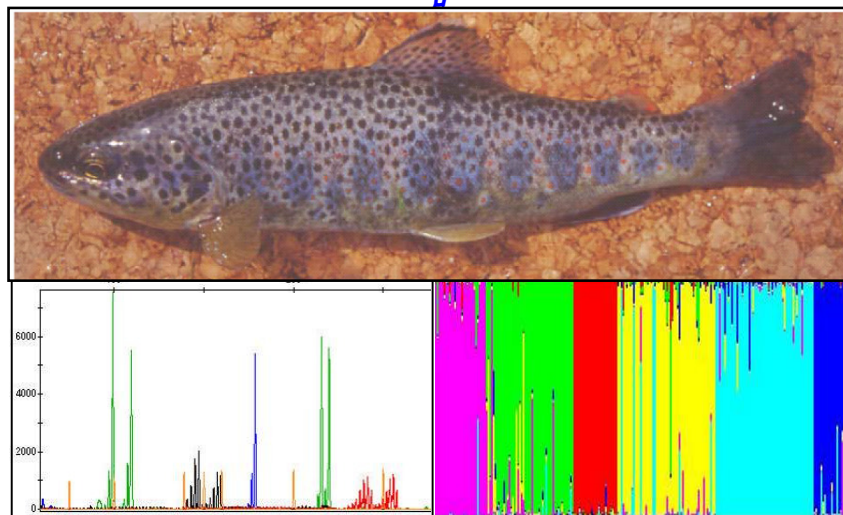




Analyse de la variabilité génétique intra et inter populations et mesure du mélange des pools de gènes sauvages et domestiques de la truite commune (*Salmo trutta fario*) des cours d'eau situés dans la zone du Parc National des Pyrénées

Rapport de synthèse



N. Merchernek (MC - UPPA)

A. Manicki (AI - INRA)

Décembre 2008

Sommaire

Introduction	1
1. Effet des repeuplements sur la structure génétique de la truite commune <i>Salmo trutta fario</i>	2
2. Structure des populations de la truite commune (<i>S. trutta</i> L.) dans les cours d'eau de la zone centrale du PNP	3
3. Matériel et méthodes	4
3.1 Site et échantillons étudiés	4
3.2 Extraction, amplification de l'ADN et Génotypage	4
3.3 Méthodes d'analyse des résultats	7
3.3.1 Analyse de la variabilité génétique au sein et entre les populations.....	7
3.3.2 Mesure du taux de mélange génétique	7
4. Résultats et discussion	9
4.1 Variabilité génétique au sein des populations	9
4.2 Variabilité génétique inter-populations.....	10
4.2.1 Détermination de la structure génétique par la méthode d'AFC	12
4.2.2 Détermination de la différenciation génétique des populations.	17
4.3 Estimation du taux de mélange entre les pools de gènes domestiques et sauvages.....	19
Conclusion	22
Références bibliographiques.....	24
ANNEXE.....	26

Introduction

La politique de gestion piscicole a longtemps privilégié le déversement de poissons pour faire face à la demande de pêche sans mesurer l'impact sur la qualité des milieux aquatiques. Le milieu naturel ne constituait alors qu'un support d'accueil temporaire pour un stock de poissons dont la fonction est d'être pêché. Cette politique de gestion a mené à une altération des stocks aussi bien en terme quantitatif que qualitatif.

La prise de conscience de cette altération a le mérite d'avoir suscité une réflexion sur les chantiers à mettre en œuvre pour la protection du patrimoine piscicole en liaison avec la pêche. Elle a conduit dans la première moitié des années 90 à la mise en place de plans de gestion piscicole favorisant la reproduction naturelle et la protection des populations sauvages avec l'objectif de maintenir, voire d'augmenter le stock de poissons adultes capturables par pêche. Ces plans de gestion marquent donc le passage d'une gestion quantitative de l'offre de pêche à une gestion qualitative qui nécessite l'encadrement des pratiques de repeuplement et la connaissance de **leur impact écologique et génétique**.

La truite commune, *Salmo trutta fario* est l'une des espèces concernées par les plans de gestion patrimoniaux. Ce document est le rapport de synthèse d'un travail réalisé dans le cadre d'une gestion patrimoniale des populations de la truite communes, *Salmo trutta fario* des cours d'eau de la zone centrale et périphérique du Parc National des Pyrénées (PNP). Il porte sur l'analyse de la variabilité génétique intra et inter populations. L'étude a été menée à l'UMR ECOBIOP INRA/UPPA 1224, à la demande du Parc National des Pyrénées (PNP).

Les objectifs de cette étude étaient de

- 1- caractériser de la façon la plus exhaustive possible, les différentes formes génétiques de truite commune présentes dans les cours d'eau montagneux des Pyrénées (Hautes-Pyrénées et Pyrénées-Atlantiques),
- 2- étudier l'impact des pratiques d'alevinage sur la structure génétique des populations sauvages,
- 3- identifier des populations dans lesquelles il n'y aurait pas eu d'introgession par les gènes des souches de repeuplement afin qu'elles fassent l'objet de mesures de conservation.

Ce document est une synthèse des analyses réalisées dans le contexte de ce projet. Il décrira la structure génétique des populations étudiées et rendra compte du taux de mélange entre les pools de gènes domestiques et sauvages des populations des cours d'eau situés dans la zone du PNP.

1. Effet des repeuplements sur la structure génétique de la truite commune (*S. trutta* L.)

Les pratiques de repeuplement piscicoles et notamment de truites communes, sont utilisées pour compenser la diminution du potentiel de recrutement naturel ou pour établir de nouvelles populations dans les zones où les populations natives se sont éteintes. Elles sont utilisées aussi de plus en plus pour répondre à une demande pressante des pêcheurs et visent à soutenir les effectifs pendant la saison de pêche (Caudron et Champigneulle 2002).

La truite commune *S. trutta* a une aire de répartition très étendue allant de l'océan arctique au nord jusqu'en Afrique du Nord au sud. Cette large distribution géographique a conduit à une différenciation génétique très importante (Ferguson 1989 ; Ihssen *et al*, 1981).

En France, on distingue, dans l'ordre chronologique de la colonisation des cours d'eau, trois formes génétiques de la truite commune *Salmo trutta*: la **forme ancestrale corse** (en tête de bassin des rivières corses), la **forme méditerranéenne** (dans les cours d'eau Méditerranéens), et la **forme atlantique** avec 2 sous groupes : un sous-groupe dit "ancestral" et un sous-groupe dit "moderne" (Ferguson et Flemming 1983).

La reproduction d'individus domestiques dans les rivières s'accompagne d'un flux génique des souches domestiques vers les populations natives, c'est l'introgression. Les populations sauvages de la truite commune ont été très exposées au flux de gènes à partir de souches domestiques (Hansen *et al* 1997, Hansen *et al* 2000 ; Weber et Fausch 2003 ; McGinnity *et al* 2004...). Même si les campagnes de repeuplement en Europe sont mieux encadrées que par le passé, on ne sait toujours pas jusqu'à quel point les populations actuelles des cours d'eau sont introgressées (Hansen *et al* 2001).

Cependant, on peut supposer que l'implantation de truites domestiques dans certains cours sera difficile. En effet, les populations naturelles de truite commune sont caractérisées par une différenciation génétique importante aussi bien à l'échelle macrogéographique qu'à l'échelle microgéographique (Altukov *et al* 2000). Elles se comportent ainsi en unités évolutives semi-indépendantes en développant des adaptations locales rendant difficile l'implantation d'individus issus d'une population d'origine différente et à fortiori s'il s'agit de populations domestiques avec une adaptation à la reproduction en captivité (Taylor 1991, Nielsen *et al* 2001, Poteaux *et al.*, 1998, ; Ruzzante *et al* 2001). Ces adaptations locales sont plus importantes dans les habitats extrêmes.

En revanche, en absence d'adaptation locale prononcée, le mélange des pools de gènes domestiques et natifs induit une diminution de la fitness, ce qui à terme peut avoir des effets allant jusqu'à l'extinction (Fleming et Cross 1993, Waples 1994). Dans ces cas, on observe une diminution de l'effectif efficace après quelques générations

accompagné souvent d'une réduction de la variabilité génétique (Tessier *et al* 1997, Hansen *et al* 2000).

2) Structure des populations de la truite commune (*S. trutta* L.) dans les cours d'eau de la zone du PNP

Dans les cours d'eau du piémont pyrénéen, la truite commune *Salmo trutta* fait partie des espèces piscicoles autochtones. En 1935, on note sa présence dans une soixantaine de lacs (Chimits, 1970). Cette espèce s'y serait implantée au moment du réchauffement qui a suivi la dernière glaciation (Huet 1954, Illies *et al* 1963).

A ce jour, l'étude la plus complète réalisée sur la structure des populations de truites communes dans les cours d'eau pyrénéens est l'étude de la variabilité morphologique des truites pyrénéennes (Lascaux *et al* 2005). Cette étude a permis de distinguer plusieurs morphotypes répartis différemment entre les bassins.

- i. Sur les bassins d'Aspe et D'Ossau, on retrouve une subdivision amont/aval avec
 - i. en amont des truites caractérisées par une **forte ponctuation noire**
 - ii. en aval des truites **moyennement ponctuées de rouge** comme de noir.
- ii. Sur le bassin de l'Adour, la ponctuation des truites est relativement homogène (**moyen en rouge et moyen moins en noir**)
- iii. Sur le bassin du Gave de Pau,
 - i. Le sous bassin Gave de Cauterets se distingue par la présence sur le Gave du Marcadau et ses affluents d'un morphotype **ponctué de rouge**
 - ii. On note la présence au niveau du Gave du Lutour d'un morphotype **fortement de rouge et de noir**.
 - iii. On retrouve un morphotype particulier très **faiblement ponctué de noir** dans le Bergons et la Glère
- iv. Les truites des piscicultures fédérales de Cauterets et de Pé-de-Hourat présentent un morphotype **fortement ponctué de noir et très faiblement ponctuées de rouge**.

D'un point de vue génétique, les premières analyses de la structure des populations de truite du bassin du **Gave de Pau et de la Nivelle** menées par Aurelle (Berrebi *et al* 1997 ; Aurelle *et al* 1999 ; Aurelle *et al*, 2002) ont montré une bonne différenciation des populations avec éventuellement la coexistence de truites des rameaux méditerranéen, des truites du rameau atlantique ancestral et enfin des truites du rameau atlantique moderne. Il faut noter que les souches utilisées pour le repeuplement sont issues du type atlantique moderne pratiquement fixées pour l'allèle LDH-5*90 (Krieg et Guyomard 1985; Ombredane *et al* 2001).

3. Matériel et méthodes

3.1 Site et échantillons étudiés :

L'étude étalée sur trois années a été réalisée sur 28 sites situés dans les principaux bassins versants du PNP (Figure 1). Les échantillons étudiés ont été obtenus, conservés dans l'éthanol, auprès de Patrick Berrebi (CNRS-Montpellier) et de Jean Marc Lascaux (ECOGEA-Toulouse).

Dans une partie prospective, **trois** échantillons de souches domestiques utilisées pour les repeuplements dans la zone du PNP et **dix** échantillons répartis sur les bassins versants (*Gave d'Aspe, Gave D'Ossau, Gave de Pau, et Neste*) et représentant la plupart des morphotypes décrits par Lascaux *et al* (2005) ont été étudiés. Cette première analyse a surtout permis de voir la différenciation inter-bassin et la présence de plusieurs entités génétiques dans la zone étudiée (*rapport N°2_janvier08*). Les résultats de cette première partie nous a amené à sélectionner, en concertation avec le PNP, une quinzaine d'échantillons supplémentaires afin affiner l'analyse au sein de chacun des bassins et de mieux estimer l'impact de l'introgession par les souches domestiques (Tableau1).

3.2 Extraction, amplification de l'ADN et Génotypage :

L'ADN est extrait individuellement en utilisant le kit Wizard SV 96 Genomic DNA purification system (Promega) puis conservé dans le tampon TE à - 20°C.

L'étude a été menée en utilisant des marqueurs génétiques très informatifs couramment utilisés pour analyser la structuration génétique des populations, les microsatellites. L'utilisation de ces marqueurs en combinaison avec des méthodes d'inférence permet aussi de travailler sur des populations mélangées et de déterminer l'origine des individus avec un degré de confiance important (Waser and Strobeck 1998, Pritchard *et al* 2000, Dawson et Belkhir 2001, Corander *et al* 2003).

Nous avons utilisé dix microsatellites (Str-60, Mst-15, Str-12 ,T3-13, SSOSL85, Ssa197, Str58 Mst73, FGT-1, Mst543, Mst 171 et SSOSL311) comprenant ceux préconisés dans la convention relative à ce projet.

