

Université de Montréal

Impact des polluants agricoles sur la génétique des populations d'une espèce sentinelle: le  
ouaouaron (*Rana catesbeiana*)

par  
Isabelle Lefebvre

Département de sciences biologiques  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.)  
en sciences biologiques

Avril 2010  
© Isabelle Lefebvre, 2010-04-20

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Impact des polluants agricoles sur la génétique des populations d'une espèce  
sentinelle: le ouaouaron (*Rana catesbeiana*)

présenté par  
Isabelle Lefebvre

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Bernard Angers	: président rapporteur
Marc Amyot	: membre du jury
François-Joseph Lapointe	: directeur

## RÉSUMÉ FRANÇAIS

---

L'expansion agricole ne cesse d'agir sur la perte d'habitats essentiels et nécessaires au développement des espèces. Bien que plusieurs espèces réussissent à survivre dans ces habitats peu adéquats, la persistance et la santé de plusieurs populations semblent compromises par l'utilisation souvent intensive de polluants chimiques agricoles et de fertilisants. Cette étude a pour but de déterminer l'impact des contaminants et de l'écologie du paysage sur la diversité génétique des populations de ouaouarons retrouvées en milieu agricole. Notre hypothèse de départ stipule qu'une exposition chronique aux polluants agricoles induira des différences génétiques au niveau des populations exposées. Le bassin versant de la rivière Yamaska a été désigné comme site d'étude puisqu'il fait partie de la région agricole la plus importante du Québec et parce qu'on y retrouve un gradient d'utilisation des terres pour l'agriculture (faible, moyen, élevé). Le ouaouaron a été choisi à titre de modèle biologique puisque ses caractéristiques physiologiques et écologiques en font une espèce sentinelle capable de rendre compte de l'état de santé global des écosystèmes. La caractérisation génétique des populations a été effectuée à partir de marqueurs d'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Les résultats montrent que la diversité génétique est liée à la colonisation à partir de l'embouchure de la rivière Yamaska et que quelques populations sont génétiquement différenciées. De plus, nous avons démontré une relation positive entre le nombre de locus polymorphes et l'atrazine, l'indice de contamination et le métolachlore et la concentration en azote ainsi qu'entre l'hétérozygotie attendue et la concentration en phosphate.

Mots clés: Ououarons, espèce sentinelle, diversité génétique, AFLP, écologie du paysage, fertilisants, pesticides, agriculture.

## ABSTRACT

---

Agricultural expansion continues to act on the loss of critical habitats for the development of species and affects the integrity of remaining habitats. Although several species manage to survive in such inadequate ecosystems, persistence and health of many populations seem compromised by the intensive use of pesticides and fertilizers. This study aims at determining the impact of pollutants and landscape ecology on the genetic diversity of bullfrog populations inhabiting an agricultural area. Our hypothesis states that chronic exposure to agricultural pollutants induces genetic differences in exposed populations. The watershed of the Yamaska River was designated as the study site because it is part of the largest agricultural region in Quebec and because the sampling sites represent a gradient of land use for agriculture (low, moderate, high). The bullfrog was chosen as the biological model, since its physiological and ecological characteristics make it a sentinel species, which can reflect the overall health of an ecosystem. Population genetic characterization has been conducted from AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers. The results show that genetic diversity is correlated to colonization from the mouth of the Yamaska River and that some populations are genetically differentiated. Furthermore, we demonstrated a positive relationship between the number of polymorphic loci and the atrazine, the contamination index and the nitrogen concentration as well as between expected heterozygosity and phosphate concentration.

Keywords: Bullfrog, sentinel species, genetic diversity, AFLP, landscape ecology, agrochemicals, fertilizer, agriculture.

# TABLE DES MATIÈRES

---

RÉSUMÉ FRANÇAIS .....	III
ABSTRACT.....	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES .....	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	IX
REMERCIEMENTS.....	XII
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>1</b>
1.0 INTRODUCTION .....	2
1.1 LA RIVIÈRE YAMASKA .....	5
<b>1.1.1 Situation géographique.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2 La problématique de la rivière Yamaska .....</b>	<b>7</b>
1.2 LE OUAOUARON .....	9
<b>1.2.1 Répartition géographique.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2 Caractères morphologiques .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.3 Reproduction et cycle de vie.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.5 Écologie de l'espèce.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.6 État de l'espèce dans le bassin de la rivière Yamaska .....</b>	<b>13</b>
1.3 LA GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS.....	15
<b>1.3.1 Les Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3 Avantages de la méthode .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.4 Imprécisions associées à la méthode.....</b>	<b>18</b>
1.4 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	19
1.5 ORGANISATION DU MÉMOIRE .....	20
<b>CHAPITRE 2 .....</b>	<b>22</b>
2.1 RÉSUMÉ.....	23
2.2 ABSTRACT .....	24
2.3 INTRODUCTION .....	25
2.4 MATERIALS AND METHODS .....	28
<b>2.4.1 Study area .....</b>	<b>28</b>
<b>2.4.3 Water chemistry and landscape ecology.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.4 Statistical and population genetic analysis.....</b>	<b>31</b>
2.5 RESULTS .....	32
2.6 DISCUSSION.....	36
<b>2.6.1 Genetic diversity.....</b>	<b>36</b>
<b>2.6.2 Population differentiation.....</b>	<b>38</b>

<b>2.6.3 Agrochemicals and landscape ecology impact</b> .....	39
2.7 CONCLUSION .....	40
2.8 ACKNOWLEDGMENTS.....	40
<b>CHAPITRE 3</b> .....	<b>42</b>
3.1 UTILISATION DE L’AFLP.....	43
3.2 LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE .....	44
3.3 DIFFÉRENCIATION GÉNÉTIQUE .....	47
3.4 IMPACT DES POLLUANTS ET DE L’ÉCOLOGIE DU PAYSAGE EN MILIEU AGRICOLE .....	48
3.5 BILAN ET RECHERCHES FUTURES .....	50
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>51</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>XIII</b>

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Table 2-I:</b> Primer sequences of EcoRI and MseI for the four primer pairs.....	33
<b>Table 2-II:</b> Concentration of pesticides and nutrients in surface water ( $\mu\text{g/L}$ ) for all the sampling sites in the Yamaska River drainage basin (Deborah Stairs (DS), Cowansville (CO), Choinière (CH), Lake Boivin (LB), Farnham (FA), Pot-au-Beurre (PB) and Noire River (RN)).....	36
<b>Table 2-III:</b> Percentage of landscape variables at a radius of 1000 m for all the sampling sites of the Yamaska River drainage basin (Deborah Stairs (DS), Cowansville (CO), Choinière (CH), Lake Boivin (LB), Farnham (FA), Pot-au-Beurre (PB) and Noire River (RN)).....	37
<b>Table 2-IV:</b> Sampling size of population, expected heterozygosity ( $H_j$ ), Shannon diversity index, polymorphic loci and private alleles of bullfrog populations from the Yamaska River drainage basin (Deborah Stairs (DS), Cowansville (CO), Choinière (CH), Lake Boivin (LB), Farnham (FA), Pot-au-Beurre (PB) and Noire River (RN)).....	38
<b>Table 2-V:</b> Pairwise $F_{ST}$ between bullfrog populations from Deborah Stairs (DS), Cowansville (CO), Choinière (CH), Lake Boivin (LB), Farnham (FA), Pot-au-Beurre (PB) and Noire River (RN)).....	39

## LISTE DES FIGURES

---

- Figure 1.1:** Représentation du bassin versant de la rivière Yamaska et sa situation géographique dans la province de Québec (Modifié de Bérubé & al., 2005).....7
- Figure 1.2:** Représentation de l'aire de répartition naturelle et de l'aire de répartition où l'espèce a été introduite en Amérique (Modifié de <http://www.natureserve.org>).....11
- Figure 1.3:** Différentes étapes associées au processus de l'AFLP. Cet exemple présente un fragment d'ADN génomique digéré par les deux enzymes de restriction EcoR1 et Mse1 (Figure modifiée de Meudt & Clarke, 2007).....18
- Figure 2.1:** Localization of the Yamaska River drainage basin and the seven sampling sites included in this area (Modified from Berubé & al., 2005).....32



## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

---

°C	Degré Celsius
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ATP	Adénosine triphosphate
Bp	Base pairs
cm	Centimètre
CL50	Concentration létale pour 50% des individus d'une population
DNA	Desoxyribonucleic acid
g	Gramme
he	Hectare
kg	Kilogramme
km	Kilomètre
L	Liter
MDDEP	Ministère du développement durable et des parcs
PCR	Polymerase chain reaction
TOXEN	Centre de toxicologie en environnement
UQAM	Université du Québec à Montréal
UV	Ultra violet



**Pour Nicole et Jean-Charles, mes parents,  
qui ont toujours cru en moi**

## REMERCIEMENTS

---

Je me dois avant tout de remercier mon directeur de recherche, François-Joseph Lapointe, qui a su croire en moi depuis le début. Pour le scientifique et la personne que tu es, tu resteras toujours quelqu'un pour qui j'ai le plus grand respect. Merci pour toutes les connaissances que tu m'as transmises et pour tous les moments de divertissement que j'ai passé au laboratoire en ta compagnie.

Je voudrais aussi mentionner l'aide inestimable et inconditionnelle de Nathalie Tessier durant la réalisation de mon projet de maîtrise. Tu m'as surtout fait apprécier les secrets de la biologie moléculaire mais aussi toutes les subtilités de la langue française septilienne... Je garde un très bon souvenir de tous les fous rires et les péripéties sur le terrain, mais je tiens surtout à garder l'amitié qui s'est développée entre nous.

Je suis également reconnaissante envers tous les membres du LEMEE. Je remercie Anaïs, Sarah, Véronique, Olivier, Sébastien, Yong, Astrid, Nathalie, Louise et François, autant pour votre support scientifique que moral, dans les bons comme les plus durs moments.

Je tiens à mentionner notre collaboration avec la compagnie Conservation de la nature pour ce projet. Merci à Louise Gratton, Mélanie Frenette et Hala Breich.

Il est aussi essentiel de remercier Monique Boily et tous les chercheurs du "Projet Ouaouaron" pour leur support et surtout pour leur collaboration aux travaux de terrain.

Finalement, je désire remercier les différents organismes subventionnaires qui ont contribué à la réalisation de ce projet de recherche : le Fonds Québécois de Recherches sur la Nature et les Technologies (FQRNT) et le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) dans le cadre d'une bourse BMP-Innovation.

# Chapitre 1

---

Introduction

## 1.0 Introduction

Le déclin des amphibiens est un phénomène international causant une importante perte de biodiversité (Pechman & al., 1991; Collins & Storfer, 2003). Depuis les années 50, l'effectif mondial des amphibiens aurait diminué de 50% (Houlahan & al., 2000) et, au cours des années 90, plus de 500 populations de grenouilles et de salamandres ont été désignées menacées ou vulnérables (Ross & Richards, 1999). Cette situation est dramatique puisque les amphibiens sont essentiels à l'équilibre des écosystèmes (Blaustein & al., 1994). Leur biomasse, leur position dans la chaîne trophique ainsi que leurs actions sur le cycle des nutriments en font des composantes intégrales de chaque écosystème (Blaustein & al., 1994; Hanlin & al., 2000; Petranka & Murray 2001; Hutchens & DePerno, 2009). De plus, ils sont des indicateurs efficaces de la santé globale des habitats (Collins & Storfer, 2003).

