

Développement d'un marqueur moléculaire pour l'identification des lamproies au stade juvénile

Ahmed SOUISSI^{1,2}, Anne-Laure BESNARD^{1,2}, Guillaume EVANNO^{1,2}

¹ DECOD (Dynamique et Durabilité des Ecosystèmes), L'Institut Agro, IFREMER, INRAE, Rennes, France.

² Pôle Gestion des Migrateurs Amphihalins dans leur Environnement, OFB, INRAE, L'Institut Agro, UPPA, Rennes, France.

Correspondance : Guillaume EVANNO, guillaume.evanno@inrae.fr

*Il y a trois espèces de lamproie en France : la lamproie marine (*Petromyzon marinus*), la lamproie de rivière ou lamproie fluviatile (*Lampetra fluviatilis*) et la lamproie de Planer (*L. planeri*). La lamproie de Planer et la lamproie de rivière étant impossibles à distinguer morphologiquement au stade juvénile, les chercheurs ont développé une approche moléculaire qui permet aujourd'hui de discriminer ces deux espèces.*

Introduction

La conservation de la lamproie marine (*Petromyzon marinus*), de la lamproie de rivière ou lamproie fluviatile (*Lampetra fluviatilis*) et de la lamproie de Planer (*L. planeri*) représentent un enjeu majeur. En effet, la lamproie marine est classée en tant qu'espèce en danger, et la lamproie de rivière est considérée comme vulnérable, selon les critères de l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN), sur la liste rouge des poissons de France. En outre, la répartition de ces trois espèces reste mal connue en France, et ce projet visait initialement à développer une approche de détection des trois espèces à partir d'ADN environnemental (ADNe).

À l'âge adulte, la lamproie marine peut-être distinguée facilement des deux autres espèces de lamproie (photo 1). Néanmoins, au stade juvénile, les larves dites « ammocètes » des trois espèces sont impossibles à distinguer dans leur première année. À partir d'une taille d'environ 5 cm, les ammocètes de *P. marinus* présentent une coloration sombre sur la nageoire caudale qui permet de les distinguer des larves des deux autres espèces. De plus, des marqueurs de l'ADN mitochondrial permettent aussi de distinguer *P. marinus* des deux espèces de *Lampetra* (Docker *et al.*, 1999). En revanche, la lamproie fluviatile et la lamproie de Planer sont très proches génétiquement et leur ADN mitochondrial est similaire. De plus, il n'est pas possible de les distinguer morphologiquement à tous les stades juvéniles. À l'âge adulte, c'est principalement la taille qui permet de distinguer *L. planeri* (10 à 15 cm) de *L. fluviatilis* (18 à

30 cm). Ces deux espèces s'hybrident et sont considérées comme des écotypes¹ avec un isolement reproducteur partiel (Rougemont *et al.*, 2015). Les objectifs de ce projet étaient donc de développer 1) des marqueurs moléculaires permettant de distinguer ces deux espèces, et 2) une approche de détection de la présence des trois espèces de lamproie par ADN environnemental. Seul le premier objectif a été atteint et ce sont donc uniquement les résultats liés à cet objectif qui sont présentés.

Photo 1 – Photographie des trois espèces de lamproie présentes en France. De haut en bas : lamproie marine, lamproie de rivière (x2) et lamproie de Planer (source : U3E, INRAE).



1. Les écotypes sont des groupes de populations d'une même espèce qui présentent des adaptations distinctes en réponse aux conditions environnementales spécifiques de leur habitat.

Nous avons tout d'abord identifié des marqueurs de type SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) avec des allèles distincts entre *L. fluviatilis* et *L. planeri*. En pratique, cela consiste à déterminer des zones de l'ADN avec des bases distinctes entre les deux espèces, parmi les quatre bases azotées possibles de l'ADN (adénine, thymine, guanine et cytosine). Nous avons utilisé des données avec plusieurs milliers de SNPs analysés sur 186 individus collectés en France lors d'une étude précédente (Rougemont *et al.*, 2017). Cette analyse a nécessité l'assemblage d'un génome de lamproie de Planer. L'individu choisi a été un mâle collecté sur l'Oir, un cours d'eau de l'Observatoire de recherche en environnement sur les poissons diadromes dans les fleuves côtiers (ORE diaPFC). Une particularité des lamproies est que seules les cellules germinales possèdent la totalité du génome, l'ADN a donc été extrait à partir du sperme de cet individu. Nous avons ainsi détecté cinq SNPs discriminants entre *L. fluviatilis* et *L. planeri*. Parmi eux, nous en avons sélectionné un qui possède l'avantage de ne pas être présent chez *P. marinus*, sa non-amplification permettant de distinguer les genres *Lampetra* et *Petromyzon*.

