

ETAT D'AVANCEMENT POUR L'ACTIVITÉ DÉFINITION DES STOCKS (WP1)

Eva García-Isarch, Montse Pérez, Carolina Acosta-Díaz, Mar González, Jorge Landa et Eli Muñoz
Instituto Español de Oceanografía (IEO)

Et les équipes des échantillonneurs de:

Institut Mauritanien de Recherches Océanographiques et de Pêches (IMROP)

Centre de Recherche Océographique Dakar-Thiaroye, Sénégal (CRODT)

The Gambia Fisheries Department (FD)

Centro de Investigação Pesqueira Aplicada (CIPA)

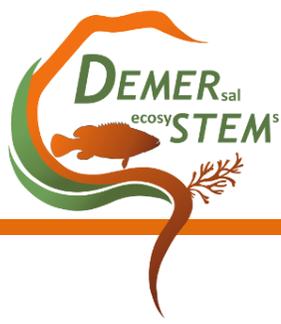
Centre National des Sciences Halieutiques de Boussoura (CNSHB)

Centre de Recherches Océanologiques (CRO)

Fisheries Commission of Ghana



INDEX



I. INTRODUCTION DE L'ACTIVITÉ DÉFINITION DES STOCKS (WP1)

- ÉTUDES DE CAS
- TÂCHES

II. MÉTHODE

- SOURCES DES ÉCHANTILLONS
- ESPÈCES ET ZONES D'ÉCHANTILLONAGES

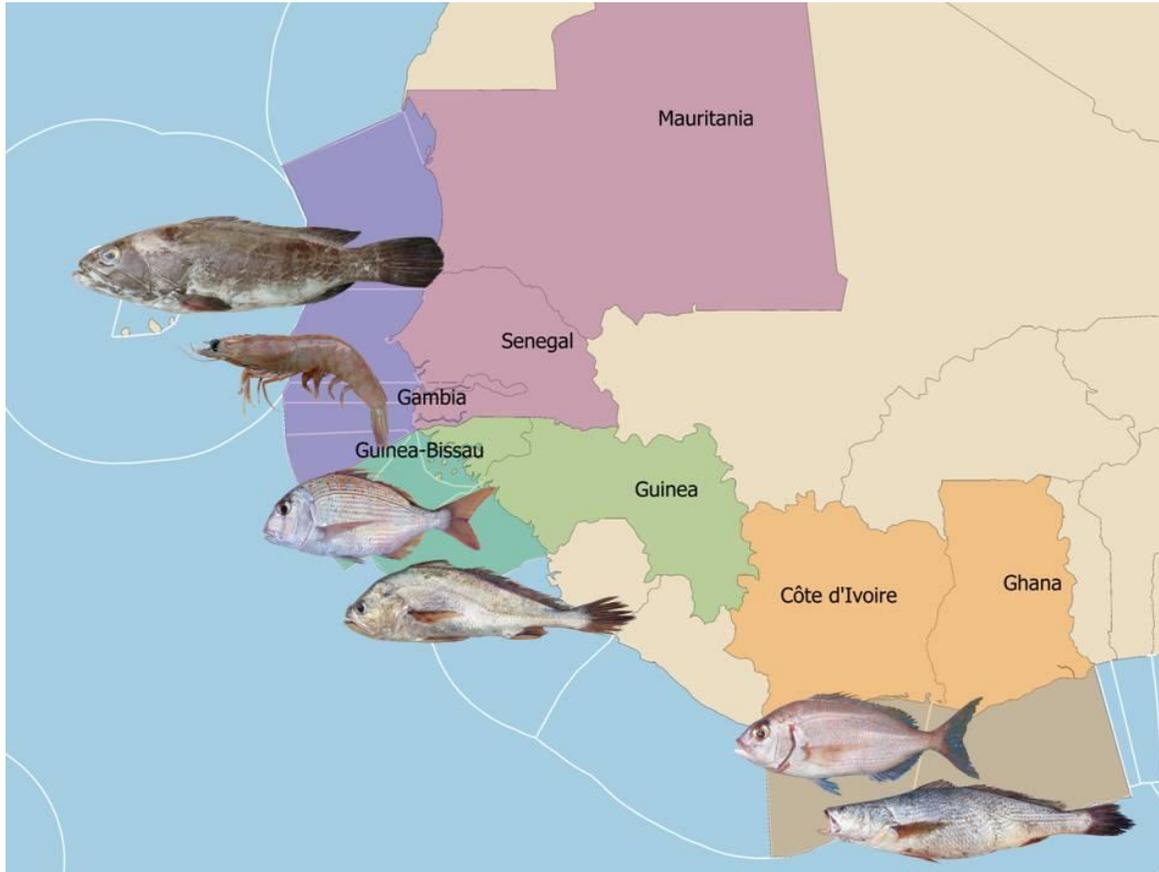
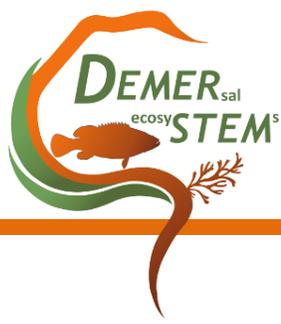
III. ETAT D'AVANCEMENT POUR LA GÉNÉTIQUE

- GÉNOTYPAGE
- SÉQUENÇAGE

IV. ETAT D'AVANCEMENT POUR LA MORPHOMÉTRIE

- ACTIVITÉS MORPHOMÉTRIE_ TRUSS NETWORK
- PRISE DES MESURES POUR LA MORPHOMÉTRIE
- MESURES EFFECTUÉES
- ANALYSE DE DONNÉES
- ACTIVITÉS MORPHOMÉTRIE_ OTOLITHES (CONTOURS)