L'interaction complexe de plusieurs facteurs est en cause dans l'explication de ce déclin global (Collins & Storfer, 2003). Parmi ceux-ci, notons l'introduction, volontaire ou non, d'espèces invasives qui vont agir à titre de prédateurs et de compétiteurs envers les espèces indigènes (Collins & Storfer, 2003). De même, les radiations UV ont des effets mutagènes qui induisent des dysfonctions sous létales du système immunitaire (Blaustein & al., 2003). Et puis, il y a l'émergence d'infections causées par des pathogènes tel que le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) qui peut causer un déséquilibre des électrolytes chez les grenouilles et entraîner un arrêt cardiaque (Pennisi, 2009).

Le facteur le plus souvent invoqué pour expliquer le déclin des amphibiens est manifestement la destruction des habitats (Blaustein & al., 1994). L'étalement urbain et l'expansion agricole ne cessent d'entraîner directement la perte d'habitats essentiels au développement des espèces. De plus, l'agriculture peut agir indirectement en modifiant l'intégrité des habitats résiduels et en altérant l'équilibre physique et biotique des écosystèmes (Mann & al., 2009). En effet, les pratiques agricoles contemporaines favorisent la création de canaux d'irrigation et l'utilisation des eaux souterraines pour les

besoins des cultures. Involontairement, de nouveaux plans d'eau sont ainsi créés et ils sont souvent exploités par les amphibiens, particulièrement durant la période de reproduction (Marsh & al., 2004; Vasconcelos & Calhoun, 2004). Bien que plusieurs espèces réussissent à survivre au sein de ces habitats peu adéquats, la persistance et la santé de plusieurs populations semblent compromises par l'utilisation souvent intensive de polluants agricoles (Mann & al., 2009).

La contamination aquatique par les polluants agricoles, tels les pesticides et les fertilisants semble être un facteur significatif causant le déclin des amphibiens (Mann & al., 2009). Les *organophosphates*, les *carbamates* et les *pyrethroides* sont des pesticides de la dernière génération dont les effets synergiques sont souvent néfastes (Blaustein & al., 2003). Individuellement, l'impact des pesticides a été étudié en exposant divers organismes à des concentrations établies en laboratoire (Belfiore & Anderson, 2001). Plusieurs travaux ont démontré les effets létaux et sous létaux des contaminants agricoles qui peuvent induire des troubles du développement, du comportement, des carences immunitaires et également altérer les étapes de la différenciation sexuelle (Alvarez & al., 1995; Bridges & Semlitsch, 2000; Hayes & al., 2002; Cevalco & al., 2008). En effet, certains des polluants retrouvés en milieu agricole agiraient sur une hormone sexuelle de type stéroïde qui joue un rôle essentiel dans le développement secondaire des organes reproducteurs, au niveau de la fertilité et de la capacité de reproduction (Belfroid & al., 1999; Korner & al., 2000). Plus précisément, l'atrazine aurait pour effet de féminiser les grenouilles mâles et d'induire des malformations génitales (Tavera-Mendoza & al., 2002; Hayes & al., 2002; 2006).

Quelques chercheurs se sont penchés sur l'incidence des malformations chez les populations de grenouilles vivant en milieu agricole (McCallum, 1999; Meteyer & al., 2000; Vandenlangenberg & al., 2003) et l'effet tératogène de certains polluants fût démontré en laboratoire. Cependant, l'incidence des malformations n'a pu être concrètement établie avec les concentrations retrouvées en milieu naturel (Fort & al., 1999; Mann & al., 2009). À ce jour, on a pas encore identifié d'agent unique responsable des

anomalies répertoriées et les chercheurs soupçonnent maintenant l'interaction de plusieurs facteurs en milieu naturel (Fort & al., 1999; Garber 2002; Garber & al., 2004).

En réponse à l'impact des polluants agricoles sur les individus, plusieurs travaux ont tenté d'élucider les effets génétiques d'une exposition aux contaminants agricoles (Bickham & al., 2000; Belfiore & Anderson, 2001; Matson & al., 2006). Selon les résultats de différents chercheurs, les polluants chimiques induiraient fréquemment des changements par l'introduction directe de mutations hérissables chez les individus ou par l'accélération de la dérive génique (Yauk & Quinn, 1996; Belfiore & Anderson, 2001; Blaustein & al., 2003; Keane & al., 2005). L'intégrité génétique des populations et leur potentiel à répondre aux changements environnementaux seraient directement affectés. Par contre, les études réalisées en nature impliquant une combinaison de polluants arrivent rarement à établir une relation claire entre la pollution agricole et la diversité génétique (Belfiore & Anderson, 2001).

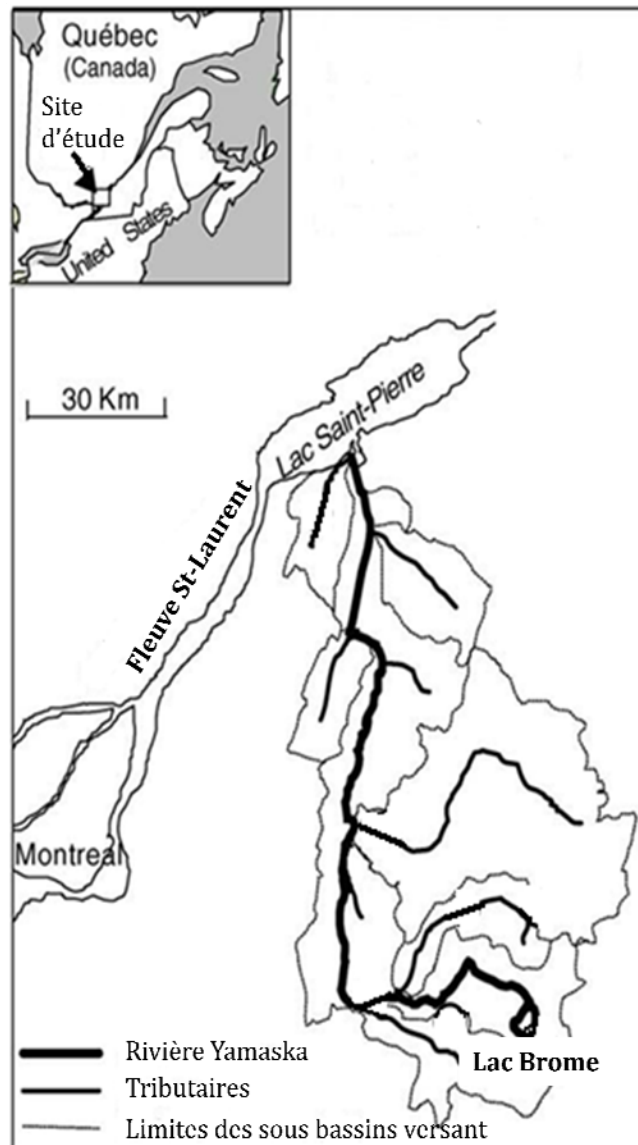
Trop peu de recherches ont étudié l'impact de l'interaction des contaminants agricoles retrouvés en nature au niveau des populations. Une équipe de chercheurs multidisciplinaires chapeautés par le Centre de toxicologie en environnement (TOXEN, UQAM) ont mis sur pied en 2003, le "Projet Ouaouaron" sur la rivière Yamaska. Cette équipe voulait vérifier l'impact des pesticides à différents niveaux physiologiques sur les amphibiens et plus particulièrement sur une espèce sentinelle, le ouaouaron (*Rana catesbeiana*). En plus de maximiser l'acquisition de connaissances sur les effets de l'agriculture, cette collaboration entre chercheurs permet l'optimisation de la récolte des échantillons et de l'utilisation des spécimens euthanasiés.



## **1.1 La rivière Yamaska**

### **1.1.1 Situation géographique**

Le bassin versant de la rivière Yamaska a été retenu comme site d'étude. Localisé dans le sud du Québec, il couvre 4784 km<sup>2</sup>, prend sa source dans le lac Brôme et suit son cours jusqu'à l'embouchure du fleuve St-Laurent à la hauteur du lac St-Pierre (Figure 1.1). Reconnu pour ses eaux de piètre qualité, qui proviennent essentiellement de cultures intensives (maïs, soya, élevage porcin et avicole) (MDDEP, 1998), la rivière Yamaska s'écoule au cœur de la région agricole la plus importante du Québec. On distingue au sein du bassin versant neuf sous bassins indépendants répartis selon un gradient d'utilisation des terres (Spear & al., 2009), où l'intensité de l'activité agricole est faible (superficie cultivée entre 0 et 19%), moyenne (20-59%) et forte (60 % et +) (Primeau & al., 1999). Les sources potentielles de pollution peuvent donc être caractérisées autant par des analyses de la qualité de l'eau que par l'utilisation des terres adjacentes.



**Figure 1.1:** Représentation du bassin versant de la rivière Yamaska et sa situation géographique dans la province de Québec (Modifié de Bérubé & al., 2005).

### **1.1.2 La problématique de la rivière Yamaska**

L'agriculture et l'élevage intensif contribuent majoritairement à l'utilisation du territoire du bassin versant de la rivière Yamaska. Ensemble, ces deux activités occupent 52,4 % du territoire alors que cette proportion se situe à 42,8 % pour les zones forestières (végétation, régénération et coupe), 3,1 % pour les zones urbaines (routes et milieux urbains) et 1,7 % pour les zones aquatiques (eau, marais et tourbières) (COGEBY). Le type de paysage retrouvé dans ce bassin versant est principalement modelé par les pratiques agricoles et les habitats propices au développement des espèces sont hautement fragmentés. Bien que la proportion du territoire occupée par les zones urbaines soit faible, les pressions anthropiques sont fortes puisque la majorité des grandes villes (St-Hyacinthe, Granby, Cowansville) sont situées sur les berges de la rivière Yamaska ou de l'un de ses tributaires.

Au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, suite à la transformation des petites fermes familiales en complexes agricoles hautement productifs, la région a suivi la tendance industrielle globale. L'implantation de grandes fermes d'élevage porcin et aviaire a rapidement été perçue comme une activité rentable pour la région. Depuis les trente dernières années, ces changements ont provoqué une augmentation de plus de 145% de la production porcine tandis que l'agriculture plus traditionnelle a diminué de 40% (Agriculture et agroalimentaire Canada). Les 300 000 porcs qui sont élevés dans cette région génèrent une quantité de fumier et de lisier équivalent à 23 000 tonnes d'azote et à 6700 tonnes de phosphore annuellement (MDDEP, 1998). Le ruissellement d'azote et de phosphore enrichit les cours d'eau et mène éventuellement à leur eutrophisation. Cette production intensive de fertilisants sert à la culture du maïs à grandes interlignes qui requiert l'épandage d'une importante quantité de fertilisants à des fins de productivité (MDDEP, 1998). Ainsi, les éleveurs de porcs éliminent facilement ces rejets d'origine animale et s'assurent de la rentabilité de leurs récoltes puisque le maïs est un des principaux constituants de l'alimentation des porcs d'élevage (Environnement Québec, 2002).

