

Centre Eau, Terre et Environnement  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Université du Québec

**Écotoxicologie évolutive des populations de perchaude (*Perca flavescens*)  
exposées de façon chronique à des gradients polymétalliques  
en milieu naturel**

Par  
Vincent Bourret

Mémoire présenté  
pour l'obtention  
du grade Maître es sciences (M.Sc.)

Membres du Jury

Directeur de recherche	Patrice Couture INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Peter G.C. Campbell INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Louis Bernatchez Université Laval
Examinateur interne	Landis Hare INRS-ETE
Examinateur externe	Filip Volckaert K.U. Leuven

## Résumé

Dans les régions de Sudbury en Ontario et de Rouyn-Noranda au Québec, l'exploitation minière est considérable depuis des décennies et les effets de ces industries se sont fait sentir sur les écosystèmes aquatiques. De nombreuses études suggèrent que l'exposition chronique aux métaux exerce une pression de sélection amenant des différences au niveau de la tolérance aux métaux et de la capacité à gérer les concentrations internes de métaux. L'écotoxicologie évolutive est un domaine d'étude ayant récemment émergé de l'association entre la génétique des populations et de l'écotoxicologie, mais ce type d'approche n'a pas encore été appliquée régulièrement aux populations naturelles et spécialement chez les poissons. En utilisant des marqueurs microsatellites, nous avons pu examiner le rôle de la contamination métallique en tant que force sélective causant des changements évolutifs importants au niveau de la diversité génétique de 20 populations naturelles de perchaudes distribuées également entre les deux régions minières mentionnées ci-dessus. Nous avons examiné les relations entre la diversité génétique et la contamination des métaux et nous avons trouvé des corrélations significatives au niveau populationnel et individuel (globale et intra-population). Au niveau des populations, leur diversité génétique était corrélée négativement avec la contamination au cadmium ( $P < 0,001$ ;  $r^2 = 0,47$ ) suggérant que des baisses démographiques auraient pu survenir à différentes intensités parmi ces populations. Nous avons observé la même corrélation entre la diversité génétique au locus *Pfla L1* et la contamination au cuivre ( $P = 0,005$ ;  $r^2 = 0,33$ ) suggérant plutôt un effet localisé et ainsi une association possible entre ce locus et un gène impliqué dans la tolérance au cuivre. Nous avons également observé que le degré « d'apparentement interne », un indice de diversité génétique individuel, présentait la tendance opposée alors que les individus les plus contaminés au cadmium étaient plus diversifiés que les moins contaminés dans des populations références et contaminées. Nos résultats révèlent donc que quelques décennies de contamination par les métaux ont significativement modifié les patrons de diversité génétique observés chez des populations naturelles de perchaudes vivant en régions minières.

## **Avant-Propos**

Voilà maintenant plus de deux années et demie que je me suis engagé dans cette aventure qui allait me faire passer par toutes les émotions, de la satisfaction personnelle au désespoir professionnel en passant fréquemment par la frustration bureaucratique et les joies de la collaboration avec un groupe de collègues extraordinaires de partout au Québec, au Canada et dans le monde.

Au moment du dépôt final, le chapitre 2 est accepté pour publication dans la revue Aquatic Toxicology. Les coauteurs de ce chapitre ont contribué à ma supervision. Le travail sur le terrain et en laboratoire, les analyses et la rédaction furent réalisés par moi-même, bien entendu sous la supervision et les conseils de mon directeur (P.C.) et de mes codirecteurs (L.B. et P.G.C.C.). Les commentaires de deux arbitres anonymes ayant examiné le manuscrit du chapitre 2 et des examinateurs internes et externes ont également contribué à l'amélioration de ce mémoire.

## **Remerciements**

C'est avec un sens du devoir accompli que je dépose aujourd'hui ce mémoire qui résume certes l'essentiel de presque trois années de recherche, mais qui reste malheureusement peu éloquent quant aux gains sur les plans personnel, culturel, social et professionnel que m'a permis d'acquérir cette expérience unique. Je tiens donc à remercier beaucoup de gens sans qui mes efforts, ma persévérance et mon entêtement ne m'auraient même pas permis de survivre trois mois en recherche.

Tout d'abord, j'aimerais remercier mes directeurs de recherche, Patrice Couture et Louis Bernatchez, que je considère maintenant comme des amis. La confiance immense qu'ils m'ont accordée, de même que leurs judicieux conseils, m'ont notamment permis de réaliser ce projet de façon autonome et d'en sortir mieux préparé pour mon avenir professionnel. Les encouragements et l'enthousiasme de Patrice m'ont fait croire en mes capacités et m'ont permis de persévéérer. Quant à Louis, sa motivation et sa confiance envers tes étudiants n'a d'égal que le dévouement qu'il leur inspire. Merci également à mon codirecteur, Peter Campbell; sans son soutien et sa participation, ce projet n'aurait tout simplement jamais pris forme. Aux trois, je tiens à leur exprimer mes sincères remerciements pour les expériences uniques, enrichissantes et inoubliables qu'ils m'ont permis de vivre en m'offrant de participer à des évènements scientifiques internationaux.

Je m'en voudrais d'oublier de remercier mes collègues autant pour leurs commentaires pertinents qu'impertinents, leur présence et leur tolérance. Plus particulièrement, merci à Dominique, Vicky, Guillaume, Mélanie, Scott, Véro, Nicolas H., Arne, Dylan, Sean, Pierre, Émilie, Silva et Lucie. Un merci spécial aux autres membres du labo Bernachez pour cette ambiance remarquable qui m'a donné le goût de poursuivre ma passion.

Aussi, je tiens à remercier profondément ma famille pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements constants. Finalement, je ne pourrai jamais remercier assez une personne qui m'est très chère; elle a été un témoin privilégié du meilleur comme du pire que cette aventure a fait ressortir de moi. Sans broncher, elle m'a toujours encouragé et poussé en avant en me montrant qu'elle croyait en moi. Sonia, cette maîtrise est aussi la tienne, merci pour tout...

# Table des matières

Résumé.....	ii
Avant-Propos .....	iii
Remerciements.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures .....	vii
1. Introduction.....	1
1.1 Contexte historique en écotoxicologie.....	1
1.2 Génétique des populations .....	3
1.2.1 Indices de diversité génétique .....	4
1.2.2 Effets des contaminants sur la diversité génétique .....	5
1.3 Biologie de la perchaude.....	7
1.4 Systèmes étudiés .....	8
1.4.1 Sudbury.....	8
1.4.2 Rouyn-Noranda.....	10
1.5 Problématique et objectifs .....	11
2. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch ( <i>Perca flavescens</i> ) populations chronically exposed to a polymetallic gradient .....	13
2.1 Résumé.....	14
2.2 Abstract .....	15
2.3 Introduction.....	16
2.4 Materials and Methods.....	19
2.4.1 Fish Sampling .....	19
2.4.2 Liver metal concentrations.....	19
2.4.3 Microsatellite genotyping .....	20
2.4.4 Genetic data analyses.....	21
2.4.5 Statistical analysis .....	24
2.5 Results.....	26
2.5.1 Samples and hepatic metal concentrations .....	26
2.5.2 Genetic data analyses.....	26
2.5.3 Statistical analysis .....	28
2.6 Discussion.....	30
2.7 Acknowledgements.....	51
3. Conclusion .....	52
Bibliographie .....	58
ANNEXE A .....	69

## Liste des tableaux

<b>Table 2.1</b> Microsatellite loci characteristics: structure of repeat motif, primer sequence, allele size range, PCR annealing temperature ( $T_A$ ) in °C, number of alleles observed ( $A$ ) and reference publication are provided.....	38
<b>Table 2.2</b> Summary of genetic diversity at 9 microsatellite loci among, from left to right, 10 populations from Sudbury and 10 from Rouyn-Noranda: $N$ the number of individuals genotyped from each population on the first line (except for locus <i>Pfla L4</i> , which are given above other locus data), and per locus in each populations: corrected allele number* ( $\hat{A}$ ), correlation value of heterozygote deficit ( $F_{IS}$ ) and expected ( $H_E$ ) and observed ( $H_O$ ) heterozygosities. **For All loci, statistics represent compilation of the seven loci that were retained for analyses (loci <i>Pfla L4</i> and <i>Svi L10</i> were excluded). *** Indicate locus showing significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P = 0.05$ ). *Allelic richness ( $\hat{A}$ ) corrected to $n = 50$ using the rarefaction method of FSTATS 2.9.3 (Goudet, 2002).....	39
<b>Table 2.3</b> Summary of the allele size permutation test of Hardy <i>et al.</i> (2003) for population differentiation: $\theta_{ST}$ and $R_{ST}$ estimates for each locus employed and across all loci P-values of significance tests ( $R_{ST} > \rho R_{ST}$ ) with asterisks (**for $P < 0.01$ level).....	41
<b>Table 2.4</b> Number of loci significantly ( $\alpha = 0.05$ ) different for each population pair based on the genic differentiation test (above the diagonal) and pairwise measures of genetic differentiation based on allelic identity ( $\theta_{ST}$ ) (below the diagonal). *NS asterisks indicate non-significant comparison.....	42
<b>Table 2.5</b> Hierarchical partitioning of genetic variance (AMOVA) between both geographical regions (Rouyn-Noranda and Sudbury), among populations within regions and within individual populations. Significance at the *** $P < 0.001$ level.....	43
<b>Table 2.6</b> Results of simple and partial Mantel tests showing the relationships between genetic differentiation ( $\theta_{ST}$ ), geographic distance (Geo. Dist., shortest distance) and differences in cadmium contamination between paired populations (absolute values). Geographic distances were log transformed before Mantel tests. Significant or marginal correlations are showed in bold characters.....	44

## Liste des figures

<b>Figure 2.1</b> Location of the 20 lakes in this study (10 in Ontario and 10 in Québec). Lakes sampled in Ontario are: Geneva (GE), Whitson (WH), Hannah (HA), Ramsey (RA), Laurentian (LA), Richard (RI), Daisy (DAI), Barlow (BA), Nosbonsing (NO) and James (JA). Lakes sampled in Québec are: Dasserat (DAS), Opasatica (OP), Évain (ÉV), Hélène (HÉ), Marlon (MA), Dufault (DU), Osisko (OS), Vaudray (VA), Joannès (JO) and Bousquet (BO).....	45
<b>Figure 2.2</b> Concentrations of Cd (top panels) and Cu (bottom panels) (mean $\pm$ S.E., $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight), in liver samples from individuals of populations from Rouyn-Noranda, Québec (left panels) and Sudbury, Ontario (right panels) .....	46
<b>Figure 2.3</b> Relationship between overall gene diversity of populations calculated from 7 microsatellite loci vs.: top panel) mean liver Cd concentration and bottom panel) mean liver Cu concentration. P-values and adjusted regression are indicated. ....	47
<b>Figure 2.4</b> Relationship between gene diversity of populations calculated from locus <i>Pfla L1</i> populations' mean liver Cu concentration. P-value and adjusted regression are indicated in the top-right corner.....	48
<b>Figure 2.5</b> Individual's mean Internal Relatedness (IR) for each contamination group based liver Cd concentration. The groups represent 4 quartiles formed using 1376 individuals (all samples pooled), the most contaminated being the 4 <sup>th</sup> quartile. P-value of linear contrast is indicated. ....	49
<b>Figure 2.6</b> Individual's mean Internal Relatedness (IR) for each group formed based on their liver Cd concentration in four populations where the relationship was significant: a) Dufault, b) Vaudray, c) James and d) Dasserat. The groups represent 4 quartiles formed using all samples from each population, the more contaminated being the 4 <sup>th</sup> quartile. P-values of linear contrasts are indicated. ....	50

# **1. Introduction**

## **1.1 Contexte historique en écotoxicologie**

Depuis la révolution industrielle, un grand nombre de composés chimiques et d'agents physiques ont été rejetés dans notre environnement. Certains de ces composés ne constituent pas des molécules normalement présentes dans un environnement naturel. Ce sont des composés que l'on nomme xénobiotiques. Depuis plus d'un siècle, ces derniers font l'objet de nombreuses études qui tentent d'évaluer leurs effets potentiels sur l'homme. C'est ce champ d'étude que l'on désignait autrefois comme la toxicologie. Les dernières décennies ont été marquées par une conscientisation particulièrement importante de la population mondiale, des gouvernements, des scientifiques et même des entreprises privées pour la sauvegarde de notre environnement. Ainsi, la toxicologie telle que nous la connaissons a été réorganisée de sorte qu'elle fait maintenant partie d'un domaine plus vaste, l'écotoxicologie. La première définition de ce terme fournit par Truhaut en 1969 l'explique essentiellement comme une extension naturelle de la toxicologie; il avait dit alors que c'était la science des effets des poisons sur les organismes et des effets écologiques des polluants (Hoffman *et al.*, 1995).

Dans la littérature, les définitions de l'écotoxicologie ne se comptent plus. Il semble que ce soit un terme qui permette à l'imagination d'en expliquer la signification de bien des manières, sans toutefois laisser de côté la base du terme qui est l'examen des effets toxiques d'un ou plusieurs composés sur un ou plusieurs constituants d'un écosystème. D'un point de vue plus restrictif, mais très utile, c'est donc la science qui teste les effets de substances toxiques sur les écosystèmes en gardant comme objectif de protéger ces derniers plutôt que leurs simples constituants spécifiques (Hoffman *et al.*, 1995). De manière générale, l'écotoxicologie emploie donc des paramètres écologiques pour tester la toxicité sur les systèmes environnementaux. Dans cet ordre d'idée, les abondantes avancées théoriques en génétique, de même que l'avènement des outils moléculaires

modernes des dernières décennies ont donc permis à un champ d'étude spécifique à l'écotoxicologie de faire son apparition, soit la génotoxicologie.

Spécifiquement, la génotoxicologie ou la toxicologie génétique est l'étude des dommages des processus génétiques causés par des agents ayant une affinité pour l'ADN qui apparaissent généralement des suites d'activités anthropiques (Brusik, 2001). Elle met l'accent sur les mécanismes moléculaires qui amènent des effets sur le fonctionnement de l'ADN, mais aussi sur les mécanismes de protection et de réparation qui tentent de s'opposer à ce type d'effet préjudiciable. La plupart des études génotoxicologiques se sont attardées principalement aux humains comme sujet d'étude dans le but de prévenir le cancer, les syndromes génétiques, de même que le vieillissement (Hayes *et al.*, 2001). Cependant, les études de génotoxicologie environnementale ont des objectifs qui se conforment mieux au cadre de l'écotoxicologie en ce sens où elles visent plutôt à incorporer ces connaissances génétiques afin de déterminer les effets des contaminants au niveau des populations animales et végétales et des écosystèmes. De cette façon, on vise à examiner les impacts de la pollution et des contaminations environnementales de même que les réponses à court et moyen termes des organismes touchés, pour comprendre et gérer adéquatement ces systèmes.

Les années 1990 ont été marquées par un développement rapide des outils moléculaires (marqueurs moléculaires et débit des appareils) qui ont permis à la génétique des populations de faire des percées importantes. L'avènement de ce dernier domaine et sa récente association avec l'écotoxicologie ont permis l'apparition du domaine de l'écotoxicologie évolutive qui s'attarde particulièrement à l'examen, en expérimentation contrôlée et en milieu naturel, des effets des contaminants sur la structure génétique au niveau des populations et des communautés (Bickham *et al.*, 2000; Belfiore & Anderson, 2001). Connaître et comprendre les effets des polluants environnementaux sur le génome est d'une importance cruciale pour préserver le potentiel évolutif des populations naturelles puisque la diversité génétique leur fournit tout le potentiel de s'adapter aux forces de sélection (Gillespie & Guttman, 1989).

Heureusement, il existe aujourd’hui des outils moléculaires très sensibles qui nous donnent la capacité de détecter des variations génétiques entre des populations et même intra-population avec des tailles d’échantillons assez importants pour détecter des changements subtils au cadre génétique des populations. Ainsi, notre compréhension des conséquences évolutives potentielles peut désormais être supportée par de nombreux et puissants outils. Il n’est donc pas surprenant que la génétique des populations soit présentement de plus en plus utilisée en tant que « bio-indicateur » de la santé de populations exposées de façon chronique à des polluants (Bickham *et al.*, 2000).

## 1.2 Génétique des populations

L’ADN est l’unité fondamentale de l’héritabilité et de la reproduction; des perturbations dans sa structure et ses fonctions peuvent mener à des changements au niveau de la dynamique ou de la démographie des populations (Theodorakis, 2001). Cependant, dans les cas où les principaux contaminants ne sont pas reconnus pour leur effets génotoxiques et/ou lorsque d’autres conséquences phénotypiques qui pourraient avoir une base génétique sont connues, une approche écotoxicologique en génétique des populations s’avère une meilleure alternative.

La génétique des populations est un domaine permettant de déterminer les rôles relatifs des forces évolutives (dérive, mutation, sélection et migration) dans la différentiation génétique. Les marqueurs génétiques neutres, comme les microsatellites, sont des outils puissants permettant de définir la structure des populations ainsi que les rôles des forces évolutives, mis à part la sélection naturelle (Paetkau *et al.*, 1995; Bernatchez *et al.* 1998; Ciofi & Bruford, 1999; Saint-Laurent *et al.*, 2003). Les populations peuvent être définies grâce aux différences dans leurs fréquences alléliques et parfois par l’existence d’allèles diagnostiques, c’est-à-dire spécifiques à une ou certaines des populations à l’étude (Vrijenhoek, 1998; Cornuet *et al.*, 1999).