I- INTRODUCTION Études de cas WP 1



Les stocks sélectionnés correspondent à un ou plusieurs des critères suivants :

- ◆ Stock partagé
- ◆ Espèce d'importance commerciale
- ◆ Espèce emblématique pour les pêcheries artisanales
- ◆ Espèce d'importance pour les flottilles européennes
- ◆ Espèce avec des nourriceries côtières (lien avec WP2)

Identification des stocks

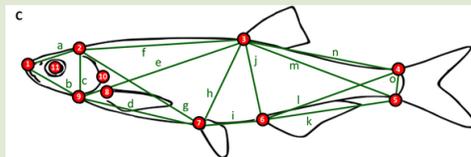
Génétique

- Etude de la structure génétique des populations pour identifier les limites géographiques des stocks à l'aide des marqueurs microsatellite



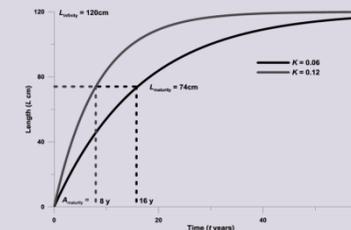
Morphométrie

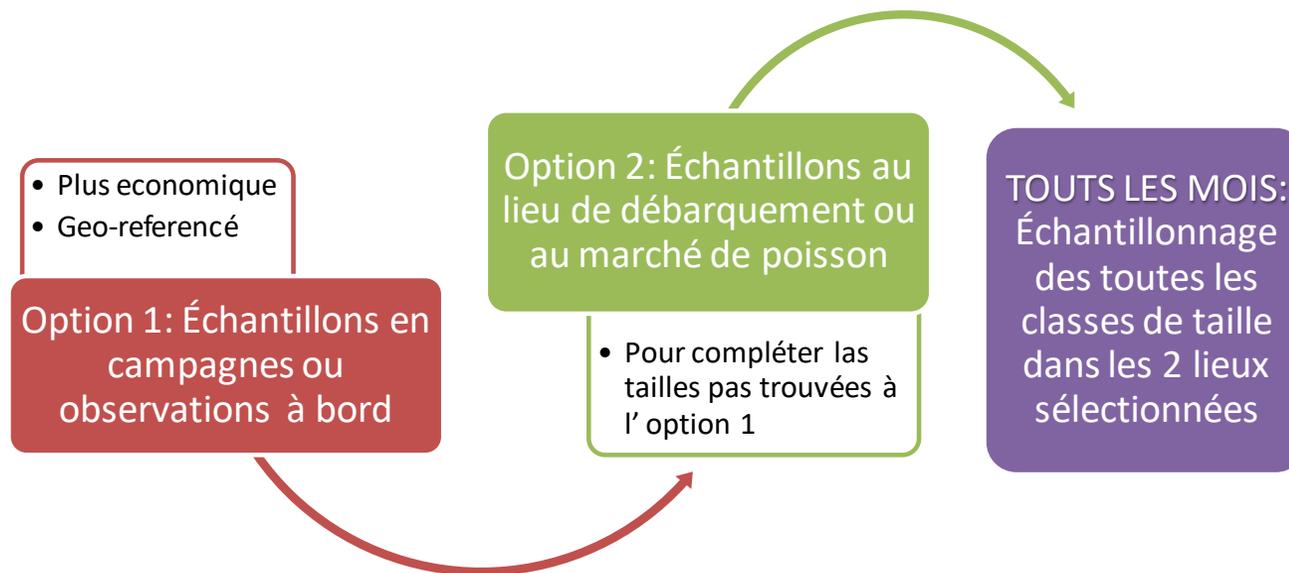
- Analyses basées sur des mesures morphométriques de l'espèce.



Traits d'histoire de vie

- Croissance, mortalité, recrutement, reproduction et distribution





Utilisation des campagnes et /ou les embarquements des observateurs à bord pour effectuer des échantillonnages des 6 ESPÈCES, si capturées, toujours avec des **informations géo-référencées**, au moins pour :

- Paramètres biologiques (BIO)
- La génétique (GEN)
- Images pour morphométrie (MOR)

II- MÉTHODE

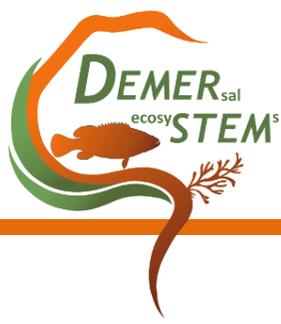
Espèces et zones d'échantillonnage



PAYS	ESPÈCES	SITES D'ÉCHANTILLONAGE
MAURITANIE	<i>Penaeus notialis</i>	Nouadhibou
	<i>Epinephelus aeneus</i>	Nouakchott
SÉNÉGAL-GAMBIE	<i>Penaeus notialis</i>	Saint Louis (Fleuve Sénégal)- Port de Dakar
		Saloum -Casamance
		Banjul (Gambie)
	<i>Epinephelus aeneus</i>	Kayar
		Saloum –Casamance
		Banjul (Gambie)
GUINÉE-BISSAU	<i>Penaeus notialis</i>	Cacheu
	<i>Pagrus caeruleostictus</i>	Bissau
		Cacine
	<i>Pseudolithus elongatus</i>	Cacheu
		Cacine
	GUINÉE	<i>Pagrus caeruleostictus</i>
<i>Pseudolithus elongatus</i>		Conakry
CÔTE D'IVOIRE	<i>Pagellus bellottii</i>	Abidjan
	<i>Pseudolithus senegalensis</i>	San Pedro
GHANA	<i>Pagellus bellottii</i>	Tema
	<i>Pseudolithus senegalensis</i>	Takoradi

