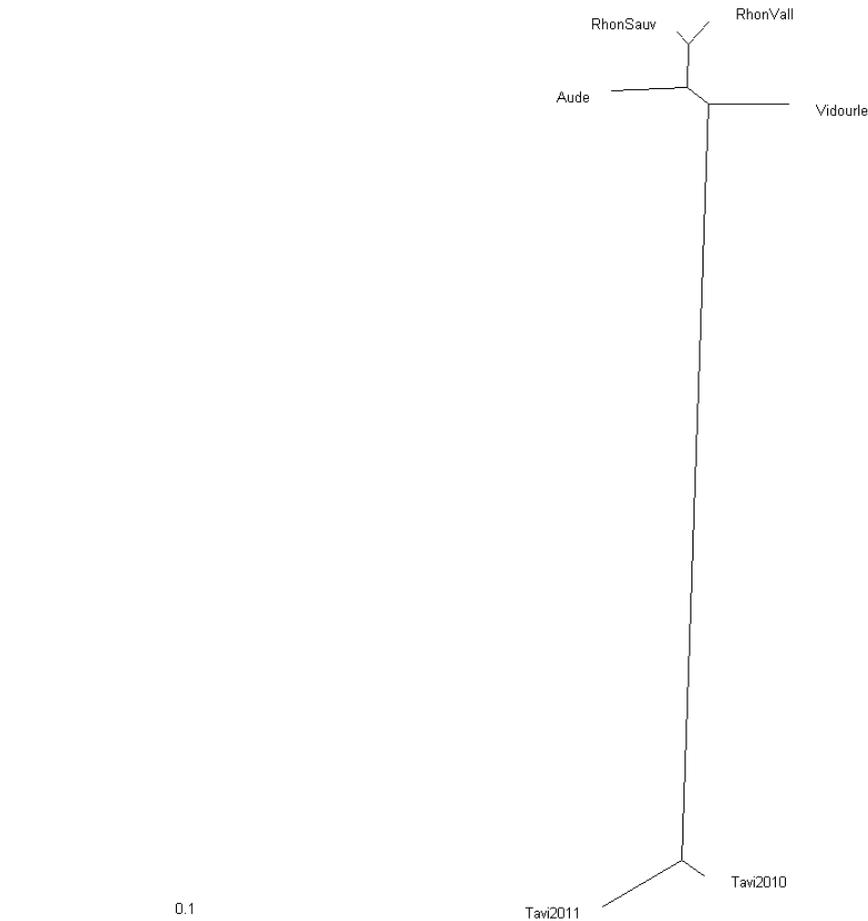
Au dessus de la diagonale : valeur de l'indice Fst (ns = non significativement différent de 0, *** : significativement différent de 0 avec $p < 0.001$) ; au dessous de la diagonale : nombre efficace de migrants

Les populations de la vallée du Rhône ne sont pas significativement différentes entre elles, ce qui indique un échange important entre ces populations et peut-être l'existence d'une population source à savoir le Rhône. Les deux populations du Tavignano (juvéniles 2010 et adultes 2011) ne sont pas non plus significativement différentes entre elles, ce qui est un signe de stabilité temporelle de la population. Cependant, on note une différence très marquée entre les populations du Tavignano d'une part et les populations du pourtour méditerranéen d'autre part, avec des valeurs de Fst supérieure à 0.23 dans tous les cas.

Les valeurs de Nm confirment cette tendance, puisqu'on estime à plusieurs dizaines de nombre efficace de migrants par génération entre populations de la Vallée du Rhône, mais en dessous de la valeur seuil de 1 entre les populations corses et les autres.

- A partir de la matrice de distances génétiques entre les populations (calculées par la méthode classique de Nei 1978), nous avons réalisé un *arbre phylogénétique* (selon la méthode du Neighbor-Joining, Saitou & Nei 1987). Cet arbre permet une visualisation facile des distances entre les populations, puisqu'il présente les différentes populations reliées par des branches dont la longueur est proportionnelle à la distance génétique entre les populations. Les analyses ont été réalisées à l'aide de la suite logicielle Phylip (Felsenstein, 2005) (Fig. 1).

