

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**CARACTÉRISATION DE LA FONCTION Na^+/K^+ -
ATPASIQUE BRANCHIALE CHEZ DES OMBLES DE
FONTAINE (*SALVELINUS FONTINALIS*) ANADROMES ET
RÉSIDENTS DE LA RIVIÈRE LAVAL**

Mémoire présenté dans le cadre
du programme de maîtrise en océanographie
en vue de l'obtention du grade de maître ès Sciences

PAR

© MICHÈLE PELLETIER ROUSSEAU

Janvier 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 :

Réjean Tremblay, président du jury, Université du Québec à Rimouski

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

Guy Claireaux, examinateur externe, Université de Bretagne

Dépôt initial le 13 janvier 2014

Dépôt final le 13 juin 2014

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de maîtrise, Céline Audet, sans qui ce projet de maîtrise n'aurait pas été le même. Céline, ta passion est contagieuse et c'est excessivement motivant et formateur de travailler avec toi, que ce soit en laboratoire ou à la station aquicole. J'espère que ton souci du détail et du travail bien fait me suivront dans ma future carrière professionnelle! Merci également pour les contrats et les belles expériences de travail qui m'ont donnés envie de continuer dans le domaine.

Je tiens à remercier Guy Claireaux et Réjean Tremblay d'avoir accepté de corriger ce mémoire et de prendre le temps de me lire. Merci également à Éric Parent pour le séquençage et les bons conseils, et à Éric Normandeau pour m'avoir rassuré dans mes calculs d'expression génique! Un gros merci à Adeline pour l'aide à la mise en page!

Également, merci aux filles du labo: Aurélie, Mélanie, Wahiba, Andrée-Anne, Marion, vous m'avez donné de précieux conseils et avez rendu les journées au labo plus agréables! Un merci particulier à Andrée-Anne qui a fait les échantillonnages et qui a été d'une aide précieuse pour la partie génétique. Je tiens aussi à remercier les amis de l'ISMER avec qui les dîners et les 5 à 7 étaient tous plus drôles les uns que les autres!

Merci à ma jumelle Andrée, on s'est encouragé et découragé dans nos maîtrises respectives, mais on y est arrivé en même temps, comme de vraies jumelles! À quand un article commun...?!

Merci également aux fillettes, merci pour les discussions scientifiques, mais surtout celles absolument pas scientifiques, les 5 à 7, et plus encore! Merci également aux membres de ma famille qui ont toujours su m'encourager et me faire savoir qu'ils étaient fiers de moi. Maman, pour la dernière fois, je suis en océanographie, et non en géographie!!

Merci à Christian pour sa présence, sa patience, et son merveilleux sens de l'humour pour gérer mes montagnes russes d'émotions!

RÉSUMÉ

Les ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) anadromes et résidents de la rivière Laval (Côte-Nord, Québec) représentent deux populations génétiquement et physiologiquement distinctes vivant en sympatrie. L'anadromie implique un défi osmorégulateur pour les poissons, entraînant plusieurs ajustements physiologiques, incluant l'augmentation de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase branchiale. Cette dernière est considérée comme critique lors de l'acclimatation en eau salée chez les salmonidés. La présence de deux isoformes (*ala* et *alb*) de la sous-unité catalytique de la Na^+/K^+ -ATPase branchiale, différemment exprimés en fonction de la salinité a récemment été démontrée chez d'autres espèces de salmonidés anadromes. Afin de vérifier s'il existe des différences de capacité osmorégulatoire en eau salée au niveau de la Na^+/K^+ -ATPase branchiale entre les deux formes, des ombles de fontaine anadromes et résidents de la rivière Laval (1+) ont été graduellement transférés dans des eaux estuariennes de juin à août (augmentation de 2% par jour, salinité finale 28%) et comparés à un groupe contrôle demeuré en eau douce. Avant le transfert et 3, 7, 14 et 60 jours après le transfert en eau salée, des mesures d'activités enzymatiques absolue et spécifique de la Na^+/K^+ -ATPase branchiale ont été réalisées. Les expressions relatives des deux isoformes *ala* et *alb* ont été mesurées à l'aide d'analyses *PCR* quantitatives en temps réel. Les résultats démontrent des réponses enzymatique et d'expression génique Na^+/K^+ -ATPasique branchiales similaires chez les deux formes; soit une augmentation des activités spécifique et absolue après 14 jours (28%), ainsi qu'une diminution de l'expression de l'isoforme *ala* après 14 jours (28%) et une augmentation de l'expression de l'isoforme *alb* après 60 jours (28%). Ces résultats suggèrent la conservation chez les résidents de la rivière Laval d'une certaine capacité d'habileté hypo-osmorégulatoire en eau salée au niveau de cette enzyme. L'expression différentielle des deux isoformes en fonction de la salinité suggère une activité ou une régulation de transport différente reliée à l'absorption ou l'excrétion d'ions. Un décalage entre les réponses d'expression génique et d'activité enzymatique a été observé, traduisant peut-être des inhibitions de la traduction ou simplement des temps de réponses différents pour ces deux processus.

Mots clés : Omble de fontaine, Na^+/K^+ -ATPase branchiale, anadromie, acclimatation eau salée, régulation ionique

ABSTRACT

Anadromous and river-resident brook charr (*Salvelinus fontinalis*) from Laval river (Northern shore, Québec) represent two genetically and physiologically distinct populations, living in sympatry. Anadromy implies an osmoregulatory challenge for fish and several physiological adjustments must be set up, including the up regulation of gill Na^+/K^+ -ATPase activity, considered as a critical physiological variable for successful seawater acclimation in salmonids. It has been recently demonstrated in other anadromous salmonid species, that the two isoforms (*ala* and *alb*) of this enzyme are differently expressed according to salinity. In order to verify if there are differences in the saltwater osmoregulatory capacity at the gill Na^+/K^+ -ATPase level in both forms, anadromous and river-resident brook charr (1+) were gradually transferred in estuarine water from June to August (increase of 2% day⁻¹, final 28%) and compared to a control group stayed in fresh water. Before the transfer and after 3, 7, 14 and 60 days following saltwater transfer, enzymatic gill Na^+/K^+ -ATPase absolute and specific activities were measured. Relative expression of the two isoforms *ala* and *alb* were analysed using quantitative real time *PCR*. The results showed similar gill Na^+/K^+ -ATPase responses at enzymatic and genomic expression levels in both forms of brook charr: up regulation of absolute and specific activity after 14 days (28%), down regulation of *ala* isoform after 14 days (28%) and up regulation of *alb* isoform after 60 days (28%). These results suggest a certain conservation of the hypo-osmoregulatory capacity in river-resident charr from Laval river at the gill Na^+/K^+ -ATPase level. The differential expression of these isoforms according to salinity suggest that *ala* and *alb* may differ in transport activity or regulation related to ion uptake and secretion, respectively. A time lapse between enzymatic and genomic expression responses has been observed and may indicate translation inhibition or different time response of these two mechanisms.

Keywords : Brook charr, gill Na^+/K^+ -ATPase, anadromy, seawater acclimation, ion regulation

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	VII
RÉSUMÉ.....	IX
ABSTRACT	XI
TABLE DES MATIÈRES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES FIGURES.....	XVII
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 CARACTERISATION DE LA FONCTION Na^+/K^+ - ATPASIQUE BRANCHIALE CHEZ DES OMBLES DE FONTAINE (SALVELINUS FONTINALIS) ANADROMES ET RESIDENTS DE LA RIVIERE LAVAL.....	9
1.1 RESUME.....	9
1.2 ABSTRACT	10
1.3 INTRODUCTION	11
1.4 MATERIAL AND METHODS	13
1.5 RESULTS.....	22
1.6 DISCUSSION.....	28
CHAPITRE 2 DISCUSSION GENERALE	33
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	38
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	41

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Number of fish sampled in each group..... 14

Table 2. Endogenous and target genes sequences, specific Taqman primers and probes
and PCR efficiencies..... 19

Table 3. Total homogenate protein concentration in each group.....23

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Morphologie et mécanismes de transport des cellules à chlorure branchiales en eau salée (gauche) et en eau de mer (droite).....	4
Figure 2. Agarose gel (2%) to verify RNA integrity and quantity.	16
Figure 3. Agarose gel (2%) to verify cDNA in duplicates amplified with Amplitaq Gold Master Mix.....	18
Figure 4. Absolute Na ⁺ /K ⁺ -ATPase activity (mean ± SD) during summer in both fresh and salt water.	24
Figure 5. Specific Na ⁺ /K ⁺ -ATPase activity (mean ± SD) during summer in fresh and salt water.	25
Figure 6. Relative changes in expression of α1a mRNA isoform using the anadromous in fresh water at day 0 group as the reference group (horizontal line) (mean ± SD). .	27
Figure 7. Relative changes in expression of α1b mRNA isoform using the anadromous in fresh water at day 0 group as the reference group (horizontal line) (mean ± SD). .	28

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'anadromie, une forme spécialisée de diadromie, est une stratégie migratrice fréquente chez les salmonidés, impliquant une migration saisonnière en eau salée, et un retour subséquent en eau douce pour se reproduire (Gross et al., 1988; Doyon et al., 1991). Le principal avantage de la migration en eau salée est la plus grande abondance de nourriture due à la productivité plus élevée du milieu marin en régions tempérées, permettant ainsi l'atteinte d'une plus grande taille et donc d'une meilleure fécondité lors du retour en eau douce (Doyon et al., 1991; Gross et al., 1988; Perry et al., 2005; Thériault et al., 2007; Zidlewesky et Wilkie, 2013). La migration en eau de mer engendre en contrepartie des coûts métaboliques associés à l'osmorégulation, aux défenses contre les maladies (nouveaux pathogènes) ainsi qu'à la prédation (Jonsson et Jonsson, 1993). Les avantages doivent cependant surpasser les coûts et avoir un impact sur la valeur adaptative des individus afin que ce comportement perdure et évolue par sélection naturelle (Gross et al., 1988).

On retrouve chez plusieurs espèces de salmonidés la présence d'une anadromie partielle dans une même population; c'est-à-dire qu'une partie de la population migre en eau salée pour une certaine période (individus anadromes), tandis que l'autre partie de la population demeure en eau douce tout au long de son cycle vital (individus résidents) (Curry et al., 2010; Jonsson et Jonsson, 1993; Morinville et Rasmussen, 2003; Thériault et Dodson, 2003). On retrouve des populations présentant de l'anadromie partielle entre autres chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, Zimmerman et Reeves, 2000), l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus* L., Arnesen et al., 1993), le saumon Atlantique (*Salmo salar*, Verspoor et Cole, 1989) et l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*, McCormick et al., 1985). Cette dernière est l'une des espèces de salmonidés présentant le phénomène d'anadromie le moins prononcé, comportant une migration généralement de courte durée, restreinte aux eaux estuariennes (Curry et al., 2010; McCormick et al., 1985). De façon générale, les ombles de fontaine anadromes effectuent une migration trophique en mer au printemps et reviennent en eau douce à la fin de l'été ou au début de l'automne pour la

période de reproduction (Doyon et al., 1991; Curry et al., 2010). Lorsqu'un accès à la mer est présent, le comportement anadrome peut être exprimé (Curry et al., 2010). Claireaux et Audet (2000) ont démontré la présence de patrons saisonniers de la capacité hypo-osmorégulatoire des ombles de fontaine ainsi que l'importance de la température sur celle-ci, l'efficacité hypo-osmorégulatoire étant maximale à la fin du printemps. Les températures saisonnières propres à chaque rivière et les régimes de salinité délimitent temporellement et spatialement les migrations, en fonction de la condition physiologique des individus (Curry et al., 2010). Chez l'omble de fontaine des rivières de l'Est du Canada, les formes anadromes et résidentes peuvent vivre en sympatrie dans le même environnement et faire partie d'un même pool génétique (tactiques anadrome ou résidente), ou au contraire représenter plutôt deux populations physiologiquement et génétiquement distinctes (stratégies anadrome ou résidente) (Boula et al., 2002; Curry et al., 2010; Thériault et Dodson, 2003).