MAURITANIE ET SÉNÉGAL :

Epinephelus aeneus



1^{ere} période



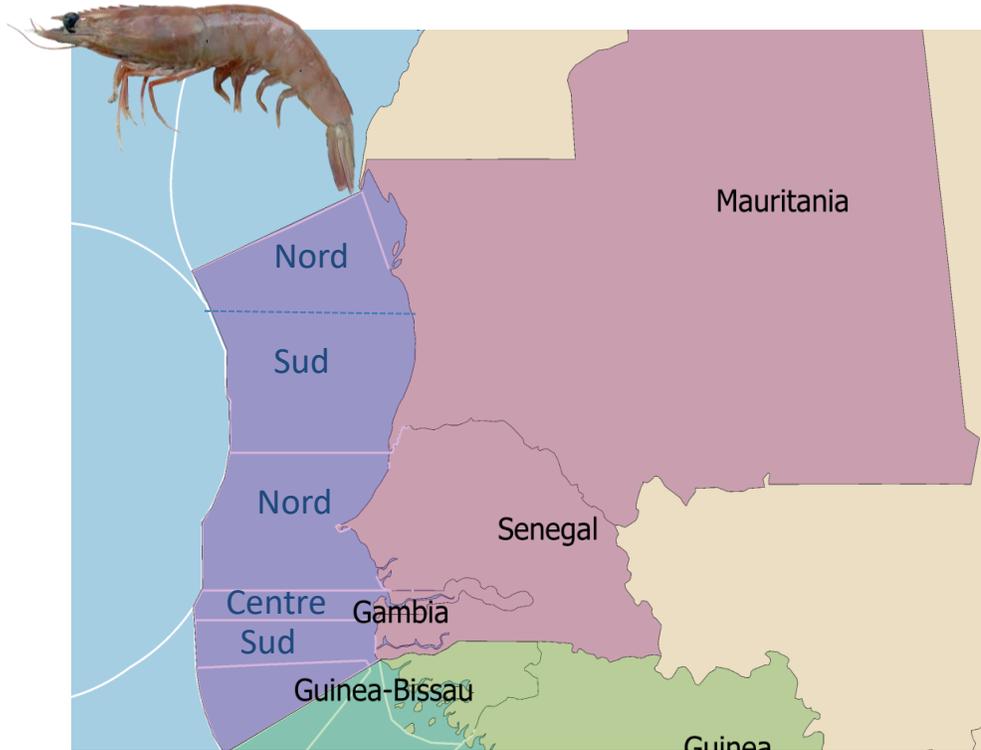
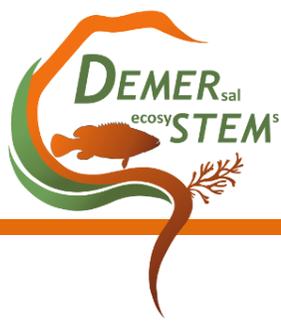
2^{eme} période



PAYS	Zone/ Mois	Fév 20	Mar 20	Avr 20	Mai 20	Juin 20	Juill 20	Août 20	Sep 20	Oct 20	Nov 20	Déc 20	Jan 21
MAURITANIE	Noauadhibou	T BIO- MOR- GEN	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO- MOR- GEN	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO
	Nouakchott	T BIO- MOR- GEN	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO- MOR- GEN	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO
SENEGAL-GAMBIE	Kayar	T BIO- MOR- GEN	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO- MOR- GEN	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO
	Saloum- Casamance	T BIO- MOR- GEN	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO- MOR- GEN	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO
	Gambie	NA											

MAURITANIE, SÉNÉGAL- GAMBIE et G. BISSAU :