Bassin versant	N° des pop	Station	Année de prélèvement	Morphotype (Lascaux et al 2005)
Gave d'Aspe	1	Labre	2003	Très ponctué de noir
	2	Lesc	2002	Très ponctué de noir
	3	Ansa	2003	Très ponctué de noir
	4	Espel	2003	Très ponctué de noir
	5	Aspe1	2003	Très ponctué de noir
	6	Aspe2	2003	Classique
Gave d'Ossau	7	Oss1	2002	Très ponctué de noir
	8	Oss2	2002	Classique
	9	Souss1	2002	Très ponctué de noir
	10	Souss2	2002	Très ponctué de noir
Gave de Pau	11	Ouz	2001	Domestique +classique
	12	Berg	2001	peu ponctué de noir
	13	Bol	2001	Classique
	14	Cbasq	2001	Classique
	15	Bern	2001	Très ponctué de noir et peu ponctué de rouge
	16	Sers	2001	Très ponctué de noir et peu ponctué de rouge
	17	R.Lourd	2001	Très ponctué de noir et peu ponctué de rouge
	18	Marca	2001	Ponctué de rouge
	19	Ara	2001	Ponctué de rouge
Neste	20	Géla	2001	Classique
	21	Riou	2001	Classique
	22	Espi	2001	Classique
	23	Aure1	2001	Classique
	24	Aure2	2001	Classique
	25	Coup	2001	Très ponctué de noir
Piscicultures	26	P-C-cl	2001	Très ponctué de noir et peu ponctué de rouge
	27	P-C-pu	2001	Très ponctué de noir et peu ponctué de rouge
	28	P-Pé	2002	Très ponctué de noir et peu ponctué de rouge

Tableau 1 : Liste des échantillons étudiés, avec l'année de l'échantillonnage, leur localisation au niveau du bassin versant, de la rivière et de la station d'échantillonnage ainsi que leur morphotype tel qu'il est décrit dans Lascaux *et al* 2005.

Dans la première partie de cette étude nous avons mis en place le multiplexage en répartissant les *loci* de microsatellites en 3 panels (Figure 2). Cette méthode permet d'amplifier plusieurs marqueurs dans une même réaction de PCR et de génotypage. Elle permet par conséquent, un gain de temps considérable ainsi qu'une réduction non négligeable du coût des analyses.

Les réactions d'amplifications sont conduites dans un thermocycleur Applied Biosystem 2700. Le génotypage est réalisé à l'aide d'un séquenceur ABI 3100-AVANT dans des plaques de 96 puits en utilisant le logiciel de pilotage DataCollection (Applied Biosystem). La taille des allèles est calculée par le logiciel Genemapper (Applied Biosystem)

3.3 Méthodes d'analyse des résultats :

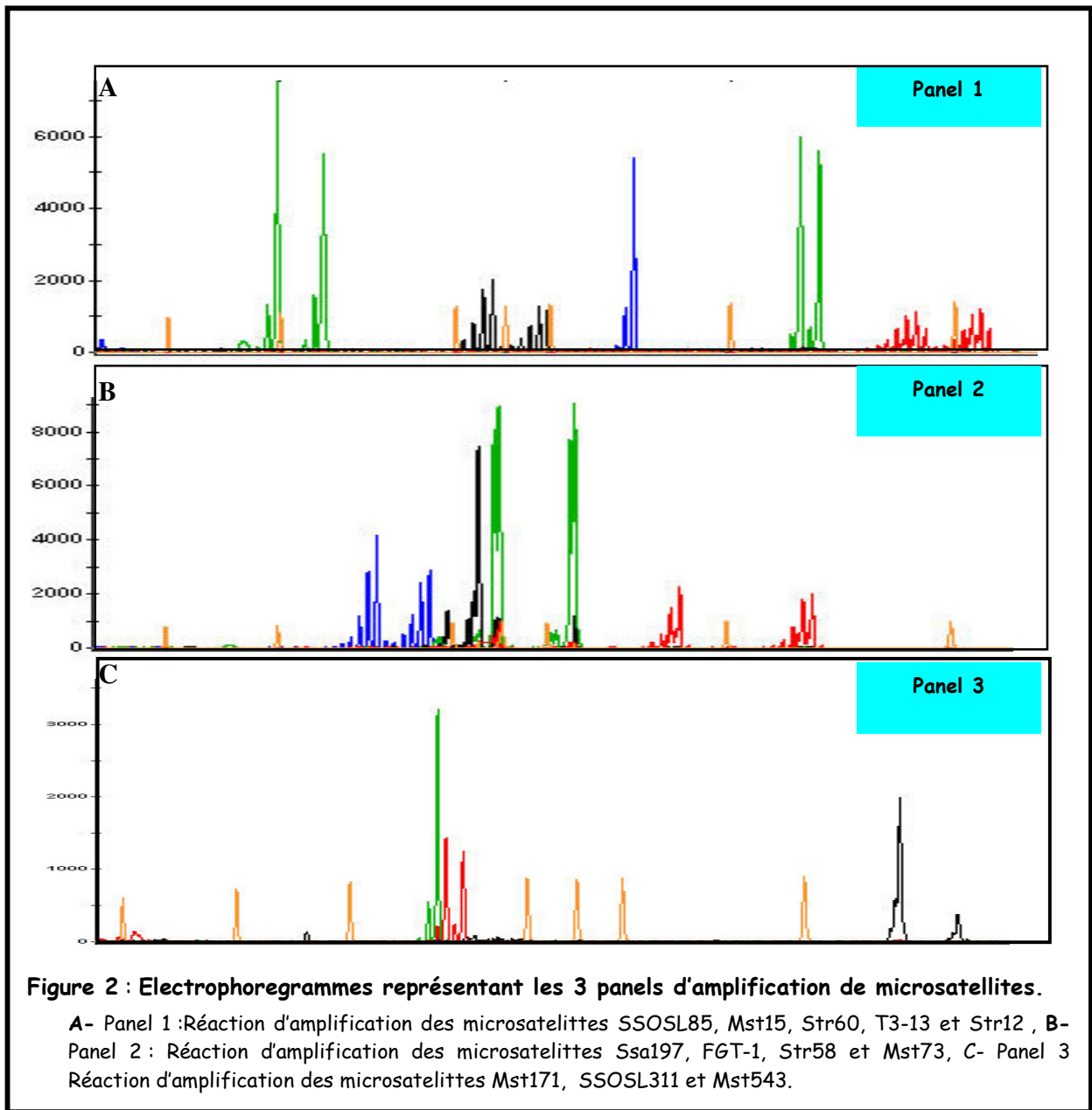
3.3.1 Analyse de la variabilité génétique au sein et entre les populations :

La variabilité génétique au sein de chaque population, pour chaque *locus* et également pour l'ensemble des *locus* et des populations est estimée par le calcul de la diversité allélique mesurée ici par le nombre total d'allèles par locus et par population qui donne une indication globale sur la diversité.

La différenciation des populations est analysée à l'aide du logiciel GENETIX (Belkhir *et al* 2002) en utilisant la méthode d'analyse factorielle des correspondances ou AFC et l'indice de fixation de Wright F_{st}

3.3.2 Mesure du taux de mélange génétique :

Dans l'analyse globale des résultats, Nous avons utilisé le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al* 2000) basées sur une approche Bayésienne pour estimer le degré d'introgession des populations naturelles par le pool des gènes domestiques. Dans cette méthode, chaque individu est assigné à sa population d'origine. Il sera assigné à plus d'une population lorsqu'il provient d'un croisement entre deux ou plusieurs pools de gènes.



4. Résultats et discussion

4.1 Variabilité génétique au sein des populations

La figure 3 présente la richesse allélique des populations. Comme nous l'avons déjà souligné dans l'étude prospective, les valeurs les plus faibles de la diversité allélique exprimée en nombre cumulé d'allèles, sont obtenues pour les populations situées en amont des cours d'eau pour tous les bassins sauf pour Géla, avec dans la plupart des cas des valeurs inférieures à celle des échantillons de pisciculture. Trois populations (Espelungère, Bergons et Aratille) se sont révélées monomorphes au seuil de 5% pour le *locus* Str60 suggérant une action importante de la dérive génétique sur ces populations suite probablement à une réduction importante de l'effective efficace et à une absence de flux de gènes.

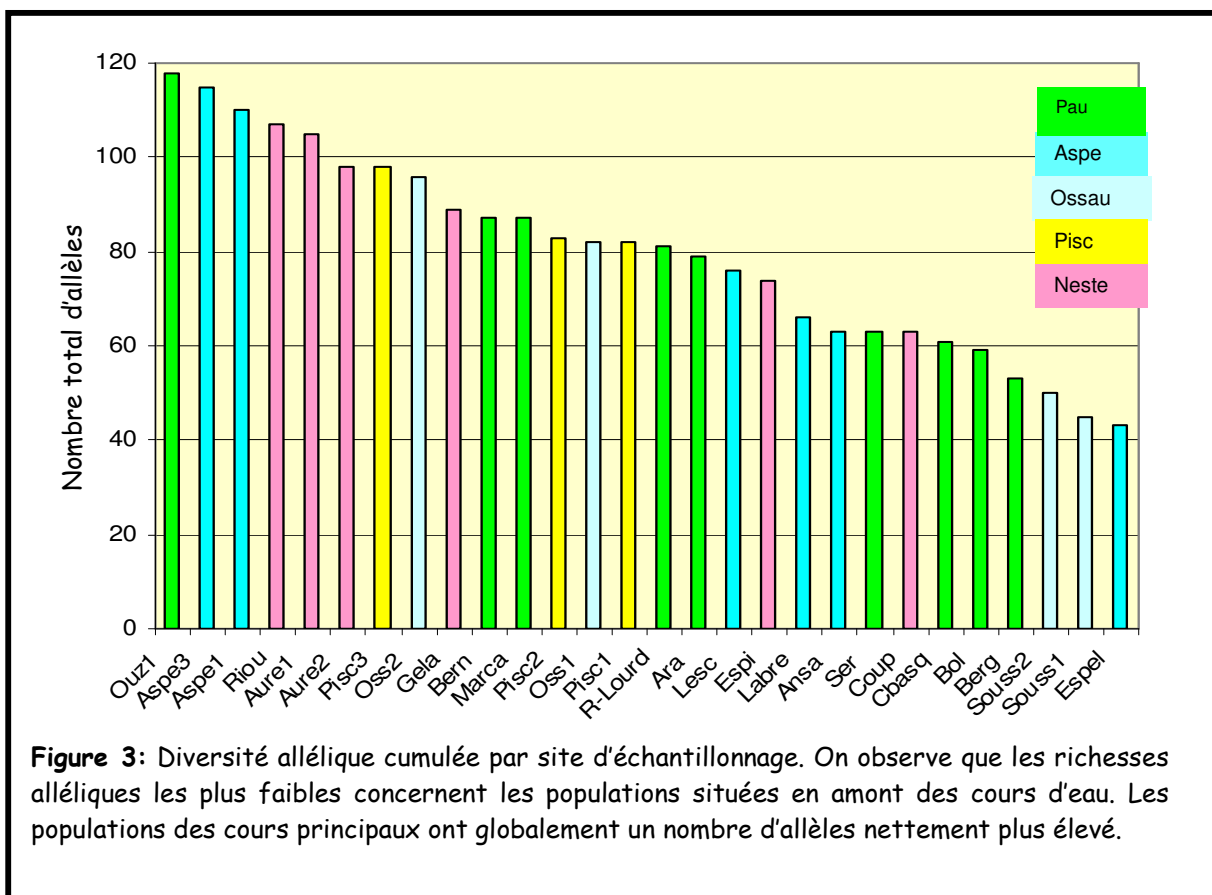
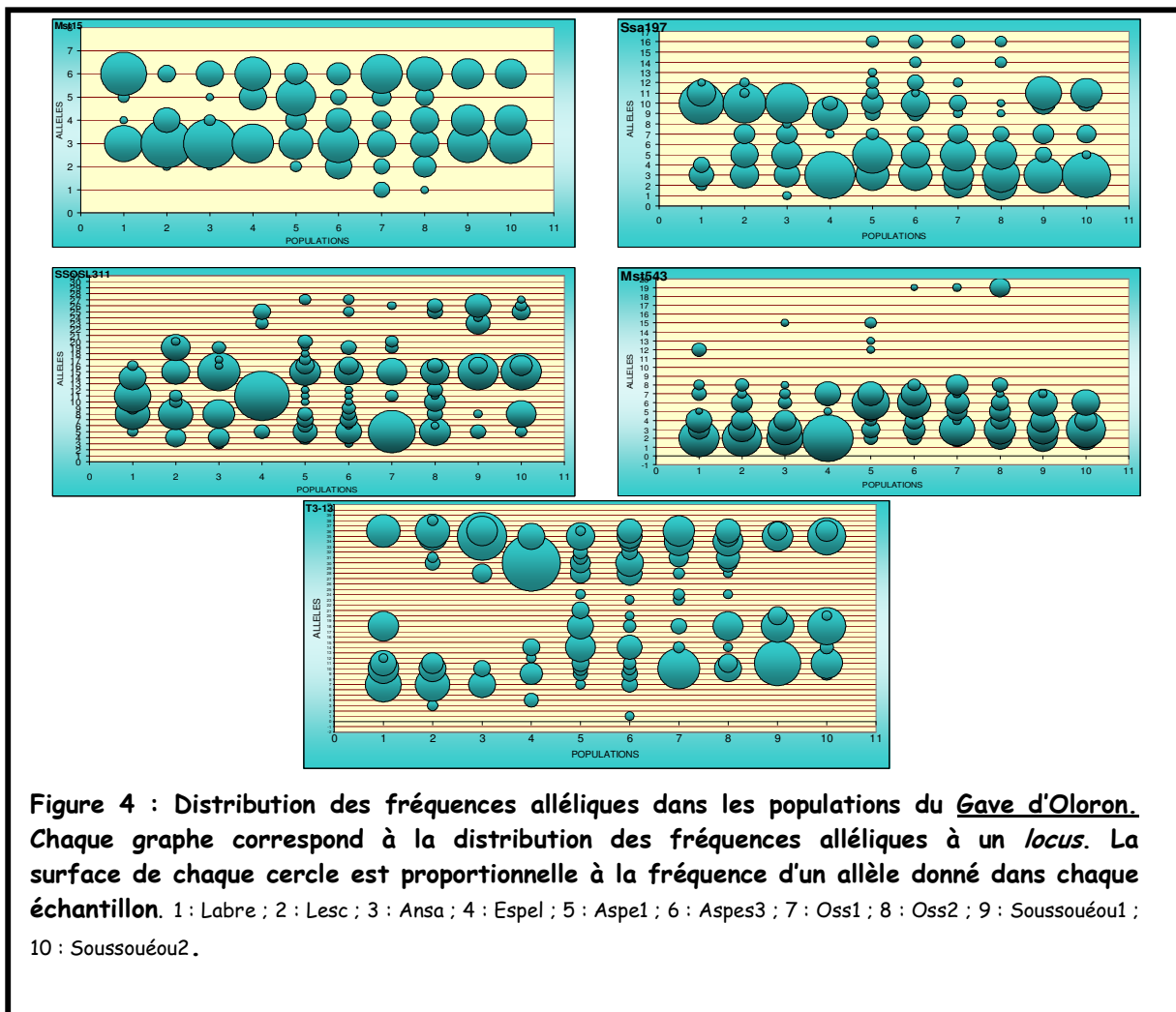


Figure 3: Diversité allélique cumulée par site d'échantillonnage. On observe que les richesses alléliques les plus faibles concernent les populations situées en amont des cours d'eau. Les populations des cours principaux ont globalement un nombre d'allèles nettement plus élevé.

