

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**COMPARAISON DE LA RÉPONSE AU TRANSFERT EN
EAU DE MER CHEZ DEUX SOUCHES D'OMBLES DE
FONTAINE ET DE LEURS HYBRIDES RÉCIPROQUES
AVEC EMPHASE SUR LA RÉPONSE TISSULAIRE
BRANCHIALE**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© ANDRÉE-ANNE LEMIEUX

mai 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Composition du jury :

Denis Chabot, président du jury, Institut Maurice Lamontagne

Céline Audet, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski

Guy Claireaux, examinateur externe, Université de Bretagne Occidentale

Dépôt initial le 29 novembre 2013

Dépôt final le 18 mai 2014

Je dédie ce mémoire à ma famille qui m'encourage depuis le tout début dans cette aventure universitaire et également à mon amoureux qui m'a soutenue dans les moments moins faciles.

REMERCIEMENTS

Bien qu'un seul étudiant obtienne un diplôme, beaucoup de personnes l'ont entouré afin de réaliser son projet de maîtrise. Je vous dois donc bien des remerciements.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice qui m'a donné ma première opportunité de travailler à la station aquicole de Pointe-au-Père et de me familiariser avec le monde de la recherche. Après trois étés dans son laboratoire, elle m'a fait confiance et m'a donné la chance de faire une maîtrise sur l'omble de fontaine, un poisson que j'affectionne particulièrement. C'est au cours de ces deux années que j'ai appris la rigueur scientifique et la persévérance. Merci Céline de m'avoir soutenue pendant ces trois années et de m'avoir appris plus de choses que tu le crois.

Également, je tiens à remercier mes collègues de laboratoire et, plus particulièrement, Marion Pillet et Wahiba Ait Youcef qui m'ont apporté un peu de vie sociale pendant ces études. Merci à tous ceux qui ont pris le temps de s'occuper de mes poissons, de m'aider dans les échantillonnages (Renée Gagné, Catherine Audet-Walsh, Julie Chabot-Allard, Laurie Beaupré) et dans les manipulations au laboratoire (Claude Belzile et Éric Parent). Un merci particulier à Michèle Rousseau-Pelletier qui a été d'une aide précieuse pour toute la partie en biologie moléculaire.

De plus, bien qu'un encadrement scolaire soit très important dans la réalisation d'un projet de recherche, je ne peux pas passer sous silence, l'immense support de ma famille. Merci papa de m'avoir botté les fesses quand j'en avais besoin et merci maman de me faire comprendre que ce n'est pas si pire, ça va aller mieux demain. Merci à ma sœur Maryse d'être là pour me changer les idées! Merci à mes amies et à mes cousines qui ne comprennent rien à la biologie, mais qui prennent le temps de m'écouter quand même. Finalement, merci à mon amoureux Francis, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans toi. Tu

as toujours été là pour me soutenir quand j'avais besoin de me faire comprendre, que tout va aller pour le mieux et de m'écouter même si je répétais la même chose sans arrêt. Tu as toujours su m'épauler et pour cela, je t'en serai toujours reconnaissante et tu peux considérer qu'une partie de ce mémoire t'appartient également.

Et enfin, je remercie les organismes subventionnaires du CRSNG pour les fonds nécessaires à la réalisation de ce projet ainsi que le Réseau Aquaculture Québec (RAQ) qui m'a permis d'assister à un congrès au Nouveau-Brunswick pour parfaire mon cheminement. Je remercie aussi l'Université du Québec à Rimouski (UQAR) et l'Institut des sciences de la mer (ISMER) pour la formation académique complète.

RÉSUMÉ

L'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) de la famille des *Salmonidae* est une espèce présente dans la rivière Laval au Québec où elle se retrouve sous forme de deux populations parapatriques génétiquement distinctes. L'une d'elles est anadrome tandis que l'autre est résidente. La forme anadrome effectue des migrations saisonnières en eau salée alors que la forme résidente demeure en eau douce pour l'ensemble de son cycle de vie. L'objectif principal de cette étude était de déterminer si après un transfert en eau de mer, les deux souches d'ombles de fontaine et leurs hybrides démontrent une capacité de réorganisation cellulaire au niveau du tissu branchial et si l'expression des gènes liés à l'apoptose est plus élevée chez les anadromes que chez la forme résidente. Pour ce faire, nous avons exposé des individus des deux populations à des salinités 0 à 28 ‰ (augmentations de 2 ‰ par jour) au printemps ainsi que leurs hybrides réciproques. Un groupe de poissons témoins est demeuré en eau douce chez les formes pures et les hybrides. À l'atteinte de 28 ‰ (jour 14), l'osmolalité plasmatique était significativement plus élevée chez les résidents que chez les anadromes et les hybrides alors qu'elle est demeurée stable en eau douce. Chez les individus demeurés en eau de mer, au niveau branchial, chez les deux formes, le nombre de cellules à chlorure a diminué tant au niveau des lamelles branchiales qu'au niveau des filaments respiratoires à l'atteinte de 28 ‰. Par contre au même moment, on a observé plus de cellules à mucus sur les filaments branchiaux chez la forme anadrome que chez la forme résidente. Au niveau génique, une sous-expression des gènes grancalcine et annexine A2 a été observée chez les individus échantillonnés en eau de mer et ce, pour les deux formes. En août, l'indice hépatosomatique était plus élevé chez les animaux maintenus en eau salée par rapport à ceux restés en eau douce. En conclusion, les deux formes et les hybrides ne diffèrent pas de façon importante dans leur réponse physiologique, histologique et génique aux changements de salinité.

Mots clés : Omble de fontaine, anadromie, résident eau douce, apoptose, cellules à chlorure, annexine A2 et grancalcine

ABSTRACT

Brook charr *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) (family Salmonidae) from the Laval River, Quebec, pertains to two genetically distinct parapatric populations, one anadromous and one resident. The anadromous form undergoes seasonal migrations in salt water while the resident form remains in fresh water for its entire life cycle. The main objective of this study was to determine if there is a cellular reorganization at the gill tissue level and if the expression of apoptosis-related genes is higher in anadromous than in resident fish. We also studied the response of reciprocal hybrids to check for parental forms effects. Both anadromous and resident fish with their hybrids were gradually transferred to salt water (0 up 28 ‰ with increments of 2 ‰ per day) in the spring. Controls remained in fresh water. When salinity of 28 ‰ was reached (day 14), plasma osmolality was higher in resident than in anadromous fish and hybrids. On the same sampling day, at the gill level, in both anadromous and resident fish, the number of chloride cells had decreased both on lamella and filaments at 28 ‰ (day 14). However, there were more mucous cells on gill filaments in anadromous fish than in freshwater residents. At the gene level, expression of grancalcin and annexin 2 was lower in salt water and for both forms. In August, the hepatosomatic index was higher in fish that had spent the summer in salt water compared to those raised in fresh water. In conclusion, hybrids and both anadromous and resident fish did not differ much in their physiological, histological and genetic response to an increase in salinity.

Keywords: Brook charr, anadromous, resident, apoptosis, chloride cells, annexin A2 and grancalcin

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	IX
RÉSUMÉ	XI
ABSTRACT.....	XIII
TABLE DES MATIÈRES.....	XV
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
LISTE DES FIGURES	XIX
INTRODUCTION	1
MATÉRIEL ET MÉTHODE	11
2.1 FORMATION DES FAMILLES	11
2.2 ÉCHANTILLONNAGE.....	12
2.3 HISTOLOGIE	14
2.3.1 Microscopie optique	14
2.3.2 Microscopie confocale	15
2.4 MESURES ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES	15
2.5 EXPRESSION GÉNIQUE	16
2.6 TRAITEMENT DES DONNÉES.....	23
RÉSULTATS.....	25
3.1 COMPARAISON PHYSIOLOGIQUE ENTRE LES DIFFÉRENTS CROISEMENTS (SOUCHES PURES ET INDIVIDUS HYBRIDES)	25
3.1.1 Croissance.....	25
3.1.2 Indicateurs osmotiques et hématologiques.....	34

3.2 COMPARAISON DE LA STRUCTURE DU TISSU BRANCHIAL ENTRE LES DEUX	
FORMES	44
3.2.1 Nombre de cellules à chlorure sur les filaments et les lamelles branchiales	44
3.2.2 Épaisseur du filament branchial et de la lamelle respiratoire	50
3.2.3 Autres mesures histologiques	56
3.3 COMPARAISON DE L'EXPRESSION GÉNIQUE ENTRE LES SOUCHES PURES	58
DISCUSSION	61
4.1 RÉPONSE DES DIFFÉRENTS CROISEMENTS À UN TRANSFERT EN EAU DE MER À	
28 ‰	61
4.2 COMPARAISON DE LA STRUCTURE DU TISSU BRANCHIAL ET DE L'EXPRESSION DE	
GÈNES RELIÉS À L'APOPTOSE ENTRE RÉSIDENTS ET ANADROMES	65
CONCLUSION GÉNÉRALE	71
ANNEXE I	73
ANNEXE II	75
ANNEXE III	77
ANNEXE IV	79
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nombre de poissons échantillonnés à l'été 2011 en fonction des formes (anadrome et résidente) et des croisements (Anadrome♀-Résident♂ et Résident♀-Anadrome♂), du traitement et des jours.....	13
Tableau 2 : Séquences obtenues lors du séquençage à l'Institut Maurice-Lamontagne (IML) pour l'ensemble des gènes à l'étude	20
Tableau 3 : Amorces utilisées pour la méthode TaqMan.	21
Tableau 4 : Résultats des ANOVAs à trois facteurs : Jours (0, 3, 7, 14 et 60), Forme (AR, R, RA et A) et Traitement (Eau douce et Eau de mer) sur l'ensemble des variables physiologiques.....	26
Tableau 5 : Résultats des ANOVAs à deux facteurs : Jours (0 et 14) et Forme (Résident et Anadrome) en eau douce seulement.....	51
Tableau 6 : Résultats des ANOVAs à deux facteurs : Jours (0, 7 et 14) et Forme (Résident et Anadrome) en eau de mer seulement	52
Tableau 7 : Épaisseur du filament branchial et de l'épithélium du filament branchial chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues soit en eau douce ou en eau de mer au mois de juin.....	53
Tableau 8 : Distance interlamellaire (DI), distance de diffusion (DD), épaisseur de l'épithélium lamellaire (EEL) et nombre de cellules à mucus sur les lamelles respiratoires (CML) chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues en eau douce (ED) ou en eau de mer (EM) durant au mois de juin	55

Tableau 9 : Nombre de cellules à mucus sur le filament (CMF) chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues soit en eau douce ou en de mer au mois de juin.....57

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Gel d'électrophorèse à 2 % d'agarose avec 100 µl de bromure d'éthidium (500 µg/ml) après l'extraction d'ARN.....	17
Figure 2 : Gel d'électrophorèse à 2 % d'agarose avec 100 µl de bromure d'éthidium (500 µg/ml) après la vérification des amorces.....	18
Figure 3 : Validation de la courbe standard effectuée à partir du gène 18S.....	21
Figure 4 : Validation de l'efficacité de la PCR effectuée à partir du gène 18S.....	22
Figure 5 : Longueur chez des ombles de fontaine résidents et anadromes maintenus soit en eau douce (ligne pointillée), soit en eau de mer (ligne pleine) durant la période estivale.....	28
Figure 6 : Masse chez les ombles de fontaine maintenus soit en eau douce (ligne pleine) soit en eau de mer (ligne pointillée) pendant la période estivale.....	29
Figure 7 : Longueur d'ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides (R♀A♂ et A♀R♂) pour le jour 60.....	30
Figure 8 : Masse chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides (R♀A♂ et A♀R♂) pour le jour 60.....	31
Figure 9 : Indice hépatosomatique chez des ombles de fontaine maintenus en eau douce (ligne pointillée) ou en eau de mer (ligne pleine) durant la période estivale.....	32
Figure 10 : Indice hépatosomatique chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides (R♀A♂ et A♀R♂) qui ont été maintenus en eau douce (triangle) ou eau de mer (carré) durant 60 jours.....	33

Figure 11 : Pourcentage d'hématocrite chez des ombles de fontaine durant la période estivale.....	35
Figure 12 : Pourcentage d'hématocrite chez des ombles de fontaine de souches maintenues soit en eau de mer ou en eau douce.....	36
Figure 13 : Concentration d'hémoglobine chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides (R♀A♂ et A♀R♂).....	37
Figure 14 : Concentration moyenne d'hémoglobine par globule rouge chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides (R♀A♂ et A♀R♂).....	38
Figure 15 : Concentration moyenne d'hémoglobine par globule rouge chez des ombles de fontaine maintenus en eau douce (ligne pointillée) et en eau de mer (ligne pleine) durant la période estivale.....	40
Figure 16 : Osmolalité plasmatique chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides (R♀A♂ et A♀R♂) pendant la période estivale.....	41
Figure 17 : Osmolalité plasmatique chez des ombles de fontaine maintenus en eau de mer (ligne pointillée) ou en eau douce (ligne pleine) durant la période estivale.....	42
Figure 18 : Microphotographies de filaments et lamelles branchiales d'ombles de fontaine résidents au jour 14, en eau de mer.....	45
Figure 19 : Microphotographies de filaments et lamelles branchiales d'ombles de fontaine anadromes au jour 14 en eau de mer.....	46
Figure 20 : Microphotographies de filaments et lamelles branchiales d'ombles de fontaine en microscopie confocale à 630x.....	47
Figure 21 : Nombre de cellules à chlorure sur les filaments branchiaux chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues en eau de mer ou en eau douce en juin.....	48

Figure 22 : Nombre de cellules à chlorure sur les lamelles respiratoires chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues soit en eau douce ou en eau de mer en juin.....	49
Figure 23 : Épaisseur des lamelles respiratoires chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues soit en eau de mer et en eau douce en juin	54
Figure 24 : L'expression génique du gène Grancalcine ($-\Delta\Delta\text{CT}$) chez des ombles de fontaine résidents (Forme R) et anadromes (Forme A) maintenus soit en eau douce ou en eau de mer durant la période estivale.....	58
Figure 25 : L'expression génique du gène Annexine A2 ($-\Delta\Delta\text{CT}$) chez des ombles de fontaine résidents (Forme R) et anadromes (Forme A) maintenus soit en eau douce ou en eau de mer durant la période estivale.....	59

INTRODUCTION

Les eaux douces du Québec regorgent d'une multitude d'espèces de poissons parmi lesquels la famille des *Salmonidae* est bien représentée. Cette famille y a plusieurs représentants, entre autres, le grand corégone (*Coregonus clupeaformis*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le saumon atlantique (*Salmo salar*), la truite brune (*Salmo trutta*), le touladi (*Salvelinus namaycush*), l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*), l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) et plus encore... (Bernatchez et Giroux, 2000). Bien que souvent présente en eau douce, cette famille se retrouve aussi en eau de mer. En effet, les salmonidés font partie du 5 % d'espèces amphihalines que contient l'ordre des téléostéens (Evans, 1984). Par définition, une espèce amphihaline peut vivre en eau douce et en eau de mer (Le petit Larousse illustré, 2008). Les différents genres de la famille des salmonidés ont par contre des niveaux d'anadromie distincts et le genre *Salvelinus* est celui dont l'anadromie est la moins prononcée (Power, 1980). Pour les classer selon leur degré d'anadromie, Rounsefell (1958) avait utilisé six caractéristiques du cycle de vie des anadromes soit la distance parcourue lors de la migration, la durée de séjour en mer, le stade de maturité en mer, l'habitat de frai, la mortalité après le frai et l'occurrence des formes d'eau douce. Plusieurs espèces ou populations de salmonidés doivent s'adapter à des changements de salinité dès leur plus jeune âge. Dans la rivière Ste-Marguerite, il a été observé en milieu naturel que l'omble de fontaine va migrer en eau de mer vers l'âge d'un ou deux ans selon la grosseur et devenir ichtyophage lorsqu'il atteint 25 cm (Thériault et Dodson, 2003 ; Morinville et Rasmussen, 2006).

La famille des salmonidés est l'un des groupes de poissons les plus intensément étudiés et cela est dû à son importance sur le plan écologique, mais surtout à sa valeur économique (Leong *et al.*, 2010). On constate dans l'Est du Canada que la pêche sportive

est très lucrative surtout grâce au saumon atlantique. Cependant, comme pour bien d'autres espèces de poissons, les populations du saumon atlantique sont malheureusement en déclin. Pour compenser, la pêche sportive s'est alors tournée vers une espèce proche parente : l'omble de fontaine.

La forme anadrome, appelée aussi truite de mer, est fort appréciée des pêcheurs sportifs puisque sa vigueur ressemble à celle du saumon atlantique (MPO, 2013). L'exploitation de cette ressource offre ainsi une alternative envisageable aux pêcheurs passionnés. L'omble de fontaine est une espèce endémique à l'Amérique du Nord qu'on retrouve principalement entre 35 et 60 degrés de latitude Nord (Scott et Crossman, 1973), soit dans les mêmes régions que le saumon atlantique. On trouve dans les rivières québécoises deux stratégies de vie exprimées chez l'omble de fontaine : l'une étant résidente, c'est-à-dire qu'elle demeure en eau douce toute l'année et l'autre étant anadrome et effectuant des migrations saisonnières vers l'eau de mer (Wilder, 1952). Chez l'omble de fontaine, Curry *et al.* (2010) ont proposé que l'anadromie serait un trait ancestral qui émerge des résidents en eau douce. Il habite principalement les eaux claires, fraîches et bien oxygénées que ce soit en rivière ou ruisseau pour les résidents ou les eaux estuariennes et côtières pour la forme anadrome. Cependant, les mouvements en eau de mer de l'omble de fontaine anadrome sont beaucoup moins importants que ceux du saumon atlantique et se limitent aux eaux côtières environnantes (Bernatchez et Giroux, 2000).

La rivière Laval (48°44'N ; 69°05'O) sur la Côte-Nord, aux environs de Forestville, abrite deux populations d'ombles de fontaine, l'une est anadrome et l'autre résidente. Elles sont techniquement considérées comme parapatriques puisqu'il y a peu de limitations géographiques et de barrières physiques empêchant leur co-habitation dans les mêmes habitats. Cependant, des études précédentes ont montré qu'elles sont différentes génétiquement (Castric et Bernatchez, 2003; Castric et Bernatchez, 2004). De plus, il y a une isolation reproductrice temporelle puisque les deux populations vont frayer en eau douce avec un décalage (Boula *et al.* 2002). Au contraire de la population résidente, la population d'ombles de fontaine anadrome va effectuer des migrations saisonnières dans la

baie Laval des mois de mai à septembre afin de profiter d'une plus grande richesse des milieux estuariens (Curry *et al.*, 2006). Les migrations saisonnières, de l'eau douce à l'automne pour effectuer le frai à l'eau de mer, en saison chaude, pour se nourrir, sont de 22 km (Boula *et al.*, 2002 ; Curry *et al.*, 2006). Mais pourquoi migrer ? La migration offre des avantages puisque le milieu marin est richement pourvu en nourriture et que l'acclimatation à l'eau de mer s'accompagne d'une stimulation de l'hormone de croissance. Une meilleure croissance chez les ombles de fontaine fournit également une meilleure chance de se reproduire puisque chez les femelles, la fécondité augmente avec la taille (Perry *et al.*, 2004 ; Perry *et al.*, 2005 ; Morinville et Rasmussen, 2006). Cependant, pour être efficace en milieu marin, l'animal doit adapter son corps au nouvel environnement.

En effet, l'utilisation estivale des habitats côtiers s'accompagne de plusieurs modifications physiologiques liées entre autres à l'osmorégulation afin de permettre l'acclimatation à la différence de salinité entre les deux milieux, c'est-à-dire d'un passage à l'eau douce vers un milieu salé variant entre 26 et 30 ‰ (Curry *et al.*, 2006). Les téléostéens maintiennent la concentration ionique et l'osmolalité des fluides corporels à des niveaux différents de ceux de l'environnement externe, que ce soit en eau douce ou en eau salée (Leblanc *et al.*, 2003 ; Evans, 1993) maintenant un gradient ionique et osmotique entre les fluides corporels et l'environnement externe (Kaneko *et al.*, 2002). Le mécanisme physiologique de base pour la régulation ionique en eau de mer est l'augmentation du nombre d'ionocytes au niveau branchial (cellules à chlorure), de l'activité de Na⁺ K⁺-ATPase branchiale et de la perméabilité membranaire (McCormick, 1994 ; McCormick *et al.*, 2009). Pour s'adapter à l'eau de mer, certaines espèces de salmonidés subissent un phénomène de smoltification qui correspond à la mise en place de transformations physiques, comportementales et physiologiques préalable à la migration (Hoar, 1988 ; Nilssen *et al.*, 1997 ; McCormick *et al.*, 1998 ; Hutchison et Iwata, 1998). L'âge de la première migration, et par conséquent de la smoltification, varie entre un et sept ans selon les facteurs abiotiques et biotiques soit la latitude, la salinité, la productivité, la compétition inter et intra-spécifique et l'intensité de prédation (Lenormand *et al.*, 2004). Des études précédentes ont observé des migrations chez des juvéniles d'ombles de fontaine âgés de 1+

(Lenormand *et al.*, 2004 ; Thériault et Dodson, 2003). Bien que peu développé chez les ombles de fontaine, le phénomène de smoltification est tout de même présent au niveau de la capacité hypo-osmorégulatoire (Nilssen *et al.*, 1997) et cette espèce montre des signes d'anticipation osmorégulatoire (Claireaux et Audet, 2000). Les individus résidents ont également conservé la capacité osmorégulatoire en eau salée (Claireaux et Audet, 2000). Bastien (2010) a mis en évidence des différences entre les formes résidentes et anadromes de l'omble de fontaine de la rivière Laval au niveau enzymatique et physiologique. Les réponses à l'eau de mer ont été mesurées à l'aide de différents indicateurs : hormones (cortisol, T₄ ou thyroxine, T₃ ou triiodothyronine), activité de la Na⁺K⁺-ATPase, osmolalité plasmatique et croissance. Cependant, ce projet n'a été réalisé qu'en eau de mer avec les deux populations de la rivière Laval, la condition physiologique en eau douce n'étant évaluée que la journée précédant le transfert en eau de mer, limitant ainsi le pouvoir d'interprétation. Pour le présent projet, nous avons donc décidé de suivre parallèlement en eau douce et en eau de mer les différences de condition physiologique tout au long de la saison de croissance à la fois pour les deux formes ainsi que pour les croisements hybrides. L'utilisation de ces derniers permettra de déterminer si cette capacité est liée à des effets maternels.

En général, les téléostéens en eau de mer risquent constamment la déshydratation et doivent contrecarrer le gain passif d'ions et la perte d'eau (McCormick *et al.*, 2009 ; Christensen *et al.*, 2012). Les ombles de fontaine surmontent ce défi en buvant l'eau de mer pour combler les besoins en eau et les ions en surplus sont éliminés par l'urine (ions divalents) ou les branchies (ions monovalents comme le sodium et le chlore) (McCormick *et al.*, 2009). Par conséquent, les branchies doivent inverser leur fonction qui étaient d'absorber des ions en eau douce pour devenir un organe d'excrétion et, pour ce faire, elles utilisent des cellules spécialisées nommées ionocytes ou cellules à chlorure ou encore cellules riches en mitochondries (MRC) (Evans *et al.*, 2005). Les branchies sont en effet des organes respiratoires, mais sont aussi le principal lieu d'échanges d'ions, d'eau, d'excrétion des déchets azotés et de la régulation acide-base (Wendelaar Bonga et Van der Meij, 1989 ; Bœuf, 1993 ; Leblanc *et al.*, 2003 ; Evans *et al.*, 2005 ; Christensen *et al.*,

2012). Boulet et collaborateurs (2012) ont étudié l'expression génique au niveau des branchies afin de contraster les formes résidentes et anadromes et ont voulu vérifier la possibilité de préacclimatation liée à des mécanismes de physiologie d'anticipation. Pour ce faire, ils ont utilisé des biopuces du saumon atlantique. Bien que cette technologie permette de dresser un portrait global intéressant, elle ne donne pas l'obtention d'une réponse à une échelle plus fine. Une biopuce permet de comparer plus de 16 000 gènes et a facilité la comparaison de ceux-ci entre les deux formes, c'est-à-dire résidente et anadrome. Toutefois, si l'expression peut être comparée (surexpression ou sous expression chez un groupe par rapport à l'autre), elle ne peut pas être quantifiée par cette méthode. Boulet et collaborateurs (2012) ont donc confronté l'expression génique au niveau branchial entre individus anadromes et résidents 1+, en eau douce et en juin, soit la période de migration en milieu marin pour la population anadrome. Le muscle blanc a été utilisé comme tissu témoin et peu de gènes y étaient exprimés de façon différentielle entre résidents et anadromes. Étonnamment, dans les branchies, les gènes exprimés différemment entre les deux formes ne sont pas ceux qui avaient d'abord été envisagés tels que ceux reliés à l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ branchiale. L'étude de Boulet *et al.* (2012) a permis de mettre en évidence l'expression, avant le passage en eau de mer, de gènes codant pour des protéines qui ont un rôle dans le système immunitaire et un enrichissement en transcrits d'EST (*Expressed Sequence Tag*) reliés à la biosynthèse et au métabolisme protéique, à l'apoptose et à l'angiogenèse. En juin, les gènes codant pour ces protéines étaient différemment exprimés chez les anadromes. En effet, chez les anadromes, on a pu observer une forte régulation à la hausse de trois gènes soit la grancalcine, l'annexine A2 et la transcétolase. La grancalcine est une protéine de la famille des « EF-hand » et elle est spécifiquement exprimée dans les neutrophiles et dans les macrophages. Roes et collaborateurs (2003) ont trouvé que les protéines « EF-hand » sont impliquées dans la régulation de plusieurs processus cellulaires comme la migration cellulaire, l'apoptose et la fusion des membranes. De plus, il s'agit d'une protéine avec cinq sites de liaisons répétitifs pour le Ca^{2+} (Roes *et al.*, 2003 ; Xu et Xinquan, 2011). Le Ca^{2+} joue un rôle important dans plusieurs voies apoptotiques (Jia *et al.*, 2001) puisque les ions calcium contrôlent une

variété de phénomènes cellulaires incluant la contraction des muscles, l'adhésion, la sécrétion, la mobilité, la croissance, la différenciation, l'expression génique et la mort cellulaire (Maki, 2000). L'annexine A2 fait partie de la famille des annexines (Wang *et al.*, 2009) qui sont des protéines intracellulaires (Maki, 2000) jouant un rôle important dans le maintien homéostatique du Ca^{2+} (Liu *et al.*, 2003). Elle est présente dans différents sites de la cellule incluant le noyau, la membrane plasmique et le cytosol (Fang *et al.*, 2012) et il a été démontré qu'à la surface des macrophages, elle a un rôle phagocytaire relié au phénomène d'apoptose (Fang *et al.*, 2012 ; Fan *et al.*, 2004). L'annexine A2 est également impliquée dans plusieurs processus cellulaires incluant la survie de la cellule, la croissance, la division et la différenciation (Lokman *et al.*, 2011) de même que la prolifération, l'apoptose (Chiang *et al.*, 1999 ; Huang *et al.*, 2008), l'angiogenèse, la migration, l'invasion et l'adhésion cellulaire (Zhai *et al.*, 2011). La transcétolase est une protéine impliquée dans la régulation non oxydative de la voie penthose-phosphate et elle est significativement surexprimée dans plusieurs types de tumeurs puisqu'elle agit comme régulateur de la prolifération et du métabolisme des cellules cancéreuses (Hartmannsberger *et al.*, 2011, Xu *et al.*, 2009). Il a également été démontré qu'elle joue un rôle au niveau de l'apoptose cellulaire (Hartmannsberger *et al.*, 2011). Les études du transcriptome réalisées par Boulet *et al.* (2012) suggèrent donc la présence d'un fort remaniement cellulaire dans les branchies des poissons anadromes, phénomène qui ne serait pas présent chez les résidents. Cette hypothèse se base sur une surexpression des gènes reliés à l'apoptose et l'angiogenèse, ainsi qu'à la prolifération et la différenciation cellulaire chez les anadromes.