L'ampleur de la différentiation génétique entre les populations peut être établie grâce aux statistiques F de Wright, qui constituent un ensemble de mesures hiérarchiques de différentiation génétique. Les calculs de  $F_{ST}$  représentent la réduction du degré d'hétérozygotie observée dans un ensemble de populations par rapport au degré d'hétérozygotie attendue chez ces populations dans le cas d'une reproduction aléatoire. Ils constituent donc une mesure de consanguinité et reflètent l'effet de la dérive sur les populations (Weir & Cockerham, 1984; Hardy *et al.*, 2003). Les calculs de  $R_{ST}$  sont aussi très utiles dans l'étude de la divergence génétique entre populations. Cette mesure assume un modèle de mutation pas-à-pas au niveau des loci microsatellites et représente l'ampleur de la différentiation génétique selon la variance dans la taille des allèles (Slatkin, 1995). Ainsi, plus la différence dans la taille de deux allèles est grande, plus des événements de mutation sont assumés. Il est donc possible, grâce à ces calculs, de mieux comprendre l'histoire évolutive des populations étudiées. Les calculs de  $F_{ST}$  et de  $R_{ST}$  peuvent être effectués globalement et entre chaque paire de populations.

### 1.2.1 Indices de diversité génétique

Les mesures de diversité génétique sont aussi des paramètres examinés de près dans toutes les études de génétique des populations puisqu'elles renferment des indices importants quant à la présence de certaines forces évolutives. En ce qui concerne les populations, l'estimateur de la diversité génétique de Nei (1977) est généralement utilisé globalement, c'est-à-dire en considérant tous les loci, mais aussi pour chaque locus. De plus, la richesse allélique (Leberg, 2002) est un autre paramètre utile pour des fins de comparaison de la diversité au niveau des populations puisqu'il permet de normaliser le nombre d'allèles par locus ou moyen (pour tous les loci) pour un nombre d'individus identique pour chaque population malgré un échantillonnage inégal, c'est-à-dire lorsque que les populations échantillonées présentent un nombre d'individus inégales.

Au niveau individuel, la diversité peut être mesurée au moins de deux façons, soit d'abord en examinant la proportion des loci qui présentent des allèles différents, c'est-à-

dire des loci hétérozygotes. Cette dernière proportion est un paramètre que l'on appelle l'hétérozygotie à loci multiples (HLM ou MLH en anglais). Cependant, il existe aussi le degré « d'apparentement interne » (appelé internal relatedness ou IR en anglais) qui constitue une mesure de la diversité individuelle. Ce dernier paramètre est basé sur la mesure d'apparentement de Queller et Goodnight (1989), excepté que dans ce cas précis, à chaque locus, deux allèles plutôt que deux paires d'allèles sont comparés. Lorsqu'elle est calculée sur plusieurs loci, cette mesure se retrouve centrée autour de zéro et distribuée normalement, où les valeurs négatives représentent des individus relativement peu apparentés et où de fortes valeurs positives suggèrent des individus consanguins (Garant *et al.*, 2005). Le degré « d'apparentement interne » est donc une mesure représentative de la diversité comme le HLM, mais le calcul permet de pondérer le poids de chaque allèle par sa fréquence dans la population de sorte que deux individus hétérozygotes pour chacun des locus peuvent avoir une diversité individuelle différente si l'un des deux possède des allèles moins fréquents dans la population.

### **1.2.2 Effets des contaminants sur la diversité génétique**

Des changements dans la diversité génétique peuvent se produire naturellement dans des populations qui ne sont pas affectées par des contaminants puisqu'ils peuvent être dus aux mutations, à la migration, à la dérive dans une petite population et lors d'un événement de goulot d'étranglement ou encore par une pression de sélection causée par une perturbation naturelle comme une maladie ou un changement soudain des conditions écologiques. La contamination environnementale peut aussi causer des changements dans la variabilité génétique en augmentant ou diminuant cette dernière, mais la restructuration génétique des populations due aux contaminants peut être complexe (Keane *et al.*, 2005).

En effet, bien que l'augmentation de la diversité génétique dans des populations affectées par un ou plusieurs contaminants peut être théoriquement liée à une sélection différentielle où la tolérance aux contaminants augmenterait en lien avec l'hétérozygotie

individuelle (Van Straalen & Timmermans, 2002), elle est généralement associée aux effets génotoxiques de contaminants mutagéniques (Baker *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Berckmoes *et al.*, 2005; Eeva *et al.*, 2006). Par ailleurs, une diminution de la diversité génétique peut être reliée à des mécanismes plus complexes. Essentiellement, cette diminution est généralement associée à des événements de goulot d'étranglement résultant de l'effet toxique des polluants et/ou de pression de sélection pour des génotypes tolérants dans une population exposée de façon chronique à un environnement pollué. Ainsi, les effets des contaminants sur la génétique des populations méritent beaucoup d'attention puisqu'une faible diversité génétique est associée à une plus grande vulnérabilité aux perturbations environnementales subséquentes et également à une aptitude réduite des populations naturelles (Maes *et al.*, 2005).

Il existe plusieurs façons de classer les polluants : soit par leur nature chimique ou physique, leurs propriétés, leur source, leur utilisation ou encore leur utilisation dans l'environnement (Moriarty, 1999). Cependant, il importe ici de faire une distinction entre les métaux et les xénobiotiques. Ces derniers se démarquent particulièrement des métaux, naturellement présents dans la croûte terrestre, puisque ce sont des contaminants qui ne sont pas produits naturellement dans l'environnement. Les contaminants xénobiotiques sont habituellement des molécules organiques, comme les dioxines et les biphenyles polychlorés (BPC). Puisqu'ils sont difficilement dégradés dans l'environnement, leurs propriétés lipophiles causent de sérieux problèmes de bioaccumulation dans les régions affectées. À l'opposé, tous les métaux se retrouvent naturellement dans l'environnement contrairement aux xénobiotiques, mais seulement certains métaux sont essentiels et donc requis par l'organisme. Ce sont ces métaux qui sont sous contrôle homéostatique, et ce sont aussi ces métaux qui sont non seulement toxiques mais qui peuvent aussi être en déficience (Shaw & Chadwick, 1998).

Selon les études que j'ai examinées sur les effets des contaminants sur la diversité génétique, il ressort que celles qui ont examiné des cas de contamination par des composés organiques ou des xénobiotiques observaient généralement une augmentation de la diversité génétique chez les populations touchées (Chen *et al.*, 2003; Eeva *et al.*,

2006) ou n'observaient pas de changement (Roark *et al.*, 2005; McMillan *et al.*, 2006). Quant aux métaux, ils présentent toutes les réponses possibles, allant de l'augmentation à la diminution de diversité génétique (tel que discuté dans le chapitre 2). Cependant, en raison de leurs propriétés parfois mutagènes, les xénobiotiques sont certainement plus susceptibles de provoquer une augmentation de la diversité que les métaux.

### 1.3 Biologie de la perchaude

La perchaude (*Perca flavescens*) est une espèce d'eau douce appartenant à la famille des percidés. L'origine probable de ce percidé serait des populations de la perche (*Perca fluviatilis*) de l'Asie du nord-est, qui auraient envahi le continent américain durant le Pléistocène (Thorpe, 1977; Todd & Hatcher, 1993). La perchaude et la perche, considérées comme des espèces distinctes, possèdent une morphologie et des histoires de vie équivalentes. Le seul caractère connu qui distingue morphologiquement *Perca flavescens* de *P. fluviatilis* est l'os prédorsal, qui s'étend chez la perchaude entre la première et la deuxième épine dorsale alors qu'elle est antérieure à la première épine dorsale chez la perche (Thorpe, 1977). On la retrouve habituellement dans des eaux claires avec une végétation modérée et un fond vaseux, sablonneux ou encore de graviers. Cependant, son abondance diminue dans des eaux où la turbidité augmente et où la présence de végétation diminue (Scott & Crossman, 1973).

La perchaude est considérée comme une espèce à cycle vital court, puisque son âge à maturité est bas et sa longévité moyenne est de 7 ans. En général, les femelles atteignent la maturité à 3 ans et les mâles un an plus tôt (Thorpe, 1977; Gerlach *et al.*, 2001). Comme chez plusieurs espèces de poissons, les femelles ont une croissance plus rapide et atteignent une taille maximale plus grande que les mâles. Les adultes et les jeunes sont grégaires, souvent en mouvement en groupes de 50-200 individus regroupés par taille alors que les jeunes se retrouvent plus souvent en eau peu profonde et plus près du littoral que les adultes. Les perchaudes se regroupent aussi avec des espèces de menés telles que le mené argenté (Gerlach *et al.*, 2001; Scott & Crossman, 1973). Durant le

cours de sa vie, la perchaude se déplace entre les aires d'alimentation, les eaux profondes où elle passe l'hiver et les aires de reproduction. Des études de marquage-recapture réalisées au lac Michigan ont démontré que plus du tiers des perchaudes se déplaçaient sur des distances plus grandes que 40 km et que 7% de ces dernières avaient parcouru plus de 100 km après trois ans (Miller, 2003).

Finalement, fait notable, les perchaudes changent leur alimentation selon leur taille et les saisons, mais de façon générale, elles s'alimentent tant dans la zone pélagique que benthique et elles préfèrent les insectes immatures, de gros invertébrés et des poissons. Les changements dans la diète de la perchaude en fonction de l'augmentation de sa taille correspondent aux changements de microhabitats (Sediva *et al.*, 2000).

## 1.4 Systèmes étudiés

Dans les régions de Sudbury en Ontario et de Rouyn-Noranda au Québec, l'exploitation minière est considérable depuis des décennies. Les émissions toxiques des fonderies présentes dans ces deux capitales de l'industrie minière ont eu pour effet de créer à plus ou moins grande échelle des gradients de contamination polymétallique dans les lacs avoisinants (Dillon & Smith, 1984; Laflamme *et al.*, 2000). En effet, dans chacune de ces régions, il est possible de retrouver des lacs présentant des niveaux de contamination très variés allant d'une très faible présence des métaux à des niveaux de contamination majeurs. Bien que la présente étude s'est intéressée aux effets évolutifs de la contamination en regroupant ces régions puisqu'elles présentent de nombreuses similarités, elles sont ici présentées de façon indépendante.

### 1.4.1 Sudbury

Dans la région de Sudbury, plus d'un siècle d'activités industrielles ont causé des dommages écologiques sévères. Une grande partie du bassin versant de cette région est

caractérisée par un environnement géologique hautement résistant au ruissellement chimique, rendant ce secteur particulièrement vulnérable. Ainsi, l'acidification des lacs dans la région de Sudbury a été observée dès la fin des années 1950 et déjà en 1971, il a été démontré que les lacs situés jusqu'à 40 kilomètres du centre de la ville présentaient des pH très bas et des concentrations de métaux traces très élevées (Dixit *et al.*, 1987). Avant que ne se déploient les efforts de restauration des écosystèmes, plusieurs espèces aquatiques ont été extirpées des plans d'eau locaux (Beamish & Harvey, 1972; Yan & Welbourn, 1990).

Effectivement, en 1972, en tentant d'évaluer l'état des stocks de poissons dans 4 lacs en périphérie de Sudbury, le ministère des ressources naturelles de l'Ontario n'a pas capturé de poisson après un effort de pêche impressionnant (Scheider *et al.*, 1975). Ils avaient alors attribué cet insuccès à des pH bas et/ou de hauts niveaux de contaminants métalliques (Yan & Dillon, 1984). Puis, le chaulage de certains lacs a été entrepris en 1975 afin de ramener leur pH à des niveaux acceptables (Dixit *et al.*, 1987). Cependant, une tentative de réintroduction de truites dans le lac Lohi, par Powell en 1977 (Ontario Minister of Natural Resources), n'a pas obtenu le succès escompté après qu'il n'eut pas retrouvé de truites vivantes après 4 mois. Il attribua alors cet échec à la toxicité du cuivre (Cu).

Malgré les récents signes de récupération observés, des concentrations élevées persistent toujours dans certains lacs environnants (Nriagu *et al.* 1998). Les concentrations de métaux, particulièrement le Cu et le nickel (Ni), dans les lacs de cette région sont supérieures aux concentrations typiques et diminuent au fur et à mesure que l'on s'éloigne du centre industriel (Pyle *et al.*, 2005). D'ailleurs, selon Borgmann (2001), le Ni serait la principale cause de toxicité des sédiments dans la région de Sudbury. Cependant, dans une étude de Pyle *et al.* (2005), ni le Cu et le Ni n'étaient utiles afin de prédire la condition des poissons étudiés, mais cette étude montrait des signes encourageants pour la diversité des poissons alors que 20 espèces furent capturées dans un total de 12 lacs de la région. Finalement, il est à noter que de récentes études ont démontré des effets de la contamination métallique chez les poissons de la région de

Sudbury (Rajotte & Couture, 2002; Audet & Couture, 2003; Giguère *et al.*, 2006). Par conséquent, le gradient de contamination métallique présent dans les plans d'eau de la région de Sudbury présente un cadre de recherche intéressant pour étudier les effets biologiques associés à la contamination par les métaux.

#### **1.4.2 Rouyn-Noranda**

Les activités minières dans la région de Rouyn-Noranda sont relativement plus récentes, mais sévissent tout de même depuis 1927 (Couillard *et al.*, 2004). Malheureusement, étant donné que les industries rejetant des contaminants dans l'atmosphère et des effluents liquides ont opéré pendant des décennies sans règles environnementales strictes (Commissaire de l'environnement et du développement durable, 2002), ils ont également causé des répercussions sévères aux écosystèmes de la région de Rouyn-Noranda. En effet, les vents dominants de l'Ouest sont responsables du gradient de contamination polymétallique, particulièrement dominé par le Cd et le zinc (Zn), présents dans cette région (Couillard *et al.*, 1993). Le cas du lac Dufault dans ce secteur a été particulièrement bien couvert par la littérature pour reconstituer les conditions historiques qui ont prévalu dans certains lacs de cette région (Cattaneo *et al.*, 2004; Couillard *et al.*, 2004). Ainsi, l'analyse des profils de métaux des sédiments de ce lac a révélé que la concentration maximale de Cu était associée aux activités minières de la mine Amulet entre les années 1937 et 1962 (Couillard *et al.*, 2004). De la même façon, la concentration maximale de Cd a été associée aux activités minières de la mine Norbec entre les années 1964 et 1978 (Couillard *et al.*, 2004).

Par ailleurs, des évidences de récupération de la chimie du lac ont été associées à des efforts mis en place à la fin des années 1980 (Cattaneo *et al.*, 2004). Effectivement, l'étude de Perceval *et al.* (2006) fait état d'une réduction des émissions des fonderies (particulièrement pour le Cd et le Zn) dans les années 1980 qui a mené à des réductions appréciables de 59% en concentration de Cd et de 46% en ce qui concerne la concentration de Cd accumulée par les myses dans les lacs étudiés. Par contre, les

concentrations de Cd et de Cu dans le lac Dufault restent respectivement 18 et 4 fois plus fortes que les normes canadiennes (Couillard *et al.*, 2004).

En ce qui concerne la toxicité de l'environnement, une étude de Borgmann *et al.* (2004) a révélé que les effets toxiques des sédiments du lac Dufault étaient probablement causés par le Cd, au moins chez les amphipodes, avec une contribution possible du Cu. Ainsi, ces deux métaux pourraient avoir un effet indirect sur la croissance et la reproduction des poissons s'ils présentent un impact important sur la communauté benthique (Borgmann *et al.*, 2004). De plus, le Cd serait aussi une source de stress pour *Pyganodon grandis* lors d'une exposition chronique à de faibles concentrations comme c'est le cas dans plusieurs lacs de la région de Rouyn-Noranda (Giguère *et al.*, 2003).

Finalement, la communauté de poissons a aussi subi les répercussions de la contamination minière. Toujours dans le lac Dufault, le doré jaune (*Sander vitreus*) était complètement absent entre les années 1972 et 1985 avant d'être réintroduit en 1987 et de subir une lente récupération jusqu'à ce jour (Cattaneo *et al.*, 2004). Les populations d'autres espèces, notamment la perchaude, ont également été gravement touchées dans plusieurs autres lacs de la région, mais se sont rétablies à des rythmes variés (Cattaneo *et al.*, 2004; obs. pers.). Cependant, de récentes études ont aussi démontré certains effets non négligeables de la contamination métallique chronique actuelle sur les perchaudes de Rouyn-Noranda, et ce même à de faibles concentrations (Giguère *et al.*, 2005; Giguère *et al.*, 2006) Par conséquent, tout comme dans le cas de Sudbury, la région de Rouyn-Noranda présente également un cadre de recherche intéressant pour étudier les effets biologiques associés à la contamination par les métaux.

## **1.5 Problématique et objectifs**

De nombreuses études suggèrent que l'exposition chronique aux métaux exerce une pression de sélection menant à des différences au niveau de la tolérance aux métaux et de la capacité à gérer les concentrations internes de métaux (Rajotte & Couture, 2002;

Audet & Couture, 2003; Campbell *et al.*, 2003 ; Giguère *et al.*, 2006). Par conséquent, cette étude se veut une investigation au niveau du rôle de la contamination métallique dans l'avènement de changements évolutifs dans deux régions minières sujettes à des émissions toxiques émanant de fonderies depuis plus de 50 ans. Ces régions offrent un cadre de recherche unique à l'exploration des effets des métaux sur des populations aquatiques naturelles puisqu'elles présentent, toutes deux, un gradient de contamination polymétallique (principalement Cd, Cu, Zn et Ni) dans les lacs avoisinant leur centre industriel.

Ainsi, nos objectifs spécifiques étaient les suivants : (1) examiner l'implication de la contamination dans la différentiation génétique entre les populations de Rouyn-Noranda et de Sudbury; (2) de tester s'il existe des différences significatives entre les niveaux de diversité génétique des populations provenant de lacs présentant des niveaux de contamination différents; et (3) de tester si le niveau de diversité génétique individuelle est associé avec le niveau de contamination métallique des individus.

Afin de répondre aux trois objectifs spécifiques de cette étude, des perchaudes de populations naturelles d'un grand nombre de lacs le long de chacun des gradients de contamination polymétallique dans chacune des régions géographiques identifiées plus haut ont été échantillonnées et leur niveau de contamination en Cd et en Cu analysées. Initialement, nous devions aussi inclure des mesures de Ni étant donné son importance pour les poissons étudiés, particulièrement dans la région de Sudbury, mais des problèmes expérimentaux nous ont empêché d'obtenir des valeurs mesurables ou fiables. Néanmoins, chez la perchaude, les concentrations tissulaires de Ni sont corrélées à celles du Cd et du Cu, particulièrement dans la région de Sudbury (P. Couture, INRS-ETE, comm. pers.). Il nous paraît donc justifié d'utiliser le Cd et le Cu comme cibles principales pour répondre à nos objectifs.

