

# **Identification génétique des larves d'éperlans arc-en-ciel capturées dans le fleuve Saint-Laurent en 2009**

Guillaume Côté et Louis Bernatchez

IBIS (Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes)  
Université Laval  
Québec, QC  
G1V 0A6

Auteur pour correspondance :  
Dr Louis Bernatchez

IBIS (Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes)  
Québec, Canada, G1V 0A6  
Tél: 1-418-656-3402; Téléc.: 1-418-656-7176  
Courriel: [louis.bernatchez@bio.ulaval.ca](mailto:louis.bernatchez@bio.ulaval.ca)

5 février 2010

## Introduction

Les populations d'éperlans arc-en-ciel (*Osmerus mordax*) du fleuve St-Laurent sont issues de deux races glaciaires; la race Acadienne (aussi appelée clade A) et la race Atlantique (clade B). Le nom des races fait référence au refuge qu'elles ont occupé durant la dernière glaciation ainsi qu'à l'identification des haplotypes d'ADN mitochondrial qui les caractérisent respectivement. Lors du retrait des glaces, ces deux races ont colonisé le fleuve Saint-Laurent par le biais de routes différentes, soit par les rivières de la vallée de l'Hudson – lac de Champlain (États-Unis) pour la race Atlantique et par le golfe du Saint-Laurent pour la race Acadienne. Les deux races se sont ensuite mélangées dans l'estuaire moyen du fleuve Saint-Laurent entraînant la formation de deux populations, soit la population de la rive nord (PRN) et la population de la rive sud (PRS). Celles-ci diffèrent au niveau de la proportion des deux races glaciaires. La PRN est composée à 87.1% d'individus de la race Atlantique (B) et la PRS est composée de à 80.9% d'individus de la race Acadienne (A) (Bernatchez et Martin 1996).

La PRS est désignée comme espèce vulnérable en vertu de la Loi sur les espèces menacées ou vulnérables du Québec depuis 2005 (Trencia et coll., 2004). L'abondance de cette population anadrome a considérablement diminué au cours des trente dernières années. La disparition de sites de reproduction et la vulnérabilité des frayères existantes sont responsables de la fragilité de la population. Jusqu'à récemment, les seules frayères encore utilisées étaient situées dans quatre tributaires du fleuve sur la rive sud (Ruis. de l'Église, R. Ouelle, R. Fouquette et R. du Loup).

Des inventaires réalisés depuis 2005 démontrent toutefois l'existence d'une frayère dans l'estuaire du fleuve Saint-Laurent à proximité du ruisseau de l'Église, tributaire exploité par la PRS et où un incubateur est actuellement employé pour suppléer la production de larves de la PRS. Il a été proposé que cette frayère à même les hauts-fonds de l'estuaire pourrait être utilisée par des individus qui appartiennent à la PRS (résultats en cours de vérification). L'abondance de larves capturées atteint son maximum au site projeté du terminal méthanier Rabaska et de Beaumont. L'observation d'œufs d'éperlans dans le même secteur, faite en 2007 et 2008 dans le cadre d'inventaires effectués par une firme de consultants, confirme la présence d'un site de reproduction. Les travaux portant sur la génétique des larves en dévalisons dans ce secteur en 2007 et 2008 ont cependant généré des résultats différents : en 2007 il semblerait que les larves appartiennent exclusivement à la PRS (Brisson-Bonenfant, 2008; Thériault, 2007) alors qu'en 2008 elles appartiennent en grande majorité à la PRN (Côté et Bernatchez 2009).

En 2009, le MRNF a poursuivi l'inventaire des larves d'éperlan dans le secteur de Beaumont afin de préciser le secteur effectivement exploité par la PRS pour la reproduction et de mesurer la variabilité annuelle de la production larvaire de ce site. Les objectifs du projet à long terme sont d'identifier et de caractériser les habitats de fraie utilisés par les éperlans arc-en-ciel de la PRS dans le secteur de l'estuaire à la hauteur de Beaumont et d'évaluer l'importance relative des sites de fraie de cette population.

La présente étude a pour objectif principal d'estimer la contribution des populations PRS et PRN au sein d'échantillons de larves d'éperlans arc-en-ciel capturées dans le fleuve Saint-Laurent en 2009. Étant donné qu'il est impossible de déterminer visuellement à quelle population un individu au stade larvaire appartient, des analyses moléculaires sont utilisées. Notamment une analyse de restriction sur un fragment de l'ADN mitochondrial permet de déterminer si un individu appartient à la race Acadienne (clade A) ou à la race Atlantique (clade B). Lorsque les

larves sont ainsi identifiées, une analyse de stocks mixte permet de déterminer quelle est la contribution de la PRN et de la PRS dans l'échantillon analysé.

