



UNIVERSITÉ
LAVAL

Complexe de la Romaine

Caractérisation génétique des populations de saumon atlantique

Décembre 2006



UNIVERSITÉ
LAVAL

Complexe de la Romaine

Caractérisation génétique des populations de saumon atlantique

Rapport sectoriel

présenté à

GENIVAR Société en commandite

et

Hydro-Québec Équipement

Décembre 2006

Auteur(s) et titre (pour fins de citation) :

Albert, V., Bernatchez, L. 2006. *Complexe de la Romaine – Caractérisation génétique des populations de saumon atlantique. Rapport sectoriel* présenté par l'Université Laval à GENIVAR Société en commandite et à Hydro-Québec Équipement. 30 p. et annexes.

Contexte et objectifs :

Cette étude a été réalisée dans le contexte du projet de complexe de la Romaine. Elle vise à caractériser le patron génétique observé chez les populations de saumon atlantique (*Salmo salar*) de la rivière Romaine et de la rivière Puyjalon.

Résumé :

Hydro-Québec projette la réalisation d'un complexe hydroélectrique d'environ 1 500 Mégawatts (MW) sur la rivière Romaine dans la région de la Moyenne-Côte-Nord tout juste au nord de la municipalité de Havre-Saint-Pierre (Québec). Ce complexe consiste essentiellement en la construction de quatre aménagements hydroélectriques. Le présent rapport a pour objectif de caractériser les stocks de saumon atlantique de la rivière Romaine et un de ses affluents, la rivière Puyjalon.

La Romaine est une rivière à saumon et un cours d'eau majeur de la région de la Côte-Nord. Même si le rendement de la pêche sportive y est faible, le saumon atlantique demeure la ressource faunique la plus prisée de la rivière. Quant à la rivière Puyjalon, elle est l'affluent principal de la Romaine dont les branches principale et secondaire s'y jettent en aval de la Grande Chute aux points kilométriques 11 et 13. Cette rivière représente aussi un habitat important pour l'espèce.

La caractérisation génétique des stocks de saumon atlantique des rivières Romaine et Puyjalon a été effectuée à l'aide de onze marqueurs microsatellites et a permis de déterminer si les deux rivières abritaient des populations génétiquement distinctes en plus de quantifier l'ampleur de la différenciation entre celles-ci. La première étape consistait à comparer la distribution des fréquences alléliques. Ensuite, l'ampleur de la différenciation génétique a été évaluée. Finalement, une analyse de la variance moléculaire a permis de vérifier l'effet des cohortes sur la variance observée dans les échantillons.

Les analyses statistiques ont permis de conclure que les individus de la Romaine étaient significativement différents des spécimens de la Puyjalon. Ce résultat est confirmé par les tests de différence entre les distributions de fréquences alléliques, les mesures de l'ampleur de la différenciation génétique (F_{ST}) de même que l'analyse moléculaire de la variance. En effet, ces trois tests indiquent tous une différence significative entre les deux populations.

Par conséquent, malgré la proximité des deux cours d'eau, la population de la Romaine est significativement différente de la population de la Puyjalon avec une valeur significative de F_{ST} de 0,036.

Mots clés : saumon atlantique, structure génétique, diversité génétique, microsatellite, rivière Romaine, rivière Puyjalon, complexe de la Romaine.

Versión : Finale

Code de diffusion : Interne-externe

Date : Décembre 2006

Équipe de réalisation

Hydro-Québec Équipement

Chargé de projet

: Michel Bérubé

GENIVAR Société en commandite

Chargé de projet principal

: Frédéric Lévesque

Université Laval (département de biologie)

Responsable de projet

: Louis Bernatchez

Analyses en laboratoire, traitements
des données, rédaction

: Vicky Albert

Table des matières

	<i>Page</i>
Sommaire.....	v
Équipe de réalisation	vii
Table des matières	ix
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xi
Liste des cartes.....	xi
Liste des annexes	xii
1. INTRODUCTION	1
1.1 MISE EN CONTEXTE.....	1
1.2 OBJECTIFS GÉNÉRAUX	1
2. ZONE D'ÉTUDE	5
3. MÉTHODES.....	7
3.1 ÉCHANTILLONNAGE.....	7
3.2 ANALYSES EN LABORATOIRE.....	7
3.2.1 Sélection des marqueurs génétiques.....	7
3.2.2 Extraction de l'ADN.....	8
3.2.3 Amplification des loci microsatellites.....	8
3.2.4 Migration et détermination du génotype.....	10
3.3 ANALYSES STATISTIQUES DES DONNÉES	10
3.3.1 Statistiques descriptives	10
3.3.3 Estimation du nombre de populations.....	11
3.3.3 Distribution des fréquences alléliques	12
3.3.4 Différenciation génétique	12
3.3.5 Analyse de la variance.....	13
4. RÉSULTATS.....	15
4.1 STATISTIQUES DESCRIPTIVES	15
4.2 ESTIMATION DU NOMBRE DE POPULATIONS	17
4.3 FRÉQUENCES ALLÉLIQUES.....	18
4.4 DIFFÉRENCIATION GÉNÉTIQUE	21
4.5 ANALYSE DE LA VARIANCE	21
5. DISCUSSION.....	23
5.1 DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE	23
5.2 NOMBRE DE POPULATIONS ESTIMÉ	24
5.3 COMPARAISON AVEC D'AUTRES ÉTUDES.....	25
6. CONCLUSION	27
7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	29

Liste des tableaux

	Page
Tableau 3-1.	Nombre d'échantillons d'écailles de saumon utilisé par stade de vie, pour chaque rivière. L'année d'échantillonnage est entre parenthèse..... 7
Tableau 3-2.	Informations sur les loci utilisés pour la caractérisation génétique..... 9
Tableau 4-1.	Statistiques descriptives de la variabilité allélique aux 11 marqueurs microsatellites au sein des deux groupes de saumons analysés. Nombre d'échantillons analysés (M), nombre d'allèles à chacun des loci (A), allèle le plus commun (A_c , en paires de bases), fréquence de l'allèle le plus commun (F_c), étendue de la taille des allèles (A_R), hétérozygotie observée (H_o), hétérozygotie attendue à chacun des loci (H_E) et hétérozygotie moyenne (H_M). d indique un déficit en hétérozygotes significatif ($p < 0,05$)..... 16
Tableau 4-2.	Indices $ln P(D)$ et K calculés afin de déterminer le nombre de populations (K) le plus probable. 17
Tableau 4-3.	Valeurs de probabilité locus par locus et multilocus pour les tests de différenciation génétique entre les rivières Romaine et Puyjalon basés sur les fréquences alléliques. 21
Tableau 4-4.	Résultats de l'analyse de la variance. 22

Liste des figures

Figure 4-1.	Proportion pour chaque échantillon de son génome provenant de chacun des regroupements simulés pour un nombre de populations (K) de deux et de trois. Chaque échantillon est représenté par une barre verticale. Chaque couleur réfère à un regroupement. La proportion de la barre verticale représentée par une couleur est directement proportionnelle à la proportion du génome de cet individu provenant de ce regroupement. 18
Figure 4-2.	Distribution des fréquences alléliques pour chacun des 11 loci et pour les deux groupes de saumons analysés. La surface de chaque cercle est directement proportionnelle à la fréquence relative de l'allèle dans la population. 19

Liste des cartes

Carte 1-1	Complexe de la Romaine – Portion accessible au saumon atlantique	3
-----------	--	---

Liste des annexes

- Annexe 1 Caractéristiques des aménagements hydroélectriques du complexe de la Romaine
- Annexe 2 Informations sur les échantillons utilisés pour les analyses
- Annexe 3 Protocoles pour les amplifications et la migration sur capillaires
- Annexe 4 Géotypes des échantillons aux loci microsatellites utilisés pour les analyses statistiques

1. Introduction

1.1 Mise en contexte

Hydro-Québec projette la réalisation d'un complexe hydroélectrique d'environ 1 500 Mégawatts (MW) sur la rivière Romaine dans la région de la Moyenne-Côte-Nord tout juste au nord de la municipalité de Havre-Saint-Pierre (Québec). Ce complexe consiste essentiellement en la construction de quatre aménagements hydroélectriques dont les caractéristiques sont présentées à l'annexe 1 (tiré de GENIVAR, 2006). La mise en place des barrages mènerait à la formation de quatre grands réservoirs, les réservoirs de la Romaine 1, de la Romaine 2, de la Romaine 3 et de la Romaine 4. De plus, ces barrages seraient situés entre les points kilométriques 52,5 et 192,5 de la rivière.

Le projet de complexe de la rivière Romaine fait actuellement l'objet d'études dans le but d'obtenir suffisamment de données pour la prise de décision quant à sa réalisation. Ces études visent entre autre la définition des caractéristiques de l'environnement et la détermination des impacts sur l'environnement. La Romaine est une rivière à saumon atlantique (*Salmo salar*)¹ et un cours d'eau majeur de la région de la Côte-Nord. Même si le rendement de la pêche sportive y est faible, le saumon demeure la ressource faunique la plus prisée de la rivière. S'insérant dans ce contexte, le présent rapport a pour objectif de caractériser les stocks de saumons de la rivière Romaine et un de ses affluents, la rivière Puyjalon (Carte 1-1). Pour ce faire, des analyses génétiques seront réalisées à partir d'échantillons d'écaillés de saumons prélevés en 2001 et 2003 dans la rivière Romaine et en 2001 dans la rivière Puyjalon. La caractérisation génétique s'effectuera avec des marqueurs microsatellites et permettra de déterminer si les deux rivières abritent des populations génétiquement distinctes et, le cas échéant, de quantifier l'ampleur de la différenciation entre celles-ci.

Ainsi, dans un premier temps, le présent rapport décrit succinctement la zone d'étude (chapitre 2). Par la suite, la méthodologie utilisée pour caractériser génétiquement les stocks de saumons est présentée au chapitre 3. Les résultats suivent ensuite au chapitre 4 et leur interprétation est donnée à l'aide d'une discussion au chapitre 5.

1.2 Objectifs généraux

S'insérant dans le cadre du projet de développement hydroélectrique de la rivière Romaine, la présente étude a pour objectif principal de déterminer si les saumons du cours principal de la rivière Romaine sont différents génétiquement de ceux de son affluent, la rivière Puyjalon. Plus spécifiquement, elle consiste à :

- Extraire l'ADN des échantillons d'écaillés disponibles;

¹ Saumon sera le nom utilisé pour désigner l'espèce afin d'alléger le texte dans ce document.

- Caractériser génétiquement chaque échantillon à un nombre suffisant de marqueurs microsatellites;
- Effectuer les analyses statistiques permettant de conclure sur le degré de différenciation génétique entre les échantillons de la rivière Romaine et ceux de la rivière Puyjalon.



Habitat

- Tronçon accessible au saumon

Obstacles

- 1^{er} obstacle infranchissable pour le saumon
- Obstacle franchissable avec réserve pour le saumon
- Obstacle franchissable pour le saumon

Échantillonnages

Station juvénile

- ▲ PL-3-8
 - Numéro de station
 - Engin
 - PL Pêche à la ligne
 - SE Seine de rivage

Station smolt

- ▲ PR1
 - Point kilométrique
 - Recapture smolt
 - Rivière Puyjalon

Station adulte

- ▲ RA16
 - Point kilométrique
 - Adulte
 - Rivière Romaine

Infrastructures

- ✈ Aéroport
- ✈ Aérodrome
- Route principale
- Route secondaire
- Chemin
- ▲ Poste et ligne de transport

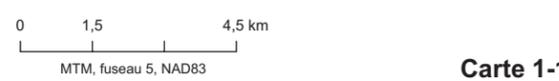
Composantes du projet

- Réservoir (Niveau maximal d'exploitation)
- PK 190 Point kilométrique de rivière
- Centrale hydroélectrique
- Route d'accès

Complexe de la Romaine
Caractérisation génétique des populations de saumon atlantique de la rivière Romaine

Portion accessible au saumon atlantique

Sources :
BDTA, 1 : 250 000, 2002
SDA, 1 : 20 000, 2004
MRNF Québec
Sites de campement proposés, Polygéo, octobre 2004
Inventaires : GENIVAR, 2004
Cartographie : GENIVAR
Fichier : 0344_c1-1_ge_470_061205.th10



2. Zone d'étude

Les stocks de saumons à l'étude proviennent de deux rivières distinctes situées dans la région de la Côte-Nord, soit la rivière Romaine et la rivière Puyjalon. La Romaine est une rivière à saumon de 496 km de longueur avec un bassin versant d'une superficie de 14 350 km² et un débit moyen de 340 m³/s. La rivière est accessible aux saumons jusqu'au point kilométrique (PK) 52,5 où se trouve la Grande Chute, un obstacle infranchissable pour ce dernier. Un décompte de nids réalisé en 2003 a recensé la présence de 81 nids surtout concentrés dans la section plus en aval du cours principal de la rivière Romaine (Belles-Isles et coll., 2004).