4.2 Variabilité génétique inter-populations

La figure 4 présente les profils alléliques des populations du Gave d'Oloron. Le détail des profils alléliques de tous les *loci* et pour tous les bassins est présenté en Annexe 1. On a observé une homogénéité des profils au niveau des cours principaux du Gave d'Aspe (Aspe1 et Aspe2), du Gave d'Ossau (Oss1 et Oss2) et de la Neste (Aure1 et Aure2). Il est fort possible que ce soit également le cas pour le Gave de Pau. En revanche les profils des affluents sont relativement hétérogènes c'est-à-dire différents entre eux et différents des cours principaux. Ceci reflète une différenciation conséquente des têtes de bassins liées probablement et souvent à une fragmentation de l'habitat.

Certains allèles ne sont rencontrés que dans un bassin Figure 5. C'est le cas par exemple de l'allèle 1 du *locus* T3-13 qui n'est retrouvé que dans le Gave de Pau. L'allèle 33 du *locus* FGT-1 est rencontré seulement dans le Gave d'Aspe et l'allèle 9 du même *locus* est présent dans toutes les populations de la Neste à des fréquences relativement élevées alors qu'il n'est retrouvé que chez 3 individus du Gave d'Aspe



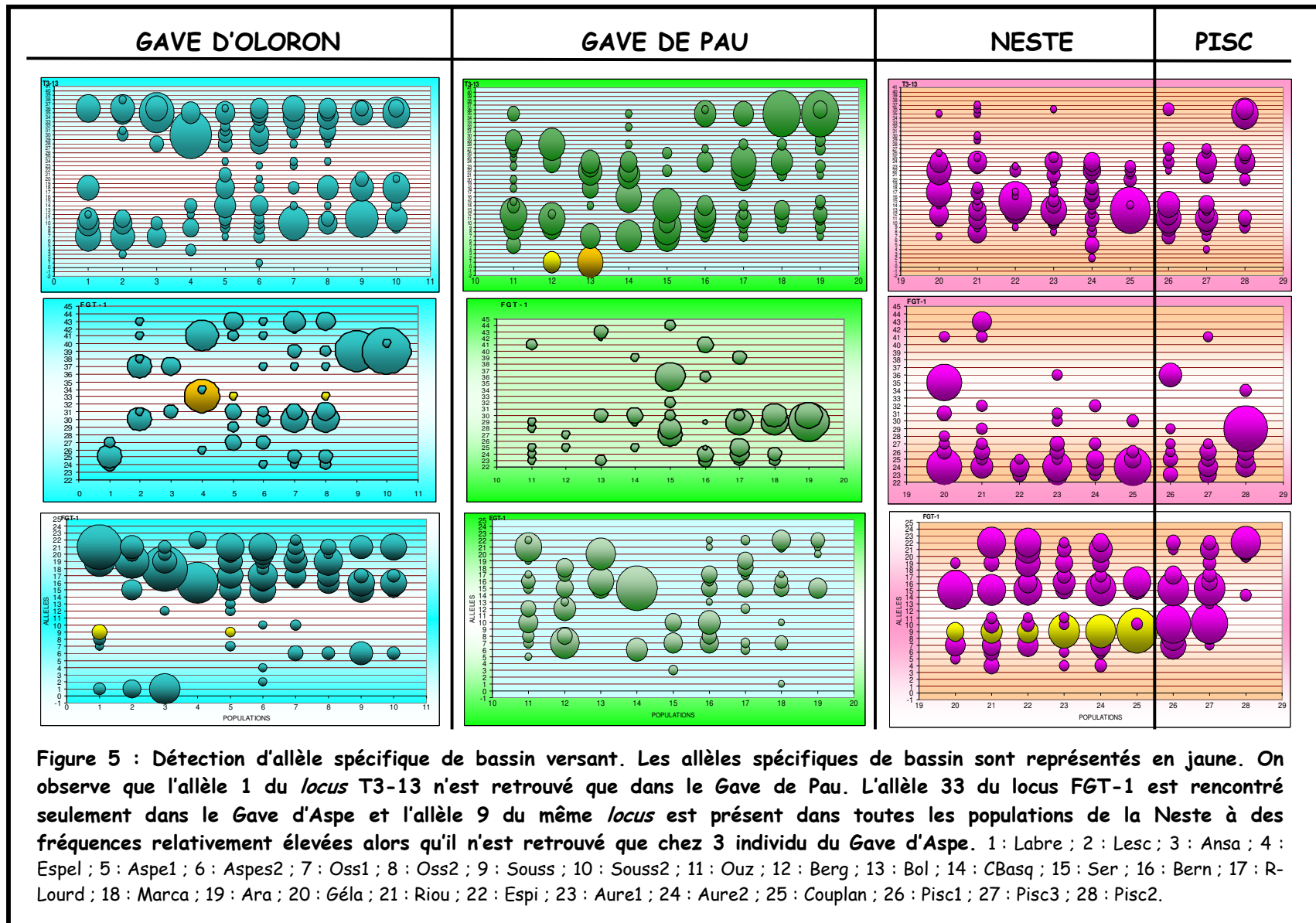
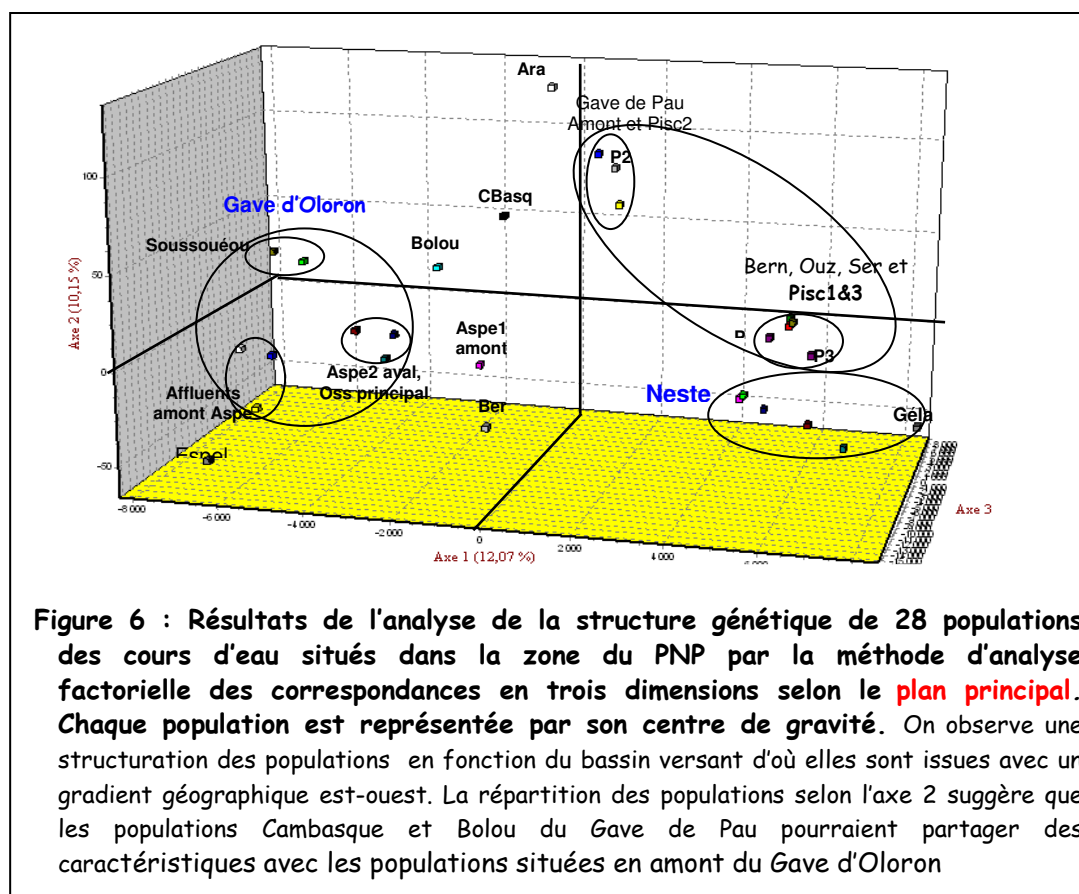


Figure 5 : Détection d'allèle spécifique de bassin versant. Les allèles spécifiques de bassin sont représentés en jaune. On observe que l'allèle 1 du locus T3-13 n'est retrouvé que dans le Gave de Pau. L'allèle 33 du locus FGT-1 est rencontré seulement dans le Gave d'Aspe et l'allèle 9 du même locus est présent dans toutes les populations de la Neste à des fréquences relativement élevées alors qu'il n'est retrouvé que chez 3 individu du Gave d'Aspe. 1 : Labre ; 2 : Lesc ; 3 : Ansa ; 4 : Espel ; 5 : Aspe1 ; 6 : Aspes2 ; 7 : Oss1 ; 8 : Oss2 ; 9 : Souss ; 10 : Souss2 ; 11 : Ouz ; 12 : Berg ; 13 : Bol ; 14 : CBasq ; 15 : Ser ; 16 : Bern ; 17 : R-Lourd ; 18 : Marca ; 19 : Ara ; 20 : Géla ; 21 : Riou ; 22 : Espi ; 23 : Aure1 ; 24 : Aure2 ; 25 : Couplan ; 26 : Pisc1 ; 27 : Pisc3 ; 28 : Pisc2.

4.2.1 Détermination de la structure génétique par la méthode d'AFC

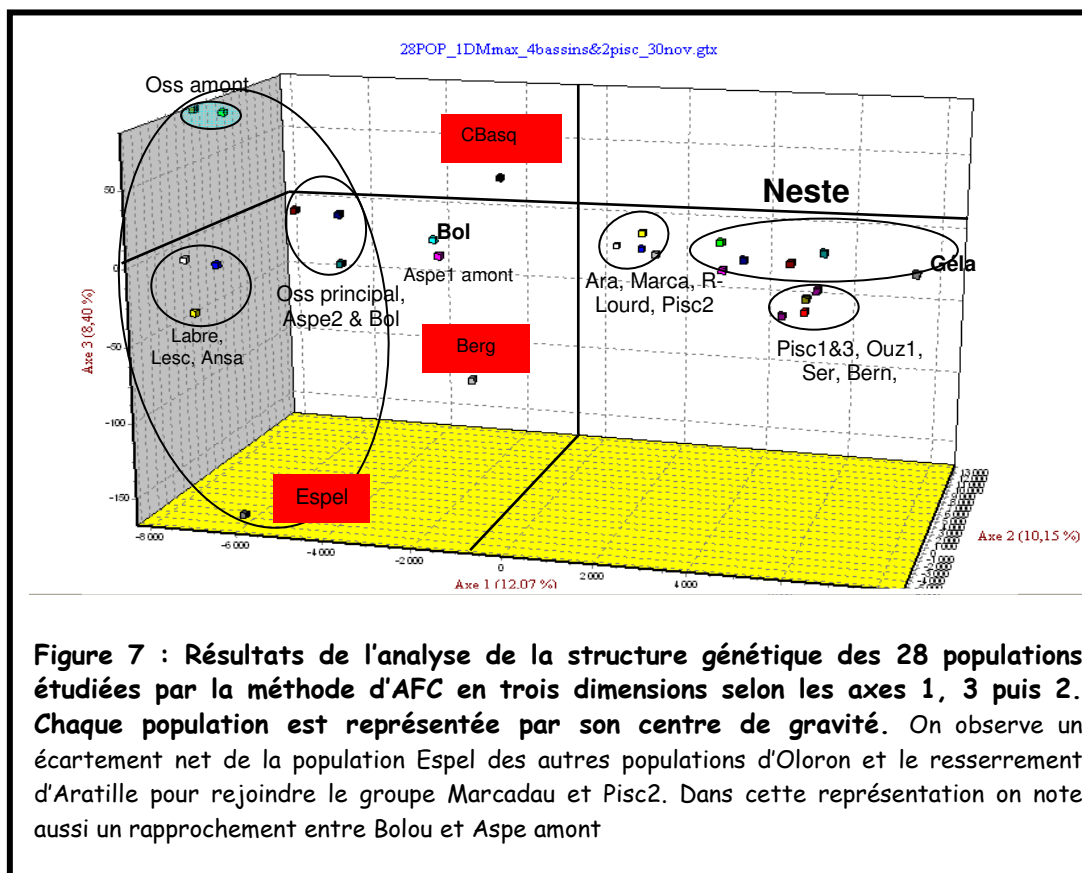
Nous avons utilisé la méthode **d'analyse factorielle des correspondances** en trois dimensions (AFC) pour analyser plus finement la structure génétique des populations. Cette méthode nous donne également un premier aperçu sur l'introggression des gènes domestiques. Pour faciliter la lecture des graphes, chaque population est représentée par son centre de gravité dans les AFC concernant l'ensemble des populations.