Les résultats obtenus par Boulet *et al.* (2012) étaient spécifiques au tissu branchial, puisqu'aucun résultat similaire n'a été obtenu dans le muscle, utilisé comme tissu témoin. Il a déjà été démontré que l'épithélium branchial a un haut taux de renouvellement cellulaire soit par apoptose ou nécrose (Wendelaar Bonga et Van der Meij, 1989). Physiologiquement, les branchies sont constituées de plusieurs arcs branchiaux qui sont cartilagineux et sur lesquels sont attachés les filaments ou lamelles branchiales primaires et les nombreuses lamelles branchiales secondaires. Au niveau histologique, l'épithélium lamellaire est constitué de cellules pavimenteuses, qui sont les cellules les plus nombreuses,

appuyées sur une lame basale (Wendelaar Bonga et Van der Meij, 1989). On y retrouve également des cellules à chlorure et des cellules à mucus. Premièrement, au niveau morphologique, les cellules à mucus sont souvent très grosses avec un noyau écrasé par le cytoplasme clair. Les cellules à mucus ont un rôle excréteur en transportant de nombreuses vésicules ciblant les pathogènes, les matériaux toxiques ou des particules de débris (Mladineo *et al.*, 2009). Celles-ci contiennent un gel polyanionique qui constitue le mucus (Roberts et Powell, 2003 ; Verdugo, 1984). Deuxièmement, les cellules à chlorure ou ionocytes sont pléomorphes, c'est-à-dire qu'elles se divisent en cellules accessoires, matures et dégénératives (Wendelaar Bonga et Van der Meij, 1989) et elles sont principalement localisées à la base des lamelles secondaires sur le filament et directement sur les lamelles secondaires. Contrairement aux ionocytes, les cellules accessoires ont une moins grande concentration de $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ (Christensen *et al.*, 2012). Les cellules à chlorure sont très larges avec un cytoplasme clair et un large noyau contenant une chromatine active (Maksimovich, 2008). Sender et collaborateurs (1999) ont montré chez *Platichthys flesus*, la présence de différences morphologiques entre des ionocytes aux formes angulaires lorsque le poisson vit en eau salée et aux formes plus rondes chez les poissons en eau douce. De plus, chez les téléostéens euryhalins, les ionocytes sont plus gros et plus nombreux en eau de mer qu'en eau douce (Karnaky *et al.*, 1976 et Dymowska *et al.*, 2012). La fonction étant la régulation des ions sodium et potassium dans l'organisme, les cellules à chlorure possèdent deux isoformes de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ (McCormick *et al.*, 2009). Chez l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*), il a été démontré qu'il y a inversement de la concentration des isoformes $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ dans les branchies c'est-à-dire qu'il y a une augmentation de αa et une diminution de αb au moment de la migration anadrome de l'eau de mer à l'eau douce (Bystriansky et Schulte, 2011 ; Bystriansky *et al.*, 2007). Les isoformes auraient des rôles spécifiques chez les salmonidés pour l'hypo-osmorégulation et l'hyper-osmorégulation. Par conséquent, l'expression génique de ces protéines diffère selon le milieu (Bystriansky et Schulte, 2011). Il a été démontré que la première isoforme $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ αa était localisée sur les filaments et les lamelles en eau douce alors qu'en eau de mer, elles sont présentes uniquement sur les filaments

(McCormick *et al.*, 2009). L'inverse a été observé pour l'autre isoforme de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, soit α1b (McCormick *et al.*, 2009). La dégénérescence des cellules à chlorure se fait par apoptose en montrant des signes de rétrécissement et de densification du cytoplasme et du noyau (Noguera et Bruno, 2010).

Chez les organismes multicellulaires, l'apoptose est très régulée et elle est la forme la plus typique de mort cellulaire programmée (Noguera et Bruno, 2010 ; Alberts *et al.*, 2002). Elle se produit par fragmentation de l'ADN (Chen *et al.*, 2006), réduction du volume du cytoplasme (Santi *et al.*, 2005), désassemblage de l'enveloppe du noyau et changements membranaires qui font en sorte que la cellule est rapidement phagocytée par les cellules voisines ou les macrophages (Alberts *et al.*, 2002). À l'instar de la nécrose, l'apoptose est une mort cellulaire qui ne fait pas intervenir la lyse de la cellule, ce qui empêche les dommages aux cellules voisines et permet le recyclage des composants organiques (Alberts *et al.*, 2002). L'apoptose permet aussi de contrôler le taux de division cellulaire. Elle peut être activée par des voies internes, c'est-à-dire à partir de signaux protéiniques ou bien par des voies externes par un contact avec un lymphocyte. La machinerie intracellulaire responsable de l'apoptose est semblable chez tous les organismes et dépend d'une famille de protéines nommée les caspases (Alberts *et al.*, 2002). Par exemple, lorsque la caspase 3 est activée dans la cellule celle-ci agit alors comme un effecteur central de la mort cellulaire apoptotique (Monteiro *et al.*, 2009). Ainsi, lorsque la cellule est endommagée ou stressée, la voie interne va s'activer en commençant par les mitochondries qui vont induire une protéine porteuse d'électron sur la cytochrome c dans le cytosol. Cela va activer le précurseur des caspases, les procaspases. S'ensuit alors une cascade de réactions de différentes caspases, chacune d'elles étant responsable d'une partie de la dégradation cellulaire. Pour la voie externe, un lymphocyte se lie avec ses protéines *fas* ligandes aux protéines *fas* de la cellule et active les procaspases inactives. Il y a ensuite une agrégation et la séparation des caspases actives qui causeront la mort de la cellule. Chez les poissons, l'apoptose branchiale est très commune après trois jours d'exposition à l'eau salée (Wendelaar Bonga et Van der Meij, 1989) et elle sera visible sur les cellules dont le noyau apparaît fluorescent sur un fond noir (Estabel *et al.*, 2003).

Le but de mon projet de maîtrise était de tester les hypothèses émises par Boulet et collaborateurs (2012) et Bastien (2010). Mon premier objectif était de vérifier si une différence entre les formes persiste tout au long de l'été et de tester, le cas échéant, si cette différence est présente entre les deux milieux préférentiellement utilisés par chacune des deux formes ou si elle est liée essentiellement à la forme. L'hypothèse testée était que les paramètres physiologiques diffèrent entre les deux formes et les croisements hybrides, en eau salée, durant la période estivale, mais pas en eau douce.

J'avais comme deuxième objectif de tester, au niveau branchial, l'hypothèse d'une réorganisation cellulaire chez les ombles de fontaine anadromes et d'une différenciation d'expression génique au niveau branchial entre les deux formes. J'avais également comme objectif de confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une réorganisation cellulaire dans les branchies des ombles anadromes, au printemps, en comparaison à des ombles résidents de même âge en comparant la structure histologique (épaisseur des filaments et lamelles branchiaux, distance de diffusion, populations de cellules à mucus et à chlorure). Pour répondre à cet objectif, nous avons également comparé, dans les branchies, l'expression génique par utilisation de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en temps réel pour les gènes identifiés par des biopuces comme étant différentiellement exprimés par les anadromes et résidents et ayant des fonctions liées au système immunitaire (Boulet *et al.*, 2012). Les gènes ciblés étaient la grancalcine, l'annexine A2 et la transcétolase et l'hypothèse testée était que les gènes liés à l'apoptose sont exprimés de façon différentielle entre les résidents et les anadromes.

Ce projet permettra ainsi de mieux distinguer les deux formes d'ombles de fontaine présentes dans la rivière Laval et d'accroître nos connaissances sur la physiologie des ombles anadromes.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 FORMATION DES FAMILLES

À l'automne 2009, à la station aquicole de l'UQAR-ISMER (Rimouski, QC), 37 géniteurs d'ombles de fontaine de souches résidentes et anadromes originaires de la rivière Laval à Forestville, QC, ont été utilisés afin de former 24 familles. Six familles anadromes, sept familles résidentes, six familles hybrides (anadrome-résident) et cinq familles hybrides (résident-anadrome) ont été produites. Ces familles sont de types demi-frères, c'est-à-dire que lors de la formation des familles, un même père a été utilisé pour former 1 famille de lignée pure (ex : anadrome ♀ et anadrome ♂) et 1 famille de type hybride (ex : résident ♀ et anadrome ♂). Les géniteurs anadromes et résidents ont été élevés dans les mêmes conditions environnementales respectant la température, la salinité et la photopériode du milieu naturel. Après la fécondation, l'incubation des oeufs a été effectuée dans le noir à une température de 4 °C dans des clayettes séparées où l'éclosion a eu lieu et ceci afin d'éviter le mélange des familles. Les alevins ont été maintenus dans ces bassins jusqu'au moment où le marquage par la coupure des nageoires pelviennes en juillet 2010 a été possible, soit à un poids moyen d'environ un gramme. Les familles ont ensuite été placées aléatoirement dans 5 bassins de 500 L. Les conditions de densité optimales d'élevage ont été respectées soit un maximum de 30 kg de poisson par m³. Les alevins ont été nourris avec de la moulée commerciale avec des rations basées sur leur poids, leur âge et la température de l'eau selon les indications du fabricant. Les coupures de nageoires ont été entretenues tous les 4 mois afin de ne pas perdre l'identification des familles. En mai 2011, les familles ont été marquées à nouveau avec des élastomères au niveau de l'oeil (rouge, bleu, vert et orange). Chaque famille avait alors un marquage unique qui a permis de refaire des groupes de familles au hasard pour les deux milieux expérimentaux testés.

Chaque famille a ainsi été séparée en deux lots égaux dans six nouveaux bassins de 500 L pour qu'une première moitié (traitement 1 ou eau de mer) subisse un passage de l'eau douce à l'eau de mer à raison de 2 ‰ par jour jusqu'à l'obtention d'une salinité de 28 ‰. La salinité étant vérifiée à l'aide d'un réfractomètre. La deuxième moitié (traitement 2 ou eau douce) a constitué le groupe témoin qui est demeuré en eau douce tout l'été.

2.2 ÉCHANTILLONNAGE

Les échantillonnages ont tous été effectués en après-midi. Les poissons étaient à jeun depuis 24 heures au début de l'échantillonnage. Il a été effectué aux jours 0, 3, 7, 14 et 60 débutant au moment de l'augmentation de la salinité lorsque requis. Étant donné l'augmentation progressive de salinité, ces jours correspondent à des valeurs de salinité de 0, 6, 14, 28 et 28 ‰ respectivement pour les bassins passés en eau de mer. Pour le jour 0, huit individus par famille ont été échantillonnés à raison de quatre par traitement. Aux jours 3, 14 et 60, 2 individus par familles ont été échantillonnés dans les deux milieux (eau douce et eau salée). Cependant, au jour 7, huit poissons par traitement ont été échantillonnés par traitement afin de permettre de mener des analyses en parallèle sur la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. La capture des poissons s'est effectuée de façon aléatoire. Lors des échantillonnages, il pouvait être difficile d'attraper le nombre total d'individus visé pour une même famille. Afin d'éviter des biais liés à l'échantillonnage d'animaux en provenance d'une même famille, comme indiqué précédemment, on capturait les poissons jusqu'à concurrence de 2 individus par famille. Si après plusieurs captures, certaines familles demeuraient sous-représentées, l'échantillonnage cessait tout de même afin d'éviter des stress inutiles dans les bassins expérimentaux. Également, lorsque les poissons étaient très petits, il était possible que la quantité de sang soit insuffisante pour effectuer l'ensemble des analyses plasmatiques, alors un autre poisson de la même famille dans le même groupe était échantillonné pour s'assurer que les familles soient bien représentées dans tous les groupes pour l'ensemble des analyses. Le nombre de poissons échantillonnés lors de cette expérience est présenté au tableau 1.

Tableau 1 : Nombre de poissons échantillonnés à l'été 2011 en fonction des formes (anadrome et résidente) et des croisements (Anadrome♀-Résident♂ et Résident♀-Anadrome♂), du traitement et des jours

Jour	Traitement	Anadrome	Résident	Anadrome- résident	Résident anadrome	Totaux
0	Eau douce	24	29	25	20	98
	Eau de mer	24	28	23	20	95
3	Eau douce	13	14	12	10	49
	Eau de mer	13	14	12	9	48
7	Eau douce	47	53	48	40	188
	Eau de mer	47	49	47	39	182
14	Eau douce	14	14	13	9	50
	Eau de mer	12	13	13	10	48
60	Eau douce	12	14	12	10	48
	Eau de mer	16	16	13	10	55
Totaux		222	244	218	177	861

À chaque échantillonnage, les poissons ont été anesthésiés à l'aide de MS-222 (3-aminobenzoic acide éthyle ester, 0,12 g L⁻¹), puis identifiés à la famille. Les animaux ont été pesés et mesurés. Ensuite, une prise de sang a été effectuée par ponction caudale avec une seringue munie d'une aiguille 25G 3/8 enduite d'héparine d'ammonium et le sang a été centrifugé à 0,6 g pendant 3 minutes. Le plasma récupéré a été conservé à -80 °C. L'hématocrite a été mesuré sur place en utilisant des capillaires héparinés qui ont été centrifugés à 4000 g pendant 3 minutes, une mesure en pourcentage a été obtenue (Audet et Claireaux, 1992). Le pourcentage d'hématocrite correspond au pourcentage de plaquettes et de globules sanguins qu'on retrouve dans le sang. Un échantillon de 5 µl de sang a été ajouté à 2,5 ml de solution de Drabkin pour mesurer l'hémoglobine ultérieurement en laboratoire. Puis, le deuxième arc branchial gauche a été prélevé et conservé dans un fixateur pour l'histologie. Le deuxième arc branchial droit a été prélevé et conservé à une

température de -80 °C pour la biologie moléculaire. Finalement, le muscle épaxial et le foie ont été prélevés, puis congelés dans l'azote liquide après une pesée pour le foie et conservés à -80 °C. Pour éviter une contamination, tous les instruments et le plan de travail ont été rincés à l'alcool éthylique anhydre entre chaque individu.

2.3 HISTOLOGIE

Les analyses histologiques ont été effectuées sur les échantillons d'arc branchial gauche. Lors de l'échantillonnage, ces tissus ont été fixés dans une solution formaldéhyde 4 % – glutaraldéhyde 5 % – tampon cacodylate, pH 7,2 et conservés à 4 °C pour un maximum de deux semaines. Une série de déshydratations a ensuite été effectuée dans différents bains d'éthanol de 50 % à 100 % pendant 15 min en conservant les échantillons sur glace. L'enrobage des tissus a été effectué dans une résine de glycol-méthacrylate (JB-4 embedding kit, Marivac) à température de la pièce. Les couteaux de verre ont été taillés avec un Taab-Pyper knifemaker MKII. Des coupes sagittales de 3 µm d'épaisseur ont été effectuées à l'aide d'un microtome de type REICHERT-JUNG 2050 jusqu'à l'obtention de trois filaments par coupe. Les coupes ont ensuite été montées sur lame.

2.3.1 Microscopie optique

Une coloration au bleu de méthylène (0,01 %) et fuchsine basique (0,01 %) a été effectuée. Le médium utilisé pour le montage des lames étaient le Permunt (Fisher Scientific). Des mesures ont été effectuées sur trois filaments différents ainsi que sur 10 lamelles sur chacun des filaments selon Audet et Wood (1993). Le comptage des cellules a été réalisé sous un microscope optique OLYMPUS BX 50 à un grossissement de 1025x en immersion. Les cellules à chlorure et les cellules à mucus ont été comptabilisées sur trois filaments choisis aléatoirement ainsi que sur 10 lamelles secondaires par filament

pour un total de 30 lamelles par individu. Le nombre de cellules a été rapporté sur la distance mesurée et est exprimé en nombre de cellules/200µm. L'ensemble des distances sur les filaments et les lamelles a été mesuré avec le logiciel MOCHA (Jandel Scientific sur Windows 98). Un total de 64 poissons a été analysé incluant des animaux échantillonnés aux jours 0, 7 et 14 pour les souches pures seulement. Étant donné la similarité entre les deux souches, les hybrides n'ont pas été analysés.

2.3.2 Microscopie confocale

Pour la photographie en microscopie confocale (ZEISS LSM700, Microscope AXIO), le réflecteur utilisé était le vert AF488 avec une lumière d'excitation à une longueur d'onde de 495 nm et une lumière émise à 525 nm. Les marqueurs utilisés étaient FITC et DAPI. Le logiciel utilisé pour les images était Zen 2009 sur Windows 7.

2.4 MESURES ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES

L'indice hépatosomatique a été calculé de la façon suivante :

$$\text{IHS} = \frac{\text{Poids du foie (g)}}{\text{Poids total (g)}}$$

Étant donné que les poissons étant sexuellement immatures, le calcul ne prenait pas en compte le poids des gonades. La concentration d'hémoglobine a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm (spectrophotomètre Beckman DU® 640). La concentration moyenne d'hémoglobine par globule rouge (MCHC) a été calculée à partir de l'hémoglobine et de l'hématocrite de la façon suivante :

$$\text{MCHC} = \text{Hémoglobine (mg/ml)} * \text{hématocrite (\%)}$$

L'osmolalité plasmatique a été mesurée en duplicat avec un osmomètre (Vapro pressure 5520, Wescor). Les valeurs obtenues d'osmolalité sont en mOsm/kg.

2.5 EXPRESSION GÉNÉRIQUE

Les analyses moléculaires ont été effectuées sur les échantillons d'arc branchial droit. Les tissus ont été homogénéisés à l'aide d'un sonicateur (Sonicator Ultrasonic processor XL2020) et l'ARN extrait à l'aide d'une trousse d'extraction Qiagen (RNeasy Plus Mini Kit). Les étapes de centrifugation nécessaires pour l'extraction ont été effectuées avec une centrifugeuse Eppendorf 5415C. La concentration et la pureté de l'ARN ont été mesurées/vérifiées à l'aide d'un appareil Nanovue (Nanodrop de General Electric) et la qualité de l'extraction a été validée sur gel d'électrophorèse à 2 % d'agarose avec 100 µl de bromure d'éthidium (500 µg/ml) (Figure 1). Une échelle moléculaire de 50 à 2000 Pb a été utilisée (Sigma, PCR Marker). Les photos des gels ont été prises à 325 nm sur un Alpha Imager HP (Alpha Innotech) avec le logiciel Alpha Imager 3400 (Windows XP).

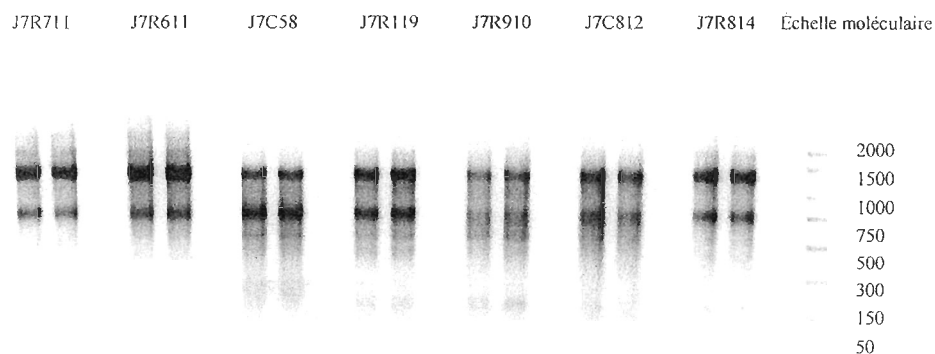


Figure 1 : Gel d'électrophorèse à 2 % d'agarose avec 100 μ l de bromure d'éthidium (500 μ g/ml) après l'extraction d'ARN. Les deux bandes visibles correspondent au 28S et 18S. Dans cet exemple, l'échantillon J7R910 n'a pas été conservé puisque les bandes n'étaient pas bien définies.

La transcription inverse a été effectuée avec une trousse Qiagen (QuantiTect Reverse, Qiagen). Une recherche sur *Genbank* pour les gènes sélectionnés a permis de dessiner une première série d'amorces à l'aide du logiciel Primer-Blast (Tableau 2). Celles-ci ont été testées sur un échantillon d'ADN_c avec la trousse *Amplitag Gold 360* en PCR classique (*Polymerase reaction chain*) afin de vérifier qu'un seul fragment était amplifié. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : un cycle d'activation de 10 min à 95 °C, suivi de 40 cycles PCR de 30 sec à 95 °C, 30 sec à 60 °C et 1 min à 72 °C suivis d'une extension finale de 7 min à 72 °C. Une vérification sur un gel d'agarose a été faite pour s'assurer d'obtenir une seule et unique bande dont la position sur l'échelle moléculaire variait selon les amorces utilisées et la longueur du fragment d'ADN (Figure 2).

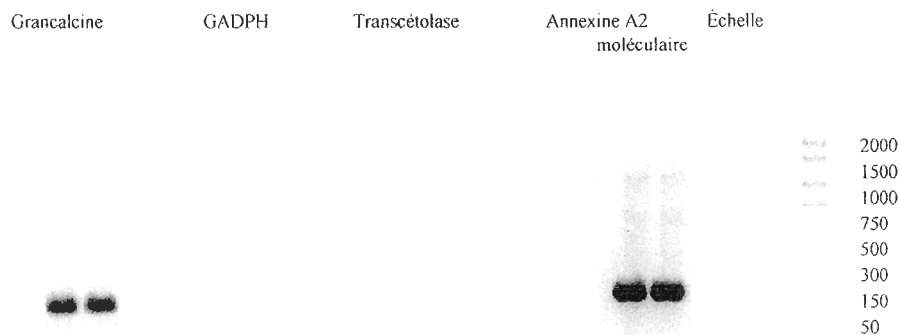


Figure 2 : Gel d'électrophorèse à 2 % d'agarose avec 100 μ l de bromure d'éthidium (500 μ g/ml) après la vérification des amorces. Une seule bande est visible autour de 150 Pb. Dans cet exemple, sur les quatre paires d'amorces testées, seulement deux paires étaient valides.

Le produit du PCR classique a ensuite été utilisé pour le séquençage des fragments à l'Institut Maurice-Lamontagne. Pour ce faire, une purification du produit PCR a été faite sur colonne (Qiagen, QIAquick PCR Purification kit) suivi d'une PCR classique (les conditions d'amplification étaient les suivantes : 35 cycles PCR comprenant un cycle de dénaturation de 30 sec à 95 °C, un cycle d'amplification de 15 secondes à 60 °C et un cycle d'extension pendant 4 min à 60 °C pour une durée approximative de 4 heures) afin d'amplifier l'échantillon pour le séquençage avec le BigDyeterminator version 3.1 (Applied Biosystems). Le produit de la PCR a ensuite été purifié (Ultra-Sep Dye Removal columns) et séché (AS160 Automatic SpeedVac). Le produit a été suspendu dans du formamide et séquencé (Tableau 2). Le séquençage a été effectué avec un séquenceur 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems-Hitachi). Une fois la séquence obtenue validée, une courbe d'étalonnage a été effectuée en PCR quantitative (Bio-Rad, MyiQ-icycler-Real time PCR) avec le marqueur SYBRGreen (BIO-RAD) afin de valider l'efficacité de la transcription inverse. Une courbe de dilution a été effectuée avec l'ARN extrait (de 100 ng à 10 pg d'ARN) et une transcription inverse a été effectuée sur ces dilutions afin de vérifier si la pente de la courbe standard était égale à -3,3 (Figure 3).

