



**HAL**  
open science

**2022. Etude de faisabilité “ Détermination de l’origine natale des aloses de Méditerranée (Alosa agone) par la géochimie des otolithes. ” Phase 3: essais d’assignation des otolithes d’alosos et d’aloses adultes à leur rivière d’origine Note technique**

Alexandre Richard, Gilles Bareille, Matthias Vignon

► **To cite this version:**

Alexandre Richard, Gilles Bareille, Matthias Vignon. 2022. Etude de faisabilité “ Détermination de l’origine natale des aloses de Méditerranée (Alosa agone) par la géochimie des otolithes. ” Phase 3: essais d’assignation des otolithes d’alosos et d’aloses adultes à leur rivière d’origine Note technique. Scimabio Interface; IPREM UMR5254 CNRS/UPPA - Institut des Sciences analytiques et de physico-chimie pour l’Environnement et les matériaux; INRAE ECOBIOP - Saint-Pée-sur-Nivelle. 2022. hal-04449613

**HAL Id: hal-04449613**

**<https://univ-pau.hal.science/hal-04449613>**

Submitted on 9 Feb 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

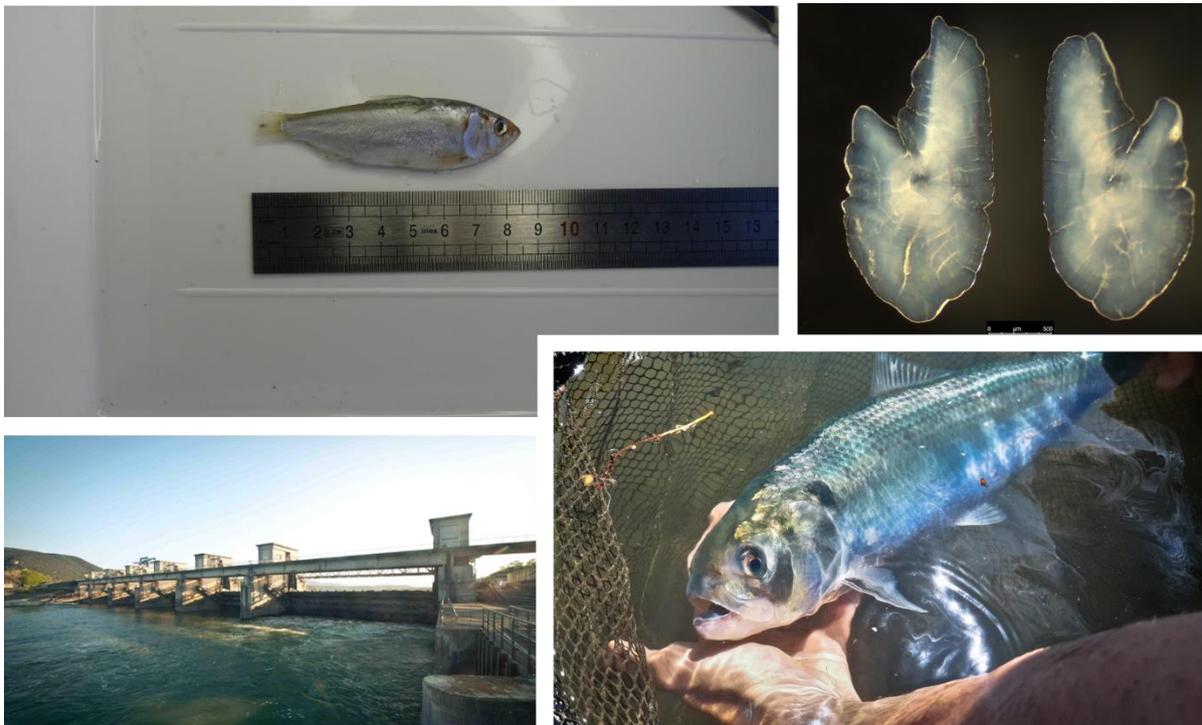
**Etude de faisabilité « Détermination de l'origine natale des aloses de Méditerranée (*Alosa agone*) par la géochimie des otolithes. »**

Phase 3 : essais d'assignation des otolithes d'alosons et d'aloses adultes à leur rivière d'origine

**Note technique**

**Richard A., Bareille G., Vignon M., 2022**

**Association Migrateurs Rhône-Méditerranée**



**Octobre 2022**

**En collaboration avec :**



Citation : RICHARD A., BAREILLE G., VIGNON M. 2022. Etude de faisabilité « Détermination de l'origine natale des aloses de Méditerranée (*Alosa agone*) par la géochimie des otolithes ». Phase 3 : essais d'assignation des otolithes d'alosons et d'aloses adultes à leur rivière d'origine. 22p.

## SOMMAIRE

1	Contexte et rappel des premiers résultats.....	4
2	Objectifs .....	4
3	Prélèvements et analyses.....	5
3.1	Sites d'échantillonnage .....	5
3.2	Extraction des otolithes et préparation .....	6
3.3	Analyses chimiques .....	7
3.4	Analyses statistiques .....	8
4	RESULTATS - INTERPRETATIONS.....	8
4.1	Analyses chimiques des otolithes d'alosons .....	8
4.1.1	Exemples de profils élémentaires .....	8
4.1.2	Résultats des analyses chimiques .....	9
4.1.3	Relation eau - otolithe.....	10
4.2	Assignation des alosons à leur rivière d'origine.....	11
4.2.1	Représentation des analyses microchimiques par rivière.....	11
4.2.2	Variabilité intra-individuelle.....	14
4.2.3	Variabilité temporelle des signatures .....	15
4.2.4	Analyse discriminante par Random Forest.....	16
4.3	Origine natale des aloses adultes.....	17
4.3.1	Résultat des analyses .....	17
4.3.2	Comparaison des signatures des aloses avec celles des alosons.....	18
4.3.3	Essai d'assignation des aloses adultes .....	19
5	DISCUSSION.....	20
6	Références.....	21
7	Annexes .....	22

## Liste des figures

Figure 1 : Extraction des otolithes dans une tête d'aloseon (à gauche) et photographie de 2 otolithes dans l'éthanol (à droite).....	6
Figure 2: Exemple de profil d'otolithe d'aloseons montrant la partie de l'otolithe retenue pour l'analyse.....	7
Figure 3 : Profils des otolithes d'aloseons prélevés sur l'Ardèche et l'Aude. Les ratios élémentaires Ba/Ca, Sr/Ca et Sr/Ba sont présentés pour tous les otolithes analysés.....	9
Figure 4 : Relations eau-otolithes des ratios élémentaires.....	11
Figure 5 : Ordination (NMDS) avec données standardisés [0-1] des différents ratios élémentaires du Ba :Ca (Baryum sur Calcium), du Sr :Ba (Strontium sur Baryum), et du Sr :Ca (Strontium sur Calcium) pour les 41 otolithes d'aloseons analysés, provenant de 7 cours d'eau du bassin RMC.....	12
Figure 6 : Gradients des trois ratios élémentaires dans le plan de l'analyse d'ordination NMDS avec données standardisées [0-1]. Isolignes + ordination de la figure 5. ....	13
Figure 7 : Mise en évidence de la variabilité intra-individuelle (segment entre les 2 otolithes d'un même individu) .....	14
Figure 8 : Mise en évidence de la variabilité temporelle, notamment pour l'Ardèche (en rouge), échantillonnée en 2019 et 2021.....	15
Figure 9 : Projection des adultes en ordination NMDS sur données standardisées [0-1]. Les triangles et polygones représentent les aloseons. Les points représentent les aloses adultes en fonction de leur lieu de capture.....	18
Figure 10 : Projection des signatures extrapolées dans les otolithes à partir de l'eau (rectangles) pour 10 rivières dans lesquelles des aloseons n'ont pas été prélevés. L'ordination grisée (NMDS sur données standardisées [0-1]) reprend les composantes déjà illustrées dans les figures précédentes.....	19

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Détails des aloseons capturés en 2021 (données MRM) .....	5
Tableau 2 : Répartition des aloseons prélevés en 2019 et 2021.....	6
Tableau 3 : Synthèse des résultats des ratios élémentaires. Les cellules grisées groupées par paires indiquent 2 otolithes analysés pour un même individu.....	10
Tableau 4 : Matrice de confusion (avec erreur de classification par regroupement).....	16

## 1 Contexte et rappel des premiers résultats

La présente note technique fait suite aux deux premières phases d'étude réalisées en 2019 et 2021 (Richard et Bareille, 2020, 2021). La phase I a consisté à analyser et comparer la composition chimique élémentaire et isotopique des eaux des principaux cours d'eau dans lesquels la reproduction naturelle de l'alose de Méditerranée est avérée ou fortement suspectée. Des prélèvements d'eau avaient été réalisés dans 16 cours d'eau : le Rhône et ses 7 principaux affluents en aval de Valence (du nord au sud : Eyrieux, Drôme, Ardèche, Cèze, Ouvèze, Durance, Gardon), ainsi que 8 fleuves côtiers (d'ouest en est : Tech, Têt, Agly, Aude, Orb, Hérault, Vidourle, Argens). Dans la phase 2, la microchimie des otolithes d'alosons capturés dans 4 de ces cours d'eau (2 affluents du Rhône et 2 fleuves côtiers) a été analysée, et des premières tendances de discrimination de ces cours d'eau ont été dégagées.