Dans la rivière Ste-Marguerite (Québec, Canada), où les formes anadrome et résidente font partie d'un même pool génétique, Morinville et Rasmussen (2003) ont démontré le lien entre les coûts métaboliques et la tactique adoptée chez les ombles de fontaine juvéniles. Les individus anadromes de cette rivière seraient limités au niveau énergétique en eau douce, puisqu'ils démontrent des taux de consommation élevés, mais des efficacités de croissance faibles comparativement aux individus résidents, ce qui pourrait expliquer en partie la migration des anadromes de cette rivière (Morinville et Rasmussen, 2003). Morinville et Rasmussen (2008) ont également mis en évidence le lien existant entre la stratégie adoptée et la morphologie des ombles juvéniles de cette rivière, en lien avec les différents habitats utilisés; les individus anadromes auraient une morphologie plus longiligne pour faire face aux vitesses de courant élevées rencontrées. De plus, Thériault et Dodson (2003) ont également démontré l'importance de l'atteinte d'une certaine taille comme facteur important contrôlant la migration.

Malgré le fait que l'anadromie partielle soit fréquemment observée chez les salmonidés, les mécanismes d'adoption de l'anadromie ne sont que partiellement connus.

Tel que mentionné précédemment, l'adoption d'une stratégie/tactique fait intervenir plusieurs facteurs environnementaux et individuels, et est propre à chaque bassin de drainage, ce qui en fait un phénomène d'étude complexe. Certains individus résidents peuvent également exprimer le comportement anadrome lorsque les facteurs environnementaux tels la température et la salinité le permettent (Thériault et al., 2007). Afin d'expliquer la résilience du comportement anadrome, Curry et collaborateurs (2010) ont récemment soulevé l'hypothèse voulant que les résidents auraient émergé des individus anadromes. Les individus résidents pourraient donc avoir conservé la capacité hypo-osmorégulatoire et le comportement anadrome pourrait être exprimé si les conditions physiologiques et environnementales adéquates sont rencontrées (Curry et al., 2010; Hiroi et McCormick, 2007; Henry et al., 2004).

Le phénomène de smoltification est une étape primordiale afin de préparer les poissons à faire face au changement drastique de salinité accompagnant la migration. Ce phénomène comporte des ajustements physiologiques, morphologiques, biochimiques et comportementaux particulièrement importants au niveau des capacités osmorégulatoires (McCormick, 2001; McCormick, 2009). Chez les téléostéens, les branchies sont les principaux organes permettant la régulation des ions monovalents (Na^+ , Cl^- , NH_4^+), autant en eau douce qu'en eau salée (Evans et al., 2005; McCormick, 2001). Indépendamment de la salinité extérieure, les téléostéens maintiennent généralement leur osmolarité plasmatique à environ un tiers de celle de l'eau de mer (McCormick, 2001). En eau douce, le gain d'eau et la perte d'ions sont contrecarrés par la production d'une urine diluée et par l'absorption active d'ions. En eau salée, la perte osmotique d'eau et le gain d'ions sont plutôt contrecarrés par l'action de boire l'eau de mer et par la sécrétion active des excédents d'ions à travers les branchies (Evans et al., 2005; McCormick, 2001).

Les cellules à chlorure, cellules spécialisées dans le transport d'ions et riches en mitochondries, sont le principal site d'iono-régulation des branchies. L'adénosine triphosphatase sodium-potassium branchiale (Na^+/K^+ -ATPase), située au niveau baso-latéral

de ces cellules à chlorure, est une enzyme clé dans les échanges ioniques, autant en eau douce qu'en eau salée (Figure 1) (McCormick, 2001; Mobasheri et al., 2000). Afin de créer

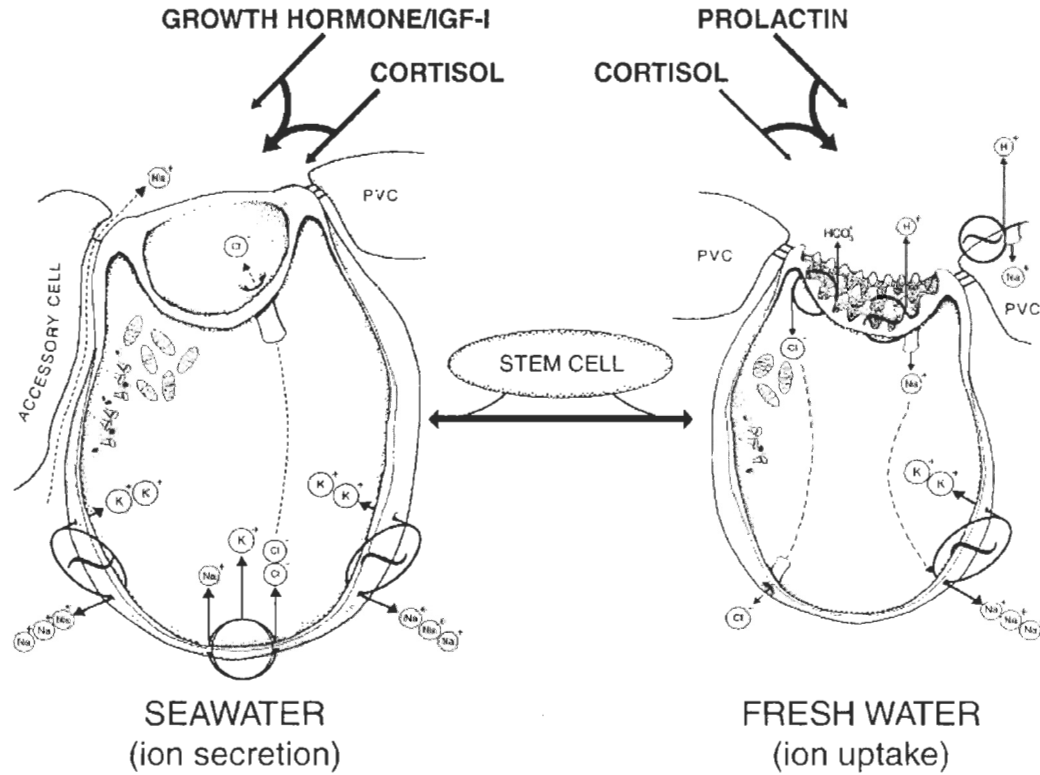


Figure 1. Morphologie et mécanismes de transport des cellules à chlorure branchiales en eau salée (gauche) et en eau de mer (droite). Tirée de McCormick et al., 2001

un gradient ionique entre les milieux intra et extra cellulaires, la Na⁺/K⁺-ATPase couple l'hydrolyse d'une molécule d'adénosine tri-phosphatase (ATP) pour permettre l'échange de deux ions potassium (K⁺) extracellulaires contre trois ions Na⁺ intracellulaires (Mobasheri et al., 2000). En eau salée, ce gradient est utilisé entre autre par le co-transporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻ afin de sécréter les ions Na⁺ au niveau paracellulaire (Marshall, 2002). En eau douce, le gradient ionique créé par la Na⁺/K⁺-ATPase est utilisé pour faciliter l'absorption des ions Na⁺ et Cl⁻ par la pompe à protons (H⁺-ATPase) ou par des échangeurs

Na^+/H^+ en conjonction avec l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, ainsi que des canaux à ions Na^+ transmembranaires (Figure 1) (Evans et al., 2005; McCormick, 2001).

La Na^+/K^+ -ATPase est constituée de deux sous-unités : la sous-unité catalytique alpha (α) et la sous-unité beta (β). La sous-unité alpha est la sous-unité critique pour le transport d'ions, puisqu'elle contient les sites de liaison pour l'ATP et les ions Na^+ et K^+ (McCormick, 2001; Mobasher et al., 2000). Il a été démontré que différents isoformes de la sous-unité alpha sont exprimés dans le tissu branchial de salmonidés, avec les isoformes *ala* et *alb* différemment exprimés en fonction de la salinité (Richards et al., 2003). Chez la truite arc-en-ciel, le saumon atlantique et l'omble chevalier, l'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'isoforme *ala* domine en eau douce, tandis que l'isoforme *alb* devient majoritairement exprimé après un transfert en eau salée (Bystriansky et al., 2006; Flores et Schrimpton, 2012; McCormick et al., 2009; Richards et al., 2003). Ce changement d'expression des isoformes de la Na^+/K^+ -ATPase accompagne ainsi la transformation des branchies, passant d'un épithélium absorbant les ions à un épithélium excréteur ceux-ci en eau salée. Les propriétés cinétiques spécifiques de ces deux isoformes suggèrent ainsi des rôles différents dans les milieux d'eau douce et d'eau salée (Bystriansky et al., 2006). Une augmentation de l'activité totale de l'enzyme Na^+/K^+ -ATPase est également associée à la migration en eau salée (Marshall, 2002). En effet, une augmentation de l'activité totale de cette enzyme a été démontrée à plusieurs reprises comme étant corrélée au processus de smoltification et à une augmentation de l'habileté hypo-osmorégulatoire (Boula et al., 2002; Evans et al., 2005; McCormick, 2001; Siegler et al., 1996). Une augmentation des ARNm d'un gène donné peut permettre une augmentation de production de protéines par les processus de traduction des ARN messagers en synthèse protéique, et ainsi se traduire en une activité enzymatique plus élevée (Nikinmaa et Rytönen, 2011). L'augmentation de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase branchiale observée chez les salmonidés lors d'un transfert en eau salée pourrait ainsi être reliée en grande partie à une augmentation des ARNm de l'isoforme *alb* (Bystriansky et al., 2006; Richards et al., 2003). Par ailleurs, chez certaines populations d'omble chevalier confinées en eau douce par des barrières physiques naturelles, des

transferts en eau salée ont démontré une inhabileté à s'acclimater à cet environnement hypertonique, expliquée par une incapacité à augmenter l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, elle-même expliquée en partie par une incapacité à augmenter l'expression de l'isoforme *$\alpha 1b$* (Bystriansky et al., 2007).

Contrairement à la rivière Ste-Marguerite, les ombles de fontaine résidents et anadromes de la rivière Laval, située sur la Côte-Nord (Québec, Canada), représentent deux populations génétiquement et physiologiquement distinctes, vivant en sympatrie (Boula et al., 2002; Perry et al., 2005). Les ombles anadromes effectuent une migration trophique dans la Baie Laval de mai à septembre afin de profiter des ressources alimentaires plus abondantes en milieu estuarien. Les ombles anadromes font ainsi face à un changement drastique de salinité, de 0 à 34‰, avec une préférence entre 26 et 30‰ (Curry et al., 2006). Boula et collaborateurs (2002) ont effectué des travaux sur le terrain et ont mis en évidence une certaine différenciation génétique entre anadromes et résidents de la rivière Laval à l'aide de marqueurs microsatellites. Ces mêmes auteurs ont également observé une activité Na^+/K^+ -ATPasiqne branchiale significativement plus élevée chez la forme anadrome, au printemps lors de la dévalaison, comparativement à la forme résidente. Perry et collaborateurs (2005) ont eux aussi étudié les deux formes d'ombles de la rivière Laval et ont observé des différences phénotypiques au niveau morphologique, au stade juvénile. Bastien (2010) a pour sa part observé de faibles différences significatives d'activité Na^+/K^+ -ATPasiqne branchiale entre les deux formes de la rivière Laval en milieu contrôlé. Par contre, la salinité maximale utilisée était de 20‰, bien en dessous de ce que les ombles de fontaine anadromes de la rivière Laval rencontrent lors de leur migration estivale (Curry et al., 2006). En utilisant la technique de micropuces, une étude de Boulet et collaborateurs (2012) a démontré de fortes différences de profils d'expression génique chez différents gènes exprimés au niveau des branchies entre les deux formes d'ombles de la rivière Laval. Cette étude a ainsi examiné l'expression génique avant la transition des anadromes en eau salée, afin de vérifier la possibilité d'un phénomène de pré-acclimatation reliée à des mécanismes d'anticipation (Boulet et al., 2012). Néanmoins, les gènes différemment exprimés entre les deux formes n'étaient pas reliés à l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase

branchiale, mais plutôt aux fonctions immunitaires. Ainsi, malgré ces avancées, des questionnements demeurent quant aux différences possibles d'acclimatation branchiale en milieu hypertonique entre les deux formes d'ombles de fontaine de la rivière Laval.