Le plan principal constitué par les axes 1, 2 de l'analyse par AFC montre une structuration des populations du PNP en fonction du bassin versant d'où elles sont issues (**figure 6**). Dans le groupe du Gave d'Oloron, on distingue trois sous-groupes : un sous-groupe renfermant les populations de l'amont du Gave d'Aspe (avec un écartement de la population Espelungère), un sous-groupe situé en amont du Gave d'Ossau et un sous-groupe où l'on retrouve les populations des cours principaux des Gaves d'Aspe et d'Ossau. Les populations de la Neste forment un groupe compact où il est difficile de distinguer une structuration si ce n'est un léger écartement de la population de Géla des autres populations. Enfin, les points correspondant aux populations du Gave de Pau sont beaucoup plus éclatés. On retrouve deux populations situées en amont du Gave de Cauterets (Marcadau et le R. de Lourdes) associés à la pisciculture Puntas. Dans un autre groupe, les piscicultures Cauterets classique et Pé-Dé-Hourat sont associés aux échantillons de Bernazaou, d'Ouzon et du R. de Ser). Les autres populations du Gave de Pau (Bergons, Cambasque, Bolou) sont très disparates.



La figure 7 présente la répartition des 28 populations selon les axes 1, 3 puis 2. Cette représentation apporte deux informations supplémentaires : la distinction de la population Espelungère du reste des populations et la proximité entre la population Bolou du Gave de Pau et la population située tout en amont du Gave d'Aspe.

Ces résultats confirment l'existence d'au moins trois formes génétiques de truites communes dans les cours d'eau analysés. D'autre part, il est tout à fait logique que les échantillons des souches domestiques soient retrouvés dans le groupe du Gave de Pau dont elles sont originellement issues. Des analyses d'assignation plus précises qui seront développées dans la suite du rapport ont été nécessaires pour distinguer la part de la proximité génétique de ces populations de la part du mélange des gènes par introgression

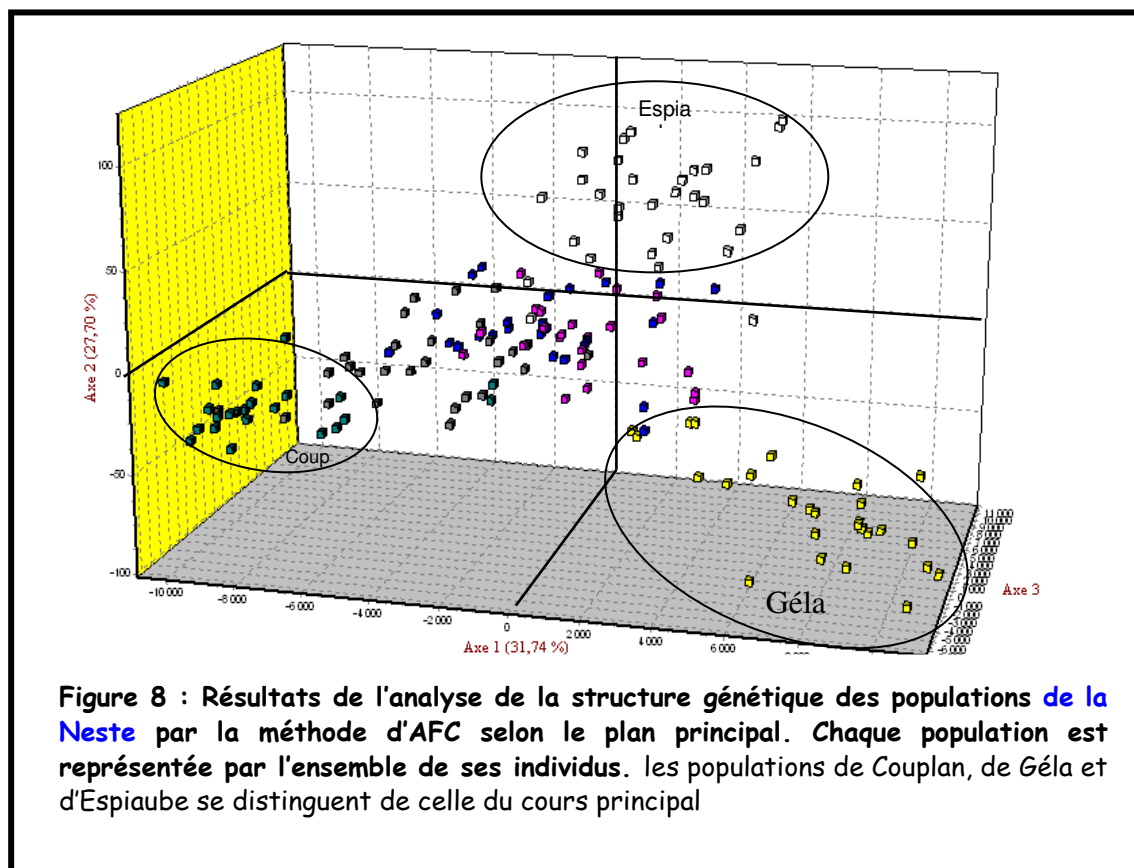


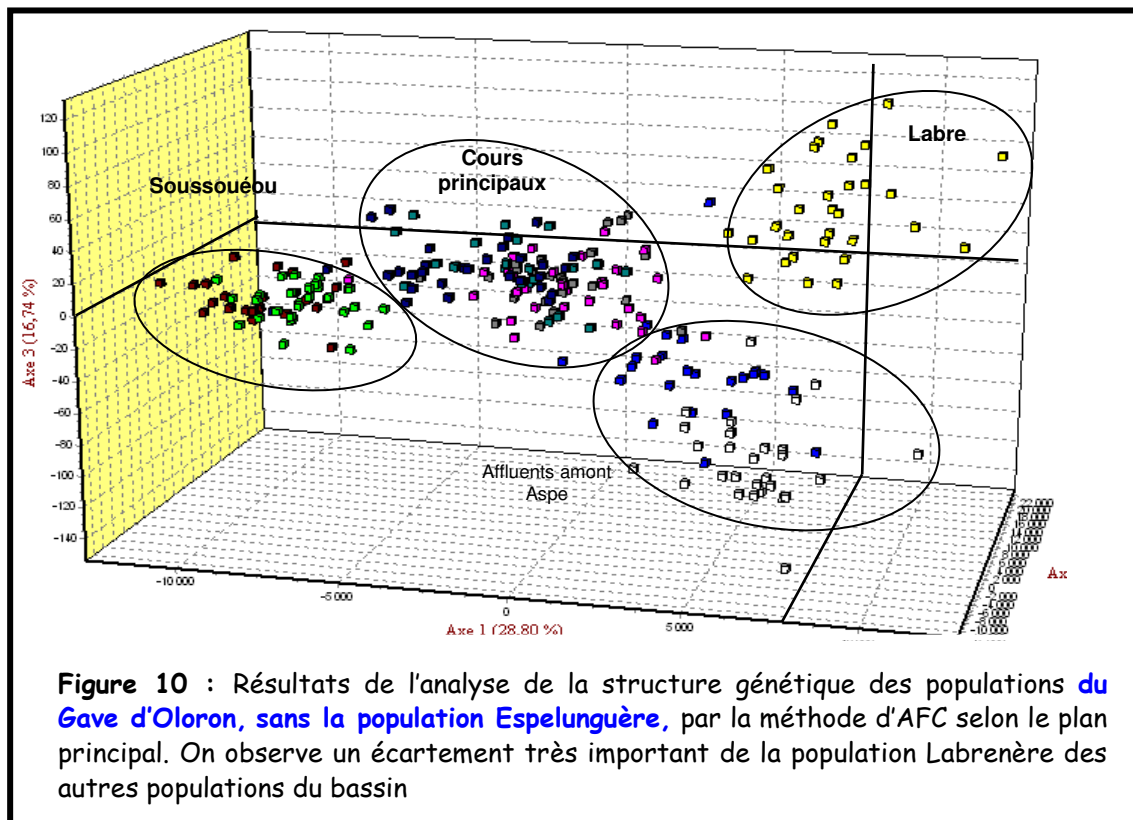
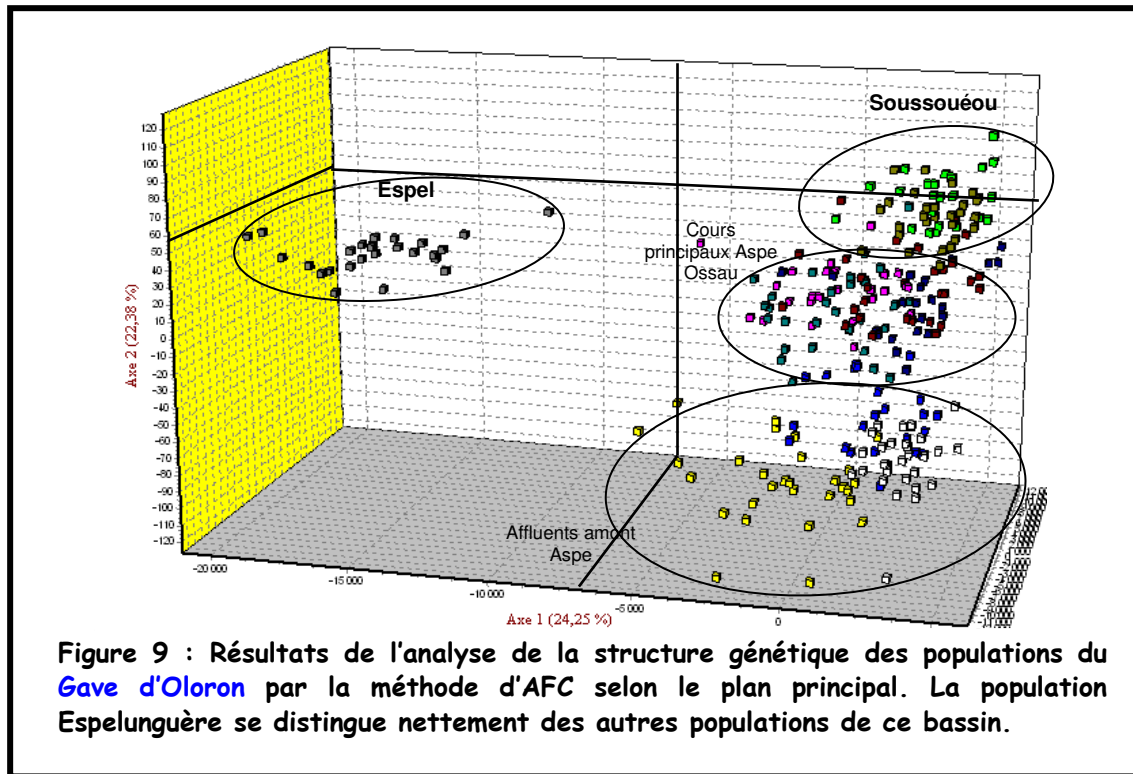
Nous avons réalisé une AFC pour chaque bassin, afin d'affiner l'analyse