Les premières analyses effectuées sur l'eau avaient indiqué la possibilité de différencier des rivières ou groupes de rivières, en couplant les différents marqueurs Sr:Ca, Sr:Ba, Ba:Ca et  $^{87}\text{Sr}:^{86}\text{Sr}$ . Sur la base d'une analyse ponctuelle d'eau, plusieurs cours d'eau étaient potentiellement différenciables les uns des autres (Têt, Tech, Argens, Durance, Drôme, Eyrieux), ce qui a laissé présager la possibilité de déterminer avec un faible taux d'erreur l'origine natale des juvéniles (alosos) provenant de ceux-ci. D'autres cours d'eau ont en revanche présenté des signatures chimiques très proches (ex : Ardèche-Hérault), ce qui préfigurait la faible probabilité d'attribuer une origine unique à certains juvéniles mais plutôt une assignation à un groupe de rivières.

Au cours de la seconde phase de cette étude, les analyses microchimiques réalisées sur les otolithes d'alosons collectés au cours de l'été 2020 dans quatre rivières (Hérault, Ardèche, Durance, Vidourle) ont montré des résultats très cohérents avec ceux obtenus sur l'eau. Les positionnements respectifs des cours d'eau sont restés similaires, avec toutefois une importante variabilité inter-individus constatée pour la Durance et dans une moindre mesure pour l'Hérault, probablement explicable par des lieux de reproduction hétérogènes au sein du bassin versant. La discrimination des 4 cours d'eau semblait assez nette en 3 groupes : un groupe 'Ardèche-Hérault', le Vidourle d'autre part, et enfin la Durance.

Cette troisième phase d'étude vise d'abord à étoffer l'échantillon d'alosos analysés, en diversifiant les rivières d'origine d'une part, et en prélevant davantage d'individus sur les cours d'eau déjà échantillonnés. En outre, des aloses adultes ont été échantillonnées et des premiers essais d'assignation de leur origine natale seront menés, sous condition que les échantillons d'alosos soient suffisamment représentatifs de la diversité des affluents où la reproduction de l'alose s'opère.

## 2 Objectifs

Les objectifs de cette troisième phase sont les suivants :

1. **Analyser la composition chimique élémentaire et isotopique d'un nouvel échantillon d'otolithes d'alosos** provenant de cours d'eau dont l'eau a été précédemment analysée (en phase I), et **d'un échantillon d'alosos additionnel prélevé sur les 4 cours d'eau étudiés en phase II** ;

2. Analyser cette même composition élémentaire et isotopique sur un échantillon d'aloses adultes provenant de captures en mer ou de captures dans les cours d'eau caractérisés en phase I ;
3. Générer un modèle d'assignation des alosons à leur rivière d'origine (ou groupe de rivières) puis essayer de caractériser les origines natales des alosons adultes sur la base des données microchimiques disponibles.

### 3 Prélèvements et analyses

#### 3.1 Sites d'échantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés par MRM entre août et novembre 2021 dans 3 affluents du Rhône (l'Ardèche, la Cèze, la roubine des Grande Cabanes) et un fleuve côtier (l'Aude). Un total de 20 individus a été échantillonné : 8 alosons dans l'Aude, 7 dans l'Ardèche, 3 dans la Cèze et 2 dans la roubine des Grandes Cabanes.

Tableau 1 : Détails des alosons capturés en 2021 (données MRM)

Code poisson	Date capture	Cours d'eau	Lieu de captures	LT (mm)	LF (mm)	Nb otolithes
21_ARD_01	24/08/2021	Ardèche	Piboulette	132		1
21_ARD_02	24/08/2021	Ardèche	Piboulette	82	74	2
21_ARD_03	24/08/2021	Ardèche	Piboulette	118	105	2
21_ARD_04	19/08/2021	Ardèche	Piboulette	118	107	2
21_ARD_05	19/08/2021	Ardèche	Piboulette	105	96	2
21_ARD_06	19/08/2021	Ardèche	Piboulette	79	72	2
21_ARD_07	19/08/2021	Ardèche	Piboulette	117	100	1
21_RCE_01	12/08/2021	Cèze	Confluence Rhône Cèze	115	100	2
21_RCE_02	12/08/2021	Cèze	Confluence Rhône Cèze	113	99	2
21_RCE_03	12/08/2021	Cèze	Confluence Rhône Cèze	110	96	2
21_VAC_01	04/10/2021	Roubine Grande Cabanes	Vaccarès	140	125	2
21_VAC_02	04/10/2021	Roubine Grande Cabanes	Vaccarès			2
21_AUD_02 A	11/2021	Aude	aval barrage anti sel		97	2
21_AUD_07 A	11/2021	Aude	aval barrage anti sel		103	2
21_AUD_03 A	11/2021	Aude	aval barrage anti sel		102	1
21_AUD_04 A	11/2021	Aude	aval barrage anti sel		73	2
21_AUD_05 A	11/2021	Aude	aval barrage anti sel		100	2
21_AUD_06 A	11/2021	Aude	aval barrage anti sel		95	2
21_AUD_08 A	11/2021	Aude	Sallele d'Aude Canal	120	102	2
21_AUD_01 A	11/2021	Aude	aval barrage anti sel		102	1

Cet échantillon 2021 vient compléter les 20 alosons déjà prélevés dans 4 cours d'eau et analysés en 2019 (voir Annexe 1). Seul l'Ardèche a fait l'objet de prélèvements sur les deux années. Ainsi, **l'effectif total analysé sur les 2 années est de 40 alosons répartis sur 7 cours d'eau** (Tableau 2).

Tableau 2 : Répartition des alosons prélevés en 2019 et 2021

Cours d'eau	Année	Date	Site	Nb alosons analysés		
				Total	2 otolithes	1 otolithe
Ardèche	2019	22/08/2019	Sauze	2	1	1
	2021	19-24/08/2021	Piboulette	7	3	4
Aude	2021	11/2021	Aval barrage anti-sel	8	4	4
Cèze	2021	12/08/2021	Confluence Rhône	3	2	1
Durance	2019	08/08/2019	Callet	7	2	5
Hérault	2019	14/08/2019	St Thibéry	8		8
Roubine du Vaccarès	2021	04/10/2021	Vaccarès	2	2	
Vidourle	2019	02/09/2019	Marsillargues	3		3
<b>Total</b>				<b>40</b>	<b>14</b>	<b>26</b>

### 3.2 Extraction des otolithes et préparation

Les extractions des otolithes ont été réalisées par MRM fin 2021 (Figure 1). Les 2 otolithes ont été extraits sur 16 alosons, 1 seul otolithe a été extrait sur 4 alosons (Tableau 1).

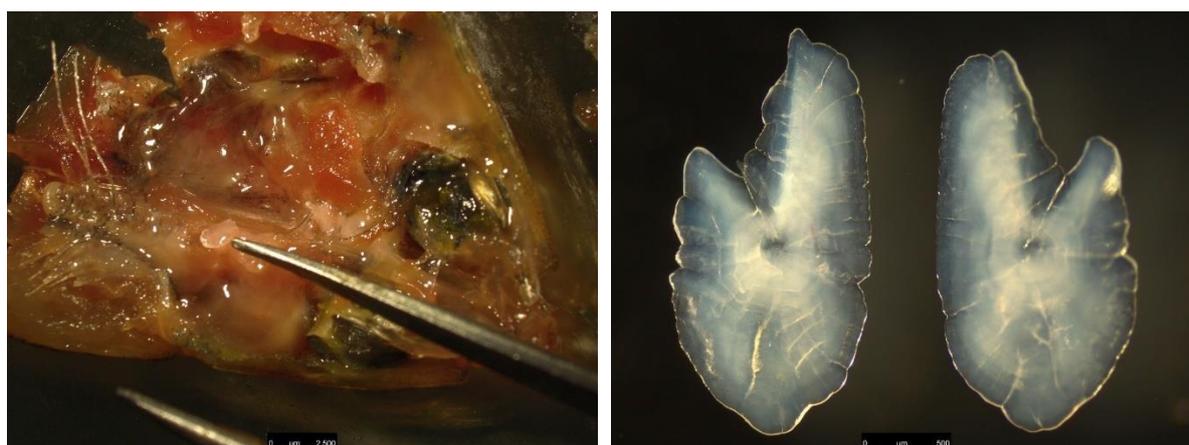


Figure 1 : Extraction des otolithes dans une tête d'aloseon (à gauche) et photographie de 2 otolithes dans l'éthanol (à droite)

Au laboratoire, les otolithes ont été d'abord photographiés dans l'éthanol (Figure 1) de manière à localiser le nucléus. Puis chaque otolithe a été inclus en positionnant le sulcus vers le haut, dans une goutte de colle Cristalbond préalablement chauffée à 200°C. Après refroidissement, un ponçage minutieux a été réalisé à l'aide de disques de papier silice abrasifs humidifiés avec de l'eau MilliQ (18,2 ΩQ) jusqu'au nucleus, puis les principales rayures ont été ôtées par polissage fin à l'aide d'une solution de poudre d'alumine Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Les lames minces ont ensuite été découpées en vue de leur analyse par spectrométrie de masse couplée à un laser femtoseconde (Plateforme analytique PAMAL, Institut de chimie analytique et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux-IPREM, Université de Pau et des pays de l'Adour-UPPA). Parmi les 40 alosons prélevés en 2019 et 2021, les 2 otolithes ont été analysés pour 14 individus (dont 11 individus en 2021), renseignant ainsi sur la variabilité intra-individuelle des signatures microchimiques ; pour les autres individus, un seul otolithe a été analysé (Tableau 2).