**2. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch  
(*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a  
polymetallic gradient**

## 2.1 Résumé

Dans les régions de Sudbury en Ontario et de Rouyn-Noranda au Québec, l'exploitation minière est considérable depuis des décennies et les effets de ces industries se sont faits sentir sur les écosystèmes aquatiques. De nombreuses études suggèrent que l'exposition chronique aux métaux exerce une pression de sélection amenant des différences au niveau de la tolérance aux métaux et de la capacité à gérer les concentrations internes de métaux. L'écotoxicologie évolutive est un domaine d'étude ayant récemment émergé de l'association entre la génétique des populations et de l'écotoxicologie, mais ce type d'approche n'a pas encore été appliqué régulièrement aux populations naturelles et spécialement chez les poissons. En utilisant des marqueurs microsatellites, nous avons pu examiner le rôle de la contamination au cadmium et au cuivre en tant que force sélective causant des changements évolutifs importants au niveau de la diversité génétique de 20 populations naturelles de perchaudes distribuées également entre les deux régions minières mentionnées ci-dessus. Nous avons examiné les relations entre la diversité génétique et la contamination des métaux et nous avons trouvé des corrélations significatives au niveau populationnel et individuel (globale et intra-population). La diversité génétique des populations était corrélée négativement avec la contamination au cadmium ( $P < 0,001$ ;  $r^2 = 0,47$ ) suggérant que des baisses démographiques auraient pu survenir à différentes intensités parmi ces populations. Nous avons observé la même corrélation entre la diversité génétique au locus *Pfla L1* et la contamination au cuivre ( $P = 0,005$ ;  $r^2 = 0,33$ ) suggérant plutôt un effet localisé et ainsi une association possible entre ce locus et un gène impliqué dans la tolérance au cuivre. Nous avons également observé que le degré « d'apparentement interne », un indice de diversité génétique individuel, présentait la tendance opposée alors que les individus les plus contaminés au cadmium étaient plus diversifiés que les moins contaminés dans des populations références et contaminées. Nos résultats révèlent donc que quelques décennies de contamination par les métaux ont significativement modifié les patrons de diversité génétique observés chez des populations naturelles de perchaudes vivant en régions minières.

## 2.2 Abstract

Depending on such factors as the intensity and duration of the exposure, and the genetic diversity and connectedness of the starting population, exposure to elevated metal concentrations can result in population level alterations such as demographic bottlenecks or metal-induced selection. These processes can be revealed using a population genetic approach, and have important implications with respect to population persistence. The main objective of this study was to examine the role of metal contamination in driving evolutionary changes by documenting patterns of genetic diversity within and among populations of wild yellow perch (*Perca flavescens*) in two major mining regions that have been subject to metal emissions from smelters for at least 80 years; Rouyn-Noranda, Québec and Sudbury, Ontario.. Yellow perch populations from ten lakes representing a gradient of metal contamination in each of the two lake systems were evaluated concurrently to reveal relationships between metal contamination and genetic diversity. These replicated sympatric observations allowed us to evaluate correlations and infer causal relationships between metal exposure and evolutionary responses in this species. Within-population gene diversity over all loci was negatively correlated with liver cadmium contamination ( $P < 0.001$ ;  $r^2 = 0.47$ ). Similarly, a negative correlation between gene diversity and liver copper contamination was observed at a single locus (*Pfla L1*,  $P = 0.005$ ;  $r^2 = 0.33$ ), suggesting a local effect of copper contamination. Internal relatedness, an index of individual diversity, presented the opposite tendency as the more contaminated individuals were more diverse than were the less contaminated ones in contaminated and reference populations. Our results thus suggest that the selective response to contamination has been large enough to substantially reduce the within-population genetic diversity, despite the fact that the less inbred individuals may be favoured by selection within any given population. Overall, our results reveal that 50+ years of metal contamination have significantly impacted patterns of genetic diversity observed among populations of wild yellow perch in mining areas and as such, may have affected the capacity of populations to respond to future environmental changes.

## **2.3 Introduction**

Anthropogenic toxicants from many sources are known to have a multitude of consequences to natural populations (Posthuma & Van Straalen, 1993; Robb, 1994; Belfiore & Anderson, 2001; Mineau, 2005). Among these, physiological and behavioural endpoints have been extensively explored in the past, but relatively few studies have examined longer-term effects on the genetic composition of populations. Understanding the effects of environmental contaminants on the genome is crucial for preserving the evolutionary potential of natural populations, as genetic diversity provides their potential to adapt to environmental changes (Gillespie & Guttman, 1989; Maes *et al.*, 2005; Frankham *et al.*, 2002). Indeed, the interaction between genetic diversity and fitness is a key element in evolutionary biology and the importance of understanding this process for conservation biology is also well acknowledged (DeSalle & Amato, 2004).

Contaminants may have opposite effects on genetic diversity. On the one hand, an increase in genetic variation has been reported when the toxicant is mutagenic (Baker *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Berckmoes *et al.*, 2005; Eeva *et al.*, 2006). Moreover, differential selection associated with contaminants could theoretically contribute to increased genetic diversity under the hypothesis that tolerance to contaminants may increase as a function of individual heterozygosity (Van Straalen & Timmermans, 2002). On the other hand, although it may increase the average fitness of the population in the short-term, selection may be accompanied by a loss of genetic variation if the selective differential associated with tolerance to contaminants has been large (Baker *et al.*, 2001). Many studies have suggested that decreases in individual heterozygosity may in turn affect population growth and recruitment as such decreases may be associated with decreased resistance to diseases, growth rate and fertility (Leberg 1990; Reed & Frankham, 2003; Hartl & Clark, 1997). Thus, as pointed out by McMillan *et al.* (2006), rapid adaptation to novel environmental stressors is no guarantee of long-term population sustainability.

The main objective of this study was to examine the role of metal contamination in driving evolutionary changes by documenting patterns of genetic diversity within and among populations of wild yellow perch (*Perca flavescens*) in two major mining regions that have been subject to metal emissions from smelters for at least 80 years; Rouyn-Noranda (RN), Québec and Sudbury (S), Ontario. A copper smelter has been in operation since 1927 in the city of Rouyn-Noranda, and although emissions are currently controlled, lakes located downwind from this smelter are contaminated with metals such as Cd, Cu and Zn due to historical atmospheric deposition (Couillard *et al.* 2004). Similarly, lakes in the Sudbury region have been affected by historical inputs from nickel mining and smelting operations. The selected lakes included some pristine lakes with low ambient metal levels, below the Canadian Water Quality Guidelines for these metals; some highly contaminated lakes, with metal concentrations many times over the Canadian Guidelines; and a broad range of lakes between these extremes (Campbell *et al.* 2003). Moreover, some of the most contaminated lakes included in this study were fishless some decades ago and now only yellow perch are abundant (Scheider *et al.*, 1975; V.Bourret pers. obs.). These two regions offer an excellent framework to explore the effects of metal contamination on wild aquatic populations. They both present polymetallic (mostly Cd, Cu, Zn and Ni) gradients in lakes surrounding their industrial centers (Giguère *et al.*, 2005; Pyle *et al.*, 2005).

By sampling yellow perch from a large number of lakes along two polymetallic gradients of contamination in different geographic regions and by determining their levels of hepatic Cd and Cu (as metals representative of regional anthropogenic inputs and indicative of the extent of environmental contamination), we sought to test: (1) whether yellow perch from the two regions are genetically distinct; (2) whether there are significant differences in levels of genetic diversity in populations inhabiting lakes with contrasting metal levels (i.e., whether metal contamination exerted a selective pressure on populations along the polymetallic gradients), and (3) whether individual genetic diversity is associated with the concentration of accumulated metal within individual fish (i.e., whether fish with high liver metal concentrations within a lake population exposed to the same contamination differ genetically from those with lower metal concentrations).

To address these issues, we used basic population genetics parameters and assessed relationships between the levels of contamination and differentiation both between populations and among individuals within populations.

## **2.4 Materials and Methods**

### **2.4.1 Fish Sampling**

Based on previous studies (reviewed in Pyle *et al.*, 2005), ten lakes were selected in each mining region on the basis of their level of contamination by copper and cadmium, in order to cover a broad range of lakes along the spatial metal gradient present in these regions (Figure 2.1). Sampling was carried out between the end of July and the beginning of August in both 2004 and 2005. In each lake, a minimum of 50 yellow perch of all sizes available were collected using a seine net; in contaminated lakes we increased the sample size to 100 so as to allow us to investigate relationships between within-population gene diversity and levels of contaminants. Each fish was measured (total length, TL), weighed (Wt), and its sex determined. We then calculated Fulton's condition factor (FCF; (weight (g)) x (total length (cm))<sup>3</sup> x 1000). Opercular bones were collected for age determination, and the liver as well as fin clips were collected for tissue metal analysis and DNA extraction, respectively. We targeted only the liver as a way to simplify the already extensive analyses because according to a study previously done by our group, from a practical point of view, the liver seems to be the organ best suited for biomonitoring, since its accumulated concentrations most closely reflected Cd and Cu exposure (Giguère *et al.*, 2004).

### **2.4.2 Liver metal concentrations**

Liver samples were placed in 10 mL Teflon vials (Cole-Parmer) and weighed after lyophilisation. Dry samples were digested in 4 mL of analytical grade nitric acid in a microwave oven at an output of 750 W for intervals of 30 s, 20 s, 15 s, and finally 10 s. The Teflon vial caps were sealed tightly to prevent sample evaporation during the microwave procedure. The samples were allowed to cool between intervals to prevent excess pressure within the vials. Certified reference material from the National Research

Council of Canada (TORT2) was used to monitor analytical accuracy and recovery, and blanks were inserted every 10 samples to control for contamination. Recoveries averaged  $96.3 \pm 4.5\%$  for Cd and  $93.7 \pm 4.5\%$  for Cu (mean  $\pm$  S.E.). Digests were then diluted in deionised MilliQ water and concentrations of cadmium (Cd) and copper (Cu) were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES) or by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) when the concentrations were too low for detection by ICP-AES. Although tissue nickel was also measured, it is not reported in this paper, since its concentration was below detection limits in several samples and available data were judged unreliable based on poor reproducibility and variable recovery rates.

#### **2.4.3 Microsatellite genotyping**

Fin clips were used to extract DNA following the salt-extraction method developed by Aljanabi & Martinez (1997). Samples were then screened for variation at nine microsatellite loci. Simplex polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed for six microsatellite loci developed for yellow perch (*Pfla L1*, *Pfla L3*, *Pfla L4*, *Pfla L5*, *Pfla L6*, *Pfla L9*; Leclerc *et al.*, 2000) and three for walleye (*Sander vitreus*) (*Svi L10* Wirth *et al.*, 1999; *Svi 17*, Borer *et al.*, 1999; *Svi E*, Eldridge *et al.*, 2002). PCRs were performed in 12.5  $\mu$ L reaction volumes composed of double-distilled H<sub>2</sub>O, 1.0  $\mu$ L 10X reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% TritonX-100, 50 mM KCl), 50-100 ng of template DNA, 0.3  $\mu$ L dNTPs (or deoxynucleosides, the monomers that DNA polymerase uses to form DNA) (10 mM final concentration for each dNTP), 0.16  $\mu$ M fluorescently labelled (forward) primer, 0.32  $\mu$ M (final concentration) of reverse primer, and 0.4 U *Taq* DNA polymerase. The PCR program used involved the following steps: 95°C for 5 min; 35 cycles at 95°C for 30 s, 45 s at a marker-specific annealing temperature (see Table 2.1) and 45 s at 72°C; and a final 10 min at 72°C. Amplified products were resolved on an ABI 3100 genetic analyser (Applied Biosystem Inc.) using GeneScan™ - 500 LIZ™ as a size standard and scored using GENESCAN 3.7 and GENOTYPER 3.7 software (Applied Biosystem Inc.).

#### **2.4.4 Genetic data analyses**

##### *Genetic diversity*

Genetic diversity within each population was quantified using standard descriptive statistics for each locus and globally: observed and expected heterozygosities ( $H_O$  and  $H_E$ ) as well as allelic diversity ( $A$ ) using GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset, 1995) and Nei's (1977) estimator of gene diversity using FSTAT 2.9.3 (Goudet *et al.*, 2002). Global and per locus allelic richness ( $\hat{A}$ ) were corrected (using the rarefaction method of FSTAT 2.9.3) to the smallest sample ( $n = 50$ ) to increase the power of detecting differences in  $\hat{A}$  (Leberg, 2002). Conformity to Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) expectations for each locus and across all loci, and linkage disequilibrium (LD) between all locus pairs were also tested using GENEPOP 3.4. When applicable, the sequential Bonferroni correction for multiple tests was applied to maintain the table-wide significance level at  $\alpha = 0.05$  (Rice, 1989). For other statistical tests (see below), the 0.05 level of significance was used unless otherwise stated.

##### *Neutrality test*

The rationale of most neutrality tests is that while genetic drift and migration affect the whole genome to the same extent, selection is targeted to a few loci only, and thus a locus that presents a significantly different pattern than the remainder of the genome might be located in a chromosomal region under selection. Schlötterer (2002) proposed a test of neutrality to be assessed on microsatellites: the *LnRH* method. The test assumes the stepwise mutation model, neutrality and mutation-drift equilibrium and therefore expects the variance in diversity to be a good estimator of microsatellite variability. The test statistics calculate the ratio of the genetic variabilities of two populations for each locus to identify those that differ significantly in variability from the remainder of the genome (Schlötterer, 2002). Maple v7.0 (2001) was used to calculate the gene diversity ratio between all possible pairs of populations and a Fisher F statistic was used to identify the loci that differed significantly from neutrality in their gene diversity ratios.

### *Differentiation*

Genic differentiation ( $G$ ; Guo & Thompson, 1992) at individual loci between all pairs of samples and significance values over all loci were obtained using Fisher's method (Ryman & Jorde, 2001) available in GENEPOP 3.4. We compared global and pair-wise measures of genetic differentiation based on allelic identity ( $F$ -statistics, e.g.  $\theta_{ST}$ ; Weir & Cockerham, 1984) and allele size ( $R$ -statistic, e.g.  $R_{ST}$ ; Michalakis & Excoffier, 1996) to highlight the relative importance of drift ( $\theta_{ST}$ ) vs. mutation ( $R_{ST}$ ) for population differentiation with the allele size randomization test of Hardy *et al.* (2003) using 1000 permutations with SPAGeDi 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002). If the null hypothesis of  $F_{ST} = R_{ST}$  were rejected ( $\alpha = 0.05$ ),  $R_{ST}$  measures would be considered the better indicator of genetic differentiation between study sites, because of the contribution of stepwise mutation model (SMM)-like mutations in the genetic differentiation. Here, acceptance of the null hypothesis led to the calculation of genetic differentiation among lakes or populations using the  $F_{ST}$  of Weir and Cockerham ( $\theta$ ) as calculated with GENETIX (Belkhir *et al.*, 2001) after 1000 permutations for significance. An analysis of molecular variance (AMOVA) was performed using ARLEQUIN 3.01 (Schneider *et al.*, 2000) in order to assess the relative importance of regional (Sudbury vs. Rouyn-Noranda) and population genetic differences within each region.

### *Internal Relatedness*

As a measure of individual genetic diversity, we used internal relatedness (IR; Amos *et al.*, 2001), which is based on the relatedness measure of Queller & Goodnight (1989), except that at each locus, two alleles rather than two pairs of alleles are compared. Over several loci, the resulting values are approximately normally distributed and centered on zero, with negative values suggesting relatively outbred individuals and high positive values being suggestive of inbreeding (Garant *et al.*, 2005). IR values were computed using an EXCEL (Microsoft Inc.) macro written in Visual Basic provided on the William Amos website (<http://www.zoo.cam.ac.uk/zootaff/amos/>, Department of Zoology, Cambridge University, UK).

### *Effective Population size and Bottleneck test*

Estimates of contemporary (parental generation) inbreeding effective population sizes ( $N_e$ ) were produced using the linkage disequilibrium method on single temporal samples. This method was developed by Hill (1981) and Bartley *et al.* (1992) and is based on the expectation that smaller populations will accumulate more disequilibrium over time. Estimates were performed on each sampled population using NEESTIMATOR 1.3 (Peel *et al.*, 2004). We considered that the linkage disequilibrium method was the most appropriate for our study because (i) the methodology requirements are appropriate for the sampling employed in this study (Waples, 1991; Bartley *et al.*, 1992); (ii) we did not have temporal sampling to estimate  $N_e$  from temporal methods when only one generation separates samples (Waples, 1989; Tallmon *et al.*, 2004); and (iii) it does not appear to be seriously affected by a reduction in population size (Waples, 2005).

We also tested for recent and major reduction in population size using BOTTLENECK 1.2.02 (Piry *et al.*, 1999), which should be particularly sensitive to recent population bottlenecks. Populations that have experienced a bottleneck event usually present a correlated reduction in allele numbers ( $k$ ) and gene diversity ( $H_e$ ). However, the resulting gene diversity in a recently bottlenecked population should be higher than the expected equilibrium gene diversity ( $H_{eq}$ ) that is computed from the observed number of alleles ( $k$ ), under the assumption of a constant-size (equilibrium) population (Luikart *et al.* 1998). Bottleneck significance was tested with the Wilcoxon sign-rank test (Luikart *et al.*, 1998), under a two-phase mutation model (TPM; more appropriate for microsatellites; Di Rienzo *et al.*, 1994), with 95% one-step (SMM) and 5% infinite allele models (IAM), and 12% variance of multiple-step mutations (Luikart *et al.*, 1998) for 5000 iterations as recommended by Piry *et al.* (1999).