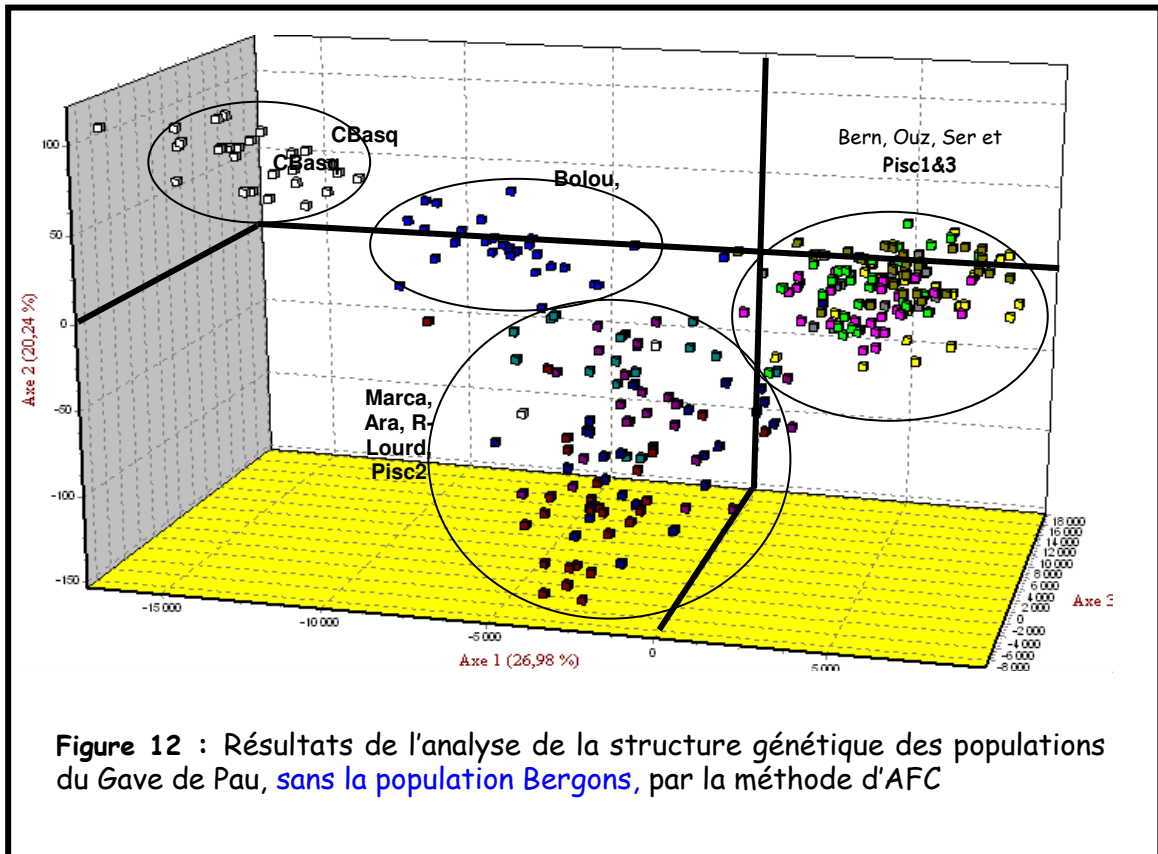
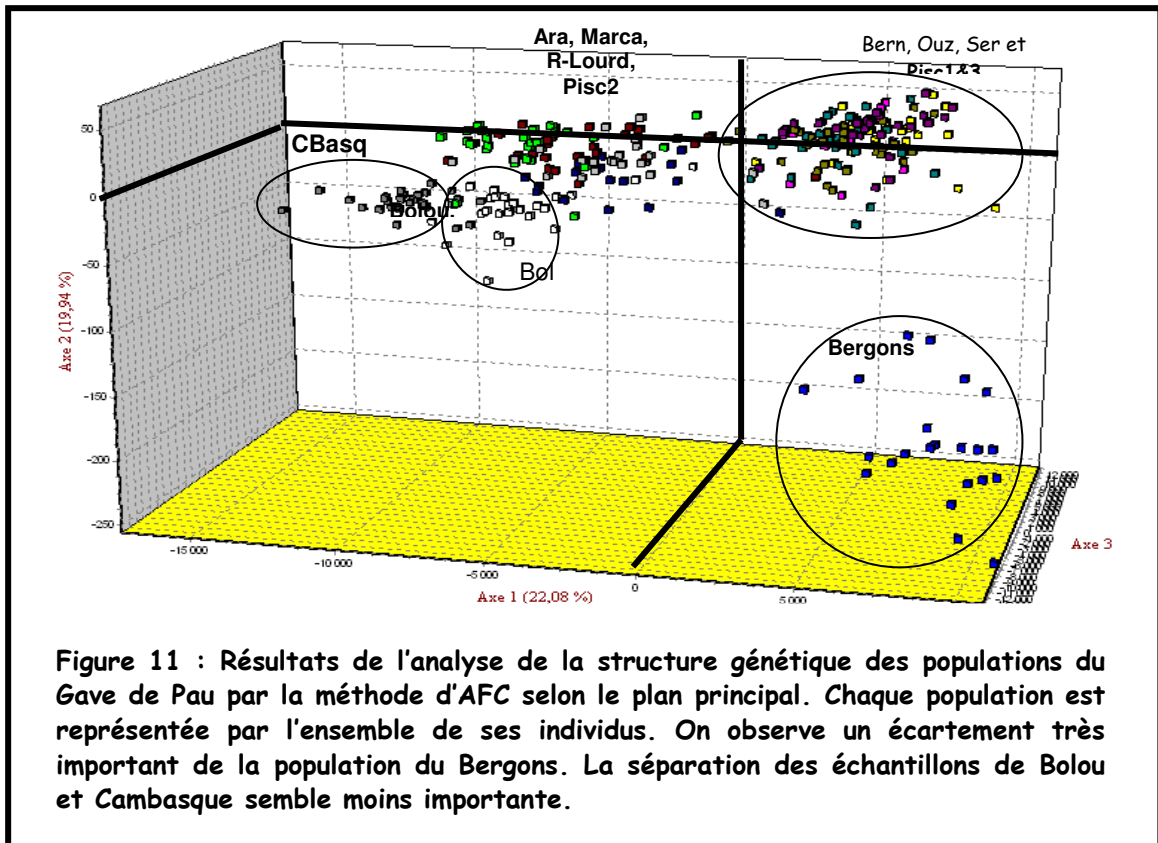
On remarque, pour le bassin de la Neste d'Aure (figure 8), que les axe 1 et 2 distinguent les populations de Couplan, de Géla et d'Espiaube ce qui suggèrent l'absence de flux de gènes entre ces populations et le reste du bassin. En revanche, les deux populations du cours principal (Aure 1 et Aure2) et la population du Rioumajou semblent très proches.

La même analyse effectuée sur le Gave d'Oloron (figure 9) montre que la population Espelunguère est très particulière, l'axe 1 l'oppose à toutes les autres populations de ce bassin. Ces dernières sont séparées (comme dans l'analyse sur les 28 populations) en trois groupes : le groupe Aspe Amont, le groupe Ossau amont et le groupe cours principaux Ossau-Aspe. Dans l'analyse globale (figure 6), Espelunguère semble posséder malgré tout des caractéristiques communes avec les autres populations situées en amont du Gave d'Aspe et d'Ossau puisqu'elles se projettent toutes dans la même région de l'axe 1.

l'AFC sur le Gave d'Oloron sans la population Espelunguère (figure 10), reconferme la séparation génétique entre les populations des affluents amont des sous bassin d'Aspe et d'Ossau par rapport aux populations des cours principaux. Ce résultat suggère que ces populations n'ont pas la même histoire évolutive. On peut penser à plusieurs épisodes de colonisation liés aux mécanismes de glaciation et de fontes des glaces.







Les deux dernières analyses AFC sont réalisées avec les populations du Gave de Pau. La première analyse montre que l'axe 2 (figure 11) sépare la population du Bergons des autres populations de ce bassin. La deuxième analyse est réalisée en excluant l'échantillon du Bergons de l'analyse (figure 12) alors que l'axe 1 distingue nettement la population Cambasque et à un moindre degré la population du Bolou des deux autres groupes. Il serait intéressant de pousser l'investigation pour connaître le statut évolutive des deux populations du Cambasque et du Bolou. Il est clair qu'elles sont plus éloignées entre elles que des deux autres groupes. A ce stade de l'analyse, tout laisse penser que dans le Gave de Pau, on aurait au moins trois entités génétiques qu'on pourrait appeler entité type Bergons, type Cambasque et type Pau classique.

4.2.2 Détermination de la différenciation génétique des populations

Le F_{st} de Wright est un indice qui donne le degré de différenciation des populations. Il compare les populations deux par deux. Les valeurs de cet indice sont comprises entre 0 et 1. On parle de différenciation génétique à partir de valeur de $F_{st} \geq 0,05$. Le tableau 2 présente les F_{st} obtenus à partir des tests de comparaison deux à deux des 28 populations de truites communes des cours d'eau de la zone du PNP analysées.

C'est dans le Gave de Pau qu'on observe le plus de différenciation génétique des populations. En effet, dans ce bassin, trois populations (Bergons, Cambasque et Aratille) présentent des F_{st} très élevés. Les F_{st} de Bergons et Cambasque sont importants même avec les populations du même bassin. D'ailleurs, la valeur le F_{st} entre Bergons et Cambasque est parmi les plus important (0,312).

Les populations situées en amont du Gave d'Aspe se distinguent une fois de plus des populations amont du Gave d'Ossau avec des valeurs de F_{st} supérieures à 0,200 sauf pour Lescun. Dans ce bassin c'est Espelunguère qui se distingue puisque les F_{st} entre cette population et toutes les autres sont parmi les plus importants.

Les F_{st} obtenus entre d'une part, les populations d'Espelunguère, Bergons Cambasque et d'autre part, les souches domestiques restent très élevés. Les populations situées en amont des Gaves d'Aspe et d'Ossau ont aussi présenté des F_{st} élevés avec les souches domestiques, ce qui d'ores et déjà suggère que toute ces populations sont peu ou pas introgressées par le pool de gènes domestiques.

En revanche, plusieurs populations se sont avérées très proches génétiquement des piscicultures avec des F_{st} très faibles. C'est le cas par exemple des échantillons prélevés dans les cours principaux d'Aspe et d'Ossau (Aspe 1 & 2 et Ossau 1 & 2) ainsi que de la plupart des populations de la Neste d'Aure (Géla, Rioumajou, Aure 1 & 2). Au niveau du Gave de Pau, ce sont les échantillons d'Ouzon, de Bernazaou, du R- de Lourdes et de B. de Sers qui ont présenté des F_{st} faible.

On peut aussi noter des F_{st} faibles entre les échantillons du Gave du Marcadau. Cette proximité avec une souche domestique n'est probablement **pas seulement** liée à un phénomène d'introggression suite à un repeuplement mais peut aussi être liée à l'origine des individus fondateurs de la souche domestique Puntas. En effet, cette souche a été établie à partir de géniteurs capturés au niveau du Gave de Marcadau

Theta	Labre	Lesc	Ansa	Espel	Aspel	Aspe 2	Oss1	Oss2	Souss1	Souss2	Ouz	Berg	Bol	Cbasq	Ser	Bern	R-Lourd	Marca	Ara	Gela	Riou	Espi	Aure1	Aure2	Coup	Pisc1	Pisc3	
Lesc	0,086																											
Ansa	0,127	0,039																										
Espel	0,222	0,212	0,271																									
Aspel	0,130	0,079	0,117	0,188																								
Aspe 2	0,097	0,056	0,089	0,175	0,016																							
Oss1	0,129	0,101	0,139	0,238	0,061	0,043																						
Oss2	0,116	0,070	0,118	0,190	0,045	0,029	0,009																					
Souss1	0,228	0,171	0,226	0,283	0,139	0,116	0,139	0,099																				
Souss2	0,225	0,166	0,214	0,278	0,137	0,117	0,144	0,098	0,007																			
Ouz1	0,135	0,136	0,166	0,230	0,083	0,067	0,096	0,085	0,178	0,189																		
Berg	0,254	0,203	0,257	0,285	0,167	0,158	0,213	0,175	0,255	0,267	0,206																	
Bol	0,183	0,130	0,190	0,201	0,105	0,081	0,103	0,083	0,164	0,157	0,153	0,230																
Cbasq	0,257	0,220	0,275	0,278	0,160	0,170	0,209	0,173	0,231	0,229	0,209	0,312	0,171															
Ser	0,181	0,154	0,191	0,265	0,093	0,090	0,102	0,099	0,209	0,221	0,068	0,218	0,169	0,231														
Bern	0,193	0,149	0,195	0,240	0,103	0,097	0,101	0,082	0,161	0,176	0,062	0,196	0,145	0,219	0,060													
R-Lourd	0,164	0,105	0,152	0,215	0,059	0,056	0,090	0,054	0,140	0,132	0,080	0,183	0,078	0,149	0,097	0,065												
Marca	0,212	0,148	0,186	0,262	0,145	0,108	0,140	0,112	0,188	0,180	0,122	0,251	0,124	0,241	0,137	0,105	0,051											
Ara	0,276	0,204	0,247	0,316	0,210	0,173	0,223	0,179	0,262	0,240	0,195	0,322	0,190	0,288	0,224	0,186	0,097	0,030										
Gela	0,176	0,151	0,189	0,253	0,083	0,077	0,109	0,100	0,191	0,209	0,084	0,207	0,154	0,218	0,106	0,091	0,092	0,162	0,244									
Riou	0,148	0,115	0,163	0,225	0,051	0,056	0,084	0,073	0,169	0,181	0,073	0,187	0,119	0,207	0,102	0,087	0,070	0,128	0,206	0,043								
Espi	0,189	0,181	0,215	0,271	0,097	0,107	0,123	0,120	0,224	0,232	0,113	0,253	0,187	0,245	0,136	0,131	0,129	0,202	0,282	0,088	0,061							
Aure1	0,156	0,123	0,177	0,231	0,051	0,069	0,093	0,082	0,181	0,189	0,093	0,178	0,135	0,204	0,115	0,106	0,086	0,159	0,232	0,065	0,004	0,076						
Aure2	0,157	0,134	0,182	0,233	0,054	0,062	0,091	0,082	0,171	0,186	0,081	0,197	0,136	0,198	0,101	0,093	0,081	0,151	0,230	0,033	0,009	0,059	0,013					
Coup	0,243	0,212	0,271	0,302	0,115	0,140	0,159	0,153	0,227	0,232	0,168	0,250	0,193	0,250	0,198	0,176	0,163	0,232	0,309	0,159	0,088	0,165	0,039	0,093				
Pisc1	0,176	0,148	0,190	0,240	0,087	0,089	0,098	0,084	0,168	0,186	0,050	0,192	0,151	0,202	0,043	0,018	0,069	0,128	0,207	0,093	0,085	0,127	0,094	0,082	0,168			
Pisc3	0,183	0,157	0,204	0,260	0,115	0,104	0,102	0,095	0,174	0,199	0,063	0,221	0,168	0,242	0,066	0,018	0,107	0,147	0,243	0,084	0,083	0,120	0,101	0,086	0,176	0,027		
Pisc2	0,191	0,127	0,180	0,221	0,101	0,083	0,114	0,088	0,148	0,142	0,107	0,206	0,089	0,193	0,119	0,084	0,013	0,029	0,060	0,133	0,108	0,179	0,129	0,121	0,194	0,099	0,130	

Tableau 2 : Différenciation génétique des populations estimée à l'aide de l'indice Fst de Wright (indice de comparaison des populations deux par deux). Les valeurs de Fst les plus élevées sont obtenues pour les trois populations Espelunguère, Bergons, Cambasque et Aratille.