### 3.3 Analyses chimiques

La composition géochimique des otolithes a été étudiée à l'institut IPREM (UPPA) sous la responsabilité de Gilles Bareille, par ablation laser femtoseconde (Alafamet, Novalase, France) couplée à un spectromètre de masse à plasma induit (ICP-MS) pour l'analyse de 6 éléments chimiques : calcium (Ca), magnésium (Mg), manganèse (Mn), strontium (Sr), Zinc (Zn) et le baryum (Ba). Le magnésium et le zinc, n'apportant pas de pouvoir discriminant, ne seront pas présentés. Le rapport des isotopes du Sr ( $^{87}\text{Sr} : ^{86}\text{Sr}$ ) sera réalisé en 2023, en utilisant un spectromètre de masse multicollection à plasma induit (MC-ICP-MS) couplé au même laser femtoseconde. L'appareil n'était pas opérationnel en 2022, ces analyses ont donc été reportées.

Les analyses élémentaires ont été réalisées en continu sous la forme d'un transect initié entre 50 et 200  $\mu\text{m}$  avant le nucleus selon si le nucleus était bien visible (50  $\mu\text{m}$  avant) ou non (200  $\mu\text{m}$  avant) afin d'être certain de passer systématiquement par celui-ci. Les transects continus se composent d'une acquisition (mesure) toute les 1 s avec une vitesse d'avancé de 5  $\mu\text{m}/\text{s}$ , soit un point tous les 5  $\mu\text{m}$ .

Le profil de chaque individu a été observé afin de sélectionner la portion correspondant à la période de vie en rivière en excluant la portion du transect correspondant au développement embryolaire car elle contient la signature maternelle (visualisé par un pic du ratio Mn/Ca), qui n'est pas forcément en relation avec le milieu de vie au stade juvénile (Figure 2). En général, la zone d'intérêt pour identifier l'origine natale est comprise entre 200 et 500  $\mu\text{m}$  (en moyenne) du début des profils. Elle peut néanmoins être plus longue ou plus courte, ou démarrer avant ou après 200  $\mu\text{m}$ , en fonction du taux de croissance de chaque individu. La zone en fin de vie des alosons n'a pas été retenue car elle enregistre potentiellement la période de déplacement dans la partie aval du cours d'eau qui peut ne pas être similaire aux zones de frayères. La zone retenue a donc été ajustée pour chaque individu. La valeur moyenne a alors été retenue pour chacun des ratios élémentaires.

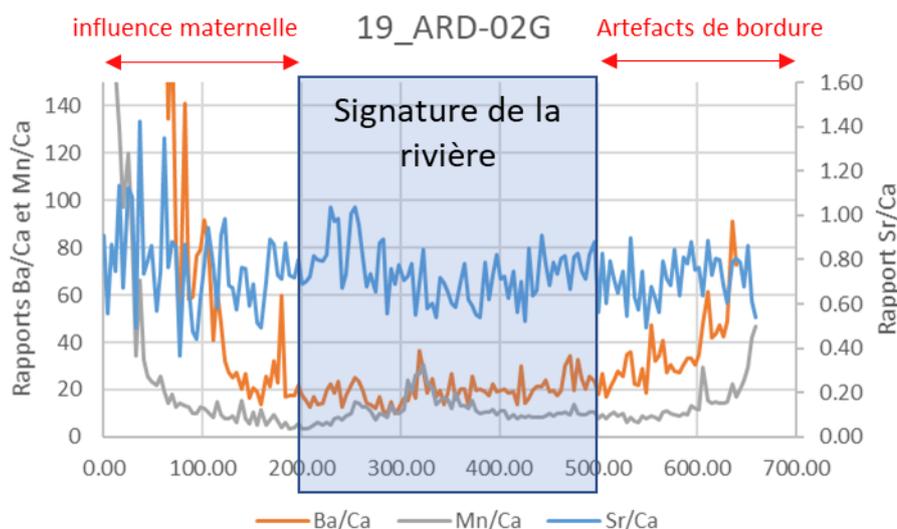


Figure 2: Exemple de profil d'otolithe d'alosons montrant la partie de l'otolithe retenue pour l'analyse

### 3.4 Analyses statistiques

Une ordination NMDS (Nonmetric Multidimensional Scaling ; Kruskal, 1964) a d'abord été réalisées sur les données microchimiques élémentaires (Sr :Ca, Ba :Ca, Sr :Ba) standardisées [0-1] pour visualiser en deux dimensions la structure du jeu de données.

Les données élémentaires ont ensuite été analysées à l'aide d'une analyse discriminante de type *Random Forest* (RF). Cette technique repose sur les arbres de classification et de régression (CART) et exploite la robustesse d'une approche par ensemble (*bagging*). Elle est utilisée pour modéliser et prédire les relations entre un ensemble de variables prédictives (données élémentaires) et une seule variable réponse (Rivière d'origine, Breiman, 2001). Contrairement aux méthodes paramétriques plus traditionnellement utilisées (analyses discriminantes linéaires, quadratiques *etc.*), cette approche non paramétrique ne nécessite pas de faire d'hypothèse *a priori* concernant la relation prédicteur-réponse (linéarité de la relation, distributions convexes et homoscédastiques, *etc.*), offrant ainsi la possibilité de modéliser des relations complexes et non linéaires impliquant des interactions profondes issues de données bruitées (Cutler *et al.* 2007). L'utilisation de cette méthode pour des données microchimiques est venue confirmer ses performances (Mercier *et al.* 2011 ; Richard *et al.*, 2018).

Le principe général consiste d'abord à établir un modèle discriminant basé sur les données des alosons dont l'origine est connue. Pour chaque aloson et chaque élément, seule la moyenne des mesures le long du profil de l'otolithe correspondant à la zone rivière est utilisée. Toutes les données individuelles ont été utilisées (y compris les analyses des deux otolithes pour un même individu, d'où la possibilité de déterminer la variabilité intra-individuelle des signatures environnementales). Les performances du modèle ont été estimées par validation croisée, afin d'éviter tout raisonnement circulaire et artificiellement surestimer ces performances. Pour ce faire, seule une fraction des données initiales (environ  $\frac{3}{4}$  des données, appelées '*in-bag*') a été utilisée pour construire le modèle discriminant. La fraction restante ('*out-bag*') utilise le modèle ainsi construit pour prédire l'origine des poissons. Cette prédiction est comparée à l'origine réelle des individus afin d'en évaluer les performances. Afin de s'assurer de la robustesse du modèle, l'étape précédente a été répétée 1'000 fois de façon indépendante. Le modèle ainsi construit par l'ensemble des 10'000 itérations a pu être utilisé pour déterminer l'origine natale des aloses adultes capturées en rivière ou en mer.

## 4 RESULTATS - INTERPRETATIONS

### 4.1 Analyses chimiques des otolithes d'alosons

#### 4.1.1 Exemples de profils élémentaires

La Figure 3 illustre des profils d'otolithes d'alosons issus de l'Ardèche et de l'Aude. Ces profils sont similaires à l'exemple de la Figure 2. On constate une stabilité temporelle et interindividuelle pour le ratio Sr :Ca. A contrario, de fortes différences entre individus sont visibles pour le Ba :Ca, en

particulier pour l'Ardèche et le Sr :Ba pour l'Aude. Pour certains individus, des variations temporelles importantes apparaissent dans les profils, traduisant des changements de milieu (dévalaison ?) ou des différences dans la métabolisation du baryum au cours du développement ontogénique des alosons.