## Méthode

Le clade mitochondrial (A ou B) a été identifié pour 108 larves et 19 œufs d'éperlan arc-en-ciel provenant de cinq échantillons récoltés dans le fleuve Saint-Laurent en mai 2009 à Beaumont, Neuville et Deschambault. Ces larves ont été capturées les 4, 6,7 et 8 mai 2009. La méthode décrite par Pigeon et coll. (1998) et adaptée et décrite par Lecomte et Dodson (2004) a été utilisée. Cette méthode comprend trois grandes étapes :

### *1- Extraction de l'ADN*

La première étape des manipulations en laboratoire consiste à extraire l'ADN génomique des larves. L'ADN génomique a été extrait selon la méthode « Quick-lysis » (Olsen et coll., 1996). Les larves ont été digérées dans 50µl d'une solution de « Quick extract » à une température de 37°C pendant une période de 12h. Un choc thermique de 15 min à 95°C a ensuite été effectué pour dénaturer les protéines. Les larves entières ont été digérées en raison de leur petite taille.

### *2- Amplification de l'ADN mitochondrial*

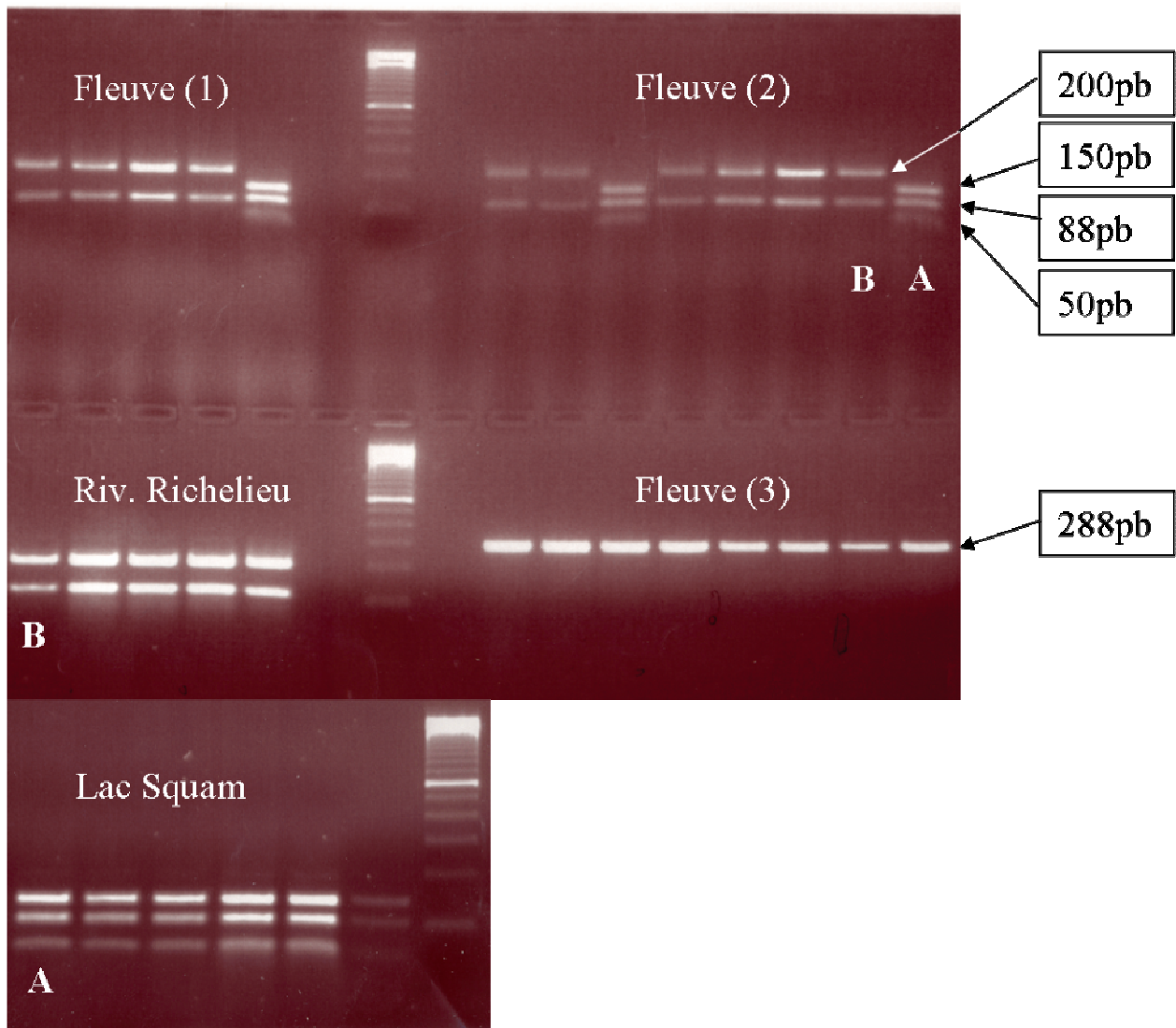
Pour chaque individu, un fragment de 288 paires de base (pb) du gène ND6 de l'ADN mitochondrial a été amplifié par une réaction de polymérase en chaîne (PCR). Un volume de 2,5µl d'ADN provenant de la solution d'extraction a été utilisé pour la réaction. Les détails techniques et les recettes pour l'étape d'amplification sont présentés à l'annexe 1.