Quant à la rivière Puyjalon, elle est l'affluent principal de la Rivière Romaine et se jette dans la rivière Romaine aux PK 11 et 13. Cette rivière est composée d'une branche principale et d'une branche secondaire, la rivière Bat-le-Diable, et représente aussi un habitat important pour le saumon. Belles-Isles et ses collaborateurs (2004) ont recensé les nids de la rivière Puyjalon en 2003 pour le cours principal ainsi que pour les deux principaux tributaires, les rivières Bat-le-Diable et Allard. Ils ont observé 31 nids dans le cours principal, 68 nids dans la rivière Bat-le-Diable et 16 nids dans la rivière Allard.

Finalement, selon le décompte de nids effectué pendant la fraie à l'automne 2003 dans les deux cours d'eau, la répartition du stock reproducteur entre la Romaine et la Puyjalon est d'environ 40:60 (Belles-Isles et coll., 2004).

3. Méthodes

3.1 Échantillonnage

La plupart des échantillons d'écailles utilisés dans la présente étude avaient déjà été recueillis dans le cadre d'une étude menée en 2001 par le Groupe conseil GENIVAR, visant entre autre l'évaluation de l'abondance et de la répartition des saumons adultes et juvéniles de la rivière Romaine (GENIVAR, 2002). Les écailles avaient alors été utilisées afin de déterminer l'âge des saumons échantillonnés. Une fraction de ces échantillons a donc été sélectionnée afin de permettre la caractérisation et la comparaison sur le plan génétique des stocks de saumons de la rivière Romaine et de la rivière Puyjalon. D'autres échantillons d'écailles prélevés sur des saumons adultes lors d'une étude de télémétrie dans la Romaine en 2003 (Belles-Isles et coll., 2004) complètent les échantillons analysés. Leur provenance est illustrée sur la carte 1-1.

La totalité des échantillons de saumons adultes disponibles a été utilisée, alors que pour les juvéniles, 50 échantillons par rivière ont été sélectionnés (tableau 3-1). Une attention particulière, dans le cas des échantillons de saumons juvéniles, a été portée afin de conserver des juvéniles issus de la même cohorte pour la rivière Puyjalon. Dans le cas des échantillons de la rivière Romaine, il n'y avait pas suffisamment d'échantillons d'une même cohorte ce qui nous a obligé à prendre des individus de deux classes d'âge. Des informations supplémentaires relatives aux échantillons utilisés pour les analyses sont disponibles à l'annexe 2.

Tableau 3-1. Nombre d'échantillons d'écailles de saumon utilisé par stade de vie, pour chaque rivière. L'année d'échantillonnage est entre parenthèse.

Stade	Romaine	Puyjalon
Juvénile	50 (2001)	50 (2001)
Adulte	10 (2003)	25 (2001)

3.2 Analyses en laboratoire

3.2.1 Sélection des marqueurs génétiques

La sélection des marqueurs génétiques utilisés est une étape déterminante pour l'atteinte des objectifs d'un projet. Chaque type de marqueur a ses forces et ses limitations et leur pertinence varie en fonction de la problématique. Dans le cas d'une caractérisation génétique de populations en milieu naturel, les marqueurs microsatellites sont souvent utilisés. Les avantages des marqueurs microsatellites sont qu'ils présentent, entre autre, un degré de polymorphisme variable, ils sont relativement faciles à obtenir et leur analyse est robuste. Ces marqueurs sont en fait des régions du génome qui présentent des séquences de 2 à 4 bases répétées en tandem un certain nombre de fois (ex. GATAGATAGATAGATA). Chaque région identifiée comme un microsatellite est un locus. Chaque individu possède deux copies distinctes de chaque locus, chacune de ces copies est appelée un allèle. Dans le cas

des marqueurs microsatellites, c'est le nombre de répétitions de la séquence répétée en tandem qui fait varier la taille en paires de bases des allèles. C'est donc cette variabilité qui est utilisée afin de comparer les individus entre eux.

Étant donné que le degré de variabilité est différent pour chaque locus, il est important de choisir des microsatellites ayant une variabilité suffisante à l'intérieur des populations à l'étude et permettant ainsi de caractériser chacune des populations et de déterminer le degré de différenciation qui existe entre elles. Les marqueurs utilisés pour la présente étude ont déjà été utilisés pour la caractérisation génétique de nombreux autres stocks de saumons au Québec et présentent un degré de variabilité amplement suffisant. Au total, 14 loci ont été utilisés initialement, les informations relatives à ces loci sont présentées au tableau 3-2.

3.2.2 Extraction de l'ADN

La première étape des manipulations en laboratoire consiste à extraire l'ADN génomique des écailles de saumons. Cette étape permettra d'isoler l'ADN en solution aqueuse et permettra ensuite de procéder aux étapes subséquentes. Tout d'abord, il s'agit de digérer les écailles avec une enzyme qui dégrade les protéines, la protéinase K, ce qui a pour effet de libérer l'ADN des cellules. Ensuite, le produit de digestion est purifié à l'aide de membranes d'affinités afin d'éliminer les protéines et les sels de la solution et de conserver seulement l'ADN. Dans ce cas-ci, c'est la trousse d'extraction DNeasy Tissue kit (QIAGEN Inc.) qui a été utilisée en suivant les directives de la procédure standard. Sommairement, la membrane fixée dans les colonnes fournies retient l'ADN, il suffit de faire passer des tampons nettoyants par centrifugation à travers la membrane afin d'éliminer les résidus de protéines et les sels. À la fin, l'ADN est resuspendu dans l'eau, élué pour être finalement conservé dans des tubes individuels à -20°C. Étant donné la faible qualité habituelle de l'ADN extrait à partir d'échantillons d'écailles, le volume d'eau pour l'éluion a été réduit de 80% par rapport au volume proposé dans le protocole standard. Cette seule modification avait pour but de récupérer la même quantité d'ADN dans un plus petit volume afin d'avoir une concentration suffisante pour les étapes subséquentes.

3.2.3 Amplification des loci microsatellites

Une fois l'ADN isolé, la prochaine étape est la réaction de polymérisation en chaîne (PCR pour « polymerase chain reaction »). Cette étape consiste à sélectionner et amplifier à volonté une région du génome permettant ainsi la visualisation des fragments, dans ce cas-ci, des loci microsatellites. La région qui est copiée est délimitée grâce à deux oligonucléotides qui sont de courts segments d'ADN synthétisés, appelés aussi amorces, dont la séquence est complémentaire à une des deux extrémités du fragment d'ADN recherché. Par la suite, une réaction enzymatique est enclenchée afin de créer une copie du fragment compris entre les deux amorces. Ces étapes sont répétées jusqu'à ce qu'un nombre suffisant de fragments soient créés permettant ainsi de visualiser la région amplifiée. Les détails techniques et les recettes pour les étapes de l'amplification sont présentés à l'annexe 3.

Tableau 3-2. Informations sur les loci utilisés pour la caractérisation génétique.

Locus	Séquence des amorces (5'-3')	Molécule fluorescente	Motif	Température d'appariement (°C)	Référence
<i>Ssa-85</i>	a : AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC b : ACCCGCTCCTCACTTAATC* ¹	PET (Rouge)	GT	56	(Oreilly et coll., 1996)
<i>Ssa-197</i>	a : GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG b : TGGCAGGGATTTGACATAAC*	VIC (Vert)	GTGA	56	(Oreilly et coll., 1996)
<i>Ssa-202</i>	a : CTTGGAATATCTAGAATATGGC b : TTCATGTGTTAATGTTGCGTG*	VIC (Vert)	GTGA	56	(Oreilly et coll., 1996)
<i>SsaD71</i>	F : AACGTGAAACATAAATCGATGG* R : TAAGAATGGGTTGCCTATGAG	PET (Rouge)	TAGA	60	(King et coll., 2005)
<i>SsaD85</i>	F : CTTTGGCTGTTTCAGGTATGAC* R : CACTGCTCTACAACAGAAGTCTC	FAM (Bleu)	TAGA	60	(King, comm. pers.) ²
<i>SsaD144</i>	F : TTGTGAAGGGGCTGACTAAC* R : TCAATTGTTGGGTGCACATAG	FAM (Bleu)	TAGA	60	(King et coll., 2005)
<i>Ssosl417</i>	F : TTGTTTCAGTGTATATGTGTCCCAT* R : GATCTTCACTGCCACCTTATGACC	FAM (Bleu)	GT	56	(Slettan et coll., 1995)
<i>SsspG7</i>	F : CTTGGTCCCCTTCTTACGACAACC* R : TGCACGCTGCTTGGTCCTTG	PET (Rouge)	GATA	58	(Paterson et coll., 2004)
<i>Sssp1605</i>	F : CGCAATGGAAGTCAGTGGACTGG* R : CTGATTTAGCTTTTTAGTGCCCAATGC	NED (Jaune)	GATA	58	(Paterson et coll., 2004)
<i>Sssp2201</i>	F : TTTAGATGGTGGGATACTGGGAGGC* R : CGGGAGCCCCATAACCCTACTAATAAC	PET (Rouge)	GATA	58	(Paterson et coll., 2004)
<i>Sssp2210</i>	F : AAGTATTCATGCACACACATTCCTGC* R : CAAGACCCTTTTTCCAATGGGATTC	FAM (Bleu)	GATA	58	(Paterson et coll., 2004)
<i>Sssp2215</i>	F : ACTAGCCAGGTGTCTGCGGTC* R : AGGGTCAGTCAGTCACACCATGCAC	NED (Jaune)	GATA	58	(Paterson et coll., 2004)
<i>Sssp2216</i>	F : GGCCCAGACAGATAAACAAACACGC* R : GCCAACAGCAGCATCTACACCCAG	VIC (Vert)	GATA	58	(Paterson et coll., 2004)
<i>MST-3</i>	1 : CCCTGGTTTGACTTTGTCTCA* 2 : AGGCACTCTCACCAGCTAAAGATG	PET (Rouge)	CT	56	(Presa et Guyomard, 1996)

1 L'astérisque indique l'amorce à laquelle est fixée la molécule fluorescente

2 Tim King, United States Geological Survey, octobre 2001, comm. pers.

3.2.4 Migration et détermination du génotype

Afin de visualiser les fragments produits lors de la réaction PCR, un séquenceur automatique a été utilisé (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Inc.). Le principe des séquenceurs automatiques consiste à faire migrer par électrophorèse les fragments d'ADN à travers une matrice de polymère. C'est la force du champ électrique qui fait déplacer les molécules d'ADN étant elles-mêmes chargées négativement. Les fragments d'ADN sont séparés au cours de la migration en fonction de leur longueur, les fragments plus courts migrants plus rapidement à travers la matrice de polymère que les fragments plus longs. Les fragments sont visualisés à la fin du parcours de migration à l'aide d'un laser qui détecte les molécules fluorescentes présentes sur les fragments amplifiés (préalablement fixées aux amorces utilisées). En plaçant un standard de taille (solution avec différents fragments de tailles connues) dans chaque puit, la taille des différents allèles peut être déterminée de façon très précise. Les informations relatives aux résultats de migration sont stockées dans des fichiers informatiques.

Le séquenceur automatique ABI Prism 3100 Genetic Analyzer a le potentiel de détecter et de discriminer cinq molécules fluorescentes différentes. Ainsi, en portant attention à la taille en paires de bases des 14 loci amplifiés, il a été possible de faire migrer tout les loci en seulement deux migrations : une première migration combinant *Ssa-197*, *Ssa-202*, *SsaD71*, *SsaD85*, *Ssosl417* et *SsspG7* et une deuxième combinant *SsaD144*, *Sssp1605*, *Sssp2201*, *Sssp2210*, *Sssp2215*, *Sssp2216*, *Ssa-85* et *MST-3*. Les détails techniques et les recettes pour les étapes de la migration sont présentés à l'annexe 3. En raison de problèmes lors de l'amplification résultant en un nombre de données manquantes trop important, 3 loci des 14 loci sélectionnés au départ ont été retranchés soit les loci *MST-3*, *Ssa85* et *Sssp2201*. Les analyses statistiques ont donc été effectuées avec les 11 loci restant.

Après la migration, la taille des allèles a été déterminée en référence au standard de taille utilisé à l'aide du logiciel GENESCAN version 3.7 (Applied Biosystems Inc.). Les allèles ont été sélectionnés manuellement en visualisant les résultats de migration à l'aide du logiciel GENOTYPER version 3.7 NT (Applied Biosystems Inc.). Ceci permet de déterminer le génotype multilocus des individus, c'est-à-dire la composition allélique des individus pour chacun des loci. Dans le cas des microsatellites, les allèles sont identifiés en terme de leur taille en paires de bases.