L'arrivée de tels complexes agricoles hautement productifs a donc engendré un cycle de production quasi autosuffisant.

La culture du maïs, et plus récemment du soya, requiert également de grandes quantités de pesticides (Environnement Québec, 2002). Le taux moyen annuel d'utilisation de pesticides dans le bassin de la rivière Yamaska s'élève à 1,83 kg d'ingrédients actifs par hectare (he) cultivé, alors que la moyenne québécoise se chiffre à 1,3 kg/he (MDDEP, 1998). Les herbicides, principalement le métolachlore qui est généralement employé pour la culture du soya et en combinaison avec l'atrazine dans les champs de maïs, sont les pesticides les plus utilisés. L'atrazine est un important perturbateur endocrinien qui a un effet dépresseur sur le système immunitaire et qui peut engendrer la féminisation des mâles (Hayes & al., 2002; Fan & al., 2007), alors que le métolachlore pourrait être cancérigène et induire des lésions hépatiques (Santé Canada, 1990). En raison des superficies occupées par le maïs et le soya dans cette région, ces cultures monopolisent la plus grande portion des pesticides commercialisés au Québec (Environnement Québec, 2002).

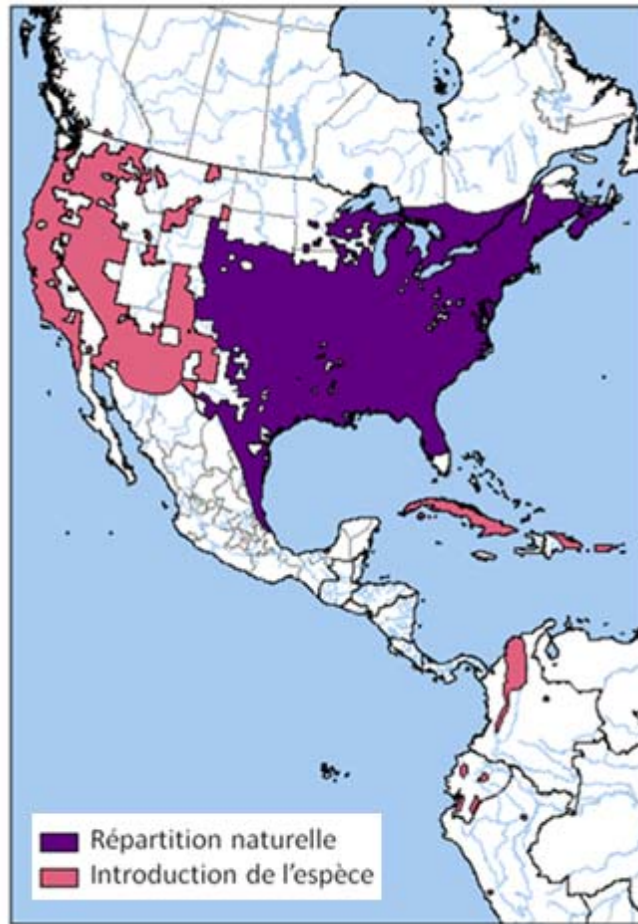
L'expansion agricole et urbaine a entraîné un déboisement important dans tout le bassin versant et plus particulièrement près des rives de la rivière Yamaska et de ses tributaires (COGEBY). Puisque la végétation permet la protection et la rétention des sols, l'érosion devient un problème majeur responsable de l'apport de matières en suspension dans les cours d'eau (COGEBY). Cette érosion prive les agriculteurs de terres fertiles et entraîne le ruissellement de pesticides et de fertilisants. Les engrais et les pesticides se lient aux matières en suspension dans le sol, s'en dissocient une fois dans l'eau et, graduellement, participent à l'eutrophisation des cours d'eau (COGEBY). Le problème est exacerbé par les méthodes contemporaines de culture qui mettent le sol à nu et par le non respect de la bande riveraine par un nombre d'agriculteurs encore trop grand. De plus, les changements hydrologiques associés au drainage des eaux de surface et sous terraines, ont tendance à amplifier les variations du courant et ainsi augmenter l'érosion des sols (Spear & al., 2009).

## **1.2 Le ouaouaron**

Le ouaouaron (*Rana catesbeiana*) est un bon modèle biologique pour les études écotoxicologiques. À titre d'espèce sentinelle, les ouaouarons sont plus susceptibles aux expositions chroniques en raison de leur peau perméable, leur cycle de vie entièrement aquatique, leur longévité (12 ans) et la position qu'ils occupent dans la chaîne trophique.

### **1.2.1 Répartition géographique**

Le ouaouaron est un amphibien appartenant à la sous-classe des Lissamphibia, l'ordre des Anura (Anoures) et la famille des Ranidae ou vrais grenouilles. Son aire de répartition naturelle se situe sur la côte est de l'Amérique du Nord entre le sud du Québec et le nord du Mexique (Figure 1.2). Cette répartition géographique s'étend aussi dans quelques états à l'intérieur des terres Américaines. Le ouaouaron a été introduit, volontairement ou involontairement, dans plusieurs autres parties du monde comme l'ouest de l'Amérique du Nord, l'Amérique du sud, l'Europe et l'Asie. Dans plusieurs de ces régions, on le considère comme une espèce invasive ayant un impact négatif sur les espèces indigènes (Moyle, 1973; Kupferberg, 1997; Kiesecker & Blaustein, 1998; Laufer & al., 2008). Dans son aire de répartition naturelle, il possède un statut de préoccupation mineure.



**Figure 1.2:** Représentation de l'aire de répartition naturelle et de l'aire de répartition où l'espèce a été introduite en Amérique (Modifié de <http://www.natureserve.org>).

### 1.2.2 Caractères morphologiques

Le ouaouaron est le plus gros anouère d'Amérique du Nord, mesurant en moyenne de 12 à 16 cm et pouvant peser jusqu'à 200 g. Il peut prendre une couleur verdâtre ou brunâtre avec plus ou moins de taches sur le dos et les pattes. Son ventre est habituellement de couleur crème tacheté de gris. Sa lèvre supérieure est verte et un repli cutané contourne dorsalement le tympan pour rejoindre les pattes avant. Les membres postérieurs sont palmés et plus

longs que les membres antérieurs. On note un dimorphisme sexuel au niveau de la couleur de la gorge et de la grosseur du tympan (Desroches & Rodrigue, 2004).

### **1.2.3 Reproduction et cycle de vie**

Sous nos latitudes, la reproduction des ouaouarons s'étend de la mi-juin à la mi-juillet. Les mâles vont alors avoir tendance à agréger leur territoire pour former des chorales et ce pour toute la durée de la période de reproduction. Les ouaouarons sont très territoriaux et ils défendent leur territoire en adoptant des comportements agressifs (Ryan, 1980). Ces agressions, bien qu'accompagnées d'un coût énergétique important, permettent aux mâles dominants de conserver un territoire de choix ainsi que de déterminer leur position de dominance dans la chorale (Emlen, 1976). Le succès reproducteur des mâles augmente en fonction de l'âge et il est relié à l'augmentation de l'habilité à défendre un territoire (Howard, 1978, 1988). Les plus jeunes mâles sont condamnés à vivre en satellites non territoriaux dont le succès reproducteur sera faible. Ils vont tout de même assurer leur reproduction en interceptant des femelles (Howard, 1988). Bien que les mâles entrent en compétition pour les femelles, ce sont ces dernières qui les approchent et les sélectionnent. Elles vont donc baser leur choix sur les qualités de ceux-ci, mais aussi sur le territoire qu'ils occupent (Ryan, 1980).

Entre la mi-juin et la mi-juillet, après un amplexus complet, une femelle peut pondre jusqu'à 3000 œufs qui éclore de 3 à 6 jours après la ponte (Desroches & Rodrigue, 2004). Plusieurs facteurs vont influencer la durée de la vie larvaire comme l'altitude, la latitude, l'étendue de la zone littorale, la profondeur du plan d'eau, la quantité et la disponibilité de la nourriture et la densité de la population (Wilbur & Collins, 1973). Comme tous les poïkilothermes, les ouaouarons vont croître lentement et irrégulièrement durant la saison favorable. Ensuite leur croissance s'arrêtera durant les périodes d'hibernation. Sous notre climat, les individus vont demeurer au stade larvaire durant deux à trois hivers avant la métamorphose. Les têtards restent actifs durant ces périodes de basses températures, contrairement aux adultes qui s'enfouissent sous la boue pour hiberner. Les mâles

atteignent la maturité sexuelle 1 à 2 ans suite à la métamorphose tandis que les femelles sont sexuellement matures après 2 à 3 ans (Shirose & al., 1993). Une fois métamorphosé, le ouaouaron peut vivre jusqu'à 9 ans.

### 1.2.5 Écologie de l'espèce

Les juvéniles vont surtout manger des insectes (coléoptères, odonates, hyménoptères, diptères). À mesure que la taille des individus augmente, les proies augmentent aussi en taille et l'alimentation se diversifie (Bruneau & Magnin, 1980b). Les adultes continuent à sélectionner les insectes mais ils ingèrent aussi, en ordre d'importance, de petites grenouilles, des têtards, des poissons et des écrevisses (Korschgen & Moyle, 1955; Korschgen & Baskett, 1963; Bruneau & Magnin, 1980). Certaines études ont aussi observé de petits serpents, des couleuvres, des oiseaux et même de petits mammifères dans le contenu stomacal de certains ouaouarons (Frost, 1935; Minton, 1949; Hewitt, 1950). Le cannibalisme fait partie des comportements du ouaouaron et la pression s'exerce surtout par les adultes envers les juvéniles (Culley & Gravois, 1970; Purnima, 2005). Cette espèce possède plusieurs prédateurs, dont notamment le raton laveur (*Procyon lotor*), le grand héron (*Ardea herodias*), la tortue serpentine (*Chelydra serpentina*) et certains serpents.

Le ouaouaron est contraint aux habitats humides permanents et tempérés (lacs, étangs, zones marécageuses, délaissés des rivières, ruisseaux). Étant une espèce très résistante, il peut se développer dans les milieux perturbés ou modifiés par l'homme. Il habite surtout les plans d'eau où la nourriture et la végétation aquatique sont abondantes, lui permettant ainsi d'échapper à ses prédateurs. Lorsque ces ressources sont épuisées, certains individus se déplacent d'un habitat à l'autre. La distance maximale de dispersion pour l'espèce a été enregistrée entre 0,64 km et 1,6 km (Raney, 1940; Ingram & Raney, 1943; Smith & Green, 2005). Puisque les mâles sont très territoriaux, les déplacements sont surtout effectués par les femelles (Austin & al., 2003) et les juvéniles (Willis & al., 1956). Cependant, le phénomène de dispersion a été peu étudié et les ouaouarons pourraient bien parcourir des



distances beaucoup plus grandes que celle enregistrées jusqu'à maintenant (Smith & Green, 2005).