### *3- Digestion de la région amplifiée*

Par la suite, le fragment amplifié est digéré avec l'enzyme de restriction *DdeI* 1 pendant 12h à 37°C. Les détails techniques et les recettes pour l'étape de digestion sont présentés à l'annexe 2. Cette enzyme coupe l'ADN lorsqu'elle rencontre une séquence nucléotidique particulière (Figure 1). Le fragment amplifié chez la race Atlantique (clade B) possède un site de reconnaissance pour l'enzyme *DdeI* tandis que le fragment de la race Acadienne (clade A) en possède deux. Pour visualiser l'ADN digéré, une migration sur un gel d'agarose 2% a d'abord été effectuée. Ensuite, le gel a été exposé aux rayons UV. L'exposition aux rayons UV fait apparaître sur le gel des bandes correspondant aux fragments d'ADN produits par la digestion. Ainsi, lors de la visualisation du produit de la digestion sur gel d'agarose, nous détectons toujours deux bandes pour les échantillons de la race Atlantique (clade B) (200 et 88pb) et trois bandes pour les échantillons de la race Acadienne (clade A) (150, 88 et 50pb) (Figure 2). Des échantillons de références ont été employés pour confirmer les patrons de migration (Atlantique – groupe B- « pur » en provenance de la rivière Richelieu; Acadienne – groupe A - « pur » en provenance du lac Squam).



**Figure 1.** Site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *DdeI*.



**Figure 2.** Photo de digestion de l'ADN mitochondrial avec l'enzyme *DdeI*. Fleuve 1 et 2 illustrent le produit de la digestion des larves d'éperlans du site de Beaumont. Fleuve 3 représente le fragment de 288pb du gène ND6 de l'ADN mitochondrial non digéré. Riv. Richelieu illustre le produit de digestion d'échantillons de référence d'une population pure de race glacière Atlantique (clade B) tandis que le Lac Squam illustre le produit de digestion d'échantillons de référence d'une population pure de race glacière Acadienne (clade A) (Bernatchez, 1997).

## Résultats

La race glaciaire a été identifiée chez 108 larves et 19 oeufs d'éperlans arc-en-ciel (Tableau 1). Pour un site donné, le nombre total de larves analysées est inférieur à 25 et correspond au nombre total de larves disponibles et analysables. Parmi celles-ci, seulement 27 (13,5%) au total appartiennent à la race glaciaire Acadienne (clade A) et donc 86,5% appartiennent à la race glaciaire Atlantique (clade B). Ces proportions sont très semblables, sinon quasiment identiques aux proportions des deux clades rapportées dans les années antérieures pour la PRN (87% B vs. 13% A). Dépendamment des sites d'échantillonnage, le pourcentage d'individus appartenant au clade A varie entre 0 et 32,0%.

Date	Site	Échantillon	Clade A	Clade B	Total
01/05/2009 et 04/05/2009	Beaumont	1	1	24	25
06/05/2009 et 07/05/2009	Deschambault	2	3	22	25
07/05/2009 et 08/05/2009	Beaumont	3	3	22	25
06/05/2009 et 08/05/2009	Neuville	4	1	15	16
08/05/2009	Deschambault	5	2	15	17
1-4/05/2009	Beaumont (œufs)	1	1	14	15
8-25/05/2009	Neuville (œufs)	2	0	4	4
	Total		<b>11</b>	<b>116</b>	<b>127</b>

**Tableau 1.** Information et identification de la race glaciaire des larves d'éperlans selon le test de digestion de l'ADN mitochondrial par l'enzyme de restriction *DdeI*. Clade A = race glaciaire Acadienne, Clade B = race glaciaire Atlantique.