Validation du marqueur

Nous avons ensuite développé un protocole de PCR² quantitative, c'est-à-dire d'amplification ciblée et quantifiée d'une zone du génome, pour analyser en routine ce SNP diagnostique de *L. fluviatilis* et *L. planeri*. Ce marqueur nommé diagLpf a été testé sur 270 échantillons comprenant des larves et des adultes des deux espèces issues de dix-sept sites de France, mais aussi d'Irlande et du Royaume-Uni (figure 1). Ces échantillons archivés au laboratoire provenaient pour la plupart d'études précédentes, et ont été collectés grâce au soutien de nombreuses fédérations de pêche et associations migrateurs³. Nous avons aussi sollicité des collègues chercheurs du Royaume-Uni et d'Irlande pour avoir des échantillons à une large échelle spatiale afin de tester la validité de diagLpf au-delà des cours d'eau français. En particulier, nous avons pu avoir des échantillons de la population de lamproies du Loch Lomond en Écosse, qui possède la particularité d'abriter trois « formes » de lamproies qui s'hybrident : la lamproie fluviatile (parasite-anadrome), la lamproie de Planer (non parasite-résident en eau douce), et une forme lacustre de la lamproie fluviatile qui parasite des poissons en eau douce.

Les résultats ont été cohérents avec l'identification morphologique dans tous les cas, sauf pour les échantillons provenant du bassin du Rhône et du Loch Lomond en Écosse (Souissi *et al.*, 2022). Dans le cas du Rhône, nous pensons que la présence d'une lignée très divergente de la lamproie de Planer (voire d'une espèce cryptique⁴)

soit la cause de ce polymorphisme particulier. L'évolution de lignées divergentes entre des bassins versants atlantiques et méditerranéens a déjà été documentée (cas de la truite commune) en lien avec l'histoire glaciaire de ces bassins (Bernatchez *et al.*, 1992). Dans le cas du Loch Lomond, les deux formes parasites étaient bien homozygotes (ff) au marqueur diagLpf, mais les individus de la forme résidente étaient soit homozygotes (ff) ou hétérozygotes⁵ (pf). Ainsi, le marqueur diagLpf n'est pas diagnostique dans ce cas de figure avec plus de deux formes de *Lampetra* en sympatrie, l'hybridation étant en outre très fréquente entre ces formes.

Conclusion

En conclusion, à l'échelle nationale, le marqueur diagLpf permet de distinguer les larves ammocètes de *L. planeri* et *L. fluviatilis* (hors bassin du Rhône). Ainsi, lors de la capture d'ammocètes dans le cadre d'inventaires et de pêches électriques, l'identification de l'espèce est désormais possible à partir d'un morceau de nageoire. Cet outil permettrait donc de connaître la répartition des ammocètes des trois espèces de lamproies dans les bassins versants, et de déterminer une éventuelle différence d'habitats entre espèces en lien avec les caractéristiques physiques (profondeur, température, degré d'oxygénation, granulométrie...) et biotiques (présence d'autres espèces de lamproies ou d'invertébrés) du substrat. Nous avons également testé l'amplification de diagLpf avec des échantillons d'ADNe extraits à partir de prélèvements d'eau. Néanmoins, malgré de nombreuses tentatives et tests de divers protocoles, cette démarche n'a pas abouti. À l'avenir, les nombreux développements techniques en cours dans le domaine de l'ADNe, nous permettent toutefois d'espérer pouvoir détecter la présence des lamproies par cette approche. ■

EN SAVOIR PLUS...

Souissi, A., Besnard, A. L., Evanno, G. (2022). Développement d'outils moléculaires pour l'identification et l'étude de la distribution des trois espèces de lamproies à l'échelle nationale. Rapport final. OFB-Inrae- Institut Agro-UPPA. 17 p.

<https://hal.science/hal-03933969>

2. La *Polymerase Chain Reaction* ou PCR (ou encore ACP pour amplification en chaîne par polymérase), est une technique de répllication ciblée *in vitro*. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie.