4.3 Estimation du taux de mélange entre les pool de gènes domestiques et sauvage

La méthode d'assignation développée dans le logiciel STRUCTURE permet de détecter des phénomènes d'introgession remontant à plusieurs générations. Cette méthode donne pour chaque individu sa probabilité d'appartenir à un groupe génétique parmi K groupes possibles sans aucune information *a priori* sur l'origine géographique des individus. Les figures 13 à 15 montrent les résultats de l'analyse de mélange des gènes sauvage et domestiques dans les bassins de la Neste, du Gave d'Oloron et du Gave de Pau respectivement. Les résultats numériques de cette analyse sont synthétisés dans figure 16

Ainsi, dans le Gave d'Oloron, on n'observe **aucun individu de la population d'Espelunguère ou des deux populations de Soussouéou** présentant un profil domestique (figure 13). De façon générale le **taux de mélange des gènes sauvages et domestique est faible** dans le sous-bassin d'Ossau. En revanche, les échantillons des populations Aspe 1 et Labrenère ont présenté des taux d'introgession de 23% et 16% respectivement.

Au niveau du Gave de Pau (figure 14), nous **n'avons pas détecté de présence de gène domestiques dans la population du Bergons** et les populations du Bolou et du Cambasque semblent très faiblement introgressées contrairement à l'échantillon d'Ouzon qui a présenté un taux d'introgession de plus 40%. Tous les individus des populations du Bernazaou, du R. de Lourdes, du Marcadau et d'Aratille ont une structure de même type génétique que l'une et/ou l'autre des populations domestiques. On peut penser qu'il s'agit, dans ces cas d'une proximité génétique avec les populations sources des souches domestiques. Si ce n'est pas le cas, il est à craindre que les populations natives de ces cours d'eau se soient complètement éteintes et remplacées par les souches domestiques.

Pour le bassin de la Neste d'Aure (figure 15), les gènes domestiques sont détectés dans pratiquement toutes les populations analysées sauf Espiaube où leur présence est à la limite de la détection. La population de Couplan semble aussi peu introgressée. Les taux de mélange de gènes natifs et domestiques les plus élevés pour ce bassin sont détectés dans les populations de Géla et du Rioumajou.

Il a noter que la méthode d'assignation utilisée dans le Logiciel STRUCTURE a donné pour certains échantillons (Bernazaou, Ouzon, Labrenère et Aratille) des taux d'assignation aux souches domestiques supérieurs aux résultats obtenus dans la méthode précédente. Cette différence pourrait être expliquée par la détection dans la méthode de STRUCTURE de phénomènes d'introgession remontant à plusieurs générations.

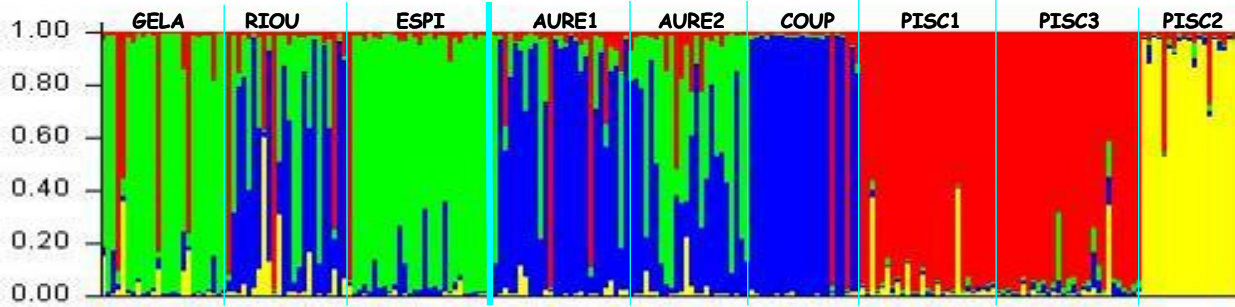


Figure 13 : Analyse du taux de mélange entre le pool de gènes domestiques et le pool de gènes sauvage des populations des cours d'eau **de la Neste d'Aure**. L'analyse est réalisée à l'aide du logiciel STRUCTURE. Les individus sont assignés à des groupes génétiques sans aucune information *a priori* sur leur population d'origine. Chaque individu est représenté par une barre verticale au sein de K groupes génétiques (ici K= 4). Le groupe des populations sauvages de la Neste est représenté en bleu et ou vert, la pisciculture Puntas est représentée en vert et les deux autres piscicultures en rouge. Ainsi les individus des populations sauvages qui seront représentés par une barre rouge ou verte ou alors par une barre de couleur composite proviendrait d'un croisement entre deux ou plusieurs pools de gènes.

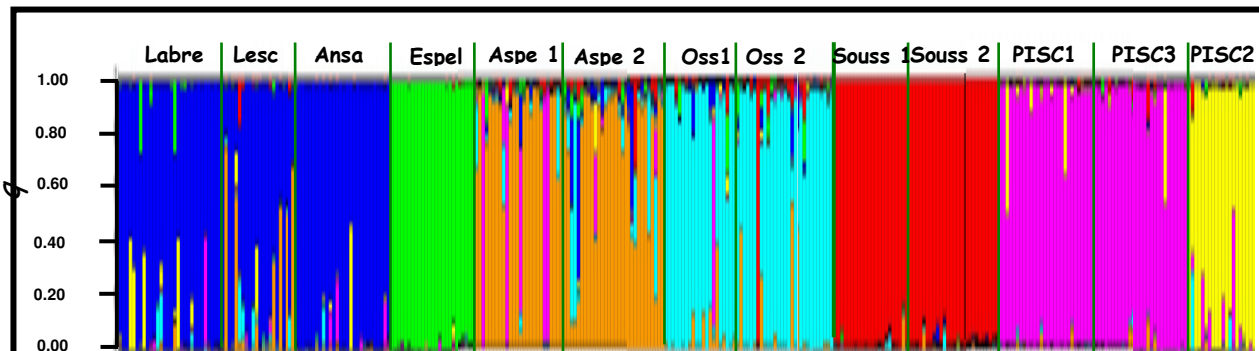


Figure 14 : Analyse du taux de mélange entre le pool de gènes domestiques et le pool de gènes sauvage des populations des cours d'eau **du Gave d'Oloron**, K= 7. Les populations sauvages sont réparties dans 5 groupes génétiques. La pisciculture Puntas est représentée en jaune et les deux autres piscicultures en rose. On observe qu'aucun individu de la population de Espelunguère ou des deux populations de Soussouéou ne présente de profil de pisciculture.

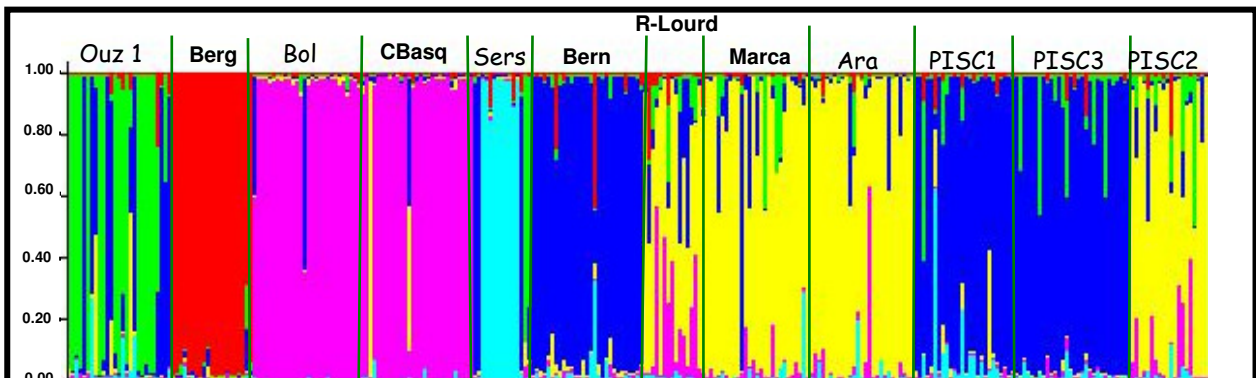


Figure 15 : Analyse du taux de mélange entre le pool de gènes domestiques et le pool de gènes sauvage des populations des cours d'eau du Gave de Pau. Les populations sauvages sont réparties dans 6 groupes génétiques. La pisciculture Puntas est représentée en jaune et les deux autres piscicultures en bleu. Seule la population du Bergons ne semble pas introgressée. (pas de barre contenant du bleu ou du jaune). On observe très peu d'introgression dans les populations Les populations du Bolou et du Cambasque. Tous les individus des populations du Bernazaou, du R. de Lourdes, du Marcadau et d'Aratille ont une structure de type du même type génétique que l'une et/ou ml'autre des population domestiques.

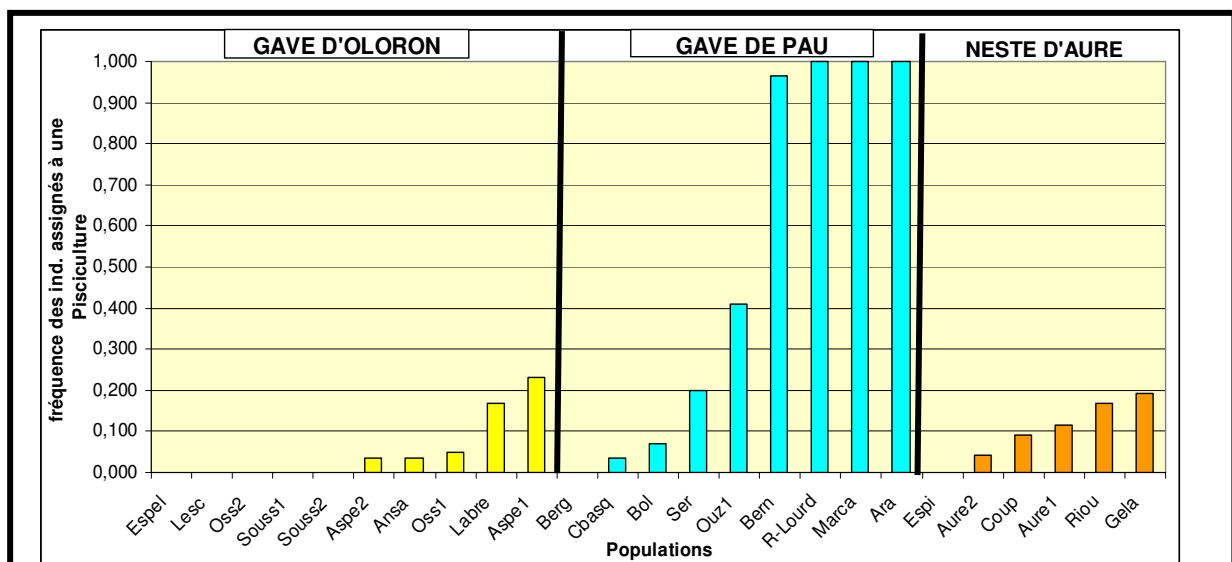


Figure 16 : Synthèse de l'analyse du mélange des gènes domestique et sauvages dans les populations de truite de la zone du PNP

Conclusion et recommandations en vue de la conservation des populations étudiées

Il est maintenant admis par tous (gestionnaires, usagers et scientifiques) qu'il est indispensable de pratiquer une gestion durable des ressources piscicoles. La caractérisation de la structure génétique des populations de poissons et tout particulièrement des populations de truite commune (*S. trutta fario*) dans tout système hydrographique est le préalable à toute mesure de conservation et de gestion des populations, elle constitue le premier pas de l'aide à la décision. Cela permet d'identifier les différentes entités génétiques présentes et surtout les populations autochtones encore préservées et/ou à préserver et de mesurer l'impact des pratiques de gestion entreprises dans les cours d'eau étudiés, tel que le repeuplement. En d'autres termes, la connaissance de la structure génétique permet d'identifier et de caractériser les populations qui présentent un intérêt phylogénique, écologique et patrimonial. Cette étude est un exemple (s'il en fallait) illustrant l'importance de l'approche génétique pour répondre à des problématiques de gestion et de conservation des espèces.

Le travail de génétique entrepris sur les populations de truite commune (*S. trutta fario*) présentes dans les cours d'eau dans la zone du PNP est la première étude génétique réalisée à une échelle aussi importante dans cette région des Pyrénées. Il a été réalisé sur une partie (28 stations) des échantillons prélevés dans le cadre d'une étude morphologique réalisée à la demande du PNP par le bureau d'étude ECOGEA (Lascaux *et al* 2005).

L'analyse de la structure génétique a été réalisée à l'aide de marqueurs microsatellites. Ces derniers ont eu une double utilité dans le contexte de cette étude. Ils ont permis d'établir la structure fine des populations de truites analysées et l'utilisation de *loci* très variables tels que Str12, FGT-1, SSOSL311 et T3-13 a permis d'obtenir un pouvoir discriminant très élevé entre les individus. Il a donc été possible de les assigner à leur population d'origine avec précision et d'évaluer ainsi le mélange des gènes domestique et sauvage.