L'omble de fontaine représente une espèce d'importance économique majeure au Québec. Elle est particulièrement prisée pour la pêche sportive et une bonne partie de la production québécoise est dédiée à l'ensemencement (Morin, 2007). En raison du déclin observé des populations de saumons Atlantique, l'omble de fontaine anadrome fait face à un effort de pêche croissant. En effet, les pêcheurs sportifs se tournent de plus en plus vers l'omble de fontaine anadrome, une prise intéressante et combative (St-Laurent, 2008). Néanmoins, peu d'informations sont disponibles sur ces populations afin de mettre en place des mesures de gestion adéquates qui sont absentes pour le moment en milieu estuarien (St-Laurent, 2008). Une gestion adéquate des populations passe inévitablement par l'acquisition de connaissances des deux formes d'ombles de fontaine.

Ce projet vise à vérifier si la capacité d'acclimatation à des salinités comparables à celles retrouvées en milieu naturel est similaire entre des ombles de fontaine résidents et anadromes de la rivière Laval et tente de rallier la physiologie et la génétique, afin d'obtenir un portrait global de l'acclimatation branchiale en eau salée chez ces deux formes d'ombles. De façon plus spécifique, nous avons voulu tester si l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase branchiale ainsi que l'expression des isoformes *$\alpha 1a$* et *$\alpha 1b$* de la sous-unité catalytique de cette enzyme sont similaires chez les deux formes tant en eau douce qu'après transfert graduel en eau salée.

Objectifs spécifiques et hypothèses alternatives

Le premier objectif vise à vérifier les différences possibles dans l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase entre les formes (résidents – anadromes), en fonction du milieu (eau douce – eau de mer) et en fonction de la saison (fin printemps ou période de dévalaison en milieu naturel – en été – à la fin de l'été ou période de montaison en milieu naturel).

Le deuxième objectif vise à vérifier, à l'aide de la méthode d'expression génique en temps réel, si les isoformes de la Na^+/K^+ ATPase branchiale sont exprimés de la même façon entre les formes, en fonction du milieu et en fonction de la saison.

H₁ objectif 1 : activité Na^+/K^+ -ATPase significativement plus élevée en eau salée qu'en eau douce, chez les anadromes au printemps.

H₁ objectif 2 : diminution de l'expression de l'isoforme $\alpha 1a$ et augmentation de l'expression de l'isoforme $\alpha 1b$ chez les anadromes en eau salée, lors de la dévalaison.

H₂ objectif 2 : augmentation de l'expression de l'isoforme $\alpha 1b$ plus importante chez les anadromes par rapport aux résidents en eau salée.

CHAPITRE 1

CARACTÉRISATION DE LA FONCTION Na^+/K^+ -ATPASIQUE BRANCHIALE CHEZ DES OMBLES DE FONTAINE (*SALVELINUS FONTINALIS*) ANADROMES ET RÉSIDENTS DE LA RIVIÈRE LAVAL

1.1 Résumé

Les ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) anadromes et résidents de la rivière Laval (Côte-Nord, Québec) représentent deux populations génétiquement et physiologiquement distinctes, vivant en sympatrie. Afin de vérifier s'il existe des différences dans la capacité osmorégulatoire en eau salée entre les deux formes, des anadromes et des résidents ont été graduellement transférés en eau estuarienne de juin à août (augmentation de 2‰ par jour, salinité finale de 28‰). L'activité Na^+/K^+ -ATPasiqne branchiale et les niveaux de mRNA des deux isoformes de la sous-unité α de cette enzyme (*ala* and *alb*) ont été mesurés avant le transfert ainsi qu'après 3, 7, 14 et 60 jours suivants le transfert en eau salée. Les résultats ont montré une augmentation similaire de l'activité Na^+/K^+ -ATPasiqne branchiale après 14 jours (28‰) chez les deux formes ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'isoforme *alb* après 60 jours (28‰) et une diminution de l'expression *ala* après 14 jours (28‰). L'expression différentielle des deux isoformes en fonction de la salinité suggère une activité ou une régulation de transport différente reliée à l'absorption ou l'excrétion d'ions. Les résultats enzymatiques et génomiques suggèrent que les résidents de la rivière Laval auraient retenu une certaine capacité hypo-osmorégulatoire au niveau de cette enzyme lorsqu'exposés à l'eau salée durant l'été. Une plus grande perturbation de l'osmolalité plasmatique en eau salée chez les résidents comparativement aux anadromes ne semble pas s'expliquer par l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase branchiale. Des mesures enzymatique et/ou génique d'autres co-transporteurs branchiaux impliqués dans le transport ionique auraient pu expliquer cette différence entre résidents et anadromes.

1.2 Abstract

Anadromous and river-resident brook charr (*Salvelinus fontinalis*) from Laval river (Northern shore, Québec) represents two genetically and physiologically distinct populations, living in sympatry. To verify if there are differences between salt water osmoregulatory capacity of the two brook charr forms, anadromous and river-resident were gradually transferred in estuarine water from June to August (increase of 2‰ day⁻¹, final 28‰). Gill Na⁺/K⁺-ATPase activity and mRNA levels of the two Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit isoforms (*ala* and *alb*) were measured before, and after 3, 7, 14 and 60 days following saltwater transfer. The results showed similar up regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase activity at 28‰ in both forms, an up regulation of the *alb* isoform expression after 60 days and a down regulation of the *ala* isoform expression after 14 days (28‰). The differential expression of these isoforms according to salinity suggest that *ala* and *alb* may differ in transport activity or regulation related to ion uptake and secretion, respectively. These results suggest that river-resident have retained some hypo-osmoregulatory capacity at this enzyme level when exposed to seawater during summer. Greater perturbations of plasma osmolality in saltwater for river-resident compared to anadromous cannot be explained at the Na⁺/K⁺-ATPase level. Enzymatic and/or genomic expression of another gill co-transporters implied in ion transport may explain this difference between anadromous and river-resident.

1.3 Introduction

Anadromy, a specialized form of diadromy which implies trophic migration from fresh to salt water, represents an important osmoregulatory challenge for teleosts (Gross et al., 1988). Partial anadromy is commonly expressed among salmonids, with fish adopting a migratory life-history strategy or tactic (anadromous), while others will adopt a river-resident strategy or tactic (Curry et al., 2010; Jonsson and Jonsson, 1993; Thériault and Dodson, 2003; Morinville and Rasmussen, 2003). The main benefit of migration in salt water is the greatest abundance of food, conditions that will improve growth rate and fecundity (Thériault et al., 2007; Zidlewesky and Wilkie, 2013). Adoption of anadromy is complex and result from interactions between individual and environmental variables, interactions that are not fully understood (Hendry et al., 2004; McCormick, 2009; Curry et al., 2010). In brook charr (*Salvelinus fontinalis*) populations, anadromy life-history may be expressed when there is an access to estuarine water. However, anadromy is described as poorly developed for this species, with a short time migration, generally restricted to estuarine water (Curry et al., 2010; McCormick et al., 1985). Moreover, migration patterns vary widely across different river systems (Curry et al., 2010). Two general models exist: brook charr forms can live in the same environment and either be part of the same breeding pool or represent genetically and physiologically distinct populations (Boula et al., 2002; Curry et al., 2010; Thériault et al., 2007). In both general models, river-resident form can also express the anadromy behavior (Curry et al., 2010; Hendry et al., 2004). According to Curry et al. (2010), the anadromous form would be the ancestral trait in brook charr species, and river-resident form would have emerged from this migratory form. The osmoregulatory ability in hyper-osmotic environment can therefore have been retained by the resident-river form and migration to saltwater environment can be physiologically possible (Hendry et al., 2004).

In the Ste-Marguerite River, where the two forms are part of the same population, Morinville and Rasmussen (2003) demonstrated the relationship between metabolic costs and life-history tactic in juvenile brook charr. Expression of anadromous behavior was

linked to energetic limitations in fresh water, with higher oxygen consumption rates and lower growth efficiency for anadromous than resident fish. Morinville and Rasmussen (2008) also showed that the two forms of this river system had morphological differences because of their differences in habitat use, prior and during migration; anadromous fish have a more streamlined morphology than river-resident that better suits high velocity waters.

In the Laval river (Qc, Canada), river-resident and anadromous brook charr rather represent two physiologically and genetically distinct populations, living in sympatry and showing phenotypic divergence of morphology and seasonal differences in osmoregulatory physiology (Boula et al., 2002; Perry et al., 2005). At the end of spring, anadromous brook charr migrate downstream and stay in the Laval Bay for the summer facing a drastic salinity change, from 1 to 34‰ (Curry et al., 2006). Study on the field has shown differences in gill Na^+/K^+ -ATPase activity between anadromous and river-resident from the Laval River, with a higher enzyme activity during downstream migration of anadromous fish (Boula et al., 2002). During seawater transfer, anadromous fish increase their gill Na^+/K^+ -ATPase activity, and excrete excess salts against a concentration gradient (Marshall, 2002; McCormick, 2001). Recent studies have shown the presence of different isoforms of the catalytic subunit of this enzyme, *α1a* and *α1b*, both being differently expressed with salinity changes (Bystriansky et al., 2006; Flores and Schrimpton, 2012; McCormick et al., 2009; Richards et al., 2003).

To investigate whether anadromous and fresh water resident fish differ in their ability to up regulate Na^+/K^+ -ATPase activity and express those two forms of Na^+/K^+ -ATPase, specific and absolute enzyme activity and expression of the genes coding for the two isoforms were measured either in fresh or salt water from June to August.

1.4 Material and Methods

Fish collection and experimental design

The experimentation has been done at the ISMER aquaculture station in Pointe-au-Père, Québec (48°31'N; 68°29'W). Fish used for this study were descendants from a stock of anadromous and resident-river lineages, both originating from Laval River and maintained at the Station aquicole de l'ISMER. Fish from both forms were reared in freshwater under similar natural temperature and photoperiod conditions, in six tanks of 500 liters each. Families were identified with different fins cut, mixed randomly in tanks and fed daily until fulfilment. In May, when fish were 17 months -old, both anadromous and river-resident were transferred to salt water (salinity being increasing by 2‰ per day until 28‰). These fish were maintained at 28 ‰ until August. Samplings were done at day 0, before the transfer to saltwater, and after 3, 7, 14 and 60 days following transfer. Control fish from each family were maintained in fresh water during the whole experiment and sampled on the same days than those in salt water. Numbers of fish sampled for each group are shown in Table 1. For each sampling day, fish were anesthetized using MS222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, 0.12g L⁻¹), blood sample were taken by caudal puncture, centrifuged and plasma was immediately frozen at -80°C for further analyses. The second and gill arch were sampled and immediately frozen at -80°C for further analyses of Na⁺/K⁺-ATPase activity measurement and isoforms expression.

Na⁺-K⁺-ATPase activity

Gill Na⁺-K⁺-ATPase activity was measured according to the micromethod described by McCormick (1993). Gill filaments (~10 mg) were cut from the gill arch on ice and homogenized in SEI buffer (pH = 7.1, 0.3mol L⁻¹ sucrose, 0.02 mol L⁻¹ Na₂EDTA, 0.1 mol L⁻¹ Imidazole, triton-100x 0.1%). Homogenates were centrifuged at 5000g (4°C) for one minute to collect supernatant. For each sample, 10 µl of supernatant was assayed in

Table 1. Number of fish sampled in each group

Days	Environment	Anadromous	River-resident
0	Freshwater	24	28
	Saltwater	24	29
3	Freshwater	13	14
	Saltwater	13	14
7	Freshwater	47	53
	Saltwater	47	49
14	Freshwater	14	14
	Saltwater	14	13
60	Freshwater	12	14
	Saltwater	16	16

presence or absence of ouabain (0.58mmol L^{-1}), a specific inhibitor of Na^+/K^+ -ATPase. Each assay was run in triplicate with and without ouabain. The Na^+/K^+ -ATPase activity was determined spectrophotometrically and read at a wavelength of 405 nm in 96 wells microplate with a Vmax Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California). Total protein concentration from each homogenate was measured with the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine albumin as standard. The absorbance was measured with a Vmax Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California).