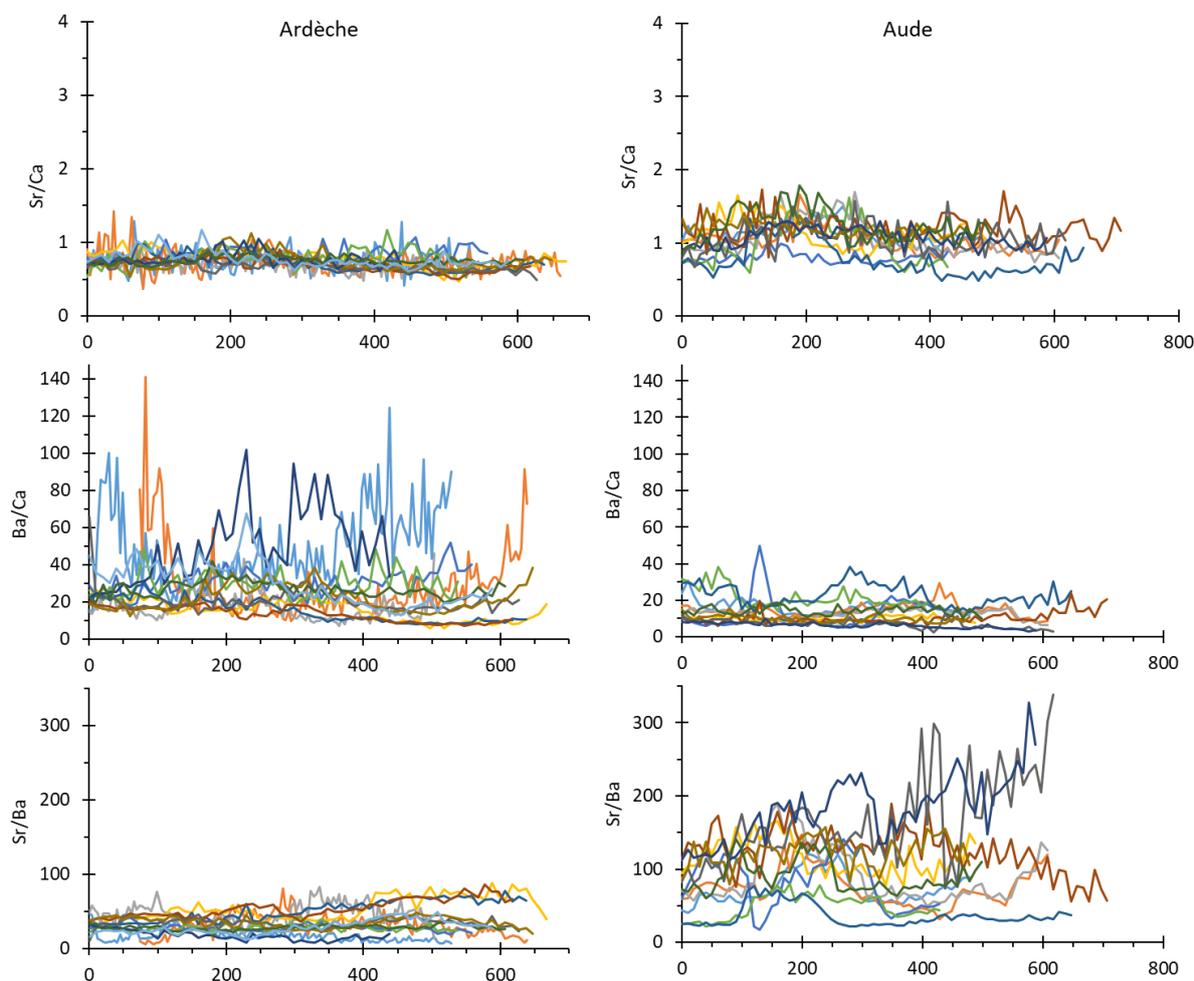


Figure 3 : Profils des otolithes d'alosons prélevés sur l'Ardèche et l'Aude. Les ratios élémentaires Ba/Ca, Sr/Ca et Sr/Ba sont présentés pour tous les otolithes analysés.

#### 4.1.2 Résultats des analyses chimiques

Les valeurs moyennes des ratios élémentaires des alosons prélevés en 2021 sont présentées dans le Tableau 3. Lorsque les 2 otolithes ont été analysés (pour 11 individus), les deux informations ont été conservées. Ces résultats montrent à première vue le faible contraste entre les affluents étudiés et parfois des écarts substantiels entre individus d'un même cours d'eau.

Tableau 3 : Synthèse des résultats des ratios élémentaires. Les cellules grisées groupées par paires indiquent 2 otolithes analysés pour un même individu.

		Sr86/Ca ( $10^{-3}$ )	Ba138/Ca ( $10^{-6}$ )	Sr/Ba
		Moyenne	Moyenne	Moyenne
ARD-01D	Ardèche	0,72	13	61
ARD-02G	Ardèche	0,87	32	28
ARD-02D	Ardèche	0,83	29	29
ARD-03G	Ardèche	0,64	10	63
ARD-03D	Ardèche	0,61	10	66
ARD-04G	Ardèche	0,65	20	34
ARD-05G	Ardèche	0,67	18	38
ARD-06D	Ardèche	0,77	61	14
ARD-06G	Ardèche	0,75	25	30
ARD-07D	Ardèche	0,71	20	36
RCE-01G	Cèze	0,87	9	117
RCE-02D	Cèze	0,79	11	95
RCE-02G	Cèze	0,84	14	75
RCE-03D	Cèze	0,74	6	145
RCE-03G	Cèze	0,80	9	124
VAC-01D	Roubine-Vacares	1,11	7	171
VAC-01G	Roubine-Vacares	1,05	5	240
VAC-02D	Roubine-Vacares	1,00	12	91
VAC-02G	Roubine-Vacares	0,90	5	200
AUD-01AG	Aude	1,19	12	130
AUD-04AG	Aude	0,92	16	64
AUD-04AD	Aude	0,92	14	72
AUD-05AD	Aude	1,04	10	103
AUD-03AD	Aude	0,78	12	79
AUD-06AG	Aude	0,72	18	40
AUD-06AD	Aude	0,66	23	30
AUD-08AG	Aude	1,18	11	119
AUD-08AD	Aude	1,14	9	128
AUD-07AG	Aude	1,12	6	199
AUD-07AD	Aude	1,06	5	206
AUD-02AD	Aude	1,14	14	86

#### 4.1.3 Relation eau - otolithe

Les relations entre les ratios élémentaires mesurés dans l'eau en 2019 et dans les otolithes d'aloisons prélevés en 2019 et 2021 sont présentées dans la Figure 4. Il ressort une très bonne corrélation pour le ratio Sr :Ca, avec une faible hétérogénéité entre individus d'une même rivière ; en revanche, on observe davantage de variabilité dans les otolithes pour les ratios Ba :Ca et Sr : Ba au sein d'un même cours d'eau. Certains cours d'eau se démarquent par de très fortes disparités entre individus : c'est le cas de l'Ardèche, de l'Hérault et de la Durance.

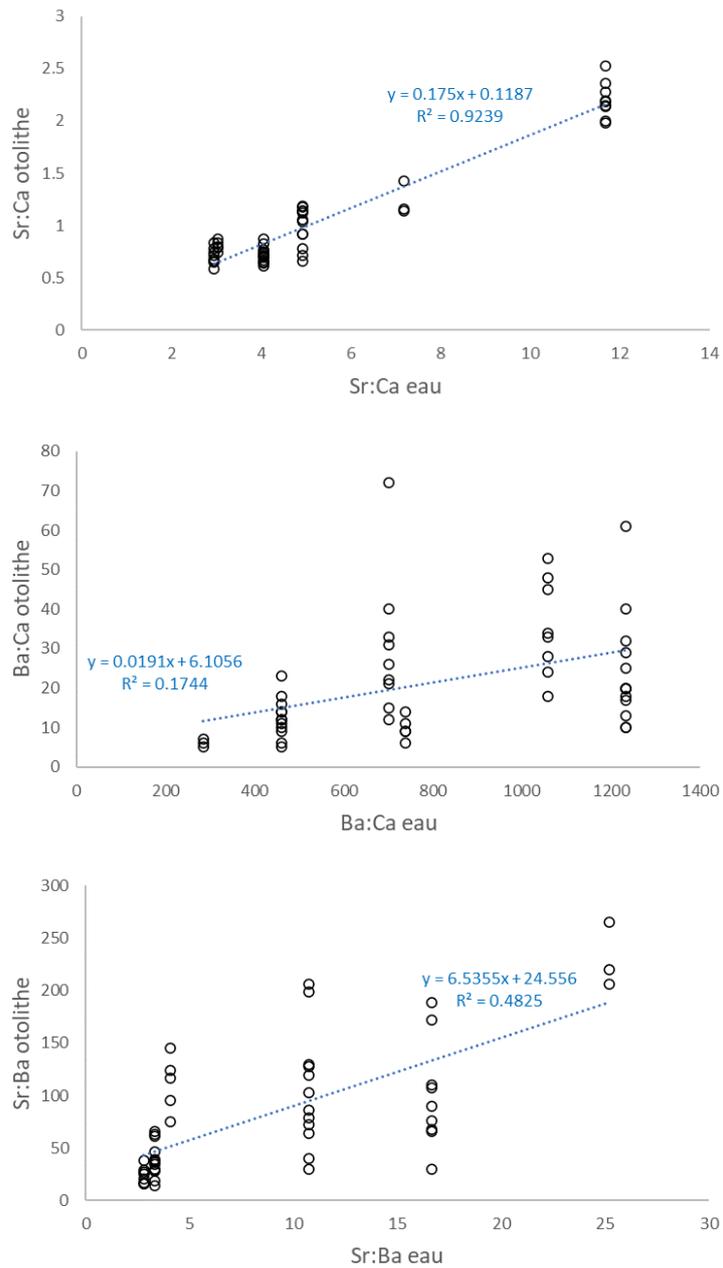


Figure 4 : Relations eau-otolithes des ratios élémentaires

## 4.2 Assignation des alosons à leur rivière d'origine

### 4.2.1 Représentation des analyses microchimiques par rivière

Les résultats des analyses élémentaires ont été représentés graphiquement dans un même plan (Figure 5), avec délimitation des polygones formés par les différents individus d'un même cours d'eau. Les gradients des 3 ratios dans ce plan à deux dimensions sont présentés dans la Figure 6. Il ressort un fort chevauchement des polygones, traduisant une faible différenciation des cours d'eau

sur la base des profils élémentaires dans les otolithes d'alosons. Ce résultat peut sembler congruent, pour certains cours d'eau, avec les analyses d'eau réalisées en 2019 : exemple de l'Ardèche et de l'Hérault (Richard et Bareille, 2020). En revanche, la Cèze, l'Aude et l'Ardèche, qui présentaient davantage d'hétérogénéité dans les signatures élémentaires de l'eau, montrent des similitudes dans les signatures de certains alosons, ainsi qu'une très forte variabilité entre individus d'un même cours d'eau, en particulier pour l'Ardèche et l'Aude. Il demeure important de garder à l'esprit qu'une analyse ponctuelle d'eau ne reflète pas forcément la variabilité de la composition de la rivière au cours du temps. Les profils microchimiques intègrent quant à eux la variabilité temporelle rencontrée au cours de la vie des alosons dans la rivière.