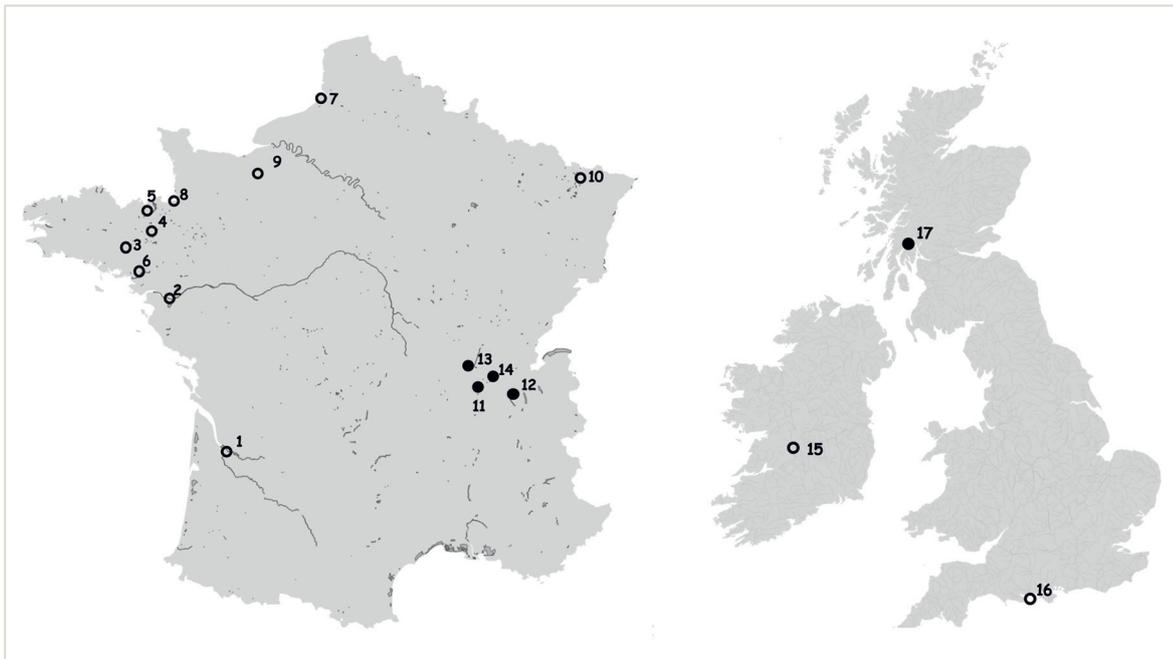
3. En France, les associations migrateurs sont des associations « Loi 1901 » dont les missions sont la gestion, la protection et la restauration des stocks de poissons migrateurs.

4. Espèce difficile à distinguer morphologiquement ou écologiquement d'autres espèces apparentées, même si elle est génétiquement distincte.

5. Homozygote s'il possède deux copies identiques de l'allèle correspondant à un certain gène et hétérozygote si les deux allèles sont différents pour ce même gène.

Figure 1 – Cartes des 17 sites échantillés.

Les points blancs indiquent les populations où le marqueur *diagLpf* fonctionne, et les points noirs les cas où ce marqueur ne permet pas de distinguer *L. fluviatilis* et *L. planeri* (Souissi *et al.*, 2022).



RÉFÉRENCES

- 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(3), 161-173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1992.tb00172.x>
- Docker, M. F., Youson, J. H., Beamish, R. J., & Devlin, R. H. (1999). Phylogeny of the lamprey genus *Lampetra* inferred from mitochondrial cytochrome b and ND3 gene sequences. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(12), 2340-2349. <https://doi.org/10.1139/f99-171>
- Rougemont, Q., Gaigher, A., Lasne, E., Côte, J., Coke, M., Besnard, A. L., Launey, S., & Evanno, G. (2015). Low reproductive isolation and highly variable levels of gene flow reveal limited progress towards speciation between European river and brook lampreys. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(12), 2248-2263. <https://doi.org/10.1111/jeb.12750>
- Rougemont, Q., Gagnaire, P. A., Perrier, C., Genthon, C., Besnard, A. L., Launey, S., & Evanno, G. (2017). Inferring the demographic history underlying parallel genomic divergence among pairs of parasitic and nonparasitic lamprey ecotypes. *Molecular Ecology*, 26(1), 142-162. <https://doi.org/10.1111/mec.13664>
- Souissi, A., Besnard, A. L., & Evanno, G. (2022). A SNP marker to discriminate the European brook lamprey (*Lampetra planeri*), river lamprey (*L. fluviatilis*) and their hybrids. *Molecular Biology Reports*, 49(10), 10115-10119. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07800-8>