Penaeus notialis



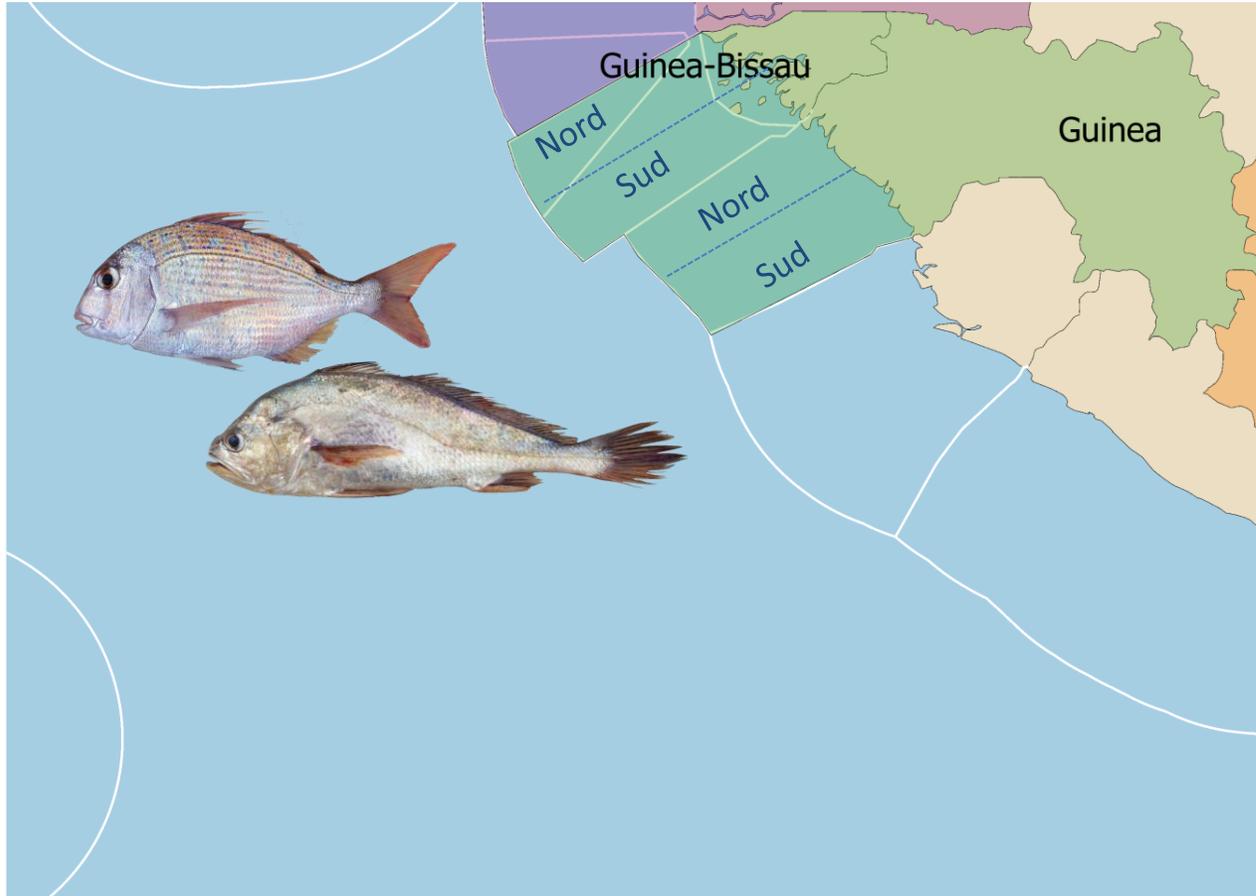
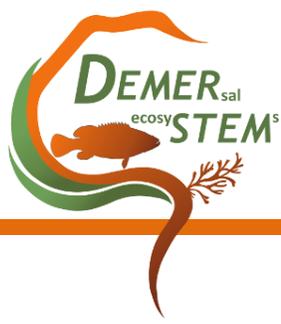
1^{ere} période

2^{eme} période

PAYS	Zone/ Mois	1 ^{ere} période						2 ^{eme} période					
		Mar 20	Avr 20	Mai 20	Juin 20	Juill 20	Août 20	Sep 20	Oct 20	Nov 20	Déc 20	Jan 21	Fév 21
MAURITANIA	North	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO
	South	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO
SENEGAL-GAMBIE	Saint Louis	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO
	Saloum	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO
	Gambie	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO
GUINEA-BISSAU	Cacheu	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO- MOR- GEN	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO

GUINEA-BISSAU – GUINÉE:

Pagrus caeruleostictus et *Pseudotolithus elongatus*



1^{ere} période

2^{eme} période

P. caeruleostictus

PAYS	Zone/ Mois	1 ^{ere} période		2 ^{eme} période											
		Jan 20	Fév 20	Mar 20	Avr 20	Mai 20	Juin 20	Juill 20	Août 20	Sep 20	Oct 20	Nov 20	Déc 20	Jan 21	
GUINEA-BISSAU	Bissau	NA													
	Buba	T BIO-MOR-	T BIO-MOR-	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR-	T BIO-MOR-	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO
GUINEA	Kamsar ou Katchek	T BIO-MOR-	T BIO-MOR-	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR-	T BIO-MOR-	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO
	Conakry	T BIO-MOR-	T BIO-MOR-	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR-	T BIO-MOR-	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO

1^{ere} période

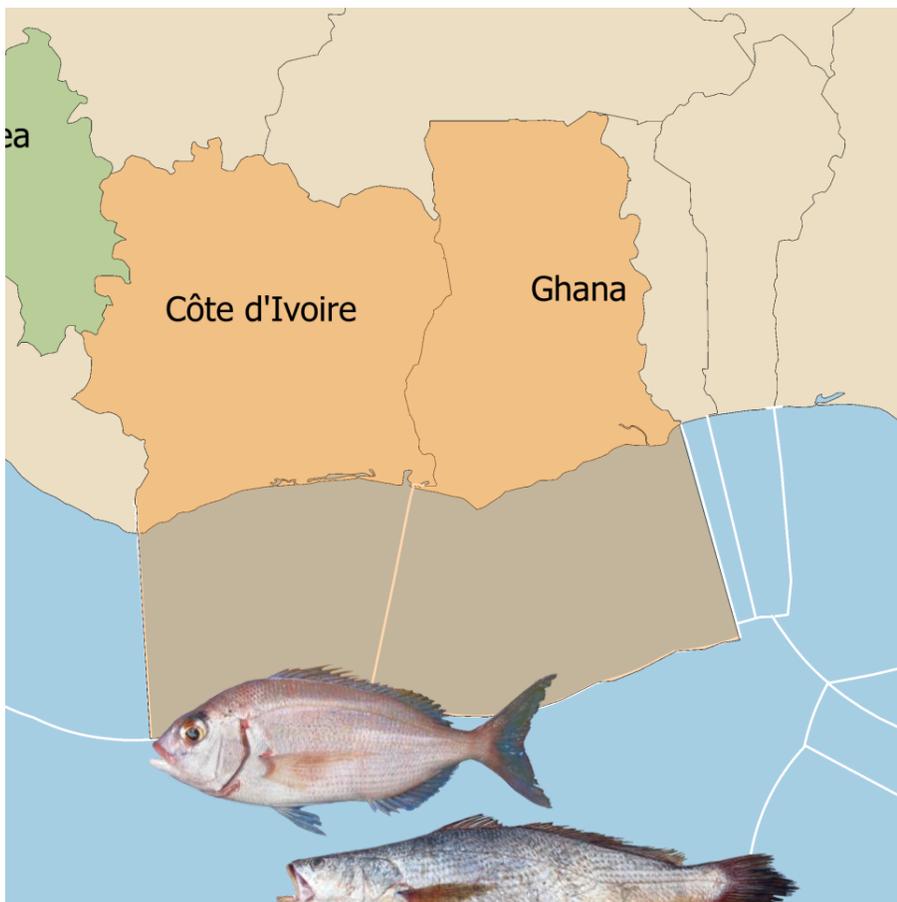
2^{eme} période

P. elongatus

PAYS	Zone/ Mois	1 ^{ere} période			2 ^{eme} période								
		Dec 19	Jan 20	Feb 20	Mar 20	Avr 20	Mai 20	Juin 20	Juill 20	Août 20	Sept 20	Oct 20	Nov 20
GUINEA-BISSAU	Cacheu	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO-MOR						
	Cacine	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO-MOR						
GUINEA	Kamsar ou Katchek	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO-MOR						
	Conakry	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO-MOR						

CÔTE D'IVOIRE – GHANA:

Pagellus bellotii et *Pseudotolithus senegalensis*



Pagellus bellotii

1^{ère} période

2^{ème} période

PAYS	Zone/ Mois	1 ^{ère} période						2 ^{ème} période					
		Mar 20	Apr 20	May 20	Jun 20	Jul 20	Aug 20	Sep 20	Oct 20	Nov 20	Dec 20	Jan 21	Feb 21
CÔTE D'IVOIRE	Abidjan	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO
	San Pedro	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO
GHANA	Tema	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO
	Takoradi	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO

P. senegalensis

1^{ère} période

2^{ème} période

PAYS	Zone/ Mois	1 ^{ère} période						2 ^{ème} période					
		Mar 20	Apr 20	May 20	Jun 20	Jul 20	Aug 20	Sep 20	Oct 20	Nov 20	Dec 20	Jan 21	Feb 21
CÔTE D'IVOIRE	Abidjan	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO
	San Pedro	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO
GHANA	Tema	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO
	Takoradi	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO-MOR	T BIO	T BIO	T BIO	T BIO

DIFFICULTÉS GÉNÉRALES RENCONTRÉES:

- Quelques périodes d'échantillonnage ne sont pas synchronisés entre les pays d'un même cas d'étude .
- Les périodes et les lieux des échantillonnages ne sont pas complets par rapport à ce qui était prévu → besoin de réorganisation des données disponibles.

WP1- Identification des stocks

III. ETAT D'AVANCEMENT POUR LA GÉNÉTIQUE



Montse Pérez et Mar González



1- GÉNOTYPAGE :

Etude de la structure génétique des populations pour identifier les limites géographiques des stocks à l'aide des **marqueurs microsatellite**.

2 espèces sélectionnées →
celles qui sont déjà présentes
dans les bases de données
internationales :

- soit BOLD
- soit Barcode

Epinephelus aeneus



- Mauritanie
- Sénégal

Penaeus notialis



- Mauritanie
- Sénégal + The Gambia
- Guinée-Bissau

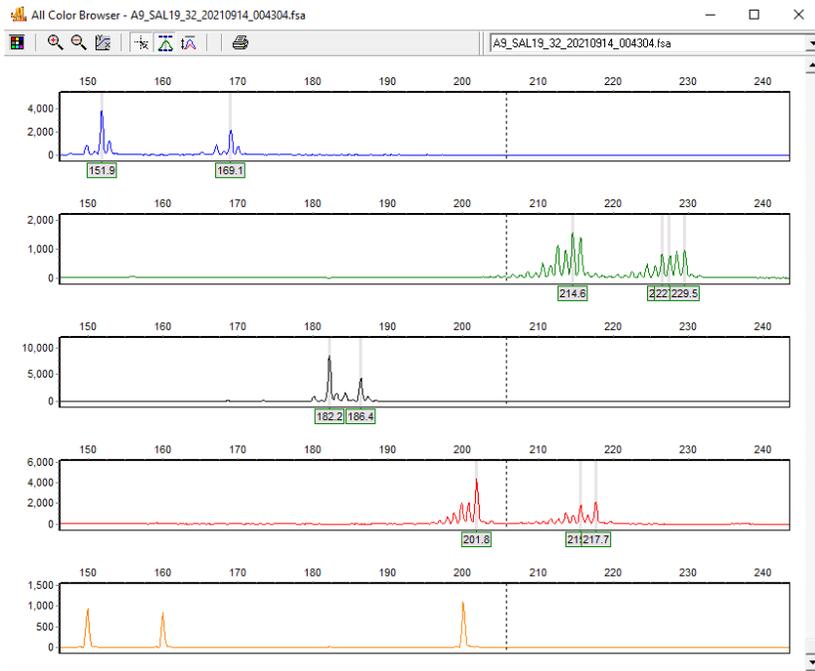
2- SÉQUENÇAGE (Activité Complémentaire) :

Pour les autres espèces qui ne sont pas présentes dans ces bases internationales, un travail préliminaire d'intégration de l'ADN de ces espèces dans les bases de données internationales BOLD du projet *Barcode of life*, est aussi en cours.