## **2.4.5 Statistical analysis**

### *Population differentiation and metal concentrations*

Mantel tests (Mantel, 1967) and partial Mantel tests (Legendre & Legendre, 1998) were computed in R 2.2.1 (The R core development team) to examine the relationships between genetic differentiation, metal contamination, geographic distance and lake areas (all parameters expressed as pair-wise distances in matrices). We used pair-wise  $F_{ST}$  as a ratio ( $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ ) to test for isolation by geographic distance between populations based on lakes coordinates (Rousset, 1997). Lake areas were calculated using ArcGIS 9 (ESRI inc.) and matrices of metal contamination were built based on differences (absolute values) of mean tissue metal concentration between populations for Cd and Cu. To first test for effects of geographic distance and lake area on genetic differentiation, simple Mantel tests were applied on two matrices for 10 000 randomizations. We then computed partial Mantel tests for 10 000 randomizations to examine the individual impact of cadmium and copper contamination on the extent of genetic differentiation while controlling for geographic distance or lake area.

### *Within-population gene diversity and levels of contaminants*

We first tested whether single variables, namely total length, weight, age, Fulton's condition factor (FCF) and tissue metal concentration (Cd and Cu) reported as means for every population were correlated with overall (global effect of Heterozygosity-Fitness-Correlation, HFC) and individual (local HFC effects) loci gene diversity of populations ( $H$ ) as well as allelic richness, both computed using FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2002) (see Pemberton 2004 for a review of HFC). If univariate analysis revealed a significant correlation, we then used multiple regression models to test for the inclusion of more than one variable. We also tested whether both overall and single-locus gene diversity were correlated to lake area and effective population size ( $Ne$ ). Univariate statistics were computed in SAS 9.1 (SAS Institute Inc.) as correlations to first test for significant relationships and then as regressions to explore the relative individual effects of correlated variables on the dependent variables of gene diversity.

Secondly, we tested for the existence of an association between levels of contaminants (both Cu and Cd) within individuals and individual gene diversity (measured by IR). Here, individuals were classified into four quartiles according to their liver metal concentrations, and comparisons among those groups were performed using the LSMEANS procedure available in SAS. We then performed a less stringent analysis since LSMEANS did not reveal a significant difference among groups despite the fact that a visual trend was observed in the data (see Results). Thus, we tested whether there was a linear relationship among groups using the method of linear contrast. This analysis was performed both by pooling individuals of all populations into a single analysis as well as separately for each population.

## **2.5 Results**

### **2.5.1 Samples and hepatic metal concentrations**

Liver digests and measurements of Cd and Cu concentrations were performed on a total of 1393 fish collected over 2 summers in Rouyn-Noranda (RN) and Sudbury (S) (Figure 2.2). Thus, we analysed 50 fish in 12 lakes and 100 fish from 8 highly contaminated lakes with an expected high level of contamination, except for Lake Dufault where 93 fish were analyzed. In accordance with previous studies (Couture *et al.*, 2008ab; Pyle *et al.*, 2008), mean liver Cd concentrations in contaminated populations from Rouyn-Noranda were higher than those from Sudbury, and reciprocally, the highest liver Cu concentrations were recorded in Sudbury fish (Figure 2.2).

### **2.5.2 Genetic data analyses**

#### *Genetic diversity*

Locus *Pfla L4* was excluded from all analyses because of scoring problems related to amplification and locus *Svi L10* was discarded because of generalized strong deficits in heterozygotes. Therefore, seven loci were considered for all further analyses. All loci were moderately polymorphic, with the total number of alleles per locus ranging from 11 to 20 (mean = 14), and expected heterozygosity across all samples ranging from 0.21 to 0.50 (mean = 0.37) (Table 2.2). Allelic richness corrected to  $n = 50$  using the rarefaction method ranged from 1 to 20 alleles per locus per population.

The null hypothesis of the Hardy-Weinberg equilibrium was not rejected after correcting the significance level or the number of pair-wise comparisons of populations and loci ( $\alpha = 0.00037$ ,  $k = 135$ ), without any locus-sample showing significant deviation. Fisher's exact test of genotypic linkage disequilibrium did not reveal significant linkages after correction ( $\alpha = 0.00013$ ,  $k = 393$ ) and only 28 significant linkages if considering the

standard level of significance of 5%, a value close to expectation by chance alone ( $n = 20$ ). Therefore, we accepted the null hypothesis of independence of the seven loci kept for analyses.

#### *Neutrality test and Population differentiation*

The neutrality test revealed a lower proportion of significant standardized  $\ln RH$  than expected by chance (one of 19 comparisons) on five out of seven loci. Loci *Pfla L6* and *Svi 17* showed more significant values than expected by chance under the standard 5% significant level but none under the 1% level. Moreover, they did not present significant p-values for the two-way Fisher test. Thus, the neutral hypothesis could not be rejected for any loci under the assumption of the  $\ln RH$  test, and therefore all were retained for subsequent analyses of population differentiation.

Multilocus  $R_{ST}$  values were not significantly higher than the simulated distribution of  $R_{ST}$  values ( $\rho R_{ST}$ ) ( $P = 0.23$ ) (Table 2.3). This result indicated that the  $F$ -statistic ( $\theta_{ST}$ ) was more appropriate for assessing differentiation between populations, and that there was no apparent effect of long-term historical isolation on population differentiation (Hardy *et al.* 2003). In a global test over all loci, significant genic differentiation was observed ( $P < 0.001$ ), which translated into a global  $F_{ST}$  value of 0.362, reflecting an overall pronounced level of differentiation among populations. Global  $F_{ST}$  values within each region also indicated moderate to strong differentiation among populations at this scale ( $RN = 0.162$ ,  $S = 0.262$ ). Pair-wise  $F_{ST}$  values (estimated by  $\theta$ ) were all significant except for two comparisons (Daisy and Richard in Sudbury, Évain and Hélène in Rouyn-Noranda), and ranged from 0.010 and 0.680 (Table 2.4). The AMOVA results further confirmed the observed population structure, whereby 29.5% of the overall genetic variance was attributable to differences between regions and 15.6% to differences among populations within a region (Table 2.5).

### *Effective Population size and Bottleneck test*

Estimates of contemporary effective population sizes ( $N_e$ ) with the linkage disequilibrium method ranged from 20.4 (Geneva) to infinity (nine populations). No evidence of population bottlenecks was detected according to BOTTLENECK: after correction ( $\alpha = 0.0025$ ,  $k = 20$ ). No significant departure from mutation-drift equilibrium was observed for any sampled population, based on the Wilcoxon sign-rank test, under the assumption that all loci fit the two-phase mutation model TPM (data not shown).

### **2.5.3 Statistical analysis**

#### *Population differentiation and levels of contaminants*

Simple Mantel tests showed significant correlation between genetic differentiation ( $\theta_{ST}$ ) and geographic distance ( $P < 0.0001$ ;  $r^2 = 0.487$ ) and non-significant correlation between  $\theta_{ST}$  and lake areas ( $P = 0.884$ ). Therefore, partial Mantel tests were used to further explore relationships between population differentiation and metal contamination (Cd and Cu) while controlling for geographic distance. These tests did not show a significant relationships with Cd contamination ( $P = 0.210$ ) but revealed marginally significant relationships for Cu contamination ( $P = 0.063$ ) (Table 2.6), whereby 5.2% ( $r^2 = 0.052$ ) of overall genetic differentiation among populations was explained by this metal concentration. Partial tests computed on individual loci revealed that this relationship was driven by *Pfla L1*, which was the only significant locus ( $P = 0.021$ ) and indicated that 8.0% ( $r^2 = 0.080$ ) of genetic differentiation at this locus could be explained by differences in Cu contamination among lakes.

#### *Within-population gene diversity and levels of contaminants*

Univariate tests did not show significant correlations between overall within-population gene diversity or allelic richness with total length ( $P = 0.200$ ), weight ( $P = 0.152$ ), age ( $P = 0.174$ ), FCF ( $P = 0.942$ ), effective population size ( $P = 0.146$ ), or lake area ( $P = 0.712$ ).

However, a strong negative correlation was found between overall gene diversity and Cd ( $P = 0.0005$ ,  $r^2 = 0.472$ ) (Figure 2.3). A negative, albeit weaker correlation was also found between allelic richness and Cd ( $P = 0.0085$ ,  $r^2 = 0.289$ ). Tests performed on individual loci revealed that four out of seven loci contributed significantly to this pattern with Cd (*Pfla L3*,  $P = 0.0133$ ,  $r^2 = 0.256$ ; *Pfla L9*,  $P = 0.0028$ ,  $r^2 = 0.365$ ; *Svi 5*,  $P = 0.0184$ ,  $r^2 = 0.231$ ; *Svi17*,  $P = 0.0028$ ,  $r^2 = 0.366$ ). In contrast, there was no significant association between either overall gene diversity or allelic richness and Cu contamination ( $P = 0.480$ ;  $P = 0.501$ ). However, a highly significant correlation between gene diversity and Cu contamination was observed for locus *Pfla L1* only ( $P = 0.005$ ,  $r^2 = 0.326$ ) (Figure 2.4). Tests using multiple regression analysis failed to reveal any significant contribution from additional variables to the observed patterns of genetic diversity.

#### *Within-individual gene diversity and levels of contaminants*

Pooling all individuals from all populations into an integrated analysis using the LSMEANS procedure, we found that individual genetic diversity (IR) was not significantly different among groups formed on the basis of Cu ( $P = 0.655$ ) but a marginally significant trend was observed for Cd ( $P = 0.056$ ). Moreover, a significant linear relationship was detected among those groups for Cd contamination ( $P = 0.036$ ) with the linear contrast test, which indicated that IR was positively correlated with individual Cd contamination (Figure 2.5). The latter analysis performed separately for each population revealed that the overall significant relationship was mainly driven by the significant or marginal positive linear correlation between IR and Cd contamination for four populations from the two lakes with highest level of Cd contamination, Dufault ( $P = 0.034$ ) and Vaudray ( $P = 0.062$ ), and two lakes with low levels of contamination, Dasserat ( $P = 0.044$ ) and James ( $P = 0.044$ ) (Figure 2.6). On the other hand, there was no significant linear relationship detected among pooled groups for Cu contamination ( $P = 0.493$ ).

## 2.6 Discussion

The main objective of this study was to examine the role of metal contamination in driving evolutionary change by documenting patterns of genetic diversity among populations of wild yellow perch in two major mining regions that were subjected to high metal emissions from smelters for over 50 years (~1930 to ~1985). The emissions are currently much better controlled, but lakes in the affected regions have not yet fully recovered (Gunn *et al.*, 1995; Perceval *et al.*, 2006). More specifically, we tested whether (i) contamination was involved in genetic differentiation between populations; (ii) within-population genetic diversity varied as a function of metal contamination, and (iii) whether individual genetic diversity was associated with the metal concentrations within individuals. Overall, our results revealed that metal contamination has had a significant impact at both the population and individual levels of genetic structuring, although apparent differential effects were observed between Cu and Cd. This study demonstrates that metal contaminants associated with mining activities have evolutionary impacts on the genetic makeup of yellow perch populations from northern Ontario and Québec.

As mentioned in the Introduction, lakes in the two study regions were subjected to contamination by more than one metal. Based on the metal concentration gradients (i.e., the ratio of maximum to minimum concentrations), the major contaminants in the Rouyn-Noranda area are zinc and cadmium. Homeostatic control of internal zinc concentrations in yellow perch is very effective (Giguère *et al.*, 2004, 2005), and these and other studies (Couture *et al.* 2008a; Pyle *et al.* 2008) have concluded that it is unlikely that indigenous perch are directly affected by zinc. The situation is different for cadmium, however, for which tissue metal levels respond directly to the gradient in ambient cadmium. Indeed, several lines of evidence suggest that cadmium is the metal primarily responsible for the biological deterioration of the lakes in the Rouyn-Noranda area (Campbell *et al.* 2003; Borgmann *et al.*, 2004). In the Sudbury lakes, copper and nickel are the metals that demonstrate the greatest concentration gradient, although aqueous, but not sediment, cadmium concentrations in some lakes approach the high

values reported in Rouyn-Noranda lakes (Couture *et al.*, 2008a). For invertebrates in the Sudbury region, Borgmann *et al.* (2001) concluded that nickel was the metal most likely to cause toxicity. This metal was also demonstrated to accumulate in Sudbury yellow perch (Rajotte & Couture 2002; Pyle *et al.*, 2005; Giguère *et al.* 2006) as well as in fish from Rouyn-Noranda in the Spring (Couture *et al.* 2008a) and was related to effects on condition and metabolism in fish from both regions (Pyle *et al.* 2008; Couture *et al.* 2008b). In the following discussion we have focused on hepatic Cd and Cu as predictors of metal-induced effects. However, given the polymetallic nature of the contamination and the positive correlations reported for several hepatic metals in fish from these regions (Cd, Cu, Ni, Se and Zn; Couture *et al.* 2008a), we cannot establish definite cause→effect relationships.

First, partial Mantel tests controlling for the effect of geographic distance did not show a significant relationship between the extent of population differentiation and Cd or Cu contamination when performed over all loci. However, the analysis performed on individual loci revealed that a significant association between population structuring observed at locus *Pfla L1* and Cu contamination. Despite the fact that the neutrality test did not identify *Pfla L1* as an outlier locus potentially under selection, the above results suggest that selection imposed by Cu contamination may be partially responsible for the different pattern of population differentiation observed at this marker. This hypothesis was further supported by the results we observed when testing for an association between within-population genetic diversity at single loci and levels of metal contamination. Again, a highly significant negative correlation between gene diversity and Cu contamination was observed for locus *Pfla L1* only. Whereas many studies have demonstrated similar effects of pollution on genetic diversity either at the population or the individual level (see below), we are aware of only one study where a particular chemical agent impacted patterns of population differentiation. Thus, in a study of natural populations of brown rats resistant to a rodenticide, Kohn *et al.* (2003) showed that resistance was apparently due to directional selection in these populations and was assigned to a specific locus (*Rw*) containing a known microsatellite marker. Their results also showed that the extent of population differentiation was more pronounced at this

marker than others. We thus propose that the differential pattern of population structuring and genetic diversity observed at *Pfla L1* and only for Cu could be indicative of the directional selective effect of this metal on a chromosomal region comprising this locus (Hansson & Westerberg, 2002). Admittedly, however, future experimental studies will be needed to rigorously test this causal effect.

Secondly, we observed a strong negative correlation between overall gene diversity and Cd concentration independent of fish age, length, weight, condition factor, effective population size and lake area. In contrast, no such global effect was observed for Cu, indicating a differential evolutionary impact of these two contaminants on the genetic composition of yellow perch populations. This study adds to the results of previous work performed on other species, which also revealed that contamination may cause a significant reduction of genetic diversity in impacted populations. Reductions of genetic diversity have been associated with a wide range of contaminants, either inorganic (Peles *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Berckmoes *et al.*, 2005; Maes *et al.*, 2005; Keane *et al.*, 2005), or organic (Baker *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Theodorakis *et al.*, 2006). For instance, in a study on the European eel (*Anguilla anguilla*), Maes *et al.* (2005) reported a reduced genetic variability in polluted eels at allozyme loci in addition to a significant negative correlation between a metal bioaccumulation index (for nine metals) and condition. Moreover, Keane *et al.* (2005) reported that the mean genetic similarity of dandelions (*Taraxacum officinale*) was always significantly higher at urban sites than at rural sites. They also observed a significant negative correlation between the number of genotypes at any given site and increasing amounts of airborne particular matter. Arguably, there are also many studies that failed to reveal significant effects of contamination on within-population genetic diversity (Berckmoes *et al.*, 2005; Roark *et al.*, 2005; McMillan *et al.*, 2006). While these results may truly reflect a lack of such effects, many confounding factors may have hampered the detection of a significant effect of contamination. McMillan *et al.* (2006) argued that there are several reasons why population genetics change and why their consequences cannot be predicted simply by the magnitude of contaminant exposure. For example, population expansion and successful immigration of new individuals may help populations to buffer against losses

of genetic diversity. Berckmoes *et al.* (2005) concluded that genetic diversity in seven wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations was not affected by metal contamination and they proposed two hypotheses that could have contributed to this conclusion, even though they had some evidence of contamination-related genetic structuring. These authors first suggested that the pollution-induced stress was not intense enough or that insufficient time had passed to induce a population genetics response. Then, they proposed that important gene flow among populations could have masked the effects of metals on local populations. Here, the effects of such potential confounding factors were mitigated by the fact that we analyzed a large number of populations among which the amount of gene flow is apparently very low, as revealed by the high  $F_{ST}$ -values that we observed. For instance, applying the standard relationship linking  $F_{ST}$  to gene flow (Nm estimate ( $F_{ST} = 1/(4Nm+1)$ )), the mean  $F_{ST}$  value of 0.362 we observed suggests that the mean level of gene flow among all populations analysed is roughly 0.5 migrant per generation. Moreover, lakes were selected to reflect a strong gradient of contamination on the basis of both duration (up to 50 years) and intensity of exposure to metal contaminants.

In studies where a significant impact of contaminants on genetic diversity has been reported, the causal effect has been associated with two main explanations: a demographic bottleneck induced by pollution, or selective pressure exerted by contaminants (Bickham *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2001; Keane *et al.*, 2005). Here, using our analyses of locus diversity, we did not find any significant evidence for a population bottleneck in any lake sampled, apparently suggesting that contamination has not caused a pronounced and very rapid population decline. Admittedly, however, the small number of loci that we used coupled with probability adjustments to account for simultaneous multiple tests may not have offered sufficient power to detect recent bottlenecks (Cornuet & Luikart, 1996). Moreover, the stepwise mutation model (SMM) is statistically conservative (Luikart & Cornuet, 1998; Spencer *et al.*, 2000); the heterozygosity excess test is sensitive to the severity of the population size reduction, and should detect only historical population bottlenecks that were severe (Luikart & Cornuet, 1998). Thus, we cannot rigorously exclude the possibility that reduced diversity in lakes contaminated by

Cd was indeed caused by population bottlenecks on the basis of this test alone. In fact, it is known that habitat quality in some of these lakes was much worse in the past than it is today, and that perch populations in those lakes were reduced to very small numbers (Yan & Welbourn, 1990). Furthermore, we did not find any significant correlation between contemporary estimates of population effective size or lake area (which in lakes of similar morphometry and nutrient status could represent a surrogate for census size; see Johnson *et al.* 1992) with gene diversity. This result suggests that present demographic conditions cannot explain the low level of diversity observed in contaminated populations. Consequently, we propose that the most likely explanation for the pattern of genetic diversity we observed is linked to the important demographic reductions associated with metal contamination that occurred in the past when environmental conditions were harsher. While our results do not allow us to conclude that demographic decline in contaminated lakes was associated with intense selective pressures acting on unfit genotypes (but see below), they do suggest that metal pollution has had an evolutionary impact on perch populations since we observed a significant loss of genetic variation in these populations. Theory predicts, and empirical studies have shown, that a reduction of genetic diversity may in turn reduce individual fitness due to inbreeding effects, and reduce as well the evolutionary potential to adapt to environmental change (Theodorakis, 2001; Van Straalen & Timmermans, 2002; Reed & Frankham, 2003).