Pour les analyses d'expression génique, nous avons utilisé l'appareil 7900HT (Applied Biosystem). Pour la méthode TaqMan, deux amorces et une sonde ont été définies à partir de la séquence préalablement obtenue (Tableau 3). Ces nouvelles paires d'amorces ont été dessinées avec le logiciel Primer Express 3.0. Les amorces sont de type TaqMan Gene Expression Assay Mix et le réactif est TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life Technology).

Ensuite, avec les amorces TaqMan, une courbe standard a été réalisée avec une dilution d'un pool d'ADN de 10^{-1} à 10^{-4} afin de vérifier l'efficacité de la PCR sur l'ensemble des gènes (Figure 4). Pour être efficace, la pente doit être de -3,3 comme pour la validation de l'efficacité de la transcriptase inverse.

Tableau 2 : Séquences obtenues lors du séquençage à l'Institut Maurice-Lamontagne (IML) pour l'ensemble des gènes à l'étude

Gènes	Amorces (5'→3')	Séquences	Références
18S	F : CCCCCTAATTGGAATGAGTACACTTT R : ACGCTATTGGAGCTGGAATTACC	AAATCCTTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCT GGTGCCAGCAGCCGC (51 pb)	<i>Salmo salar</i> AJ427629 (Holzer <i>et al.</i> , 2002)
GADPH	F : GCAGGCCAGCAGGTGAAGG R : GGTGAAAGGTCAGCGGGGGC	CCAGCTTGCCACCCTCAGCCTTGACCTCACCGTGGAA AACGTCCTGGGTGGAGTCATACTTGAACATGTAGA CCATGTAGTCCAGGTCGATGAAGGGTCTGTTGATGG CCACAATCTCAACTCCCTTCTGGAGTGGAAATGCAG CACGGGTCACCAGACGCCGATACGGC (171 pb)	<i>Salmo trutta</i> EF406273.1 (Lucarda <i>et al.</i> , 2007)
Beta-actine	F : GCTGTCTCCCTCCATCGT R : TCTCCACGTAGCTGTCTTCTG	GCTGTCTCCCTCCATCGTCCGGTCCGTCACCGCATC AGGGAGTGTGGTTGGGATGGGCCAGAAAGACAGC TACGTGGGAGA (83 pb)	Alignement entre <i>O. mykiss</i> AF157514 (Yang <i>et al.</i> , 1999) et <i>S. salar</i> (Leong <i>et al.</i> , 2010)
Transcétolase	F : GCCGTATCGGGCGTCTGGTG R : CCAGCTTGCCACCCTCAGCC	TGGTGAAAGGTCAGCGGGGGCGGTATCTTCTGTTAG GGTAGCTCGGGCAGATGGTCTTGTGGGATTCTGA ATCTGAGCCTCGTAAGTCGTTAATCGGCCTCCTCT GGCCCGGTCTTAGGCATGGGCTTACCCAGTGCCAG ATTCAATCCATATCTCTCAATGCCTTGATCCTCTCCCC TTGAAGGTCTGCC (195 pb)	<i>Salmo salar</i> NM_001140534.1 (Leong <i>et al.</i> , 2010)
Annexine A2	F : GCTGGCGAAGTACAGCGGCTT R : AACGGATGTGGCCACCTGGA	AACGGATGTGGCCACCTGGATCTCTATCATGTCAGA GAGGAGTGTTCCTCACCTGCAGAAAGTGTGACAG GTATAAGAGCTACAGTCCCTACGACATGCAGGAGA GCATCAGGAAGGAGGTGAAGGGAGACCTGGAGAAG TCCTTCTCACACTCGTTGAGTGTGTTGAGAAACAAG CCGCTGTACTTCGCCAGCA (197 pb)	<i>Salmo salar</i> CA057408.1 (Rise <i>et al.</i> , 2004)
Grancalcine	F : TGCCCCAATGGTCACCAAGCA R : TGCCCTGTGTTGTAAACATGCCCT	GGCGATTTGCCCTGTGTTGTAAACATGCCCTGTTATT CCTTCGCAAAGAAAAGCATGCATTAACCTACCGCCAA CAATTATGCTACAACCTTTTGTGATAACCTGCAT TTTCATAGTTCAGGGTGAATATTTCTCAGACAT GTAGTTAAGTGCTTGGTGACCATTGGGGCAA (176 pb)	<i>Salmo salar</i> CK990820.1 (Rise <i>et al.</i> , 2004)

* Le gène 18S et BETA-ACTINE avaient été séquencés par Marie Vagner (Sauvage *et al.*, 2012)

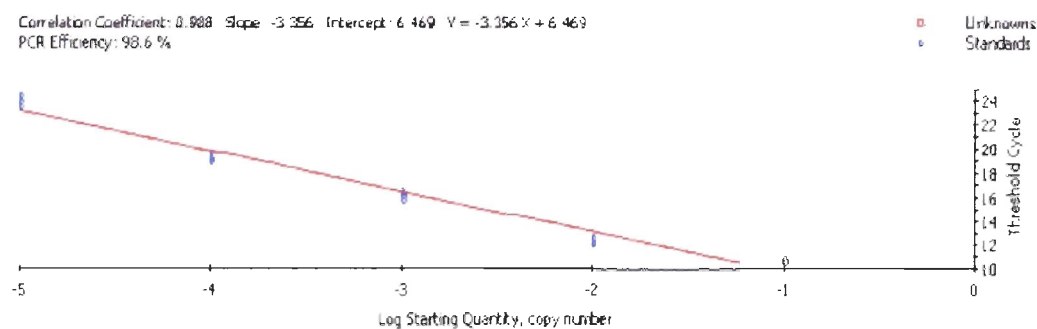


Figure 3 : Validation de la courbe standard effectuée à partir du gène 18S. La pente de la courbe est de -3,356

Tableau 3 : Amorces utilisées pour la méthode TaqMan

Gène	Amorces (5'→3')	Sonde
18 S	F : GATCCATTGGAGGGCAAGTCT R : GATACGCTATTGGAGCTGGAATTAC	TGCCAGCAGCCGC
GADPH	F : CCGTGGGTGGAGTCATACTTG R : TCAACGACCCCTTCATCGA	CATGTAGACCATGTAG TCCAG
Beta-actine	F : GGTCGTCCCA GGCATCAG R : CGTCTCCCACGTAGCTGTCTT	ATGGTTGGGATGGGC
Transcétolase	F : GCCTCGCTAAGTCGTTTAAATCG R : TGGGTAAGCCCATGCCTAAG	CCTCCTCTGGCCCGGT
Annexine A2	F : GCTACAGTCCCTACGACATGCA R : GACTTCTCCAGGTCTCCCTTCA	AGAGCATCAGGAAGGAG
Grancalcine	F : CGATTTGCCCTGTGTTGTAAC R : GCGGTAGTTAATGCATGCTTTTC	TGCCCTGTTATTCTT

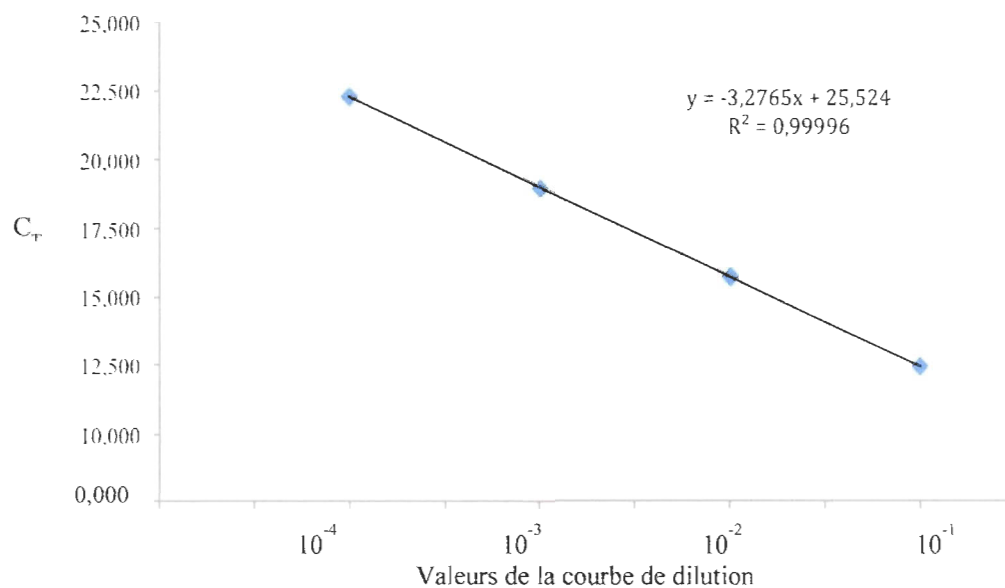


Figure 4 : Validation de l'efficacité de la PCR effectuée à partir du gène 18S. La pente de courbe est de -3,2765

Une première série d'analyses a été effectuée avec 84 échantillons comprenant deux gènes de référence 18S et GAPDH ainsi que trois gènes cibles : annexine A2, grancalcine et transcétolase. Toutefois, cette analyse préliminaire a permis de constater l'absence d'expression de la transcétolase et de retirer cet EST de l'analyse subséquente. Les résultats n'ont pas été conservés étant donné certains ajustements apportés au protocole de PCR qui ont grandement limité le nombre d'échantillons pouvant être conservés. Les résultats de ces travaux préliminaires sont présentés en annexe (voir annexe I).

Au total, 168 échantillons ont été analysés pour les cinq gènes choisis (18S, GAPDH, Beta-Actine, Grancalcine et Annexine A2). Les plaques ont été montées avec 4 échantillons. Pour chaque puit, le mélange de réaction utilisé était composé de 0,5 µl d'amorces, 2 µl d'eau stérile, 5 µl du milieu réactionnel et 2 µl d'ADN_c dilué à 10⁻² (25 à 50 ng). La plaque a ensuite été centrifugée à 2000 g (centrifugeuse Eppendorf 5430R+). La PCR a été réalisée avec un cycle d'incubation de 2 minutes à 50 °C et 20 secondes à 95 °C

et un second cycle d'amplification répété 50 fois de 10 secondes à 95 °C et 20 secondes à 60 °C. Les « Cycle Treshold » (CT) des échantillons ont été analysés avec le logiciel RQ Manager (Applied Biosystems) et ExpressionSuite (Applied Biosystems). Pour un même échantillon, seulement les réplicats dont la différence entre les CT était sous un maximum de 0,5 ont été conservés pour l'analyse statistique.

2.6 TRAITEMENT DES DONNÉES

Un test de Kolmogorov-Smirnov a été utilisé pour tester la normalité des données et le test de Levene pour l'homogénéité des variances. Pour les données des variables suivantes : Longueur, Hématocrite, EF (Épaisseur du filament), EEF (Épaisseur de l'épithélium du filament), EL (Épaisseur de la lamelle), CML (nombre de cellules à mucus sur la lamelle) et CCF (nombre de cellules à chlorure sur le filament), aucune transformation n'a été nécessaire pour obtenir l'homogénéité des variances. Cependant pour les données des variables CCL (nombre de cellules à chlorure sur les lamelles branchiales) et Poids, celles-ci ont été modifiées avec une transformation logarithmique. Pour les variables IHS (Indice hépato-somatique), Hémoglobine, MCHC (Concentration moyenne d'hémoglobine par globule rouge), Osmolalité et celles de CT (Expression génique), l'homogénéité des variances n'a pas été obtenue. Les différences physiologiques entre les formes et les hybrides ont été analysées par analyse de variance (ANOVA) à trois facteurs : traitement (eau douce et eau de mer), forme (anadrome, résident, anadrome♀-résident♂ et résident♀-anadrome♂) et jour (0, 3, 7, 14 et 60) à l'aide du logiciel STATISTICA (version 6 sur Windows XP). Le seuil de significativité a été fixé à 0,05. Pour les différences histologiques, les données ont été analysées avec une ANOVA à deux facteurs : forme (résident et anadrome) et jour (0, 3 et 7). En présence d'effets significatifs, des tests de comparaison multiple de Tukey ont été effectués sur les variables dont les variances étaient homogènes. Pour les autres, un test LSD (Least Significant Difference) sur les rangs a été utilisé comme test a posteriori. Pour les données d'expression génique,

une valeur arbitraire de 41 cycles a été attribuée aux échantillons pour lesquels l'expression était non détectable. De plus, les $\Delta\Delta CT$ ont été calculés à partir de l'équation suivante (Livak et Schmittgen, 2001):

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T,Target} - C_{T,Actin})_{Time\ x} - (C_{T,Target} - C_{T,Actin})_{Time\ 0}$$

où :

Target = Gène cible (Grancalcine ou Annexine A2)

Actin = Gène de référence (18S,, GAPDH, Beta-Actine)

Time x = N'importe quel point dans le temps

Time 0 = Représente 1X l'expression du gène cible normalisé avec le gène de référence

RÉSULTATS

3.1 COMPARAISON PHYSIOLOGIQUE ENTRE LES DIFFÉRENTS CROISEMENTS (SOUCHES PURES ET INDIVIDUS HYBRIDES)

3.1.1 Croissance

L'utilisation des ANOVAs à trois facteurs (Jour : 0, 3, 7 14 et 60 ; Traitement : Eau douce et Eau de mer ; Forme : Anadrome, Résident, Résident-anadrome et Anadrome-résident) pour l'analyse des données physiologiques complexifie la description des résultats. Pour simplifier sa compréhension, seulement les résultats les plus significatifs seront présentés sous la forme graphique, mais l'ensemble des résultats des analyses ANOVAs à trois facteurs pour l'ensemble des variables physiologiques sont présentés dans le Tableau 4.

Les résultats obtenus montrent une croissance sur deux mois, celle-ci étant similaire que les animaux aient été élevés en eau douce ou en eau de mer (Tableau 4). Tel qu'attendu, il n'y a pas de différence significative de croissance entre les poissons qui ont été élevés en eau douce et eau de mer pour les jours 0 (0 ‰), 3 (6 ‰), 7 (14 ‰) et 14 (28 ‰) du mois de juin ($12,42 \text{ g} \pm 0,18$; $n = 758$) (Figures 5 et 6). Les poissons échantillonnés en eau douce et en eau de mer au jour 60 ont une longueur et une masse significativement plus élevées que les poissons échantillonnés en début d'expérimentation (Figures 5 et 6).

Tableau 4 : Résultats des ANOVAs à trois facteurs : Jours (0, 3, 7, 14 et 60), Forme (AR, R, RA et A) et Traitement (Eau douce et Eau de mer) sur l'ensemble des variables physiologiques

Variable	Transformation	Jour	Traitement	Forme	Jour * Traitement	Jour * Forme	Traitement* Forme	Jour * Traitement * Forme
Longueur (cm)	Aucune	$F_{4, 821} = 35,84$ $p = 0,00$	$F_{1, 821} = 0,80$ $p = 0,37$	$F_{3, 821} = 7,67$ $p = 0,00$	$F_{4, 821} = 7,3$ $p = 0,02$	$F_{12, 821} = 0,93$ $p = 0,51$	$F_{3, 821} = 0,49$ $p = 0,69$	$F_{12, 821} = 0,88$ $p = 0,56$
Masse (g)	Logarithmique	$F_{4, 821} = 46,29$ $p = 0,00$	$F_{1, 821} = 0,21$ $p = 0,65$	$F_{3, 821} = 5,79$ $p = 0,00$	$F_{4, 821} = 2,99$ $p = 0,02$	$F_{12, 821} = 0,82$ $p = 0,63$	$F_{3, 821} = 1,09$ $p = 0,35$	$F_{12, 821} = 0,58$ $p = 0,86$
Indice Hépatosomatique	Aucune	$F_{4, 388} = 4,24$ $p = 0,02$	$F_{1, 388} = 40,00$ $p = 0,00$	$F_{3, 388} = 2,37$ $p = 0,07$	$F_{4, 388} = 16,91$ $p = 0,00$	$F_{12, 388} = 0,75$ $p = 0,70$	$F_{3, 388} = 1,82$ $p = 0,14$	$F_{12, 388} = 0,96$ $p = 0,48$
Hémoglobine (mg/globule)	Aucune	$F_{4, 380} = 32,68$ $p = 0,00$	$F_{1, 380} = 2,10$ $p = 0,15$	$F_{3, 380} = 1,27$ $p = 0,29$	$F_{4, 380} = 1,50$ $p = 0,20$	$F_{12, 380} = 2,46$ $p = 0,00$	$F_{3, 380} = 1,09$ $p = 0,35$	$F_{12, 380} = 0,91$ $p = 0,53$
Hématocrite (%)	Aucune	$F_{4, 313} = 3,73$ $p = 0,01$	$F_{1, 313} = 14,58$ $p = 0,00$	$F_{3, 313} = 1,88$ $p = 0,13$	$F_{4, 313} = 1,46$ $p = 0,21$	$F_{12, 313} = 1,30$ $p = 0,22$	$F_{3, 313} = 1,47$ $p = 0,22$	$F_{12, 313} = 0,84$ $p = 0,61$
Osmolalité (mOsm/kg)	Aucune	$F_{4, 369} = 2,04$ $p = 0,09$	$F_{1, 369} = 29,15$ $p = 0,00$	$F_{3, 369} = 5,39$ $p = 0,00$	$F_{4, 369} = 13,93$ $p = 0,00$	$F_{12, 369} = 0,78$ $p = 0,68$	$F_{3, 369} = 2,28$ $p = 0,08$	$F_{12, 369} = 0,68$ $p = 0,77$
MCHC	Aucune	$F_{4, 302} = 14,42$ $p = 0,00$	$F_{1, 302} = 5,64$ $p = 0,01$	$F_{3, 302} = 2,24$ $p = 0,08$	$F_{4, 302} = 3,04$ $p = 0,02$	$F_{12, 302} = 2,03$ $p = 0,02$	$F_{3, 302} = 1,75$ $p = 0,16$	$F_{12, 302} = 1,57$ $p = 0,10$

Nous avons également mis en évidence un effet forme pour le poids et la longueur soit un effet qui n'est pas affecté par les facteurs Jour ou Traitement. Effectivement, la croissance varie selon le type de souches et de croisements. Par conséquent, les poissons provenant du croisement anadrome-résident se démarquent des autres poissons avec une longueur significativement supérieure d'environ 5 % et en masse de 13 % par rapport aux poissons du croisement résident-anadrome et de ceux appartenant aux souches pures (Figures 7 et 8).

Au début de l'été, l'indice hépato-somatique est demeuré stable chez tous les poissons qu'ils aient été élevés en eau douce ou en eau de mer (Figure 9). Cependant, à la fin de l'été, celui-ci est plus élevé chez les poissons qui ont été élevés en eau de mer que ceux qui sont demeurés en eau douce durant tout l'été. De plus, on observe que les formes ne réagissent pas de la même façon au traitement eau de mer (Figure 10). En effet, les poissons appartenant à la souche pure anadrome conservent le même indice hépato-somatique en eau douce et en eau de mer après 60 jours alors que celui-ci est plus élevé pour les animaux résidents et hybrides demeurés en eau de mer (Figure 10). En eau douce, les poissons qui appartiennent au croisement anadrome-résident ont un indice hépato-somatique qui est significativement inférieur à celui des poissons appartenant aux souches pures et ceux du croisement résident-anadrome.

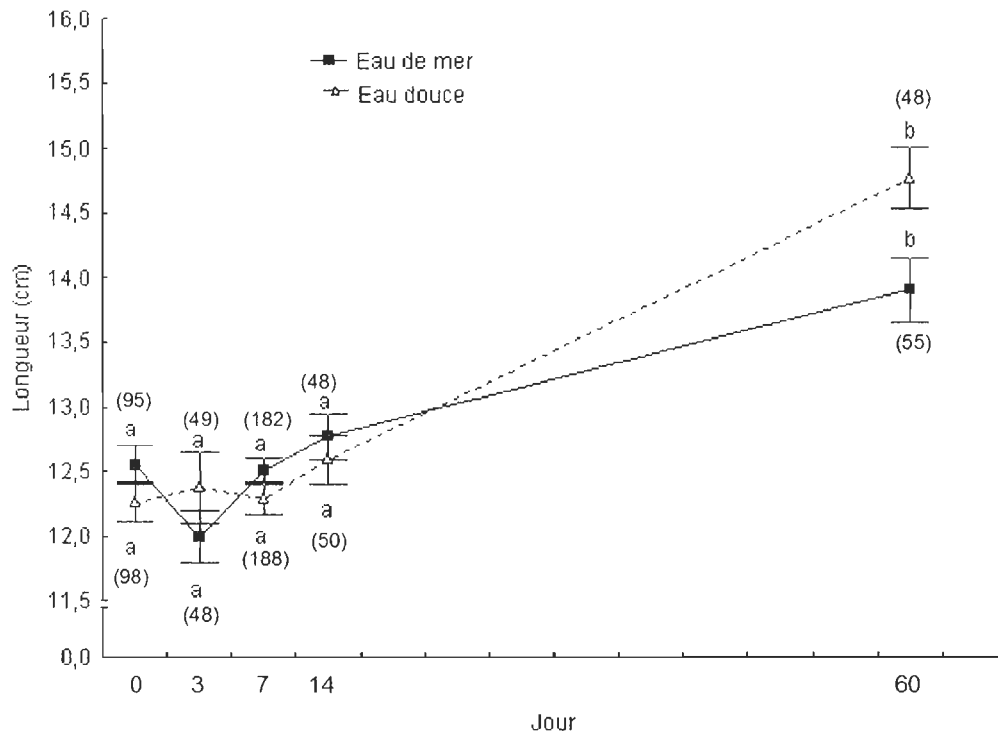


Figure 5 : Longueur chez des ombles de fontaine résidents et anadromes maintenus soit en eau douce (ligne pointillée), soit en eau de mer (ligne pleine) durant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données obtenues chez les différentes formes et leurs hybrides. Moyenne \pm erreur type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les jours dans un milieu donné.

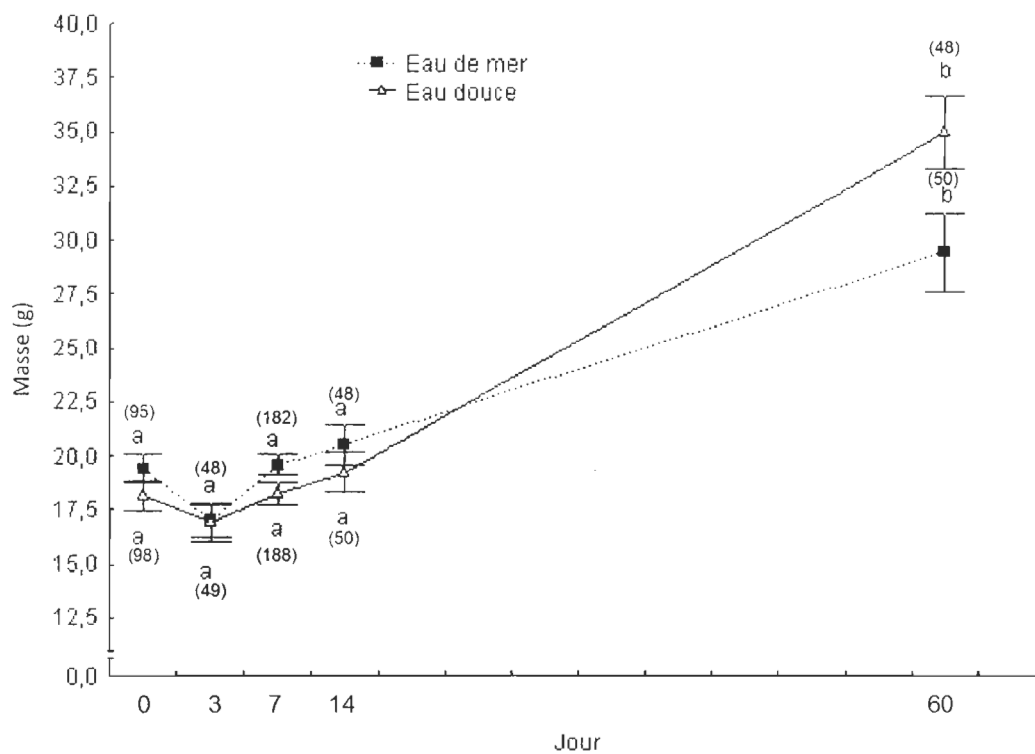


Figure 6 : Masse chez les ombles de fontaine maintenus soit en eau douce (ligne pleine) soit en eau de mer (ligne pointillée) pendant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données obtenues chez les différentes formes. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les jours pour un milieu donné. L'ANOVA a été effectuée sur une transformation de type logarithmique, la présentation graphique a été faite avec les données non transformées.