Na⁺/K⁺-ATPase isoform expression

Total RNA was extracted from approximately 10 mg of gill filaments using a RNeasy Plus Mini kit[®] (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada) following manufacturer's instructions. Isolated RNA was quantified using a spectrophotometer NanoVue (NanoDrop ND-1000 spectrophotometer v3.3.0, NanoDrop Technologies Inc., DE, USA). RNA samples were run on an agarose gel (2%, with $500\ \mu\text{g mL}^{-1}$ Ethidium bromide marker) to verify both RNA integrity and quantity (Figure 2). First strand cDNA was obtained from 1 μg RNA by using the QuantiTect Reverse Transcription Kit[®] (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer protocol, and the quantity obtained was evaluated using a NanoVue. cDNA samples were stored at -20°C until quantitative real-time polymerase chain reaction analyses (RT-qPCR).

The two target genes were the two isoforms of Na^+/K^+ -ATPase, *ala* and *alb* genes. Because the mRNA sequences for the *ala* and *alb* genes were not available for *Salvelinus fontinalis* on GenBank[®] database, non-specific primers were designed from *Oncorhynchus mykiss* sequences (GenBank ID: AY319391 and AY319390 respectively). To verify that the primers designed for *ala* and *alb* genes amplified the target genes, brook charr gill cDNA was amplified by classic PCR with Amplitaq Gold Master Mix (Applied Biosystems, Foster city, CA) on a MyIQ Single Color Real-Time PCR Detection system

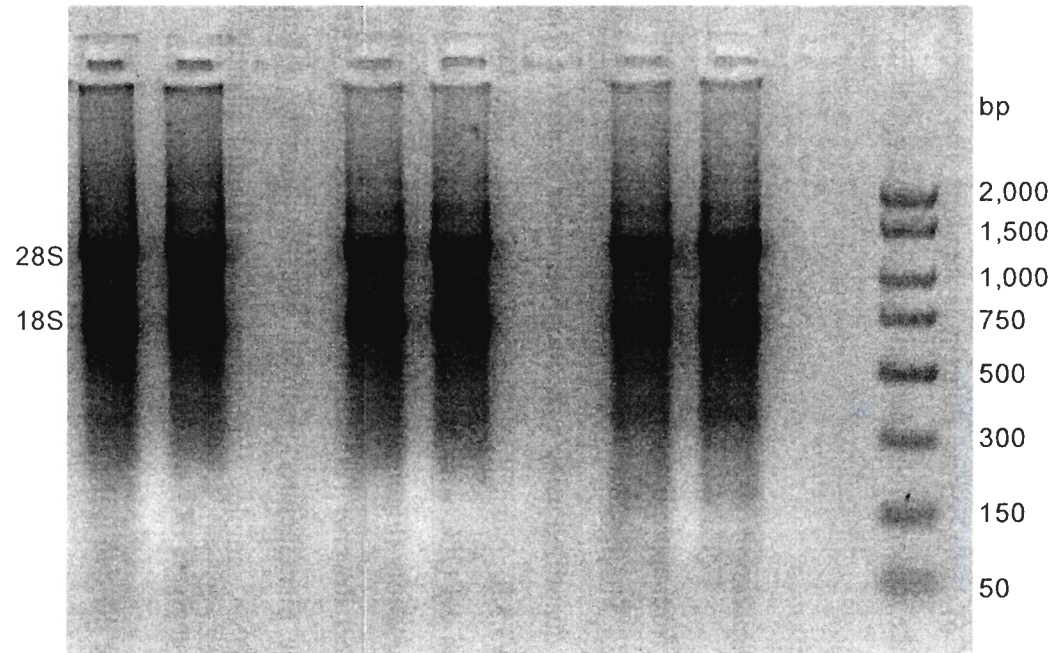


Figure 2. Agarose gel (2%) to verify RNA integrity and quantity. From left to right, three RNA samples in duplicates, and PCR marker, 50-2,000bp (Sigma-Aldrich Inc.).

(Bio-Rad, ON, Canada). Thermal cycling conditions were as follow: 10 minutes at 95°C, followed by 40 repeats of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60 °C and 1 minute at 72°C, followed by 7 minutes at 72°C. The PCR products ranging from 151 to 194 bp were run on an agarose gel (2%) to check for the presence of a single product (Figure 3). Nucleotides were isolated using the Ultra-Step Terminator removal Kit (Eazy Nucleic Isolation; Ezna, Bio-Tek Omega) and sequenced in both senses using the Ultra-Step[®] Dye Terminator v3 chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems-Hitachi). To verify that sequences amplified were from the selected genes, homology percentages were verified using Genbank nucleotide BLAST Software. Percentages of 96% and 95% of maximal identities were obtained respectively between our *ala* and *alb* sequences and those of *O. mykiss*.

Three housekeeping genes were used, *18S*, *Beta actin* and *GAPDH* genes, to normalize expression of the target genes. Sequences of *Beta actin* and *18S* genes for *S. fontinalis* were obtained using similar procedures as described above (Marie Vagner, personal communication). Non-specific primers for *GAPDH* were designed from *Salmo trutta* sequence on Genbank Database (Genbank ID: EF406273). The same procedure with Amplitaq Gold and sequencing were applied to obtain amplification of this housekeeping gene. A maximal identity value of 97% was obtained between our *GAPDH* sequence and that for *S. trutta*.

Specific primers and fluorescent Taqman minor groove binder (MGB) probes were designed with Primer Express[®] software Version 3.0 (Applied Biosystems) and are listed in Table 2.

Quantitative RT-PCR were performed using a 7900 HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Each sample of cDNA was run in triplicate for each gene and each well contained 2 µl of cDNA, 0.5 µl of TaqMan Gene Expression Assay Mix (primers and probe) and 5 µl of TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems). Thermal cycling conditions were as follow: 20 seconds at 95°C followed by 50 repeats of 1 s at 95°C, and 20 seconds at 60°C. Data were imported in ExpressionSuite Software Version

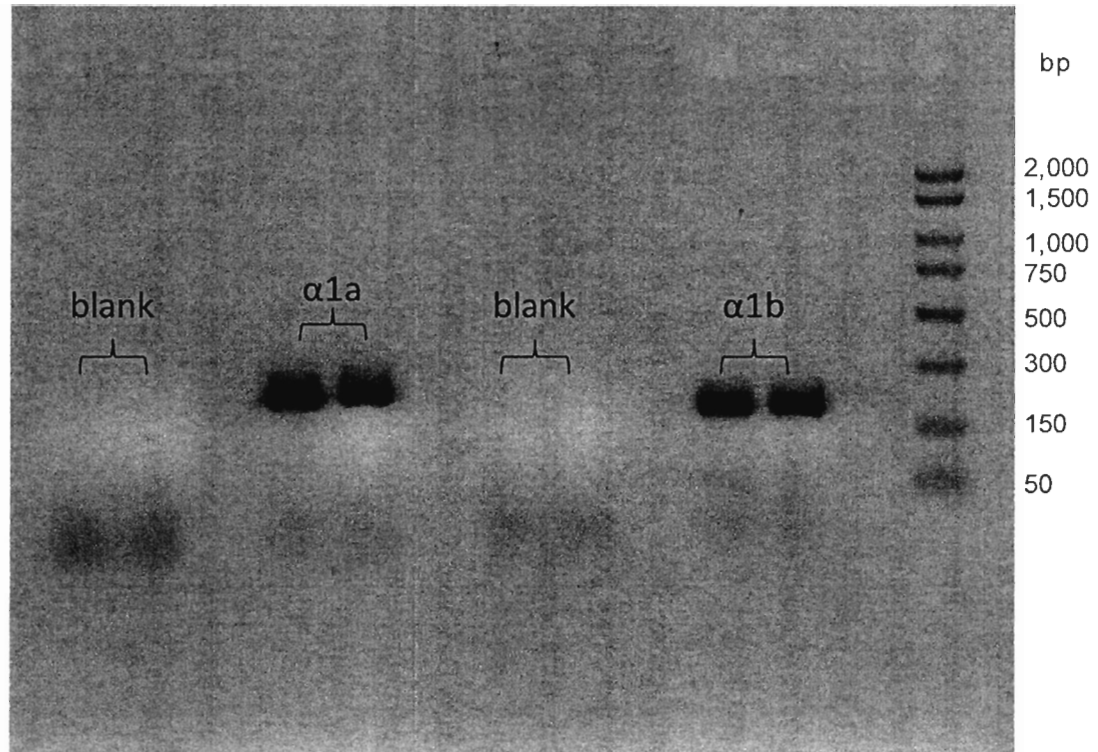


Figure 3. Agarose gel (2%) to verify cDNA in duplicates amplified with Amplitaq Gold Master Mix. Blank contained sterile water instead of cDNA sample.

Table 2. Endogenous and target genes sequences, specific Taqman primers and probes (5'→3') and PCR efficiencies

Gene	Sequence Product length (bp)	Probe: labeled FAM-5' and 3'-MGB Forward primer Reverse primer	Dilutions curve slope
<i>18S</i>	AAATCCTTTAACGAGGATCC ATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA GCAGCCGC (51bp)	TGCCAGCAGCCGC GATCCATTGGAGGGCAAGTCT GATACGCTATTGGAGCTGGAATT AC	-3.2765
<i>Beta actin</i>	GCTGTCTTCCCCTCCATCGTC GGTCGTCCCAGGCATCAGGGAGTG ATGGTTGGGATGGGCCAGAAAGAC AGCTACGTGGGAGA (83bp)	ATGGTTGGGATGGGC GGTCGTCCCAGGCATCAG CGTCTCCCACGTAGCTGTCTT	-3.3515
<i>GAPDH</i>	CCAGCTTGCCACCCTCAGCC TTGACCTCACCGTGGAACGTCC GTGGGTGGAGTCATACTTGAACA TGTAGACCATGTAGTCCAGGTCG ATGAAGGGGTCGTTGATGGCCAC AATCTCAACTCCCTTCTTGAGTG GAATGCAGCACGGGTCACCAGAC GCCCGATACGGC (171 bp)	CATGTAGACCATGTAGTCCAG CCGTGGGTGGAGTCATACTTG TCAACGACCCCTTCATCGA	Not used for Taqman analyses

<i>a1a</i>	TTTTCTCGCCAGCGGCTGCA AGGTGGACAACCTCTTCACTCACT GGTGAATCTGAGCCCCAAACTCG TAGTCCCGATTTCTCCAATGACAA CCCCCTGGAAACCAGGAACATCG CCTTCTTCTCTACCAACTGTGTTG AAGGAACTGCCAGAGGTATCGTC ATCAACACTGGTGACCACACTAT CATGGGTCGAA (194bp)	CCCCCTGGAAACC GTCCCGATTTCTCCAATGACA TGGTAGAGAAGAAGGCGATGTTC	-3.033
------------	---	---	--------

<i>a1b</i>	CATCCTTGCACTGCTGTCCT AGGACTCTCAATCCCAGTGGTTTG TAAAGAGAATATACTTGCTCCTTA TCCTGAGAAACGCCACCTGTTAC ACGTTTACACTTCTCTCTCACTTT CTCGACGTCTCGAGTCACCCCGA AGCTCCCTCCCCA (151bp)	AGAATATACTTGCTCCTTATC GGACTCTCAATCCCAGTGGTTT GTGTAACAGGTGGCGTTTCTCA	-3.35
------------	---	---	-------

1.0.1 (Life technologies). Since the expression of *GAPDH* gene varied greatly among samples, it has not been used for the calculation of relative expression. Moreover, ExpressionSuite Software gives a score for the endogenous controls, which is a measure of how the Ct values for each endogenous control vary compared to those from all the other genes chosen as endogenous controls. The lower the score is, the more stable the expression of this gene is compared to all the other genes chosen as endogenous controls. The score obtained when *18S*, *Beta actin*, and *GAPDH* genes were combined was 9.41, while it was 4.6, when only *18S* and *Beta actin* were considered as endogenous controls. This last combination was then used.