Previous physiological studies suggest that metal contamination has caused significant phenotypic change in the yellow perch populations we studied. In their study of Sudbury lakes, Rajotte & Couture (2002) reported that nucleoside diphosphate kinase activity, an indicator of biosynthesis, was higher in the most metal-contaminated fish. This suggested an increased rate of protein turnover and a bioenergetic cost of metal exposure, which corresponded to a lower growth rate in these fish. Furthermore, their results suggested that yellow perch from the most metal-contaminated lakes exhibited lower aerobic capacities. A more recent study by Audet & Couture (2003) revealed lower muscle aerobic and anaerobic capacities and higher liver anaerobic capacities in a contaminated population compared to a control one. Direct effects of metals on the yellow perch

endocrine systems, which were detected in a pattern linked to accumulated metal concentrations (i.e., along the metal exposure gradient), have been reported in lakes sampled in the Rouyn-Noranda area and also in Sudbury (Gravel *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2008). Adult and 1<sup>+</sup> perch collected from the more contaminated lakes exhibited an attenuated cortisol stress response *in vivo*, whereas young-of-the-year did not. Lower levels of the thyroid hormones T3 and T4, key hormones for regulation of intermediary metabolism and osmoregulation, were measured in adult yellow perch from contaminated lakes (Levesque *et al.*, 2003; Gravel *et al.*, 2005). However, in order to assess whether these phenotypic differences are the result of evolutionary change (change in the genetic architecture), the quantitative genetic parameters (heritability, genetic (co)variance) would have to be determined in controlled experiments. Such experiments would also allow testing whether the observed phenotypic differences between populations from contaminated and non contaminated lakes have been driven by divergent selection, for instance by comparing the extent of quantitative genetic differentiation at phenotypic traits ( $Q_{ST}$ ) with that of neutral expectations quantified at microsatellite loci ( $F_{ST}$ ) (Spitze, 1993).

Further evidence that Cd contamination may exert differential selective pressures associated with levels of genetic diversity was suggested by the test of association between levels of an individual's genetic diversity (as measured by the Internal relatedness parameter) and its Fulton condition factor (FCF) and its metal contamination level. No significant relationship was observed with FCF, or for levels of accumulated Cu. However, this analysis did reveal that individual genetic diversity (IR) was positively correlated with individual Cd contamination. The analysis performed separately for each population revealed that the overall significant relationship was driven by a positive correlation between IR and Cd contamination in four populations. Overall, while these results do not allow us to generalize the positive association between levels of individual genetic diversity and tolerance to metal contamination, they do provide at least partial evidence that less inbred perch are more tolerant to Cd contamination in some circumstances. In such cases then, one would predict that individual fitness should increase with individual genetic diversity, and consequently, selective pressures exerted

by Cd contamination should favour the maintenance of higher genetic diversity within contaminated populations. For instance, Peles *et al.* (2003) also observed significant higher individual diversity in earthworm (*Lumbricus rubellus*) populations inhabiting contaminated sewage sludge, and suggested that heterozygosity may be selectively advantageous to individuals that are exposed to multiple toxicants. Here, however, we observed a pronounced reduction in genetic diversity as a function of increased levels of Cd contamination. Taken as a whole, these results suggest that the selective response to contamination has been large enough to substantially reduce the effective population size and thus within-population genetic diversity, despite the fact that the less inbred individuals may be favoured by selection within any given population. Further experiments to assess the relative survival or growth of more diverse *versus* less diverse individuals would allow a more rigorous assessment of the importance of Cd contamination as a selective force acting on different genotypes.

### *Conclusions*

With reference to our three original objectives, we have demonstrated (1) that yellow perch from the Rouyn-Noranda and Sudbury regions are genetically distinct, (2) that overall genetic diversity decreases along a gradient of increasing Cd contamination and that Cu contamination may be involved in reducing the diversity at one of the seven loci we analysed, and (3) that within a lake population, increased metal tolerance (indicated by higher tissue Cd concentrations) is associated with higher genetic diversity. Overall, our results indicate that measurable evolutionary impacts of pollution can be observed in just an average human lifetime, thus adding to the growing evidence that human activities are not only affecting the demography and the ecology of wild species, but also their evolutionary trajectory (Ashley *et al.*, 2003). Namely, since genetic diversity provides the potential to adapt to selective forces (Gillespie & Guttman, 1989), and despite the recent recovery of many lakes impacted by toxic industrial emissions (Gunn *et al.* 1995), our results support the hypothesis that Cu, but more importantly Cd contamination, may have at least partially compromised the evolutionary potential of those species composing aquatic communities from these regions with respect to future

environmental change. Finally, given that these regions are also affected by zinc and nickel contamination, investigation of the possible impacts of these metals on the genetics of wild aquatic species is also needed to better understand the consequences for chronically exposed populations. Also, diversity and gene expression of specific genes involved in metabolic activities or detoxification mechanisms should be the focus of the next steps towards improving our understanding of selective pressures exerted by metal contamination. Indeed, as stated by Staton *et al.* (2001), a single gene approach may provide the strongest model system for the genetic assessment of environmental impacts on natural population where there is strong evidence of gene/contaminant interaction.

**Table 2.1** Microsatellite loci characteristics: structure of repeat motif, primer sequence, allele size range, PCR annealing temperature ( $T_A$ ) in °C, number of alleles observed ( $A$ ) and reference publication are provided.

Locus	Species	Repeat motif	Primer sequence (5' to 3')	Size range (bp)	$T_A$ (°C)	$A$	Reference
<i>Pfla L1</i>	<i>Perca flavescens</i>	(GA) <sub>27</sub>	F: AAGCAGCCTGATTATATAC	90-126	50	12	Leclerc <i>et al.</i> 2000
			R: CAGACAATTAAACATGCAAC				
<i>Pfla L3</i>	<i>Perca flavescens</i>	(TG) <sub>18</sub>	F: GCCGAATGTGATTGAATG	115-190	53	20	Leclerc <i>et al.</i> 2000
			R: CGCTAAAGCCAACTTAATG				
<i>Pfla L4</i>	<i>Perca flavescens</i>	(TC) <sub>37</sub>	F: AAAGGGAAAAGGCTACGGTG	80-135	53	15	Leclerc <i>et al.</i> 2000
			R: ATCAGCAGTGCTTATGTTG				
<i>Pfla L5</i>	<i>Perca flavescens</i>	(GT) <sub>27</sub>	F: TGAGAGCCCATGAATTAC	126-160	53	10	Leclerc <i>et al.</i> 2000
			R: GCAAACACAGCCAATTAG				
<i>Pfla L6</i>	<i>Perca flavescens</i>	(TG) <sub>18</sub>	F: GCATACATATAAGTAGAGCC	135-180	53	16	Leclerc <i>et al.</i> 2000
			R: CAGGGTCTTCACTATACTGG				
<i>Pfla L9</i>	<i>Perca flavescens</i>	(TG) <sub>24</sub>	F: GTTAGTGTGAAAGAACATCTGC	210-280	59	14	Leclerc <i>et al.</i> 2000
			R: TGGGAAATGTGGTCAGCGGC				
<i>Svi 5</i>	<i>Sander vitreus</i>	(AC) <sub>18</sub>	F: CTTAATTCCCCCAGCAAC	160-220	52	15	Eldridge <i>et al.</i> 2002
			R: TGTGTGCATCATTATCACTG				
<i>Svi 17</i>	<i>Sander vitreus</i>	(AC) <sub>13</sub>	F: GCGCACTCTCGCATAGGCCCTG	140-190	52	11	Borer <i>et al.</i> 1999
			R: CGTTAAAGTCCTTGGAAACC				
<i>Svi L10</i>	<i>Sander vitreus</i>	(CA) <sub>33</sub>	F: GGTAATGTATTCAGTTATTGC	190-280	51	39	Wirth <i>et al.</i> 1999
			R: GCTGTTCTCCAAGTAAAGCC				

**Table 2.2** Summary of genetic diversity at 9 microsatellite loci among, from left to right, 10 populations from Sudbury and 10 from Rouyn-Noranda: \*N the number of individuals genotyped from each population on the first line (except for locus *Pfla L4*, where N is given above other locus data), and per locus in each populations: \*\*Allelic richness ( $\bar{A}$ ) corrected to n = 50 using the rarefaction method of FSTATS 2.9.3 (Goudet, 2002), correlation value of heterozygote deficit ( $F_{IS}$ ) and expected ( $H_E$ ) and observed ( $H_O$ ) heterozygosities. \*\*\*Indicate locus showing significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (P = 0.05). \*\*\*\*For All loci, statistics represent compilation of the seven loci that were retained for analyses (loci *Pfla L4* and *Svi L10* were excluded).

Locus	A	Sudbury										Rouyn-Noranda										
		N*	99	100	100	100	50	50	50	50	50	93	100	100	100	50	50	50	EV	HE		
<i>Pfla L1</i>	12	$\bar{A}^{**}$	3	3.7	3.8	4.9	6	5	3	7	5	5	5.2	2	3.9	3.9	4	3	5	2	6	5
		$F_{IS}$	-0.02	-0.06	-0.07	-0.02	-0.08	-0.11	0.22	-0.03	0.17	-0.01	0.01	0.05	-0.01	-0.02	-0.15	-0.04	-0.10	-0.24	0.20	0.06
		$H_e$	0.23	0.16	0.18	0.55	0.47	0.29	0.33	0.68	0.58	0.44	0.48	0.15	0.31	0.33	0.52	0.46	0.33	0.50	0.50	0.51
		$H_o$	0.23	0.17	0.19	0.56	0.50	0.32	0.26	0.70	0.48	0.44	0.47	0.14	0.31	0.34	0.60	0.48	0.36	0.62	0.40	0.48
<i>Pfla L3</i>	20	$\bar{A}$	5	8.5	4.4	3	7	10	5	10	6	10	5.5	3	6.2	5.2	4	1	8	9	7	8
		$F_{IS}$	-0.07	-0.03	0.06	0.03	-0.01	0.02	-0.10	0.18	0.06	0.04	0.10	0.04	-0.02	0.10	-0.07	NA	0.05	-0.08	-0.09	0.09
		$H_e$	0.63	0.76	0.63	0.53	0.63	0.78	0.35	0.34	0.55	0.48	0.30	0.18	0.45	0.31	0.19	0.00	0.57	0.48	0.48	0.31
		$H_o$	0.68	0.78	0.59	0.51	0.64	0.76	0.38	0.28	0.52	0.46	0.27	0.17	0.46	0.28	0.20	0.00	0.54	0.52	0.52	0.28
<i>Pfla L4***</i>	15	$N$	98	44	46	96	49	47.0	30	31	49	47	73	82	88	76	44	40	43	42	42	39
		$\bar{A}$	7.2	9.2	4.9	8.3	9.4	7.8	4	8	6.5	12	9.8	4	9.8	7.9	8.7	3.7	9.4	9.5	6	6.8
		$F_{IS}$	0.07	0.92	0.31	0.30	0.69	0.83	1.00	1.00	0.64	0.47	0.85	0.89	0.71	0.81	0.71	0.93	0.91	0.89	0.78	0.80
		$H_e$	0.73	0.82	0.41	0.81	0.84	0.76	0.59	0.84	0.72	0.89	0.84	0.68	0.87	0.83	0.77	0.37	0.78	0.85	0.75	0.77
		$H_o$	0.68	0.07	0.28	0.57	0.27	0.13	0.00	0.00	0.29	0.47	0.12	0.07	0.25	0.16	0.23	0.03	0.07	0.10	0.17	0.15
<i>Pfla L5</i>	10	$\bar{A}$	2.9	4.2	3.5	3.9	4	4	2	4	3	4	5.1	3	3	3	2	5	5	6	4	
		$F_{IS}$	-0.04	0.04	-0.03	0.03	-0.18	-0.05	-0.03	0.02	-0.06	0.01	-0.10	-0.01	0.04	0.00	-0.16	-0.21	0.11	0.00	0.04	0.06
		$H_e$	0.11	0.54	0.63	0.55	0.53	0.55	0.50	0.28	0.15	0.52	0.68	0.34	0.58	0.53	0.64	0.45	0.63	0.44	0.73	0.63
		$H_o$	0.11	0.52	0.65	0.53	0.62	0.58	0.52	0.28	0.16	0.52	0.74	0.34	0.56	0.53	0.74	0.54	0.56	0.44	0.70	0.60

<i>Pfla L6</i>	16	$\bar{A}$	2.8	3.8	5.9	4	5	4	1	5	2	8	5.3	3	4.6	2.5	5	3	5	7	5	6
		$F_{is}$	0.06	-0.07	0.03	-0.06	0.15	0.27	NA	0.11	-0.08	-0.04	-0.06	-0.27	0.00	0.10	-0.19	-0.06	0.08	0.14	0.10	0.03
		$H_e$	0.15	0.38	0.40	0.37	0.38	0.41	0.00	0.63	0.15	0.61	0.51	0.52	0.39	0.44	0.52	0.15	0.70	0.65	0.71	0.66
		$H_o$	0.14	0.41	0.39	0.39	0.32	0.30	0.00	0.56	0.16	0.64	0.54	0.66	0.39	0.40	0.62	0.16	0.64	0.56	0.64	0.64
<i>Pfla L9</i>	14	$\bar{A}$	3.5	4.3	5.2	4	6	3	2	7	5	9	3.9	2	5.6	2	3	3	7	7	5	6
		$F_{is}$	0.10	0.00	0.08	-0.08	-0.15	0.11	-0.03	0.05	0.11	0.13	0.05	-0.05	-0.02	-0.05	-0.08	0.25	0.00	0.01	-0.14	0.10
		$H_e$	0.48	0.42	0.20	0.43	0.42	0.40	0.08	0.74	0.61	0.51	0.23	0.10	0.26	0.10	0.17	0.13	0.42	0.53	0.44	0.53
		$H_o$	0.43	0.42	0.18	0.46	0.48	0.36	0.08	0.70	0.54	0.44	0.22	0.11	0.26	0.11	0.18	0.10	0.42	0.52	0.50	0.48
<i>Svi 5</i>	15	$\bar{A}$	3	5.5	4.6	3.6	4	5	4	5	4	7	3.2	2	3.4	2.5	2	1	5	5	5	4
		$F_{is}$	-0.07	0.00	0.12	-0.04	0.11	-0.03	0.02	-0.05	-0.08	0.29	-0.01	-0.02	-0.08	0.17	0.00	NA	-0.06	0.26	0.17	-0.04
		$H_e$	0.25	0.27	0.33	0.12	0.13	0.27	0.59	0.30	0.20	0.22	0.04	0.05	0.24	0.10	0.02	0.00	0.19	0.13	0.39	0.33
		$H_o$	0.26	0.27	0.29	0.12	0.12	0.28	0.58	0.32	0.22	0.16	0.04	0.05	0.26	0.08	0.02	0.00	0.20	0.10	0.32	0.34
<i>Svi 17</i>	11	$\bar{A}$	2	3.9	1.8	4	6	5	3	5	3	5	3.1	1	2.9	2.5	3	1	4	4	5	3
		$F_{is}$	0.17	0.08	-0.01	-0.05	0.02	0.24	0.29	-0.09	0.20	0.01	-0.01	NA	0.28	-0.03	-0.02	NA	-0.03	-0.05	-0.05	-0.01
		$H_e$	0.31	0.34	0.02	0.65	0.67	0.39	0.39	0.59	0.53	0.30	0.05	0.00	0.10	0.07	0.08	0.00	0.12	0.13	0.15	0.06
		$H_o$	0.25	0.31	0.02	0.68	0.66	0.30	0.28	0.64	0.42	0.30	0.05	0.00	0.07	0.07	0.08	0.00	0.12	0.14	0.16	0.06
<i>Svi L10***</i>	39	$\bar{A}$	15.5	11.3	9	13.4	15	13	5	20	14	19	8.9	5.7	8.3	6.6	10	6	9	10	9	10
		$F_{is}$	0.32	0.28	0.06	0.32	0.50	0.24	0.18	0.16	0.22	0.30	0.19	0.11	0.40	0.60	0.20	0.29	0.27	0.10	0.34	0.26
		$H_e$	0.92	0.75	0.77	0.91	0.91	0.70	0.75	0.90	0.87	0.88	0.69	0.72	0.66	0.57	0.68	0.64	0.77	0.71	0.78	0.78
		$H_o$	0.63	0.54	0.73	0.62	0.46	0.54	0.62	0.76	0.68	0.62	0.56	0.64	0.40	0.23	0.54	0.46	0.56	0.64	0.52	0.58
<i>All loci****</i>		$\bar{A}$	3.2	4.9	4.2	3.9	5.4	5.1	2.9	6.1	4	6.9	4.5	2.3	4.2	3.1	3.4	2	5.6	5.6	5.6	5.1
		$H_e$	0.31	0.41	0.34	0.45	0.46	0.44	0.32	0.51	0.40	0.44	0.33	0.19	0.33	0.27	0.31	0.17	0.42	0.41	0.49	0.43
		$H_o$	0.30	0.41	0.33	0.46	0.48	0.41	0.30	0.50	0.36	0.42	0.33	0.21	0.33	0.26	0.35	0.18	0.41	0.41	0.46	0.41

**Table 2.3** Summary of the allele size permutation test of Hardy *et al.* (2003) for population differentiation:  $\theta_{ST}$  and  $R_{ST}$  estimates for each locus employed and across all loci P-values of significance tests ( $R_{ST} > \rho R_{ST}$ ) with asterisks (\*\*for  $P < 0.01$  level).