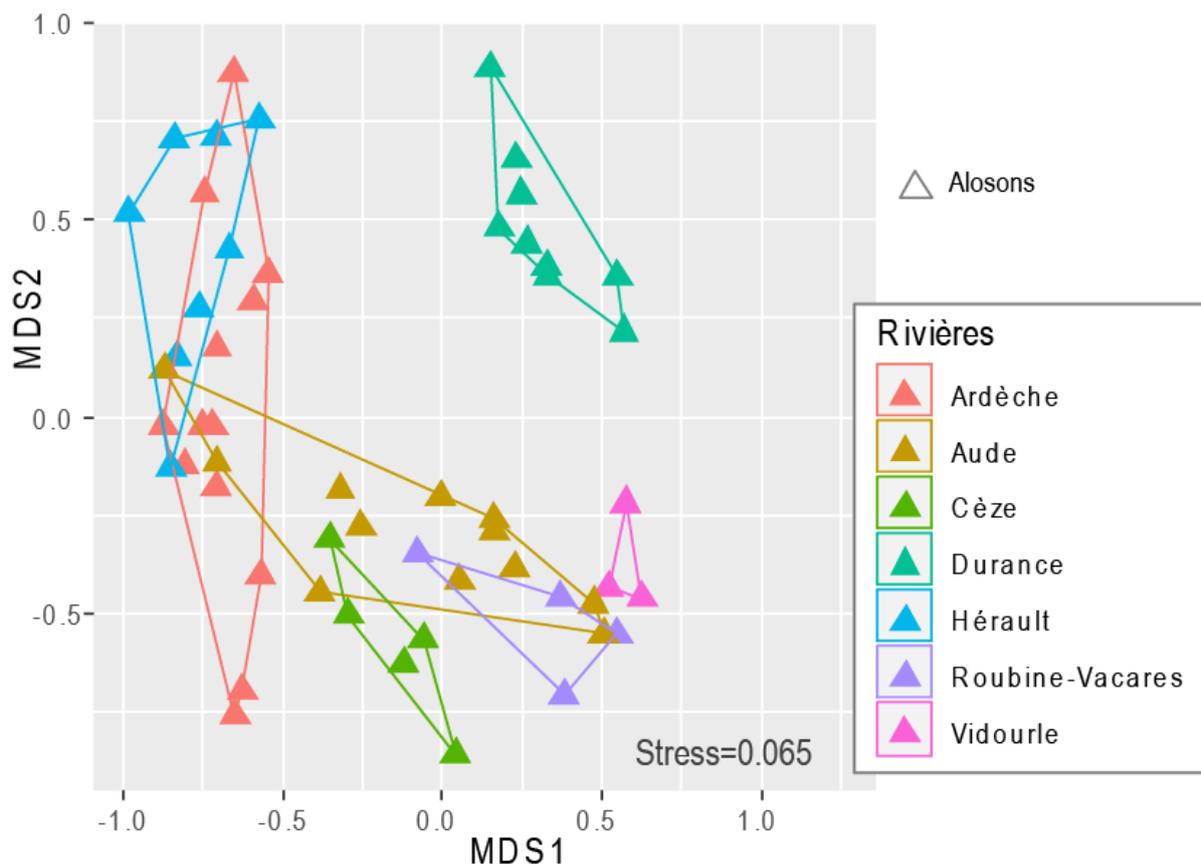
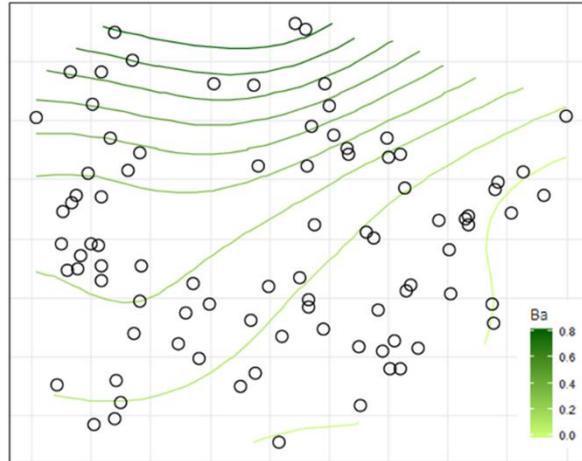
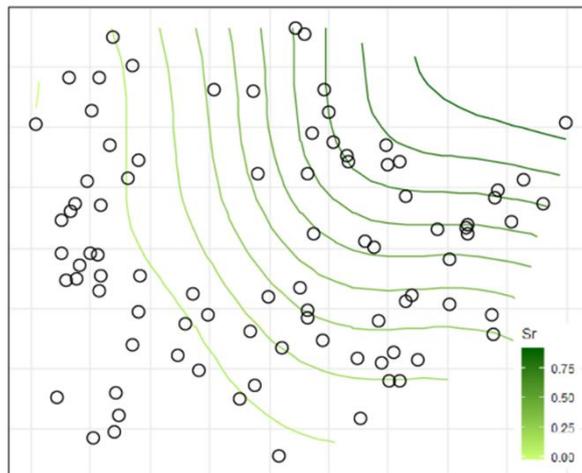


Figure 5 : Ordination (NMDS) avec données standardisés [0-1] des différents ratios élémentaires du Ba :Ca (Baryum sur Calcium), du Sr :Ba (Strontium sur Baryum), et du Sr :Ca (Strontium sur Calcium) pour les 41 otolithes d'alosons analysés, provenant de 7 cours d'eau du bassin RMC.

**Ba/Ca**



**Sr/Ca**



**Sr/Ba**

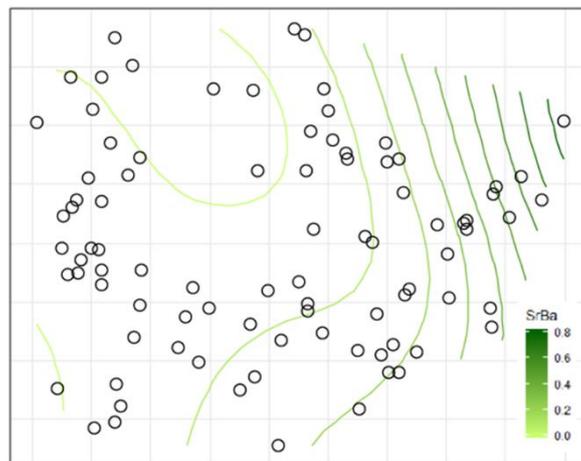


Figure 6 : Gradients des trois ratios élémentaires dans le plan de l'analyse d'ordination NMDS avec données standardisées [0-1]. Isolignes + ordination de la figure 5.

#### 4.2.2 Variabilité intra-individuelle

La variabilité intra-individuelle peut être évaluée à partir des résultats obtenus pour les 2 otolithes d'un même individu. La Figure 7 met en évidence la position respective des 2 otolithes dans le plan NMDS sur données standardisées, tant pour les juvéniles que pour les adultes.

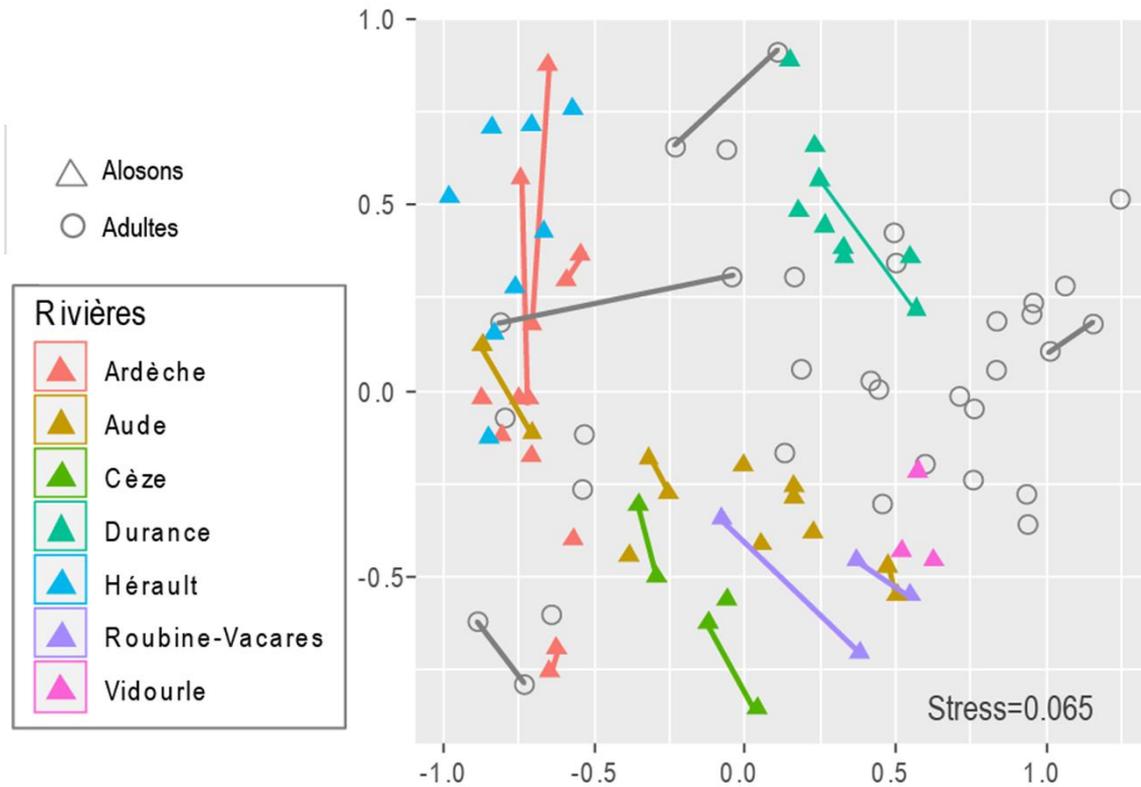


Figure 7 : Mise en évidence de la variabilité intra-individuelle (segment entre les 2 otolithes d'un même individu)