### **1.2.6 État de l'espèce dans le bassin de la rivière Yamaska**

Bien que le ouaouaron soit une espèce résistante, certains individus retrouvés dans le bassin versant de la rivière Yamaska sont confinés à des habitats de moins bonnes qualités et à des écosystèmes perturbés. Ils sont ainsi directement exposés à une combinaison de polluants qui se retrouvent dans le milieu aquatique (fertilisants, pesticides). De plus, l'épandage des fertilisants coïncide fréquemment avec la période de développement des œufs et des larves, phase critique pour la survie des individus (Watt et Jarvis, 1997).

Selon l'Atlas des amphibiens et reptiles du Québec (AARQ, 2007), plusieurs observations de ouaouarons ont été rapportées dans tout le bassin versant de la Yamaska. Ces sites ont été répertoriés et certaines populations sélectionnées afin de s'assurer que l'effectif soit adéquat pour les besoins et la durée du projet ainsi que pour la survie de ces populations. De plus, les sites d'échantillonnage utilisés pour toutes les études associées au "Projet Ououaron" représentent le gradient de pollution qui existe au sein du bassin versant. Les dernières périodes d'échantillonnages (2008, 2009) nous ont permis de constater que les populations retrouvées aux sites les plus pollués sont de moins en moins nombreuses, forçant ainsi les chercheurs à abandonner temporairement ou définitivement la récolte d'échantillons à certains sites.

Les premiers résultats des chercheurs du "Projet Ououaron" démontrent que les mâles et les femelles retrouvés aux sites les plus exposés aux perturbations agricoles ont une taille significativement plus petite, suite à une croissance ralentie, que les individus retrouvés aux sites peu contaminés (Boily & al., 2005). De plus, les mâles retrouvés aux sites les plus contaminés présentent une diminution significative de l'emmagasinement des rétinoïdes hépatiques et de la concentration en ester de rétinol (Bérubé & al., 2005; Boily & al., 2009). Ces déséquilibres au niveau des rétinoïdes, principale forme de la vitamine A transportée

dans le sang, peuvent entraîner, entre autres, des malformations, des problèmes de différenciation cellulaire et de reproduction.

Une étude indépendante du "Projet Ouaouaron" et réalisée dans la Vallée du St-Laurent a spécifiquement traitée de l'occurrence des malformations des membres postérieurs associées aux pesticides chez quatre espèces de grenouilles, incluant le ouaouaron (Ouellet & al., 1997). Pour toutes les espèces confondues, l'incidence des malformations était plus grande chez les individus exposés aux pesticides (12 %) comparativement aux individus non exposés (0,7 %). Ces chercheurs ont également constaté que les juvéniles étaient plus affectés que les adultes, signifiant un désavantage certain de ces anomalies pour la survie des individus (Ouellet & al., 1997).

Au niveau de la reproduction, des chercheurs se sont penchés sur l'effet de l'agriculture sur la différenciation sexuelle et le développement des gonades des têtards de ouaouarons de la rivière Yamaska (Plouffe-Malette & al., 2009a). Leurs résultats démontrent que la présence de polluants agricoles aurait tendance à altérer et même à retarder la gamétogénèse chez les mâles et les femelles. De plus, un nombre plus élevé d'individus non différenciés a été observé pour les sites les plus contaminés (Plouffe-Malette & al., 2009a). Ces mêmes chercheurs ont aussi voulu déterminer l'influence des polluants agricoles au niveau du système reproducteur des mâles adultes (Plouffe-Malette & al., 2009b). Ils ont établi que le nombre de spermatogonies, des cellules germinales en contact avec la membrane basale du tube séminifère, est plus faible chez les mâles habitant les sites les plus contaminés. Les individus retrouvés aux sites contaminés présentent aussi des caractères sexuels secondaires significativement différents des sites non contaminés (Plouffe-Malette & al., 2009b). Ces résultats indiquent une altération du développement sexuel et de la spermatogénèse qui peut provoquer l'incapacité de reproduction chez certains individus.

Finalement, les résultats d'une autre étude associée au "Projet Ouaouaron" ont permis de constater que certains parasites persistent en interaction avec la pollution agricole et peuvent altérer la santé physiologique et immunitaire des individus (Marcogliese & al.,

2009). L'impact sur la diversité génétique de ces populations n'a toutefois pas été vérifié. Une telle étude est importante puisque la diversité génétique d'une population reflète sa capacité à faire face aux changements de l'environnement.

### **1.3 La génétique des populations**

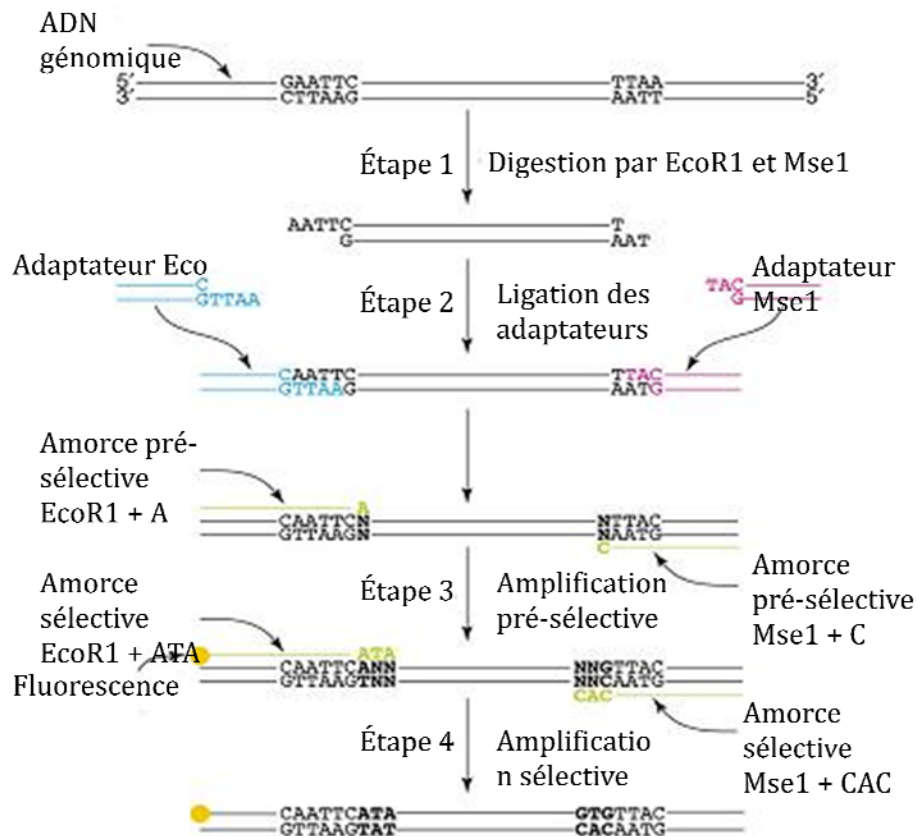
Afin d'établir les liens entre la pollution agricole et la structure démographique des populations, nous utiliserons les outils de la génétique. La diversité génétique des populations se veut le reflet des différents processus démographiques et évolutifs subits par celles-ci. Parmi ces processus, on note les migrations, les mutations et la dérive génique qui représentent la somme des phénomènes stochastiques pouvant affecter la diversité génétique des populations. L'évolution de la diversité génétique varie entre les populations car les processus dynamiques des gènes dépendent des paramètres démographiques des populations, tels que le nombre d'individus participant aux processus reproductifs de celles-ci (taille efficace) ou le niveau de consanguinité (reproduction de deux individus apparentés). Les fluctuations des paramètres démographiques des populations laissent une signature détectable au niveau de la diversité génétique.

#### **1.3.1 Les Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

Nous avons choisi d'utiliser la méthode des AFLP qui s'avère être très efficace pour des questions de différenciation génétique (Bleas & al., 1998; Bensch & Akesson, 2005). L'AFLP produit des marqueurs nucléaires dominants qui sont souvent concentrés dans la région entourant les centromères d'un chromosome (Alonso-Blanco & al., 1998; Saliba-Colombani & al., 2000). Largement répandus au sein de l'ADN nucléaire, ils permettent de rendre compte des variations globales du génome.

L'AFLP est une méthode d'amplification sélective de fragments d'ADN utilisant la réaction de polymérase en chaîne (RPC). Le processus est généralement complété en quatre

étapes: (1) digestion de l'ADN total, (2) ligation, (3) amplification pré-sélective et (4) amplification (Blears & al., 1998; Figure 1.3).



**Figure 1.3:** Différentes étapes associées au processus de l'AFLP. Cet exemple présente un fragment d'ADN génomique digéré par les deux enzymes de restriction EcoR1 et Mse1 (Figure modifiée de Meudt & Clarke, 2007).

1) Digestion: L'ADN total est d'abord digéré par deux enzymes de restriction (exemple: EcoR1 et Mse1). L'une des enzymes reconnaît fréquemment un site de 4 paires de bases (Mse1), tandis que l'autre coupe à un site de 6 à 8 paires de bases (EcoR1), ce qui est moins fréquent. Trois types de fragments seront ainsi générés, soit des fragments dont les deux

extrémités ont été reconnues par EcoR1 (EcoR1-EcoR1), des fragments dont une extrémité a été coupée par EcoR1 et l'autre par Mse1 (EcoR1-Mse1; exemple Figure 1.3) et des fragments produits exclusivement par Mse1 (Mse1-Mse1). Ce dernier type de fragments est généré dans 90% des cas (Bleas & al., 1998). La taille des fragments produits se situe généralement entre 40 et 400 paires de bases (Bensch & Akesson, 2005).

2) Ligation: Ensuite, un adaptateur double d'oligonucléotides qui possède une extrémité homologe aux fragments produits par la digestion est ligué à l'aide d'ATP et d'une enzyme (T4 ligase) qui catalyse la réaction. Suite à la ligation, l'ADN devra être amplifié par RPC à l'aide d'amorces constituées de trois parties: la séquence complémentaire de l'adaptateur (ADAP), la séquence spécifique du site de restriction (ENZ) et des bases qui permettent la sélection (EXT) d'un certains nombres de fragments:

	ADAP	ENZ	EXT
EcoR1 :	5- GACTGCGTACC	AATTC	NNN -3
Mse1 :	5- GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN -3

3) et 4) L'amplification pré-sélective et sélective: L'amplification pré-sélective se fait en ajoutant une seule base à l'extension (N -3) tandis que l'amplification sélective se fait en ajoutant de trois à quatre bases (NNN -3). Souvent quelques combinaisons de ces amorces suffisent pour amplifier un grand nombre de marqueurs polymorphiques. Les amorces sont marquées en fluorescence pour pouvoir les visualiser à l'aide d'un séquenceur automatique. Les fragments de différentes tailles produits sont identifiés selon leur présence (1) ou leur absence (0) pour les individus analysés résultant en un profil unique pour chacun de ces individus. La matrice de présence / absence ainsi créée à partir du profil d'AFLP de tous les individus est utilisée pour les analyses génétiques.