Determination of the relative expression of each gene, in each group (x), was determined according to Livak and Schmittgen (2001) with the anadromous, day 0, freshwater group used as the calibrator:

$$\text{Amount} = 2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{((C_{t_{\text{target}}}-C_{t_{\text{reference}}})_{\text{group x}} - (C_{t_{\text{target}}}-C_{t_{\text{reference}}})_{\text{calibrator}})}$$

where Ct is the number of cycles where the fluorescence emission reaches a fixed threshold and $C_{t_{\text{reference}}}$ represents the geometric mean of the Ct for the two reference genes. To use this equation, RT-qPCR efficiencies were verified using a standard curve with five cDNA dilutions (from 100 ng to 10 pg). RT-qPCR was performed on these cDNA dilutions for each Taqman primers and probe using the same protocol described before. The Ct values were plot for each dilution. A slope of approximately -3.3 is equivalent to a 100% reaction efficiency and allows direct comparison of amplification plots according to the $\Delta\Delta C_t$ method. An arbitrary Ct value of 41 was attributed for samples when expression was no detectable.

Statistical analysis

Normality and homoscedasticity of variance were verified with Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. Data were analyzed using three-way analysis of variance (ANOVA) tests with days of sampling (0, 3, 7, 14 and 60), form (resident and anadromous) and environment (fresh water and salt water) used as factors. When a significant effect was

found, a posteriori HSD Tuckey test for unequal sample size was performed. If homoscedasticity was not obtained, LSD test was run on ranks. For all analyses, $\alpha = 0.05$. These statistical analyses were done using STATISTICA 7.0.

1.5 Results

Na⁺/K⁺-ATPase activity and protein concentrations

Protein concentrations did not differ among days of sampling ($F_{[4]} = 0.399$; $p > 0.05$), form ($F_{[1]} = 1.355$; $p > 0.05$), or environment ($F_{[1]} = 0.002$; $p > 0.05$), with a mean valor of 0.072 ± 0.016 mg protein mg tissu⁻¹ (Table 3). The absolute enzyme activity did not differ between anadromous and river-resident forms at any time of the experiment ($F_{[1]} = 0.807$; $p > 0.05$, but there was a significant combined effect of environment and time of sampling (environment X time of sampling: $F_{[4]} = 12.965$; $p < 0.001$, Figure 4). On day 14, enzyme activity significantly raised both in saltwater (28‰) and freshwater groups. After 60 days, the Na⁺/K⁺-ATPase activity was significantly higher in salt- compared to fresh water. In fresh water, activity at day 60 was similar to the activity measured on day 0 (Figure 4). The same pattern as for absolute activity was observed for the specific enzyme activity, with a combined significant effect of environment and time of sampling (environment X time of sampling: $F_{[4]} = 8.169$, $p < 0.001$). In contrast with the results obtained with specific activity, absolute activity was significantly higher at day 60 than at day 14 in salt water (Figures 4 and 5).

Table 3. Total homogenate protein concentration in each group (mean \pm SD) (mg protein mg tissu-1)

Days	Environment	Anadromous	River-resident
0	Freshwater	0.079 \pm 0.009	0.074 \pm 0.025
	Saltwater	0.073 \pm 0.014	0.065 \pm 0.016
3	Freshwater	0.078 \pm 0.004	0.066 \pm 0.007
	Saltwater	0.071 \pm 0.016	0.066 \pm 0.013
7	Freshwater	0.069 \pm 0.012	0.076 \pm 0.016
	Saltwater	0.069 \pm 0.016	0.070 \pm 0.021
14	Freshwater	0.070 \pm 0.026	0.071 \pm 0.012
	Saltwater	0.074 \pm 0.012	0.068 \pm 0.012
60	Freshwater	0.070 \pm 0.015	0.065 \pm 0.020
	Saltwater	0.079 \pm 0.015	0.085 \pm 0.014

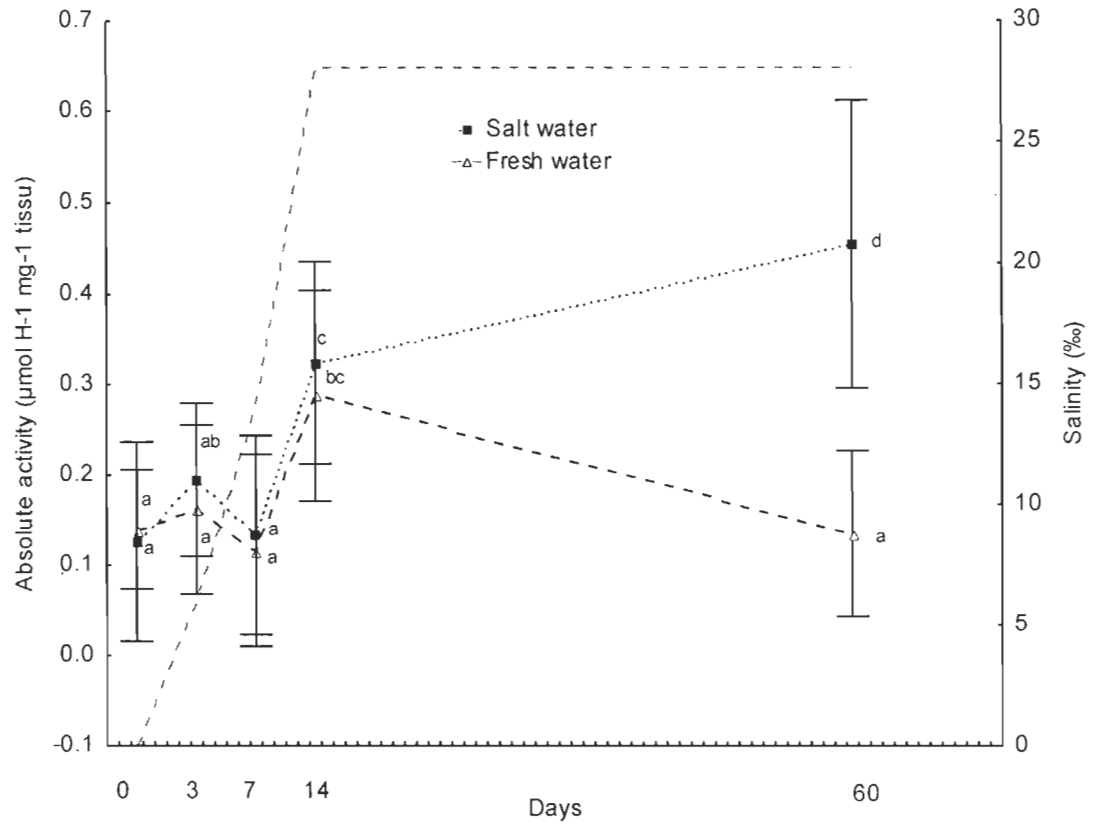


Figure 4. Absolute Na⁺/K⁺-ATPase activity (mean ± SD) during summer in both fresh and salt water. Data for anadromous and river-resident fish were pooled. Different letters indicate significant difference. The grey dotted line indicates salinity in the saltwater tank.

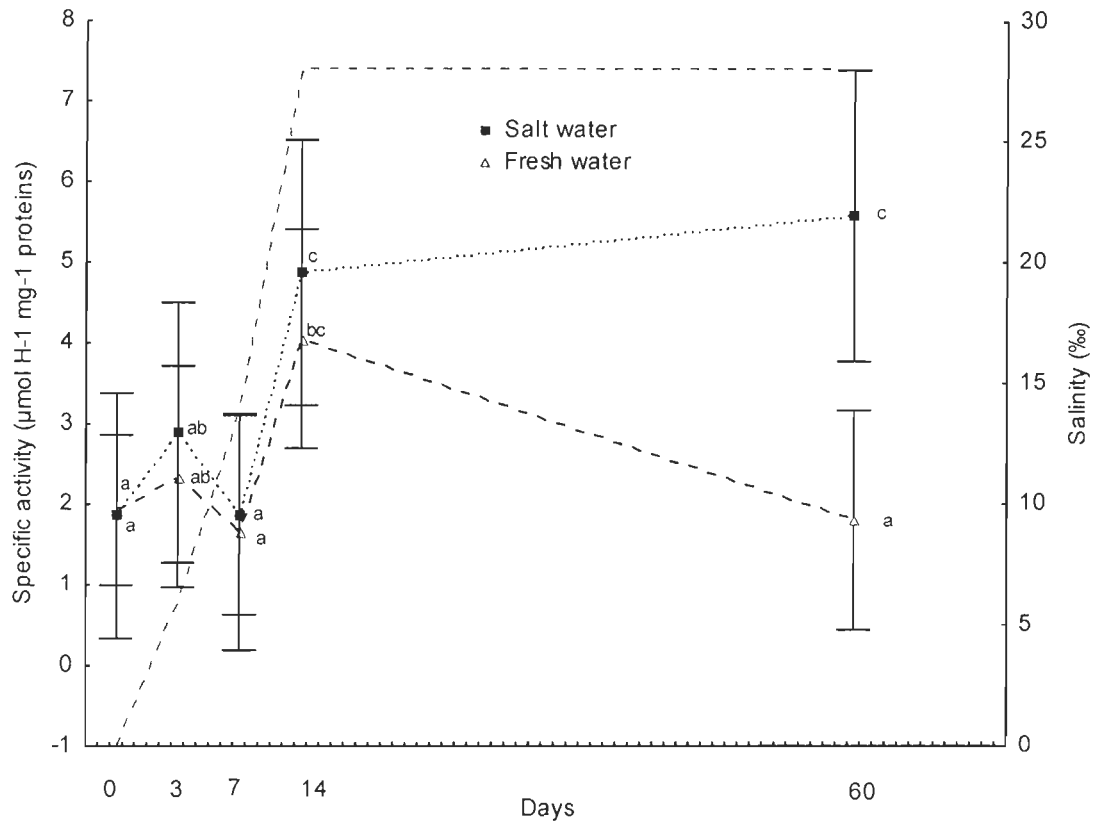


Figure 5. Specific Na⁺/K⁺-ATPase activity (mean ± SD) during summer in fresh and salt water. Data for anadromous and river-resident fish were pooled. Different letters indicate significant differences. The grey dotted line indicates salinity in the saltwater tank.

Expression of Na⁺/K⁺-ATPase isoforms

As for the enzyme activity, the relative expression of the two target genes (*ala* and *alb*) did not differ between forms at any time of the experiment ($F_{[1]} = 0.0019$, $p > 0.05$ for *ala*; $F_{[1]} = 0.0845$, $p > 0.05$ for *alb*). However, there were significant changes in relative expression of both Na⁺/K⁺-ATPase mRNA isoforms over time and between environments (environment X time of sampling: $F_{[4]} = 3.0908$, $p = 0.018$ for *ala*; $F_{[4]} = 2.5999$, $p = 0.04$ for *alb*). After 14 days, when salinity reached 28‰, the *ala* isoform relative expression was significantly higher in fresh water compared to salt water (Figure 6). The relative expression of the *ala* isoform in the saltwater group was under-expressed while the relative expression of this isoform was overexpressed in the freshwater group after 14 days compared to the calibrator group (Figure 6). The relative expression of the isoform *alb* did not change significantly until the end of the experiment. On day 60, relative expression was significantly lower in fresh than in salt water (Figure 7). At the end of the experiment, an under-expression of the isoform *alb* in fresh water and an over-expression of this isoform in salt water are observed.