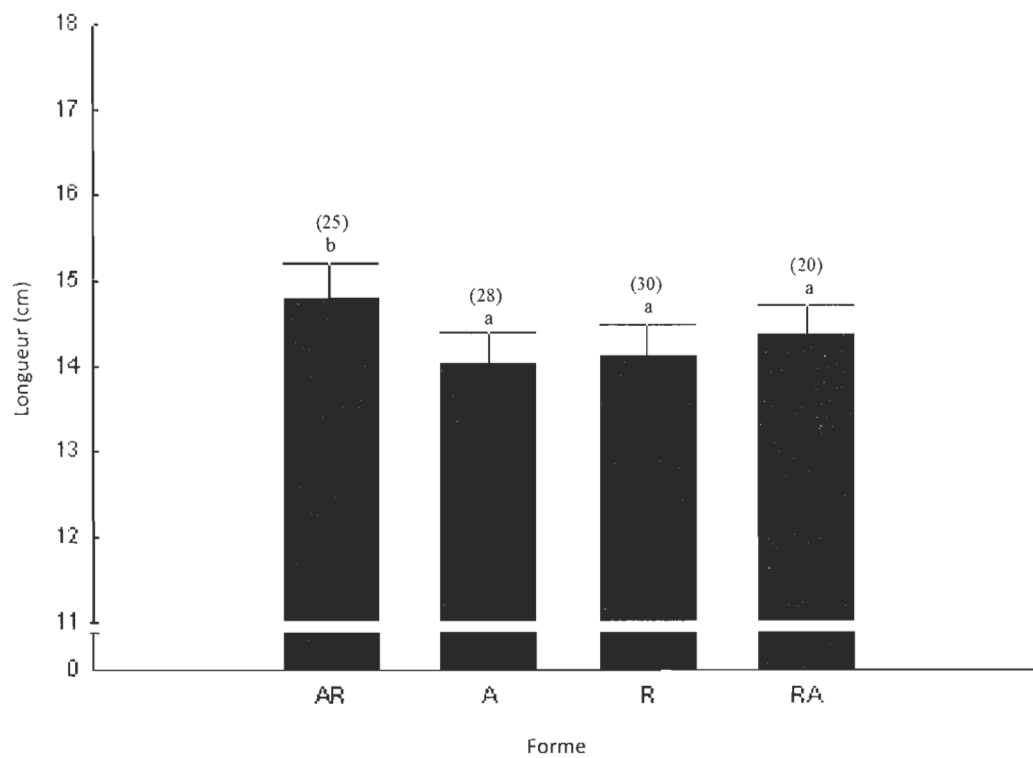


Figure 7 : Longueur d'ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides ($R\text{♀}A\text{♂}$ et $A\text{♀}R\text{♂}$) pour le jour 60. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différents traitements. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les formes.

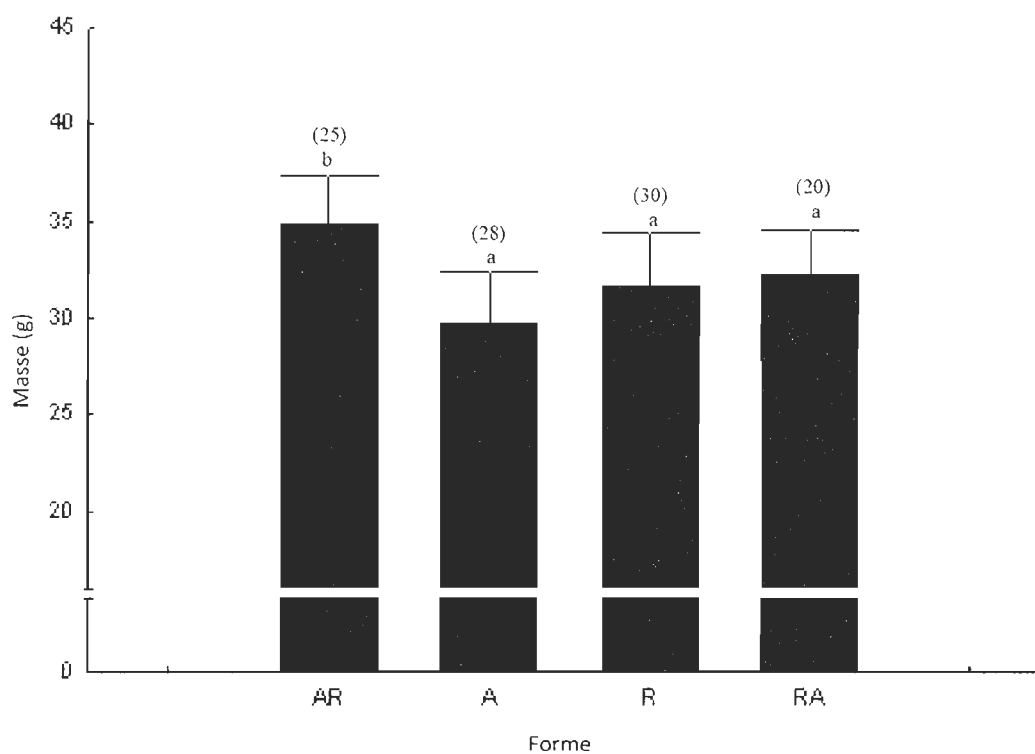


Figure 8 : Masse chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides ($R\text{♀}A\text{♂}$ et $A\text{♀}R\text{♂}$) au jour 60. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différents traitements. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les formes. L'ANOVA a été effectuée sur une transformation de type logarithmique, la présentation graphique a été faite avec les données non transformées.

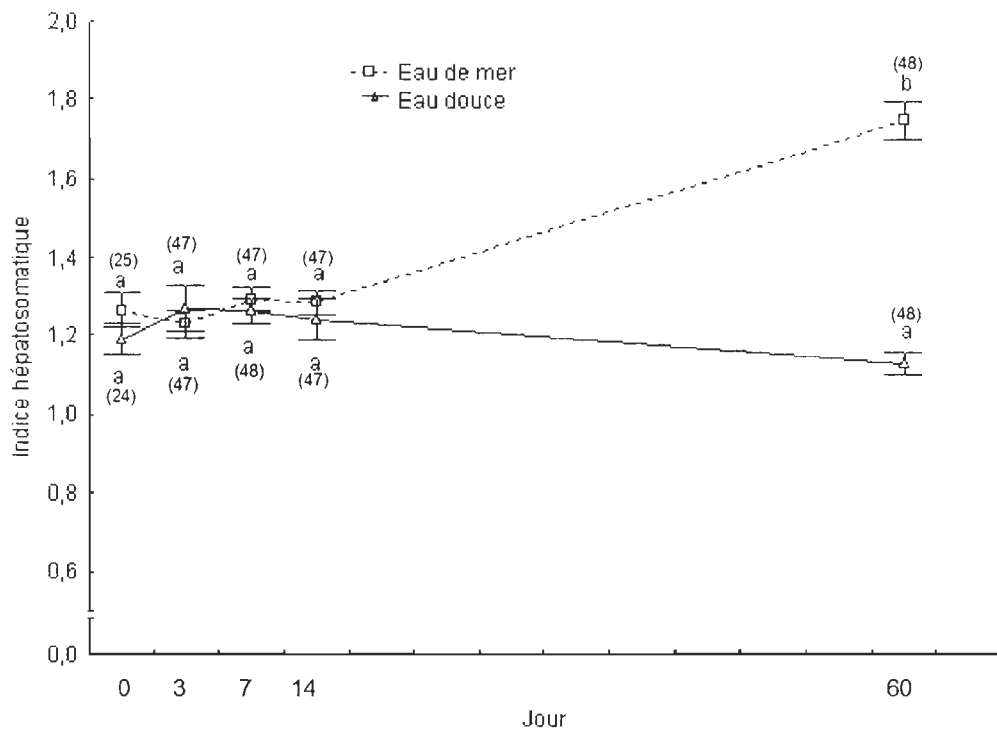


Figure 9 : Indice hépatosomatique chez des ombles de fontaine maintenus en eau douce (ligne pointillée) ou en eau de mer (ligne pleine) durant la période estivale. Les moyennes incluent les données obtenues chez les deux formes. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les jours pour un milieu donné.

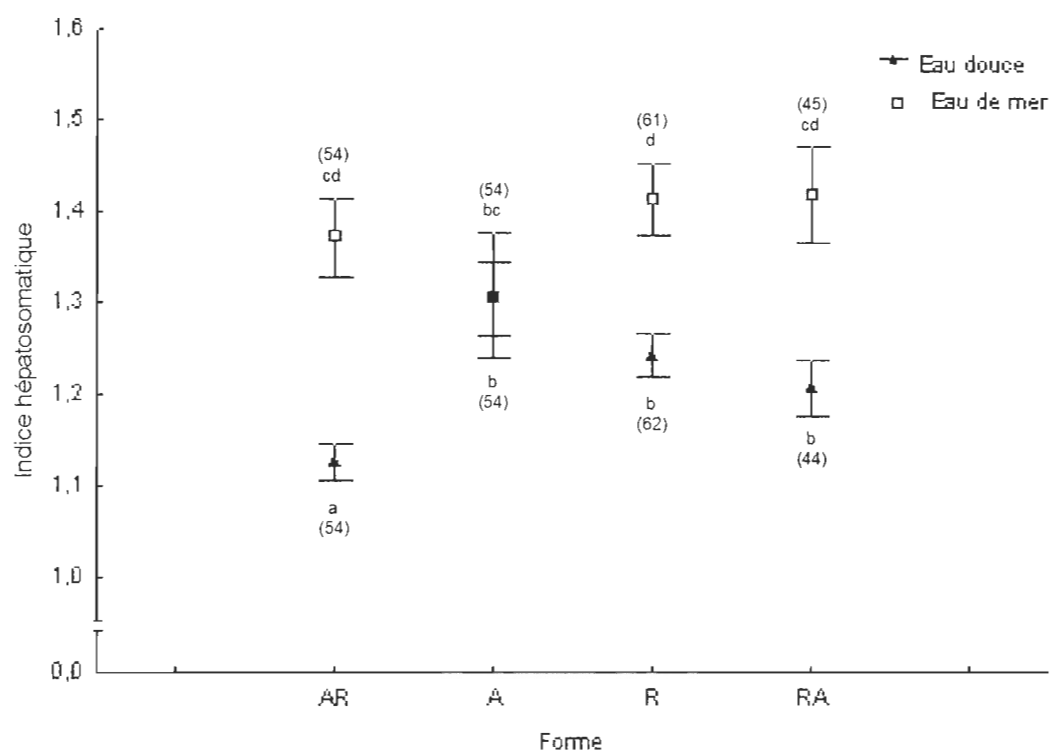


Figure 10 : Indice hépatosomatique chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides ($R\text{♀}A\text{♂}$ et $A\text{♀}R\text{♂}$) qui ont été maintenus en eau douce (triangle) ou eau de mer (carré) durant 60 jours. Les moyennes incluent les données obtenues à tous les jours d'échantillonnage. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les formes.

3.1.2 Indicateurs osmotiques et hématologiques

Les animaux échantillonnés au jour 0 (0 ‰) au début du mois de juin avait un pourcentage d'hématocrite significativement plus élevé que ceux échantillonnés à la fin du mois de juin (Figure 11). Également, lorsque l'on compare les poissons qui sont demeurés en eau douce avec ceux qui ont été élevés en eau de mer, on constate que le pourcentage d'hématocrite est significativement plus élevé chez les animaux qui ont évolué en milieu salin (Figure 12).

La concentration en hémoglobine chez les poissons ne varie pas selon qu'ils ont été élevés en eau douce ou en eau de mer ($p = 0,14$). Toutefois, on observe des différences de la concentration d'hémoglobine chez les animaux selon la journée d'échantillonnage et la forme (Figure 13). Chez les anadromes, la concentration d'hémoglobine est faible en début d'expérimentation puis augmente aux environs de 130 mg/ml lors des journées d'échantillonnage 14 et 60 (Figure 13). On observe sensiblement les mêmes variations de la concentration d'hémoglobine chez les poissons de la forme résidente à l'exception du jour 3 (6 ‰) qui est plus élevé que le jour 0. Chez les animaux qui proviennent d'un croisement hybride, on constate qu'il y a beaucoup de variations de la concentration d'hémoglobine pour les différentes journées d'échantillonnage. Au jour 14, le croisement hybride anadrome-résident a une concentration d'hémoglobine autour de 130 mg/ml et elle augmente à la fin de l'été alors qu'elle est significativement plus élevée que chez les autres formes (Figure 13). On observe les mêmes variations pour le croisement résident-anadrome, on constate qu'en comparant avec le jour 0 en eau douce, l'hémoglobine est plus élevée au jour 3, au jour 14 et au jour 60.

Au niveau de la concentration moyenne d'hémoglobine par globule rouge, on observe qu'il n'y a pas de différences chez les animaux qui ont été élevés en eau douce ou en eau de mer (Figure 14). En début d'expérimentation, le MCHC demeure semblable chez tous les poissons (Figure 14).

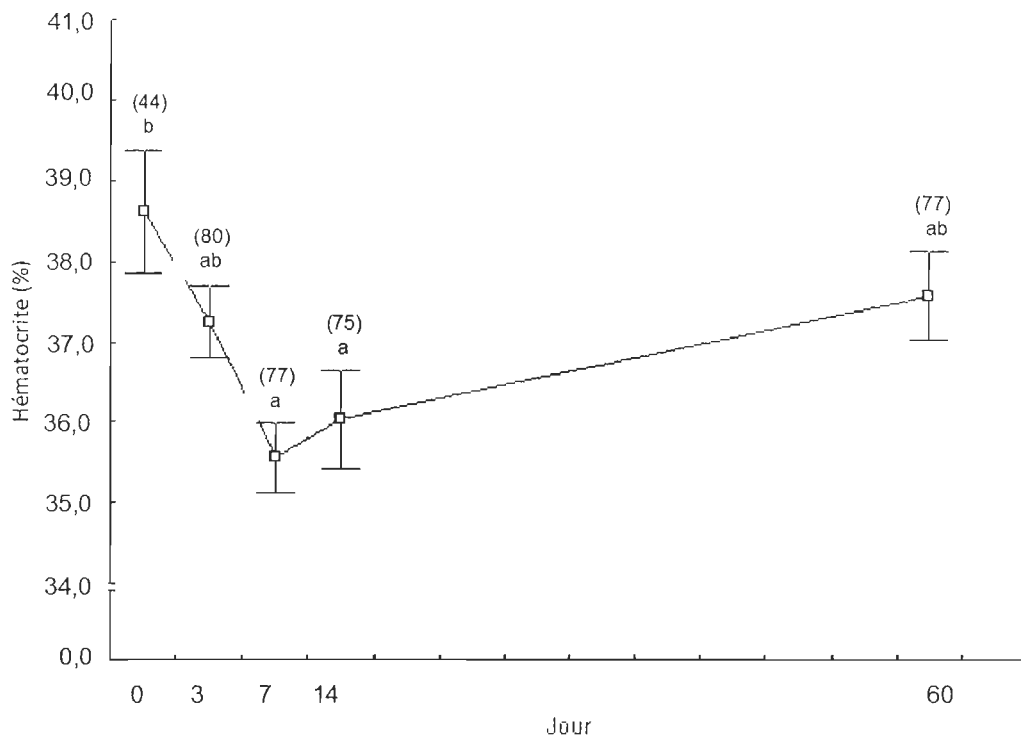


Figure 11: Pourcentage d'hématocrite chez des ombles de fontaine durant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différentes formes et traitements. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les jours.

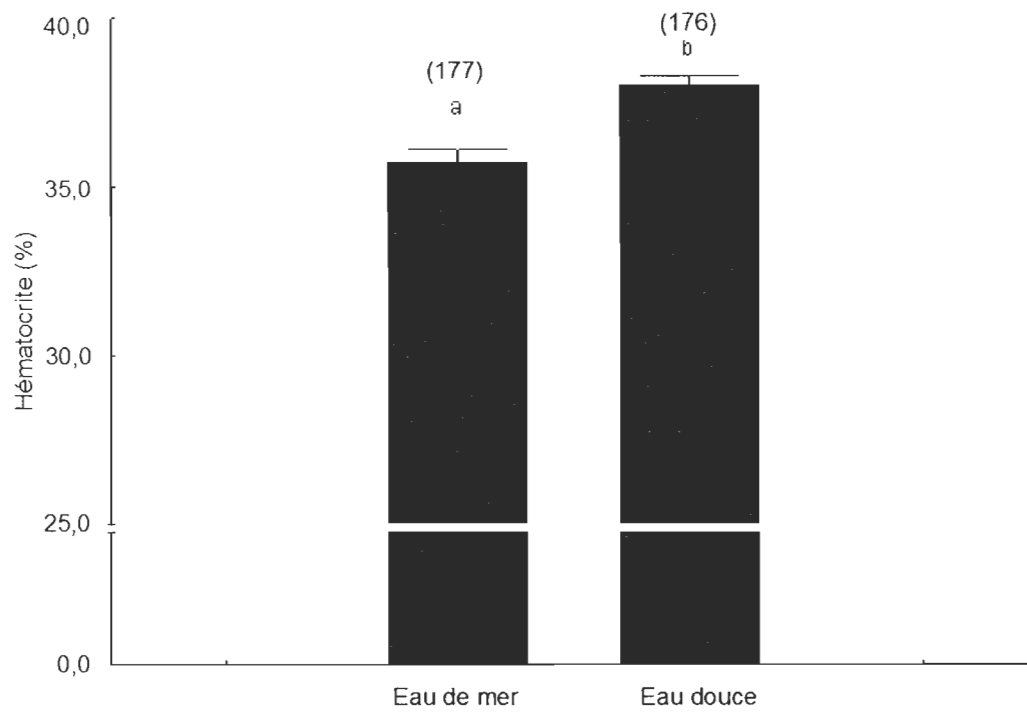


Figure 12: Pourcentage d'hématocrite chez des ombles de fontaine de souches maintenues soit en eau de mer ou en eau douce. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différentes formes et journées. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les milieux.

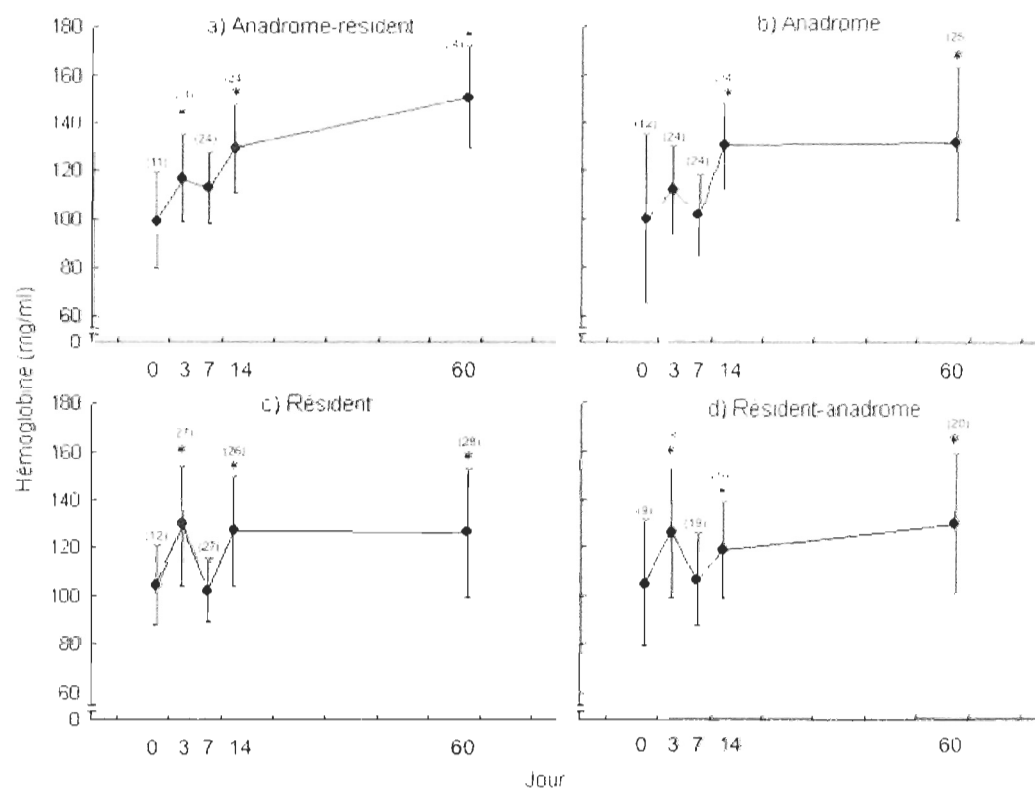


Figure 13 : Concentration d'hémoglobine chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides ($R \times A$ et $A \times R$) pendant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différents traitements. Moyenne \pm erreur-type. Les * montrent les différences significatives entre le jour 0 et les autres jours pour chacune des formes. Voir annexe II pour l'ensemble des tests a posteriori.

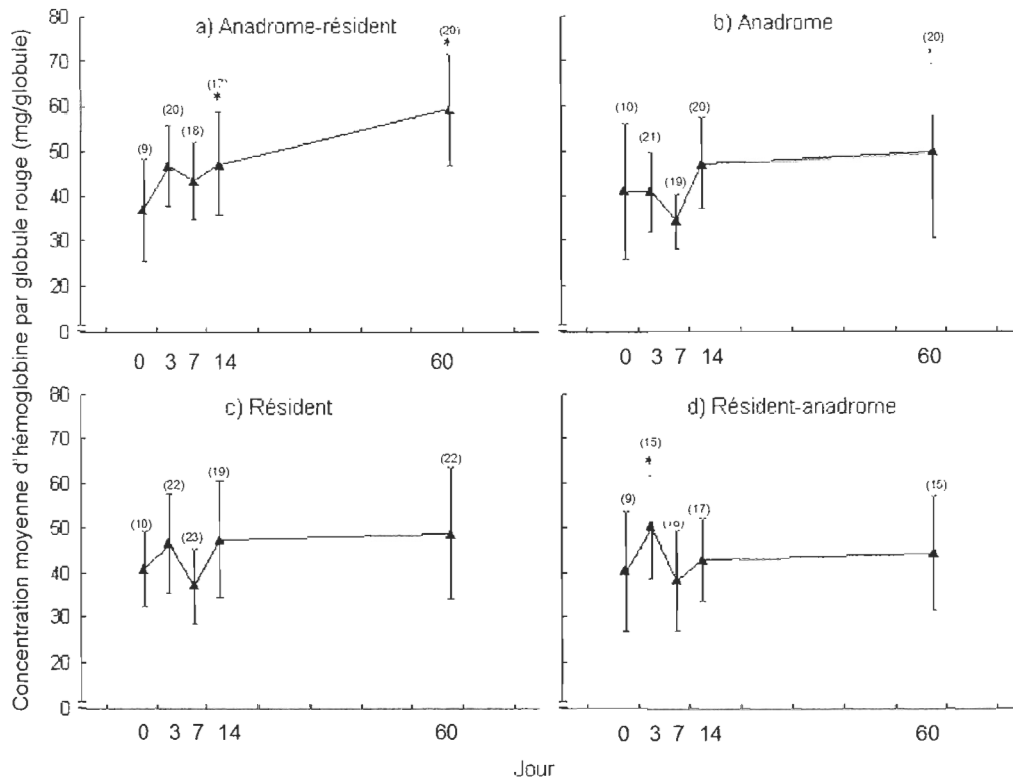


Figure 14 : Concentration moyenne d'hémoglobine par globule rouge chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides ($R\text{♀}A\text{♂}$ et $A\text{♀}R\text{♂}$) durant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différents traitements. Moyenne \pm erreur-type. Les * montrent les différences significatives entre le jour 0 et les autres jours pour chacune des formes. Voir annexe III pour l'ensemble des tests a posteriori.

Ensuite, chez les poissons résidents-anadromes, on constate au jour 3, que le MCHC est plus élevé en comparaison au jour 0 mais également plus élevé que celui observé chez les autres formes pour la même journée (Figure 14 et voir annexe III). Deux mois après le début de l'expérimentation, les poissons du croisement anadrome-résident ont une concentration moyenne d'hémoglobine par globule rouge significativement plus élevée que les autres animaux, il y a donc une forte présence d'hémoglobine corpusculaire en comparaison avec les poissons échantillonnés tout au long de l'expérimentation (voir annexe III). De plus, comparativement à son jour 0, la souche pure anadrome a un MCHC plus élevé.

On observe également que le MCHC varie chez les ombles de fontaine maintenus en eau douce ou en eau de mer. Au jour 0 (0 ‰) et 3 (6 ‰), celui-ci demeure le même dans les deux milieux d'élevage et ce, chez l'ensemble des animaux (Figure 15). Aux jours 7 (14 ‰) et 14 (28 ‰), la concentration moyenne d'hémoglobine par globule rouge est plus faible chez les poissons qui ont été élevés en eau de mer en comparaison avec ceux qui sont demeurés en eau douce (Figure 15). À la fin de l'expérimentation, le MCHC est significativement plus élevé chez les poissons qui sont demeurés en eau douce tout l'été en comparaison des poissons échantillonnés durant la période estivale.

Pour l'osmolalité plasmatique, on constate qu'il y a des différences significatives tant au niveau des différentes souches de poissons, des jours, que des traitements (Figures 16, 17 et voir annexe IV). En début d'expérimentation, l'osmolalité plasmatique est semblable chez tous les poissons. Au jour 14 (28 ‰), il y a une augmentation significative de l'osmolalité plasmatique pour les poissons de la forme résidente comparativement à celle des animaux anadromes. On constate que l'osmolalité plasmatique diffère peu chez les anadromes et les hybrides lorsqu'ils sont en eau de mer (Figure 16). À la fin de l'expérimentation, l'osmolalité plasmatique est similaire chez l'ensemble des poissons.