### 1.3.3 Avantages de la méthode

L'AFLP offre plusieurs avantages afin de déterminer efficacement la diversité génétique des populations. La technique est facile, rapide et les marqueurs peuvent être produits, peu importe l'origine et la complexité de l'ADN utilisé (Vos & al., 1995). *A priori*, il n'est pas nécessaire de connaître la constitution du génome à l'étude et de fines variations peuvent être détectées avec peu d'ADN (0,05-0,5 ug) ou de l'ADN légèrement dégradé (Blears & al., 1998). De plus, il est possible d'amplifier simultanément plusieurs régions aléatoires permettant ainsi d'étudier le polymorphisme du génome en entier (Mueller & Wolfenbarger, 1999). En fait, il est primordial de générer un très grand nombre de marqueurs (plus de 200) puisque l'information fournie individuellement est faible. Les marqueurs provenant de l'AFLP peuvent détecter de très petites différences génétiques qui résultent d'événements récents (Campbell & al., 2003; Squirrell & al., 2003; Woodhead & al., 2005).

### 1.3.4 Imprécisions associées à la méthode

L'AFLP peut donner des résultats imprécis. D'abord, la méthode ne peut fournir l'information complète sur le génome des organismes diploïdes puisque les allèles sont traités comme des marqueurs dominants. Ainsi, les individus qui possèdent une bande peuvent être homozygotes (1/1) ou hétérozygotes (1/0) pour ce même locus. Avec le type de données générées par l'AFLP, les analyses génétiques assument l'équilibre d'Hardy Weinberg. Ainsi, il est primordial d'interpréter les résultats provenant de l'AFLP en tenant compte de cette limite de la méthode. Une autre imprécision découlant de l'AFLP est la présence potentielle d'homoplasie. Ce phénomène survient lorsque deux bandes de même longueur ne sont pas homologues et qu'elles représentent deux locus distincts, ce qui a pour effet de diminuer artificiellement la diversité génétique. L'homoplasie augmente avec la densité des fragments amplifiés et diminue avec la longueur de ces mêmes fragments (Vekemans & al., 2002). Il est donc important de répéter les analyses pour un certain pourcentage des individus analysés afin de s'assurer de la répétabilité du processus. Selon

le patron d'amplification, il peut aussi être nécessaire de sélectionner les locus à partir d'une certaine longueur en paire de bases afin d'éviter les groupes de fragments densément amplifiés.

Puisqu'on doit générer un grand nombre de fragments qui ne sont pas préalablement sélectionnés avec l'AFLP, le risque que ces locus soient liés est substantiel. Ceci peut entraîner une diminution de la précision des estimateurs (Thompson & Meagher, 1998).

#### **1.4 Objectifs de l'étude**

L'objectif principal de cette étude est de déterminer l'impact des polluants agricoles (pesticides et fertilisants) sur la diversité génétique de différentes populations de ouaouarons (*Rana catesbeiana*) dans le bassin versant de la rivière Yamaska. Notre hypothèse de départ stipule qu'une exposition chronique aux polluants agricoles induira des différences génétiques au niveau des populations exposées. Différents scénarios peuvent résulter de l'exposition aux polluants chimiques tels que les pesticides. D'abord, la diversité génétique peut diminuer suite à l'accélération de la dérive génique (Belfiore & Anderson, 2001). Moins fréquemment, il est possible d'assister à l'augmentation de la consanguinité (Belfiore & Anderson, 2001) ou à une sélection ne favorisant que les génotypes tolérants à cette forme de pollution (Keane & al. 2005). Au contraire, la diversité génétique peut augmenter suite à une exposition chronique par l'induction de nouvelles mutations dans le génome ayant pour cause directe la présence de mutagènes dans l'environnement (Yauk & Quinn, 1996). Un troisième cas pourrait aussi être observé. Il est possible que la diversité génétique ne varie pas en fonction de la concentration des polluants agricoles. Ceci pourrait indiquer une véritable absence de variation ou pourrait résulter d'une utilisation inappropriée de l'AFLP pour répondre à la question. Ce projet de recherche a comme second objectif de vérifier l'effet de l'écologie du paysage retrouvée en milieu agricole sur la diversité génétique des populations de ouaouarons. Les habitats terrestres entourant un milieu humide ou un cours d'eau sont critiques dans le processus de filtration physique et chimique des polluants qui peuvent y ruisseler (Lowrance & al., 1984). Ces habitats qui

jouent un rôle tampon sont aussi essentiels au maintien de la biodiversité pour toutes les espèces semi-aquatiques (Semlitsch, 1998). Bien que le ouaouaron soit entièrement aquatique, il n'est pas rare que cette espèce utilise sporadiquement cette zone lors de sa dispersion. Nous postulons que la diversité génétique des populations associées à de grandes superficies de terres agricoles et peu de végétation sera plus faible.

### **1.5 Organisation du mémoire**

Le prochain chapitre, sous forme d'article, présente la méthodologie et les résultats découlant de ce projet de recherche. Le dernier chapitre se veut une synthèse des principaux résultats obtenus et constitue une conclusion globale intégrant principalement une critique de l'étude.





## Chapitre 2

---

### **Agrochemical impacts on the population genetics of a sentinel species: the bullfrog (*Rana catesbeiana*)**

Cet article sera prochainement soumis à Conservation Genetics :

Lefebvre I, Tessier N, Boily M & Lapointe FJ (2010) Agrochemicals impact on the population genetics of a sentinel species: the bullfrog (*Rana catesbeiana*).

## 2.1 Résumé

L'expansion agricole ne cesse d'agir sur la perte d'habitats essentiels au développement des espèces. Bien que plusieurs espèces réussissent à survivre dans ces habitats peu adéquats, la persistance et la santé de plusieurs populations semblent compromises par l'utilisation souvent intensive de polluants chimiques agricoles et de fertilisants. L'objectif principal de cette étude est d'établir l'impact d'une exposition chronique aux polluants agricoles (pesticides, fertilisants) au niveau de la diversité génétique des populations de ouaouarons (*Rana catesbeiana*) du bassin versant de la rivière Yamaska. Sept populations représentant un gradient d'utilisation des terres par l'agriculture (faible, moyen, élevé) ont été caractérisées génétiquement par 372 fragments d'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Les analyses génétiques ont démontré que plusieurs populations sont génétiquement distinctes, mais sans isolement par distance. Une corrélation significative a été établie entre le nombre de locus polymorphes et l'atrazine ( $r = 0,575$ ,  $p = 0,037$ ), l'indice de contamination atramet ( $r = 0,610$ ,  $p = 0,045$ ) ainsi qu'entre le nombre de locus polymorphes et la concentration en azote ( $r = 0,617$ ,  $p = 0,045$ ). L'hétérozygotie est aussi positivement corrélée à la concentration en phosphate, avec ou sans correction pour les distances au fleuve ( $r = 0,686$ ,  $p = 0,040$ ). Ceci indique que l'exposition aux polluants agricoles aurait tendance à induire de nouvelles mutations dans le génome des populations exposées. Cependant, d'autres études incluant plusieurs groupes d'âge et d'autres marqueurs génétiques seront nécessaires afin de déterminer l'impact véritable des polluants agricoles au niveau de la génétique des populations.

Mots clés: Ououarons, espèce sentinelle, diversité génétique, AFLP, écologie du paysage, fertilisants, pesticides, agriculture.

## 2.2 Abstract

Agricultural expansion continues to act on the loss of critical habitats for the development of species and affects the integrity of those remaining. Although several species manage to survive in these inadequate habitats, persistence and health of many populations seem compromised by the intensive use of pesticides and fertilizers. The main objective of this study is to determine the impact of chronic exposure to agricultural pollutants (pesticides, fertilizers) on the genetic diversity of bullfrog populations in the Yamaska River watershed. Seven populations, representing a gradient of land use by agriculture (low, moderate, high), were genetically characterized by 372 AFLP fragments (Amplified Fragment Length Polymorphism). Genetic analysis showed that some populations were significantly differentiated, without isolation by distance. Polymorphic loci were significantly correlated with atrazine ( $r = 0.575$ ,  $p = 0.037$ ), contamination index atramet ( $r = 0.610$ ,  $p = 0.045$ ) and the nitrogen concentration ( $r = 0.617$ ,  $p = 0.045$ ) as was the correlation between expected heterozygosity and phosphate concentration, with or without correction for geographical distances ( $r = 0.686$ ,  $p = 0.040$ ). This indicates that exposure to agricultural pollutants may induce new mutations in the genome of exposed populations. However, other studies including several age groups and other genetic markers are needed to determine the true impact of agricultural pollutants on the population genetics.

Keywords: Bullfrog, sentinel species, genetic diversity, AFLP, landscape ecology, agrochemicals, fertilizer, agriculture.

## 2.3 Introduction

The global amphibian decline is a worldwide phenomenon causing an important loss of biodiversity (Pechman & al., 1991; Collins & Storfer, 2003). From 1993 to 1999, more than 500 populations of frogs and salamanders were listed as declining, or as special conservation concern (Ross & Richards, 1999). Amphibians are integral constituent of many ecosystems by acting on the nutrient cycle (Blaustein & al., 1994; Hanlin & al., 2000). They represent an important part of the vertebrate biomass in some of those ecosystems (Petranka & Murray 2001), and hold vital positions in aquatic and terrestrial food web (Hutchens & DePerno, 2009). Amphibians are also known to be useful indicator species of overall environmental health (Collins & Storfer, 2003).

Biologists are aware that there is no single cause for the global amphibian decline and attribute this trend to a complex interaction of factors (Collins & Storfer, 2003). For one, habitat destruction is definitely the most important cause of amphibian losses (Blaustein & al., 1994). It is mainly due to agricultural expansions, which alter the physical and biotic nature of habitats by converting forest to open lands (Mann & al., 2009). Alien species are also influencing native populations through predation, competition, hybridization and introduction of pathogens (Collins & Storfer, 2003). Moreover, UV radiations are known to affect amphibians at the individual level by inducing sublethal damages such as immune dysfunction and mutations (Blaustein & al., 1998). Finally, emerging infectious diseases and pathogens like chytrid fungus and iridoviruses are listed as having potential declining effects on amphibians (Collins & Storfer, 2003).

Aquatic contaminations by chemical pollutants such as pesticides are receiving increasing attention as yet another factor causing amphibian decline (Mann & al., 2009). Agrochemicals like organophosphates, carbamates, pyrethroids, herbicides and fungicides are examples of the last generation of pesticides, which seriously affect aquatic wildlife through erosion (Blaustein & al., 2003). The synergistic actions of such contaminants are probably dramatic and significant on population health. However, their effects have

historically been assessed with model organisms exposed to various chemicals in laboratory settings (Belfiore & Anderson, 2001). Several studies have determined the sublethal and lethal effects of agricultural pollutants inducing developmental and behavioral abnormalities, reproductive defects or immunity reduction (Alvarez & al., 1995; Bridges & Semlitsh, 2000; Hayes & al., 2002). Until recently, few studies have been conducted in the wild to evaluate the effects of multiple agricultural pollutants at the population level. Such small-scale studies provided the opportunity for understanding and predicting detrimental effects at higher levels of organization, including communities and landscapes (e.g. Bickham & Smolen, 1994; Belfiore & Anderson, 2001).