1- Génotypage :

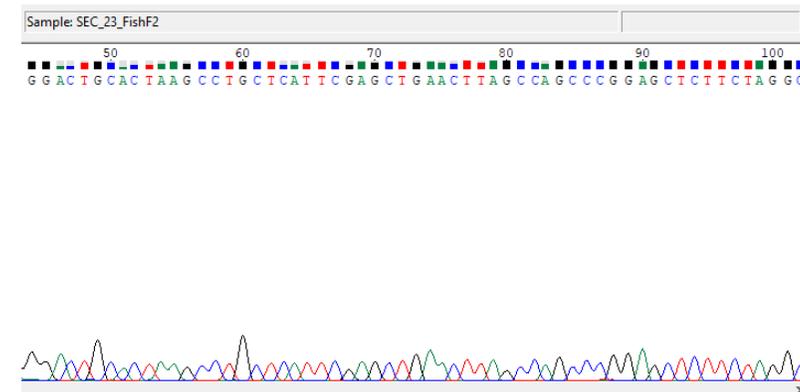
- *Penaeus notialis*
- *Epinephelus aeneus*



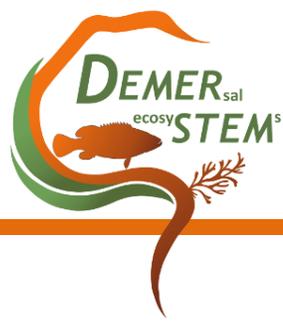
Exemple de PCR multiplex (4 paires de Primers) en *E. aeneus*

2- Séquençage du gène mitochondrial Cytochrome Oxydase I (COI):

- *Pseudolithus senegalensis*
- *Pagellus bellottii*
- *Pagrus coeruleostictus*
- *Pseudolithus typus*



Morceau du séquençage du gène COI de *P. bellottii* (amplifié avec les primers universelles pour les vertébrés FishF2 et FishR2), c'est-à-dire la séquence des bases azotées des nucléotides (Adénine, Guanine, Cytosine et Thymine)



Extraction d'ADN pour le génotypage: *Penaeus notialis*

<i>Penaeus notialis</i>			
Mauritanie			
Zone	Mois	Code	Nombre d'échantillons
LAN	Nov 18	LANCE 183_1-50	50
LAN	Dec 18	LANCE 55_1-5	5
LAN	Dec 18	LAN01, LAN02, etc.	20
LAN	Jan 19	LANCE 70_1-6	6
LAN	Jan 19	LANCE 125_1-9	9
LAN	Jan 19	LANCE 150_1-9	9
NDB	Dec 19	SOP_NDB_26/12/19	33
			132

<i>Penaeus notialis</i>			
Guinée-Bissau			
Zone	Mois	Code	Nombre d'échantillons
ZEE	Nov 19	ZEE_SOP_22/11/19_L1	2
ZEE	Nov 19	ZEE_SOP_22/11/19_L2_1	1
ZEE	Nov 19	ZEE_SOP_22/11/19_L3	18
ZEE	Nov 19	ZEE_SOP_22/11/19_L4	31
ZEE	Nov 19	ZEE_SOP_22/11/19_L5	20
ZEE	Nov 19	ZEE_SOP_22/11/19_L6	11
ZEE	Nov 19	ZEE_SOP_22/11/19_L7	3
ZEE	Nov 19	ZEE_SOP_22/11/19_L8_7	1
ZEE	Dec 19	ZEE_SOP_08/12/19	48
			135

<i>Penaeus notialis</i>			
Sénégal			
Zone	Mois	Code	Nombre d'échantillons
CAS	Sep 19	SOP_CAS_29/09/19	5
SLO	Oct 19	SOP_SLO_04/10/19_st.29	25
SLO	Oct 19	SOP_SLO_st.31	10
			40



L'extraction d'ADN à partir de tissus conservés dans l'éthanol a été réalisée avec un kit ADN très spécifique en raison de élevée contenu en graisse de la crevette.



Accession n°	Locus	F	R	Bibliographie
AJ270749	PnS01	F-5' TGCTGTTTGTGAGTCTT	R-5' TGGCATGTTGCAGACAGTCC	Robainas-Barcia et al. (2002)
AJ270753	PnS03	F-5' TGCTAA ATAAAAGTTTCTCGGTGAG	R-5' AAGCTTGTATTTGCGTGTCG	Robainas-Barcia et al. (2002)
AJ270746	PnS04	F-5' CGATTTGCAGAACCCGTTTA	R-5' GGGGGAGGGGTTAGAAAGAG	Robainas-Barcia et al. (2002)
AJ270758	PnS18	F-5' GTCTTATCAAAACCCAAAGG	R-5' GAACAGTCCC GCCCTCTGC	Robainas-Barcia et al. (2007)
AJ427857	PnS20	F-5' CTTCCATATTCGCATGATGG	R-5' ACCCGGGATCAAGCCCTTGC	Robainas-Barcia et al. (2007)

- 1) **Tests PCR avec des primers individuellement** (avec différentes conditions (T, t, concentrations des réactives))
- 2) **Génotypage** avec le séquenceur capillaire ABI3130
- 3) **Analyse des résultats** du processus pour vérifier que l'amplification est correcte et que un signal correct a été obtenu après le génotypage
- 4) **Tests PCR multiplex** (en une seule réaction on peut mettre les 5 paires de primers) = 307 réactions PCR
- 5) PCR multiplex avec **tous les échantillons**
- 6) **Génotypage et analyse des résultats**



