

Identification génétique des larves d'éperlans arc-en-ciel capturées dans le fleuve Saint-Laurent en 2008

Guillaume Côté et Louis Bernatchez

Département de Biologie
Université Laval
Sainte-Foy, QC
G1V 0A6

Auteur pour correspondance :
Dr Louis Bernatchez

Département de Biologie, Université Laval
Québec, Canada, G1V 0A6
Tél: 1-418-656-3402; Téléc.: 1-418-656-7176
Courriel: louis.bernatchez@bio.ulaval.ca

20 mars 2009

Introduction

Les populations d'éperlans arc-en-ciel (*Osmerus mordax*) du fleuve St-Laurent sont issues de deux races glaciaires. Il y a 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. Lors du retrait des glaces, ces deux races ont colonisé le fleuve Saint-Laurent par le biais de routes différentes, soit par les rivières des États-Unis pour la race Acadienne et par le golfe du Saint-Laurent pour la race Atlantique. 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. Bernatchez et Martin (1996) ont estimé que 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).

La PRS est désignée comme espèce vulnérable en vertu de la Loi sur les espèces menacées ou vulnérables du Québec depuis 2005. 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 recensées étaient situées dans quatre tributaires du fleuve sur la rive sud.

Des inventaires réalisés depuis 2005 démontrent toutefois l'existence d'une frayère dans l'estuaire du fleuve Saint-Laurent, utilisée par des individus qui appartiennent à la PRS. 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.

En 2008, le MRNF a poursuivi l'inventaire des larves d'éperlan dans le secteur de Beaumont afin de préciser le secteur utilisé 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 2008. Étant donné qu'il est impossible de déterminer visuellement à quelle population un individu, 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 ancestral a été identifié pour 200 larves d'éperlan arc-en-ciel provenant de huit échantillons récoltés dans le fleuve Saint-Laurent en mai 2008 à Beaumont et St-Michel. Ces larves ont été capturées les 9, 13, 16 et 19 mai 2008. La méthode décrite par Pigeon et al. (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 al., 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* 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).