The Yamaska River is located in an important agricultural region where anthropogenic pressures have modeled the landscape and habitats are highly fragmented (COGEBY, Figure 2.1). As with other farming areas in Québec, the Yamaska River drainage basin experienced an increase in production over the years. Namely, the proportion of large-scale pork and poultry rearing exploded in the last 30 years in Québec (MDDEP, 1998). The result has been an overflow of liquid fertilizer used for corn and soy culture to supply animal food (Spear & al., 2009). Due to the combined effects of fertilizer and pesticides, the Yamaska River now has the lowest water quality in the province (MDDEP, 1998). Various field studies have already shown the impacts of aquatic pollution in the Yamaska River on bullfrog populations (Bérubé & al., 2005; Boily & al., 2005; Marcogliese & al., 2009; Spear & al. 2009). It has been demonstrated that male bullfrogs inhabiting sites of high intensity farming had significant smaller body sizes and presented retinoic (hepatic and blood vitamin A) metabolism disequilibria (Bérubé & al., 2005; Boily & al., 2005). Ouellet & al. (1997) have demonstrated that the occurrence of malformations is higher for individuals associated with high contamination and those abnormalities are more likely to affect juveniles. Also, researchers have confirmed that there is a significant alteration in the reproductive development of larvae and in androgens and spermatogenesis of adult males associated with a high level of agriculture and the presence of atrazine (Plouffe-Malette & al., 2009a, 2009b). These results demonstrated that individual bullfrog in the Yamaska

River basin have health problems that may result in recruitment deficit at the population level.

Yet, no study has ever been conducted on the population genetics of bullfrogs inhabiting the Yamaska river drainage basin. Molecular approaches are useful because they permit the evaluation of the current genetic structure of populations and, allow correlation between genetic composition and exposure to environmental contamination (Belfiore & Anderson 2001; Staton & al. 2001).

The main objective of this study is to assess the impact of agriculture pollution (pesticides, fertilizers) on the genetic diversity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) populations in the Yamaska River drainage basin. We hypothesize that long-term exposure to pesticide contamination has induced genetic changes in exposed populations. Even if bullfrogs are able to persist in highly and moderately contaminated habitats, we expect differences in genetic parameters as a response to the presence of pollutants. Mainly, genetic diversity can decrease with the acceleration of genetic drift and inbreeding (Belfiore & Anderson, 2001) or increase with the introduction of an abnormal number of mutations (Yauk & Quinn, 1996). Alternatively, our results may not show any relation between genetic diversity and contamination. This would either reflect a real absence of relation or may be caused by the lack of resolution of the genetic markers. Secondly, we also want to determine the impact of farmland landscape on the population genetic structure. We hypothesize that unfavorable sites described by landscape variables will contribute to population isolation by restricting the gene flow and result in a loss in genetic diversity.

The bullfrog, an indigenous species of Ranidae, was chosen as a biological model. Like other amphibians, it has a permeable skin and is highly sensitive to environmental changes. In addition, this species is more susceptible to chronic exposures because of its aquatic cycle, its longevity and its trophic position in the food chain. Moreover, this common species is neither endangered nor threatened in Québec, so that we can sample populations without affecting their effective sizes. Numerous studies have used Ranidae as a bioindicator of

environmental quality (Kaplan & Overpeck, 1964; Osborn & al., 1981; Sparling & al., 2001; Veldhoen & al., 2006).

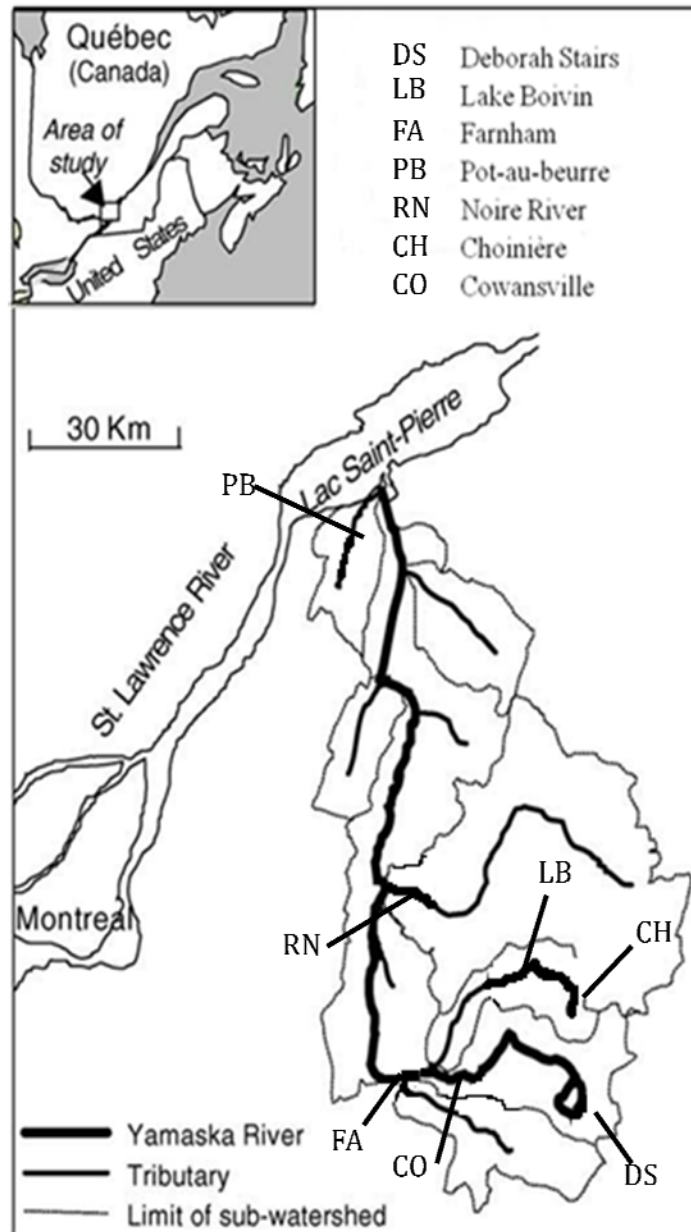
It is worth mentioning that this project was undertaken in collaboration with a group of multidisciplinary researchers from the TOXEN (UQAM). The "Bullfrog Project" was initiated in 2003 in the Yamaska River drainage basin to determine whether agrochemicals affect amphibian populations and to develop tools to assess this impact. This partnership was created to maximize the sampling effort and the use of specimens to study different physiological processes (Boily, 2004).

## **2.4 Materials and methods**

### **2.4.1 Study area**

A total of 366 bullfrogs were collected between 2004 and 2008 from seven sites covering the Yamaska River drainage basin (Figure 2.1). Individuals were sampled at night with flashlight and landing net during the reproduction period, which allowed us to locate chorus males. We chose sites with large bullfrog populations that together represented a gradient in land use. Furthermore, the sites were classified into three categories. A first group of three sites, Deborah Stairs (DS), Choinière (CH), Cowansville (CO), are associated with forests, wetlands and low agriculture intensity (0-19%). A second group of three sites, Lake Boivin (LB), Farnham (FA), and Pot-au-Beurre River (PB) are associated with moderate agricultural intensity (20-59%) including wide-row corn and soy culture. The third and last group contains a single site, Noire River (RN), in an intensive farming area where the sub-watershed is under 60% of wide-row agriculture and large-scale pork and poultry rearing (MDDEP, 1998; Primeau & al., 1999). Other intensive farming sites were removed from the study because the samples were too small for analysis.





**Figure 2.1:** Localization of the Yamaska River drainage basin and the seven sampling sites included in this area (Modified from Berubé & al., 2005).

### 2.4.2 AFLP genotyping

Tissue and blood samples were digested and total DNA extracted using phenol-chloroform protocol (Sambrook & al., 1989). AFLP genotyping was selected because it represents an inexpensive and fast approach to generate a large number of polymorphic markers randomly distributed throughout the genome (Vos & al., 1995), with highly reproducible and reliable results (Bush & al., 2000). The AFLP analysis followed the procedure described in Vos & al. (1995) modified for fluorescence visualization. DNA fingerprints were produced for each of the four selective primer combinations (Table 2-I), visualize on an ABI 3730 XL (Applied Biosystems) automated sequencer and peak identification was visualized using GeneMarker Demo V1.85 (SoftGenetics LLC). All loci were then selected on the basis of an intensity threshold (550), reproducibility of fragment size, and assuming that fragments of a particular size represent a unique AFLP locus. The 372 fragments were scored twice for the presence/absence of a band to avoid genotyping errors. Repeated analyses on re-extracted DNA were performed on 15% of the sampling for quality control. The genetic analyses were only performed on the loci from 118 bp to 240bp to avoid homoplasmy and false negative.

**Table 2-I:** Primer sequences of EcoRI and MseI for the four primer pairs.

Primer pairs	Sequence primer EcoRI	Sequence primer MseI
1	5#-GACTGCGTACCAATTC <b>ACT</b> -3#	5#-GATGAGTCCTGAGCGAC <b>GA</b> -3#
2	5#-GACTGCGTACCAATTC <b>ACT</b> -3#	5#-GATGAGTCCTGAGCGAC <b>GT</b> -3#
3	5#-GACTGCGTACCAATTC <b>AGT</b> -3#	5#-GATGAGTCCTGAGCGAC <b>GA</b> -3#
4	5#-GACTGCGTACCAATTC <b>AGT</b> -3#	5#-GATGAGTCCTGAGCGAC <b>GT</b> -3#

### 2.4.3 Water chemistry and landscape ecology

Water samples were collected in July 2008 at all sites, corresponding to the period of intensive pesticide spreading for corn and soy culture in Québec. Bulk samples of surface water (10 L) were collected from a depth of 20 cm, transported and stored at 0 – 4 °C (Spear & al. 2009). Analyses were conducted for 53 different pesticides (organophosphates, triazines and aryloxy acids) and for standard water quality indices (nitrate, nitrite, and total

dissolved phosphate) with the courtesy of MDDEP Québec under the Plan St-Laurent 2005-2010, Department of Agriculture.

Landscape ecology variables were also measured to assess the effect of land use on genetic diversity. We already know that amphibians need a terrestrial buffer zone adjacent to core aquatic and wetland. Semlitsch & Bodie (2003) proposed a minimum protection zone around 400 m to keep aquatic habitats healthy. Using geomatic data, basic landscape variables were provided by the Nature Conservancy of Canada for all sites at a radius of 400 m, 600 m and 1 km, to detect spatial effects at three different scales. Namely, the proportion of land use for agriculture and urban development, and the percentage occupied by water, wetland and vegetation were calculated. When available, farmland use was further categorized to identify the different types of culture (e.g. soy, corn, etc.).