En termes de résultats, la présente étude confirme une fois de plus la grande variabilité intra-spécifique de la truite commune liée à l'histoire évolutive de cette espèce. En effet, nous avons pu mettre en évidence dans chaque bassin plusieurs entités génétiques avec vraisemblablement des adaptations à l'échelle de bassins versants, de sous-bassins, voire de rivières. A quelques exceptions près, les populations de truite étudiées sont regroupées par bassin versant.

Dans le Gave d'Oloron (au niveau des sous-bassins d'Ossau et d'Aspe), nous avons détecté au moins trois formes génétiques indépendantes ou ayant dérivé les unes des autres par dérive génétique suite à un isolement géographique. Parmi elles, deux populations sont localisées en tête de bassin, il s'agit de la population **d'Espelunguère** et de celle de **Soussouéou**. Ces deux populations présentent une structure génétique distincte des autres populations du bassin et ne sont pas introgressées par le pool de gènes domestiques, ce qui laisse supposer **qu'il s'agit de populations autochtones adaptées à leur milieu**.

Dans le Gave de Pau, nous avons aussi identifiés trois populations particulières, il s'agit des populations de **Cambasque, de Bergons**, et à un moindre degré de **Bolou**. Ces trois populations sont également faiblement introgressées par les gènes domestiques ce qui laisse supposer, comme dans le cas d'Espelunguère et de Soussouéou, qu'il s'agit de populations d'origine ancestrale ou dérivées de **souches ancestrales et présentant un enjeu patrimonial certain**.

Nous avons noté une forte variation dans la contribution du repeuplement à la structure génétique des populations. Certaines populations, notamment des populations situées dans les zones amont des cours d'eau semblent réfractaires à l'introgession par les gènes domestiques. Il s'agit probablement de mécanisme d'adaptation locale où les poissons natifs présentent, **dans les conditions environnementales actuelles**, un meilleur succès reproducteur que les poissons déversés.

En revanche, l'impact du repeuplement est beaucoup plus important dans les cours d'eau du Gave de Pau probablement en raison de la proximité génétique entre les populations naturelles et les souches de pisciculture, source de repeuplement. En effet, les trois souches de pisciculture utilisées pour les rempoissonnements sont issues du Gave de Pau. Dans le cas de ce bassin, il sera difficile de distinguer clairement la part de la proximité génétique ancestrale de la part de l'hybridation introgressive due au repeuplement.

En termes de conservation et de gestion, il est important de passer, au niveau du réseau hydrographique situé dans la zone du PNP, de la gestion à l'échelle de l'espèce à une gestion **à l'échelle des populations** avec des mesures de protection privilégiées pour les populations "précieuses".

Les populations qui se sont avérées particulières (**Espelunguère, Soussouéou, Cambasque, Bergons et Bolou**), et qui par conséquent présentent un enjeu patrimonial, se trouvent en amont des cours d'eau et présentent malheureusement une très faible diversité génétique. La première mesure de gestion et la plus urgente serait **de déplacer la pression de pêche de ces rivières** vers des rivières dont les populations sont moins menacées.

Dans un deuxième temps, il est important d'estimer le risque d'extinction de **ces cinq populations** par l'étude de leur viabilité. Pour étudier la viabilité d'une population, il faudrait disposer de données génétiques et démographiques (effectif démographique et effectif efficace) et connaître l'aire de répartition de la population à étudier (obstacles amont et aval). Il est donc important **de réaliser un travail de synthèse** où seront exploitées toutes les données disponibles sur ces populations et sur leur habitat.

Pour les populations d'intérêt, dont la viabilité est menacée, il faudra mettre en place un plan de restauration en constituant par exemple **des stocks de géniteurs autochtones** qui serviront de source pour des opérations de repeuplement localisées. Pour celle d'entre elles qui ne se révéleront pas menacée d'extinction, il faudra impérativement arrêter le déversement de poissons domestiques dans leur aire de répartition et mettre l'accent sur la préservation de leur habitat avec une diminution de la pression de prélèvement.

Certaines populations ne semblent pas fonctionnelles mais seulement soutenues par les opérations de repeuplement. C'est le cas par exemple des populations de **R. de Lourdes** (Gave de Gavarnie) ou de **Bernazaou** (Luz). Ces populations pourraient être maintenues de cette façon pour la pêche récréative **à condition qu'elles ne soient pas directement connectées** avec des populations natives d'intérêt patrimonial. En effet, un flux de gènes à partir de ces populations pourrait avoir des conséquences aussi importantes, voire plus importantes, que les pratiques de repeuplement classique avec une hybridation introgressive importante. Dans le cas extrême (une modification brusque des conditions environnementales par exemple), cette hybridation peut aboutir à une extinction de la forme sauvage. C'est pourquoi, il faut réfléchir à un moyen d'éviter un flux de gènes des populations à composante domestique trop importante vers les populations d'intérêt patrimonial.

Par précaution, l'arrêt de déversement de poissons domestiques allochtones, ne doit pas se limiter aux cours d'eau hébergeant les populations d'intérêt mais doit aussi concerner les cours d'eau adjacents et connectés. Cette mesure devrait concerner par exemple la population **d'Espelunguère** que nous avons identifiée comme autochtone avec une très faible diversité génétique. Le cours d'eau d'Espelunguère est très proche du cours principal du Gave d'Aspe en tête de bassin (échantillon **Aspe 1**) où le taux de mélange de l'échantillon étudié avec le pool de gènes domestique est supérieur à 20%. Pour conserver les caractéristiques génétiques d'Espelunguère, il est important **d'arrêter les déversements dans toute la partie amont du bassin physiquement connectée à cette rivière.**

Références bibliographiques

Altukhov F.W., Salmenkova E.A., Omelchenko V.T. (2000). Salmonid fishes. Population Biology, Genetics and Management. Blackwell Science Ltd, Oxford.

Aurelle D., Lek S., Giraudel J-L., Berrebi P., 1999. Microsatellites and artificial neutral networks : tools for the discrimination between natural and hatchery brown trout (*Salmo trutta* L.) in Atlantic populations. *Ecological Modelling*, **120**, 313-324.

Aurelle D., Cattaneo-Berrebi G., Berrebi P., 2002. Natural and artificial secondary contact in brown trout (*Salmo trutta* L.) in the French western Pyrénées assessed by allozymes and microsatellites. *Heredity*, **89**, 171-173.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F., 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France) A program available at: <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>

Berrebi P., 1997. Introduction d'espèces dans les milieux aquatiques d'eau douce: les impacts génétiques. *Bulletin Français de Pêche et Pisciculture*, **344/345**, 471-487.

Caudron A., Champigneulle A., 2002. Evolution spatio-temporelle de la contribution du repeuplement en truite (*Salmo trutta* L.) réalisé à des stades précoces dans le bassin amont du fier. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **365/366** : 455-469

Chimits, P., 1970. La pêche sportive dans le Parc National des Pyrénées. *Bull.Fr.Piscic.*, (237):113-36

Corander J., Waldmann P., Sillampaa M.J., 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* **163**: 367-374

Dawson K. J., Belkhir K. 2001. A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. *Genet. Res.* **78**:59-77.

Ferguson A., Flemming C.C., 1983. Evolutionary and taxonomic significance of protein variation in the brown trout (*Salmo trutta* L.) and other salmonids. In: Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance. Eds. **Oxford G.S. & Rollinson D., 86-99, Academic Press, London.**

Fleming I.A., Gross M.R., 1993. Breeding success of hatchery and wild Coho Salmon (*Oncorhynchus Kisutch*) in competition. *Ecological Applications*, vol 3, 2 ,230-245.

Hansen MM., Mensberg KLD, Rasmussen G., Simonsen V., 1997. Genetic variation within and among Danish brown trout (*Salmo trutta* L.) Hatchery strains, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Aquaculture* **153**: 15-29

Hansen MM., Nielsen M.M., Nielsen E.E., Bouza C., Mensberg KLD, 2000. Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (*Salmo trutta* L.) using microsatellite DNA markers. *Can. J. Fish Aquat.*

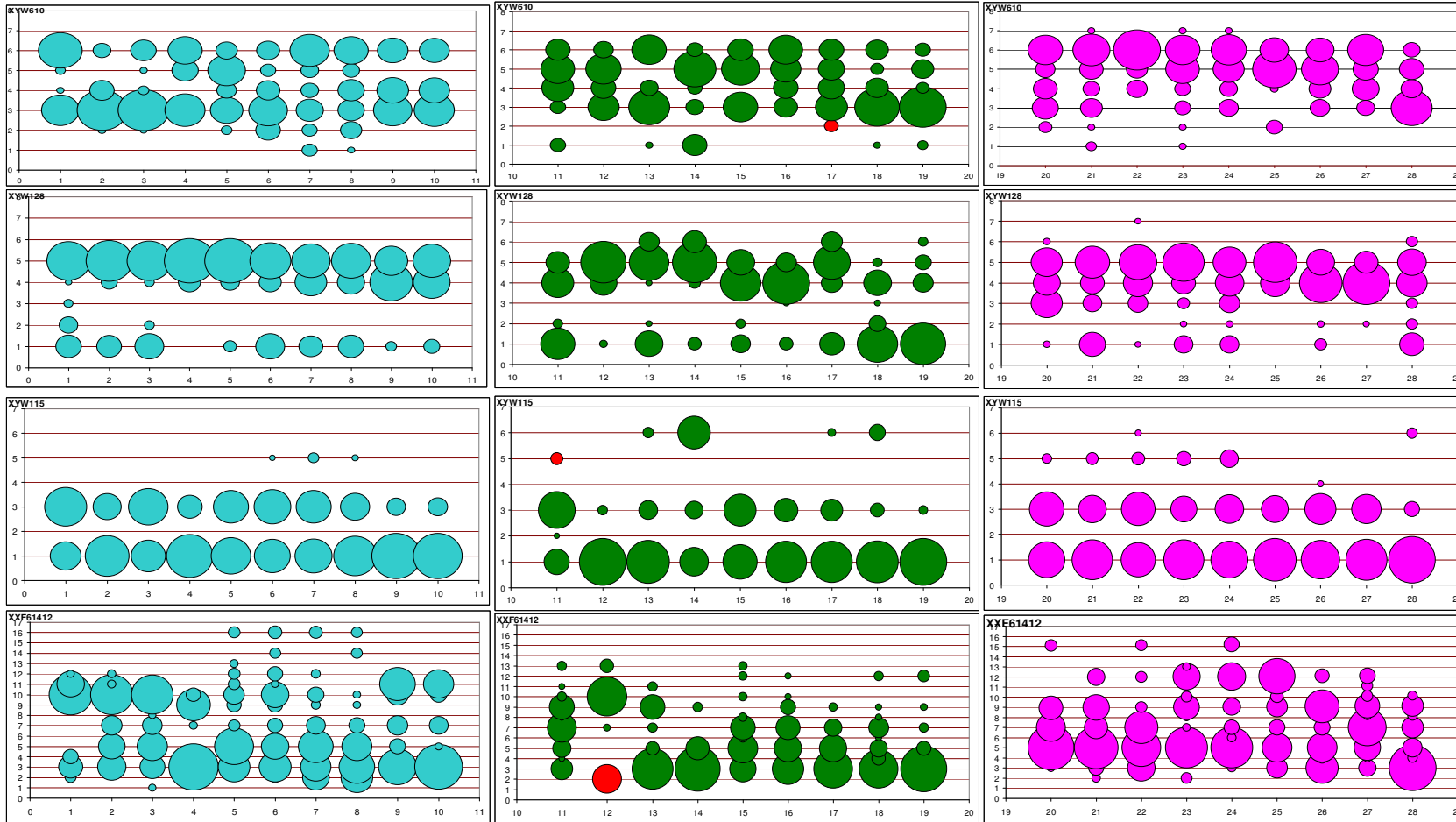
Hansen MM., Ruzzante D.E., Nielsen E.E., Mensberg KLD, 2001. Brown trout (*Salmo trutta* L.) stocking impact assessment using microsatellite DNA markers. *Ecological Applications* **11**: 148-160

Huet M., 1954. Biologie,profil en long et en travers des eaux courantes. *Bull. Fr. Piscic.* **175** pages.