3.3 **Analyses statistiques des données**

3.3.1 Statistiques descriptives

Une fois le génotype des individus obtenu, il est possible de procéder aux analyses statistiques permettant de conclure sur la composition génétique des stocks de saumons à l'étude. Différents paramètres descriptifs permettent d'avoir une idée plus générale des données. Premièrement, le nombre d'échantillons par locus dont on a le génotype (N) et qui seront par conséquent inclus dans les analyses a été calculé. Ce

nombre peut varier d'un locus à l'autre pour un même groupe puisque après trois essais d'amplification, si les individus ne présentaient pas des allèles facilement identifiables, le génotype de cet individu pour ce locus était considéré comme une donnée manquante. Ensuite, le nombre d'allèles observé pour chacun des loci (A) a été quantifié indiquant le degré de variabilité de chacun des loci à l'intérieur de chacun des groupes d'échantillons. Aussi, pour chaque groupe d'échantillons, l'allèle le plus commun (A_c) a été identifié et sa fréquence calculée (F_c) en plus de présenter l'étendue de la taille des allèles (A_r) pour chaque locus. L'hétérozygotie observée (H_o) et l'hétérozygotie attendue sans biais (H_e , Nei, 1978) pour chaque locus et chaque rivière ont été calculées de même que l'hétérozygotie moyenne (H_m) observée pour les échantillons de chaque rivière. Les différentes valeurs d'hétérozygotie ont toutes été calculées à partir du logiciel GENETIX, version 4.05.2 (Belkhir et coll., 2004). L'hétérozygotie est une mesure fondamentale de la diversité génétique à l'intérieur des populations. Elle est définie comme la probabilité qu'un individu possède une paire d'allèles qui ne sont pas identiques par descendance. Finalement, le déficit en hétérozygotes fut évalué en vérifiant l'hypothèse nulle d'absence de déficit en hétérozygotie par la méthode du test exact de Fisher. Le test fut réalisé pour chaque groupe à chaque locus et de façon globale (en combinant tout les loci d'une même rivière) à l'aide de GENEPOP version 3.3 option 1 (Raymond et Rousset, 1995) en réalisant 1000 permutations.

3.3.3 Estimation du nombre de populations

La structure génétique en milieu naturel n'est pas toujours fonction de la répartition géographique des individus. Par exemple, des études ont déjà démontré la présence d'une structuration génétique en fonction de traits d'histoire de vie plutôt qu'en fonction du site d'échantillonnage. Par exemple, une étude sur le saumon sockeye (*Oncorhynchus nerka*) a démontré que la différenciation génétique était plus grande entre les saumons anadromes et les saumons résidents d'un même site qu'entre des saumons anadromes de deux sites différents (Wood et Foote, 1996). Il est donc important avant de procéder aux analyses de distance génétique classiques de s'assurer que le regroupement par site géographique est une bonne façon de procéder.

Pour y arriver, une approche basée sur un modèle intégré dans le logiciel STRUCTURE et développée par Pritchard et coll. (2000) a été utilisée. Simplement, la procédure consiste à regrouper les échantillons par une approche Bayésienne en fonction de la composition génétique des individus, sans tenir compte de leur origine. Le modèle présenté par Pritchard et ses collaborateurs permet d'obtenir deux valeurs importantes et très utiles pour la caractérisation génétique des échantillons analysés. Tout d'abord, en utilisant le modèle « admixture », le logiciel donne un estimé de la proportion (Q) du génome d'un échantillon provenant de chacun des groupes. Ainsi, en assumant qu'il y a deux populations, le logiciel indique la proportion du génome d'un individu provenant du groupe 1 et la proportion provenant du groupe 2. Si l'individu est pur et qu'il origine du groupe 1, une valeur se reprochant de 1 devrait être obtenue pour la proportion de son génome provenant du groupe 1 et une valeur se rapprochant

de zéro devrait être obtenue pour la proportion de son génome provenant du groupe 2. De même, si l'individu est un hybride de première génération, son génome devrait être composé à 50% du groupe 1 et 50% du groupe 2. Cette valeur permet de déterminer si la composition génétique des individus est pure ou s'il y a un échange génétique par hybridation entre les groupes.

Une deuxième valeur d'intérêt qui est estimée par STRUCTURE est la probabilité ($\ln P(D)$) d'un nombre de populations donné (K). En roulant le modèle pour plusieurs K différents, il est possible de déterminer le nombre de populations le plus probable. Cependant, pour différentes raisons statistiques, cet estimé n'est pas toujours réaliste, certains calculs peuvent être fait pour obtenir un meilleur estimé. A cet effet, une procédure a été présentée par Evanno et coll. (2005). Dans le cas des échantillons de saumons de la rivière Romaine, les analyses ont été effectuées en utilisant le modèle avec « admixture », une taille allélique initiale « corrélée » et 1 000 000 d'itérations. Les analyses ont été effectuées pour un nombre de populations allant de 1 à 6 et ce pour 10 réplifications. Ainsi, en se basant sur les calculs proposés par Evanno et coll. (2005), il a été possible d'estimer le nombre de populations le plus vraisemblable en plus de voir les regroupements qui ont été déduits de la composition génétique de l'ensemble des échantillons.

3.3.3 Distribution des fréquences alléliques

Tout d'abord, en tant qu'outil visuel, les fréquences alléliques des différents loci microsatellites à l'intérieur de chaque rivière furent compilées et représentées graphiquement. Ces graphiques permettent de mieux visualiser la diversité allélique à l'intérieur de chaque rivière de même que les différences retrouvées entre les rivières. La prochaine étape consiste à tester l'hypothèse nulle d'absence de différence génétique entre les distributions de fréquences alléliques à chaque locus pour chacune des rivières. Ce test a été effectué en utilisant la méthode des chaînes de Markov pour obtenir un estimé non biaisé du test exact de Fisher pour 20 000 itérations à l'aide de GENEPOP 3.4 option 3-2 (Raymond et Rousset, 1995). Le test de différenciation de la fréquence allélique sur tout les locus a aussi été réalisé selon la méthode de Fisher.

3.3.4 Différenciation génétique

En présence de différenciation génétique, l'ampleur de la différenciation peut être évaluée à l'aide de l'estimateur de F_{ST} . Ce paramètre a été calculé à l'aide du logiciel GENETIX version 4.05.2 (Belkhir et coll., 2004) en s'appuyant sur les statistiques de Weir et Cockerham (1984). Les valeurs de F_{ST} prennent généralement des valeurs entre 0 et 1 où 0 indique l'absence de structure génétique alors que la valeur 1 indique la présence d'isolement complet entre les deux populations. Toujours à l'aide du logiciel GENETIX, des permutations (1 000) ont été réalisées afin de déterminer si la valeur de F_{ST} obtenue était significativement différente de zéro.

3.3.5 Analyse de la variance

Étant donné la présence de plus d'une cohorte à l'intérieur de chaque rivière, il était important de vérifier s'il y avait une structure génétique à l'intérieur des rivières entre les cohortes. Pour ce faire, une AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance) a été effectuée à l'aide du logiciel Arlequin 3.1 (Excoffier et coll., 2005). L'analyse moléculaire de la variance s'apparente à l'ANOVA, elle analyse la variance dans les échantillons en utilisant des données moléculaires (données de séquences, microsatellites, etc.).

4. Résultats

4.1 Statistiques descriptives

Le tableau 4-1 présente la variabilité allélique observée aux 11 loci microsatellites pour les deux groupes de saumons analysés. Tous les marqueurs utilisés se sont avérés informatifs, présentant un très bon degré de variabilité avec un nombre d'allèles par locus variant de 6 à 28 allèles. La variabilité des allèles se traduit par des estimés de diversité génétique (H_E) variant entre 0,65 et 0,96 et une diversité génétique observée (H_O) variant entre 0,61 et 0,98. En ce qui a trait à la diversité allélique moyenne de l'ensemble des loci, la diversité génétique observée pour les saumons de la rivière Romaine (0,85) est légèrement plus grande que celle de la rivière Puyjalon (0,78) alors que leur estimé de diversité génétique moyenne est similaire (respectivement 0,85 et 0,83). Les tests exacts de Fisher indiquent que la plupart des loci ne présentent pas de déficit en hétérozygotes à l'intérieur des groupes, ni de façon globale en considérant un seuil de signification de 0,05 (à l'exception de *Ssos/417* pour les deux groupes et de *SsspG7* pour le groupe de la rivière Puyjalon). Ce niveau de déficit en hétérozygotes est négligeable étant donné que si la correction de Bonferroni (utilisée dans les cas de tests multiples) avait été appliquée, aucun locus dans aucun des groupes n'aurait présenté de déficit en hétérozygotes significatif. Ce résultat indique notamment l'absence d'artefact qui aurait pu causer des erreurs dans l'identification des génotypes.

Il est possible de remarquer que le nombre d'allèles pour un locus donné est souvent plus petit dans les échantillons de la rivière Romaine que dans les échantillons de la rivière Puyjalon (vrai pour 8 cas sur 11). Aussi, il est intéressant de noter que l'allèle le plus commun pour un locus donné n'est pas toujours le même entre les deux rivières. Par exemple dans le cas du locus *Ssos/417*, l'allèle 169 est le plus fréquent dans la rivière Puyjalon représentant 51% des allèles observés alors que pour la rivière Romaine, c'est l'allèle 157 qui est le plus fréquent représentant 31% des allèles observés. Globalement, le patron général de diversité génétique amène une première indication d'une différenciation génétique entre les saumons des deux rivières.

Tableau 4-1. Statistiques descriptives de la variabilité allélique aux 11 marqueurs microsatellites au sein des deux groupes de saumons analysés. Nombre d'échantillons analysés (N), nombre d'allèles à chacun des loci (A), allèle le plus commun (A_C , en paires de bases), fréquence de l'allèle le plus commun (F_C), étendue de la taille des allèles (A_R), hétérozygotie observée (H_O), hétérozygotie attendue à chacun des loci (H_E) et hétérozygotie moyenne (H_M). d indique un déficit en hétérozygotes significatif ($p \bullet 0,05$).

Rivière		<i>Ssa197</i>	<i>Ssa202</i>	<i>SsaD71</i>	<i>SsaD85</i>	<i>Ssosl417</i>	<i>SsspG7</i>	<i>SsaD144</i>	<i>Sssp1605</i>	<i>Sssp2210</i>	<i>Sssp2215</i>	<i>Sssp2216</i>	H_M
Puyjalon	N	71	71	71	70	71	60	70	63	71	71	58	
	A	14	14	21	25	7	11	28	6	7	8	16	
	A_C	168	293 / 305	322	300	169	186	192	230	127	157	198	
	F_C	0,23	0,21	0,13	0,11	0,51	0,18	0,09	0,52	0,35	0,32	0,33	
	A_R	156-208	245-321	286-386	236-388	157-203	162-214	120-272	226-254	107-151	149-181	190-290	
	H_E	0,86	0,86	0,92	0,95	0,69	0,88	0,96	0,65	0,73	0,76	0,84	0,83
	H_O	0,86	0,83	0,92	0,90	0,61d	0,77d	0,91	0,63	0,69	0,70	0,81	0,78
Romaine	N	59	59	59	59	58	55	58	56	59	55	54	
	A	11	12	18	17	12	10	23	9	6	9	13	
	A_C	168 / 176	305	306	300	157	186	228	230	127	157	202	
	F_C	0,22	0,25	0,14	0,25	0,31	0,21	0,15	0,37	0,56	0,25	0,16	
	A_R	160-208	249-317	294-390	240-356	157-211	142-210	128-272	226-262	107-151	141-177	194-254	
	H_E	0,85	0,84	0,93	0,89	0,80	0,86	0,94	0,79	0,62	0,84	0,90	0,84
	H_O	0,90	0,73d	0,97	0,93	0,71d	0,85	0,98	0,84	0,68	0,80	0,94	0,85

4.2 Estimation du nombre de populations

En regroupant les échantillons à partir du modèle intégré dans le logiciel STRUCTURE, en ne tenant pas compte des sites d'échantillonnage, la probabilité pour un nombre de populations de un est la moins grande (tableau 4-2). En se basant sur la valeur de probabilité donnée par le logiciel STRUCTURE ($\ln P(D)$), le nombre de populations le plus probable est celui dont la valeur de $\ln P(D)$ se rapproche le plus de zéro, soit trois.

Même en effectuant le calcul proposé par Evanno et coll.(2005), le nombre de populations le plus probable est demeuré trois. Ce calcul détermine la valeur de K et permet d'identifier correctement le nombre de populations le plus probable dans la plupart des cas de modèle de dispersion. Pour le K , le nombre de populations le plus probable est celui qui obtient la valeur de K la plus élevée.