#### **2.4.4 Statistical and population genetic analysis**

Within-population genetic diversity was estimated by computing the expected heterozygosity under Hardy-Weinberg genotypic proportions ( $H_j$ , Nei's gene diversity, Nei, 1973), and the mean numbers of polymorphic loci at the 5% level. In order to account for the fact that sample size may affect the genetic parameters, random samples of 20 individuals from each population (i.e., the size of the smallest population) were generated to compute genetic diversity values. One thousand replicates were used for the computations, and mean values were used for further analyses (all computations made with the R language, Ihaka & Gentleman, 1996). To test for the presence of increased mutation rates we looked at the number of private alleles (allele that occur only in one population) for each population with the same correction for population size. Population differentiation was estimated by pairwise  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham, 1984), with Arlequin 2.0 using allelic frequencies and assuming Hardy-Weinberg equilibrium (Schneider & al., 2000). We tested for significant groups, according to the three levels of contamination, pollution and landscape ecology variables.

We test isolation-by-distance with a Mantel test (1967), by comparing  $F_{ST}$  values and geographic distances measured along the hydrographic network between sampling sites. We also evaluated the importance of colonization processes by comparing genetic diversity indices ( $H_j$ , polymorphic loci number, private alleles) with the geographic distances separating each sampling site from the mouth of the Yamaska River. To assess the impact of pollution and landscape variables, Pearson correlations tested by permutations were conducted based on the genetic diversity indices. Partial tests were also computed to account for geography by using diversity indices corrected for colonization. Statistical analyses were all computed with R language (Ihaka & Gentleman, 1996).

## 2.5 Results

Water analysis of pesticides and nutrients were conducted for all sampling sites except for Pot-au-Beurre for which there were missing data for some pesticides concentration (see complete results in the Appendix). Of the 53 pesticides analyzed, only nine were found in concentration higher than the detection limit for at least one site (AMPA, Atrazine, Bentazone, Deethyl-atrazine, Dicamba, Glyphosate, MCPA, Metolachlore, Simazine). For statistical analysis, we thus calculated a contamination index by adding the concentrations of all pesticides at each site multiplied by the CL50 values (96h) of each pesticide to reflect their toxicity. We used the CL50 values of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), because these data were available for all pesticides in the study and because it is an aquatic sentinel species like the bullfrog. We then computed a second index using only atrazine and metolachlore (hereafter referred to as atramet), since as they were found in higher concentrations at all sites. Those indices allowed us to evaluate the synergistic impact of various agrochemicals used in combination at different sites. The contamination indices and the nutrient concentrations (i.e. nitrogen (nitrite + nitrate), phosphate) were considered as pollution variables (Table 2-II), whereas landscape ecology variables were evaluated at a radius of 400 m, 600 m and 1000 m. Data for a radius of 1000 m are presented in Table 2-III.

**Table 2-II:** Concentration of pesticides and nutrients in surface water ( $\mu\text{g/L}$ ) for all the sampling sites in the Yamaska River drainage basin (Deborah Stairs (DS), Cowansville (CO), Choinière (CH), Lake Boivin (LB), Farnham (FA), Pot-au-Beurre (PB) and Noire River (RN)).

Contamination levels	Sampling sites	Contamination index	Atramet (atrazine + metolachlore)	Nitrogen (NO <sub>2</sub> + NO <sub>3</sub> )	Phosphate (total)
Low	DS	1376	168	0.006	0.019
	CO	0	0	0.006	0.069
	CH	1974	987	0.686	0.013
Moderate	LB	618	309	0.006	0.150
	FA	3140	870	3.716	0.048
	PB	4092	2046	1.934	0.091
High	RN	21304	3174	5.430	0.081

**Table 2-III:** Percentage of landscape variables at a radius of 1000 m for all the sampling sites of the Yamaska River drainage basin (Deborah Stairs (DS), Cowansville (CO), Choinière (CH), Lake Boivin (LB), Farnham (FA), Pot-au-Beurre (PB) and Noire River (RN)).

Contamination levels	Sampling Sites	Vegetation	Water	Wetlands	Agriculture	Urban area
Low	DS	94.222	0.545	4.138	1.095	0
	CO	21.391	10.664	1.346	0	66.899
	CH	55.705	42.241	0	0	2.054
Moderate	LB	43.928	29.174	14.121	3.61	9.168
	FA	21.009	7.188	0	12.395	59.408
	PB	30.558	1.464	65.573	0	2.404
High	RN	1.592	7.445	0	51.663	39.300

AFLP analyses were successfully performed on all 366 individual samples. A total of 372 fragments were scored (with a global polymorphism around 80%), and the mean number of polymorphic markers ranged from 163.64 to 342.00 depending on the population. The mean expected heterozygosity ( $H_j$ ) was estimated at 0.117 (0.143-0.424). On average, 1.547 (0.772-2.616) private alleles were screened for the seven sampling sites (Table 2-IV).

**Table 2-IV:** Sampling size of population, mean expected heterozygosity ( $H_j$ ), mean number of polymorphic loci and mean number of private alleles of bullfrog populations from the Yamaska River drainage basin (Deborah Stairs (DS), Cowansville (CO), Choinière (CH), Lake Boivin (LB), Farnham (FA), Pot-au-Beurre (PB) and Noire River (RN)).

Contamination levels	Populations	Sampling size	$H_j$	Polymorphic loci	Private alleles
Low	DS	48	0.143	163.640	0.772
	CO	20	0.174	165.000	2.616
	CH	62	0.275	269.078	1.823
Moderate	LB	55	0.424	325.007	1.182
	FA	80	0.347	342.000	1.365
	PB	47	0.385	340.376	1.296
High	RN	54	0.356	325.471	1.773

The pairwise genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) among populations was low and the values sensibly in the same range for all the populations, suggesting that those populations can be compared genetically. According to the Table 2-V, 12 values were significant based on permutation tests. Results of AMOVA were not significant using different partitioning of genetic variation between groups according to pollution exposure and landscape ecology variables.

The Mantel tests revealed no significant association between pairwise  $F_{ST}$  and geographic distances between sampling locations ( $r = -0.417$ ;  $p = 0.947$ ), indicating an absence of isolation by distance (Table 2-V). However, we obtained a significant correlation between expected heterozygosity values and the distances from the mouth of Yamaska River ( $r = -0.697263$ ;  $p = 0.035$ ). This suggests an effect of colonization reflected by the diminution of expected heterozygosity when sampling sites are further away from St-Lawence River.

**Table 2-V:** Geographic distances in km (below the diagonal) and pairwise  $F_{ST}$  (above the diagonal) between the bullfrog populations from Deborah Stairs (DS), Cowansville (CO), Choinière (CH), Lake Boivin (LB), Farnham (FA), Pot-au-Beurre (PB) and Noire River (RN).

	DS	CO	CH	LB	FA	PB	RN
DS	---	0.018*	0.000	0.063*	0.000	0.000	0.002
CO	17.5	---	0.019*	0.072*	0.020*	0.017*	0.016*
CH	87.5	70	---	0.057*	0.000	0.001	0.000
LB	74	56.5	13.5	---	0.062*	0.000	0.059*
FA	37.5	20	47.5	34	---	0.003*	0.003*
PB	142,5	125	148.3	135	105	---	0.002
RN	94.5	67	91	76	43	78	---

\*: Significant  $F_{ST}$  values, following a sequential Bonferroni correction ( $p < 0.05$ ).

Pearson correlations revealed several significant relationships. Namely, the concentrations in atrazine and the number of polymorphic loci were positively correlated ( $r = 0.575$ ,  $p = 0.037$ ), as was the atramet index and the number of polymorphic loci ( $r = 0.610$ ,  $p = 0.045$ ) and the nitrogen concentration with the number of polymorphic loci ( $r = 0.617$ ;  $p = 0.045$ ). A significant correlation was also obtained between phosphate values and expected heterozygosity ( $r = 0.691$ ;  $p = 0.045$ ), even when correcting for colonization distances to the mouth of the Yamaska River ( $r = 0.686$ ;  $p = 0.040$ ). Together these results suggest an influence of agricultural pollution and landscape ecology on genetic diversity parameters.

## **2.6 Discussion**

Although bullfrog populations are very common in Québec and the species appears to be very resistant to anthropogenic disturbance, our results show that bullfrogs may well be affected by agricultural practices.

Our data revealed that the Yamaska River drainage basin is contaminated by a combination of pesticides and nutrients. The measured agrochemicals concentration did not perfectly reflect our initial classification of sampling sites into three groups based on land use. However, this classification remains appropriate for the purpose of this study, despite the lack of statistical power.

### **2.6.1 Genetic diversity**

Using AFLP markers, we detected lower expected heterozygosity values for low contaminated population and higher values for moderately and highly contaminated sites (Table 2-IV). This can be partly explained by the agricultural pollution at those sites, as indicated by the significant positive correlation phosphate concentrations and heterozygosity. This result implies that genetic diversity increases with pollution levels, as one of our hypotheses predicted. However, we also detected a significant correlation between expected heterozygosity and the colonization distance from the Yamaska River mouth.

This effect of upstream colonization cannot be used by itself to explain the values of expected heterozygosity with respect to the contamination level (low, moderate, high). Namely, Deborah Stairs, Cowansville and Choiniere are the sampling sites at the extremity of the Yamaska hydrographic network, but they also presented the lowest heterozygosity values, regardless of pollution (Figure 2-1). Near the mouth of the River, heterozygosity values tend to increase, except for Pot-au-Beurre population, which is the most downstream site with the highest heterozygosity value. Thus, we hypothesize that the colonization of the



Yamaska hydrographic network was made upstream from a founder population near the St-Lawrence River.

Downstream drift was the first pattern of movement described by biologists to explain the evolutionary strategy of colonization (Waters 1965; Kohler 1985; Bruce 1986). Recently, research as shown upstream movement in both larvae and adults of stream salamanders, insects, fish and also frogs (Skalski & Gilliam 2000; Lowe 2003; Macneale & al. 2004; Wahbe & al. 2004; Cecala & al. 2009). Frogs may move predominantly upstream following metamorphosis to compensate for downstream larval drift and this phenomenon is more acute in disturbed area (Wahbe & al. 2004) like in the Yamaska River drainage basin. For the tailed frog (*Ascaphus truei* Stejneger), upstream movements constituted 57% of all juvenile movements and 28% of all adult movements in British Columbia (Wahbe & al. 2004). Such movements were also observed to find protection, or during the reproduction period in mature males. All upstream migrations contributed to the colonization of new habitats in the hydrological network.

All migrations have an impact on the variation of the genetic diversity (Congdon 1995; Lowe 2006), particularly when they result from a founder effect. We believe that upstream colonization in the Yamaska River was initiated from the St-Lawrence River source population at the periphery of the hydrographic network, with lower genetic diversity observed in those peripheral populations (Deborah Stairs, Cowansville, Choiniere). This is congruent with observations made on the bull trout (*Salvelinus confluentus*) using microsatellite markers, which revealed that historical colonization from one or more founder populations explains the loss of intrapopulation genetic variation (Costello AB & al. 2003).