Figure 1 : arbre phylogénétique représentant les populations d'*Alosa fallax* étudiées



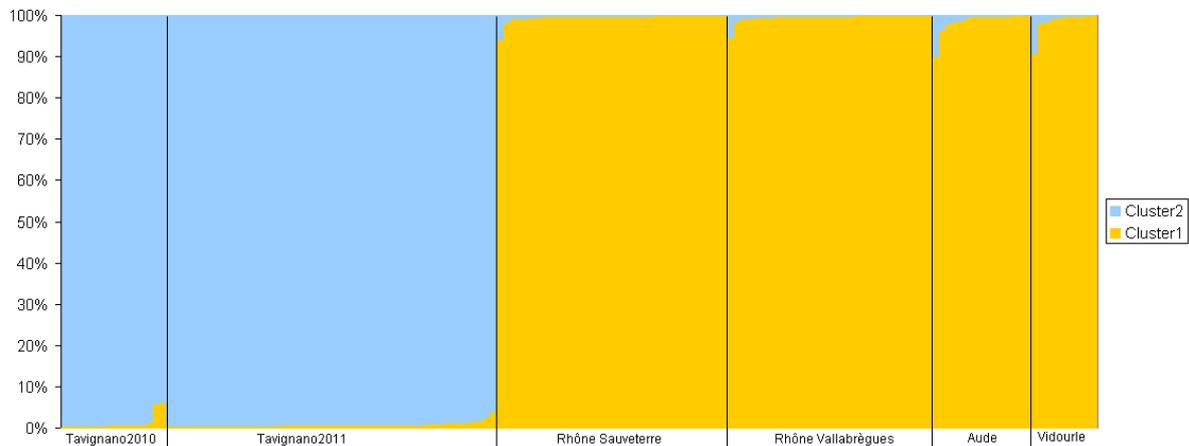
L'arbre se sépare clairement en deux branches : l'une avec les deux populations corses, et l'autre avec les populations de la Vallée du Rhône.

- Nous avons enfin utilisé la méthode de reconstitution de la structuration génétique d'un ensemble de données développée par Pritchard *et al.* (2000) dans le logiciel Structure. Le but est d'identifier des groupes d'individus génétiquement proches, en se basant sur leur génotype multi-locus, à l'aide d'une approche bayésienne que nous ne développerons pas ici. L'intérêt de cette méthode est (i) qu'elle sans *a priori* sur la délimitation des populations (deux individus issus de deux populations différentes peuvent se retrouver dans le même groupe si leur génotype est proche), et (ii) elle permet d'avoir des informations au niveau individuel (pour chaque individu, on pourra savoir si il appartient à un groupe ou à un autre, voire si il est issu d'une hybridation entre deux groupes différents). Le principe est donc de partir de l'ensemble du jeu de données, sans retenir l'information « population d'origine », d'identifier le nombre de groupes génétiques le plus probable, et d'assigner chaque individu à l'un ou l'autre de ces groupes.

Nous avons déterminé que le nombre de groupe le plus probable pour notre jeu de données est de 2 (analyse non détaillée ici). L'assignation de chaque individu est représentée sur la figure 2. Chaque colonne représente un individu, et chaque couleur représente un cluster. Pour chaque individu, le pourcentage de chaque couleur représente la probabilité d'assignation de

cet individu dans le cluster correspondant. Pour faciliter la lecture, les individus sont présentés dans l'ordre des populations.

Figure 2 : assignation des individus étudiés dans les clusters génétiques identifiés par l'analyse « Structure »



Les deux clusters identifiés séparent clairement les populations du Tavignano d'un côté, et les populations du pourtour méditerranéen de l'autre. De plus, tous les individus de chaque population sont assignés au même cluster, avec la plupart du temps 100% de certitude. On ne voit pas apparaître d'individus migrants (qui apparaîtraient comme une barre jaune dans une population bleue ou l'inverse) ou hybrides (qui apparaîtraient comme une barre moitié jaune/moitié bleu).

