

4.5 Échantillonnage génétique

4.5.1 Objectifs de l'échantillonnage génétique

Les outils de la génétique des populations fournissent des méthodes permettant d'identifier une série de caractéristiques dans une population donnée. C'est ainsi qu'il est particulièrement intéressant pour les pêcheries d'identifier certains aspects de l'espèce (groupes d'espèces, types d'espèce (c'est-à-dire les espèces individuelles), sous-espèces, stocks) ainsi que la structure, l'étendue et les limites géographiques de chacun des attributs de l'espèce.

L'identification des espèces peut être utile à appliquer lorsque les erreurs d'identification sont courantes. Par exemple, les petits albacores sont souvent confondus avec le thon obèse.

Aux fins d'une gestion efficace des thonidés grands migrateurs, il est important d'identifier les délimitations du stock (par exemple, pour le thon rouge de l'Atlantique). Cette approche se fonde sur la théorie selon laquelle la sous-division de la population peut aboutir à une différenciation génétique des populations isolées par dérive génétique et par sélection. Pour identifier les populations, l'approche générale consiste par conséquent à examiner la diversité/différence génétique à l'échelle d'une population.

Il est important de souligner que l'absence d'une spécificité génétique dans la sous-structure d'une population ne signifie pas que cette sous-structure n'existe pas. La différenciation génétique entre des stocks partageant le même bassin océanique peut être relativement faible, souvent du même ordre de grandeur que l'erreur d'échantillonnage. Les études génétiques de la structure des stocks doivent par conséquent accorder une attention particulière à la conception expérimentale et aux protocoles d'échantillonnage afin de maximiser le rapport : signal sur bruit, dans les données. Ceci dit, en raison des effets de la migration la différenciation génétique peut ne pas apparaître dans les populations de grandes dimensions. Les modèles théoriques de la différenciation des produits des gènes nucléaires et la différenciation de l'ADN mitochondrial indiquent que la migration de l'ordre des individus par génération peut être suffisante pour annihiler une différenciation génétique. Ce taux d'échange est minimum par rapport à la quantité qui serait nécessaire pour rétablir des populations épuisées à une échelle temporelle intéressante pour ceux qui exploitent ces populations. Compte tenu des limitations inhérentes à chaque méthode, la meilleure méthode pour évaluer la structure d'un stock est une approche holistique qui utilise toutes les informations disponibles à partir des études génétiques, démographiques, écologiques et du cycle vital (Waples, 1998).

4.5.2 Ciblage des échantillons

La sélection des échantillons à prélever sera définie par les objectifs du programme d'échantillonnage. L'échantillonnage local permettra d'appréhender les variations localisées et les mélanges de population à travers des analyses statistiques des données génotypiques. Un échantillonnage plus large identifiera des différences et similitudes génétiques à une plus grande échelle. Par exemple, s'il s'agit d'étudier les caractéristiques natales d'une population, il faudra cibler de petits individus qui devront se trouver dans leur zone natale. Par contre, les examens réalisés au niveau de la population exigeront le prélèvement d'échantillons provenant de toute la dimension géographique connue ou soupçonnée. La comparaison de profils génétiques dans différents échantillons séparés dans l'espace et/ou le temps peut démontrer l'existence de multiples pools génétiques ou stocks.

4.5.3 Dimension de l'échantillon

Les ressources financières disponibles limitent souvent la taille de l'échantillon qui peut cependant influencer de façon considérable les résultats des analyses génétiques. Le nombre de lieux et d'années échantillonnées augmentera également le nombre d'individus à échantillonner. En général, les programmes complets analysent plus de 100 échantillons par unité d'échantillonnage (par ex. espèce, lieu, année, etc.). La taille requise de l'échantillon dépendra de la différenciation génétique entre les individus de l'espèce dans différentes zones géographiques (par exemple). En outre, des études ont montré l'importance de maximiser les tailles de l'échantillon et la couverture temporelle. Les résultats d'études fondées sur des échantillons de petites tailles peuvent produire des valeurs positives erronées (par ex. Ely *et al.*, 2002). C'est pour toutes ces raisons qu'il est essentiel d'obtenir une assistance statistique appropriée lors de la planification du programme pour s'assurer que le programme d'échantillonnage défini permettra d'atteindre les objectifs du programme.

4.5.4 Procédures d'échantillonnage

Propreté des échantillons

Il faut éviter toute contamination. Le couteau doit être nettoyé (par exemple avec de l'éthanol) avant de découper chaque poisson. Il y aura un risque de contamination si l'on utilise un outil coupant sur différents poissons sans l'avoir nettoyé au préalable. Lorsqu'une contamination a pu se produire, cette circonstance devra être indiquée sur le formulaire correspondant à cet échantillon.