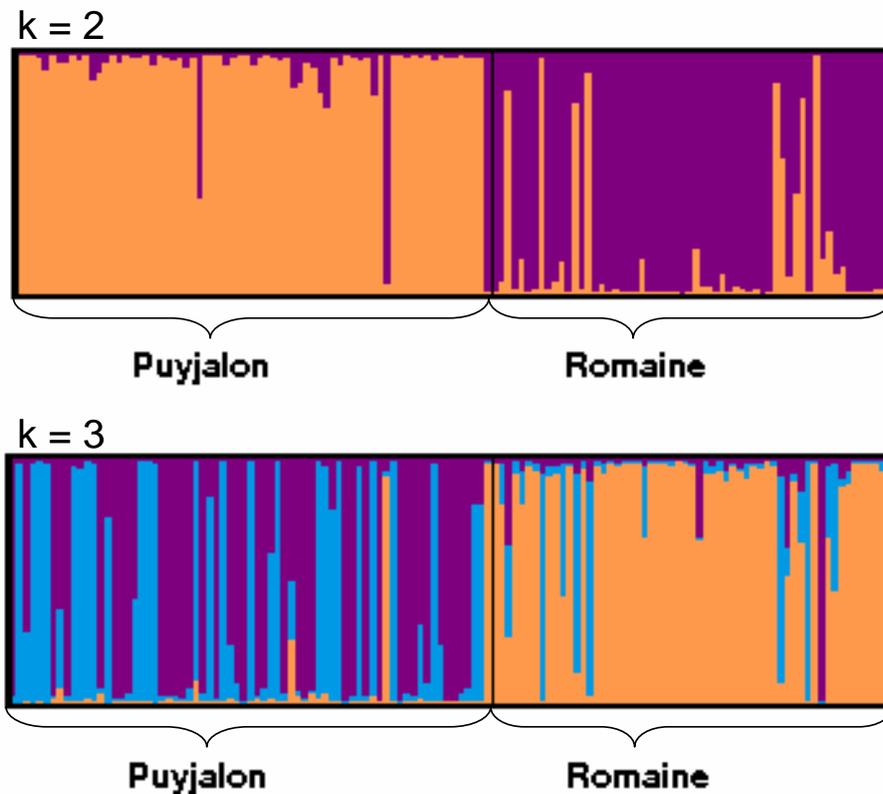
Il est intéressant de noter que les échantillons de la rivière Romaine se distinguent clairement des échantillons de la rivière Puyjalon, autant lorsqu'on assume un nombre de populations de deux ou de trois (figure 4-1). En effet, lorsque le nombre de populations assumé est de trois, les échantillons de la rivière Romaine se regroupent ensemble et forment un premier groupe alors que les échantillons de la rivière Puyjalon se répartissent dans les 2 autres groupes restants. De plus, il n'y a pas vraiment d'ambiguïté entre les deux groupes à l'intérieur de la rivière Puyjalon. Sur les 69 échantillons de la rivière Puyjalon n'étant pas regroupé avec les échantillons de la rivière Romaine, 59 ont plus de 80% de leur génome provenant soit du deuxième ($n = 25$), soit du troisième groupe ($n = 34$). En somme, ces résultats indiquent que les échantillons de la rivière Puyjalon représentent deux populations génétiquement distinctes entre elles et distinctes de la population du cours principal de la Romaine.

Après avoir remarqué la subdivision des échantillons de la rivière Puyjalon, un test de l'ampleur de la différenciation génétique fut effectué entre les deux groupes à l'intérieur de la rivière Puyjalon et une valeur de F_{ST} significative de 0,034 ($p < 0,001$) fut obtenue.

Tableau 4-2. Indices $\ln P(D)$ et K calculés afin de déterminer le nombre de populations (K) le plus probable.

K	$\ln P(D)$	K
1	-6249,59	-
2	-6026,57	49,66
3	-5891,89	128,46
4	-5942,23	1,76
5	-6053,57	2,34
6	-5991,96	-

Figure 4-1. Proportion du génome, pour chaque échantillon, provenant de chacun des regroupements simulés pour un nombre de populations (K) de deux et de trois. Chaque échantillon est représenté par une barre verticale. Chaque couleur réfère à un regroupement. La proportion de la barre verticale représentée par une couleur est directement proportionnelle à la proportion du génome de cet individu provenant de ce regroupement.



4.3 Fréquences alléliques

La figure 4-2 présente la distribution des fréquences alléliques pour chacun des 11 loci entre les deux groupes de saumons analysés. La surface de chaque cercle est directement proportionnelle à la fréquence relative d'un allèle donné dans un groupe. Globalement, ces graphiques illustrent, de façon qualitative, une distinction entre les échantillons de la rivière Romaine et de la rivière Puyjalon. Entre autre, le patron des bulles pour les loci *Ssosl417*, *Ssa197*, *SsspG7* et *Sssp2215* sont clairement différents entre les deux groupes d'échantillons. Notamment, l'allèle 169 du locus *Sssp2215* représente 15% des allèles des échantillons de la rivière Romaine alors qu'il est absent des échantillons de la rivière Puyjalon. De même, la fréquence de l'allèle 169 pour le locus *Ssosl417* est clairement plus importante dans la rivière Puyjalon que la rivière Romaine avec une différence de fréquence de 42%.

Figure 4-2. Distribution des fréquences alléliques pour chacun des 11 loci et pour les deux groupes de saumons analysés. La surface de chaque cercle est directement proportionnelle à la fréquence relative de l'allèle dans la population.

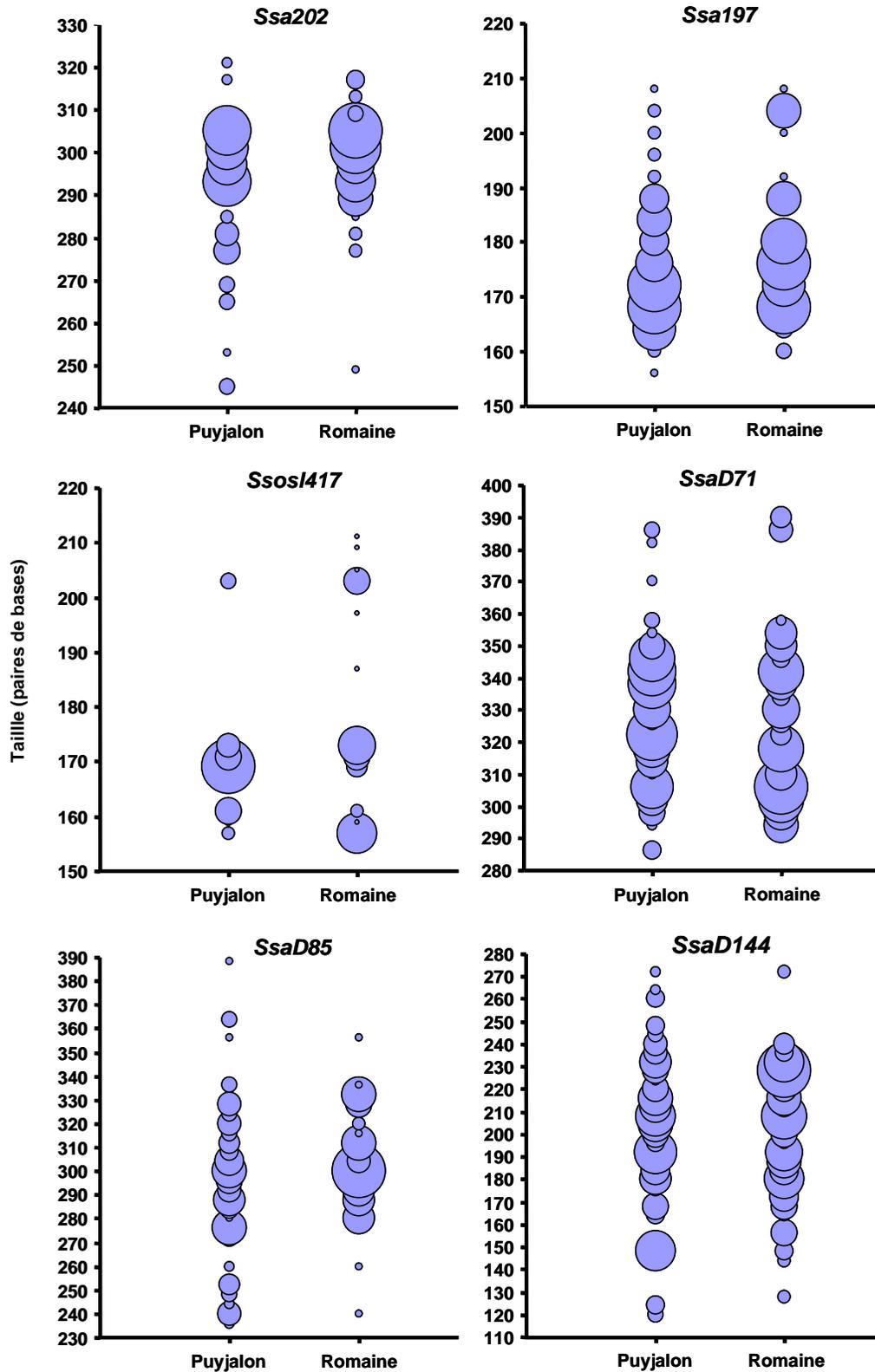
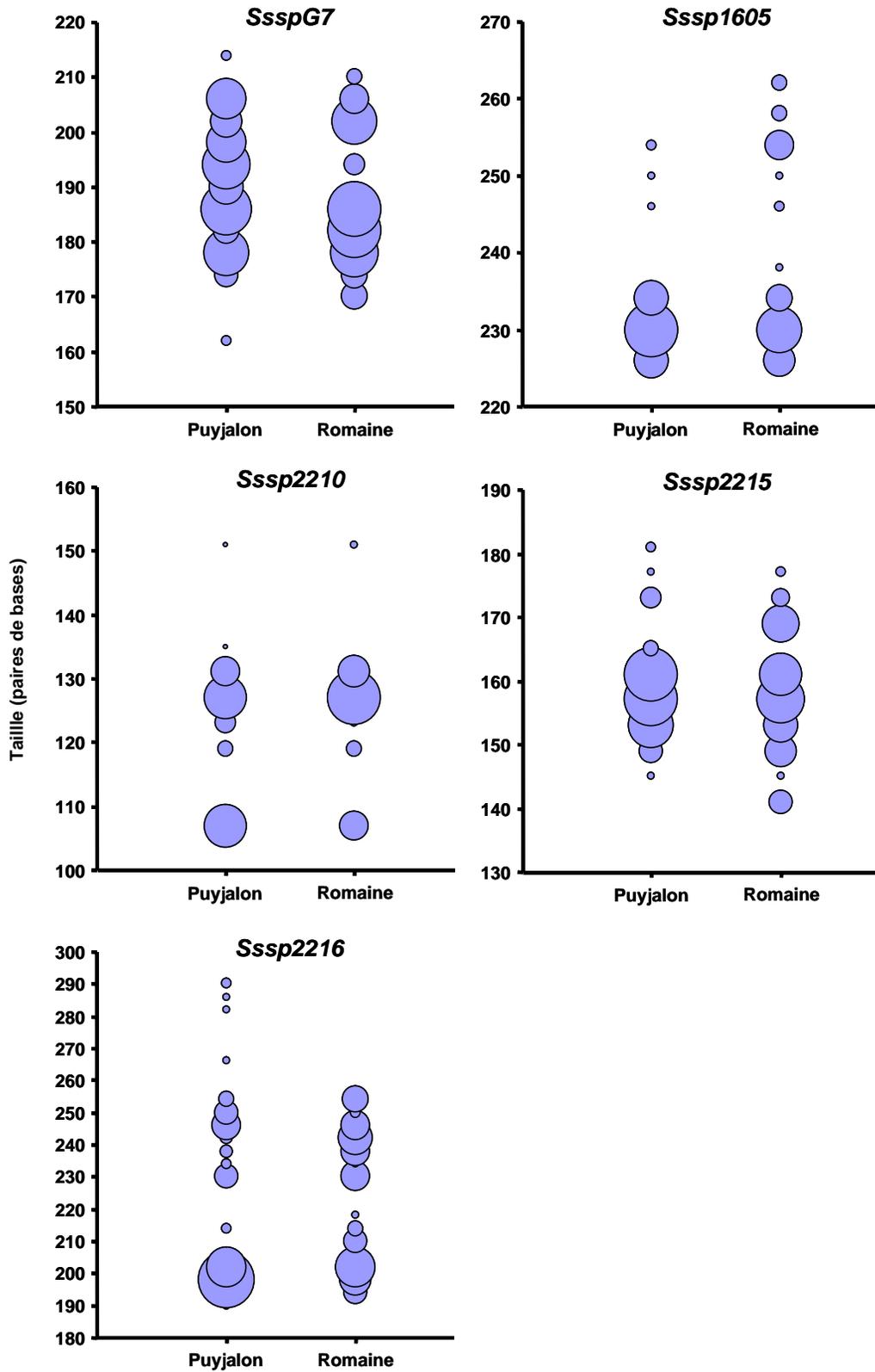


Figure 4-2. (suite)



Ces observations qualitatives sont supportées statistiquement, comme le démontre les résultats des tests de différence génétique entre les distributions des fréquences alléliques présentés au tableau 4-3. Ce tableau présente les valeurs de probabilité des tests de différenciation génétique locus par locus ainsi que globalement entre les deux groupes de saumons analysés, basés sur l'hétérogénéité dans la distribution des fréquences alléliques. De façon très claire, l'hypothèse nulle d'absence de différence génétique entre les distributions de fréquences alléliques doit être rejetée pour tout les locus pris individuellement de même que globalement. Ainsi, il y a une différenciation nette entre les distributions des fréquences alléliques entre les deux groupes d'échantillons.