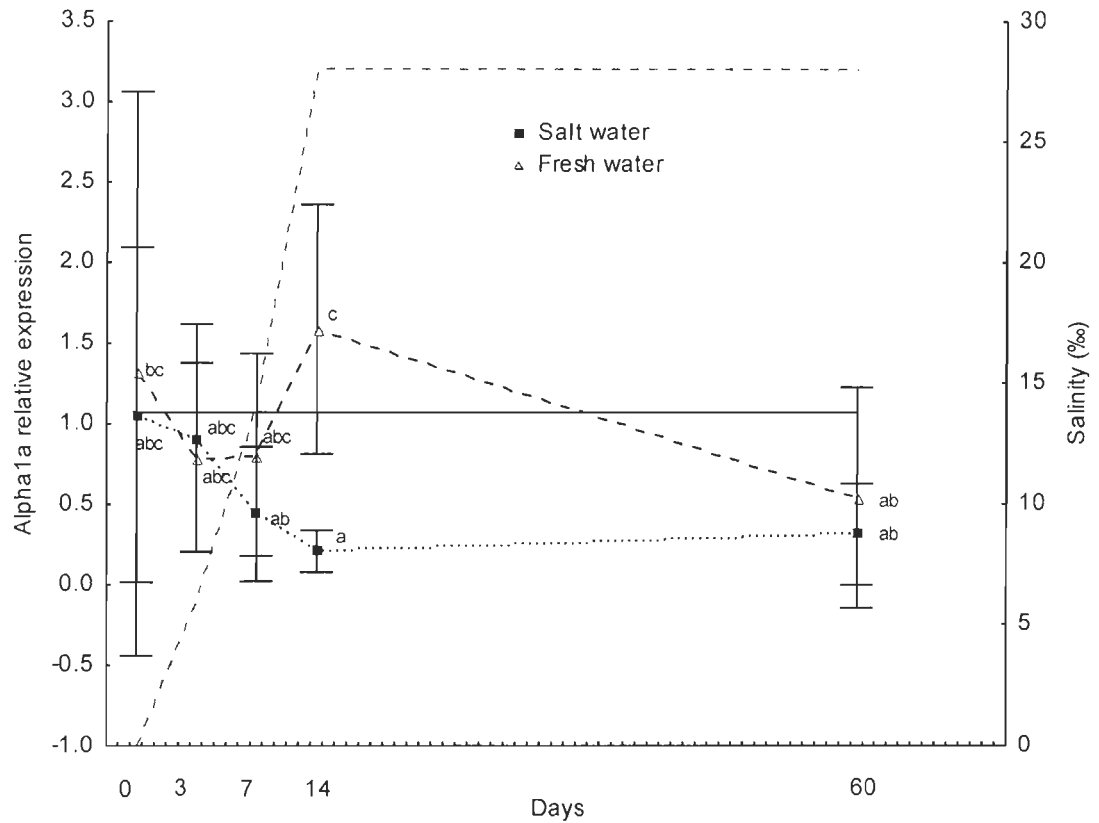


Figure 6. Relative changes in expression of $\alpha 1a$ mRNA isoform using the anadromous in fresh water at day 0 group as the reference group (horizontal line) (mean \pm SD). Data for anadromous and river-resident fish were pooled. Different letters indicate significant differences. The grey dotted line indicates salinity in the saltwater tank.

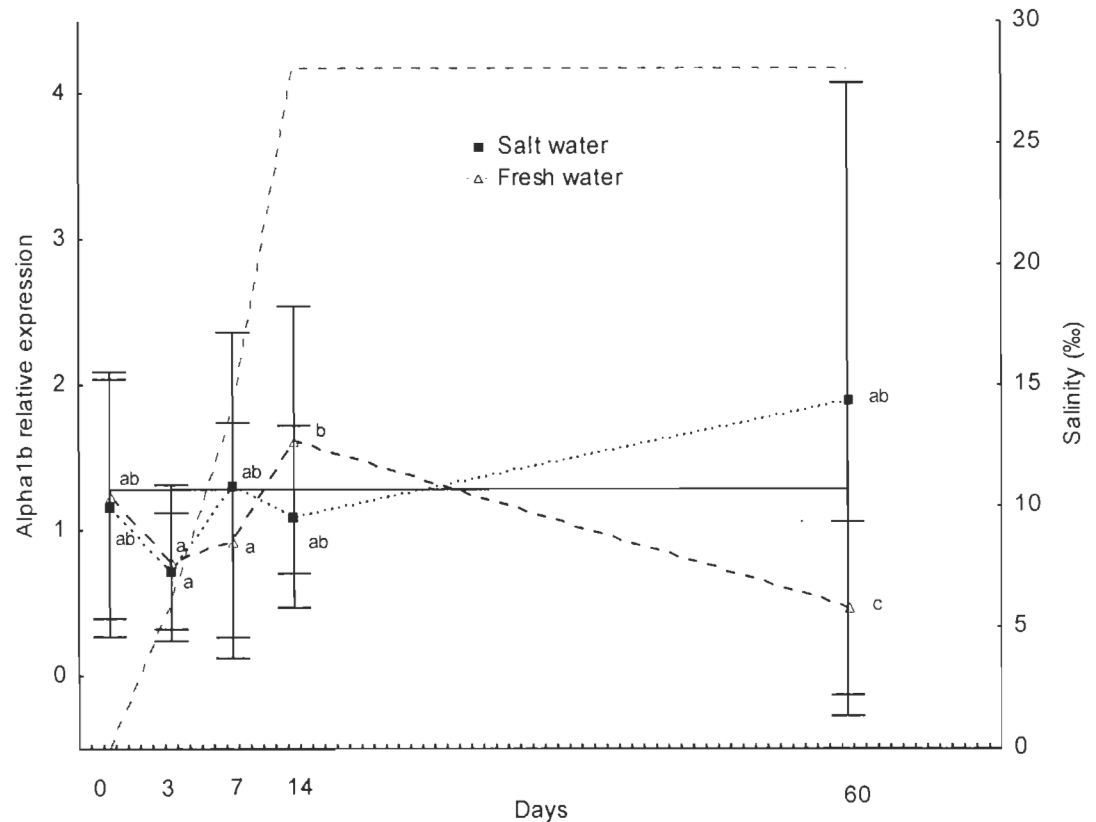


Figure 7. Relative changes in expression of $\alpha 1b$ mRNA isoform using the anadromous in fresh water at day 0 group as the reference group (horizontal line) (mean \pm SD). Data for anadromous and river-resident fish were pooled. Different letters indicate significant differences. The grey dotted line indicates salinity in the saltwater tank.

1.6 Discussion

The results presented in this study provide evidence that anadromous and river-resident charr from Laval River do not differ in their ability to regulate gill Na^+/K^+ -ATPase activity (specific and absolute) and to express α -subunit specific isoforms of this enzyme with a gradual salinity increase to 28‰. Even if the two forms of Laval River charr are genetically distinct (Boula et al., 2002; Perry et al., 2005) and have shown differences in Na^+/K^+ -ATPase activity on field study (Boula et al., 2002), no difference was observed either in Na^+/K^+ -ATPase activity or in the relative expression of the two Na^+/K^+ -ATPase

isoforms between the two forms in response to changes in salinity. Similar gill Na^+/K^+ -ATPase activity and isoform expression responses may express the persistence of anadromous behavior in brook charr, which would be the ancestral form according to Curry and colleagues (2010). Therefore, river-resident can have retained some osmoregulatory ability at the Na^+/K^+ -ATPase level in hyper-osmotic environment. In our study, when salinity reached 28‰, there was a sharp increase in gill Na^+/K^+ -ATPase activity in both forms. Plasma osmolality was significantly higher in river-resident than in anadromous fish at 28‰ (Lemieux, personal comm., 2013) despite a similar Na^+/K^+ -ATPase activity. This difference in plasma osmolality suggest difficulties acclimating to sea water with greater perturbations in plasma ion levels for the resident charr of Laval river in salt water. However, at the end of the experiment, plasma osmolality has returned to control level for both forms (Lemieux, personal comm., 2013), suggesting an efficient ion excretion system. While gill Na^+/K^+ -ATPase is an important enzyme in both salt and fresh water by creating the ionic gradient in chloride cell, this gradient is used by co-transporters and ions channels to excrete or secrete ions (Evans et al., 2005; McCormick, 2001). Nielsen and collaborators (2007) has shown an up regulation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ mRNA levels following seawater transfer of Atlantic salmon, a cotransporter implied in ion excretion in salt water, with landlocked salmon showing a time delay in up regulation of this cotransporter compared to anadromous Atlantic salmon.

Increase in Na^+/K^+ -ATPase activity in freshwater group after 14 days seems not related to plasma ions perturbations since this plasma osmolality stayed stable in this environment for the whole experiment (Lemieux, personal comm., 2013). After 60 days in saltwater, the enzyme activity was still high in the saltwater group, while a return to control level of Na^+/K^+ -ATPase activity in fresh water after 60 days was observed. The increase in enzyme activity in fresh water after 14 days may be caused by a different factor, such as stress or immune response.

Correlation between increase of gill Na^+/K^+ -ATPase activity and development of seawater tolerance has often been demonstrated in most euryhaline fish (Evans et al., 2005;

Marshall, 2002; McCormick, 2001). In a study of Bystriansky et al. (2006), an increase in gill Na^+/K^+ -ATPase enzyme activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*), rainbow trout, and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) after a 32‰ saltwater transfer was observed, with a threefold higher enzyme activity in Atlantic salmon, which may be related to the higher salinity tolerance of this species compared to rainbow trout and Arctic charr. In contrast, we found no significant difference in the enzyme activity between anadromous and freshwater resident brook charr. Several studies demonstrated a high survival rate in resident trout after a seawater transfer in spring (brook charr, McCormick et al., 1985; brown trout, Tanguy et al., 1995), which is the period with the highest hypo-osmoregulatory capacity (Claireaux and Audet, 2000). Differences in gill Na^+/K^+ -ATPase responses in salt water might have been observed between anadromous and resident forms if the increase in salinity was performed on a shorter period of time. Hiroi and McCormick (2007) showed an increase in survival and seawater acclimation with a progressive saltwater transfer to 30‰ with an increase of 10‰ per week compared to a direct transfer to 30‰ in non-anadromous brook charr. Gill Na^+/K^+ -ATPase activity increased in both direct and progressive saltwater transfer, but gradual transfer group presented a better survival rate and stable plasma ions concentrations compared to the direct transfer group (Hiroi and McCormick, 2007).

Consistent with the findings in rainbow trout (Richards et al., 2003), Atlantic salmon and Arctic charr (Bystriansky et al., 2006), we isolated two different isoforms of gill α -subunit Na^+/K^+ -ATPase in brook charr, differently expressed with salinity. As for the enzymatic activity, anadromous and river-resident showed similar patterns of Na^+/K^+ -ATPase isoforms expressions. A study of Bystriansky and collaborators (2007) have shown an incapacity to increase Na^+/K^+ -ATPase activity and expression of the *alb* isoform in landlocked Arctic charr population which leads to an incapacity to regulate plasma osmolality resulting in high mortalities after a saltwater transfer (Bystriansky et al., 2007). In our study, it seems that river-resident from Laval River have the same response than anadromous fish; increasing expression of the *alb* isoform in hyper-osmotic environment compared to the freshwater group. Moreover, a significant lower expression of *ala* isoform

was observed after 14 days in salt compared to freshwater group. This isoform expression shift suggests different kinetic properties of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit isoforms in salmonid gills as described in other studies; these isoforms may differ in transport activity or regulation related to ion uptake and secretion, respectively (Bystriansky et al., 2006; Flores and Schrimpton, 2012; McCormick et al., 2009; Richards et al., 2003). Pagliarani and colleagues (1991) reported that the Km of gill ATPase activity for rainbow trout was lower for sodium and potassium ions in fresh water compared to salt water. Nevertheless, further studies are necessary to establish the specific roles and relative importance of *α 1a* and *α 1b* in salmonids ion regulation.