Il apparaît une importante variabilité intra-individuelle selon les individus, tant pour les juvéniles que pour les adultes analysés, certains présentant des signatures très proches entre les otolithes droit et gauche alors que d'autres montrent une dispersion importante entre les deux otolithes. Cette variabilité intra-individuelle peut s'expliquer par :

- **Une variabilité liée à la préparation des otolithes.** L'incorporation n'étant pas homogène dans tous les axes de l'otolithes, le fait de quantifier les éléments sur des transects différents peut être à l'origine de différences de signaux mesurés. En outre, les otolithes d'aloses étant très fins, de légères différences de ponçage entre les deux otolithes peuvent avoir des répercussions sur les ratios chimiques mesurés ;
- **Hétérogénéité dans l'incorporation du baryum au cours des premiers mois de la vie** (observé chez les salmonidés, Bareille et al., 2022, CJFAS révision soumise en novembre 2022). Compte tenu d'une durée relativement courte du stade aloson par rapport aux juvéniles de salmonidés, l'équilibre avec l'environnement est susceptible de ne pas être totalement atteint pour cet élément (Ba) sur les aloses pendant les premières semaines à mois de vie, d'où des variations

potentiellement importantes entre individus d'une même rivière (voir la relation eau-otolithe sur la Figure 4).

**Pour la suite des analyses, les données microchimiques obtenues sur les deux otolithes d'un même individu seront conservées pour prendre en compte la variabilité intra-individuelle dans les tests d'assignation.**

#### 4.2.3 Variabilité temporelle des signatures

Certains cours d'eau ont été échantillonnés en 2019 (Durance, Hérault, Vidourle), d'autres en 2021 (Aude, Cèze, Roubine des Grandes Cabanes) et enfin l'Ardèche a été échantillonné au cours des deux années. L'effet temporel est confondant avec l'effet spatial puisque la plupart des cours d'eau n'ont été échantillonnés qu'à une seule occasion. Pour l'Ardèche cependant, on remarque l'absence de variabilité temporelle, les points 2019 et 2021 étant très proches, bien que l'on constate davantage de variabilité en 2021 (Figure 8). Il faut également noter qu'en plus d'une large variabilité individuelle, une variabilité temporelle marquée a été observée sur les profils des alosons issus de l'Aude et de la Cèze pour le Sr/Ca et le Ba/Ca. Ceci peut suggérer une variabilité amont-aval significative sur certaines rivières ou une variabilité temporelle de la signature de certaines rivières.

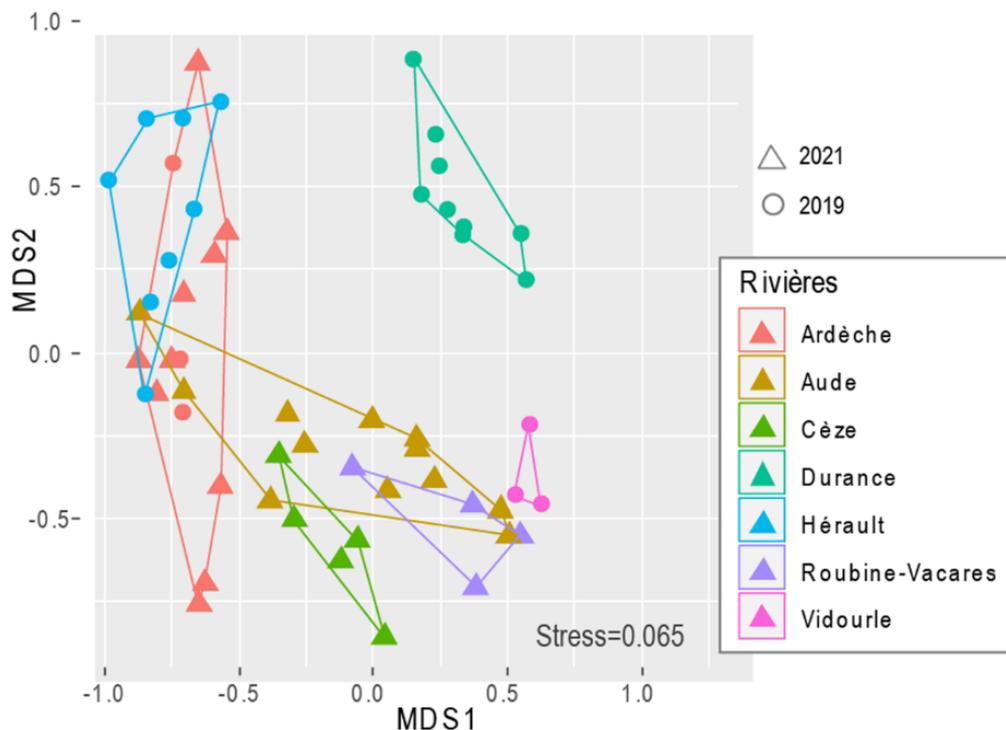


Figure 8 : Mise en évidence de la variabilité temporelle, notamment pour l'Ardèche (en rouge), échantillonnée en 2019 et 2021

#### 4.2.4 Analyse discriminante par Random Forest

Les projections graphiques des analyses microchimiques permettent difficilement de proposer des regroupements. Toutefois, étant donné la position excentrée de la Durance et les moindres chevauchements observés entre le groupe « Ardèche-Hérault » et le reste des affluents (cf Figure 8), des tests d'analyse discriminante par Random Forest ont d'abord été réalisés sur la base de 3 regroupements :

- Durance
- Hérault-Ardèche
- Cèze-Aude-Roubine-Vidourle.

Tableau 4 : Matrice de confusion pour 3 groupes (avec erreur de classification par regroupement)

		% Origines attribuées			Erreur de reclassification (%)
		Ardèche-Hérault	Durance	Le reste	
Origine réelle	Ardèche-Hérault	85.7	0	14.3	14.3
	Durance	11.1	77.8	11.1	22.2
	Le reste	12.5	0	87.1	12.5

Les résultats de cette analyse discriminante sur la base de 3 groupes de cours d'eau montrent des erreurs de classification élevées (12 à 22% selon les groupes), confirmant la difficulté de différencier ces groupes sur la base de la microchimie des otolithes d'alosons. Ce fort taux d'erreur d'assignation est la résultante de 3 phénomènes :

- **L'importante variabilité interindividuelle des signatures élémentaires** des otolithes analysés au sein d'un même cours d'eau, en particulier le ratio Ba :Ca (voir Figure 4) ;
- **Les importantes fluctuations temporelles au sein d'un même otolithe**, traduisant soit un changement d'habitat des juvéniles au sein de la rivière soit des variations temporelles de la chimie de l'eau ;
- La **faible différenciation entre cours d'eau** sur la base des ratios élémentaires analysés dans les otolithes, alors que l'analyse de l'eau semblait plus discriminante (mais basée sur un prélèvement ponctuel). Il est à noter que la localisation relativement aval des frayères à aloses n'est pas un avantage. En effet, si des discriminations plus importantes peuvent être rencontrées dans les têtes de bassin une homogénéisation des signatures s'opèrent fréquemment dans les parties aval des bassins en raison du mélange de divers affluents.

Avec seulement deux groupes (Durance vs le reste des cours d'eau), aucune erreur de reclassification n'apparaît sur les 10000 itérations (Tableau 5).

Tableau 5 : Matrice de confusion pour 2 groupes (avec erreur de classification par regroupement)

		% Origines attribuées		Erreur de reclassification (%)
		Durance	Le reste	
Origine réelle	Durance	100	0	0
	Le reste	0	100	0

## 4.3 Origine natale des aloses adultes

### 4.3.1 Résultat des analyses

Les valeurs moyennes des ratios élémentaires des 34 aloses adultes prélevées en 2021 sont présentées dans le Tableau 3. Lorsque les 2 otolithes ont été analysés (pour 5 individus), les deux informations ont été conservées. Une majorité des aloses prélevées proviennent de prélèvements en mer (19 individus sur 34), le reste étant réparti sur 5 cours d'eau (Aude, Hérault, Rhône, Tech, Têt).