Une analyse de stock mixte (MS) permet de déterminer quelle est la contribution de la PRN et de la PRS dans nos échantillons, en utilisant la formule suivante (Bernatchez et coll., 1995):

$$X = (Pm - P2) / (P1 - P2)$$

où Pm est la fréquence du clade A dans l'échantillon analysé et P1 et P2 la fréquence du clade A dans les populations de référence, soit PRS (0,809) et PRN (0,129) respectivement. En absence d'effet de variance lié à un faible échantillonnage, cette analyse donne un chiffre se situant entre 0 et 1. Il faut aussi tenir compte du fait que les estimations de proportions de fréquence des deux clades dans les deux populations remontent maintenant à plusieurs années et il se pourrait que celles-ci aient légèrement fluctué ce qui pourrait aussi affecter faiblement l'estimation de proportions. La multiplication par 100 de ce chiffre permet d'obtenir le pourcentage d'individus de la PRS dans l'échantillon. L'analyse de stock mixte a été menée pour tous les échantillons.

Ces analyses révèlent une contribution de la PRS variant entre -19,0 et -7,0% dépendamment des échantillons (Tableau 2). En raison du faible nombre de larves pour les échantillons 4 et 5, ces deux échantillons ont été regroupés pour les analyses de stock mixte. Les valeurs inférieures à 0% et supérieures à 100% s'expliquent par l'erreur d'échantillonnage qui est associée à l'estimation (X) compte-tenu des nombres relativement faible d'individus. (Pigeon et coll., 1998). Dans ces cas, les échantillons associés à une valeur inférieure à 0% ou supérieure à 100% devraient alors être considérés comme représentatif d'une ou l'autre des populations pures.

Date	Site	Fréquence clade A (%)	Fréquence clade B (%)	Contribution de la PRS (%)	Contribution de la PRN (%)
01/05/2009 et 04/05/2009	Beaumont	4,0	96,0	-13,1	113,1
06/05/2009 et 07/05/2009	Deschambault	12,0	88,0	-7,0	107,0
07/05/2009 et 08/05/2009	Beaumont	12,0	88,0	-7,0	107,0
06/05/2009 et 08/05/2009	Neuville/ Deschambault	9,4	90,6	-9,6	109,6
08/05/2009	Beaumont (œufs)	6,7	93,3	-12,2	112,2
1-4/05/2009	Neuville (œufs)	0	100	-19,0	119,0

**Tableau 2.** Analyse de stock mixte (MS) pour chaque échantillon d'éperlans arc-en-ciel capturés dans le fleuve Saint-Laurent en 2009.

## Conclusions

Les analyses effectuées révèlent que le pourcentage d'individus appartenant au clade A varie entre 0 et 12,0% et que la contribution de la PRS dans chacun des échantillons varie entre -19,0 et -7,0%. Il semble donc qu'en l'ensemble des larves et des œufs capturés en 2009 appartiennent à la PRN. Ce résultat identique à l'année 2008 amène à se questionner sur la variabilité temporelle de la représentation des diverses populations quant aux larves capturées aux alentours de Beaumont. En 2007, deux études ont identifiées une forte contribution de la PRS aux échantillons recueillis. La première étude basée sur des larves recueillies lors des travaux d'évaluation environnemental pour le projet Rabaska (GENIVAR, 2007) a déterminé une forte contribution de larves de la PRS (75% de 28 individus analysés sur un total de 248 larves capturées) dans un échantillon recueillis au-dessus des sites de déposition des œufs (Thériault, 2007). La deuxième étude portant sur des larves capturées dans la colonne d'eau, de Québec à Beaumont, en 2007 (Brisson-Bonenfant, 2008) a conclu à la prédominance de larves de la PRS partout dans la zone d'étude. Les conclusions de cette dernière étude doivent cependant être interprétés avec une certaine caution car l'analyse moléculaire fut laborieuse (Brisson-Bonenfant, comm. pers.), probablement relié à des problèmes de conservation des échantillons qui ont affecté la qualité et la quantité d'ADN. L'ensemble des données moléculaires recueillies à ce jour sur les larves dérivant à proximité de l'incubateur de Beaumont devrait donc être synthétisé et ré-analysé pour tirer des conclusions robustes sur la contribution des deux populations d'éperlans au nuage larvaire dérivant dans l'estuaire fluvial et sur l'appartenance des sites de fraie identifiés sur les hauts-fonds à proximité de l'incubateur de Beaumont (ruisseau de l'Église).