Tableau 4-3. Valeurs de probabilité locus par locus et multilocus pour les tests de différenciation génétique entre les rivières Romaine et Puyjalon basés sur les fréquences alléliques.

Locus	Probabilité
<i>Ssa197</i>	< 0,00001
<i>Ssa202</i>	0,00001
<i>SsaD71</i>	< 0,00001
<i>SsaD85</i>	< 0,00001
<i>SsosI417</i>	< 0,00001
<i>SsspG7</i>	< 0,00001
<i>SsaD144</i>	0,00059
<i>Sssp1605</i>	0,00001
<i>Sssp2210</i>	0,00156
<i>Sssp2215</i>	< 0,00001
<i>Sssp2216</i>	0,00001
Multilocus	< 0,00001

4.4 Différenciation génétique

Les différences de fréquences alléliques observées entre les rivières Romaine et Puyjalon se traduisent également en mesure d'ampleur de différenciation génétique significative. En effet, le paramètre F_{ST} pour l'ensemble des loci est de 0,036 avec 100% des 1 000 permutations qui donnent des valeurs inférieures à la valeur obtenue avec les données réelles indiquant que la valeur de F_{ST} obtenue est significativement différente de 0 avec une probabilité plus petite que 0,001.

4.5 Analyse de la variance

Les résultats de l'AMOVA concordent aussi avec le test de différenciation génétique basé sur les fréquences alléliques de même que sur la mesure d'ampleur de différenciation génétique (tableau 4-4). Tout d'abord, seulement 0,27% de la variance dans les données est expliquée par la différence entre les cohortes à l'intérieur des rivières. Cependant, 3,67% de la variance dans les données est expliquée par la différence entre les rivières ce qui est similaire à la valeur obtenue pour le paramètre F_{ST} . Ainsi, la différence génétique observée entre les rivières n'est pas un artéfact de la cohorte échantillonnée.

Tableau 4-4. Résultats de l'analyse de la variance.

Source de variation	d. l.	Somme des carrés	Composantes de la variance	Pourcentage de la variance
Entre les rivières	1	20,329	0,12597	3,67
Entre les cohortes à l'intérieur des rivières	2	7,454	0,00934	0,27
À l'intérieur des cohortes	256	845,128	3,30128	96,06
Total	259	872,912	3,43659	

5. Discussion

5.1 Diversité génétique

Les marqueurs microsatellites utilisés dans la présente étude présentaient définitivement un niveau de variabilité suffisant pour répondre à l'objectif principal de caractérisation génétique des saumons atlantiques des rivières Romaine et Puyjalon. Cette variabilité n'est pas surprenante. En effet, les mêmes marqueurs ont déjà été utilisés auparavant pour l'analyse génétique de plusieurs populations de saumons atlantiques du Québec et ils présentaient tous des niveaux de variabilité amplement suffisants pour des analyses de structure génétique de populations (Mélanie Dionne, Université Laval, décembre 2005, comm. personnelle). De même, une étude évaluant les patrons de dispersion a été réalisée sur 10 populations de saumons atlantiques réparties le long de la rive Nord du St-Laurent (Castric et Bernatchez, 2004). Cette étude utilisait une fraction des loci microsatellites utilisés ici afin d'assigner les saumons à leur rivière d'origine la plus probable. Les niveaux de polymorphisme obtenus étaient comparables à ceux observés dans la présente étude même qu'ils étaient légèrement inférieurs. Par exemple, l'hétérozygotie moyenne attendue était de 0,82 dans l'étude de Castric et Bernatchez (2004) alors qu'elle était de 0,83 et 0,84 pour les rivières Puyjalon et Romaine respectivement. De même, l'hétérozygotie moyenne observée était de 0,75 comparativement à 0,78 et 0,85 pour les rivières Puyjalon et Romaine respectivement.

Les analyses statistiques permettent de conclure que les saumons de la rivière Romaine sont significativement différents des saumons de la rivière Puyjalon. Ce résultat est confirmé par les tests de différence entre les distributions de fréquences alléliques, les mesures de l'ampleur de la différenciation génétique (F_{ST}) de même que l'analyse moléculaire de la variance. En effet, ces trois tests indiquent tous une différence significative entre les deux populations. La distribution des fréquences allélique est significativement hétérogène ($p < 0,00001$). L'ampleur de la différenciation génétique est significativement différente de zéro. L'analyse moléculaire de la variance indique que 3,67% de la variance est expliquée par la différence entre les rivières.

La présence de plus d'une cohorte à l'intérieur des échantillons aurait pu biaiser les résultats. En effet, il arrive que la variance entre échantillons récoltés à différents temps dans une même rivière soit non négligeable (Garant et coll., 2000). Lorsque la variance due à la variabilité temporelle des échantillons n'est pas prise en compte, une surestimation de la variabilité entre les sites d'échantillonnage est possible. Dans ce cas-ci, le stade de vie échantillonné (adulte ou juvénile) explique seulement 0,27% de la variance totale dans les données moléculaires ce qui indique que l'effet des cohortes est négligeable par rapport à la variance entre les rivières qui est de 3,67%.

Finalement, selon le regroupement des échantillons à partir du modèle intégré dans le logiciel STRUCTURE, il est clair que la composition génétique des échantillons n'est pas homogène et qu'il y a présence de structure génétique. Tout d'abord, la valeur de

probabilité pour un nombre de populations de un est la moins grande en comparant avec les valeurs obtenues en assumant un nombre de populations de un à six. De plus, les échantillons de la rivière Romaine se distinguent clairement des échantillons de la rivière Puyjalon. En effet, en assumant que le nombre de populations est de deux, les échantillons se regroupent selon leur site d'échantillonnage sauf pour trois échantillons de la rivière Puyjalon et huit échantillons de la rivière Romaine. Ces échantillons indiquent soit la présence de bruit de fond dans les données, soit la présence d'une migration entre les sites qui ne se traduit pas par un flux génétique important étant donné les valeurs de différenciation génétique obtenues. Malgré ces quelques exceptions, le regroupement fait par le logiciel STRUCTURE sans tenir compte de la provenance des échantillons vient appuyer le fait que les deux rivières abritent des populations distinctes.

5.2 Nombre de populations estimé

Les résultats concernant le nombre de populations le plus probable étaient quant à eux imprévus. En regroupant les échantillons par une approche Bayésienne en fonction de la composition génétique des individus et sans tenir compte de leur provenance, le nombre de populations le plus probable estimé était de trois. En regardant en détail les regroupements proposés par le modèle intégré dans STRUCTURE pour un nombre de populations de trois, des points intéressants sont à noter. Tout d'abord, les échantillons de la rivière Romaine qui ne regroupaient pas avec leur site d'échantillonnage d'origine (voir section précédente) présentaient toujours une proportion considérable de leur génome qui ne provenait pas du même groupe que les autres échantillons de la rivière Romaine. Ensuite, la différence principale entre les regroupements des échantillons en assumant deux et trois populations se situe au niveau de la rivière Puyjalon. En effet, les échantillons de la rivière Romaine regroupent ensemble et forment un premier groupe alors que pour les échantillons de la rivière Puyjalon, ces derniers se répartissent dans les 2 autres groupes restants.

Le point intéressant à noter concerne le fait qu'il n'y a pas vraiment d'ambiguïté entre les deux groupes à l'intérieur de la rivière Puyjalon. Sur les 69 échantillons de la rivière Puyjalon n'étant pas regroupés avec les échantillons de la rivière Romaine, 59 ont plus de 80% de leur génome provenant soit du deuxième groupe, soit du troisième. Il semble donc y avoir la présence de deux groupes distincts à l'intérieur de la rivière Puyjalon. Cette hypothèse, qui est aussi confirmée par une valeur de différenciation génétique significative de 0,034, une valeur qui est du même ordre de grandeur que la divergence entre les deux rivières elles-mêmes. Cette hiérarchie dans la structure génétique des saumons des rivières Romaine et Puyjalon pourrait s'expliquer par la présence de deux branches dans la rivière Puyjalon, soit le cours principal de cette dernière et la rivière Bat-le-Diable qui se jette à environ 1km de l'embouchure de la Puyjalon. Une étude a déjà démontré la présence de différenciation génétique significative entre les deux branches principales de la Rivière Ste-Marguerite au Québec (Garant et coll., 2000). Cette différenciation entre branche de rivière pourrait aussi être le cas dans le système de la présente étude. Notamment, comme les échantillons analysés ont été récoltés en aval de la séparation des deux branches de

la rivière Puyjalon, il semble très probable que ceux-ci représentent un mélange de saumons provenant de deux populations distinctes et associées à chacune des deux branches. Les informations disponibles pour les échantillons de la rivière Puyjalon ne nous permettent pas pour l'instant de vérifier cette hypothèse. Cependant, en se basant sur les informations disponibles, il est possible de conclure que la structure à l'intérieur des échantillons de la rivière Puyjalon n'est pas expliquée par le stade de vie échantillonné, le site d'échantillonnage, la date d'échantillonnage ou le sexe.

5.3 Comparaison avec d'autres études

Tel qu'énoncé à la section précédente, le niveau de polymorphisme observé pour l'ensemble des marqueurs devrait nous permettre de mettre en évidence une différenciation génétique entre les groupes d'échantillons si elle est présente. Effectivement, malgré la proximité des deux cours d'eau, la population de la rivière Romaine est significativement différente de la population de la rivière Puyjalon avec une valeur de F_{ST} de 0,036. Cette valeur est même supérieure à des valeurs déjà observées dans la littérature entre quatre rivières distinctes se déversant dans le fjord du Saguenay au Québec avec un F_{ST} variant de 0,000 à 0,015 (Tessier et Bernatchez, 2000). De même, une caractérisation génétique de 10 populations de saumons atlantiques réparties le long de la rive nord du St-Laurent a permis d'étudier les patrons de dispersion des gènes entre les populations (Castric et Bernatchez, 2004). Le F_{ST} global observé pour ces 10 populations ($F_{ST} = 0,0445$, 95% IC = 0,0310-0,0597), quoique légèrement supérieur, était du même ordre de grandeur que la valeur obtenue entre les rivières Romaine et Puyjalon. Ainsi, comparativement aux valeurs observées entre populations de saumons géographiquement éloignées, la valeur de F_{ST} observée entre la rivière Romaine et la rivière Puyjalon est significative et indique la présence de deux stocks génétiquement distincts.

6. Conclusion

Les marqueurs microsatellites utilisés dans la présente étude ont permis de répondre à l'objectif principal de caractérisation génétique des saumons atlantiques des rivières Romaine et Puyjalon. Les analyses statistiques indiquent que les saumons de la rivière Romaine sont significativement différents de ceux de la rivière Puyjalon. Ce résultat est confirmé par les tests de différence entre les distributions de fréquences alléliques, les mesures de l'ampleur de la différenciation génétique (F_{st}) de même que l'analyse moléculaire de la variance. De plus la présence de plus d'une cohorte (groupes d'âge) à l'intérieur des échantillons n'apporte pas un biais significatif dans la structure génétique des données et leur effet est négligeable par rapport à la variance entre les rivières.