Pour éviter 307 x 5 paires primers → 1535 PCRs individuelles (il prends beaucoup de temps et des réactives)

Problèmes avec les primers PnS03 et PnS20 dans certains échantillons. Primers alternatives seront recherchées



Extraction d'ADN pour le génotypage: *Epinephelus aeneus*

<i>Epinephelus aeneus</i>			
Mauritanie			
Zone	Mois	Code	Nombre d'échantillons
NKC	Août 19	GPW_NKC_30/08/19	9
NDB	Dec 19	GPW_NDB_12/19	17
NDB	Jan 20	GPW_NDB_01/2020	2
			28

<i>Epinephelus aeneus</i>			
Sénégal			
Zone	Mois	Code	Nombre d'échantillons
KAY	Dec 19	GPW_KAY_05/12/19	37
SAL	Dec 19	GPW_SAL_28/12/19	47
NKI	Jan 20	GPW_NKI_23/01/20	10
			94

NZY Tissue gDNA Isolation Kit



QIAamp DNA Mini Kit



Pour le thiof, l'extraction d'ADN a été effectuée avec des kits d'extraction d'ADN typiques à partir de tissus.





Marcador	F	R	Bibliographie
ARO1003	GTGCAAGGCAAGCTGTGTTA	AGCAGGCATCTTGTTATCTGG	Dor et al., 2014
ARO1045	CACGAAGTATTTGGCTGAT	GAGAAAGTGGCAATATTTGAC	Dor et al., 2014
ARO1083	CCGGTCTTCTTCTCTCCC	TTACTGTTGATTGAGTTGTTGT	Dor et al., 2014
ARO1084	GGGTTTATTTCAAAGGTCAG	CCCAATGAGGTGTTCAATAT	Dor et al., 2014
ARO1105	GATAGCTTACATGCACTCA	CTGAACCTCACCTGAAA	Dor et al., 2014
ARO1120	CTCTGATGCTGTTACACAAC	TCTCCATCGAAGGTAAAGG	Dor et al., 2014
ARO1131	GTGTGTCAGAGGTGGGTT	TGAATTTCACTGCATGTTTC	Dor et al., 2014
ARO1137	ATGGGTATAATTAGGACACACT	AGGAAAGGAGGGAGGAAA	Dor et al., 2014



- 1) Tests PCR avec des primers individuellement
- 2) Génotypage avec le séquenceur capillaire ABI3130
- 3) Analyse des résultats
- 4) Tests PCR multiplex avec différentes conditions:
2 PCR multiplex (de 4 primers quelque une) ont été teste





Un fragment du gène mitochondrial **Cytochrome Oxydase I (COI)** sera séquencé pour alimenter la base de données BOLD du projet Barcode of life.

*« Aujourd'hui, le développement de la biologie moléculaire a permis de contribuer à cet objectif et depuis plusieurs décennies un projet sur le Code-barres de la vie (**Barcode of Life**), est mené, comme une initiative mondiale qui vise à inventorier la biodiversité de la planète. Il s'agit d'un outil qui facilite et accélère les travaux menés par la taxonomie conventionnelle basée sur les caractères morphologiques, occupe une position intermédiaire entre les études conventionnelles de phylogénie moléculaire et de génétique des populations. Cette technique suggère qu'un fragment standard de 648 pb de la région du gène mitochondrial de la cytochrome c oxydase I (COI) sert comme une code-barres pour l'identification des espèces animales » (Daza, 2018).*



Extraction d'ADN pour le séquençage: *Pseudotolithus senegalensis* et *Pagellus bellottii*

<i>Pseudotolithus senegalensis</i>			
Ghana			
Zone	Mois	Code	Nombre d'échantillons
TEM	Oct 19	PSS_TEM_17/10/19	13
TAD	Oct 19	PSS_TAD_19/10/19	10
			23



<i>Pagellus bellottii</i>			
Ghana			
Zone	Mois	Code	Nombre d'échantillons
TAD	Dec 19	PAR_TAD_04/12/19	13
TEM	Dec 19	PAR_TEM_30/12/19	10
			23



NZY Tissue gDNA Isolation Kit

Critère de qualité	
Concentration (ng/μL)	ABS260/ABS280
> 20	1,7- 2



Pour les deux espèces, l'extraction d'ADN sont été effectuée avec des kits d'extraction d'ADN typiques à partir de tissus pour le séquençage ultérieur .



Un fragment du gène mitochondrial *Cytochrome Oxydase I (COI)* séquencé pour alimenter la base de données **BOLD** du projet **Barcode of life**.

Pas de problème avec le gène COI de *Pagellus bellottii* avec les primers

- FishF2 et
- FishR2



Nous allons essayer de séquencer les espèces de poissons restantes, en utilisant le tissu organique disponible (ex : celui qui recouvre les otolithes extraits dans les échantillonnages).