The significant increase observed in mRNA levels of *α 1b* isoform in saltwater group is only seen after 60 days. On the other side, the study of Bystriansky and colleagues (2006), showed an increase in mRNA levels of *α 1b* isoform in gills of Arctic charr, rainbow trout and Atlantic salmon after 1, 2 and 4 days, respectively, following a direct transfer to 32‰ and an increase in Na⁺/K⁺-ATPase activity after 10 days following this transfer. Also, the rise in enzyme activity after 14 days in salt water seems not related to a specific isoform, since none of them is up regulated before 14 days. However, changes at the transcriptional level and rise in enzyme activity may not happened at the same exact moment, time responses may not be the same (Nikinmaa et Rytönen, 2012). Post-transcriptional mechanisms have been shown to modulate gill Na⁺/K⁺-ATPase activity in brown trout (*Salmo trutta*) (Tjomsmark and Madsen, 2001), and could explain an elevated enzyme activity, despite a decrease or absence of response in corresponding α -subunit protein and mRNA levels.

After 14 days, there was an up regulation of the *α 1a* isoform in the freshwater group, which also corresponds to the rise in enzyme activity. This suggests that, in fresh water, this rise in enzyme activity may be majoritary explained by an up-regulation of mRNA level of this specific isoform. This rise in enzyme activity may also have been caused by handling stress, which is accompanied by an increase in plasma cortisol, the principal stress

hormone in teleosts (Evans et al., 2005). Cortisol has been shown to increase Na^+/K^+ -ATPase activity (McCormick, 2001). However, cortisol may also have caused the rise in Na^+/K^+ -ATPase activity in saltwater group.

In conclusion, this study demonstrated similar pattern of transport enzymatic responses to a gradual transfer in salt water (28‰), both in anadromous and river-resident forms from Laval River. The river-resident form seem to have retained the plasticity to respond when challenged with salt water, as judged by their ability to up regulate Na^+/K^+ -ATPase activity and adjusting level expressions of *α1a* and *α1b* isoforms in relation to external salinity, in summer. However, river-resident experienced greater ions perturbations, which cannot be explained by differences in Na^+/K^+ -ATPase activity or specific isoform expression. Gill osmoregulation is a complex phenomenon including morphological and abundance changes accompanied by co-transporters switches in chloride cells, and implies endocrinal control. In order to understand what limits the seawater acclimation, it is important to take into account numerous physiological and genetical analyses.

CHAPITRE 2

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans le but d'obtenir un portrait de l'acclimatation branchiale à une salinité retrouvée dans le milieu naturel, cette étude combine pour la première fois des mesures d'activité Na^+/K^+ -ATPase branchiale aux mesures d'expression génique des isoformes *α1a* et *α1b* de la sous-unité alpha de cette même enzyme, chez des ombles de fontaine anadromes et résidents âgés de 17 mois de la rivière Laval. Les objectifs de l'étude étaient de vérifier s'il existe des différences entre les ombles anadromes et résidents de la rivière Laval au niveau de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase et de ses isoformes, lors d'un transfert graduel en eau salée (28‰), en fonction de la saison, tout en gardant un groupe contrôle en eau douce. La première hypothèse émise stipulait une augmentation plus prononcée de l'activité Na^+/K^+ -ATPase chez les anadromes comparativement aux résidents, au moment de la période de dévalaison, en eau salée. La deuxième hypothèse émise stipulait une augmentation de l'expression de l'isoforme *α1b* et une diminution de l'isoforme *α1a* lors du transfert en eau salée, au moment de la dévalaison, avec une augmentation de l'isoforme *α1b* plus prononcée chez les anadromes comparativement aux résidents. Afin de tester ces hypothèses, des mesures d'activités enzymatiques ont été effectuées ainsi que des mesures relatives d'expression génique à l'aide de PCR quantitatives en temps réel.

Les résultats obtenus infirment les hypothèses de départ, puisque des réponses enzymatique et transcriptionnelles semblables ont été observées entre résidents et anadromes de la rivière Laval en eau douce et en eau salée. Certaines études ont également suggéré la caractère persistant de l'anadromie chez l'omble de fontaine (Curry et al., 2010; Hiroi et McCormick, 2007). En étudiant les patrons de migration, les statuts physiologique et osmorégulateur, ainsi que la structure génétique des populations d'omble de fontaine de trois rivières de l'Est du Canada, Curry et collaborateurs (2010) ont suggéré la théorie de l'ancêtre anadrome comme celle étant la plus plausible. Malgré le fait que les populations anadrome et résidente de la rivière Laval sont considérées comme deux populations

distinctes, les ombles 1+ analysés lors de cette étude montrent des caractéristique Na^+/K^+ -ATPasique branchiales similaires en milieu contrôlé. Boula et collaborateurs (2002) ont démontré une activité Na^+/K^+ -ATPasique branchiale plus élevée chez les anadromes comparativement aux résidents de ce même plan d'eau au moment de la dévalaison, mais l'étude était effectuée sur le terrain. Le milieu contrôlé dans lequel notre étude s'est déroulée permet ainsi d'éliminer les variations des facteurs environnementaux pouvant différer sur le terrain. Également, nos résultats vont dans le même sens que les résultats d'expression génique obtenus par Boulet et collaborateurs (2012) à l'aide de la technique des biopuces. En effet, les gènes différemment exprimés au niveau des branchies entre les deux formes de la rivière Laval, avant la première transition en eau salée n'étaient pas ceux reliés à l'activité de la Na^+/K^+ -ATPasique branchiale, mais plutôt des gènes impliqués dans l'apoptose et dans la différenciation des tissus (Boulet et al., 2012). Par contre, les données de biopuces pour ces mêmes gènes n'ont pas été mesurés après un transfert en eau salée.

De façon générale, une augmentation de l'activité Na^+/K^+ -ATPasique branchiale est attendue lorsqu'un poisson passe d'un milieu d'eau douce à un milieu d'eau salée afin de faire face au changement drastique de salinité (Evans et al., 2005; Marshall, 2002; McCormick, 2001). L'augmentation de l'activité de cette enzyme est en effet corrélée au processus de smoltification, et est considérée comme un important facteur garant d'une acclimatation réussie. Les augmentations des activités Na^+/K^+ -ATPasique spécifiques et absolues pour le groupe en eau salée observées dans cette étude vont dans ce sens, avec une activité significativement plus élevée à 28‰, après 14 et 60 jours de transfert en eau salée. L'augmentation des activités Na^+/K^+ -ATPasique spécifiques et absolues dans le groupe contrôle au jour 14 ne sont pas liées à des changements ioniques dans le plasma puisque ce dernier paramètre demeure stable pour le groupe contrôle (Lemieux, communication personnelle, 2013). Un autre facteur pouvant influencer l'analyse des résultats est l'effet du stress de manipulation sur l'activité Na^+/K^+ -ATPasique, le cortisol pouvant augmenter l'activité enzymatique de cette dernière (Evans et al., 2005). Les quantités de plasma étant limitées, le dosage du cortisol n'a pu être effectué, ce qui ne nous permet pas d'avoir un

portrait du niveau de stress entraîné par les manipulations. Par contre, le stress de manipulation et le stress induit par l'augmentation de salinité n'auraient pu être distingués.

Les différences d'osmolalité plasmatique entre les formes anadrome et résidente observées par Andrée-Anne Lemieux (communication personnelle, 2013) ne semblent donc pas se refléter au niveau de l'activité enzymatique de la Na^+/K^+ -ATPase, ni même au niveau de l'expression des deux isoformes spécifiques de cette enzyme. Bastien (2010) a également travaillé en milieu contrôlé en transférant graduellement des ombles anadromes et résidents de la rivière Laval à une salinité de 20‰ et a observé une intensité de réponse de l'osmolalité plasmatique plus élevée chez les résidents que chez les anadromes. Par contre, cette même étude a démontré une activité Na^+/K^+ -ATPasique branchiale plus élevée chez les anadromes, comparativement aux individus résidents (Bastien, 2010). La salinité maximale utilisée ainsi que les jours d'échantillonnage n'étant pas les mêmes, il se peut que des différences auraient pu être observées à différents intervalles de temps.

Tel que mentionné précédemment, la Na^+/K^+ -ATPase est une enzyme clé dans les transports ioniques au niveau baso-latéral des cellules à chlorure. Néanmoins, elle fonctionne en adéquation avec plusieurs co-transporteurs afin d'excréter ou absorber les ions selon le milieu extérieur (Evans et al., 2005; McCormick, 2001). Le transfert d'un milieu d'eau douce à un milieu d'eau salée comporte un grand nombre d'ajustements physiologiques inter-reliés chez les salmonidés, impliquant entre autres des changements de conformation et d'abondance des cellules à chlorure, en plus de l'augmentation de l'activité Na^+/K^+ -ATPasique (Evans et al., 2005; McCormick, 2001; McCormick et al., 2009). En eau salée, les jonctions entre les cellules se détendent afin de permettre l'excrétion des ions, et les co-transporteurs impliqués ne sont pas les mêmes en fonction du milieu (Evans et al., 2005; McCormick, 2001). Une étude de Nielsen et collaborateurs (2007) a démontré, chez le saumon Atlantique, une augmentation des abondances de protéines du co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ des cellules à chlorures après un transfert en eau salée, en plus de l'augmentation des niveau d'ARNm de l'isoforme *a1b* de la Na^+/K^+ -ATPase. Ce co-transporteur impliqué dans l'excrétion ionique pourrait aussi être différemment exprimé.

Tipsmark et collaborateurs (2002) ont également démontré, à l'aide de techniques d'anticorps spécifiques, une augmentation des abondances de protéines de la Na^+/K^+ -ATPase et de la $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ branchiales lors d'un transfert en eau salée chez la truite brune et le saumon Atlantique. Ainsi, malgré l'importance de la Na^+/K^+ -ATPase dans les échanges ioniques branchiaux, les mesures d'abondance, d'activité enzymatique et des niveaux d'ARNm d'autres co-transporteurs tel le $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ auraient pu compléter notre portrait d'acclimatation en eau salée et ainsi expliquer les différences d'osmolalité entre les deux formes.

Dans cette étude, la concentration des protéines totales a été mesurée afin d'exprimer l'activité enzymatique spécifique de la Na^+/K^+ -ATPase. Dans certaines études, les concentrations de protéines de la Na^+/K^+ -ATPase sont spécifiquement isolées et mesurées à l'aide de d'anticorps spécifiques ou de techniques de dosages, permettant une mesure encore plus spécifique (Bystriansky et al., 2007; Nielsen et al., 2007). Dans le cas de cette étude, des choix ont dû être fait en raison des limites de temps principalement, mais des résultats de protéines de la Na^+/K^+ -ATPase auraient peut-être permis l'observation de différences entre les deux souches d'ombles de fontaine, entre autre au niveau des activités absolue et spécifique, la première étant un indice de quantité et la seconde étant un indice d'efficacité. Également, à l'aide d'anticorps spécifiques aux deux isoformes branchiaux *ala* et *alb* de la Na^+/K^+ -ATPase, McCormick et collaborateurs (2009) ont démontré, chez le saumon Atlantique, des patrons de localisation différents de ces deux isoformes en fonction de la salinité, qui pourraient représenter un facteur important lors de l'acclimatation en eau salée.