Il faut cependant noter une augmentation de l'osmolalité plasmatique chez les poissons qui ont été élevés en eau de mer alors que pour ceux qui sont demeurés en eau douce, celle-ci reste stable tout au long de l'expérimentation (Figure 17).

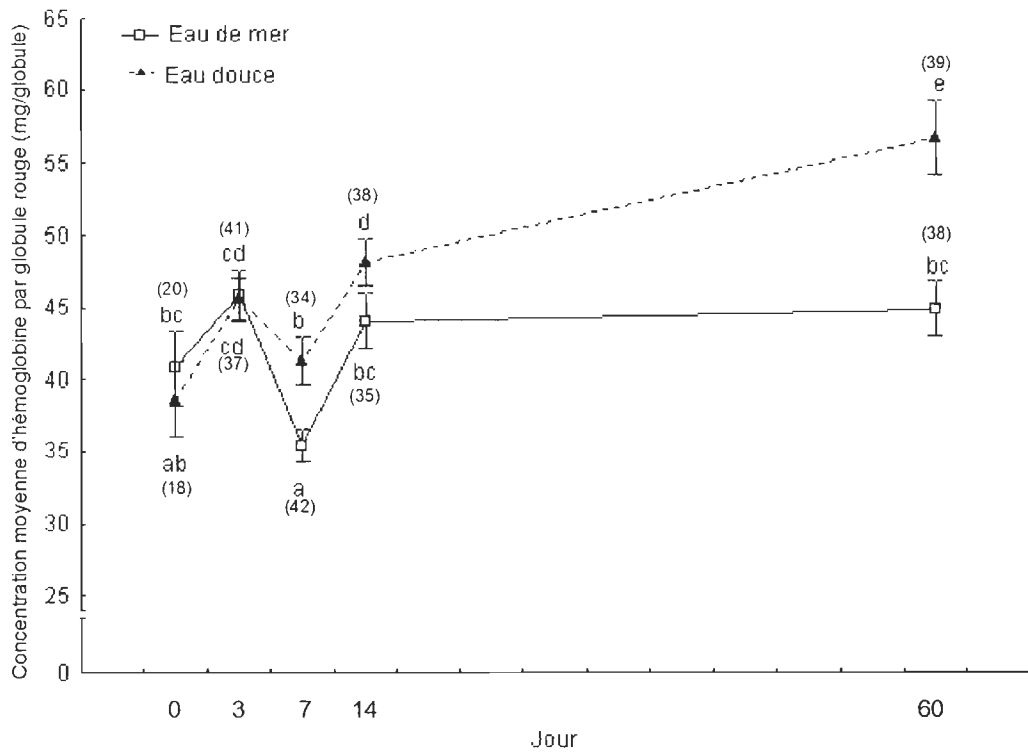


Figure 15 : Concentration moyenne d'hémoglobine par globule rouge chez des ombles de fontaine maintenus en eau douce (ligne pointillée) et en eau de mer (ligne pleine) durant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différentes formes. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives.

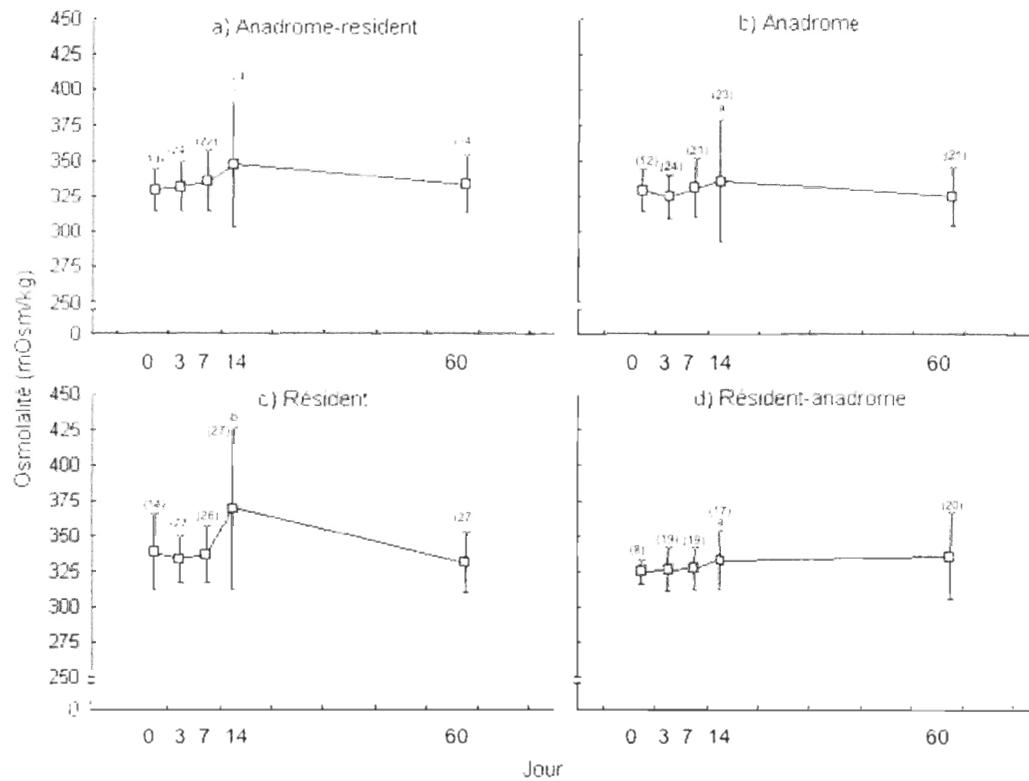


Figure 16 : Osmolalité plasmatique chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides ($R\text{♀}A\text{♂}$ et $A\text{♀}R\text{♂}$) pendant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différents traitements. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives au même jour. Voir annexe IV pour l'ensemble des tests a posteriori.

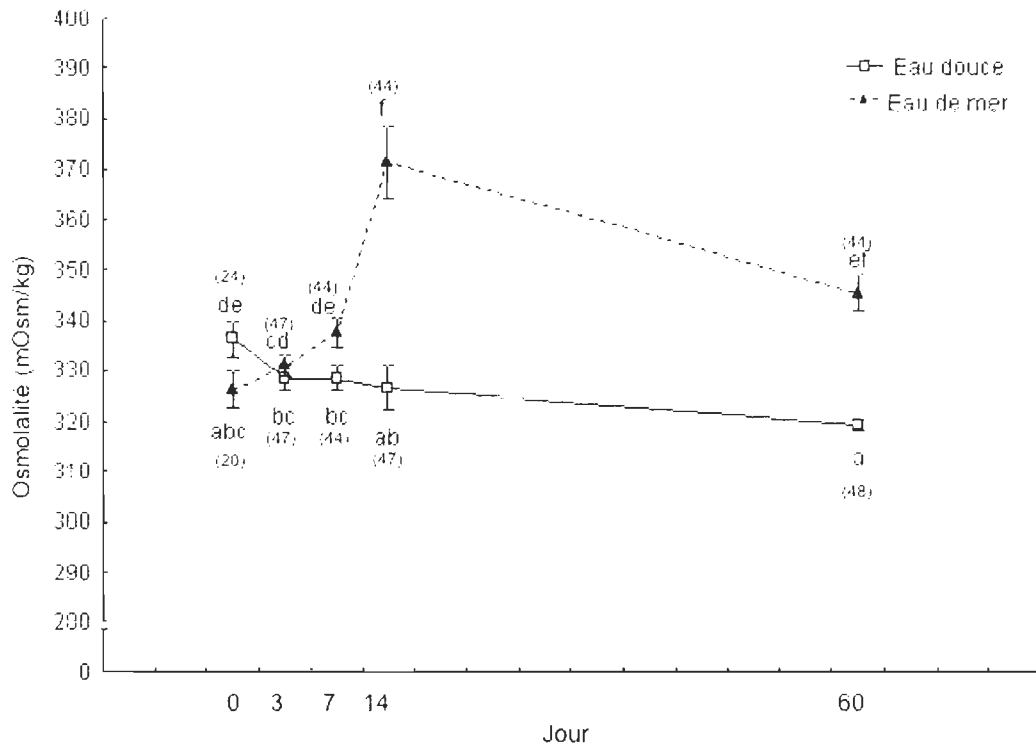


Figure 17 : Osmolalité plasmatique chez des ombles de fontaine maintenus en eau de mer (ligne pointillée) ou en eau douce (ligne pleine) durant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données pour les différentes formes. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives.

Au jour 0, la réponse de l'osmolalité plasmatique est significativement différente entre les deux milieux c'est-à-dire qu'elle est plus élevée en eau douce qu'en eau de mer. Au jour 7, l'osmolalité plasmatique des animaux est plus élevée chez les poissons vivant en eau de mer que ceux demeurés en eau douce. Au jour 14, la différence d'osmolalité plasmatique entre les deux traitements est significativement plus grande chez les animaux qui ont été élevés en eau de mer que chez ceux qui sont demeurés en eau douce. À la fin de la période estivale, on observe en eau douce, une osmolalité plasmatique significativement plus faible qu'en eau de mer.

3.2 COMPARAISON DE LA STRUCTURE DU TISSU BRANCHIAL ENTRE LES DEUX FORMES

3.2.1 Nombre de cellules à chlorure sur les filaments et les lamelles branchiales

Étant donné que pour les deux traitements eau douce et eau de mer, tous les animaux étaient en eau douce au jour 0, les données ont été regroupées dans un même groupe nommé « eau douce ». À noter qu'une analyse statistique a quand même été réalisée au préalable pour tester la présence d'un effet bassin, et aucune différence n'a été trouvée ($p > 0,05$). Au jour 7, seulement le traitement « eau de mer » a été échantillonné et analysé alors qu'au jour 14, les deux traitements « eau de mer » et « eau douce » ont été échantillonnés et analysés. À des fins de compréhension et de visualisation, des microphotographies ont été prises afin de voir l'emplacement des cellules au niveau de l'épithélium du filament branchial ainsi qu'au niveau de la lamelle respiratoire. De plus, les deux types cellulaires à l'étude soit les cellules à chlorure ou ionocytes et les cellules à mucus, y sont identifiés (Figures 18B, 19B et 20).

Tout au long de l'expérience, le nombre de cellules à chlorure diminue entre le premier jour d'échantillonnage et le dernier jour que ce soit au niveau des lamelles respiratoires ou des filaments branchiaux. Également, les résultats indiquent que les cellules à chlorure sont trois fois plus nombreuses sur les filaments branchiaux que sur les lamelles branchiales lorsque les nombres sont rapportés sur une même distance (Figures 21 et 22). Après 14 jours suivant le transfert en eau de mer, le nombre de cellules à chlorure sur les filaments branchiaux est significativement inférieur à celui observé en début d'expérience (jour 0) et ce pour les deux formes, résidente et anadrome (Figure 21). Ensuite, pour les lamelles respiratoires, on observe au jour 14 que le nombre de cellules à chlorure est significativement inférieur à celui observé au jour 0 et ce, chez les deux souches pures de poissons. De plus, au jour 14, le nombre d'ionocytes sur les lamelles branchiales est significativement plus élevé en eau de mer qu'en eau douce (Figure 22).

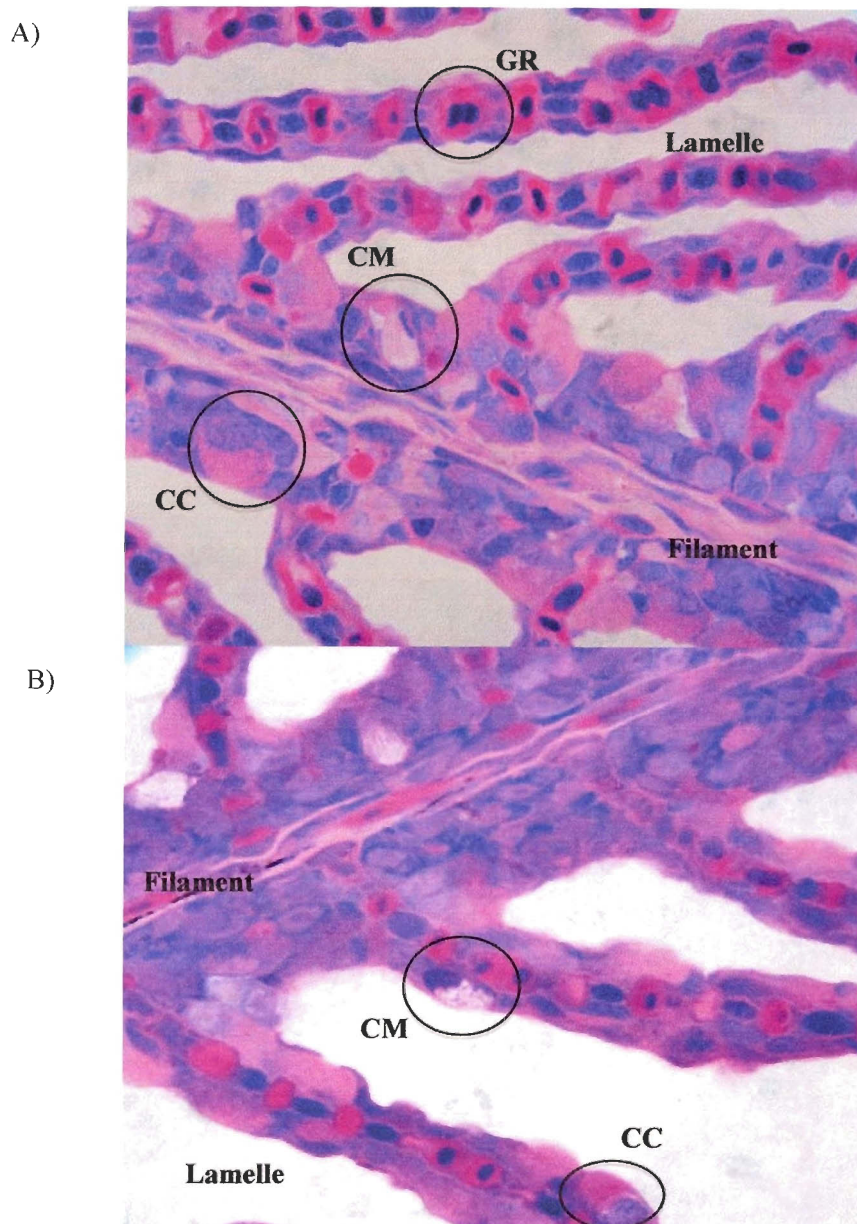


Figure 18 : Microphotographies de filaments et lamelles branchiales d'ombles de fontaine résidents au jour 14, en eau de mer A) filament branchial (400x) et B) lamelles respiratoires (1025x). CC = cellule à chlorure, CM = cellule à mucus et GR = globule rouge.

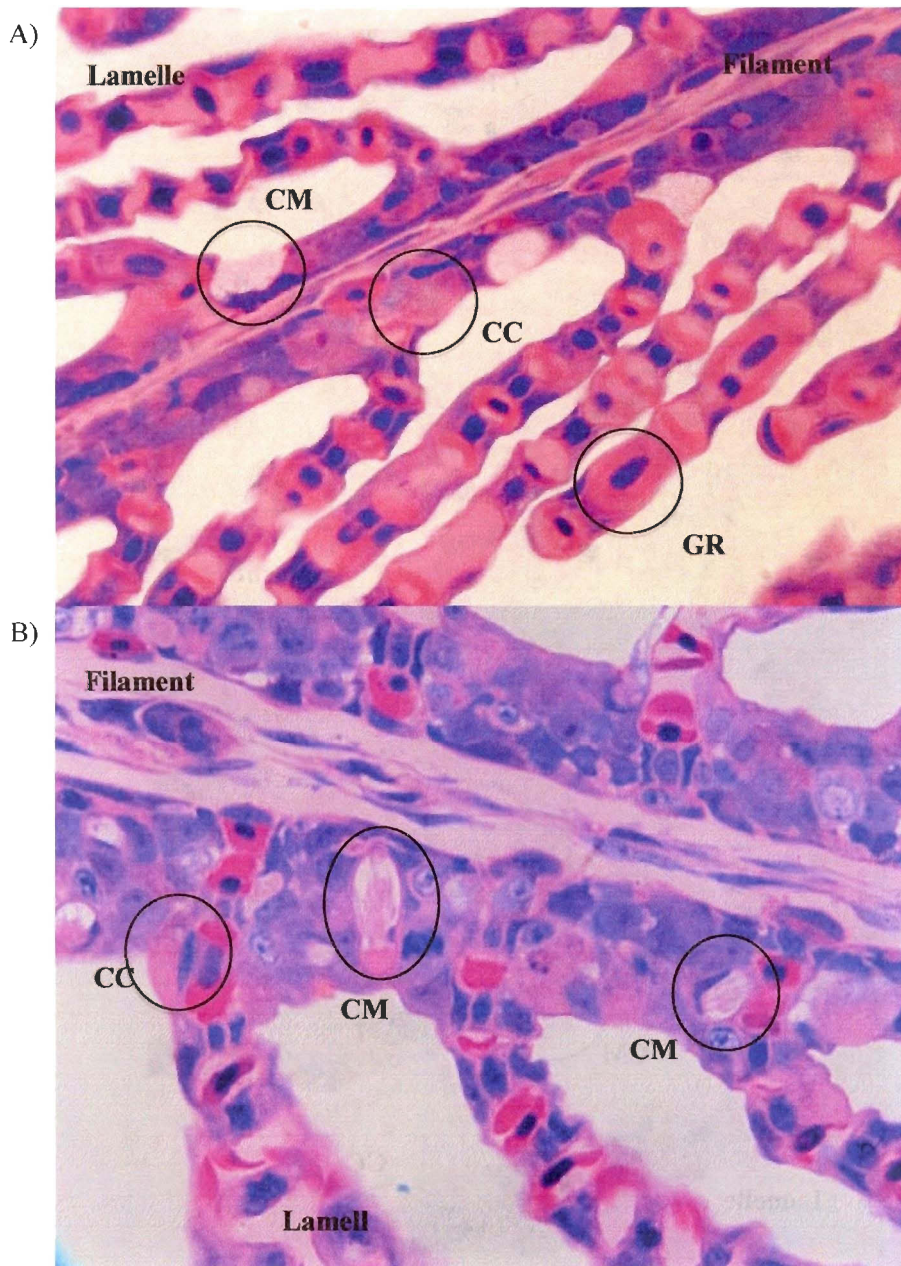


Figure 19 : Microphotographies de filaments et lamelles branchiales d'ombles de fontaine anadromes au jour 14 en eau de mer A) 400x et B) 1025x. CC = cellule à chlorure, CM = cellule à mucus et GR = globule rouge.

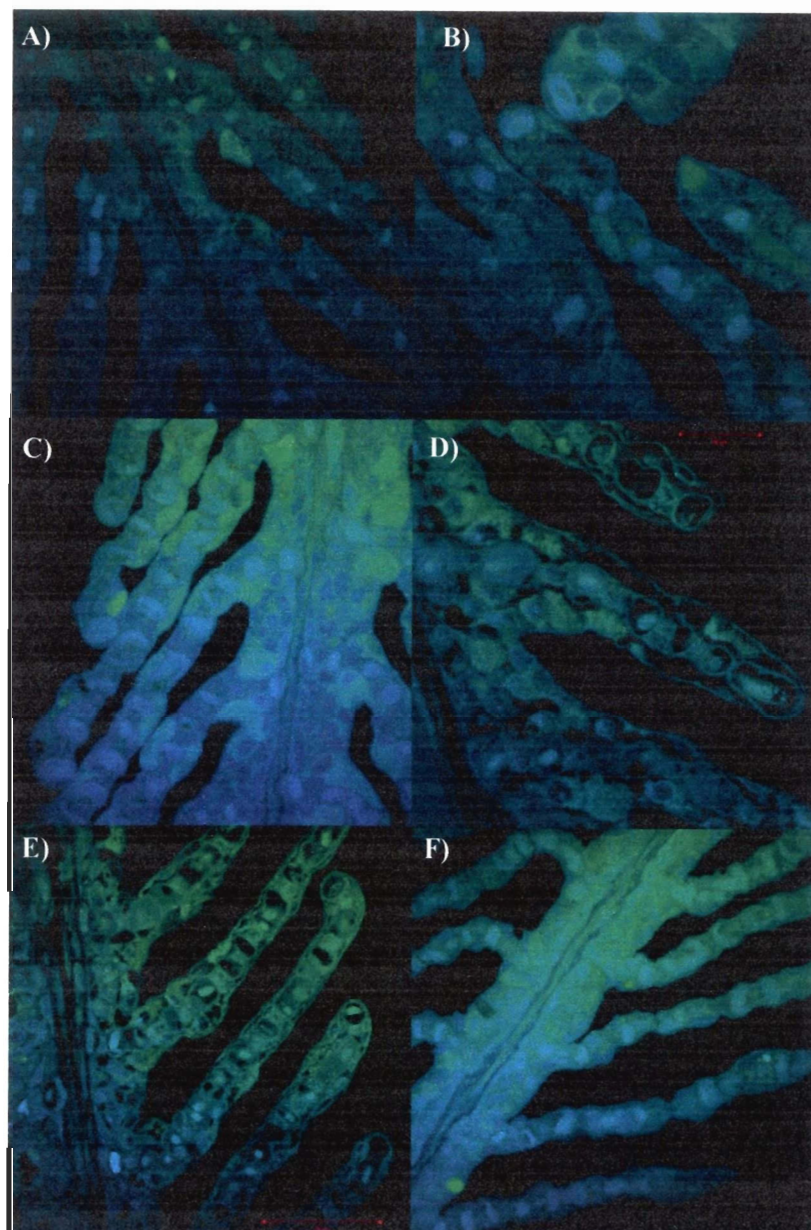


Figure 20 : Microphotographies de filaments et lamelles branchiales d'ombles de fontaine en microscopie confocale à 630x. Jour 0 : A) omble anadrome en eau douce B) omble résident en eau douce, jour 7 : C) anadrome en eau de mer D) résident en eau de mer, jour 14 : E) Résident en eau douce F) anadrome en eau de mer.

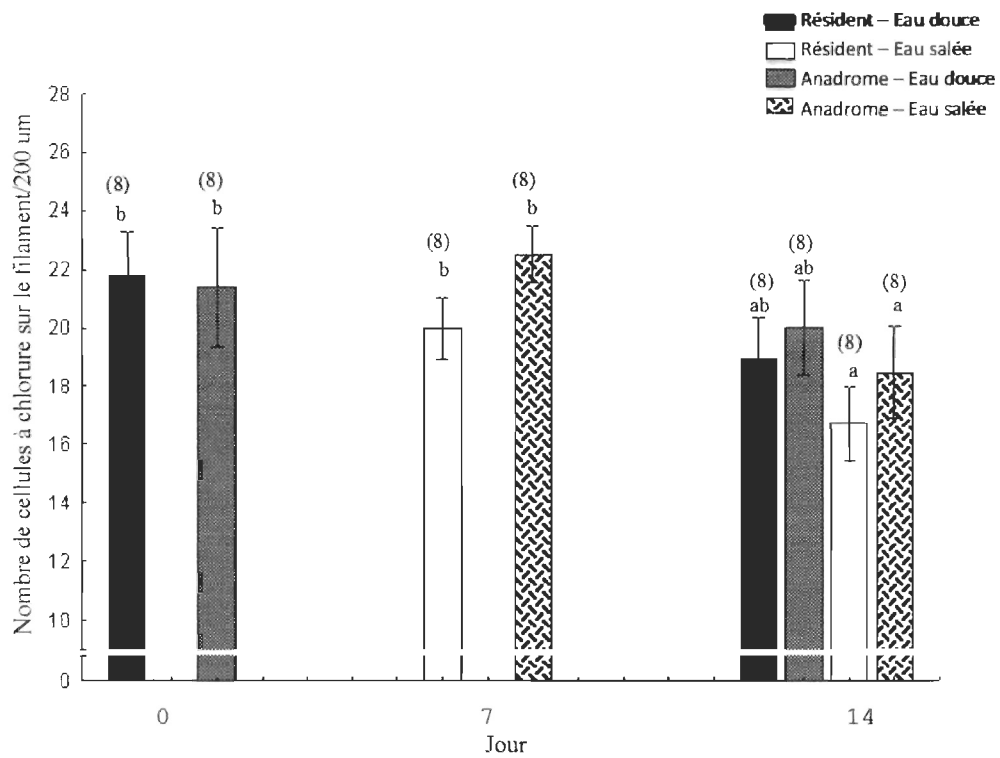


Figure 21 : Nombre de cellules à chlorure sur les filaments branchiaux chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues en eau de mer ou en eau douce en juin. Moyenne \pm erreur type. Les lettres montrent les différences significatives entre les formes pour un milieu donné.