Échantillonnage

On peut échantillonner le foie, le cœur, les tissus du muscle squelettique ainsi que le sang, des parties de nageoires ou un morceau d'animal entier (en général, des larves ou des juvéniles). Il est recommandé de prélever les échantillons du cœur, du foie et du muscle sur un seul individu. L'accès à ces tissus peut être limité dans certaines pêcheries où la valeur commerciale du poisson dépend de son état. Le muscle blanc peut être le meilleur tissu dans ce cas. Pour échantillonner le muscle blanc, on prélèvera un lambeau cutané d'environ 9 cm de diamètre dans la partie centrale du corps entre la base de la nageoire dorsale et la ligne latérale afin de découvrir le muscle.

On prendra environ 4 cm³ (~5 g) de muscle, de cœur et de foie dans chaque cas. Le muscle et le foie sont recommandés pour les analyses d'ADN. On les nettoiera, découpera et lavera dans un tampon froid (par ex. 50mM EDTA). Certaines études ont montré que le rinçage augmente le rendement d'ADN mitochondrial circulaire fermé (ADNmt). On recommande d'utiliser de petits morceaux pour les analyses d'ADN afin de s'assurer que l'éthanol pénètre bien dans les tissus à stocker.

Il existe deux méthodes différentes pour stocker du matériel issu des poissons : la congélation ou l'éthanol. L'utilisation de ces deux méthodes dépend de la finalité de l'étude. La congélation est la meilleure méthode pour stocker des spécimens qui seront soumis à une électrophorèse et à d'autres analyses biologiques (ex. biochimie et physiologie) en raison de la fiabilité des enzymes *in vitro*. Un stockage cryogénique approprié préservera l'activité enzymatique et minimisera le risque de rupture (notamment quand on utilise de l'azote liquide). Les échantillons conservés dans de l'éthanol seront utilisés UNIQUEMENT dans des études génétiques telles que l'amplification et le séquençage de l'ADN. Les échantillons peuvent être stockés dans de l'éthanol à 96%.

L'échantillon devra être emballé dans un sac en plastique (s'il va être congelé) ou dans un flacon d'éthanol puis dans un sac en plastique (à éthanol). Dans chaque cas, les sacs doivent être revêtus d'une étiquette comprenant, dans la mesure du possible, la date, le bateau, l'espèce présumée, la taille, le poids, le sexe, le lieu de capture (latitude et longitude), le type de banc de thonidés et d'association, le type de tissu et un numéro unique d'échantillon. Tous les échantillons provenant d'un même poisson doivent être étiquetés sous le même code. Si le poisson a été utilisé dans d'autres études (maturité, etc.), on utilisera le même code dans toutes les études réalisées.

Si on congèle les échantillons, il faudra le faire le plus vite possible après le prélèvement. Si ce n'est pas possible, on conservera l'échantillon dans de la glace jusqu'à l'arrivée au laboratoire où on les mettra dans un congélateur.

Expédition d'échantillons congelés

Les échantillons doivent être expédiés au destinataire correspondant dans de la glace sèche (une glacière en mousse de polystyrène suffira). Si on ne dispose pas de glace sèche, la glacière peut être couverte de glace et mise au congélateur pendant quelques jours avant l'expédition. L'expédition doit être réalisée par fret aérien (Air Cargo System) dans un vol régulier sous forme de bagage personnel. Cette solution est plus rapide et moins coûteuse que les autres alternatives d'expédition. Il est recommandé d'envoyer la lettre de transport aérien au destinataire par télécopieur. Une autre solution consiste à envoyer le numéro d'expédition.

Expédition d'échantillons dans de l'éthanol

L'expédition au destinataire de sacs contenant des flacons peut être réalisée en utilisant le courrier normal ou n'importe quel autre système d'expédition.

4.5.5 Analyse des échantillons

L'analyse d'échantillons de tissus pour l'ADN requiert la participation d'un personnel formé et l'utilisation d'un équipement approprié. Nous allons décrire ci-dessous les techniques générales pour nous assurer que les lecteurs comprennent l'importance des analyses génétiques. Les articles cités dans la section Bibliographie contiennent de plus amples informations à ce sujet.

L'échantillon de tissu peut être divisé et l'on peut incuber de petits échantillons (ex. 100 mg, mais ceci dépendra de la sensibilité de la technique choisie) dans un tampon de digestion de 1 ml. La période d'incubation et la température dépendront du tissu et de la méthode utilisée (voir bibliographie). Les autres méthodes d'extraction de l'ADN comprennent entre autres les procédures standard au phénol/chloroforme suivies d'une précipitation à l'éthanol.

Identification de l'espèce

Les patrons électrophorétiques des allozymes et l'ADN mitochondrial (ADNmt) se sont avérées utiles pour distinguer les différentes espèces de thonidés. L'ADN est le principal objet d'examen étant donné qu'il est identique dans tous les types de cellule d'un organisme, tandis que les protéines peuvent varier d'un tissu à l'autre. En outre, l'ADN est stable et fournit plus d'informations que les protéines. Par ailleurs, on a constaté que les techniques électrophorétiques sont moins efficaces dans la différenciation des espèces de thonidés (Bartlett et Davidson, 1991).