Les résultats de ces différentes méthodes convergent pour indiquer que les populations corses sont très divergentes des autres populations étudiées, et qu'il y a très peu d'échanges entre ces deux groupes. Par ailleurs, les différentes populations du pourtour méditerranéen ne sont pas différenciées entre elles, ce qui confirme les résultats précédents de Le Corre *et al.* (2005).

3. En conclusion, cette étude fait apparaître une forte divergence génétique entre les aloses du Tavignano corses et celles du pourtour méditerranéen français. Les populations du Tavignano représentent donc une ressource génétique originale pour l'espèce. Par contre, nous avons vu que la variabilité génétique à l'intérieur de ces deux groupes de populations est relativement faible. Une variabilité génétique réduite augmente les risques de consanguinité et réduisent, la fitness des individus et donc le potentiel adaptatif de ces populations aux perturbations du milieu. Cette situation peut éventuellement conduire à une extinction à plus ou moins long terme. Il est donc important, aussi bien pour les populations de Corse, que pour l'espèce dans son ensemble dans cette région géographique, de pouvoir s'assurer de leur maintien par des mesures de gestion appropriée (maintien ou restauration des sites de fraie, maintien ou rétablissement de la connectivité intra-rivière, maintien de la qualité de l'eau, etc...).

Le cas de l'aloise du Tavignano n'est pas sans rappeler une situation semblable pour la truite commune (*Salmo trutta*) en Corse. Certaines populations corses de cette espèce sont en effet très différenciées génétiquement des autres populations de truite méditerranéenne (revue dans Berrebi & Dubois 2007), au point qu'elles sont considérées comme faisant partie d'une sous-espèce géographique différente (Bernatchez *et al.* 1992). Cependant, le cas des aloses est particulier, puisqu'il s'agit d'une espèce amphihaline migratrice, donc susceptible de dispersion à plus ou moins grande échelle. Nos résultats peuvent s'expliquer soit par des

capacités migratoires ne permettant pas de couvrir la distance entre la Corse et le continent, soit par un instinct de retour (homing) très marqué chez cette espèce. Il serait intéressant de compléter ces résultats avec d'autres populations, issues de cours d'eau corses mais également de la côte méditerranéenne française, italienne et espagnole. En effet, la région méditerranéenne a toujours été considérée comme une zone de présence de nombreuses sous-espèces d'aloise feinte identifiées uniquement à partir de caractéristiques biométriques et méristiques (Baglinière, 2000).

4. Références.

Baglinière J.L., 2000. Le genre *Alosa* sp. In " Les aloses (*Alosa alosa* et *Alosa fallax* spp.) : Ecobiologie et variabilité des populations. J.L. Baglinière et P. Elie (Eds), INRA-CEMAGREF, Paris, pp. 3-30.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (1996-2001). GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions; CNRS UMR 5000; Université Montpellier II, Montpellier (France)

Bernatchez L., Guyomard R, Bonhomme F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1, 161-173.

Berrebi P., Dubois S. (2007). Life Nature « Macrostigma » - rapport final, synthèse de trois années d'analyses. Juillet 2007

El Mousadik A., Petit R.J. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 832-839

Estoup A, Largiadèr CR, Perrot E, Chourrout D (1996) Rapid one tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5, 295-298.

Felsenstein, J. (2005). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.*

Goudet J. (1995). FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486

Le Corre M. (1999). Éco-biologie et génétique des populations d'aloses (*Alosa fallax* spp.) de la Méditerranée française. Thèse, 190 p. ENSA Rennes.

Le Corre M., Alexandrino P., Sabatié M.R., Aprahamian M.W., Baglinière J.L (2005). Genetic characterization of the Rhodanian twaite shad (*Alosa fallax rhodanensis* Roule, 1924). *Fisheries Management and Ecology*, 12, 275-282.

Le Corre M., Sabatié M.R., Baglinière J.L. (2000). Caractérisation démographique de populations d'*Alosa fallax rhodanensis* (Roule 1924) (Clupeidae) de la Méditerranée française. *Cybium*, 24 (3) suppl., 119-128.

Nei M., (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.

Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.

Wright, S. (1969). *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. II. The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press, Chicago