*Tableau 6 : Synthèse des résultats des ratios élémentaires. Les cellules grisées groupées par paires indiquent 2 otolithes analysés pour un même individu.*

		Sr86/Ca ( $10^{-3}$ )	Ba138/Ca ( $10^{-6}$ )	Sr/Ba
		Moyenne	Moyenne	Moyenne
AUD-01G	Aude	2.61	18	151
AUD-02D	Aude	2.21	4	663
AUD-03G	Aude	1.53	16	93
AUD-04D	Aude	1.70	6	284
AUD-05D	Aude	0.65	11	61
HER-01D	Hérault	1.95	6	323
HER-01G	Hérault	1.89	6	347
HER-02G	Hérault	0.81	18	48
MER-01D	Mer	1.42	5	302
MER-02G	Mer	0.77	15	51
MER-04D	Mer	1.94	8	261
MER-05D	Mer	2.86	3	1083
MER-06D	Mer	1.84	77	30
MER-06G	Mer	1.20	52	36
MER-07D	Mer	0.68	19	37
MER-08D	Mer	2.31	5	449
MER-10D	Mer	1.68	11	149
MER-11D	Mer	2.20	5	449
MER-12D	Mer	0.59	10	58
MER-12G	Mer	0.57	12	49
MER-14D	Mer	2.41	16	153
MER-15G	Mer	1.76	24	80
MER-16D	Mer	0.69	25	28
MER-16G	Mer	1.43	28	53
MER-17D	Mer	1.69	12	144
MER-18D	Mer	1.97	6	336
MER-19G	Mer	1.51	48	33
RHO-01D	Rhône	1.47	7	217
RHO-02D	Rhône	1.88	4	542
RHO-02G	Rhône	1.86	3	775
RHO-03D	Rhône	1.29	8	193
TEC-01D	Tech	1.34	3	404
TEC-02D	Tech	1.24	3	436
TET-01AD	Têt	1.26	13	101

#### 4.3.2 Comparaison des signatures des aloses avec celles des alosons

La Figure 9 montre les projections en ordination NMDS des aloses adultes et des alosons sur la base de la microchimie des otolithes, en prenant en compte la moyenne des deux otolithes lorsque les deux ont été analysés. Il apparaît globalement une faible proportion d'adultes au niveau des polygones formés par les alosons (observation très nette pour l'Aude), une majorité d'individus adultes étant éloignés des barycentres des polygones. Ce phénomène peut avoir plusieurs explications :

- Une majorité d'alooses adultes proviendrait d'autres cours d'eau que ceux dans lesquels les alosons ont été prélevés, en particulier du Rhône ;
- Une dérive ontogénique se traduisant par une grande variabilité inter-individuelle pour une même rivière.
- Une origine analytique : l'échantillonnage de la partie juvénile sur des otolithes adultes peut s'avérer plus difficile. Dans le plan sagittal, la zone de l'otolithe correspondant à la phase juvénile est relativement fine. Un ponçage trop prononcé peut conduire à un mélange, lors de l'ablation, de matériel déposé en phase juvénile avec un peu de matériel déposé lorsque l'alooson a rejoint des zones plus aval (estuaire, zone fluviale aval), et donc engendrer une déviation des signatures en comparaison à l'ablation de juvéniles.

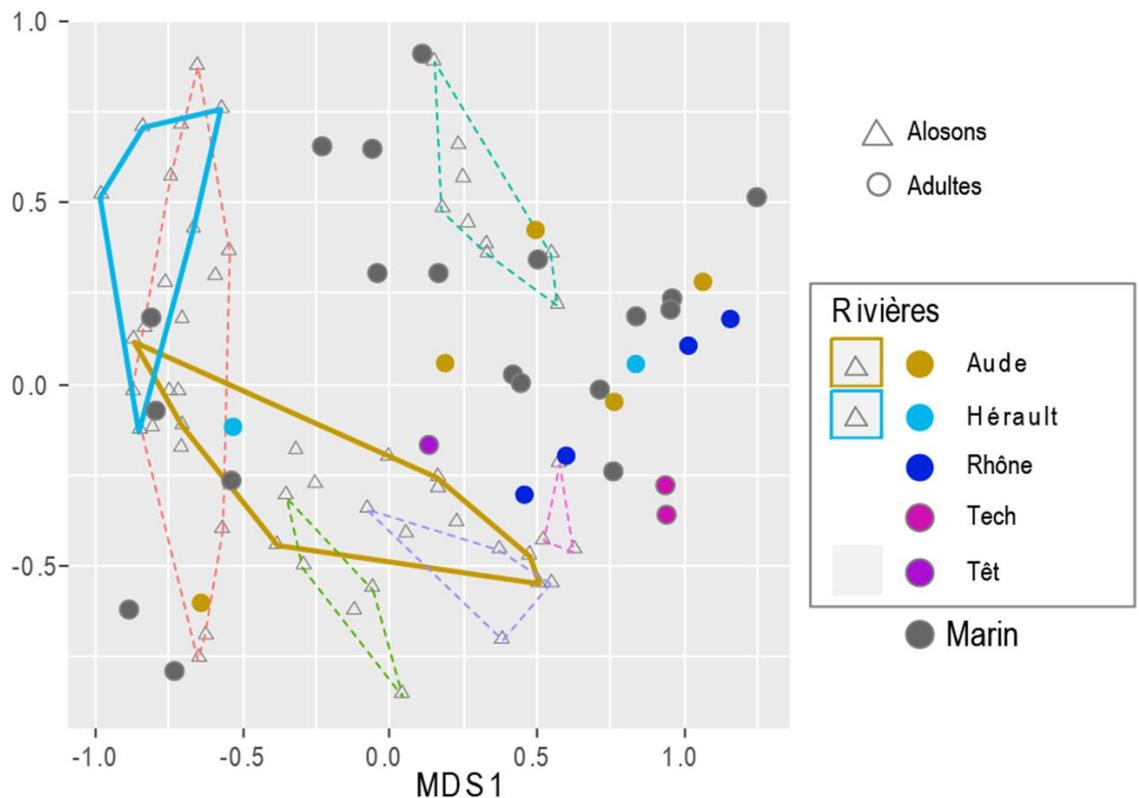


Figure 9 : Projection des adultes en ordination NMDS sur données standardisées [0-1]. Les triangles et polygones représentent les alosons. Les points représentent les aloses adultes en fonction de leur lieu de capture.

### 4.3.3 Essai d'assignation des aloses adultes

Plus des deux tiers des aloses adultes ne semblent pas provenir des cours d'eau analysés (Figure 9). Il est donc impossible d'assigner avec fiabilité ces individus sur la base des données actuelles, sachant que nous ne disposons d'alosons que pour 6 des 16 cours d'eau qui ont fait l'objet d'analyses d'eau et au niveau desquels ont été observées des populations d'alosons. En outre, la grande variabilité individuelle réduit fortement notre capacité à clairement discriminer la plupart des rivières d'origine. Il faut rappeler que la base d'un modèle d'assignation d'une origine repose sur la capture de juvéniles dans les différentes rivières où la reproduction de cette espèce s'opère. En particulier, le Rhône, la Drôme, l'Argens, la Têt, le Tech, l'Erieux, l'Ouvèze, l'Agly, l'Orb, le Gardon ne sont pas représentés par des alosons. Aussi, il n'est pas exclu que certaines aloses adultes analysées soient originaires de ces dernières rivières. Une manière de valider cette hypothèse consiste à estimer les signatures microchimiques moyennes théoriques des otolithes d'alosons provenant de ces cours d'eau non échantillonnés. Pour ce faire les relations eau-otolithe déterminées précédemment ont été utilisées (partie 4.1.3). Ces cours d'eau non échantillonnés ont été représentés sur la Figure 10. Il faut cependant garder à l'esprit que ces signatures microchimiques virtuelles (estimées) ne prennent pas en compte d'éventuelles variations temporelles car basées sur une analyse d'eau unique. La signature réelle de ces rivières devrait alors s'étendre assez largement autour des points représentés sur la figure 10.

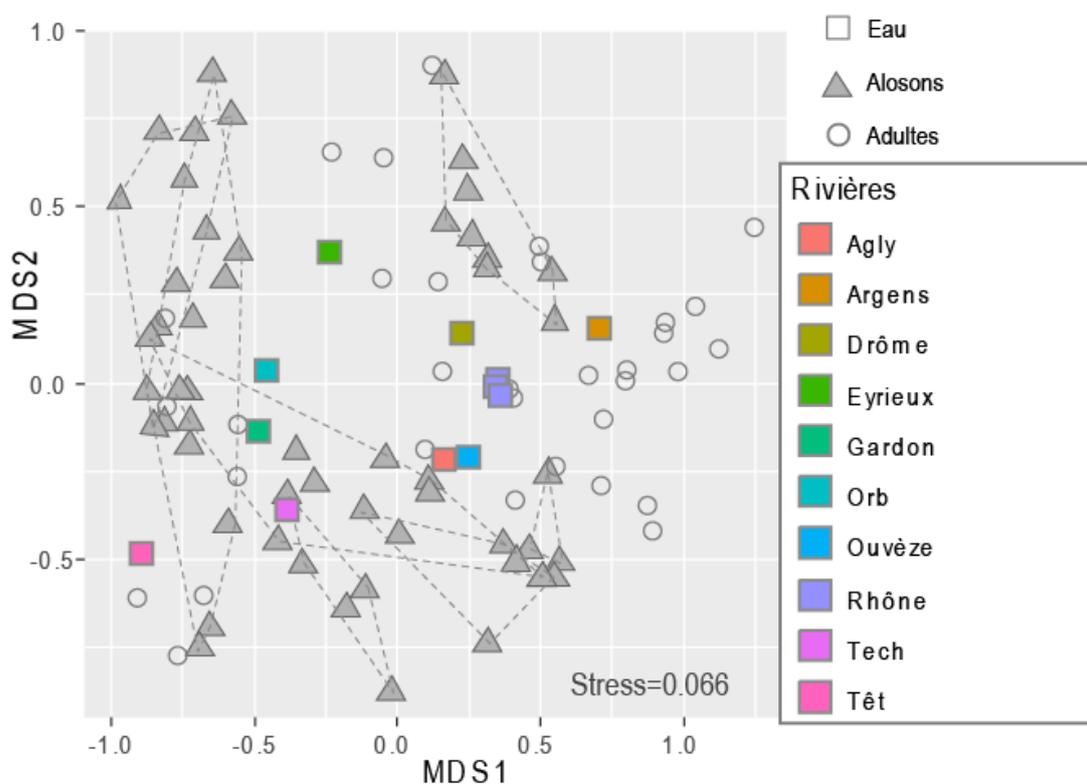


Figure 10 : Projection des signatures extrapolées dans les otolithes à partir de l'eau (rectangles) pour 10 rivières dans lesquelles des alosons n'ont pas été prélevés. L'ordination grisée (NMDS sur données standardisées [0-1]) reprend les composantes déjà illustrées dans les figures précédentes.