À l'aide des données d'expression génique en temps réel, il a été possible d'observer un changement dans l'expression des deux isoformes de la sous-unité alpha de la Na^+/K^+ -ATPase lors du transfert en eau salée; une sous-expression de l'isoforme *ala* et une sur-expression de l'isoformes *alb* tel qu'observé chez d'autres espèces de salmonidés anadromes (Bystriansky et al., 2006; Flores and Schrimpton, 2012; McCormick et al., 2009; Richards et al., 2003). Lors d'études comme celle-ci, combinant expression génomique et activité enzymatique, il faut néanmoins garder en tête que plusieurs étapes de

l'expression des gènes (en partant de l'information de l'ADN jusqu'à la traduction en synthèse protéiques) peuvent être régulées et inhibées par plusieurs facteurs, incluant les facteurs environnementaux (Nikinmaa et Rytkönen, 2012). Également, les temps de réponses enzymatique et génique ne sont pas nécessairement les mêmes, c'est-à-dire qu'une augmentation des niveaux d'ARNm d'un gène donné ne va pas nécessairement se traduire en synthèse protéique (et donc possiblement influencer l'activité enzymatique) immédiate. L'augmentation de l'activité enzymatique de la Na^+/K^+ -ATPase observée après 14 jours en eau salée peut ainsi être reliée au niveau d'enzymes déjà présent. Dans le même ordre d'idée, l'activité enzymatique élevée de la Na^+/K^+ -ATPase observée après 60 jours dans le groupe en eau salée peut être due à une augmentation des niveaux d'ARNm de l'isoforme *$\alpha 1b$* tel qu'observé au niveau de l'expression génique entre les jours 14 et 60. L'expression génique mesurée à des jours précis est ponctuelle et ne reflète pas toute la complexité des variations d'expression génique pouvant s'être produites hors de cette zone d'échantillonnage. Afin de tester cette hypothèse, il serait nécessaire d'avoir un plus grand nombre d'échantillonnages sur une plus courte échelle de temps.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La smoltification comporte une série de processus inter-reliés, incluant des changements morphologiques, physiologiques et comportementaux, compliquant ainsi l'étude des processus d'acclimatation en eau salée. Cette étude a permis de mesurer l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase branchiale, enzyme clé au niveau des échanges ioniques. Également, les deux isoformes de la Na^+/K^+ -ATPase retrouvés chez plusieurs salmonidés ont été isolés, amplifiés et quantifiés afin de vérifier la présence d'une différence d'expression en fonction de la salinité du milieu. Une certaine forme de persistance de l'habileté d'acclimatation en eau salée (28‰) a pu être démontrée chez les ombles de fontaine résidents en montrant des réponses enzymatique et transcriptionnelle Na^+/K^+ -ATPasiqque branchiales semblables à celles observées chez les anadromes face au changement graduel de salinité.

L'absence de différence entre les deux formes au niveau Na^+/K^+ -ATPasiqque branchiale observée va à l'encontre des hypothèses de départ émises en fonction de la littérature disponible sur le sujet. Des résultats négatifs comme ceux-ci demeurent donc difficilement interprétables, puisqu'une multitude de facteurs peuvent entrer en jeu dans l'analyse de ces résultats. Tel que mentionné plus tôt, dans une optique d'obtenir un portrait encore plus précis de l'acclimatation branchiale en eau salée, il pourrait être judicieux d'échantillonner à plus court intervalle de temps. De plus, la mesure de l'abondance de protéines solubles de la Na^+/K^+ -ATPase, et non celle des protéines totales pourrait affiner l'analyse. Ces derniers ajustements pourraient ainsi mettre en lumière des phénomènes de différenciation possibles n'ayant pu être observés lors de cette étude. Également, toujours dans le but d'obtenir un portrait global de l'acclimatation branchiale, il sera intéressant de combiner les résultats obtenus avec ceux obtenus par Lemieux (mémoire en évaluation), qui a étudié chez les mêmes poissons des variables telles que le nombre de cellules à chlorure, l'osmolalité plasmatique, le pourcentage d'hématocrite ainsi que l'expression de différents gènes branchiaux impliqués dans l'apoptose. Ces résultats étant complémentaires à ceux obtenus au niveau de la Na^+/K^+ -ATPase branchiale, la mise en commun de tous ces résultats mettant en jeu des processus pouvant être inter-reliés est donc essentielle à la compréhension et sera effectuée au cours des prochains mois. On peut également

mentionner, a posteriori, que la mesure du cortisol plasmatique nous aurait permis de mieux établir l'intensité du stress relié à la réponse osmotique ou aux échantillonnages.

Une connaissance plus approfondie des populations d'omble de fontaine anadrome et résident est essentielle à une mise en place de plans de gestion adéquats. Les populations anadromes faisant face à un effort de pêche grandissant, et l'omble de fontaine en général représentant l'espèce phare et niveau des ensemencements au Québec, il est tout à notre avantage d'en connaître le plus possible sur les différences possibles entre les deux formes de cette espèce.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arnesen A. M., E. H. Jorgensen et M. Jobling (1993). Feed intake, growth and osmoregulation in Arctic charr, *Salvelinus-Alpinus* (L), transferred from fresh-water to saltwater at 8°C during summer and winter. *Fish Physiology and Biochemistry* 12: 281-292.
- Bastien A. (2010). Évaluation d'un programme de sélection et identification des traits physiologiques liés à l'anadromie chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*). Thèse doctorale en océanographie, Rimouski: Université du Québec à Rimouski, 150 p.
- 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 (Quebec, Canada). *Environmental Biology of Fishes* 64: 229-242.
- Boulet M., E. Normandeau, B. Bougas, C. Audet et L. Bernatchez (2012). Comparative transcriptomics of anadromous and resident brook charr *Salvelinus fontinalis* before their first salt water transition. *Current Zoology* 58: 155-167.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bystriansky J. S., N. T. Frick, J. G. Richards, P. M. Schulte et J. S. Ballantyne (2007). Failure to up-regulate gill Na⁺K⁺-ATPase alpha-subunit isoform alpha 1b may limit seawater tolerance of land-locked Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 148: 332-338.
- Bystriansky J. S., J. G. Richards, P. M. Schulte et J. S. Ballantyne (2006). Reciprocal expression of gill Na⁺/K⁺-ATPase alpha-subunit isoforms alpha 1a and alpha 1b during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance. *Journal of Experimental Biology* 209: 1848-1858.
- 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.

- Curry R. A., L. Bernatchez, F. Whoriskey et C. Audet (2010). The origins and persistence of anadromy in brook charr. *Reviews in Fish Biology and 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.
- Doyon J.-F., C. Hudon, R. Morin et F. G. Whoriskey Jr. (1991). Bénéfices à court terme des mouvements anadromes saisonniers pour une population d'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) du Nouveau Québec. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48: 2212-2222.
- 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. *Physiological Reviews* 85: 97-177.
- Flores A. M. et J. M. Shrimpton (2012). Differential physiological and endocrine responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, transferred from fresh water to ion-poor or salt water. *General and Comparative Endocrinology* 175: 244-250.
- Gross M. R., R. M. Coleman et R. M. McDowall (1988). Aquatic productivity and the evolution of diadromous fish migration. *Science* 239: 1291-1293.
- Hendry A. P., T. Bohlin, B. Jonsson et O. K. Berg (2004). To sea or not to sea? Anadromy versus non-anadromy in salmonids. Dans *Evolution illuminated - Salmon and their relatives* (Hendry, A.P. et S. C., Stearns Eds), New York: Oxford University Press, 92-125.
- Hiroi J. et S. D. McCormick (2007). Variation in salinity tolerance, gill Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. *Journal of Experimental Biology* 210: 1015-1024.
- Jonsson B. et N. Jonsson (1993). Partial migration - Niche shift versus sexual-maturation in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3: 348-365.

- Livak K. J. et T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25: 402-408.
- Marshall W. S. (2002). Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: Retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology* 293: 264-283.
- McCormick S. D., R. J. Naiman et E. T. Montgomery (1985). Physiological smolt characteristics of anadromous and non-anadromous brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Aquatic Sciences* 42: 529-538.
- McCormick S. D. (1993). Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Canadian Journal of Aquatic Sciences* 50: 656-658.
- McCormick S. D. (2001). Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist* 41: 781-794.
- McCormick S. D. (2009). Evolution of the hormonal control of animal performance: Insights from the seaward migration of salmon. *Integrative and Comparative Biology* 49: 408-422.
- 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. *Journal of Experimental Biology* 212: 3994-4001.
- Mobasher A. J., A. I. Cozar-Castellano, M. D. Brownleader, M. Trevan, M. J. O. Francis, J. F. Lamb et P. Martin-Vasallo (2000). Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Bioscience Reports* 20: 51-91.
- Morin, R. (2007). « Production piscicole au Québec ». Document d'information DADD-02. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation. 8 p. <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/Fr/Peche>

- Morinville G. R. et J. B. Rasmussen (2003). Early juvenile bioenergetic differences between anadromous and resident brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60: 401-410.
- Morinville G. R. et J. B. Rasmussen (2008). Distinguishing between juvenile anadromous and resident brook trout (*Salvelinus fontinalis*) using morphology. *Environmental Biology of Fishes* 81: 171-184.
- Nikinmaa M. et K. T. Rytkönen (2011). Functional genomics in aquatic toxicology-Do not forget the function. *Aquatic Toxicology* 105: 16-24.
- Nikinmaa M. et K. T. Rytkönen (2012). "From genomes to functions in aquatic biology." *Marine Genomics* 5: 1-6.
- Nilsen T. O., L. O. E. Ebbesson, S. S. Madsen, S. D. McCormick, E. Andersson, B. T. Bjornsson, P. Prunet et S. O. Stefansson (2007). Differential expression of gill Na⁺,K⁺-ATPase alpha- and beta-subunits, Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*." *Journal of Experimental Biology* 210: 2885-2896.
- Pagliarani A., V. Ventrella, R. Ballestrazzi, F. Trombetti, M. Pirini et G. Trigari (1991). Salinity-dependence of the properties of gill (Na⁺-K⁺-ATPase) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 100: 229-236.
- Perry G. M. L., C. Audet et L. Bernatchez (2005). Maternal genetic effects on adaptive divergence between anadromous and resident brook charr during early life history. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 1348-1361.
- Richards J. G., J. W. Semple, J. S. Bystriansky et P. M. Schulte (2003). Na⁺/K⁺-ATPase alpha-isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *Journal of Experimental Biology* 206: 4475-4486.
- Siegler L., H. D'Cotta, L. Paulin, J. L. Baglinière et P. Prunet (1996). Biopsie et mesure de l'activité Na⁺/K⁺-ATPase branchiale: Validité et impact sur le développement du smolt du Saumon Atlantique (*Salmo salar* L.). *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture* 340: 43-55.

- St-Laurent J. (2008). Caractérisation de la population anadrome d'omble de fontaine estivant dans l'estuaire de la rivière Petite Cascapédia, Mémoire de maîtrise en océanographie, Rimouski: Université du Québec à Rimouski, 67 p.
- Tanguy J. M., D. Ombredane, J. L. Baglinière et P. Prunet (1994). Aspects of parr-smolts transformation in anadromous and resident forms of brown trout (*Salmo trutta*) in comparison with Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* : 51-63.
- 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.
- Thériault V., D. Garant, L. Bernatchez et J. J. Dodson (2007). Heritability of life-history tactics and genetic correlation with body size in a natural population of brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of Evolutionary Biology* 20: 2266-2277.
- Tipmark C. K. et S. S. Madsen (2001). Rapid modulation of Na⁺/K⁺-ATPase activity in osmoregulatory tissues of a salmonid fish. *Journal of Experimental Biology* 204: 701-709.
- Tipmark C. K., S. S. Madsen, M. Seidelin, A. S. Christensen, C. P. Cutler et G. Cramb (2002). Dynamics of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and Na⁺,K⁺-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Zoology* 293: 106-118.
- Verspoor E. et L. J. Cole (1989). Genetically distinct sympatric populations of resident and anadromous Atlantic salmon, *Salmo-salar*. *Canadian Journal of Zoology* 67: 1453-1461.
- Zimmerman C. E. et G. H. Reeves (2000). Population structure of sympatric anadromous and nonanadromous *Oncorhynchus mykiss*: evidence from spawning surveys and otolith microchemistry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 2152-2162.
- Zydlwesky J. et M. P. Wilkie (2013). Freshwater to seawater transitions in migratory fish. Dans McCormick (2000), *Fish Physiology, Euryhaline Fishes* Vol. 32, (McCormick, S. D., Farrell, A. P., et C. J., Brauner Eds), New York: Elsevier, 253-326.