7. Références bibliographiques

- Belles-Isles, M., Plourde, Y., Pelletier, P., Théberge, C., Thibodeau, P. 2004. *Complexe Romaine – Aménagement intégral de la rivière Romaine. Étude préliminaire sur les débits réservés et la faune ichthyenne*. Rapport du Groupe conseil GENIVAR à la direction Environnement et Services techniques d'Hydro-Québec. 134 p. et annexes.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F. (2004) *GENETIX 4.05.2, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Castric, V., Bernatchez, L. 2004. Individual assignment test reveals differential restriction to dispersal between two salmonids despite no increase of genetic differences with distance. *Molecular Ecology Vol. 13*, pp. 1299-1312.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology Vol. 14*, pp. 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics online Vol. 1*, pp. 47-50.
- Garant, D., Dodson, J. J., Bernatchez, L. 2000. Ecological determinants and temporal stability of the within-river population structure in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Ecology Vol. 9*, pp. 615-628.
- GENIVAR (2002) *Aménagement hydroélectrique de la Romaine-1 - Étude de la population de saumon atlantique de la rivière Romaine en 2001*. Rapport présenté à la direction Environnement et services technique, Hydro-Québec par le Groupe conseil GENIVAR. 119 p. et 10 annexes.
- GENIVAR (2006) *Complexe de la Romaine - Faune ichthyenne : Habitats et production de poissons. Rapport sectoriel*. GENIVAR Société en commandite pour Hydro-Québec Équipement, Unité Environnement. 132 p. et annexes.
- King, T. L., Eackles, M. S., Letcher, B. H. 2005. Microsatellite DNA markers for the study of Atlantic salmon (*Salmo salar*) kinship, population structure, and mixed-fishery analyses. *Molecular Ecology Notes Vol. 5*, pp. 130-132.
- Nei, M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. *Genetics Vol. 89*, pp. 583-590.

- Oreilly, P. T., Hamilton, L. C., McConnell, S. K., Wright, J. M. 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* Vol. 53, pp. 2292-2298.
- Paterson, S., Piertney, S. B., Knox, D., Gilbey, J., Verspoor, E. 2004. Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites. *Molecular Ecology Notes* Vol. 4, pp. 160-162.
- Presa, P., Guyomard, R. 1996. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *Journal of Fish Biology*, Vol. 49: pp. 1326-1329.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* Vol. 155, pp. 945-959.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. Genepop (Version-1.2) – Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* Vol. 86, pp. 248-249.
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, O. 1995. Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Microsatellites at the Ssosl25, Ssosl85, Ssosl311, Ssosl417 Loci. *Animal Genetics* Vol. 26, pp. 281-282.
- Tessier, N., Bernatchez, L. 2000. A genetic assessment of single versus double origin of landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from Lake Saint-Jean, Quebec, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* Vol. 57, pp. 797-804.
- Weir, B. S., Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* Vol. 38, pp. 1358-1370.
- Wood, C. C., Foote, C. J. 1996. Evidence for sympatric genetic divergence of anadromous and nonanadromous morphs of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Evolution* Vol. 50, pp. 1265-1279.

ANNEXE 1

Caractéristiques des aménagements hydroélectriques du
complexe de la Romaine

ANNEXE 1. Caractéristiques des aménagements hydroélectriques du complexe de la Romaine.

Adapté de GENIVAR (2006), le tableau suivant présente différentes informations relatives aux quatre aménagements projetés par Hydro-Québec pour le complexe hydroélectrique de la rivière Romaine.

Tableau 1 Caractéristiques des aménagements hydroélectriques du complexe de la Romaine.

Caractéristique	Aménagement			
	Romaine-1	Romaine-2	Romaine-3	Romaine-4
Emplacement du barrage (PK à partir de l'embouchure de la rivière)	52,5	90,4	158,5	192,0
Module (m ³ /s)	290	272	223	185
Débit d'équipement (m ³ /s)	485	453	372	307
Niveau maximal d'exploitation (m)	82,3	243,8	365,8	458,6
Niveau minimal d'exploitation (m)	80,8	238,8	352,8	442,1
Superficie du réservoir (km ²)	12,6	85,8	38,6	142,2
Superficie terrestre ennoyée (km ²)	6,5	71,5	30,7	100,7
Type de centrale	en surface	en surface	en surface	en surface
Nombre et type de groupes ²	2 Francis	2 Francis	2 Francis	2 Francis
Puissance installée ² (MW)	259	638	396	476
Production moyenne annuelle ² (GWh)	1 339	3 208	1 979	1 219

1 Description du projet en date du 27 mars 2006.

2 Les valeurs indiquées sont fonction d'un facteur d'utilisation de 0,60.

ANNEXE 2

Informations sur les échantillons utilisés pour les analyses

ANNEXE 2.1. Informations générales sur les échantillons de saumons juvéniles de la rivière Romaine utilisés pour les analyses.

Numéro spécimen	Code	Date de	Station	Poids	Longueur (mm)		Sexe	Âge	Remarque
					Totale	Fourche			
GENIVAR	Université Laval	l'échantillonnage		(g)					
2	R_juv_2	8 août 2001	PL-2-2	10,34	106	100	F	1+	
3	R_juv_3	8 août 2001	PL-2-2	10,98	111	103	M	1+	
4	R_juv_4	10 août 2001	SE-1-4	8,21	100	92	M	1+	
9	R_juv_9	10 août 2001	PL-1-7	10,35	110	101	M	1+	
12	R_juv_12	10 août 2001	PL-1-7	9,84	110	101	F	1+	
14	R_juv_14	10 août 2001	PL-1-9	15,97	126	114	F	1+	Contaminé
15	R_juv_15	10 août 2001	PL-1-9	10,89	108	100	M	1+	
17	R_juv_17	10 août 2001	PL-1-9	8,00	99	90	M	1+	
18	R_juv_18	10 août 2001	SE-1-6	8,54	104	95	F	1+	
20	R_juv_20	10 août 2001	SE-1-7	12,30	116	106	M	1+	
24	R_juv_24	11 août 2001	SE-2-2(1)	10,59	108	99	F	1+	
25	R_juv_25	11 août 2001	SE-2-2(1)	9,00	103	94	M	1+	
26	R_juv_26	11 août 2001	SE-2-2(1)	9,24	103	94	M	1+	
33	R_juv_33	11 août 2001	SE-2-2(2)	10,47	105	98	M	1+	
34	R_juv_34	11 août 2001	SE-2-2(2)	8,27	99	91	M	1+	
35	R_juv_35	11 août 2001	SE-2-2(2)	10,40	107	97	M	1+	
36	R_juv_36	11 août 2001	SE-2-2(2)	9,42	106	96	M	1+	
42	R_juv_42	11 août 2001	SE-2-2(3)	13,88	120	110	F	1+	
50	R_juv_50	11 août 2001	SE-2-3	9,58	105	95	F	1+	
51	R_juv_51	11 août 2001	SE-2-3	6,75	96	87	M	1+	
52	R_juv_52	11 août 2001	SE-2-3	11,96	114	102	F	1+	
64	R_juv_64	11 août 2001	SE-2-4	8,69	104	94	M	1+	
70	R_juv_70	11 août 2001	SE-2-5	9,92	104	94	M	1+	
71	R_juv_71	11 août 2001	SE-2-5	8,49	101	91	M	1+	
72	R_juv_72	11 août 2001	SE-2-5	8,63	100	90	ND ¹	1+	
73	R_juv_73	11 août 2001	SE-2-5	11,06	113	103	F	1+	
74	R_juv_74	11 août 2001	SE-2-5	7,80	99	90	F	1+	
75	R_juv_75	11 août 2001	SE-2-5	9,72	105	95	M	1+	
76	R_juv_76	11 août 2001	SE-2-5	7,40	97	88	F	1+	
83	R_juv_83	11 août 2001	SE-2-6	13,33	119	108	F	1+	
85	R_juv_85	11 août 2001	SE-2-6	11,80	113	102	M	1+	
86	R_juv_86	11 août 2001	SE-2-6	11,97	112	101	F	1+	
111	R_juv_111	11 août 2001	PL-2-15	10,34	111	101	F	1+	
134	R_juv_134	13 août 2001	PL-1-13	8,08	98	92	F	1+	

Numéro spécimen	Code	Date de	Station	Poids	Longueur (mm)		Sexe	Âge	Remarque
					Totale	Fourche			
135	R_juv_135	13 août 2001	PL-2-17	9,50	105	96	M	1+	
136	R_juv_136	13 août 2001	PL-2-17	6,26	92	85	F	1+	
137	R_juv_137	13 août 2001	PL-2-17	6,00	91	83	F	1+	
139	R_juv_139	14 août 2001	PL-3-2	10,76	111	102	M	1+	
141	R_juv_141	14 août 2001	PL-3-7	9,24	107	98	F	1+	
142	R_juv_142	14 août 2001	PL-3-8	9,04	108	99	M	1+	
143	R_juv_143	14 août 2001	PL-3-8	7,65	102	92	F	1+	
144	R_juv_144	14 août 2001	PL-3-8	7,05	98	90	M	1+	
181	R_juv_181	15 août 2001	PL-3-9	11,92	116	107	F	1+	
183	R_juv_183	15 août 2001	PL-3-10	5,72	91	83	F	1+	
184	R_juv_184	15 août 2001	PL-3-10	12,39	117	107	M	1+	
186	R_juv_186	15 août 2001	PL-3-11	8,57	103	95	F	1+	
230	R_juv_230	20 août 2001	PL-2-18	5,77	92	84	M	1+	
231	R_juv_231	20 août 2001	PL-1-16	11,22	116	107	F	1+	
232	R_juv_232	20 août 2001	PL-1-16	10,20	113	104	F	1+	
238	R_juv_238	22 août 2001	PL-1-18	10,65	111	101	M	1+	

1 La valeur ND indique que la donnée n'est pas disponible.

ANNEXE 2.2. Informations générales sur les échantillons de saumons adultes de la rivière Romaine récoltés en 2003 et utilisés pour les analyses¹.

Numéro spécimen GENIVAR	Code Université Laval	Date de l'échantillonnage	Station	Poids (g)	Longueur (mm)		Sexe	Âge ³	Remarque
					Totale	Fourche			
148-320	R_adu_320	-	RA23	ND ²	ND	780	F	3, 2+	
148-340	R_adu_340	-	RA23	ND	ND	910	F	3, 2+	
148-360	R_adu_360	-	RA23	ND	ND	720	F	3, 2+	
148-380	R_adu_380	-	RA23	ND	ND	850	F	3, 2+	Mauvaise amplification
148-400	R_adu_400	-	RA23	ND	ND	910	M	3, 3+	Mauvaise amplification
148-420	R_adu_420	-	RA23	ND	ND	550	M	4, 1+	
148-440	R_adu_440	-	RA23	ND	ND	810	F	2, 2+	
148-460	R_adu_460	-	RA23	ND	ND	860	F	3, 2+	
148-480	R_adu_480	-	RA23	ND	ND	830	M	2, 2+	
148-500	R_adu_500	-	RA23	ND	ND	990	F	2, 3+, G	
P. sportive A	R_adu_A	-	RA16	ND	ND	ND	F	ND	

1 Tirées de Belles-Isles et coll. (2004).

2 La valeur ND indique que la donnée n'est pas disponible.

3 Le premier chiffre indique le nombre d'années passées en rivière, le deuxième indique le nombre d'années passées en mer et la lettre G indique une fraie antérieure.

ANNEXE 2.3. Informations générales sur les échantillons de saumons juvéniles de la rivière Puyjalon utilisés pour les analyses.