La Figure 10 montre des positionnements intermédiaires de certains cours d'eau pour lesquels les otolithes d'alosons sont manquants (Rhône, Drôme, Eyrieux, éventuellement l'Argens). D'autres cours d'eau sont très proches des bassins déjà analysés (Agly, Tech, Têt, Gardon, Orb, Ouvèze). Ces résultats semblent indiquer que des discriminations plus importantes de ces cours d'eau restent incertaines, même en envisageant des échantillons additionnels d'alosons. En revanche, le Rhône et la Drôme pourraient expliquer les origines de plusieurs aloses adultes dont les projections dans le plan factoriel NMDS ne correspondent à aucun des cours d'eau pour lesquels des alosons ont été analysés.

## 5 DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de cette 3<sup>ème</sup> phase d'étude ont permis de caractériser la signature microchimique des alosons issus de 7 cours d'eau, dont 6 parmi les 16 cours d'eau qui ont fait l'objet de prélèvements et d'analyses d'eau. L'important chevauchement des signatures élémentaires des alosons issus de ces différents cours d'eau ainsi que la forte variabilité individuelle observée ne permettent pas une discrimination des affluents, excepté la Durance qui se démarque actuellement des 6 autres cours d'eau. Ces résultats sont assez cohérents avec la prépondérance de substrats majoritairement sédimentaires dans la zone d'étude qui au final se traduisent malheureusement par des signatures peu contrastées entre de nombreux cours d'eau.

Les écarts individuels observés peuvent provenir d'une hétérogénéité spatiale des lieux de reproduction et de développement des alosons avant dévalaison, d'une hétérogénéité temporelle des signatures chimiques des eaux, mais aussi de différences individuelles dans l'assimilation des éléments (rôle du métabolisme individuel), étant donné la courte phase de vie des alosons en rivière avant la dévalaison (quelques semaines à quelques mois). La forte variabilité individuelle sur le baryum (rapport Ba/Ca) représente un réel frein pour l'assignation des alosons à leur rivière d'origine. En effet le strontium seul ne permet de différencier que peu de rivière individuellement, essentiellement la Durance. A l'inverse Hérault, Ardèche, Orb, Cèze, Gardon, Aude, Têt, Tech, Eyrieux apparaissent difficilement discriminable entre eux sur la base du seul strontium. Si l'on ajoute à cela de la variabilité temporelle au cours du cycle de développement des alosons, mise en évidence via les profils microchimiques, alors la discrimination des origines des aloses dans le bassin méditerranéen demeure extrêmement délicate sur la base d'analyses microchimiques d'otolithes.

L'intégration ultérieure des données isotopiques du strontium (analyses reportées en 2023 en raison de pannes répétées) ne devrait pas apporter de pouvoir discriminant important au vu des résultats obtenus sur l'eau (Richard et Bareille, 2020). D'après ce que nous avons pu observer grâce aux signatures des eaux, seuls l'Argens, la Têt et le Tech devraient pouvoir être identifiés grâce à l'isotopie du strontium, alors que ce marqueur ne sera pas opérant pour les autres rivières. Ceci sera validé lorsque les analyses isotopiques seront disponibles, en principe début 2023.

De nombreux cours d'eau favorables à la reproduction de l'aloise n'ont pour l'instant pas été intégrés à l'étude, faute de capture d'alosons. Les résultats microchimiques d'alosons adultes montrent en grande majorité des positionnements intermédiaires par rapport aux alosons. L'hypothèse avancée serait que ces individus proviennent d'autres cours d'eau pour lesquels les alosons n'ont pas pu être échantillonnés. Cette hypothèse reste difficile à vérifier du fait de l'incertitude importante sur la relation eau-otolithe en particulier pour le baryum. Par contre, il apparaît que les adultes capturés au niveau de certains affluents ne présentent pas les signatures de ces affluents au stade juvénile, ce qui

est observé notamment pour l'Aude. Cette observation mériterait toutefois d'être confirmée sur la base d'un plus grand nombre d'échantillons.

Une extrapolation des positionnements relatifs de ces cours d'eau dans le plan projection des signatures d'otolithes à partir des signatures des eaux fournit des indications dans l'optique d'apports futurs de données complémentaires. Ainsi, le Rhône et la Drôme devraient se positionner entre la Durance et le reste des rivières pour lesquelles nous avons analysé des alosons. C'est également le positionnement d'une partie significative des aloses adultes analysées, en particulier celles collectées en mer mais aussi dans le Rhône, l'Hérault l'Aude et le Tech ; Il serait nécessaire de préciser la position du Rhône et de la Drôme si l'on veut renforcer l'hypothèse d'une origine Rhône/Drôme pour certains individus.

Ces résultats restent mitigés et difficilement transposables à la gestion opérationnelle du fait des lacunes évoquées (déficit d'alosons provenant des différents cours d'eau frayères) et des fortes variabilités interindividuelles. Les perspectives d'amélioration du modèle d'assignation ne sont pas garanties, car les recoupements entre cours d'eau restent importants, et les probabilités d'erreur d'assignation pourraient demeurer élevées. Seule une analyse basée sur un nombre important d'alosons de toutes les origines ( $\approx 10$  par cours d'eau) et sur plusieurs années/cohortes permettrait d'affiner les limites du modèle et de constituer le cas échéant davantage de regroupements de cours d'eau par analyse discriminante.

## 6 Références

Bareille G., Chappaz A., Fontaine A., Tabouret H., Morat. F., Vignon M., Martin J., Aymes J.C., Daverat F., Pécheyran C., Donard O.F.X., 2022. Freshwater fish otoliths record signals from both water and physiological processes: New insights from Sr/Ca and Ba/Ca ratios *CJFAS, révision soumise le 25/11/2022*.

Breiman L. 2001. Random forests. *Machine Learning* 45: 5-32.

Cutler D.R., Edwards T.C., Jr., Beard K.H., Cutler A., Hess K.T., Gibson J. and Lawler J.J. 2007. Random forests for classification in ecology. *Ecology* 88: 2783-2792.

Mercier L., Darnaude A.M., Bruguier O., Vasconcelos R.P., Cabral H.N., Costa M.J., Lara M., Jones D.L. and Mouillot D. 2011. Selecting statistical models and variable combinations for optimal classification using otolith microchemistry. *Ecological Applications* 21: 1352-1364.

Richard A, Bareille G., Caudron A., Colleu M.A., Dorioz J.M., Vignon M., 2018. Recherche de l'origine natale des truites du Léman à partir de la composition géochimique des otolithes. Rapport final. 49p.

Richard A. & Bareille, G., 2020. Etude de faisabilité « Détermination de l'origine natale des aloses de Méditerranée (*Alosa agone*) par la géochimie des otolithes ». Phase 1 : analyse des échantillons d'eau. 18p.

Richard A & Bareille G., 2021. Etude de faisabilité « Détermination de l'origine natale des aloses de Méditerranée (*Alosa agone*) par la géochimie des otolithes ». Phase 2 : analyse des otolithes d'alosons. 12p.

## 7 Annexes

Annexe 1 : Détails des alosons capturés en 2019 (données MRM)

Code_alosons	Date_capture	Cours_d_eau	Lieu_captures	LT (mm)	LF (mm)	Poids (g)	Nb_branchiospines	Nb_otolithes
19_DUR_01	08/08/2019	Durance	Callet	83	72	4.1	25	0
19_DUR_02	08/08/2019	Durance	Callet	94	82	5.7	27	2
19_DUR_03	08/08/2019	Durance	Callet	95	83	6.3	29	2
19_DUR_04	08/08/2019	Durance	Callet	73	68	3.7	24	2
19_DUR_05	08/08/2019	Durance	Callet	89	80	5.6	27	2
19_DUR_06	08/08/2019	Durance	Callet	75	67	3.8	25	2
19_DUR_07	08/08/2019	Durance	Callet	87	77	5.3	26	1
19_DUR_08	08/08/2019	Durance	Callet	99	87	7.5	26	2
19_HER_01	14/08/2019	Hérault	St_Thibéry	87	79	5	25	1
19_HER_02	14/08/2019	Hérault	St_Thibéry	107	95	10.9	31	2
19_HER_03	14/08/2019	Hérault	St_Thibéry	105	92	8.2	31	2
19_HER_04	14/08/2019	Hérault	St_Thibéry	87	77	5	29	2
19_HER_05	14/08/2019	Hérault	St_Thibéry	104	91	9.4	28	2
19_HER_06	14/08/2019	Hérault	St_Thibéry	79	68	3.8	30	2
19_HER_07	14/08/2019	Hérault	St_Thibéry	106	94	10.4	29	2
19_HER_08	14/08/2019	Hérault	St_Thibéry	89	82	5.2	28	2
19_ARD_01	22/08/2019	Ardèche	Sauze	106	94	7.9	26	2
19_ARD_02	22/08/2019	Ardèche	Sauze	104	89	8.2	29	2
19_VID_01	02/09/2019	Vidourle	Marsillargues	168	150	43.3	-	2
19_VID_02	02/09/2019	Vidourle	Marsillargues	157	138	35.5	32	1
19_VID_03	02/09/2019	Vidourle	Marsillargues	150	129	30.5	33	2