Locus	$\theta_{ST}$	$R_{ST}$	$\rho R_{ST}$	P-value
<i>PflaL1</i>	0.347	0.494	0.286	0.004**
<i>PflaL3</i>	0.337	0.465	0.294	0.157
<i>PflaL5</i>	0.273	0.178	0.267	0.891
<i>PflaL6</i>	0.250	0.048	0.204	0.995
<i>PflaL9</i>	0.483	0.293	0.407	0.695
<i>Svi5</i>	0.151	0.135	0.149	0.465
<i>Svi17</i>	0.582	0.429	0.488	0.650
All loci	0.362	0.389	0.331	0.233

**Table 2.4** Number of loci significantly ( $\alpha = 0.05$ ) different for each population pair based on the genic differentiation test (above the diagonal) and pairwise measures of genetic differentiation based on allelic identity ( $\theta_{ST}$ ) (below the diagonal). \*NS asterisks indicate non-significant comparison.

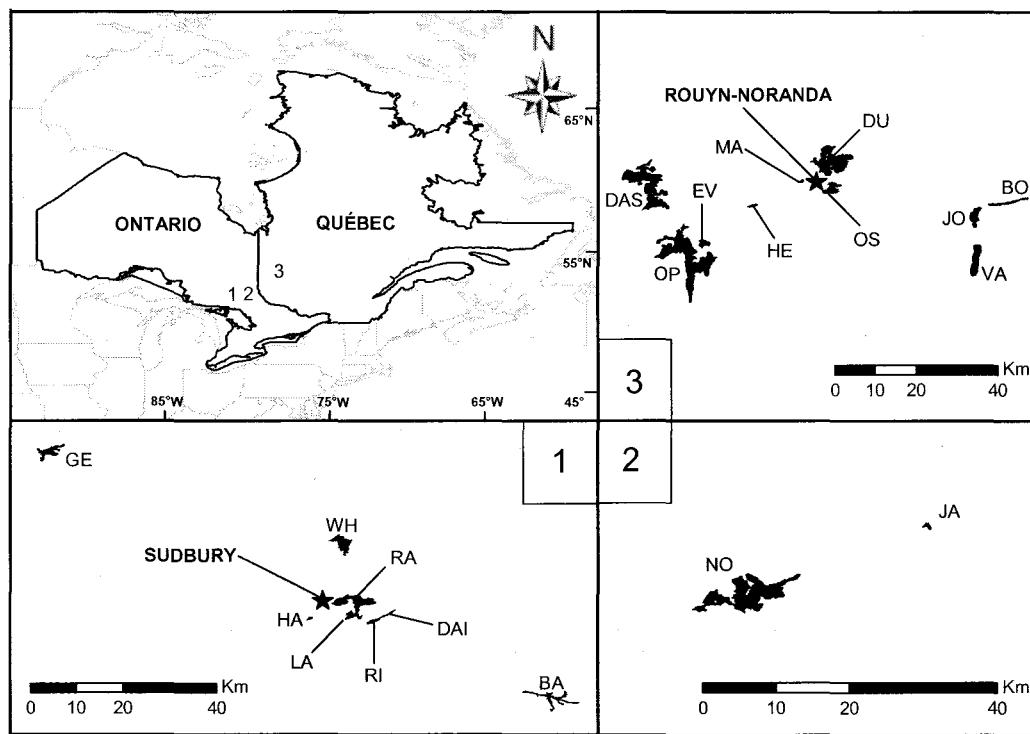
	Sudbury										Rouyn-Noranda									
	HA	WH	DAI	LA	RA	RI	BA	GE	JA	NO	OS	DU	JO	BO	VA	MA	OP	DAS	EV	HE
HA		6	7	7	7	7	7	7	7	7	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7
WH	0.300		7	6	7	7	6	7	6	7	7	7	6	6	7	7	6	6	7	7
DAI	0.092	0.340		6	0	4	7	7	7	6	7	7	7	7	6	6	6	6	7	7
LA	0.160	0.292	0.077		7	2	7	7	6	5	6	6	6	6	6	6	6	6	7	6
RA	0.099	0.334	*NS	0.070		5	7	7	7	5	7	7	7	7	7	6	5	6	7	7
RI	0.144	0.305	0.049	0.010	0.044		7	7	5	4	6	6	6	7	6	6	5	6	7	7
BA	0.336	0.419	0.238	0.248	0.223	0.209		7	5	6	6	7	7	7	7	7	6	6	7	7
GE	0.299	0.430	0.296	0.324	0.283	0.327	0.427		6	7	7	7	6	7	5	7	7	7	7	7
JA	0.311	0.447	0.221	0.244	0.225	0.215	0.151	0.458		6	7	7	6	5	5	5	6	5	5	5
NO	0.445	0.420	0.305	0.294	0.283	0.275	0.206	0.507	0.308		7	7	7	7	7	6	4	5	6	6
OS	0.610	0.578	0.486	0.485	0.492	0.509	0.477	0.680	0.569	0.144		5	5	6	5	4	5	6	7	6
DU	0.527	0.471	0.426	0.411	0.414	0.411	0.353	0.595	0.440	0.073	0.101		5	6	5	1	4	4	4	4
JO	0.578	0.508	0.500	0.468	0.494	0.483	0.437	0.629	0.468	0.262	0.345	0.195		2	4	5	4	5	6	5
BO	0.540	0.465	0.462	0.424	0.448	0.431	0.396	0.580	0.411	0.243	0.351	0.214	0.011		5	6	4	5	5	4
VA	0.595	0.536	0.493	0.465	0.497	0.493	0.448	0.659	0.489	0.279	0.375	0.264	0.084	0.076		4	3	5	5	5
MA	0.547	0.517	0.434	0.416	0.425	0.415	0.329	0.625	0.431	0.066	0.163	0.015	0.245	0.251	0.335		5	4	6	5
OP	0.522	0.484	0.418	0.373	0.393	0.368	0.312	0.572	0.355	0.146	0.312	0.137	0.119	0.101	0.214	0.128		3	2	2
DAS	0.503	0.468	0.380	0.355	0.353	0.348	0.303	0.555	0.382	0.066	0.147	0.061	0.198	0.190	0.246	0.068	0.067		3	2
EV	0.470	0.393	0.383	0.346	0.353	0.336	0.282	0.511	0.326	0.127	0.269	0.106	0.089	0.071	0.152	0.118	0.034	0.078		0
HE	0.479	0.387	0.392	0.359	0.367	0.353	0.292	0.523	0.343	0.132	0.264	0.111	0.073	0.060	0.116	0.135	0.062	0.086	*NS	

**Table 2.5** Hierarchical partitioning of genetic variance (AMOVA) between both geographical regions (Rouyn-Noranda and Sudbury), among populations within regions and within individual populations. Significance at the \*\*\* $P < 0.001$  level.

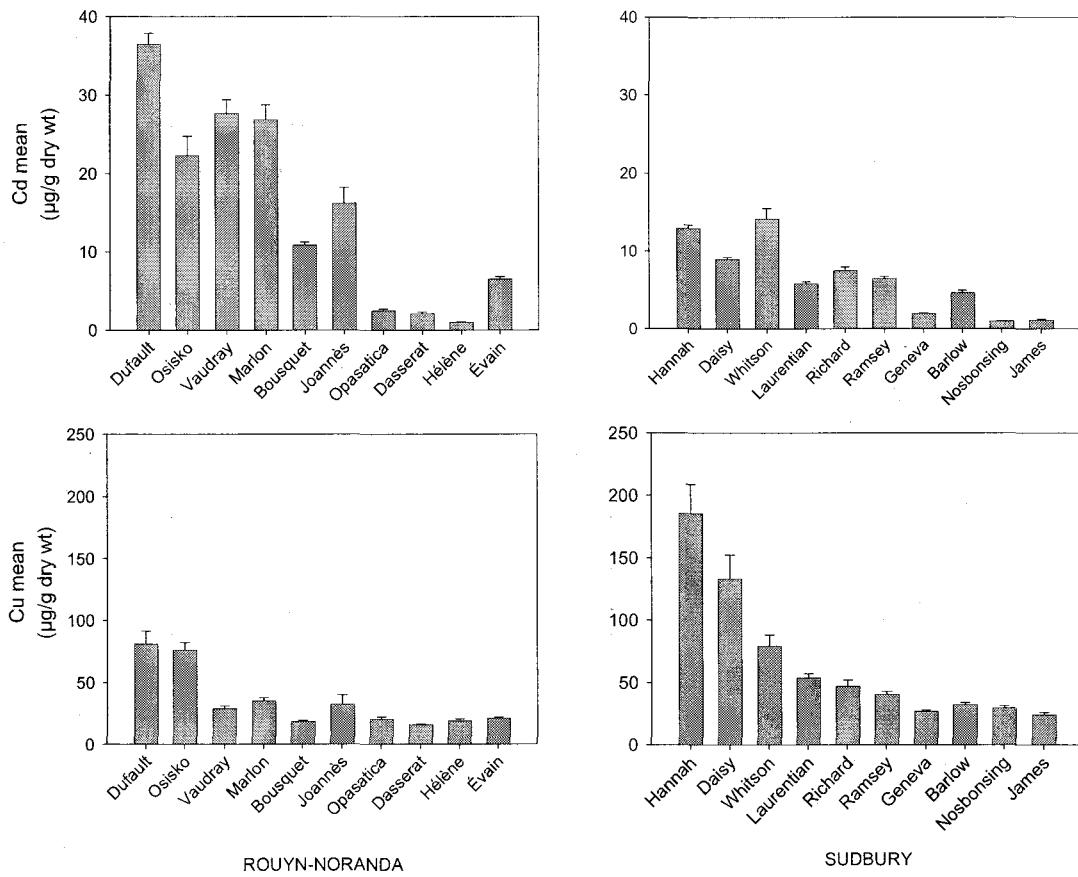
Source of variation	d.f.	Percentage of variation	P
Between regions	1	29.47	***
Among populations within regions	18	15.59	***
Within populations	2764	54.94	***

**Table 2.6** Results of simple and partial Mantel tests showing the relationships between genetic differentiation ( $\theta_{ST}$ ), geographic distance (Geo. Dist., shortest distance) and differences in cadmium contamination between paired populations (absolute values). Geographic distances were log transformed before Mantel tests. Significant or marginal correlations are showed in bold characters.

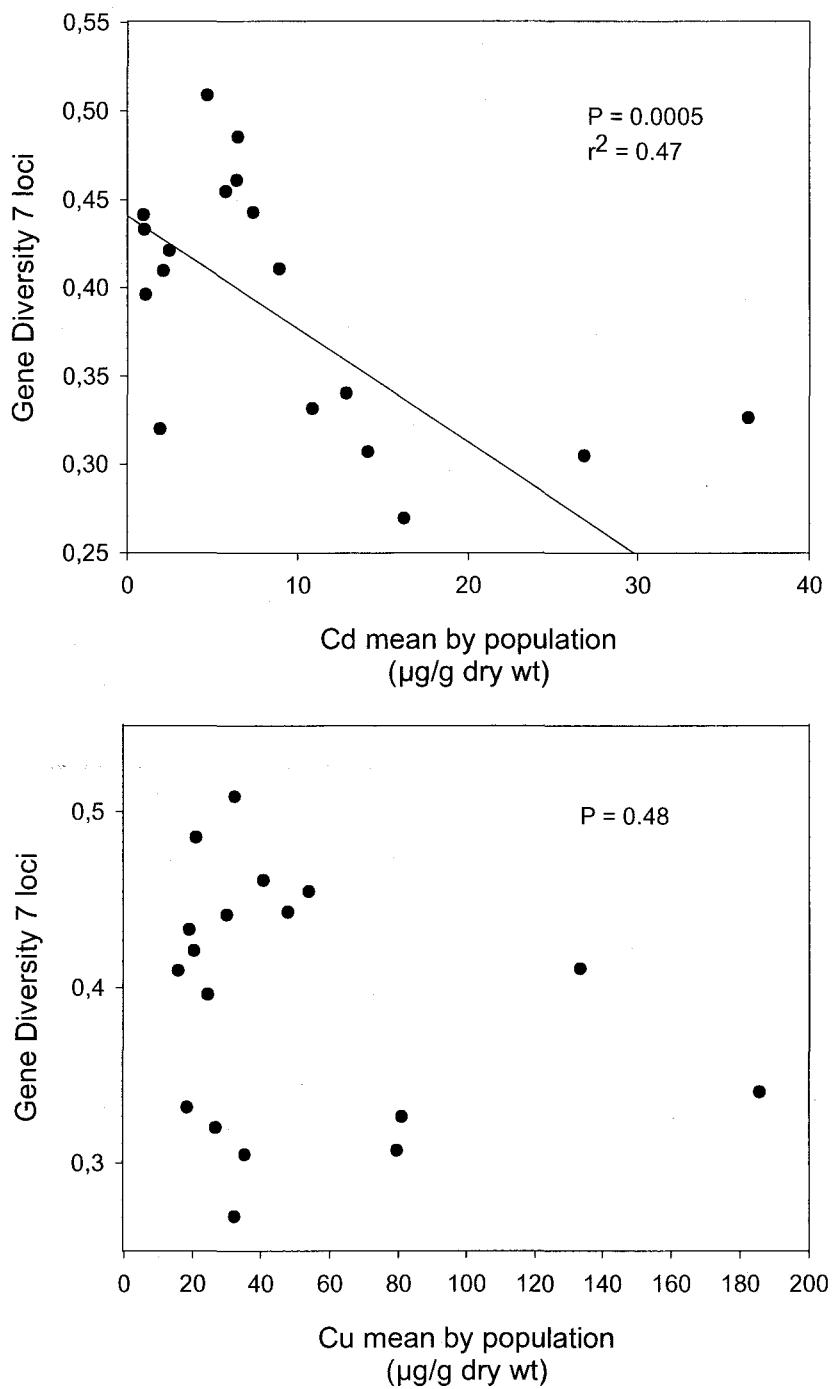
Locus	Mantel test / Partial Mantel test	P-value significance	$r^2$
All loci	Differentiation vs. Geographic distance	<0.0001	0.487
	<b>Differentiation vs. Cu Controlling for Geo. dist.</b>	<b>0.063</b>	<b>0.052</b>
	Differentiation vs. Cd Controlling for Geo. dist.	0.2098	0.007
<i>PflaL1</i>	Differentiation vs. Geographic distance	0.0023	0.105
	<b>Differentiation vs. Cu Controlling for Geo. dist.</b>	<b>0.0207</b>	<b>0.080</b>
	Differentiation vs. Cd Controlling for Geo. dist.	0.9737	0.034



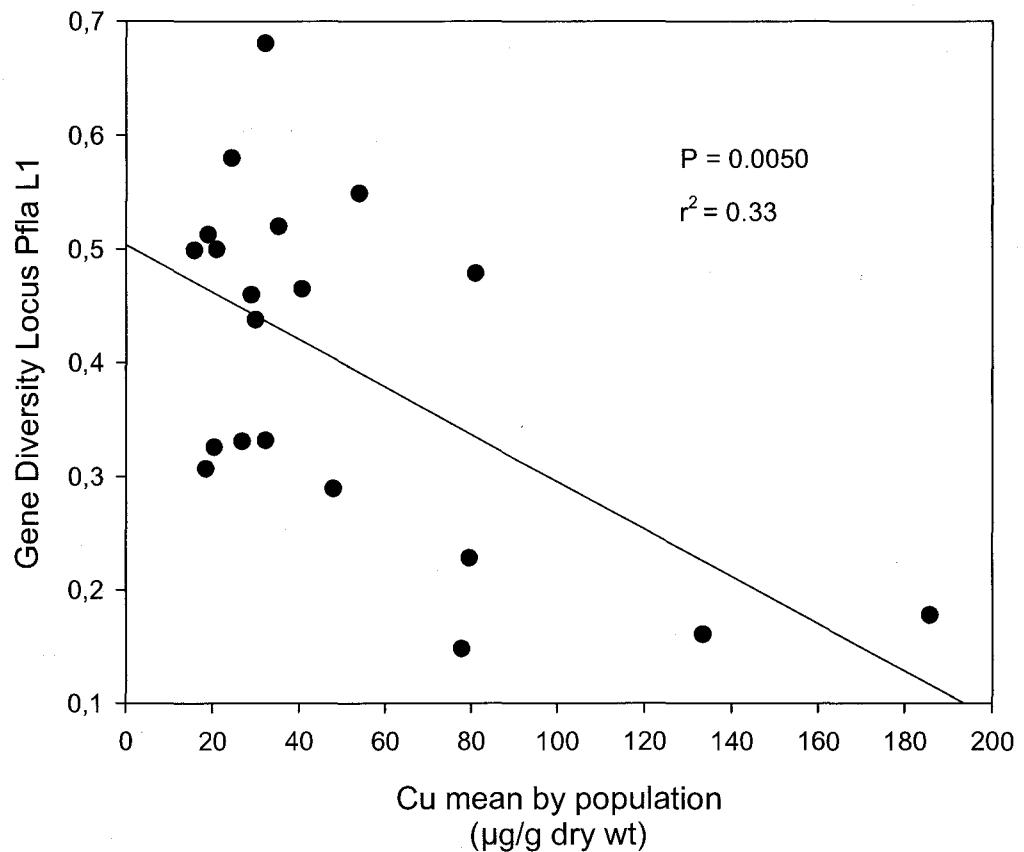
**Figure 2.1** Location of the 20 lakes in this study (10 in Ontario and 10 in Québec). Lakes sampled in Ontario are: Geneva (GE), Whitson (WH), Hannah (HA), Ramsey (RA), Laurentian (LA), Richard (RI), Daisy (DAI), Barlow (BA), Nosbonsing (NO) and James (JA). Lakes sampled in Québec are: Dasserat (DAS), Opasatica (OP), Évain (ÉV), Hélène (HÉ), Marlon (MA), Dufault (DU), Osisko (OS), Vaudray (VA), Joannès (JO) and Bousquet (BO).