- Illies J., Botosaneau L., 1963. Problèmes et méthodes de la classification et de la zonation écologique des eaux courantes, considérées surtout du point de vue funistique **Mitt. Int. Ver. Theor. Ang. Limnol.** 12 : 1-57
- Krieg F., Guyomard R., 1985. Population genetics of French brown trout (*Salmo trutta* L.): large geographical differentiation of wild populations and high similarity of domesticated stocks. **Genet. Sel. Evol.**, 17, 225-242.
- Lascaux J.M., F. Firmignac, T. Lagarrigue, 2005. Analyse de la variabilité morphologique des truites des cours d'eau du territoire du Parc National des Pyrénées. **Rapport E.CO.G.E.A.**, pour la FDAAPPMA des Hautes-Pyrénées et le Parc National des Pyrénées.
- McGinnity P., Prodohl P. Maoiléidigh N.O., Hynes R., Cotter D., Baker N., Hea B., Ferguson A., 2004. Differential life-time success and performance of native and non-native Atlantic salmon examined under communal natural conditions. **Journal of Fish Biology** 65(supplement 1): 173-187
- Nielsen E.E., M. M. Hansen & L.A. Bach, 2001. Looking for a needle in a haystack: Discovery of indigenous Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in stocked populations. **Conservation Genetics** 2: 219-232,
- Ombredane D., Baglinière J-L., Berrebi P., 2001. La truite commune (*Salmo trutta* L.1758). In: *Atlas des poissons d'eau douce*, Keith P et Allardi J. (Coords), **Patrimoines naturels**, 47, 244-249
- Poteaux C., Beaudou D., Berrebi P., 1998. Temporal variation of genetic introgression in stocked brown trout population. **Journal of Fish Biology**, 53, 701-713.
- Pritchard JK, Stephens M. et Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155: 945-959
- Ruzzante D.E., Hansen M.M., Meldrup D., 2001. Distribution of individuals inbreeding coefficients, relatedness and influence of stocking on native anadromous brown trout (*Salmo trutta*) population structure. **Mol.Ecol**, 10, 2107-2128.
- Taylor E.B., 1991. A review of local adaptation in Salmonidae, with particular reference to Pacific and Atlantic Salmon. **Aquaculture** 98: 185-207
- Tessier N., Bernatchez L., Wright J.M., 1997. Population structure and impact of supportive breeding inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in Land-locked Atlantic salmon *S. salar* L. **Molecular Ecology** , 6: 735-750
- Waples R.S., 1994. Genetic Considerations in Recovery Efforts for Pacific Salmon. **Conservation Biology**, 8: 884-886
- Waser P.M., Strobeck C. 1998. Genetic signature in interpopulation dispersal. **Trends Ecol. Evol.** 13, 43-44
- Weber et Fausch 2003., Interactions between wild and hatchery salmonids in streams: differences in Biology and evidence for competition. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 60: 1018-1036.

ANNEXE

Distribution des fréquences alléliques dans les populations de la truite commune des cours d'eau de la zone du PNP. Chaque graphe correspond à la distribution des fréquences alléliques à un *locus*. La surface de chaque cercle est proportionnelle à la fréquence d'un allèle donné dans chaque échantillon. 1 : Labre ; 2 : Lesc ; 3 : Ansa ; 4 : Espel ; 5 : Aspe1 ; 6 : Aspes2 ; 7 : Oss1 ; 8 : Oss2 ; 9 : Souss ; 10 : Souss2 ; 11 : Ouz ; 12 : Berg ; 13 : Bol ; 14 : CBasq ; 15 : Ser ; 16 : Bern ; 17 : R-Lourd ; 18 : Marca ; 19 : Ara ; 20 : GÉla ; 21 : Riou ; 22 : Espi ; 23 : Aure1 ; 24 : Aure2 ; 25 : Couplan ; 26 : Pisc1 ; 27 : Pisc3 ; 28 : Pisc2

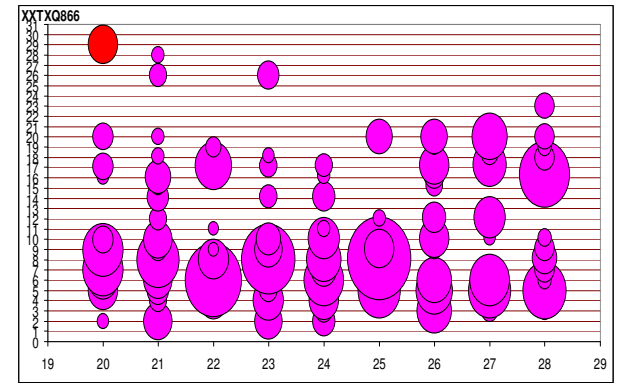
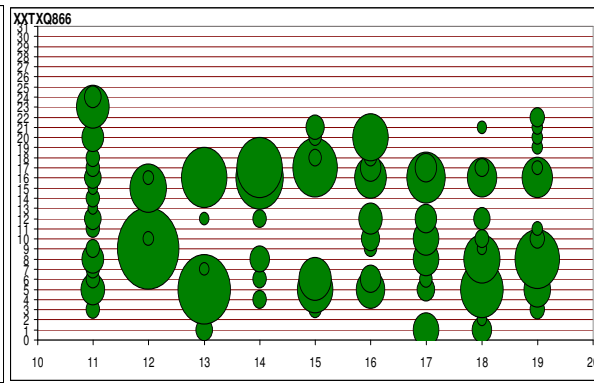
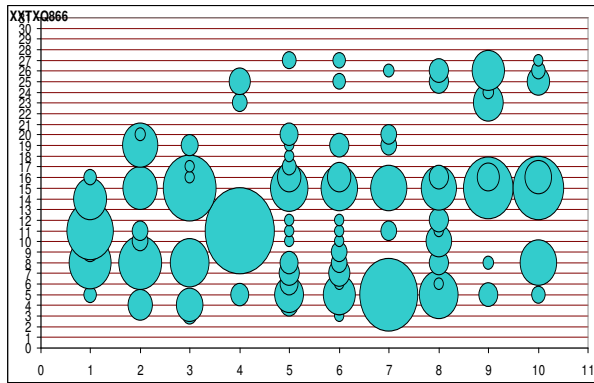


Str 15

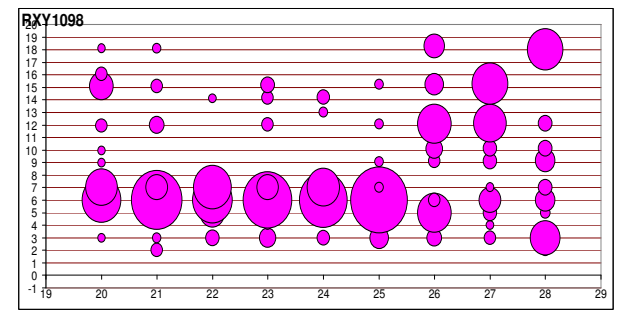
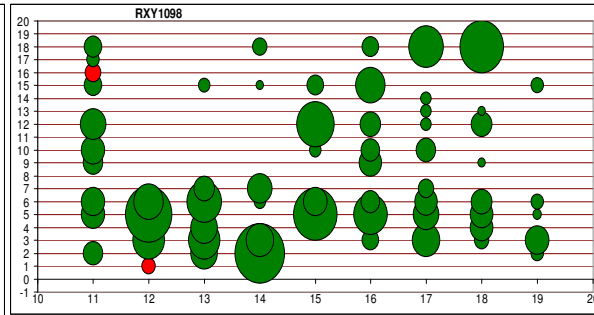
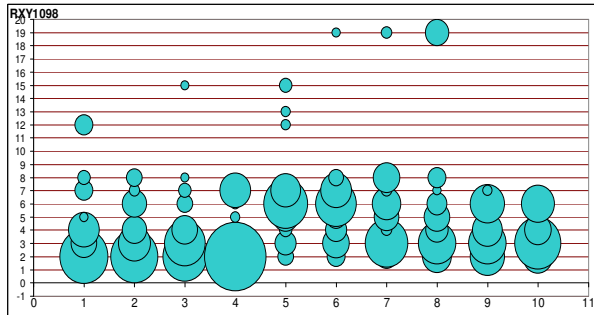
Str 73

Str 60

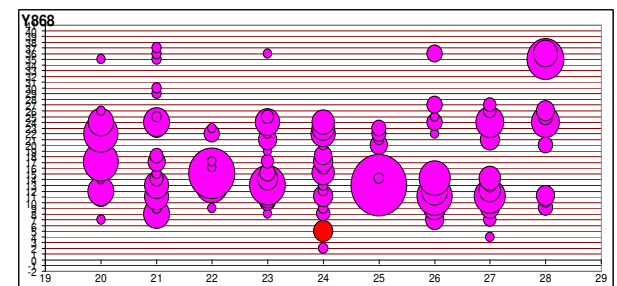
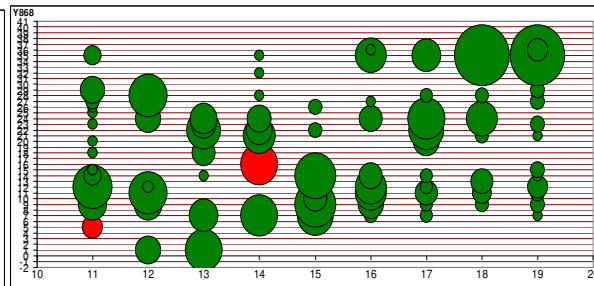
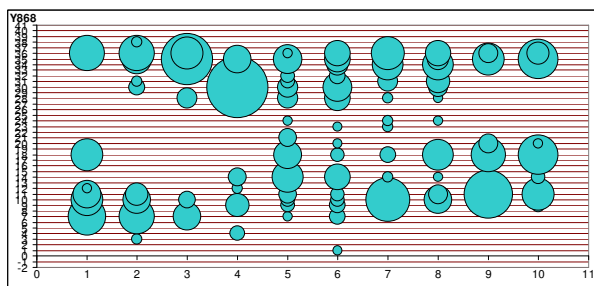
Ssa 197



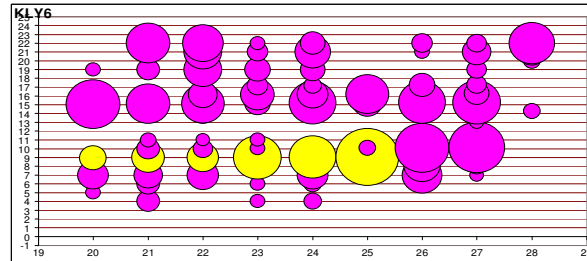
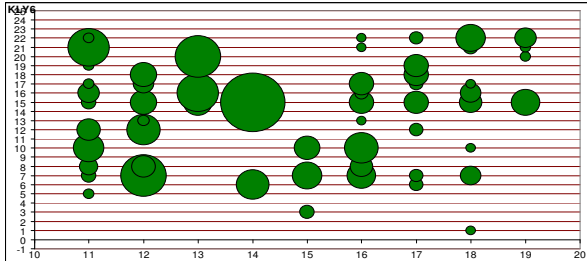
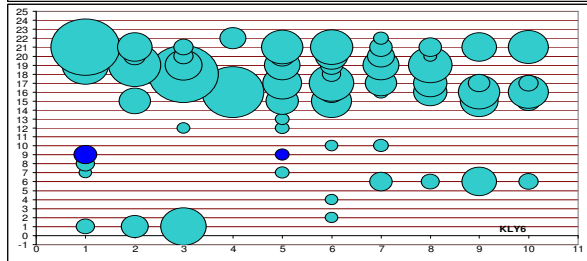
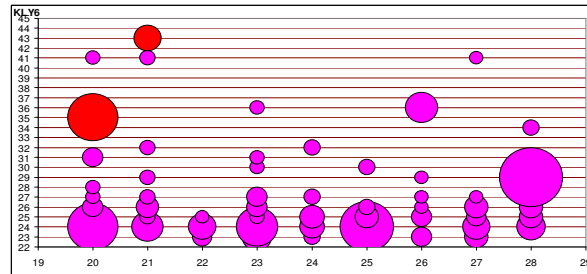
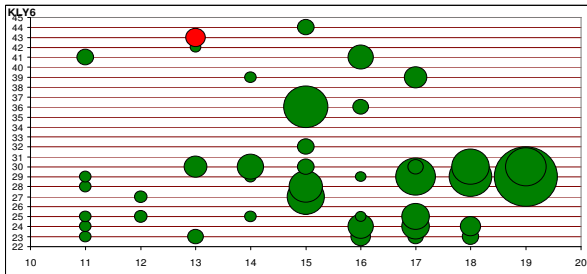
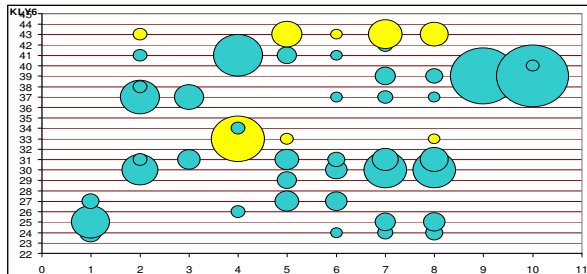
SSOSL 311



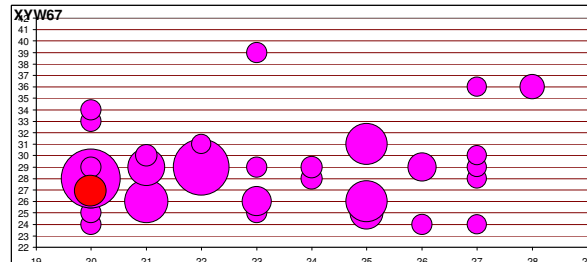
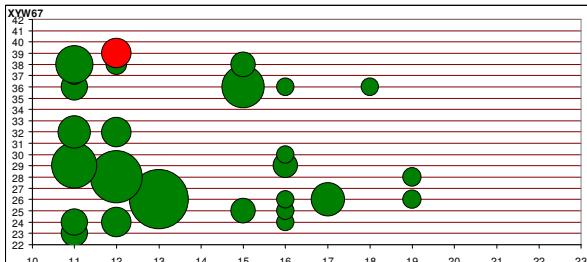
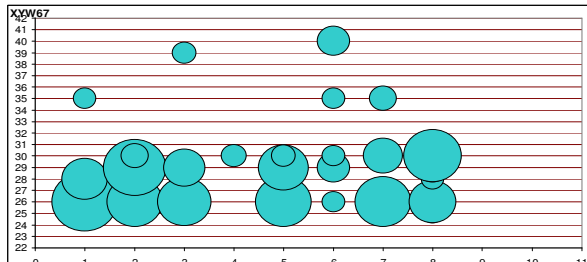
Ssa 543



T3-13



FGT_1



Str 12