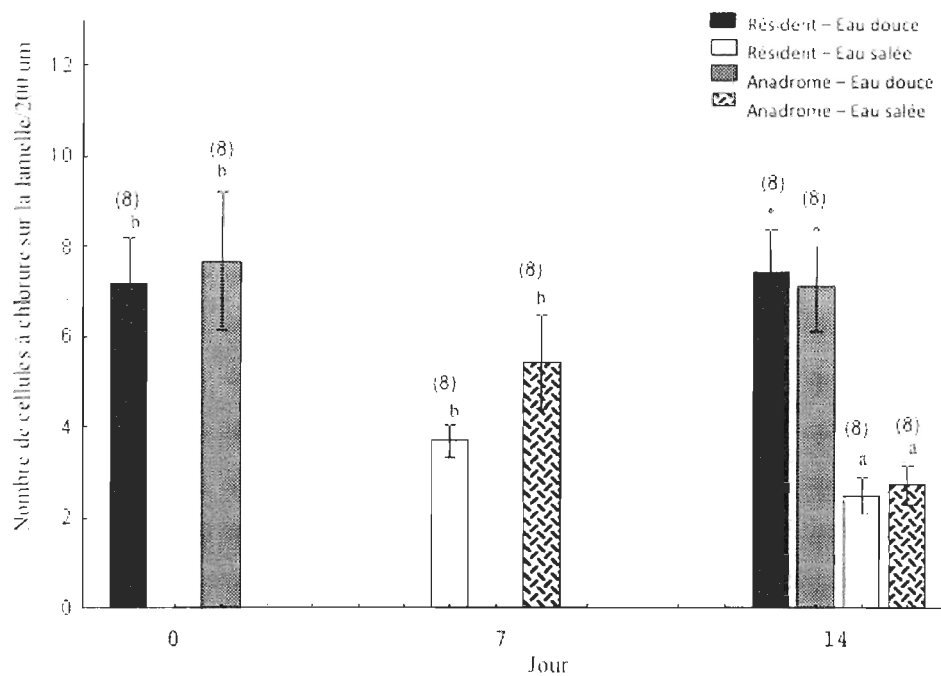


Figure 22 : Nombre de cellules à chlorure sur les lamelles respiratoires chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues soit en eau douce ou en eau de mer en juin. Moyenne \pm erreur type. Les * indiquent la présence de différences significatives entre le jour 14 eau douce et eau de mer alors que les lettres différentes indiquent la présence de différences significatives entre les jours 0, 7 et 14. L'ANOVA a été effectuée sur une transformation de type Logarithmique, la présentation graphique a été faite avec les données non transformées.

3.2.2 Épaisseur du filament branchial et de la lamelle respiratoire

L'utilisation des ANOVAs à deux facteurs sur les deux traitements séparés complexifie la description des résultats. Pour simplifier la compréhension, seulement les résultats les plus significatifs sont présentés sous la forme graphique mais l'ensemble des résultats des ANOVAs sont présentés dans les tableaux 5 et 6.

En eau douce, chez les deux formes de poissons, les filaments sont beaucoup plus épais au début de l'expérimentation (jour 0) qu'à la fin des deux semaines d'expérimentation et, au jour 14, l'épaisseur du filament est significativement supérieure en eau salée à celle observée en eau douce (Tableau 7).

L'épaisseur de l'épithélium du filament suit les mêmes tendances que l'épaisseur du filament. Ainsi, l'épithélium diminue significativement d'épaisseur entre les jours 0 et 14, en eau douce, chez les deux souches pures et l'épithélium est significativement plus épais en eau de mer qu'en eau douce au jour 14 (Tableau 7).

Au niveau des lamelles respiratoires, sur les 14 jours de suivi, les modifications de l'épaisseur des lamelles branchiales sont similaires chez les deux souches pures que les animaux aient été en eau douce ou en eau de mer (Figure 23). En eau douce, on observe une diminution significative de l'épaisseur des lamelles branchiales entre le jour 0 et le jour 14. En eau de mer, au jour 14 (28 ‰), il y a également une diminution significative de l'épaisseur des lamelles respiratoires. La diminution de l'épaisseur de la lamelle est donc semblable pour les deux traitements (Figure 23 ; Tableaux 5 et 6).

Tableau 5 : Résultats des ANOVAs à deux facteurs : Jours (0 et 14) et Forme (Résident et Anadrome) en eau douce seulement.

Variable	Transformation	Jour	Forme	Jour*Forme
Distance interlamellaire	Aucune	$F_{1,28} = 0,00$ $p = 0,98$	$F_{1,28} = 0,02$ $p = 0,88$	$F_{1,28} = 0,77$ $p = 0,39$
Épaisseur du filament	Aucune	$F_{1,28} = 5,49$ $p = 0,02$	$F_{1,28} = 0,08$ $p = 0,77$	$F_{1,28} = 0,12$ $p = 0,73$
Épaisseur de l'épithélium du filament	Aucune	$F_{1,28} = 8,65$ $p = 0,00$	$F_{1,28} = 0,05$ $p = 0,81$	$F_{1,28} = 0,12$ $p = 0,73$
Distance de diffusion	Aucune	$F_{1,28} = 0,02$ $p = 0,88$	$F_{1,28} = 0,63$ $p = 0,43$	$F_{1,28} = 2,45$ $p = 0,13$
Épaisseur de la lamelle	Aucune	$F_{1,28} = 9,64$ $p = 0,00$	$F_{1,28} = 0,22$ $p = 0,64$	$F_{1,28} = 0,71$ $p = 0,41$
Épaisseur de l'épithélium de la lamelle	Aucune	$F_{1,28} = 1,13$ $p = 0,30$	$F_{1,28} = 0,01$ $p = 0,94$	$F_{1,28} = 1,61$ $p = 0,21$
Nombre de cellules à chlorure sur le filament	Aucune	$F_{1,28} = 1,69$ $p = 0,21$	$F_{1,28} = 0,03$ $p = 0,86$	$F_{1,28} = 0,21$ $p = 0,65$
Nombre de cellules à mucus sur le filament	Aucune	$F_{1,28} = 2,54$ $p = 0,12$	$F_{1,28} = 4,13$ $p = 0,05$	$F_{1,28} = 0,16$ $p = 0,69$
Nombre de cellules à chlorure sur la lamelle	Aucune	$F_{1,28} = 0,02$ $p = 0,89$	$F_{1,28} = 0,00$ $p = 0,96$	$F_{1,28} = 0,13$ $p = 0,72$
Nombre de cellules à mucus sur la lamelle	Aucune	$F_{1,28} = 3,22$ $p = 0,08$	$F_{1,28} = 2,07$ $p = 0,16$	$F_{1,28} = 0,02$ $p = 0,87$

Tableau 6 : Résultats des ANOVAs à deux facteurs : Jours (0, 7 et 14) et Forme (Résident et Anadrome) en eau de mer seulement.

Variable	Transformation	Jour	Forme	Jour*Forme
Distance interlamellaire	Aucune	$F_{2,42} = 0,32$ $p = 0,73$	$F_{1,42} = 0,17$ $p = 0,68$	$F_{2,42} = 1,05$ $p = 0,36$
Épaisseur du filament	Aucune	$F_{2,42} = 0,68$ $p = 0,51$	$F_{1,42} = 0,00$ $p = 0,99$	$F_{2,42} = 0,02$ $p = 0,98$
Épaisseur de l'épithélium du filament	Aucune	$F_{2,42} = 1,01$ $p = 0,37$	$F_{1,42} = 0,23$ $p = 0,63$	$F_{2,42} = 0,66$ $p = 0,52$
Distance de diffusion	Aucune	$F_{2,42} = 0,76$ $p = 0,47$	$F_{1,42} = 1,96$ $p = 0,17$	$F_{2,42} = 0,34$ $p = 0,72$
Épaisseur de la lamelle	Aucune	$F_{2,42} = 3,34$ $p = 0,04$	$F_{1,42} = 0,31$ $p = 0,58$	$F_{2,42} = 0,11$ $p = 0,90$
Épaisseur de l'épithélium de la lamelle	Aucune	$F_{2,42} = 2,06$ $p = 0,14$	$F_{1,42} = 3,39$ $p = 0,07$	$F_{2,42} = 0,62$ $p = 0,54$
Nombre de cellules à chlorure sur le filament	Aucune	$F_{2,42} = 4,77$ $p = 0,01$	$F_{1,42} = 1,18$ $p = 0,28$	$F_{2,42} = 0,57$ $p = 0,57$
Nombre de cellules à mucus sur le filament	Aucune	$F_{2,42} = 0,83$ $p = 0,44$	$F_{1,42} = 6,81$ $p = 0,01$	$F_{2,42} = 0,10$ $p = 0,90$
Nombre de cellules à chlorure sur la lamelle	Logarithmique	$F_{2,42} = 13,99$ $p = 0,00$	$F_{1,42} = 0,47$ $p = 0,50$	$F_{2,42} = 0,55$ $p = 0,58$
Nombre de cellules à mucus sur la lamelle	Aucune	$F_{2,42} = 1,54$ $p = 0,23$	$F_{1,42} = 3,87$ $p = 0,06$	$F_{2,42} = 0,94$ $p = 0,40$

Tableau 7 : Épaisseur du filament branchial et de l'épithélium du filament branchial chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues soit en eau douce ou en eau de mer au mois de juin. Les * indiquent la présence de différences significatives entre le jour 0 et le jour 14 en eau douce et les caractères gras indiquent la présence de différences significatives entre le jour 0 et le jour 14 en eau de mer.

Moyenne \pm erreur type.

Épaisseur du filament (um)									
Souche	N	Jour 0 (eau douce)		N	Jour 14 (eau douce)		N	Jour 14 (eau de mer)	
Anadrome	8	44,28	\pm 4,43	8	36,67	\pm 3,66*	8	49,84	\pm 6,38
Résident	8	44,50	\pm 2,43	8	35,54	\pm 2,29*	8	50,81	\pm 6,76
Épaisseur de l'épithélium du filament (um)									
Anadrome	8	15,97	\pm 1,72	8	12,82	\pm 1,27*	8	18,04*	\pm 2,10
Résident	8	16,11	\pm 0,95	8	12,12	\pm 0,63*	8	18,78	\pm 2,05

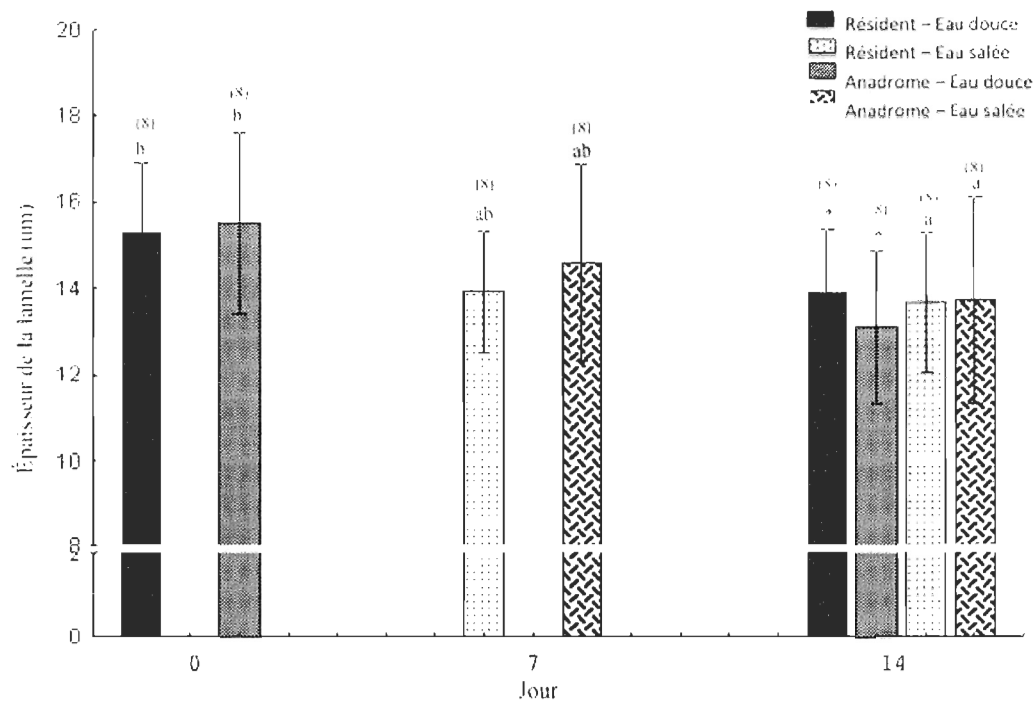


Figure 23 : Épaisseur des lamelles respiratoires chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues soit en eau de mer et en eau douce en juin. Moyennes \pm (erreur-type). Les * indiquent la présence de différences significatives entre les jours 0 et 14 alors que des lettres différentes indiquent la présence de différences significatives entre les jours 0, 7 et 14.

Tableau 8 : Distance interlamellaire (DI), distance de diffusion (DD), épaisseur de l'épithélium lamellaire (EEL) et nombre de cellules à mucus sur les lamelles respiratoires (CML) chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues en eau douce (ED) ou en eau de mer (EM) au mois de juin.
Moyenne \pm erreur type.

	Traitement	Résident			Anadrome		
		N	Moyenne	Erreur-type	N	Moyenne	Erreur-type
Distance interlamellaire (DI)	ED	16	46,94	\pm 0,95	16	46,74	\pm 1,01
	EM	24	47,15	\pm 0,62	24	47,54	\pm 0,71
Distance de diffusion (DD)	ED	16	4,15	\pm 0,19	16	3,92	\pm 0,20
	EM	24	3,68	\pm 0,12	24	4,02	\pm 0,20
Épaisseur de l'épithélium de la lamelle (EEL)	ED	16	3,76	\pm 0,18	16	3,74	\pm 0,18
	EM	24	3,43	\pm 0,10	24	3,81	\pm 0,18
Nombre de cellules à mucus par lamelle (CML)	ED	16	0,19	\pm 0,04	16	0,29	\pm 0,06
	EM	24	0,17	\pm 0,03	24	0,30	\pm 0,05

3.2.3 Autres mesures histologiques

Plusieurs autres mesures ont été prises sur les coupes histologiques soit la distance interlamellaire (DI), la distance de diffusion (DD), l'épaisseur de l'épithélium lamellaire (EEL) et le nombre de cellules à mucus sur les lamelles branchiales (CML) (Tableau 8). Cependant, à une exception près, aucune différence significative n'a été observée entre les formes ni entre l'eau douce et l'eau de mer ou entre le début et la fin de l'expérience. Le nombre de cellules à mucus présentes sur les filaments branchiaux est toutefois significativement différent entre les formes pour le traitement « eau de mer » avec un plus grand nombre de cellules à mucus chez les anadromes que chez les résidents. Il y a donc une réponse face au traitement eau de mer qui est différente de l'eau douce où les deux formes ne sont pas significativement différentes. Également, une comparaison entre le jour 14 en eau de mer (28 ‰) et en eau douce montre qu'il y a bien une différence entre les traitements où le nombre de cellules à mucus est plus élevé dans l'eau de mer par rapport à l'eau douce (Tableau 9).

Tableau 9 : Nombre de cellules à mucus sur le filament (CMF) chez les deux souches pures d'ombles de fontaine (anadrome et résidente) maintenues soit en eau douce ou en de mer au mois de juin. Les * indiquent la présence de différences significatives entre les résidents et les anadromes en eau de mer et les lettres indiquent la présence de différences significatives entre le jour 14 en eau douce et en eau de mer. Moyenne \pm erreur type.

Nombre de cellules à mucus sur le filament (CMF)									
		Eau douce			Eau de mer				
Anadrome	16	2,55	\pm	0,49	24	2,88*	\pm	0,35	
Résident	16	1,39	\pm	0,31	24	1,75*	\pm	0,23	
Jour 14	16	1,51 ^a	\pm	0,31	16	2,58 ^b	\pm	0,36	

3.3 COMPARAISON DE L'EXPRESSION GÉNIQUE ENTRE LES SOUCHES PURES

Il n'y a pas de différences significatives dans les niveaux d'expression génique des gènes grancalcine et annexine 2 entre les traitements au cours de la première semaine d'exposition à l'eau de mer (Figures 24 et 25). Au jour 14, soit à une salinité de 28 ‰, l'expression génique de la grancalcine et de l'annexine 2 étaient plus faibles chez les résidents en eau de mer que chez ceux demeurés en eau douce (Figures 24 et 25). À la fin de l'été, l'expression génique était similaire entre les deux milieux et les deux formes pures pour les deux gènes (Figures 24 et 25).

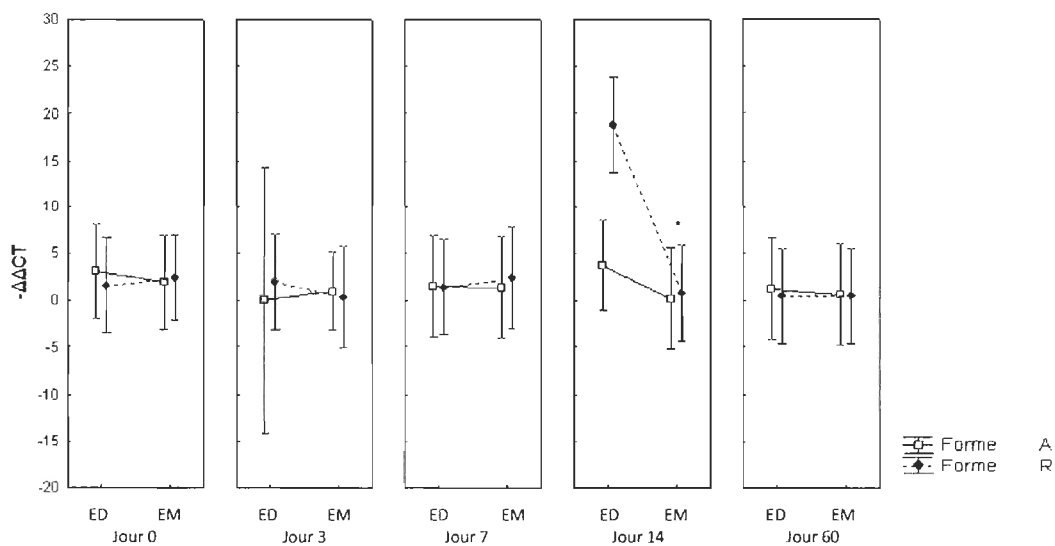


Figure 24 : L'expression génique du gène Grancalcine ($-\Delta\Delta CT$) chez des ombles de fontaine résidents (Forme R) et anadromes (Forme A) maintenus soit en eau douce ou en eau de mer durant la période estivale. Moyenne \pm erreur type. L'astérisque * montre la présence de différences significatives entre les deux milieux pour une forme donnée.

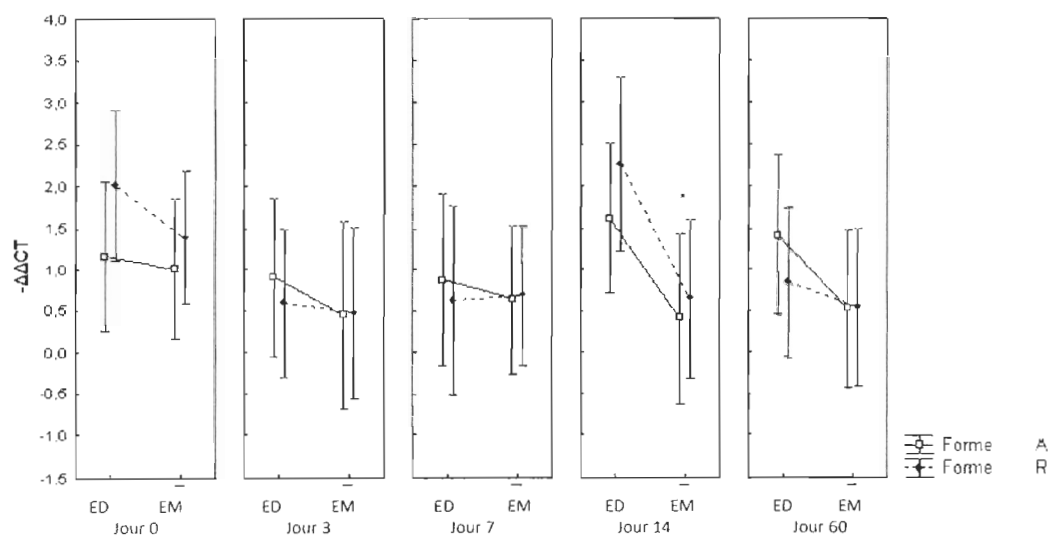


Figure 25 : L'expression génique du gène Annexine A2 ($-\Delta\Delta CT$) chez des ombles de fontaine résidents (Forme R) et anadromes (Forme A) maintenus soit en eau douce ou en eau de mer durant la période estivale. Moyenne \pm erreur type. L'astérisque * montre la présence de différences significatives entre les deux milieux pour une forme donnée.

DISCUSSION

Dans cette étude sur l'omble de fontaine, deux principaux objectifs étaient ciblés afin de vérifier certaines hypothèses posées par Bastien *et al.* (2010) et Boulet *et al.* (2012). Dans un premier temps, nous voulions vérifier si l'utilisation d'une salinité plus élevée pourrait permettre de contraster la capacité d'acclimatation à l'eau de mer entre résidents-eau douce et anadromes. L'étude de transcriptomique effectuée par Boulet *et al.* (2012) ayant démontré au niveau branchial des patrons d'expression différents entre résidents-eau douce et anadromes pour certains gènes liés à l'apoptose, nous voulions également vérifier la présence d'une réorganisation cellulaire plus importante chez les anadromes que chez les résidents en eau douce en début d'été, ce qui correspond à la période de migration en eau de mer en milieu naturel.

4.1 RÉPONSE DES DIFFÉRENTS CROISEMENTS À UN TRANSFERT EN EAU DE MER À 28 ‰

En transférant les ombles jusqu'à une salinité de 28 ‰, nous avons pu montrer que l'osmolalité plasmatique était plus élevée chez les résidents que chez les anadromes, ce qui indique, a priori, une moindre capacité d'ajustement osmotique. En effet, après un transfert à 20 ‰, Bastien (2010) avait observé une augmentation de 306-310 mOsm/kg à environ 320 mOsm/kg chez les résidents d'ombles de fontaine alors que nous avons observé des hausses pouvant aller jusqu'à 370 mOsm/kg chez les résidents comparativement à une augmentation jusqu'à 330 mOsm/kg chez les trois autres croisements à l'étude soit les anadromes, les anadromes-résidents et les résidents-anadromes.

Au cours de la même période de l'année, Boula *et al.* (2002) ont observé, sur la rivière Laval, des valeurs moyennes de 290 ± 5 mOsm/kg (moyenne \pm erreur-type) chez des adultes résidents capturés en rivière alors que sur la Petite-Cascapédia, Janssoone (2002) a observé des valeurs moyennes de 310 ± 2 mOsm/kg chez des adultes résidents en rivière pendant l'été. Ces valeurs sont plus faibles que les valeurs moyennes obtenues en eau douce, dans la présente étude, chez les résidents de rivières qui sont de $332,0 \pm 3,7$ mOsm/kg. Même si, dans notre étude, la hausse d'osmolalité à la suite du transfert en eau salée est plus élevée chez les résidents que chez les anadromes, elle n'en demeure pas moins dans les limites de ce qui est observé chez des anadromes en milieu naturel (où le stress de capture et de contention s'ajoute au changement de milieu en période de dévalaison). En effet, Boula *et al.* (2002) et Janssoone (2002) ont mesuré, respectivement, des osmolalités plasmatiques moyennes de 490 ± 10 mOsm/kg et 362 ± 6 mOsm/kg chez des anadromes capturés en estuaire.

Si le stress osmotique est plus élevé chez les résidents que chez les anadromes, on devrait s'attendre à observer des différences pour d'autres indicateurs secondaires de stress (e.g. *Salvelinus fontinalis*, eau douce à eau de mer, variations de l'hématocrite, de l'hémoglobine et du MCHC selon les mois, Claireaux et Audet, 2000 ; *Salvelinus fontinalis*, eau de mer, activité spécifique de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 2 fois supérieure chez résidents, Janssoone, 2002 ; *Salvelinus fontinalis*, eau douce, hémoglobine élevée, Houston et De Wilde, 1969). Or, ce n'est pas le cas pour plusieurs de ceux-ci. Ainsi, l'hémoglobine et la concentration d'hémoglobine par globule rouge (MCHC) au jour 14, à 28 %, sont similaires entre résidents et anadromes. De plus, alors que Bastien (2010) avait obtenu une baisse des réserves énergétiques chez les résidents à l'atteinte de 20 %, ce qu'elle avait interprété comme l'indication d'une plus grande utilisation des réserves énergétiques et reliée à un stress d'acclimatation, nous observons l'inverse. Effectivement, en eau de mer, l'indice hépatosomatique est significativement plus élevé qu'en eau douce chez les résidents et celui-ci reste identique pour les anadromes entre les deux milieux. Donc, même si l'acclimatation se fait moins rapidement chez les résidents que chez les anadromes, il ne semble pas que cela résulte en un stress accentué chez les premiers.