L'analyse des haplotypes de l'ADNmt a également été utilisée pour identifier les espèces. Ainsi, on a utilisé les haplotypes ATCO d'ADNmt pour différencier les prises de thon obèse des prises d'albacore. Ward (1995) a observé que l'analyse du RFLP (polymorphisme de taille des fragments de restriction) de plusieurs gènes mitochondriaux a permis de distinguer sans équivoque les sept espèces *Thunnus* à partir de haplotypes exclusifs. Cette découverte a été étayée par des tests d'allozymes et d'ADNmt (Ward 1995).

Discrimination de la population

Bien qu'on ait analysé des allozymes pour quantifier les niveaux de variation génétique au sein d'une population et entre différentes populations, il existe aujourd'hui des méthodes plus efficaces comme les techniques de microsatellites d'ADN nucléaire et l'analyse de la région de contrôle de l'ADNmt (boucle D).

Même si l'importance de l'ADNmt dans l'identification de la sous-division des populations a été largement documentée, il se peut que les analyses fondées sur les seules fréquences des haplotypes de l'ADNmt reflètent en fait la dispersion spécifique au sexe ou les schémas de migration. Ceci est dû au fait que l'ADNmt n'est transmis que par le parent femelle. En outre, la nature non recombinante du génome de l'ADNmt fait en sorte qu'il se comporte comme un seul locus génétique, ce qui peut réduire le pouvoir de détection d'une différenciation génétique significative (Greig *et al.*, 1999). C'est pour cette raison que les analyses de la structure des populations qui fournissent les meilleures informations combinent de multiples loci pour tester la similitude des caractéristiques phylogénétiques.

4.5.6 Analyse des résultats

Les niveaux de variation génétique peuvent être évalués en termes de nombres d'allèles par locus et d'hétérozygote observée (H_{obs}) et d'hétérozygote attendue de Hardy-Weinberg (H_{exp}) (uniquement pour l'ADN nucléaire). On peut évaluer la signification de la variation génétique en comparant H_{obs} avec H_{exp} et en faisant des tests de détection à partir de l'équilibre de Hardy-Weinberg entre les échantillons.

On peut évaluer l'homogénéité de la fréquence des allèles des microsatellites entre des populations temporelles et spatiales. Les échantillons temporels d'une même zone spatiale peuvent être regroupés s'ils ne présentent pas une différence significative dans la fréquence des allèles. On peut alors comparer les données spatiales. On recommande d'utiliser la procédure de correction de Bonferroni (Rich, 1989) pour ajuster les seuils de significativité permettant de réaliser de comparaisons multiples. La différenciation de la population peut aussi être évaluée en utilisant l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992).

Une autre technique consiste en l'analyse hiérarchique de la diversité nucléotidique en tant que mesure de la différenciation de la population (Holsinger et Mason-Gamer, 1996). Cette méthode permet l'examen de populations structurées sur le plan géographique en utilisant un site de restriction et des données de la séquence

d'ADN où la variation n'est pas héritée de façon indépendante. Les populations sont regroupées en fonction du temps moyen de coalescence pour des paires de haplotypes. Les résultats sont exposés dans un dendrogramme qui montre le rapport entre les populations après avoir rééchantillonné les données 10 000 fois. Des valeurs P significatives indiquent que le temps moyen de coalescence pour deux haplotypes extraits du même nœud d'un arbre est inférieur à celui de deux haplotypes extraits de nœuds différents.

4.5.7 Bibliographie

- APPLEYARD, S.A., P.M. Grewe, B.H. Innes, and R.D. Ward (2001). Population structure of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the western Pacific Ocean, inferred from microsatellite loci. *Marine Biology* 139: 383-393.
- BARTLETT, S.E. and W.S. Davidson (1991). Identification of *Thunnus* tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 309-317.
- ELY, B., D.S. Stoner, J.R. Alvarado Bremer, J.M. Dean, P. Addis, A. Cau, E.J. Thelen, W.J. Jones, D.E. Black, L. Smith, K. Scott, I. Naseri, and J.M. Quattro (2002). Analysis of nuclear *ldhA* gene and mtDNA control region sequences of Atlantic northern bluefin tuna populations. *Mar. Biotechnol.* 4, 583-588.
- EXCOFFIER, L., P.E. Smouse, and J.M. Quattro (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes-Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- GREIG, T.W., J.R. Alvarado Bremer, and B. Ely (1999). Preliminary results from genetic analyses of nuclear markers in swordfish, *Xiphias gladius*, reveal concordance with mitochondrial DNA analyses. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 49(1): 476-482.
- HOLSINGER, K.E. and R.J. Mason-Gamer (1996). Hierarchical analysis of nucleotide diversity in geographically structured populations. *Genetics* 142, 629-639.
- PUJOLAR, J.M., M.I. Roldán, and C. Pla (2003). Genetic analysis of tuna populations, *Thunnus thynnus* *thynnus* and *T. alalunga*. *Marine Biology* 143, 613-621.
- WAPLES, R. (1998). Identifying stock structure and resolving stock mixtures in tuna. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT* 50, 207-208.
- WARD, R.D. (1995). Population genetics of tunas. *J. Fish Biol.* 47, 259-280.