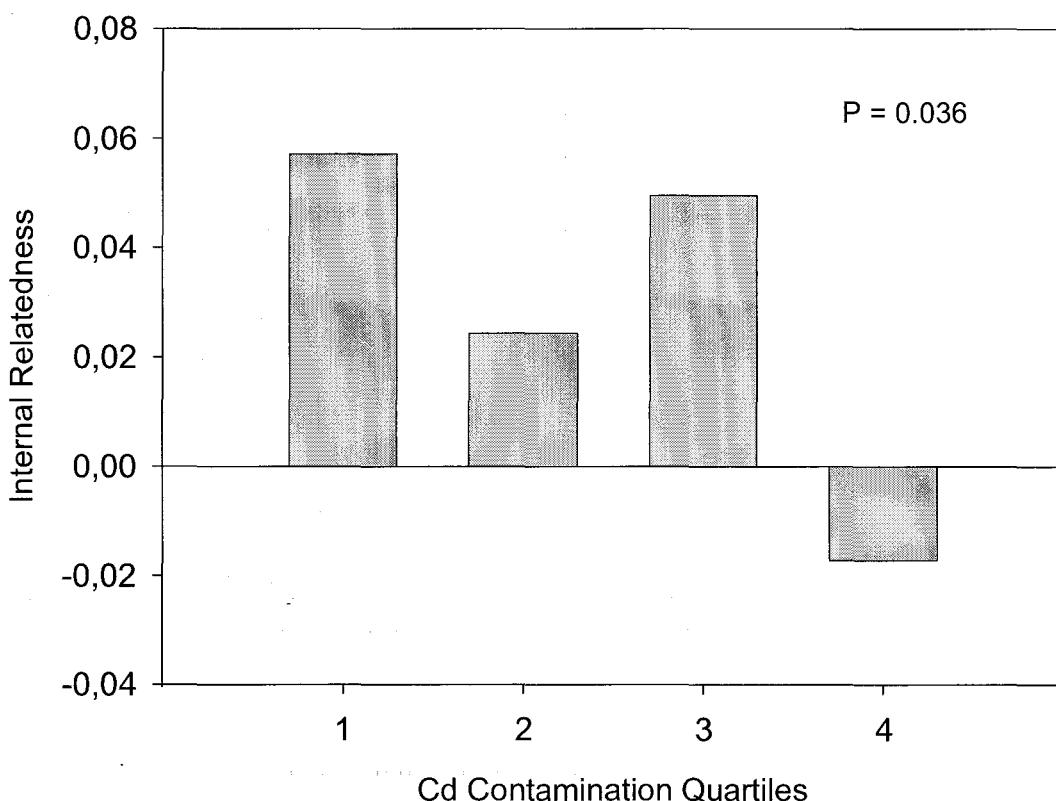
**Figure 2.2** Concentrations of Cd (top panels) and Cu (bottom panels) (mean  $\pm$  S.E.,  $\mu\text{g/g}$  dry weight), in liver samples from individuals of populations from Rouyn-Noranda, Québec (left panels) and Sudbury, Ontario (right panels).



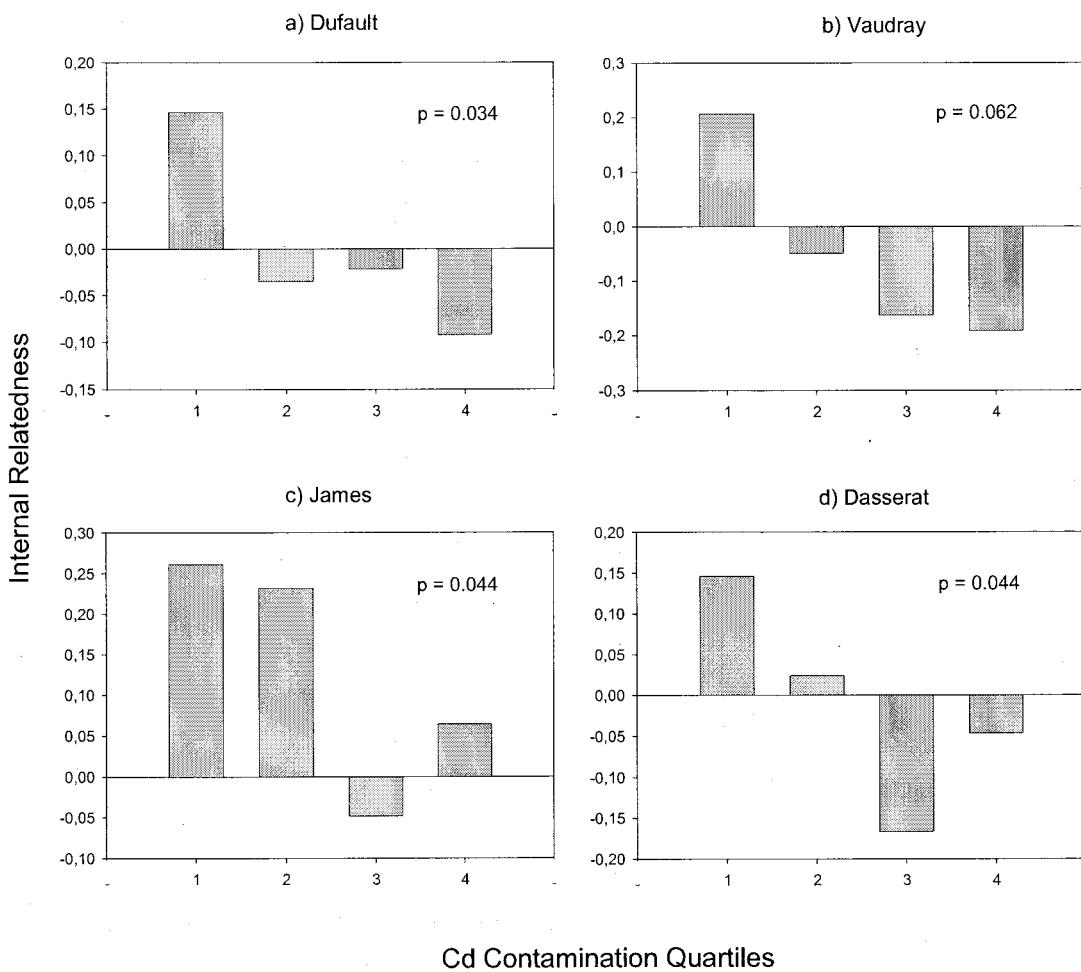
**Figure 2.3** Relationship between overall gene diversity of populations calculated from 7 microsatellite loci vs.: top panel) mean liver Cd concentration and bottom panel) mean liver Cu concentration. P-values and adjusted regression are indicated.



**Figure 2.4** Relationship between gene diversity of populations calculated from locus *Pfla L1* population mean liver Cu concentration. P-value and adjusted regression are indicated in the top-right corner.



**Figure 2.5** Individuals' mean Internal Relatedness (IR) for each contamination group based on liver Cd concentration. The groups represent 4 quartiles formed using 1376 individuals (all samples pooled), the most contaminated being the 4<sup>th</sup> quartile. P-value of linear contrast is indicated.



**Figure 2.6** Individuals' mean Internal Relatedness (IR) for each group formed based on their liver Cd concentration in four populations where the relationship was significant: a) Dufault, b) Vaudray, c) James and d) Dasserat. The groups represent 4 quartiles formed using all samples from each population, the most contaminated being the 4<sup>th</sup> quartile. P-values of linear contrasts are indicated.

## **2.7 Acknowledgements**

We are grateful to D. Lapointe, S. Chapuis, A. Geslin and C. Gauthier for their help on the field; to M.G. Bordeleau, R. Rodrigue, R. Gosselin and P. Fournier for assistance with tissue metal analysis; to L. Papillon, V. Albert, G. Côté and E. Castonguay for assistance with genetic analyses and to R.J.S. McCairns, H. Crêpeau and M. Dionne with the statistical analyses. We also thank everyone who assisted and J. Mavarez, A. Nolte and N. Hubert for their very constructive inputs. Research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to PC, from the Canadian Research Chair in genomics and conservation of aquatic resources to LB and from the Canadian Research Chair in metals ecotoxicology to PGCC. The constructive comments from two anonymous referees are gratefully acknowledged.

### **3. Conclusion**

Les effets des contaminants anthropiques sur les différents niveaux organisationnels de notre environnement ont toujours tenu une place importante dans la littérature scientifique orientée en toxicologie et en écotoxicologie. Les dommages potentiels de ces polluants envers la structure et les fonctions de l'ADN ont aussi reçu beaucoup d'attention depuis plus de 30 ans, mais seulement récemment avons nous assisté à l'émergence de l'écotoxicologie évolutive, un domaine de recherche qui s'attarde particulièrement aux effets de la contamination environnementale sur la structure génétique des populations naturelles. Bien que peu d'études aient utilisé les outils moléculaires pour examiner l'impact de la pollution sur la génétique des populations, cette approche sera de plus en plus utilisée dans le futur étant donné sa reconnaissance grandissante en temps que « bio-indicateur » de la santé de populations exposées de façon chronique à des polluants (Bickham *et al.*, 2000).

Les régions de Rouyn-Noranda au Québec et Sudbury en Ontario présentant toutes deux un gradient de contamination polymétallique dans les lacs avoisinants depuis plus de 50 ans, elles offraient un cadre d'étude exceptionnel pour l'évaluation des impacts évolutifs de cette contamination sur les populations naturelles d'espèces aquatiques. De nombreuses études ayant démontré des effets phénotypiques de la pollution métallique sur les populations de perchaudes de lacs contaminés, l'objectif principal de cette étude était d'examiner le rôle de cette contamination dans l'avènement de changements évolutifs dans deux régions minières sujettes à de fortes émissions toxiques émanant de fonderies pendant plus de 50 ans (~1930 à ~1985). Ces émissions sont mieux contrôlées de nos jours, mais les lacs des régions touchées n'ont toujours pas totalement récupéré. Spécifiquement, nous avons : (i) évalué l'importance relative de la contamination sur la différentiation génétique des populations; (ii) testé si la diversité génétique variait en fonction de la contamination métallique, et (iii) testé si la diversité individuelle était associée au niveau de contamination individuel. Bien que des effets différents aient été observés en fonction du métal d'intérêt (Cd et Cu), les résultats ont révélé que la contamination métallique a eu un impact significatif aux niveaux populationnel et

individuel de la structure génétique. Ainsi, cette étude a démontré que la contamination métallique due aux activités minières a eu des impacts évolutifs sur la génétique des populations naturelles de perchaude du nord du Québec et de l'Ontario.

Bien que nos résultats indiquent que la différentiation génétique globale entre les populations ne semble pas influencée par la contamination par le Cd et le Cu, les analyses au locus *Pfla L1* ont démontré une association entre la structuration génétique observée à ce locus et la contamination par le Cu. Ce résultat suggère que la sélection imposée par cette dernière pourrait être partiellement responsable de la différentiation génétique observée à ce locus entre les populations. Cette hypothèse fut supportée par la corrélation négative entre la diversité génétique des populations au locus *Pfla L1* et la contamination par le Cu alors qu'aucun effet global n'avait été observé. Ces résultats suggèrent donc un effet de sélection directionnelle de ce métal sur une région chromosomique qui comprend ce locus (Hansson & Westerberg, 2002). Cependant, d'autres études expérimentales seraient nécessaires afin de tester rigoureusement cet effet causal.

Par ailleurs, nous avons détecté une baisse significative de la diversité génétique globale des populations en fonction de leur niveau de contamination par le Cd, démontrant ainsi un impact évolutif contrastant entre le Cu et le Cd sur la composition génétique des populations de perchaude. Généralement, lorsqu'un impact significatif d'un contaminant sur la diversité génétique a été démontré, on attribue la cause à deux explications possibles, à savoir un événement démographique de goulot d'étranglement induit par la pollution, ou une pression de sélection exercée par un contaminant (Bickham *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2001; Keane *et al.*, 2005). Ici, malgré le manque d'évidence scientifique appuyant l'hypothèse du goulot d'étranglement, nous ne pouvons pas rigoureusement éliminer cette possibilité en vertu, d'une part, des lacunes diverses dans la méthode qui teste cette hypothèse et, d'autre part, des indices historiques qui suggèrent que les populations de perchaude ont été réduites à de petits nombres en raison d'habitats très pauvres (Yan & Welbourn, 1990; P. Couture, INRS-ETE, comm. pers.). Alors que nos résultats concernant le Cd ne nous permettent pas de conclure qu'un déclin

démographique dans les lacs contaminés ait été associé à d'intenses pressions de sélection agissant sur les génotypes moins aptes, ils révèlent cependant que la contamination métallique a eu un impact évolutif important sur les populations de perchaude en réduisant significativement la diversité génétique de ces populations. Théoriquement, une réduction de la diversité génétique peut en retour réduire l'aptitude individuelle par des effets de consanguinité et le potentiel évolutif pouvant permettre une adaptation à un environnement changeant (Theodorakis, 2001; Van Straalen & Timmermans, 2002; Reed & Frankham, 2003).

Il a été suggéré dans plusieurs études effectuées sur des populations de perchaude citées dans la présente étude que la contamination métallique aurait causé des changements phénotypiques significatifs. Cependant, afin d'établir à quel point ces changements sont dus aux changements évolutifs, des études de génétique quantitative en conditions contrôlées devraient être réalisées. Ces expériences pourraient permettre de tester si ces différences phénotypiques entre populations de lacs contaminés et non contaminés ont été induites par une sélection divergente, par exemple en comparant la différentiation aux traits phénotypiques ( $Q_{ST}$ ) à celle obtenue à l'aide de marqueurs neutres tels que les loci microsatellites ( $F_{ST}$ ) (Spitze, 1993).

Au niveau individuel, nous avons observé un indice supplémentaire révélant que la contamination au Cd pourrait exercer une pression de sélection au niveau de la diversité génétique. En effet, nous avons détecté une association entre la diversité génétique individuelle (calculée par le degré « d'apparentement interne ») et la contamination au Cd. Globalement, de même que dans quatre populations dont les deux plus contaminées et deux non contaminées, une relation linéaire significative a été observée entre ces derniers paramètres. Bien que ces résultats ne nous permettent pas de généralisation au niveau de l'association positive entre les niveaux de diversité génétique individuels et la tolérance à la contamination, ils nous fournissent autant d'indices appuyant l'hypothèse que les perchaudes les moins apparentées seraient plus tolérantes à la contamination au Cd dans certaines circonstances. Donc nos résultats suggèrent que la réponse aux contaminants aurait été assez importante pour réduire substantiellement les tailles

effectives de population et leur diversité génétique malgré le fait que les individus les plus diversifiés auraient été favorisés par la sélection dans n'importe quelle population. Des expériences qui évaluerait la survie et la croissance relative d'individus plus diversifiés versus des individus moins diversifiés permettraient d'établir de façon plus rigoureuse l'importance de la contamination au Cd en temps que force évolutive agissant sur différents génotypes.

Idéalement, cette étude aurait dû inclure le Ni et le Zn dans ses analyses puisqu'ils sont des métaux très importants dans les lacs étudiés, car les lacs des deux régions à l'étude ont été sujets à la contamination de plus d'un métal. Comme il a été mentionné dans l'introduction, en se basant sur les gradients de concentration en métaux, les contaminants majeurs dans la région de Rouyn-Noranda sont le zinc et le cadmium. Le contrôle homéostatique des concentrations internes de zinc est très efficace chez la perchaude (Giguère *et al.*, 2004, 2005), et d'autres études (Couture *et al.*, 2008a; Pyle *et al.*, 2008) ont conclu qu'il est peu probable que les perchaudes soient directement affectées par le zinc. Cependant, c'est la situation inverse concernant le cadmium puisque les concentrations tissulaires reflètent directement les conditions ambiantes. Par ailleurs, plusieurs études suggèrent que le cadmium est le principal responsable de la détérioration biologique des lacs de Rouyn-Noranda (Campbell *et al.*, 2003; Borgmann *et al.*, 2004). Par ailleurs, dans les lacs de la région de Sudbury, ce sont le cuivre et le nickel qui sont les métaux présentant les gradients les plus importants, bien que les concentrations de cadmium aqueux de certains lacs se rapprochent des fortes valeurs rapportées chez les lacs de Rouyn-Noranda (Couture *et al.*, 2008a). Dans le cas des invertébrés de Sudbury, Borgmann *et al.* (2001) ont conclu que le nickel était probablement le métal qui causait la toxicité. Selon d'autres études, ce dernier s'accumulerait également chez les perchaudes de la région (Rajotte & Couture, 2002; Pyle *et al.*, 2005; Giguère *et al.*, 2006) de même que chez des poissons de Rouyn-Noranda au printemps et serait lié à des effets sur la condition et le métabolisme de poissons des deux régions (Pyle *et al.*, 2008; Couture *et al.*, 2008b).

Dans la présente étude, nous nous sommes limités aux Cd et Cu hépatiques comme indicateurs de la contamination métallique. Cet étude ne permet donc pas de déterminer lequel ou lesquels parmi les métaux mesurés ou non sont coupables d'affecter la diversité génétique des populations, mais indiquent clairement que celle-ci est affectée par la contamination métallique. En vertu de la nature « polymétallique » de la contamination et les corrélations positives pour plusieurs métaux hépatiques des poissons de ces régions telles que rapporté par Couture *et al.* (2008a), nous ne pouvons établir de lien de cause à effet définitif. Des études supplémentaires seront requises pour identifier les métaux exerçant les plus fortes pressions sélectives. Par exemple, avec des données fiables pour les quatre métaux les plus problématiques de ces deux régions combinées, nous pourrions considérer l'utilisation d'un critère de contamination cumulatif.

En somme, nos résultats indiquent que la pollution aurait eu des impacts évolutifs mesurables dans l'espace d'une vie humaine, ajoutant au tableau déjà bien rempli des effets anthropiques sur la démographie et l'écologie de populations naturelles, mais aussi sur leur trajectoire évolutive (Ashley *et al.*, 2003). En effet, étant donné que la diversité génétique fournit le potentiel adaptatif (Gillespie & Guttman, 1989), et en dépit des récents signes de récupération des écosystèmes touchés (Gunn *et al.*, 1995), nos résultats supportent l'hypothèse que la contamination métallique a, au moins partiellement, compromis le potentiel évolutif des espèces des communautés aquatiques de ces régions si elles doivent faire face à de nouvelles perturbations environnementales.