## Référence

Bernatchez, L., Martin, S., Bernier, A., Tremblay, S., Trencia, G., Verreault, G. et Vigneault, Y. (1995) Conséquences de la structure génétique de l'éperlan-arc-en-ciel (*Osmerus mordax*) pour la réhabilitation de l'espèce dans l'estuaire du Saint-Laurent. Saint-Laurent Vision 2000, Québec City, Canada.

Bernatchez, L. & Martin, S. (1996) Mitochondrial DNA diversity in anadromous rainbow smelt, *Osmerus mordax* Mitchill: a genetic assessment of the member-vagrant hypothesis. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 53: 424-433.

Bernatchez, L. (1997) Mitochondrial DNA analysis confirms the existence of two glacial races of rainbow smelt (*Osmerus mordax*) and their reproductive isolation in the St. Lawrence R. Estuary (Québec, Canada). Molecular Ecology. 7: 73-83.

GENIVAR. 2007. *Projet RABASKA - Vérification d'indices de reproduction de l'éperlan arc-en-ciel dans l'estuaire fluvial du Saint-Laurent en 2007, secteur de Lévis-Beaumont – Rapport Final*. Rapport de GENIVAR Société en commandite à SNC-Lavalin et à RABASKA. 12 p. et annexes.

Lecomte, F. & Dodson, J.J. (2004) Role of early life-history constraints and resource polymorphism in the segregation of sympatric populations of an estuarine fish, Evolutionary Ecology Research, 6: 631-658.

Olsen, J.B., Wenburg J.K., Bentzen P. (1996) Semiautomated multilocus genotyping of Pacific salmon (*Oncorhynchus* sp.) using microsatellites. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 5: 259–272.

Pigeon, D., Dodson, J.J. & Bernatchez, L. (1998) A mtDNA analysis of spatio-temporal distribution of two sympatric larval populations of rainbow smelt (*Osmerus mordax*) in the St. Lawrence River estuary, Québec, Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 55: 1739–1747.

Thériault, V. 2007. Identification génétique des éperlans arc-en-ciel capturés à la station #95. Rapport d'analyses effectuée pour le Consortium Rabaska.

Trencia, G., Verreault, G., Legault, M., & Tremblay, V. (2004) L'éperlan arc-en-ciel (*Osmerus mordax*) anadrome mordax du sud de l'estuaire du Saint-Laurent: Une population en voie de désignation comme espèce vulnérable. Le Naturaliste Canadien, 129: 86-94.



## *Annexe 1*

Protocoles utilisés pour les amplifications du gène ND6

Solutions requises :

- 1 Tampon 5X (100 mM Tris-HCL pH 9; Triton X-100 1%; 500mM KCL)
- 2 MgCl<sub>2</sub> : 25 mM
- 3 Amorces: 10 µM
- 4 dNTP : 2,5 mM
- 5 Taq polymérase : 5U/µl
- 6 ADN : 10-20 ng/µl

Une région de 288 paires de bases du gène ND6 de l'ADN mitochondrial a été amplifiée. Les quantités en microlitres (µl) des solutions de départ nécessaires aux réactions PCR sont présentées ci-bas pour une réaction. Pour chacune des réactions PCR, le volume final était de 11 µl (8,5 µl du mélange et 2,5 µl d'ADN).

<b>ND6</b>	<b>XI</b>
5X	2
MgCl <sub>2</sub>	0,7
dNTP	0,8
ND56R250	0,5
ND56R450v	0,5
H2O	5,3
Taq	0,2
ADN	2,5

Les conditions lors de la PCR étaient les suivantes :

Programme ND6

2 min @ 95°C (1 min @ 95°C; 1 min @ 48°C; 1 min @ 72°C)<sub>32</sub> 5 min @ 72°C

## *Annexe 2*

Protocoles utilisés pour la digestion du fragment PCR

Solutions requises :

- 1 PCR
- 2 Tampon 10X (100 mM Tris-HCL pH 9; Triton X-100 1%; 500mM KCL)
- 3 *DdeI*: (10U/ $\mu$ l)

Les quantités en microlitres ( $\mu$ l) des solutions de départ nécessaires aux réactions de digestion sont présentées ci-bas pour une réaction. Pour chacune des réactions de digestion, le volume final était de 12,2  $\mu$ l (2,2  $\mu$ l du mélange et 10  $\mu$ l de la PCR).

	<i>XI</i>
10X	1,2
PCR	10
<i>DdeI</i>	1

Les conditions lors de la digestion étaient les suivantes :

Programme *Digestion*

12 h @ 37°C