Pour *Pseudotolithus senegalensis* n'est pas possible d'amplifier le gène COI ni le gène du Cytochrome b



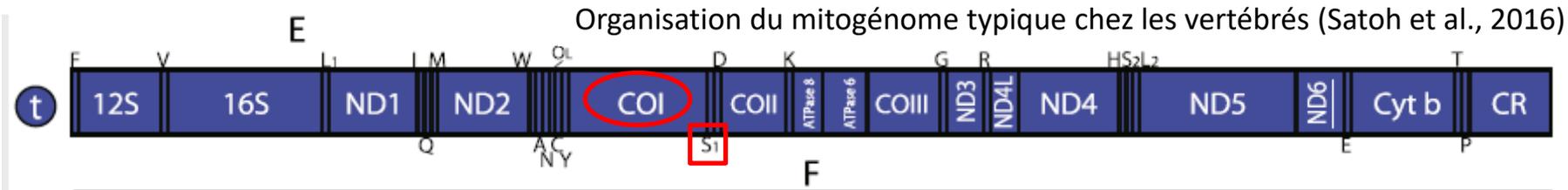
Réorganisation des gènes mitochondriaux?



Séquençage du mitogénome de *P. senegalensis*



Le mitogénome de *Pseudotolithus senegalensis* est séquencé et une réorganisation des gènes mitochondriaux est observée chez cette espèce



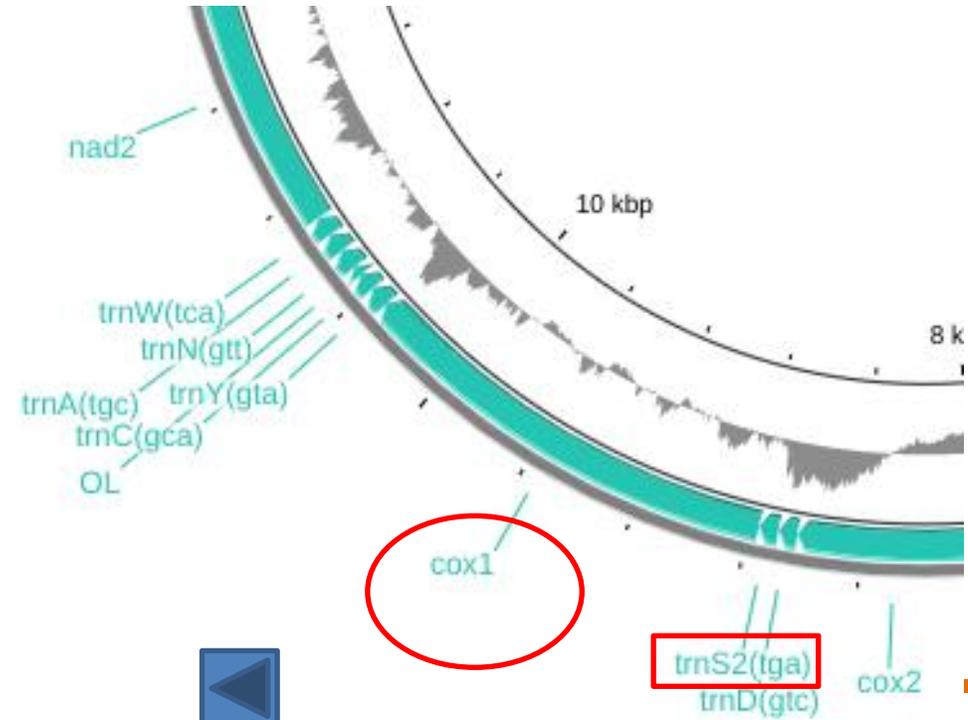
Les primers universelles FishF2 et FishR2 utilisées pour l'amplification du gène COI ont été conçues sur la base des régions flanquantes du gène COI.

Pour *P. senegalensis*, aucune amplification n'a été obtenue.

En effet, à droite du gène COI au lieu que le gène S1 apparaisse, le gène S2 → une des les primers ne peut pas sonner et s'amplifier.



Une reorganisation du mitogénome de *P. senegalensis* est envisagée





Travail en attente

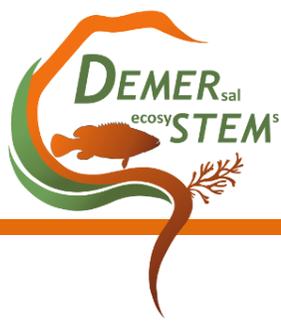
- Revue des génotypages multiplex de *P. notialis* et *E. aeneus* pour une éventuelle répétition de certains échantillons/primers.
- Réalisation du deuxième multiplex PCR pour *E. aeneus* avec les 4 paires de primers restants.
- Analyse des données après lecture du génotypage.
- Extraction d'ADN, PCR multiplex et génotypage des échantillons de la deuxième période d'échantillonnage.
- Analyse ultérieure des données après lecture du génotypage.

WP1 – Tasks

1.1 Amélioration de l'accessibilité aux données.

1.2 Identification des stocks

1.3 Evaluation des stocks



Identification des stocks

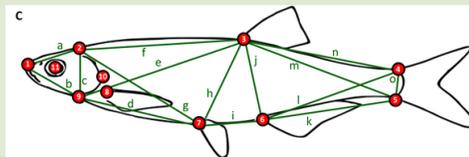
Génétique

- 2 espèces.
- Etude de la structure génétique des populations pour identifier les limites géographiques des stocks à l'aide des marqueurs microsatellite



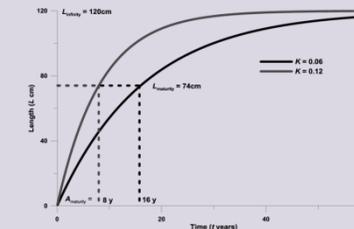
Morphométrie

- Analyses basées sur des mesures morphométriques de l'espèce.



Traits d'histoire de vie

- Croissance, mortalité, recrutement, reproduction et distribution



Travail en course...

VOIR PPT "DÉFINITION DES STOCKS_IV-Morphométrie_IEO"