Numéro spécimen GENIVAR	Code Université Laval	Date	Station	Poids (g)	Longueur (mm)		Sexe	Âge	Remarque
					Totale	Fourche			
1	P_juv_1	1 ^{er} juin 2001	PR1	20,40	147	136	F	3+	
2	P_juv_2	1 ^{er} juin 2001	PR1	25,60	158	147	M	3+	
3	P_juv_3	1 ^{er} juin 2001	PR1	19,50	141	129	ND ¹	3+	
4	P_juv_4	1 ^{er} juin 2001	PR1	29,00	160	148	F	3+	
5	P_juv_5	1 ^{er} juin 2001	PR1	16,80	141	128	M	3+	
6	P_juv_6	1 ^{er} juin 2001	PR1	18,80	145	132	ND	3+	
7	P_juv_7	1 ^{er} juin 2001	PR1	10,20	115	105	F	3+	
8	P_juv_8	2 juin 2001	PR1	14,10	131	1224	F	3+	
9	P_juv_9	2 juin 2001	PR1	22,50	150	140	F	3+	
10	P_juv_10	2 juin 2001	PR1	13,20	130	120	ND	3+	
11	P_juv_11	2 juin 2001	PR1	22,30	148	135	M	2+	
12	P_juv_12	2 juin 2001	PR1	24,60	156	143	M	3+	
13	P_juv_13	2 juin 2001	PR1	18,70	149	137	F	3+	
14	P_juv_14	2 juin 2001	PR1	24,30	155	142	M	3+	
15	P_juv_15	2 juin 2001	PR1	15,50	129	120	F	3+	
16	P_juv_16	3 juin 2001	PR1	17,30	135	124	F	2+	
17	P_juv_17	5 juin 2001	PR1	44,50	187	173	F	3+	
18	P_juv_18	5 juin 2001	PR1	18,10	139	126	ND	3+	
19	P_juv_19	5 juin 2001	PR1	12,70	133	122	F	3+	
20	P_juv_20	5 juin 2001	PR1	20,20	135	127	M	3+	
21	P_juv_21	5 juin 2001	PC1	18,90	140	129	M	3+	
22	P_juv_22	6 juin 2001	PR1	20,70	149	138	F	3+	
23	P_juv_23	6 juin 2001	PR1	18,30	138	127	F	3+	
25	P_juv_25	7 juin 2001	PR1	26,10	156	144	F	3.	
26	P_juv_26	7 juin 2001	PR1	14,90	133	123	ND	3+	
27	P_juv_27	8 juin 2001	PR1	17,00	137	125	F	3+	
28	P_juv_28	8 juin 2001	PR1	18,00	132	123	F	3+	
29	P_juv_29	8 juin 2001	PR1	11,50	121	111	F	3+	
30	P_juv_30	8 juin 2001	PR1	24,00	152	142	ND	3+	
31	P_juv_31	9 juin 2001	PR1	21,70	146	136	F	3+	
32	P_juv_32	9 juin 2001	PR1	27,40	164	150	M	3+	
33	P_juv_33	9 juin 2001	PR1	20,1	147	137	M	3.	
34	P_juv_34	10 juin 2001	PR1	25,50	153	140	F	3+	
35	P_juv_35	10 juin 2001	PR1	13,90	126	116	F	2+	
36	P_juv_36	10 juin 2001	PR1	18,20	138	126	F	3+	

Numéro spécimen	Code	Date	Station	Poids (g)	Longueur (mm)		Sexe	Âge	Remarque
					Totale	Fourche			
37	P_juv_37	11 juin 2001	PR1	25,60	149	138	F	3.	
38	P_juv_38	12 juin 2001	PR1	15,00	130	120	M	3+	
39	P_juv_39	13 juin 2001	PR1	16,20	135	129	M	2+	
40	P_juv_40	13 juin 2001	PR1	13,00	119	110	F	2+	
41	P_juv_41	14 juin 2001	PR1	16,00	130	122	F	2+	
42	P_juv_42	14 juin 2001	PR1	17,50	130	122	F	2+	
43	P_juv_43	14 juin 2001	PR1	17,40	142	132	M	3+	
44	P_juv_44	15 juin 2001	PR1	15,10	133	123	F	2+	
45	P_juv_45	16 juin 2001	PR1	21,60	142	132	M	3+	
46	P_juv_46	16 juin 2001	PR1	21,30	148	139	M	3+	
47	P_juv_47	16 juin 2001	PR1	20,30	144	132	F	3+	
49	P_juv_49	16 juin 2001	PR1	21,60	144	134	F	2+	
50	P_juv_50	16 juin 2001	PR1	32,90	167	158	F	3+	
51	P_juv_51	16 juin 2001	PR1	22,10	144	135	M	3+	
52	P_juv_52	16 juin 2001	PR1	29,90	161	150	M	4+	

1 La valeur ND indique que la donnée n'est pas disponible.

ANNEXE 2.4. Informations générales sur les échantillons de saumons adultes de la rivière Puyjalon utilisés pour les analyses.

Numéro spécimen GENIVAR	Code Université Laval	Date	Station	Poids (g)	Longueur (mm)		Sexe	Âge ²	Remarque
					Totale	Fourche			
1	P_adu_1	26 juin 2001	PA0	ND ¹	810	780	M	3,2+	
2	P_adu_2	29 juin 2001	PA0	ND	880	840	F	3,2+	
3	P_adu_3	9 juillet 2001	PA0	ND	880	830	F	3+,2+	
4	P_adu_4	10 juillet 2001	PA0	ND	940	910	F	3+,3+	
5	P_adu_5	27 juillet 2001	PA0	ND	855	810	F	3,2+	
6	P_adu_6	27 juillet 2001	PA0	ND	990	950	F	3,2+G1.	
7	P_adu_7	28 juillet 2001	PA0	ND	870	830	M	3,2+	
8	P_adu_8	29 juillet 2001	PA0	ND	860	820	F	3,2+	
9	P_adu_9	29 juillet 2001	PA0	ND	815	775	F	3,2+	
10	P_adu_10	30 juillet 2001	PA0	ND	810	755	F	2,2+	
11	P_adu_11	31 juillet 2001	PA0	ND	900	860	M	2+,2+	
12	P_adu_12	1 ^{er} août 2001	PA0	ND	800	760	F	2+,2+	
13	P_adu_13	1 ^{er} août 2001	PA0	ND	980	940	F	3+,2+G1.	
14	P_adu_14	1 ^{er} août 2001	PA0	ND	680	630	I	2+,1+	Mauvaise amplification
15	P_adu_15	6 septembre 2001	PA0	ND	845	800	F	3+,2+	
16	P_adu_16	6 septembre 2001	PA0	ND	590	560	M	2+,1+	
17	P_adu_17	6 septembre 2001	PA0	ND	785	740	F	3+,2+	
18	P_adu_18	6 septembre 2001	PA0	ND	805	770	F	3+,2+	
19	P_adu_19	6 septembre 2001	PA0	ND	815	775	M	ND	Enveloppe manquante
20	P_adu_20	6 septembre 2001	PA0	ND	840	800	M	3+,2+	
21	P_adu_21	6 septembre 2001	PA0	ND	740	710	M	3+,2+	
22	P_adu_22	6 septembre 2001	PA0	ND	855	810	F	2,2+	
23	P_adu_23	6 septembre 2001	PA0	ND	590	575	M	2,1+	
24	P_adu_24	6 septembre 2001	PA0	ND	850	810	F	3,2+	

1 La valeur ND indique que la donnée n'est pas disponible.

2 Le premier chiffre indique le nombre d'années passées en rivière, le deuxième indique le nombre d'années passées en mer et la lettre G indique une fraie antérieure.

ANNEXE 3

Protocoles pour les amplifications et la migration sur capillaires

ANNEXE 3. Protocoles pour les amplifications et la migration sur capillaires

Solutions requises :

1. Tampon 10X (100mM Tris-HCL pH8,3; 500mM KCL; 25mM MgCl₂; 0,1% gélatine; 1,6mg/ml *sérum d'albumine de bovin* (BSA))
2. Amorces : 10µM
3. dNTP : 2,5mM
4. Taq polymérase : 1 000U/ml
5. ADN : 10-20ng/µl
6. Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, numéro de produit : 4311320)
7. Genescan 500 Liz® (Applied Biosystems, numéro de produit : 4322682)

Les 14 loci utilisés initialement pour la caractérisation génétique étaient amplifiés en neuf réactions PCR, quatre simplex et cinq duplex. Les quantités en microlitres (µl) des solutions de départ nécessaires aux réactions PCR sont présentées ci-bas pour une ou 105 réactions. Pour chacune des réactions PCR, le volume final était de 25µl (22µl du mélange et 3µl d'ADN).

Ssa197/Ssosl417

	X1	X105
Tmag	2,5	262,5
dNTP	0,6	63,0
197A	1	105,0
197B	1	105,0
417A	1,2	126,0
417B	1,2	126,0
H2O	14	1470,0
Taq	0,5	52,5

SsspG7

	X1	X105
Tmag	2,5	262,5
dNTP	0,6	63,0
G7F	1,8	189,0
G7R	1,8	189,0
H2O	14,8	1554,0
Taq	0,5	52,5

SsaD71/SSaD85

	X1	X105
Tmag	2,5	262,5
dNTP	0,6	63,0
D71F	1,6	168,0
D71R	1,6	168,0
D85F	1,2	126,0
D85R	1,2	126,0
H2O	12,8	1344,0
Taq	0,5	52,5

SsaD144

	X1	X105
Tmag	2,5	262,5
dNTP	0,6	63,0
D144F	1,2	126,0
D144R	1,2	126,0
H2O	16	1680,0
Taq	0,5	52,5

Ssa202

	X1	X105
Tmag	2,5	262,5
dNTP	0,6	63,0
202A	1,2	126,0
202B	1,2	126,0
H2O	16	1680,0
Taq	0,5	52,5

MST-3/Ssa85

	X1	X105
Tmag	2,5	262,5
dNTP	0,6	63,0
MST-3,1	1,6	168,0
MST-3,2	1,6	168,0
Ssa85A	1,2	126,0
Ssa85B	1,2	126,0
H2O	12,8	1344,0
Taq	0,5	52,5

Sssp2215/Sssp2216			Sssp2210/Sssp1605		
	<i>X1</i>	<i>X105</i>		<i>X1</i>	<i>X105</i>
Tmag	2,5	262,5	Tmag	2,5	262,5
dNTP	0,6	63,0	dNTP	0,6	63,0
2215F	1,2	126,0	2210F	0,8	84,0
2215R	1,2	126,0	2210R	0,8	84,0
2216F	1,2	126,0	1605F	1,2	126,0
2216R	1,2	126,0	1605R	1,2	126,0
H2O	12,8	1344,0	H2O	15,1	1585,5
Taq	0,5	52,5	Taq	0,5	52,5

Sssp2201		
	<i>X1</i>	<i>X105</i>
Tmag	2,5	262,5
dNTP	0,6	63,0
2201F	1,7	178,5
2201R	1,7	178,5
H2O	15	1575,0
Taq	0,5	52,5

Les conditions lors de la PCR étaient les suivantes :

Programme #1 (pour MST-3/Ssa85; Ssa202 et Ssa197/Ssosl417)
 2 min @ 95°C (30 sec @ 95°C; 30 sec @ 56°C; 30 sec @ 72°C)₃₆ 5min @ 72°C

Programme #2 (pour SsaD71/SsaD85 et SsaD144)
 5 min @ 95°C (45 sec @ 95°C; 30 sec @ 60°C; 2 min @ 72°C)₃₆ 5min @ 72°C

Programme #3 (pour SsaD71/SsaD85 et SsaD144)
 2 min @ 95°C (30 sec @ 95°C; 30 sec @ 60°C; 1 min @ 72°C)₃₆ 5min @ 72°C

Une fois les réactions terminées, on procède à la préparation de la plaque pour le séquenceur automatique. Cette étape consiste à mélanger les produits de PCR dans des proportions adéquates pour permettre la visualisation des loci migrés. Ainsi, pour chaque individu, les différentes PCR sont combinées dans un même puit.

Pour le gel 1 :

Mélanger ensemble 2 µl du produit PCR Ssa202, 3 µl du produit PCR Ssa197/Ssosl417 et 2 µl de ddH₂O. Prendre 1.5 µl de ce mélange et ajouter 3 µl du produit PCR SsspG7, 3 µl du produit PCR SsaD71/SsaD85, 7,9 µl de Formamide Hi-Di et 0,1 µl de GeneScan 500 Liz.

Pour le gel 2 :

Mélanger ensemble 2 µl du produit PCR SsaD144, 3 µl du produit PCR Sssp2215/Sssp2216 et 2 µl du produit PCR Sssp2210/Sssp1605. Prendre 2 µl de ce mélange et ajouter 2 µl du produit PCR Sssp2201, 2 µl du produit PCR MST-3/Ssa85, 7,9 µl de Formamide Hi-Di et 0,1 µl de GeneScan 500 Liz.

ANNEXE 4

Génotypes des échantillons aux loci microsatellites utilisés pour les analyses statistiques

ANNEXE 4.

Génotypes des échantillons aux loci microsatellites utilisés pour les analyses statistiques. Les génotypes sont présentés en codes de six chiffres où les trois premiers représentent la taille en paires de bases du fragment le plus court et les trois derniers la taille du plus long fragment sauf dans les cas où l'individu est homozygote, alors, la taille est répétée deux fois. Les données manquantes sont codées 000000.