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

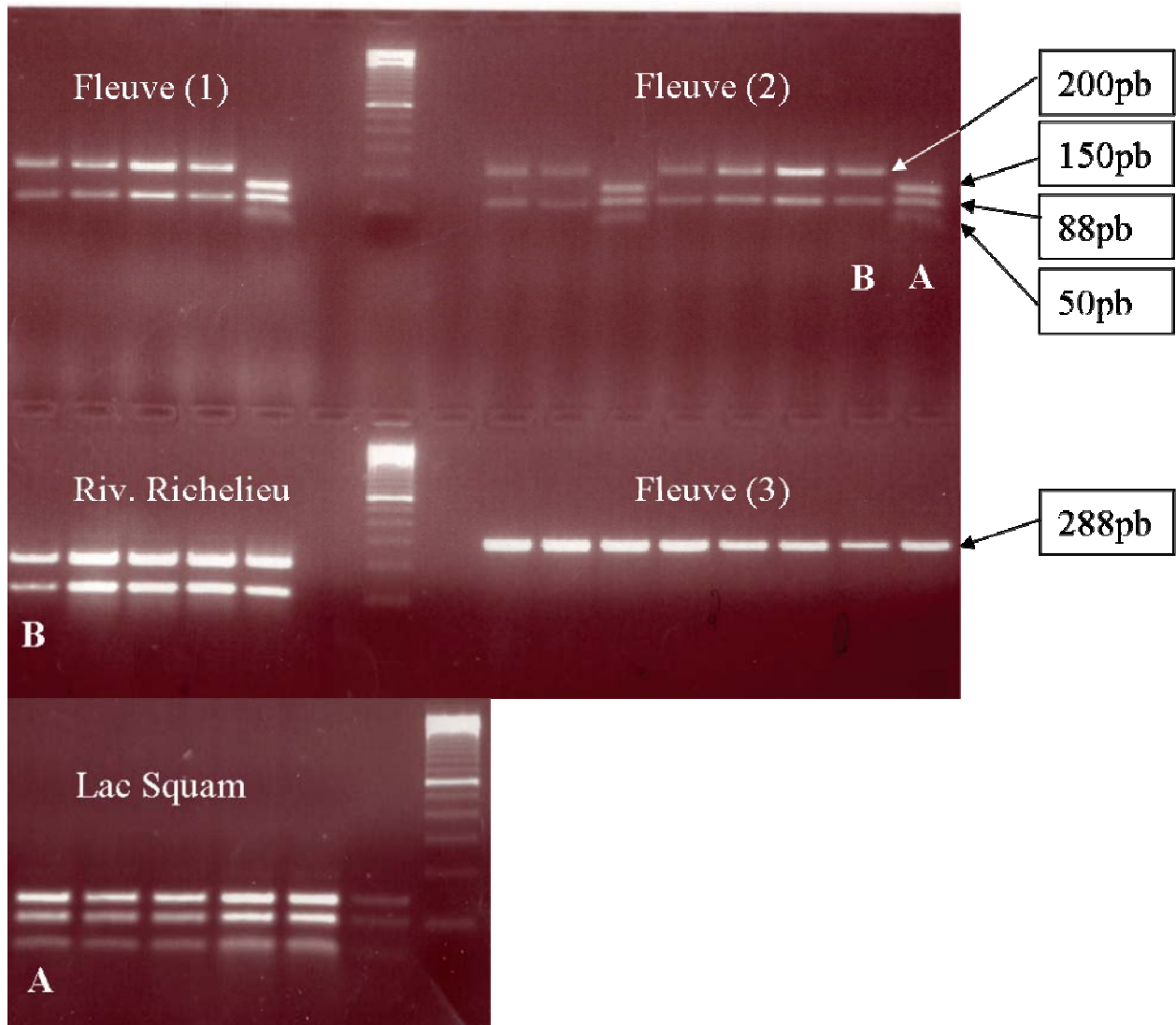


Figure 2. Photo de digestion de l'ADN mitochondrial avec l'enzyme *DdeI*. Fleuve 1 et 2 illustrent le produit de la digestion des larves d'éperlans du site de Beaumont. Fleuve 3 représente le fragment de 288pb du gène ND6 de l'ADN mitochondrial non digéré. Riv. Richelieu illustre le produit de digestion 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 glacière a été identifiée chez 200 larves 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 glacière Acadienne (clade A) et donc 86,5% appartiennent à la race glacière Atlantique (clade B). Ces proportions sont essentiellement 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	Station	Clade A	Clade B	Total
09-05-08	Beaumont	1	1	9	10
		2	1	8	9
		3	1	9	10
09-05-08	St-Michel	1	2	13	15
		2	2	13	15
13-05-08	Beaumont	1	1	9	10
		2	0	8	8
		3	1	7	8
13-05-08	St-Michel	1	1	9	10
		2	0	10	10
		3	1	8	9
16-05-08	Beaumont	1	1	9	10
		2	1	6	7
		3	2	8	10
16-05-08	St-Michel	1	0	9	9
		2	0	8	8
		3	4	4	8
19-05-08	Beaumont	1	0	6	6
		2	0	3	3
19-05-08	St-Michel	1	0	4	6
		2	0	2	2
		3	6	11	17
	Total		27	173	200

Tableau 1. Information et identification de la race glacière des larves d'éperlans selon le test de digestion de l'ADN mitochondrial par l'enzyme de restriction *DdeI*. Clade A = race glacière Acadienne, Clade B = race glacière 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 (Pigeon et coll. 1998):

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

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. En raison du faible nombre d'échantillons par station, les analyses de stock mixte ont été réalisées par site. 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 supérieure à 100% devraient alors être considérés comme représentatif d'une ou l'autre des populations pures. Ces analyses révèlent une contribution de la PRS variant entre -19,0 (0%) et 28,1% dépendamment des échantillons (Tableau 2).

Date	Site	Fréquence clade A (%)	Fréquence clade B (%)	Contribution de la PRS (%)	Contribution de la PRN (%)
09-05-08	Beaumont	10,3	89,7	-3,8	103,8
09-05-08	St-Michel	13,3	86,7	0,6	99,4
13-05-08	Beaumont	7,7	92,3	-7,7	107,7
13-05-08	St-Michel	6,9	93,1	-8,8	108,8
16-05-08	Beaumont	14,8	85,2	2,8	97,2
16-05-08	St-Michel	16,0	84,0	4,6	95,4
19-05-08	Beaumont	0,0	100,0	-19,0	119,0
19-05-08	St-Michel	32,0	68,0	28,1	71,9

Tableau 2. Analyse de stock mixte (MS) pour chaque échantillon d'éperlans arc-en-ciel capturés dans le fleuve Saint-Laurent en 2008.

Conclusions

À la lumière de ces analyses, il est évident que tous les échantillons analysés sont largement dominés par l'occurrence de larves provenant de la PRN, la contribution minimale observée pour celle-ci étant de 92%. Il y a aucun doute sur ces estimations ; la figure 2 illustre clairement que le génotype prédominant dans les échantillons est bien celui du clade B (origine Atlantique que pour la Rivière Richelieu), lequel prédomine dans la population PRN. De même, tous les échantillons analysés présentaient des profils de bades très clairs et facilement interprétables. Enfin, la prédominance du clade B dans les échantillons est également conforme aux observations de Pigeon et coll. (1998).

Référence

Bernatchez, L. & S. Martin (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.

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.

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 MgCl₂ : 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).

ND6	XI
5X	2
MgCl ₂	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)₃₂ 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 *Dde*I: (10U/ μ l)

Les quantités en microlitres (μ 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 μ l (2,2 μ l du mélange et 10 μ l de la PCR).

	<i>XI</i>
10X	1,2
PCR	10
<i>Dde</i> I	1

Les conditions lors de la digestion étaient les suivantes :

Programme *Digestion*

12 h @ 37°C