Lorsque l'on décortique les résultats obtenus durant l'ensemble de la saison estivale, aucune différence n'est observée entre les résidents et les anadromes. Toutefois, on observe un hémocrite plus faible chez les individus qui ont passé l'été en eau de mer que chez ceux demeurés en eau douce. On ne peut attribuer cette différence à un effet osmotique. En effet, s'il y avait eu débalancement osmotique, l'augmentation de l'osmolarité plasmatique aurait résulté en une diminution de la proportion d'eau présente dans le sang et donc en un hémocrite plus élevé. Comme l'hémocrite est plus élevé en eau douce qu'en eau de mer et que l'on observe après une semaine en eau de mer, une augmentation du pourcentage d'hémocrite au cours de la saison, on peut supposer que la hausse observée est fonction de la température. Ainsi, au cours de l'été, la température a augmenté de 10 à 17 °C en eau douce et de 5 à 12 °C en eau de mer. Comme l'oxygène dissous est moindre à température chaude qu'à température froide, les animaux doivent augmenter leur capacité de liaison et de transport d'oxygène en eau plus chaude afin de conserver un même registre aérobie (Fry *et al.*, 1947). D'ailleurs, la concentration d'hémoglobine sanguine est significativement plus élevée à la fin de l'été qu'en début d'expérimentation peu importe le milieu dans lequel les poissons ont été maintenus. Le MCHC est également plus élevé en fin d'été pour l'ensemble des formes, mais encore plus chez les poissons d'eau douce. Il est possible que cette augmentation de la capacité de liaison et de transport de l'oxygène soit également liée à l'augmentation de poids des animaux et donc à une augmentation de la charge présente dans les bassins (nombre de kg de poissons par mètre cube d'eau). Quoi qu'il en soit, des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour isoler les effets de la température de ceux de la densité. Il faut noter que la croissance a été similaire entre les animaux gardés en eau douce et ceux élevés en eau de mer confirmant que tous les groupes se sont bien acclimatés à l'eau de mer. En effet, un indicateur tertiaire de stress est la diminution de la capacité de croissance (Barton *et al.*, 2002). Lorsqu'il y a des changements environnementaux comme le changement de salinité, le système endocrinien joue un rôle « critique » en tout temps puisqu'il régule la fonction osmorégulatrice et que les animaux sont toujours soit en hypo ou soit en hyper osmorégulation (McCormick, 2001). Comme le cortisol, l'hormone de croissance joue également un rôle important dans cette régulation

(McCormick, 2001). Chez les salmonidés, le cortisol et l'hormone de croissance agissent en synergie pour augmenter la tolérance à l'eau de mer (McCormick, 1996 ; McCormick, 2001). On aurait donc pu s'attendre à observer une plus forte croissance chez les animaux élevés en eau de mer, ce qui ne fut pas le cas. À noter cependant que les poissons élevés en eau de mer avaient un indice hépatosomatique plus élevé que les animaux demeurés en eau douce indiquant, chez les premiers, une plus grande accumulation de réserves énergétiques en période estivale.

En travaillant avec des hybrides, nous voulions vérifier la présence d'effets parentaux ou d'hétérosis sur la réponse osmotique. Comme nous avons effectué des croisements pour obtenir des familles demi-frères, il est possible de tester la présence d'effets maternels. On constate que les individus de nos deux croisements hybrides ne présentent pas toujours les mêmes réponses que celles des souches maternelles. À la salinité maximale (28 ‰, jour 14), l'osmolalité plasmatique est plus élevée chez les résidents que chez les anadromes, mais elle est également plus élevée que chez les deux croisements hybrides. Par conséquent, nos hybrides s'acclimatent aussi rapidement que les poissons anadromes et la présence d'un seul parent (mère ou père) suffit pour exprimer ce trait puisqu'il n'y pas de différence entre les deux types de croisement hybride. La réponse des hybrides ne se distingue qu'au niveau du MCHC, celui-ci étant significativement plus élevé chez le croisement anadrome-résident que chez les trois autres types de croisement. Les individus de ce croisement étaient d'ailleurs plus gros et plus longs (meilleure croissance). Crespel et collaborateurs (2012) ont observé un effet d'hétérosis pour ce trait sur des croisements entre trois souches d'omble de fontaine, soit une souche domestique, la souche Laval et la souche Rupert, une souche résidente-eau douce. Dans cette étude, l'augmentation de la masse par rapport aux souches parentales était de 4,9 à 23,8 % dépendamment du croisement hybride considéré (souches Laval et Rupert) et de l'environnement (dans ce cas-ci des sites de production différents, mais tous en eau douce). Dans une autre étude, Crespel et collaborateurs (2013b) ont démontré la présence d'effets non-additifs chez des hybrides anadromes x résident au niveau des réserves corporelles et de la concentration en glycogène dans le foie. À l'hiver, en eau douce, chez les individus de la souche domestique et de la

souche Laval, Crespel et collaborateurs (2013a) ont observé un IHS significativement plus élevé que chez les individus de la souche Rupert. Cela suggère également qu'il y a eu utilisation des réserves énergétiques pour soutenir la croissance au lieu de l'emmagasiner pour l'automne et l'hiver à venir. La réponse pour l'IHS au niveau des hybrides était intermédiaire aux lignés parentales ce qui suggère un effet additif. De plus, ces auteurs ont montré que la stratégie d'utilisation des réserves énergétiques en hiver différait entre les souches : utilisation des réserves hépatiques de glycogène avec une diminution du facteur de condition chez la souche Laval et utilisation des lipides autour des viscères chez la souche Rupert. Dans notre étude, la réponse des hybrides au niveau de la croissance semble typiquement additive et ne met pas en lumière de phénomènes génétiques particuliers.

4.2 COMPARAISON DE LA STRUCTURE DU TISSU BRANCHIAL ET DE L'EXPRESSION DE GÈNES RELIÉS À L'APOPTOSE ENTRE RÉSIDENTS ET ANADROMES

Tel qu'indiqué précédemment, un de nos objectifs était de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une réorganisation cellulaire plus importante dans les branchies des ombles anadromes que chez les résidents en eau douce, au printemps. Nous avons également voulu vérifier si la réponse structurelle au niveau des branchies était similaire entre les deux formes.

D'un côté, en eau douce, nous n'avons relevé aucune différence d'expression pour nos deux gènes cibles, la grancalcine et l'annexine A2. En période de présomlification, Boulet *et al.* (2012) ont observé une surexpression de l'annexine A2 et de la grancalcine chez des résidents en comparaison aux anadromes en utilisant la technique des micropuces. Afin de pousser plus loin notre analyse, nous avons combiné nos premières journées d'échantillonnage qui correspondent à la période saisonnière normale de la dévalaison (c'est-à-dire jours 0, 3 et 7) pour augmenter le n en eau douce afin de mieux comparer nos deux souches en eau douce, mais cela n'a pas modifié les résultats ($F_{1, 40} = 12,77$, $p = 0,80$). La discordance entre nos résultats et ceux de Boulet *et al.* (2012) pourrait être

liée à la technique utilisée. En effet, la technique des micropuces permet de comparer une grande variété de gènes en même temps mais cette technique à tout de même des limites. Une étude effectuée par Canales *et al.* (2006) a montré qu'en comparant l'expression génique de plus de 997 TaqMan Gene Expression Assays avec cinq plaques commerciales de micropuces (MicroArray Quality Control), il y avait une forte corrélation entre les résultats mais également des discordances. La principale cause de variabilité est la différence entre la sonde de la séquence et l'emplacement visé. En effet, la méthode Taqman est beaucoup plus précise en utilisant une sonde d'une vingtaine de nucléotides sur la séquence du gène choisi alors que la biopuce utilise la complémentarité du transcrit d'ADN ne tenant pas compte de l'emplacement visé sur le gène. Une deuxième source de variabilité est la sensibilité variable et limitée des différentes plaques de micropuces pour détecter l'expression génique faiblement exprimée. Canales et ses collaborateurs (2006) ont conclu qu'il était nécessaire d'avoir une autre méthode de quantification génique pour confirmer les résultats des micropuces.

Même si des différences n'ont pas été observées en eau douce au niveau de la génomique, nous avons poussé l'étude par des observations histologiques. Des travaux effectués sur *Salmo trutta* (Madsen, 1990) et sur *Salmo salar* (McCormick, 1996) ont montré que les hormones de croissance exogènes et le cortisol avaient pour effet d'augmenter l'activité branchiale de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, le nombre de cellules à chlorure et la tolérance à la salinité. En effet, bien que le cortisol soit une hormone liée au stress, le rôle qu'il joue dans la prolifération ou la différenciation cellulaire avant la smoltification est attesté par plusieurs études et chez différentes espèces de salmonidés (*Oncorhynchus kisutch*, Richman III et Zaugg, 1987; Richman III *et al.*, 1987 ; *Salmo gairdneri*, Laurent et Perry, 1990 ; *Salmo salar*, Bisbal et Specker, 1991). Également, il a été démontré que l'augmentation du cortisol plasmatique induit une hausse du nombre de cellules à chlorure chez différents téléostéens (e. g. *Oreochromis mossambicus*, McCormick, 1990). De plus, chez le tilapia, le nombre de cellules à chlorure apoptotiques est un indicateur de stress lié à la salinité au même titre que l'augmentation de l'osmolalité plasmatique et de l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Sardella *et al.*, 2004).

En eau douce, dans la période de l'année où les anadromes entreprendraient leur migration, nos résultats ne montrent pas de différences du nombre de cellules à chlorure sur les filaments branchiaux ou sur les lamelles respiratoires. L'absence de différences significatives entre le jour 0 et le jour 7 nous démontre que les animaux à l'étude présentent peu d'indices de prémoltification. Il en va de même pour l'épaisseur des lamelles respiratoires qui demeurent inchangées entre les premières journées d'échantillonnage. Nos résultats ne supportent donc pas notre hypothèse de base suggérant une différenciation cellulaire et apoptotique pour la prémoltification chez les anadromes. Également, sur la base de nos résultats, nous ne pouvons pas conclure que nos animaux demeurés en eau douce étaient en préparation pour une migration en eau de mer même si ceux-ci étaient soumis aux mêmes conditions environnementales (photopériode et température) qu'en milieu naturel.

D'un autre côté, chez les poissons transférés en eau de mer, nous avons observé des changements dans les différents paramètres histologiques et génétiques. Ainsi, la grancalcine et l'annexine A2 sont sous-exprimées en eau de mer par rapport à l'eau douce. À prime abord, nous aurions plutôt dû voir une surexpression de l'annexine A2 après le transfert en eau salée puisque cette protéine est impliquée dans la différenciation cellulaire (Gilmore *et al.*, 2004) et est exprimée dans les branchies des poissons qui font des migrations (*Monopteris albus*, Shang *et al.*, 2007 et *Onchorhynchus mykiss*, Martin *et al.*, 2007). Si on se réfère à nos résultats d'histologie, c'est-à-dire une diminution du nombre de cellules à chlorure et de l'épaisseur du filament branchial, la sous-expression de l'annexine A2 semble cohérente. Cependant, cette observation ne supporte pas l'hypothèse selon laquelle il y a une augmentation du processus d'apoptose après le transfert en eau de mer. Janssoone (2002) a observé, chez l'omble de fontaine anadrome de la rivière Petite Cascapédia, une prolifération des cellules à chlorure au niveau des filaments branchiaux chez les individus capturés en estuaire en période de dévalaison. La même observation a été faite par Ura *et al.* (1997) sur *Oncorhynchus masou* et Shikano et Fujio (1998) sur *Poecilia reticulata*. D'un autre côté, Christensen et collaborateurs (2012) ont mesuré, en laboratoire, l'abondance d'ionocytes sur les filaments branchiaux chez le gaspareau (*Alosa*

pseudoharengus) avant et après le passage à l'eau de mer à une salinité de 26,3 ‰ et n'ont pas observé de différence entre les deux milieux. Selon ces observations on devrait donc observer une constance ou une augmentation du nombre de cellules à chlorure sur les filaments et les lamelles suite au transfert en eau salée. Dans la présente étude, on observe plutôt une diminution significative de celles-ci sur les filaments branchiaux des poissons à l'atteinte de 28 ‰, soit deux semaines après le début du transfert graduel en eau de mer. Comme soutenu par nos premières analyses sur la physiologie, il pourrait y avoir d'autres facteurs comme la température et le lieu d'échantillonnage qui expliqueraient que nos animaux réagissent de la même façon, indépendamment du milieu. Notons que l'étude de Janssoone (2002) a été réalisée sur des poissons sauvages et non dans le cadre d'une expérimentation en laboratoire. Dans les bassins d'élevage, les poissons sont à l'abri de plusieurs stress environnementaux (différences de courants, présence de prédateurs, etc.). Les exigences métaboliques étant moindres, il se peut que cela ait eu un effet sur les modifications physiologiques en lien avec la régulation osmotique. À salinité maximale, nous avons observé une diminution du nombre de cellules à chlorure au niveau des lamelles respiratoires. Cependant, cette diminution s'observe à la fois sur les animaux demeurés en eau douce et ceux qui ont migré en eau de mer. Cela suggère que la diminution du nombre de cellules à chlorure n'est peut-être exclusivement liée à la salinité mais aussi à d'autres facteurs.

Selon nos observations, il y a plus de cellules à mucus sur le filament chez les anadromes que chez les résidents en eau de mer. Également, au niveau des cellules à mucus sur le filament pour les deux souches, il y a plus de cellules en eau de mer par rapport à l'eau douce chez les individus échantillonnés au jour 14. Une augmentation du nombre de cellules à mucus chez les anadromes pourrait indiquer une réponse de protection accrue à une exposition à de nouveaux pathogènes (Mladineo *et al.*, 2009). Le milieu marin étant différent de l'eau douce d'un point de vue des microorganismes présents, il est possible que les animaux ont eu à rencontrer plusieurs contraintes autres que la salinité dans leur environnement. D'ailleurs nous avons des données non analysées qui pourraient démontrer cela. L'augmentation du nombre de cellules à mucus chez les anadromes en eau de mer

permet de valider partiellement notre première hypothèse suggérant qu'il y aurait des différences entre les souches pures. De plus, le fait que les animaux en eau de mer aient plus de cellules à mucus sur les filaments que les animaux en eau douce nous démontre que l'augmentation de la salinité a un effet sur l'histologie du tissu branchial.

Nous avons observé une sous-expression du gène grancalcine en eau de mer comparativement à l'eau douce, et ce, pour l'ensemble des poissons à l'étude au jour 14, à l'atteinte d'une salinité de 28 ‰. La grancalcine joue un rôle dans le système immunitaire inné puisqu'il s'agit d'une protéine spécialisée exprimée dans les neutrophiles et les monocytes/macrophages (Xu *et al.*, 2006). On sait également qu'elle est exprimée dans les globules rouges après un stress thermique chez les salmonidés (Lewis *et al.*, 2010). Il a déjà été attesté que même les neutrophiles déficients en grancalcine exercent quand même leur rôle dans les sites inflammés pour l'apoptose (Xu *et al.*, 2006). On peut ainsi supposer que même une sous-expression de la grancalcine n'empêche pas que les systèmes de défense soient pleinement efficaces. Cependant, le nombre de cellules à mucus ayant augmenté en eau de mer, il devient alors plus ambigu d'établir que la réponse de la grancalcine soit toujours aussi efficace. En effet, l'augmentation du nombre de cellules à mucus pourrait être liée à une réponse du système immunitaire suite à la baisse d'expression de la grancalcine. Lewis *et al.* (2010) ont démontré, chez la truite arc-en-ciel provenant d'une ferme océanique, qu'un choc de température crée une surexpression génique 4 fois plus importante du gène grancalcine par rapport à l'expression génique de ce gène à une température plus basse. Considérant que l'eau douce était plus chaude que l'eau de mer dans nos expériences, on peut penser que la réponse observée pourrait avoir été influencée ou encore être directement liée à une réponse aux conditions thermiques.

Si l'on se réfère à nos hypothèses exprimées à la suite de nos résultats physiologiques, nous avons en partie rejeté l'idée d'un stress osmotique sur la base des résultats obtenus et nous avons suggéré que plusieurs des modifications observées sur le plan hématologique pouvaient plutôt être liés à des réponses aux conditions de température. Parallèlement, on constate que les lamelles respiratoires sont de moins en moins épaisses

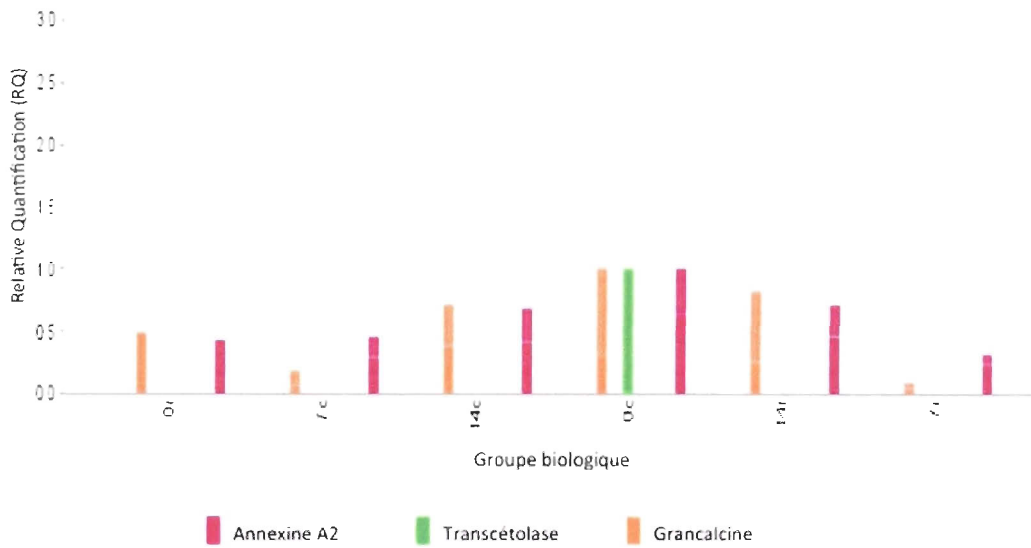
chez les deux formes à mesure que la période estivale avance, et cela pour les deux types d'habitats étudiés. Une diminution de l'épaisseur de la lamelle devrait résulter en une diminution de la distance de diffusion ce qui confirmerait une augmentation de la capacité d'échange d'oxygène avec la hausse saisonnière de la température, mais les mesures directes sur la distance de diffusion n'ont pu confirmer ceci. La diminution de l'épaisseur de l'épithélium lamellaire pourrait ainsi simplement refléter la diminution du nombre de cellules à chlorure, beaucoup plus grosses que les cellules respiratoires. Il faut noter que le filament branchial et l'épithélium du filament sont plus épais chez les animaux demeurés en eau de mer que les animaux en eau douce. Considérant les résultats obtenus au niveau histologique et génomique, nous ne pouvons conclure que la réorganisation cellulaire diffère entre les anadromes et les résidents puisque nous avons obtenu peu de différences dans la composition tissulaire branchiale et l'expression des gènes ayant un rôle à jouer dans la régulation de l'apoptose.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les objectifs de cette maîtrise étaient de vérifier deux hypothèses émises à la suite de différents travaux réalisés par Boulet *et al.*, (2012) et Bastien (2010) sur deux populations d'ombles de fontaine de la rivière Laval soit une anadrome et l'autre résidente. La première hypothèse tirée de Bastien (2010) était de vérifier, pendant la période estivale, la présence de différences physiologiques entre les formes pures et les croisements hybrides en eau de mer (28 % au lieu de 20 %). De plus, pour répondre à l'hypothèse soulevée par Bastien (2010), les populations ont également été suivies en eau douce afin d'établir si les différences physiologiques y sont également présentes. Nous avons pu établir que les anadromes avaient la réponse osmorégulatrice la plus efficace et que les individus élevés en eau de mer durant la période estivale accumulaient plus de réserves hépatiques que ceux élevés en eau douce. Quant aux hybrides, aucun phénomène de vigueur hybride n'a été observé à l'exception d'une croissance plus importante chez les anadromes-résidents. La deuxième hypothèse émise par Boulet *et al.* (2012) était de vérifier dans le tissu branchial s'il y avait une réorganisation cellulaire chez les ombles anadromes et s'il y avait une différenciation génique entre les deux formes. Cependant, nos résultats n'ont pas permis d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse. Nous avons cependant constaté qu'après deux semaines en eau de mer, l'expression génique de la grancalcine et de l'annexine A2 était plus faible qu'en eau douce. Cette étude aura permis d'accroître nos connaissances en eau de mer et en eau douce sur la physiologie de la forme anadrome, mais également sur les résidents et les croisements hybrides. Bien que peu de différences soient visibles, on observe que l'eau de mer affecte l'expression génique chez nos deux formes. D'autres gènes en lien avec l'apoptose pourraient nous donner de plus amples informations sur le processus d'acclimatation à l'eau de mer et les différenciations entre les populations. De nombreuses études restent à faire pour mieux comprendre l'impact d'un changement

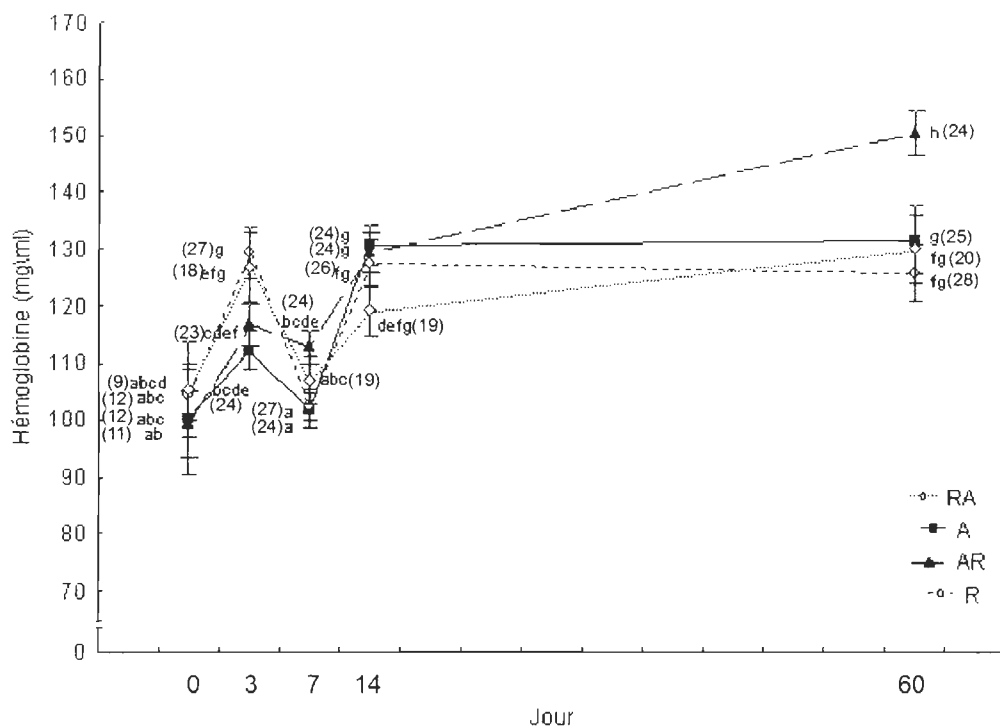
d'habitat sur les processus physiologiques et génomiques. Une meilleure compréhension de cette espèce permettra aussi de mieux la protéger et d'assurer la viabilité de son habitat. Dans le futur, l'omble de fontaine anadrome étant le successeur au saumon atlantique pour la pêche sportive, il devient primordial de la connaître sous toutes ses formes!

ANNEXE 1



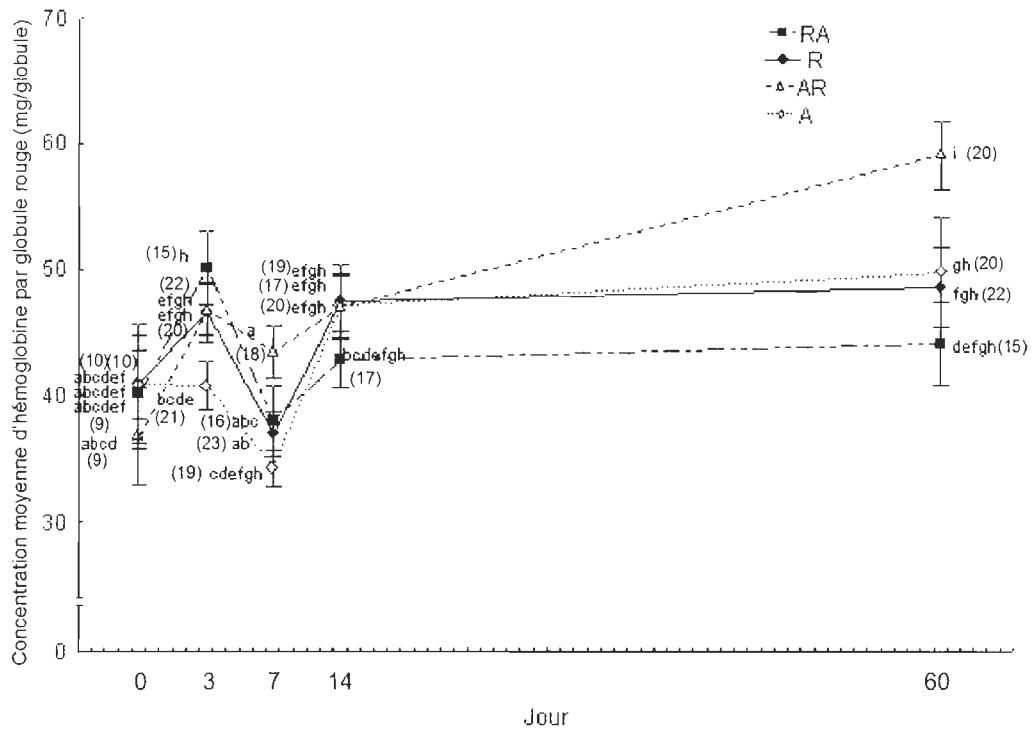
Annexe 1 : Quantification relative de l'expression génique des gènes Annexine A2, Transcétolase et Grancalcine avec la méthode Taqman en fonction des groupes biologiques (Jour = 0, 7 ou 14 et r = résident, c = anadrome).