Individus	Ssa 197	Ssa 202	Ssa D71	Ssa D85	Ssosl 417	Sssp G7	Ssa D144	Sssp 1605	Sssp 2210	Sssp 2215	Sssp 2216
P_juv_1	172172	277293	342358	252272	169169	186202	204228	230234	119131	153165	246246
P_juv_2	164168	293301	330342	316320	169169	190202	124148	226230	127131	157161	246254
P_juv_3	184188	281301	346370	320328	169203	194202	168208	230230	127127	157161	198290
P_juv_4	168168	281293	346346	260328	169173	178206	168236	230230	127127	157157	202234
P_juv_5	168172	277293	298322	296356	169173	162178	180228	230254	107123	153157	194242
P_juv_6	184184	293305	310318	300328	169169	206206	168180	226230	127127	157173	000000
P_juv_7	168176	305305	298386	272300	169203	186206	168188	234250	107127	157161	202214
P_juv_8	168172	245293	314342	252312	169169	178178	124184	000000	107107	153157	000000
P_juv_9	168180	269293	346346	324328	157171	000000	208260	226230	107135	157157	000000
P_juv_10	172176	293293	314322	300336	169169	178186	148176	226230	127131	153157	198286
P_juv_11	176192	269321	306342	288320	161169	206206	232236	230230	107123	153161	198230
P_juv_12	180196	281305	314322	296308	161203	206206	148220	226230	107107	157157	202202
P_juv_13	172180	281305	314322	248296	157203	202206	148220	226230	107127	157173	202202
P_juv_14	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000
P_juv_15	172184	297305	322346	324336	161169	182186	148260	000000	131131	153161	198198
P_juv_16	164168	277305	306306	288292	169171	186186	240248	000000	127131	157161	198202
P_juv_17	180208	293305	330358	248312	169169	000000	216216	226230	107127	153161	250282
P_juv_18	168188	265285	318338	284304	169173	178198	204204	230230	107127	153161	194250
P_juv_19	168180	293297	318330	296364	161169	174182	148200	234250	107123	161173	000000
P_juv_20	168172	281305	346346	300328	169173	000000	144168	226230	127127	157157	246290
P_juv_21	172200	293305	346386	296300	169203	000000	184192	226230	107127	153157	202250
P_juv_22	176180	293301	322338	240308	161171	186198	220228	234254	123127	157157	198198
P_juv_23	172176	245293	286298	252304	169169	186198	148176	226230	107131	153161	198202
P_juv_25	168188	301301	338342	240276	169171	174186	192228	226234	107123	149157	000000
P_juv_26	164176	277297	326330	240240	161171	186194	204224	226234	131131	153161	194198
P_juv_27	168176	277293	330342	236300	169169	190198	188240	230230	127127	149153	198246
P_juv_28	172188	297305	314318	276284	169169	178198	200232	000000	107131	153153	238250
P_juv_29	172184	293293	298346	304336	161171	186186	148148	226230	107131	149161	000000
P_juv_30	172184	293293	298346	000000	161171	186186	148148	000000	107131	161161	198246
P_juv_31	156176	293305	322330	288312	161161	198198	188212	000000	127127	149161	198198
P_juv_32	176176	277301	322338	240284	169171	174182	192220	234254	119131	157157	198198
P_juv_33	172180	297301	322338	284312	161169	000000	212212	230230	107127	157161	198198
P_juv_34	168172	301305	306342	276304	169173	186194	192212	226226	119127	161161	198202
P_juv_35	164168	297305	306338	272292	171171	186190	248260	234234	127127	157157	198202
P_juv_36	160168	293301	318382	304364	169203	000000	180208	000000	107127	157157	238254
P_juv_37	172176	301321	286342	252328	169173	194194	200212	000000	123123	153161	230246
P_juv_38	168172	293297	318342	304364	161169	186190	124192	226230	107131	157161	198246
P_juv_39	164172	277305	302350	292300	169169	194206	164192	226234	107107	153153	194198
P_juv_40	172184	253305	302322	288300	159171	000000	192196	230230	107107	153157	000000
P_juv_41	168168	265297	286342	248304	169169	000000	196244	226234	107131	149161	202246
P_juv_42	168172	305305	302338	272276	169169	194194	192196	230234	107127	157161	198230
P_juv_43	168172	293301	318346	316320	169169	174178	180232	230230	107131	157157	234254
P_juv_44	164204	293305	342342	276308	169173	194198	180216	230246	107107	157161	198246
P_juv_45	164172	285297	318350	236296	161169	178190	204216	230230	127127	161165	194250

Individus	Ssa 197	Ssa 202	Ssa D71	Ssa D85	Ssosl 417	Sssp G7	Ssa D144	Sssp 1605	Sssp 2210	Sssp 2215	Sssp 2216
P_juv_46	164176	245281	342350	300320	169169	186206	192208	230234	107127	153161	194202
P_juv_47	168168	297301	318334	296320	161169	186190	148180	230230	107131	157157	190254
P_juv_49	164164	305305	306330	276292	169171	000000	244248	226230	107127	157157	202202
P_juv_50	168168	297301	302302	252296	171173	186194	188212	226226	123127	161161	198246
P_juv_51	168184	301301	338342	252288	173173	194194	208212	226230	119127	161161	198246
P_juv_54	164188	277301	322338	276292	173173	194198	228232	226230	127127	157157	198214
P_adu_1	164188	277301	302322	240308	169171	186190	192204	234234	119127	153161	198230
P_adu_2	164172	297305	306326	276276	169169	178206	192216	230230	107107	153153	230242
P_adu_3	164164	297317	306338	240288	169169	182214	216216	230234	107127	161165	198202
P_adu_4	172184	301301	306338	288304	169173	194198	192236	226230	107107	149153	198230
P_adu_5	168172	277297	306314	244276	161169	178182	120188	230230	123123	161165	000000
P_adu_6	172192	265301	302338	304304	161161	198198	184208	230230	107127	161161	242250
P_adu_7	184188	281285	314334	300300	169169	178198	184208	230234	107131	149153	194250
P_adu_8	176184	297305	314338	276292	169169	178202	180200	230230	127131	173181	000000
P_adu_9	168188	289305	294306	280300	157157	178178	000000	230234	107127	149157	202202
P_adu_10	168172	305305	338342	276288	169171	194202	192232	226234	107131	161177	194198
P_adu_11	160180	269293	318322	296328	161169	178194	220232	230234	107127	157181	198230
P_adu_12	164164	293317	322338	288288	169169	000000	184208	230230	107127	149153	194230
P_adu_13	168172	297305	330346	292300	157159	000000	208272	230230	131131	173173	198238
P_adu_14	000000	000000	000000	000000	000000	194202	000000	000000	123127	145153	000000
P_adu_15	176204	297297	302322	272288	169169	198198	164240	234246	107127	153161	000000
P_adu_16	168180	293297	306354	312312	157171	178194	208216	230234	127127	153157	202250
P_adu_17	180200	269293	322346	316324	169169	178202	184232	230234	127131	153161	000000
P_adu_18	164176	265305	322342	276276	169171	182194	120204	226230	107127	153165	198202
P_adu_20	164168	293297	322350	288300	161171	186190	204236	226230	123127	157161	198198
P_adu_21	172176	245297	330350	260388	171173	174194	164180	234234	107119	161173	000000
P_adu_22	184196	293301	330338	244284	171173	190202	204216	226234	131151	153161	198266
P_adu_23	184188	281301	306346	320328	169203	190206	208264	230230	107127	157161	000000
P_adu_24	172184	305305	322342	288300	169169	190206	200240	230230	119131	157161	198202
R_juv_2	172180	289289	306350	300304	171171	142178	192200	226230	127131	141141	202242
R_juv_3	176180	289301	330350	292300	173203	178206	220228	230254	127131	141169	242242
R_juv_4	168180	293305	330350	280300	169203	182186	208228	226230	127131	149157	202238
R_juv_9	168176	297297	298326	316332	157161	186194	128188	234262	107131	157161	198202
R_juv_12	180188	293301	298318	292332	157203	000000	184228	226230	107151	149157	000000
R_juv_14	164200	297305	298338	260292	159171	178202	148188	230234	107127	161173	202254
R_juv_15	168172	289305	322330	300332	157169	206206	192272	230246	107131	153173	198230
R_juv_17	168172	305305	306318	280296	173173	182202	184188	234254	127127	157157	194254
R_juv_18	176188	305305	298330	296304	161169	186186	188232	230262	131151	153157	198246
R_juv_20	168204	305305	294342	280300	157157	174182	180216	230238	127127	161169	198242
R_juv_24	172180	289313	306318	296300	171173	182202	180232	226230	127127	153157	202238
R_juv_25	168172	297301	302330	292332	157157	178186	208216	226230	127127	149161	210218
R_juv_26	168204	289317	354390	300328	171173	182186	228232	230254	127127	153161	202210
R_juv_33	176180	301301	306342	296300	157157	178182	172208	234258	107131	161161	198246
R_juv_34	176204	277289	294342	276308	173173	186202	184212	226254	127131	141153	242250
R_juv_35	180180	293305	294310	296328	171205	178202	144180	238254	123127	169169	198254
R_juv_36	188204	301305	342350	300304	171173	178178	156168	230234	107127	149157	214246
R_juv_42	172188	301305	306334	292312	157173	182186	196216	234254	127131	141173	198214
R_juv_50	180204	301301	302342	288312	169173	170186	168240	230254	119127	149169	230254
R_juv_51	164168	289305	302342	300312	157157	170178	168240	226226	107127	000000	194242
R_juv_52	168168	305309	294386	280300	171173	186202	180220	000000	107123	169169	198214
R_juv_64	168204	301305	298302	300332	157173	182194	216224	230234	119127	000000	210210

Individus	Ssa 197	Ssa 202	Ssa D71	Ssa D85	Ssosl 417	Sssp G7	Ssa D144	Sssp 1605	Sssp 2210	Sssp 2215	Sssp 2216
R_juv_70	168180	297301	306342	332332	169203	186186	216232	230258	119127	161161	202210
R_juv_71	176180	289301	318342	296300	157157	178182	156232	230230	119127	000000	238242
R_juv_72	176176	289301	318318	296300	157173	178202	156192	230230	107107	149157	202238
R_juv_73	172176	249301	302334	292292	169173	142170	228228	234254	127131	157173	198230
R_juv_74	172188	301305	306318	280312	173203	000000	180188	226254	127127	141149	194254
R_juv_75	176180	297301	302350	300300	169203	178182	192228	230254	127131	153169	242254
R_juv_76	176176	289289	306342	280300	157169	186186	172228	230230	107127	157161	202238
R_juv_83	168176	297305	310330	300328	157171	182206	192228	230254	127131	141169	242242
R_juv_85	172176	281305	330342	292300	157157	186202	172208	230258	127127	157169	202246
R_juv_86	168176	297297	342390	312332	171171	142182	180208	230262	127127	157161	198230
R_juv_111	168176	297301	310318	288300	171173	182182	192228	230230	127131	153169	230242
R_juv_134	164192	293305	342346	288296	157187	206210	228240	230246	107127	153169	198202
R_juv_135	168176	305305	306318	296312	173203	178178	180188	234234	127131	149157	194254
R_juv_136	164180	289297	306330	304336	171203	142174	208232	226230	127127	149161	246254
R_juv_137	176176	305313	318326	312328	173203	202206	180228	226254	127127	157157	238242
R_juv_139	168188	293317	354354	280300	173203	174178	212232	226230	127131	161161	000000
R_juv_141	168188	293293	298354	280328	157157	178194	212224	230234	127131	169177	210246
R_juv_142	176180	293317	338390	288300	157169	182202	208232	226230	127127	145157	202230
R_juv_143	168172	293293	354386	304328	173173	178186	220232	230262	127131	153177	202246
R_juv_144	160204	297301	302318	288312	157157	186202	200228	226226	127127	157161	230246
R_juv_181	172204	301301	294310	320328	157203	170182	172208	254262	107127	157161	210242
R_juv_183	172176	293305	306338	300300	157173	206210	184228	226254	127127	141169	202234
R_juv_184	160168	301317	294338	280300	157157	170186	208216	230254	127131	161161	000000
R_juv_186	168172	293305	306354	288332	157171	182186	192208	258262	107127	157161	230246
R_juv_230	168172	293309	302306	288312	157171	142202	180208	226258	127127	000000	202210
R_juv_231	180188	293305	298350	292332	161161	182202	228232	230234	127131	149157	202238
R_juv_232	176204	289301	294302	292312	169173	170186	168228	230254	127127	153169	242254
R_juv_238	180188	301305	306318	296300	157173	142178	156180	230230	107127	149153	202238
R_adu_320	180204	293305	322330	312356	157173	194202	164184	226230	107127	149149	194202
R_adu_340	168172	293293	302306	288300	173203	000000	172224	000000	107107	153157	198242
R_adu_360	172204	297297	310326	280308	209211	000000	188200	000000	127127	157161	194238
R_adu_380	172204	000000	000000	000000	171203	000000	000000	000000	107107	153157	000000
R_adu_400	176180	301305	000000	000000	173203	182202	000000	000000	119127	000000	000000
R_adu_420	160168	281305	358386	300320	173197	178202	200208	230250	127131	157173	000000
R_adu_440	176180	301305	302310	288332	173203	182202	216224	226246	127127	161169	000000
R_adu_460	176188	277297	322338	240288	169171	174174	228236	234234	119131	153161	194246
R_adu_480	176176	297301	306386	300332	173173	182186	148220	226230	107127	157161	230250
R_adu_500	168188	285309	302346	296332	000000	182186	000000	226250	107131	157169	202238
R_adu_A	168208	301301	306338	304312	157157	174186	192236	254258	127131	157157	230238