En terminant, afin d'améliorer notre compréhension des pressions de sélection exercées par la contamination métallique, la prochaine étape serait d'examiner la diversité et l'expression de gènes spécifiques, appelés gènes candidats, impliqués dans les activités métaboliques ou mécanismes de détoxication. Ces gènes candidats, potentiellement sous sélection, pourraient également nous offrir la possibilité d'examiner les impacts environnementaux sur la génétique des populations, car ils permettraient de départager plus clairement les effets de la sélection des autres forces évolutives neutres telle la dérive génétique. En effet, comme Staton *et al.* (2001) l'ont mentionné, une approche sur

des gènes précis pourrait fournir des systèmes modèles puissants pour l'évaluation des conséquences génétiques sur les populations naturelles dans un environnement où une interaction gène-contaminant a été démontrée.

## Bibliographie

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4692-4693.
- Amos W, Wilmer JW, Fullard K, et al. (2001). The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **268**, 2021-2027.
- Ashley MV, Willson MF, Pergams ORW, et al. (2003) Evolutionarily enlightened management. *Biological Conservation*, **111**, 115-123.
- Audet D, Couture P (2003) Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **60**, 269-278.
- Baker RJ, Bickham AM, Bondarkov M, et al. (2001) Consequences of polluted environments on population structure: The bank vole (*Clethrionomys glareolus*) at Chornobyl. *Ecotoxicology*, **10**, 211-216.
- Bartley D, Bagley M, Gall G, Bentley B (1992) Use of Linkage Disequilibrium Data to Estimate Effective Size of Hatchery and Natural Fish Populations. *Conservation Biology*, **6**, 365-375.
- Beamish RJ, Harvey HH (1972) Acidification of the La Cloche Mountain Lakes, Ontario, and resulting fish mortalities. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **29**, 1131-1143.
- Belfiore NM, Anderson SL (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, **489**, 97-122.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2001) GENETIX 4.02, logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Population, Interactions: CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Berckmoes V, Scheirs J, Jordaens K, et al. (2005) Effects of environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 2898-2907.

- Bernatchez L, Dempson JB, Martin S (1998) Microsatellite gene diversity analysis in anadromous arctic char, *Salvelinus alpinus*, from Labrador, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**, 1264-1272.
- Bickham JW, Sandhu S, Hebert PDN, Chikhi L, Athwal R (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, **463**, 33-51.
- Borer SO, Miller LM, Kapuscinski AR (1999) Microsatellites in walleye *Stizostedion vitreum*. *Molecular Ecology*, **8**, 336-338.
- Borgmann U, Norwood WP, Reynoldson TB, Rossa F (2001) Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the sediment quality triad. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **5**, 950-960.
- Borgmann U, Nowierski M, Grapentine LC, Dixon DG (2004) Assessing the cause of impacts on benthic organisms near Rouyn-Noranda, Québec. *Environmental Pollution*, **129**, 39-48.
- Brusik D (2001) Genetic Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, pp. 819-852. Taylor & Francis, Philadelphia, USA.
- Campbell PGC, Hontela A, Rasmussen JB, et al. (2003) Differentiating between direct (physiological) and food-chain mediated (bioenergetic) effects on fish in metal-impacted lakes. *Human and Ecological Risk Assessment*, **9**, 847-866.
- Cattaneo A, Couillard Y, Wunsam S, Courcelles M (2004) Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of Paleolimnology*, **32**, 163-175.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic Analysis: Models and Estimation Procedures. *Evolution*, **21**, 550-570.
- Chen XY, Li N, Shen L, Li YY (2003) Genetic structure along a gaseous organic pollution gradient: a case study with *Poa annua* L. *Environmental Pollution*, **124**, 449-455.
- Ciofi C, Bruford MW (1999) Genetic structure and gene flow among Komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. *Molecular Ecology*, **8**, S17-S30.

- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, **153**, 1989-2000.
- Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A (1993) Response of metallothionein concentrations in a fresh-water bivalve (*Anodonta-Grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnology and Oceanography*, **38**, 299-313.
- Couillard Y, Courcelles M, Cattaneo A, Wunsam S (2004) A test of the integrity of metal records in sediment cores based on the documented history of metal contamination in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of Paleolimnology*, **32**, 149-162.
- Couture P, Busby P, Rajotte JW, Gauthier C, Pyle GG (2008a) Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, **14**(1) in press.
- Couture P, Rajotte JW, Pyle GG (2008b) Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. III. Energetic and physiological indicators. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, **14**(1), in press.
- DeSalle R, Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, **5**, 702-712.
- Dillon PJ, Smith PJ (1984) Trace metal and nutrient accumulation in the sediments of lakes near Sudbury, Ontario. Environmental impacts of smelters, edited by Jerome Nriagu. John Wiley and sons, inc.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, et al. (1994) Mutational Processes of Simple-Sequence Repeat Loci in Human-Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 3166-3170.
- Dixit SS, Dixit AS, Evans RD (1987) Paleolimnological evidence of recent acidification in two Sudbury lakes. *Sci. Total Environ.*, **67**, 53-67.

- Eeva T, Belskii E, Kuranov B (2006) Environmental pollution affects genetic diversity in wild bird populations. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **608**, 8-15.
- Eldridge WH, Bacigalupi MD, Adelman IR, Miller LM, Kapuscinski AR (2002) Determination of relative survival of two stocked walleye populations and resident natural-origin fish by microsatellite DNA parentage assignment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **59**, 282-290.
- Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, UK.
- Garant D, Dodson JD, Bernatchez L (2005) Offspring genetic diversity increases fitness of female Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **57**, 240-244.
- Gerlach G, Schardt U, Eckmann R, Meyer A (2001) Kin-structured subpopulations in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). *Heredity*, **86**, 213-221.
- Giguère A, Couillard Y, Campbell PGC, Perceval O, Hare L, Pinel-Alloul B, Pellerin J (2003) Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology*, **64**, 185-200.
- Giguère A, , Campbell PGC, Hare L, McDonald DG, Rasmussen JB (2004) Influence of lake chemistry and fish age on cadmium, copper, and zinc concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisherie and Aquatic Sciences*, **61**, 1702-1716.
- Giguère A, , Campbell PGC, Hare L, Cossu-Leguille C (2005) Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni). *Canadian Journal of Fisherie and Aquatic Sciences*, **62**, 563-577.
- Giguère A, Campbell PGC, Hare L, Couture P (2006) Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology*, **77**, 178-189.

- Gillespie RB, Guttman SI (1989) Effects of contaminants on the frequencies of allozymes in populations of the central stoneroller. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **8**, 309-317.
- Goudet J, Perrin N, Waser P (2002) FSTAT, a Programm to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices. Institut d'Écologie, Université de Lausanne, Lausanne.
- Gravel A, Campbell PGC, Hontela A (2005) Disruption of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in 1+ yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **62**, 982-990.
- Gunn J, Keller W, Negusanti J, et al. (1995) Ecosystem recovery after emission reductions: Sudbury, Canada. *Water Air and Soil Pollution*, **85**, 1783-1788.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics*, **48**, 361-372.
- Hansson B, Westerberg L (2002) On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2467-2474.
- Hardy OJ, Charbonnel N, Freville H, Heuertz M (2003) Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*, **163**, 1467-1482.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 618-620.
- Hartl DL, Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc, USA.
- Hayes AW, et al. (2001) *Principles and Methods of Toxicology* Taylor & Francis, Philadelphia, USA.
- Hill WG (1981) Estimation of Effective Population-Size from Data on Linkage Disequilibrium. *Genetical Research*, **38**, 209-216.
- Hoffman DJ, et al. (1995) *Handbook of ecotoxicology* Boca Raton: Lewis Publishers, USA.

- Johnson SL, Rahel FJ, Hubert WA (1992) Factors influencing the size structure of brook trout populations in beaver ponds in Wyoming. *North American Journal of Fisheries Management*, **13**, 118-124.
- Keane B, Collier MH, Rogstad SH (2005) Pollution and genetic structure of North American populations of the common dandelion (*Taraxacum officinale*). *Environmental Monitoring and Assessment*, **105**, 341-357.
- Kim SJ, Rodriguez-Lanetty M, Suh JH, Song JI (2003) Emergent effects of heavy metal pollution at a population level: *Littorina brevicula* a study case. *Marine Pollution Bulletin*, **46**, 74-80.
- Kohn MH, Pelz HJ, Wayne RK (2003) Locus-specific genetic differentiation at Rwt among warfarin-resistant rat (*Rattus norvegicus*) populations. *Genetics*, **164**, 1055-1070.
- Laflamme JS, Couillard Y, Campbell PGC, Hontela A (2000) Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57**, 1692-1700.
- Leberg PL (1990) Influence of genetic variability on population growth: implications for conservation. *Journal of Fish Biology*, **37** (supp. A), 193-195.
- Leberg PL (2002) Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology*, **11**, 2445-2449.
- Leclerc D, Wirth T, Bernatchez L (2000) Isolation and characterization of microsatellite loci in the yellow perch (*Perca flavescens*), and cross-species amplification within the family Percidae. *Molecular Ecology*, **9**, 995-997.
- Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical Ecology*, Second English edn. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Levesque HM, Dorval J, Hontela A, Van der Kraak GJ, Campbell PGC (2003) Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **66**, 657-676.

- Luikart G, Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, **12**, 228-237.
- Luikart G, Sherwin WB, Steele BM, Allendorf FW (1998) Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology*, **7**, 963-974.
- Maes GE, Raeymaekers JAM, Pampoulie C, et al. (2005) The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: Relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. *Aquatic Toxicology*, **73**, 99-114.
- Mantel NA (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220.
- Maple (2001) Version 7.0, Waterloo Maple inc., Waterloo, Ontario, Canada.
- McMillan AM, Bagley MJ, Jackson SA, Nacci DE (2006) Genetic diversity and structure of an estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) indigenous to sites associated with a highly contaminated urban harbor. *Ecotoxicology*, **15**, 539-548.
- Michalakis Y, Excoffier L (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, **142**, 1061-1064.
- Miller LM (2003) Microsatellite DNA loci reveal genetic structure of yellow perch in Lake Michigan. *Transactions of the American Fisheries Society*, **132**, 503-513.
- Mineau P (2005) A review and analysis of study endpoints relevant to the assessment of "long term" pesticide toxicity in avian and mammalian wildlife. *Ecotoxicology*, **14**, 775-799.
- Moriarty F (1999) *Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems* Academic Press, London, UK.
- Nei M (1977) F-Statistics and Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Annals of Human Genetics*, **41**, 225-233.
- Nriagu JO, Wong HKT, Lawson G, Daniel P (1998) Saturation of ecosystems with toxic metals in Sudbury basin, Ontario, Canada. *Science of the Total Environment*, **223**, 99-117.

- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite Analysis of Population-Structure in Canadian Polar Bears. *Molecular Ecology*, **4**, 347-354.
- Page RDM (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357-358.
- Peel D, Ovenden JR, Peel SL (2004) NEESTIMATOR: Software for estimating effective population size (version 1.3). Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries, Brisbane.
- Peles JD, Towler WI, Guttman SI (2003) Population genetic structure of earthworms (*Lumbricus rubellus*) in soils contaminated by heavy metals. *Ecotoxicology*, **12**, 379-386.
- Pemberton J (2004) Measuring inbreeding depression in the wild: the old ways are the best. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 613-615.
- Perceval O, Couillard Y, Pinel-Alloul B, Giguère A, Campbell PGC (2006) Long-term trends in accumulated metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein in bivalves from lakes within a smelter-impacted region. *Sci. Total Environ.*, **369**, 403-418.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.
- Posthuma L, Van Straalen NM (1993) Heavy-Metal Adaptation in Terrestrial Invertebrates: a Review of Occurrence, Genetics, Physiology and Ecological Consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, **106**, 11-38.
- Powell MJ (1977) An assessment of brook trout planting in a neutralized lake as compared to four other Sudbury area lakes. Unpublished report, *Ontario Minister of Natural Resources, Fisheries and Wildlife*, Sudbury, Ontario, 32 p.
- Pyle GG, Busby P, Gauthier C, Rajotte JW, Couture P (2008) Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. II. Growth patterns, longevity, and condition. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, **14**(1), in press.

- Pyle GG, Rajotte JW, Couture P (2005) Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **61**, 287-312.
- Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic-markers. *Evolution*, **43**, 258-275.
- Rajotte JW, Couture P (2002) Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **59**, 1296-1304.
- Rasmussen JB, Campbell PGC, Iles A, Gagnon A, Lacroix A, Hontela A (2008) Direct and indirect effects in metal-impacted lakes: use of a multidisciplinary mechanistic approach to assess effects of metals on fish. *Hum. Ecol. Risk Assess.* (in press).
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (Version-1.2) Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, **17**, 230-237.
- Rice WR (1989) Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Roark SA, Nacci D, Coiro L, Champlin D, Guttman SI (2005) Population genetic structure of a nonmigratory estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) across a strong gradient of polychlorinated biphenyl contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 717-725.
- Robb GA (1994) Environmental Consequences of Coal-Mine Closure. *Geographical Journal*, **160**, 33-40.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219-1228.
- Ryman N, Jorde PE (2001) Statistical power when testing for genetic differentiation. *Molecular Ecology*, **10**, 2361-2373.
- Saint-Laurent R, Legault M, Bernatchez L (2003) Divergent selection maintains adaptive differentiation despite high gene flow between sympatric rainbow smelt ecotypes (*Osmerus mordax* Mitchell). *Molecular Ecology*, **12**, 315-330.

- Scheider WA, Adamski J, Paylor M (1975) Reclamation of acidified lakes near Sudbury, Ontario. *Ontario Minister of Environment*, 129 p.
- Schlotterer C (2002) A microsatellite-based multilocus screen for the identification of local selective sweeps. *Genetics*, **160**, 753-763.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) ARLEQUIN version 2.0: a Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Scott WB, Crossman EJ (1973) Freshwater Fishes of Canada. In: *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, pp. 755-761, Ottawa.
- Sediva A, Kovac V, Copp GH (2000) Growth variability of morphometric characters in *Perca fluviatilis* and its relation to microhabitat use. *Folia Zoologica*, **49**, 123-132.
- Shaw IC, Chadwick J (1998) *Principles of Environmental Toxicology*. CRC Press, Taylor and Francis, UK.
- Slatkin M (1995) A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
- Spencer CC, Neigel JE, Leberg PL (2000) Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Molecular Ecology*, **9**, 1517-1528.
- Spitze K (1993) Population-Structure in Daphnia-Obtusa - Quantitative Genetic and Allozymic Variation. *Genetics*, **135**, 367-374.
- Staton JL, Schizas NV, Chandler GT, Coull BC, Quattro JM (2001) Ecotoxicology and population genetics: The emergence of 'phylogeographic and evolutionary ecotoxicology. *Ecotoxicology*, **10**, 217-222.
- Tallmon DA, Luikart G, Beaumont MA (2004) Comparative evaluation of a new effective population size estimator based on approximate Bayesian computation. *Genetics*, **167**, 977-988.
- Theodorakis CW (2001) Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology*, **10**, 245-256.
- Theodorakis CW, Lee KL, Adams SM, Law CB (2006) Evidence of altered gene flow, mutation rate, and genetic diversity in redbreast sunfish from a pulp-mill-contaminated river. *Environmental Science & Technology*, **40**, 377-386.

- Thorpe J (1977) Synopsis of biological data on the perch *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758 and *Perca flavescens* Mitchell, 1814. FAO (Food and agriculture organization of the United Nations), Fisheries synopsis 113.
- Todd TN, Hatcher CO (1993) Genetic-Variability and Glacial Origins of Yellow Perch (*Perca-Flavescens*) in North-America. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**, 1828-1834.
- Van Straalen NM, Timmermans M (2002) Genetic variation in toxicant-stressed populations: An evaluation of the "genetic erosion" hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment*, **8**, 983-1002.
- Vrijenhoek RC (1998) Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, **53**, 394-412.
- Waples RS (1989) A Generalized-Approach for Estimating Effective Population-Size from Temporal Changes in Allele Frequency. *Genetics*, **121**, 379-391.
- Waples RS (1991) Genetic methods for estimating the effective size of cetacean populations. *Genetic Ecology of Whales and Dolphins*, 279-300, International Whale Commission, London.
- Waples RS (2005) Genetic estimates of contemporary effective population size: to what time periods do the estimates apply? *Molecular Ecology*, **14**, 3335-3352.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Wirth T, Saint-Laurent R, Bernatchez L (1999) Isolation and characterization of microsatellite loci in the walleye (*Stizostedion vitreum*), and cross-species amplification within the family Percidae. *Molecular Ecology*, **8**, 1960-1963.
- Yan ND, Dillon PJ (1984) Experimental neutralization of lakes near Sudbury, Ontario. In: J.O.Nriagu (ed.), Environmental Impacts of Smelters, John Wiley & Sons, inc., New-York, NY, pp. 417-456.
- Yan ND, Welbourn PM (1990) The impoverishment of aquatic communities by smelters activities near Sudbury, Canada. In: *Patterns and Processes of Biotic Impoverishment* (ed. Woodwell GM), pp. 477-494. Cambridge University Press, New-York.

## **ANNEXE A**

### **Arbre de distance génétique**

Dans le cadre de ce projet, il était pertinent de construire un arbre de distance génétique afin de visualiser la structure génétique entre toutes les populations, mais il n'apportait pas d'information utile au corps de l'article. Cet arbre de distance génétique neighbour-joining sans racine a été construit en utilisant la distance de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) ( $D_{ce}$ ). Les valeurs de bootstrap ont été obtenues suite à 500 réplicats en utilisant PHYLIP 3.65 (Felsenstein, 2005) et visualisé dans TREEVIEW (Page, 1996). Les nombres représentent le pourcentage de support de chaque regroupement.