ANNEXE II



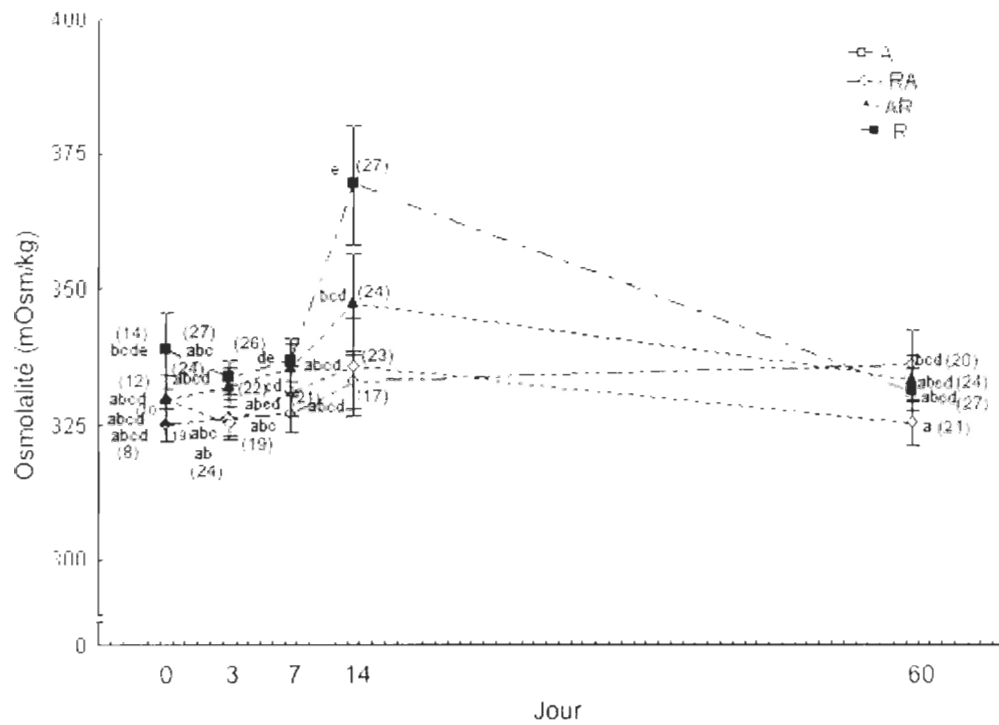
Annexe 2 : Concentration d'hémoglobine chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides (RA et AR) pendant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différents traitements. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les jours pour une forme donnée.

ANNEXE III



Annexe 3 : Concentration moyenne d'hémoglobine par globule rouge chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides (RA et AR) durant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différents traitements. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les jours pour une forme donnée.

ANNEXE IV



Annexe 4 : Osmolalité plasmatique chez des ombles de fontaine de souches pures (A et R) et de croisements hybrides (RA et AR) pendant la période estivale. Les moyennes tiennent compte des données obtenues pour les différents traitements. Moyenne \pm erreur-type. Les lettres différentes montrent les différences significatives entre les jours pour une forme donnée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS et P. Walter. 2002. « Molecular Biology of the Cell ». 4^e édition, Garland Publishing Inc., New York, 1463 p.
- AUDET C. et M. WOOD. 1993. « Branchial morphological and endocrine response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to long-term sublethal acid exposure in which acclimation did not occur ». Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 50, 198-209.
- AUDET, C. et G. CLAIREAUX. 1992. « Diel and seasonal changes in resting levels of various blood parameters in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ». Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 49, 870-877.
- BARTON, B. A., J. D. MORGAN et M. M. VIJAYAN. 2002. « Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish ». In S.M. Adams (Ed.) Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress, American Fisheries Society, 111-148.
- BASTIEN, A. 2010. « Évaluation d'un programme de sélection et identification des traits physiologiques liés à l'anadrome chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) ». Thèse de doctorat en océanographie, Déposé à l'Université du Québec à Rimouski, 150p.
- BERNATCHEZ, L. et M. GIROUX. 2000. Les poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'est du Canada. 1^{ère} édition. Ottawa : Broquet inc., 350p.
- BISBAL, G. A. et J. L. SPECKER. 1991. «Cortisol stimulates hypo-osmoregulatory ability in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. » Journal of Fish Biology. 39, 421-432.
- BŒUF, G. 1993. « Salmonid smolting : A pre-adaptation to the oceanic environment ». Dans J.C. Rankin and F.B. Jensen (eds), *Fish Ecophysiology*. Chapman Press, London. 105-135.
- BOULA D., V. CASTRIC, L. BERNATCHEZ et C. AUDET. 2002. « Physiological, endocrine, and genetic bases of anadromy in the brook charr, *Salvelinus fontinalis*, of the Laval River (Québec, Canada) ». Environmental Biology of Fishes, 64, 229-242.

- BOULET M., A. BASTIEN, E. NORMANDEAU, B. BOUGAS, C. AUDET et L. BERNATCHEZ. 2012. « Comparative transcriptomics of sympatric anadromous and resident brook char (*Salvelinus fontinalis*) before their first salt water transition ». *Current Zoology*, 58, 155-167.
- BYSTRIANSKY, J. S., N. T. FRICK, J. G. RICHARDS, P. M. SCHULTE et J. S. BALLANTYME. 2007. « Wild Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) upregulate gill Na^+/K^+ -ATPase during freshwater migration ». *Physiology, Biochemistry and Zoology*. 80, 270-282.
- BYSTRIANSKY, J. S. et P. M. SCHULTE. 2011. « Changes in gill H^+ - ATPase and Na^+/K^+ -ATPase expression and activity during freshwater acclimation of Atlantic salmon (*Salmo Salar*) ». *The Journal of Experimental Biology*. 214, 2435-2442.
- CANALES, R. D., Y. LUO, J. C. WILLEY, B. AUSTERMILLER, C. C. BARBACIORU, C. BOYSEN, K. HUNKAPILLER, R. V. JENSEN, C. R. KNIGHT, K. Y. LEE, Y. MA, B. MAQSODI, A. PAPALLO, E. HERNES PETERS, K. POULTER, P. L. RUPPE, R. R. SAMAHA, L. SHI, W. YANG, L. ZHANG et F. M. GOODSID. 2006. « Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms ». *Nature Biotechnology*, 24, 1115-1122.
- CASTRIC, V. et L. BERNATCHEZ. 2003. « The rise and fall of isolation by distance in the anadromous brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill) ». *Genetics*, 163, 983-996.
- CASTRIC, V. et L. BERNATCHEZ. 2004. « Individual assignment test reveals differential restriction to dispersal between two salmonids despite no increase of genetic differences with distance ». *Molecular Ecology*, 13, 1299-1312.
- CHEN, X-Y, J-Z SHAO, L-X XIANG et X-M LIU. 2006. « Involvement of apoptosis in malathion-induced cytotoxicity in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line ». *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 142, 36-45.
- CHIANG, Y., A. RIZZINO, Z. A. SIBENALLER, M. S. WOLD et J. K. VISHWANATHA. 1999. « Specific down-regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation ». *Molecular and Cellular Biochemistry*, 199, 139-147.
- CHRISTENSEN, A. K., J. HIROI, E. T. SCHULTZ et D. MCCORMICK. 2012. « Branchial ionocyte organization and ion-transport protein expression in juvenile alewives acclimated to freshwater or seawater ». *The Journal of Experimental Biology* 215, 642-652.

- CLAIREAUX, G. et C. AUDET. 2000. « Seasonal changes in the hypo-osmoregulatory ability of brook charr : the role of environmental factors ». *Journal of Fish Biology*, 56, 347-373.
- CREPEL, A., C. AUDET, L. BERNATCHEZ et D. GARANT. 2012. « Effects of rearing environment and strain combination on heterosis in brook trout ». *North American Journal of Aquaculture*, 74, 188-198.
- CREPEL, A., L. BERNATCHEZ, C. AUDET et D. GARANT. 2013b. « Strain specific genotype – Environment interactions and evolutionary potential for body mass in brook charr (*Salvelinus fontinalis*) ». *Genes Genomes Genetics*, 3, 379-386.
- CREPEL, A., L. BERNATCHEZ, D. GARANT et C. AUDET. 2013a. « Genetically based population divergence in overwintering energy mobilization in brook charr (*Salvelinus fontinalis*) ». *Genetica*, 141, 51-64.
- CURRY, R. A., L. BERNATCHEZ, F. G. WHORISKEY JR. et C. AUDET. 2010. « The origins and persistence of anadromy in brook charr ». *Rev Fish Biol Fisheries*, 20, 557-570.
- CURRY, R. A., J. VAN DE SANDE et F. G. WHORISKEY JR. 2006. « Temporal and spatial habitats of anadromous brook charr in the Laval River and its estuary ». *Environmental Biology of Fishes*, 76, 361-370.
- DYMOWSKA, A. K., P-P. HWANG et G. G. GOSS. 2012. « Structure and function of ionocytes in freshwater fish gill ». *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 184, 282-292.
- ESTABEL, J., A. MERCER, N. KÖNIG et J-M. EXBRAYAT. 2003. « Programmed cell death in *Xenopus laevis* spinal cord, tail and other tissues, prior to, and during, metamorphosis ». *Life Sciences*, 73, 3297-3306.
- EVANS, D. H. 1993. « Osmotic and ion regulation ». Dans *The physiology of Fishes*, Evans DH (ed), CRC Press, Boca Raton. 315-341.
- EVANS, D. H. 1984. « Gill Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁺ exchange systems evolved before the vertebrates entered fresh water ». *Journal of Experimental Biology*, 113, 465-469.
- EVANS, D. H., P. M. PIERMARINI et K. P. CHOE. 2005. « The multifunctional fish gill : dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste ». *American Physiological Society*, 85, 97-177.

- FAN, X., S. KRAHLING, D. SMITH, P. WILIAMSON et R. A. SCHLEGEL. 2004. « Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes ». *Molecular Biology of the Cell*, 15, 2863-3872.
- FANG, Y-T., C-F. LIN, C-Y. WANG, R. ANDERSON et Y-S. LIN. 2012. « Interferon- γ stimulates p11-dependent surface expression of annexin A2 in lung epithelial cells to enhance phagocytosis ». *Journal of Cellular Physiology*, 227, 2775-2787.
- FRY, F. E. J., V. S. BLACK et E. C. BLACK. 1947. « Influence of temperature on the asphyxiation of young goldfish (*Carassius auratus* L.) under various tensions of oxygen and carbon dioxide ». *Biological Bulletin*, 92, 217-224.
- GILMORE, W. S., S. OLWILL, H. MCGLYNN et H. D. ALEXANDER. 2004. « Annexin A2 expression during cellular differentiation in myeloid cell lines ». *Biochemical Society Transactions*, 32, 1122-1123.
- HARTMANNBERGER, D., B. MACK, C. EGGERT, S. DENZEL, H. STEPP, C. S. BETZ et O. GIRES. 2011. « Transketolase-like protein 1 confers resistance to serum withdrawal *in vitro* ». *Cancer Letters*, 300, 20-29.
- HOAR, W. S. 1988. « The physiology of smolting salmonids ». Dans *W.S. Hoar and D.J. Randall (eds), Fish Physiology, Vol. XIB*. Academic Press, New York. 275-343.
- HOLZER, A. S., C. SOMMERVILLE et R. WOOTTEN. 2002. «Detection of *Sphaerospora truttae* in the tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* by specific *in situ* hybridisation ». Unpublished, Genbank : AJ27629.1.
- HOUSTON, A. H. et DE WILDE, M. A. 1969. « Haematology and blood volume of thermally acclimated brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) ». *Comparative Biochemistry and Physiology*, 28, 877-885.
- HUANG Y., Y. JIN, C. H. YAN, Y. YU, J. BAI, F. CHEN, Y. Z. ZHAO et S. B. FU. 2008. « Involvement of annexin A2 in p53 induced apoptosis in lung cancer ». *Molecular and Cellular Biochemistry*, 309, 117-123.
- HUTCHISON, M. J. et M. IWATA. 1998. « Effects of thyroxine on the decrease of aggressive behaviour of four salmonids during the parr-smolt transformation ». *Aquaculture*, 168, 169-175.
- JANSSOONE, X. 2002. « Caractérisation de la population anadrome d'ombles de fontaine estivant dans l'estuaire de la rivière Petite Cascapédia ». Mémoire de maîtrise en océanographie, Déposé à l'université du Québec à Rimouski, 67p.

- JIA, J., S. TARABYKINA, C. HANSEN, M. BERCHTOLD et M. CYGLER. 2001. « Structure of apoptosis-linked protein ALG-2 : insights into Ca^{+} -induced changes in Penta-EF-Hand proteins ». *Structure*, 9, 267-275.
- KANEKO T, K. SHIRAIISHI, F. KATOH, S. HASEGAWA et J. HIROI. 2002. « Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation ». *Fisheries Science*, 68, 1-9.
- KARNAKY, K. J., L. B. KINTER JR., W. B. KINTER et C. E. STIRLING. 1976. « Teleost chloride cell : II. Autoradiographic localization of gill Na, K-ATPase in killifish *Fundulus heteroclitus* adapted to low and high salinity environments ». *The Journal of Cell Biology*, 70, 157-177.
- LAURENT, P. et S. F. PERRY. 1990. « Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri*. » *Cell and Tissue Research*, 259, 429-442.
- LEBLANC, D. M., C. M. WOOD, D. S. FUDGE et P. A. WRIGHT. 2003. « A fish out of water : Gill and skin remodeling promotes osmo- and ionoregulation in the mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus* ». *Physiological and Biochemical Zoology*, 83, 932-949.
- LE PETIT LAROUSSE ILLUSTRÉ. 2008. Larousse. 1811p.
- LENORMAND, S., J. J. DODSON et A. MÉNARD. 2004. « Seasonal and ontogenetic patterns in the migration of anadromous brook charr (*Salvelinus fontinalis*) ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61, 54-67.
- LEONG, J. S., S. G. JANTZEN, K. R. VON SCHALBURG, G. A. COOPER, A. M. MESSMER, N. Y. LIAO, S. MUNRO, R. MOORE, R. A. HOLT, S. J. M. JONES, W. S. DAVIDSON et B. F. KOOP. 2010. « *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes un evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome ». *BMC genomics*, 279, 1-17.
- LEWIS, J. M., T. S. HORI, M. L. RISE, P. J. WALSH, S. CURRIE. 2010. « Transcriptome response to heat stress in the nucleated red blood cells of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* ». *Physiology and Genomics*, 42, 361-373.
- LIU, J-W., J-J. SHEN, A. TANZILLO-SWARTS, B. BHATIA, C. M MALDONADO, M. D PERSON, S. S LAU et D. G TANG. 2003. « Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration ». *Oncogene*, 22, 1475-1485.

- LIVAK, K.J. et T.D. SCHMITTGEN. 2001. « Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method ». *Methods*, 25, 402-408.
- LOKMAN, N. A., M. P. WEEN, M. K. OEHLER et C. RICCIARDELLI. 2011. « The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression ». *Cancer Microenvironment*, 4, 199-208.
- LUCARDA, A. N., G. A. HORTOPAN et G. FORNERIS. 2007. « Fish welfare in aquaculture: molecular markers as tools for the study of chronic stress due to high stocking density in brown trout ». Unpublished, Genbank : EF406273.1.
- MAKSIMOVICH, A. A. 2008. « Evolutionary –Physiological aspects of adaptative of the Pacific salmon fry of the *Oncorhynchus* genus to migration to the sea water ». *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 44, 58-68.
- MADSEN, S. S. 1990. «The role of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*) ». *Genitive Comparative Endocrinology*, 79, 1-11.
- MAKI, M. 2000. « Roles of ALG-2 and its interacting protein in apoptosis and signal transduction ». *Electronic Journal of Pathology and Histology*, 6, 1-16.
- MARTIN, S. A. M., J. Zou, D. F. HOULIHAN et C. J. SECOMBES. 2007. « Directional responses following recombinant cytokine stimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS-11 macrophage cells as revealed by transcriptome profiling ». *BMC Genomics*, 8, 1-18.
- MCCORMICK, S. D. 2001. « Endocrine control of osmoregulation in teleost fish ». *American Zoology*, 41, 781-794.
- MCCORMICK, S. D. 1996. « Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 on salinity tolerance and gill Na^+ , K^+ -ATPase in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) : Interaction with cortisol». *General and Comparative Endocrinology*, 101, 3-11.
- MCCORMICK, S. D. 1994. « Ontogeny and evolution of salinity tolerance in anadromous salmonids : hormones and heterochrony ». *Estuaries*, 17, 26-33.
- MCCORMICK, S. D. 1990. « Cortisol directly stimulates differentiation of chloride cells in tilapia opercula membrane ». *American Journal of Physiology*, 259, 857-863.

- MCCORMICK, S. D., A. M. REGISH et A. K. CHRISTENSEN. 2009. « Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon ». *The Journal of Experimental Biology*, 212, 3994-4001.
- MCCORMICK, S. D., L.P. HANSEN, T. P. QUINN et R. L. SAUNDERS. 1998. « Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*) ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 55, 77-92.
- MINISTÈRE DES PÊCHES ET OCÉANS Canada (MPO). 2013. « Omble de fontaine » Dans *Pêches et Océans Canada*. En ligne. <<http://www.dfo-mpo.gc.ca/regions/central/pub/factsheets-feuilletsinfos-ogla-rglo/brooktrout-omblefontaine-fra.htm>>. Consulté le 23 août 2013.
- MLADINEO, I., I. BOCINA, et I. METAXA. 2009. « Ultrastructural changes in gill lamellar epithelium of wels catfish *Silurus glanis* adapted to brackish water ». *Vie et Milieu – Life and Environment*, 59, 69-78.
- MONTEIRO, S. M., N. M. S. DOS SANTOS, M. CALEJO, A. FONTAINHAS-FERNANDES et M. SOUSA. 2009. « Copper toxicity in gills of the teleost fish, *Oreochromis niloticus* : Effects in apoptosis induction and cell proliferation ». *Aquatic Toxicology*, 94, 219-228.
- MORINVILLE, G. R. et J. B. RASMUSSEN. 2006. « Does life-history variability in salmonids affect habitat use by juveniles? A comparison among streams open and closed to anadromy ». *Journal of Animal Ecology*, 75, 693-704.
- NILSSEN, K. J., O. A. GULSETH, M. IVERSEN et R. KJOL. 1997. « Summer osmoregulatory capacity of the world's northernmost living salmonid ». *American Journal of Physiology* 272, 743-749.
- NOGUERA, P. A. et D. W. BRUNO. 2010. « Liver involvement in post-smolt Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) : a retrospective histopathological study ». *Journal of Fish Diseases*, 33, 819-832.
- PERRY, G. M. L., C. AUDET et L. BERNATCHEZ. 2005. « Maternal genetic effects on adaptative divergence between anadromous and resident brook charr during early life history ». *Journal Evolutionary Biology*, 18, 1-14.
- PERRY, G. M. L., C. AUDET, B. LAPLATTE et L. BERNATCHEZ. 2004. « Shifting patterns in genetic control at the embryo-alevin boundary in brook charr ». *Evolution*, 58, 2002-2012.

- POWER, G. 1980. « The brook charr, *Salvelinus fontinalis* ». Dans E.K. Balton (ed.) *Charr : Fishes of the genus Salvelinus*, The Hague, Netherlands.
- RICHMAN, III, N. H., S. T. DE DIAZ, R. S. NISHIOKA, P. PRUNET et H. A. BERN. 1987. « Osmoregulatory and endocrine relationships with chloride cell morphology and density during smoltification in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). » *Aquaculture*, 60, 265–285.
- RICHMAN, III, N. H. et W. S. ZAUGG. 1987. « Effects of cortisol and growth hormone on osmoregulation in pre-and desmoltified coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). » *General and Comparative Endocrinology*, 65, 189-198.
- RISE, M. L., K. R. VON SCHALBURG, G. D. BROWN, M. A. MAWER, R. H. DEVLIN, N. KUIPERS, M. BUSBY, M. BEETZ-SARGENT, R. ALBERTO, A. R. GIBBS, P. HUNT, R. SHUKIN, J. A. ZEZNIK, C. NELSON, S. R. JONES, D. E. SMAILUS, S. J. JONES, J. E. SCHEIN, M. A. MARRA, Y. S. BUTTERFILED, J. M. SCOTT, S. H. NG, W. S. DAVIDSON et B. F. KOOP. 2004. «Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray : data minig and interspecific hybridization characteristics ». *Genome*, 14, 478-490.
- ROBERTS, S. D. et M. D. POWELL. 2003. « Comparative ionic flux and gill mucous cell histochemistry : effects of salinity and disease status in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ». *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 134, 525-537.
- ROES, J., B. K. CHOI, D. POWER, P. XU et A. W. SEGAL. 2003. « Granulocyte function in grancalcin-deficient mice ». *Molecular and Cellular Biology*, 23, 826-830.
- ROUNSEFELL, G. A. 1958. « Anadromy in North Salmonidae », US Government Printing Office.
- SANTI, N., A. SANDTRO, H. SINDRE, H. SONG, J.-R. HONG, B. THU, J –L. WU, V. N. VAKHARIA et O. EVENSEN. 2005. « Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis in vitro and in vivo independent of VP5 expression ». *Virology*, 342, 13-25.
- SARDELLA, B. A, V. MATEY, R. J. GONZALEZ, et C. J. BRAUNER. 2004. « Physiology biochemical and morphological indicators of osmoregulatory stress in ‘California’ Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water ». *The Journal of Experimental Biology*, 207, 1399-1413.

- SAUVAGE, C., M. VAGNER, N. DERÔME, C. AUDET et L. BERNATCHEZ. 2012. « Coding gene SNP mapping reveals QTL linked to growth and stress response in brook charr (*Salvelinus fontinalis*) ». *Genes Genomes Genetics*, 2, 707-720.
- SCOTT, W. B. et E. J. CROSSMAN. 1973. « Freshwater fishes of Canada ». Bulletin 184. Fisheries Research Board of Canada, 966p.
- SENDER, S., K. BÖTTCHER, Y. CETIN et G. GROS. 1999. « Carbonic anhydrase in the gills of seawater and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus* : purification, characterization, and immunohistochemical localization ». *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47, 43-50.
- SHANG, X., J. SUN, Y. HE, W. ZHAO, Q. LI, F. ZHOU, B. CHEN, H. CHENG et R. ZHOU. 2007. « Identification and predominant expression of annexin A2 in epithelial-type cells of the rice field eel ». *Journal of Cellular Biochemistry*, 101, 600-608.
- SHIKANO, T. et Y. FUJIO. 1998. « Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase and morphological changes in two types of chloride cells in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation in a euryhaline teleost, *Poecilia reticulata* ». *Journal of Experimental Zoology*, 281, 80-89.
- ST-LAURENT, J. 2008. « Comparaison écophysiological des formes anadrome et résidente de l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) dans la petite Cascapédia (Québec, Canada) ». Mémoire de maîtrise en océanographie, Déposé à l'Université du Québec à Rimouski, 67p.
- THÉRIAULT, V. et J. J. DODSON. 2003. « Body size and the adoption of a migratory tactic in brook charr ». *Journal of Fish Biology*, 63, 1144-1159.
- URA, K., S. MIZUNO, T. OKUDO, Y. CHIDA, N. MISAKA, S. ADACHI et K. YAMAUCHI. 1997. « Immunohistochemical study on changes in gill Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit during smoltification in the wild masu salmon, *Oncorhynchus masou* ». *Fish Physiology and Biochemistry*, 17, 397-403.
- VERDUGO, P. 1984. « Hydration kinetics of esocytosed mucins in cultured secretory cells of rabbit trachea : a new model ». Dans Nugent, J., O'Connor, M. (eds), *Mucus and Mucosa* (Ciba Foundation Symposium 109). Pitman Publishing, London, UK, 212-222.
- WANG, C-Y., Y-S. LIN, W-C. SU, C-L. CHEN et C-F. LIN. 2009. « Glycogen synthase kinase-3 and α -tubulin induce annexin A2 cleavage followed by cell cycle inhibition and apoptosis ». *Molecular Biology of the Cell*, 20, 4153-4161

- WENDELAAR BONGA, S. E. et C. J. M. VAN DER MEIJ. 1989. « Degeneration and death, by apoptosis and necrosis, of the pavement and chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* ». *Cell Tissue Research*, 255, 235-243.
- WILDER, D. G. 1952. « A comparative study of anadromous and freshwater population of brook trout (*Salvelinus fontinalis* (Mitchill)) ». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 9, 169-202.
- XU, P., J. ROES, A. W. SEGAL et M. RADULOVIC. 2006. « The role of grancalcin in adhesion of neutrophils ». *Cellular Immunology*, 240, 116-121.
- XU, W. et X. LI. 2011. « Immunoproteomic analysis of the antibody response obtained in mouse following vaccination with a T-cell vaccine ». *Proteomics*, 11, 4368-4375.
- XU, X., A. ZUR HAUSEN, J. F. COY et M. Löchelt. 2009. « Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells ». *International Journal of Cancer*, 124, 1330-1337.
- YANG, Y. H., J. L. WANG et D. R. BUHLER. 1999. « Sequence of Beta-actin cDNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ». Unpublished. Genbank : AF157514.
- ZHAI, H., S. ACHARYA, I. GRAVANIS, S. MEHMOOD, R. J. SEIDMAN, K. R. SHROYER, K. A. HAJJAR et S. E. TSIRKA. 2011. « Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression ». *The Journal of Neuroscience*, 40, 14346-14360.