### 2.6.2 Population differentiation

Genetic analyses revealed significant differentiation between some pairs of populations (Figure 2-V). However, the isolation-by-distance model was not significant to explain the genetic distances among sites. Interestingly, Cowansville was the only site significantly different from all other sites. It is only the population site with a majority of urban area at the landscape level (66.899%). This observation may explain the genetic differentiation, but more populations are required to corroborate this result. Another possible explanation is the fact that the Cowansville site was located in a small isolated pond without any connection with the Yamaska River.

Habitat fragmentation could explain the significant genetic differentiation of other sampling sites. Indeed, the Yamaska River drainage basin is characterized by land used mainly for agriculture (52.4%) and by forested areas (42.8%), including vegetation, regeneration and cutting zones (COGEBY). The anthropogenic expansion of the last 30 years has largely contributed to reduce the number of suitable habitats and to isolate the remaining habitats. Fragmentation is known to have a detrimental effect on genetic structure (Noël & al., 2007), and numerous studies have also shown that fragmentation influences gene flow and dispersion of amphibian species (Funk & al., 2005; Spear & al., 2005; Richards-Zawacki, 2009). Because dispersion and gene flow are very limited due to fragmentation in the Yamaska River drainage basin and because bullfrog individuals are confined to restricted habitat (Raney, 1940; Ingram & Raney, 1943; Smith & Green, 2005), isolated populations are more likely to be different. In addition, genetic drift is known to have an important effect on fragmented landscape by accelerating population differentiation (Reed & Frankham, 2003).

### 2.6.3 Agrochemicals and landscape ecology impact

Chronic exposure to agricultural pollution is known to have effects on the genetic diversity at the population level (Yauk & Quinn, 1996) and in some case to increase the rate of new mutations in the genome (Bickham & al., 2000). Our results showed a positive relationship between the numbers of polymorphic loci and atrazine, the contamination index (atrazine + metholachlore) and nitrogen concentration. We also obtained a significant relation between expected heterozygosity and phosphate concentration, with and without correcting for a colonization effect. These results suggest an introduction of new mutations in populations affected by higher levels of contamination (Whitehead & al., 2003). To our knowledge, only one study has observed larger numbers of mutations in a population of Marsh frog (*Rana ridibunda*) exposed to pesticides (Matson & al., 2006). However, several studies conducted with other chemical pollutants have detected an increase in the number of new mutations in exposed populations (Marvin & al., 1993; Malins & Gunselman, 1994; Yauk, 1998).

Mutations represent the raw material onto which selection acts; they are the source of genetic variation. The majority of mutations are deleterious and the arrivals of new mutations in relation with environmental pressures are often associated with a fitness reduction, collectively called "mutation load" (Bickham & al., 2000). This effect is predicted to be enhanced in populations with low heterozygosity caused by either drift or inbreeding (Barrett & Charlesworth, 1991), and to be a significant threat to all populations (Kondrashov, 1995; Lande, 1995). Chronic exposure to contaminant increases the mutation load that might interact with stochastic genetic changes (Belfiore & Anderson, 2001). The detection of new mutations in the genome of bullfrog populations in the Yamaska River drainage basin is important for further studies, in order to assess whether those mutations are heritable and deleterious.

Landscape ecology is also known to affect the genetic diversity of amphibian species by controlling the physical and chemical processes protecting water resources, providing

habitat for dispersion and influencing gene flow (Semlitsch & Bodie, 2003; Richards-Zawacki, 2009; Wang, 2009). Unfortunately, landscape ecology variables were not significantly correlated with genetic indices in this study. This suggests that the integrity of bullfrog populations is affected at a larger radius than what we calculated. Further analysis would be needed to determine the proper riparian buffer adequate for bullfrog health. As a sentinel species, those future results would be important for the entire ecosystems and should be taking into account for riparian buffer recommendations.

## **2.7 Conclusion**

Our results showed a relationship between genetic diversity indices and pollution contamination. Several significant correlations between the contamination index and genetic parameters confirm the impact of agricultural practices at the population level and the inhospitable environment found in the Yamaska River drainage basin. This also suggests that bullfrogs are badly affected by environmental conditions, and, as a sentinel species, this is reflecting the global quality of the ecosystem. Further analysis would be needed to explore the significance of this result. It would be particularly interesting to assess the genetic diversity of juveniles because mutations and reproduction defects seem to be lethal.

## **2.8 Acknowledgments**

We would like to thank M. Boily and all the members of the "Bullfrog Project" for the sampling effort, L. Gratton, M. Frenette and H. Breich for their contribution to this study, MDDEP agriculture for water analyses and all the members of the Laboratoire d'Écologie Moléculaire et Évolution for their comments on an earlier draft of this paper. This study

was supported by a NSERC and FQRNT scholarship to I. Lefebvre and NSERC grant OGP0155251 to F.J. Lapointe.

## **CHAPITRE 3**

---

Conclusion

### 3.1 Utilisation de l'AFLP

Conformément à la littérature, l'utilisation de l'AFLP s'est avérée très efficace pour répondre à nos hypothèses de recherche (Bleas & al., 1998; Bensch & Akesson, 2005). Cependant, en raison du nombre beaucoup plus élevé d'études utilisant les microsatellites que les AFLP, il est difficile de comparer les résultats obtenus avec ces deux types de marqueurs.

Les microsatellites sont aussi des marqueurs nucléaires de choix pour différencier génétiquement les populations (Jarne et Lagoda, 1996). Ces marqueurs nucléaires sont présents en grand nombre dans le génome des organismes et tous les locus ne sont généralement pas physiquement liés les uns aux autres, contrairement au génome mitochondrial (Cooper, 1999). La rapidité de leur évolution et leur grande variabilité permet de rendre compte des changements rapides de la structure et de la diversité génétique généralement induits par les polluants et substances mutagènes (Belfiore et Anderson, 2001). Ces marqueurs codominants sont composés de séquences répétées en tandem de deux à six paires de bases délimitées par des séquences uniques et dispersées de façon aléatoire dans tout le génome nucléaire (Jarne et Lagoda 1996).

Les microsatellites avaient été priorisés au début de cette étude et une vingtaine de marqueurs a été testé, parmi lesquels sept avaient été conçus spécifiquement pour le ouaouaron. Les autres locus avaient été dessinés pour des espèces de Ranidae phylogénétiquement près du ouaouaron comme la grenouille léopard (*Rana pipiens*) et la grenouille de Lataste (*Rana latastei*). Toutefois, des problèmes récurrents d'amplification pour la majorité des microsatellites testés nous ont forcé à utiliser une autre méthode pour répondre aux questions de l'étude.

Des travaux antérieurs ont démontré que les résultats portant sur la diversité génétique des populations ne peuvent être parfaitement corrélés entre l'AFLP et les microsatellites

(Mariette & al., 2001, 2002; Gaudeul & al., 2004). Le fait que les microsatellites évoluent plus rapidement que les marqueurs d'AFLP pourrait expliquer cette différence (Hoffman & al., 2009). Les valeurs de diversité génétique provenant des analyses réalisées à partir de l'AFLP ont tendance à être plus faibles que les valeurs établies par les microsatellites (Whitehead & al., 2003; Hoffman & al., 2009). Cependant, ce n'est pas toujours le cas lors d'études en milieu naturel où plusieurs forces stochastiques agissent sur la structure génétique des populations. Ainsi, les valeurs de diversité génétique d'une espèce de salamandre (*Dicamptodon tenebrosus*) de la Colombie-Britannique se sont révélées plus élevées pour l'AFLP que pour les microsatellites (Curtis & Taylor, 2004). Comparativement aux microsatellites, lorsque le nombre de fragments d'AFLP générés est plus petit que 500, les valeurs de diversité génétique sont fortement corrélées avec le taux de migration et la taille des populations (Mariette & al., 2002). Il est donc important de générer un grand nombre de fragments afin de pallier à ces différences. Ceci permet d'obtenir des résultats robustes reflétant la réalité des populations étudiées sans avoir à utiliser plus d'une méthode. Au niveau de la différenciation génétique des populations, les microsatellites et l'AFLP engendrent habituellement des résultats similaires (Mariette & al., 2001).

### **3.2 La diversité génétique**

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette étude nous ont permis de constater que, bien que les ouaouarons soient résistants aux pressions anthropiques, cette espèce semble affectée par la pollution agricole retrouvée dans tout le bassin versant de la rivière Yamaska.

Les analyses génétique ont démontré que de faibles valeurs de diversité génétique sont associées aux trois populations dont le niveau de contamination est faible et que ces valeurs sont plus élevées pour les sites moyennement et fortement contaminés (Tableau 2-IV). Partiellement, ces résultats peuvent être expliqués par la corrélation positive significative



entre les données d'hétérozygotie et la concentration en phosphate. Comme le stipulait une de nos hypothèses, la pollution aurait ainsi tendance à augmenter la diversité génétique des populations exposées. Cependant, nous avons aussi démontré qu'il existe une relation positive significative entre l'hétérozygotie et la distance de chaque site par rapport à l'embouchure de la rivière Yamaska. L'effet non négligeable de la colonisation vers l'amont sur l'hétérozygotie attendue ne nous permet donc pas d'expliquer ces valeurs en se basant uniquement sur le niveau de contamination. En effet, les populations de Deborah Stairs, Cowansville et Choinière se situent à l'extrémité du réseau hydrographique (amont) et présentent les plus petites valeurs d'hétérozygotie (Figure 2-1). Les populations qui se situent près de l'embouchure de la rivière présentent des valeurs plus élevées d'hétérozygotie, jusqu'à la valeur maximum qui correspond au site Pot-au-Beurre situé à une dizaine de km de l'embouchure. Historiquement, nous supposons que la colonisation de quelques individus en amont à partir du fleuve St-Laurent (effet fondateur) pourrait expliquer nos résultats concernant la diversité génétique.

Les dispersions passives ou actives en aval ont été les premiers mouvements décrits par les biologistes afin d'expliquer les stratégies de colonisation (Waters 1965; Kohler 1985; Bruce 1986). Récemment, certaines études ont démontré qu'il existe aussi des déplacements en amont pour expliquer ces stratégies de dispersion. Des mouvements en amont ont été observés chez des larves et des adultes de salamandres de ruisseaux, d'insectes, de poissons ainsi que chez certaines espèces de grenouilles aquatiques (Skalski & Gilliam 2000; Lowe 2003; Macneale & al. 2004; Wahbe & al. 2004; Cecala & al. 2009). Principalement, les grenouilles se déplacent des déplacements en amont pour compenser la dérive passive des petites larves en aval et ce, plus fréquemment dans les zones perturbées (Wahbe & al. 2004). Par exemple, chez la « tailed frog », une espèce menacée par des pressions anthropiques en Colombie-Britannique, 57% des mouvements de dispersion des juvéniles et 28% de ces mouvements chez les adultes se font en amont (Wahbe & al. 2004). La colonisation en amont peut aussi être effectuée dans un but de protection ou, par les mâles matures, durant la période de reproduction afin de trouver de meilleures femelles.

Quelle que soit la raison, ces dispersions en amont contribuent à la colonisation de nouveaux habitats par des individus de la population source et, par le fait même, à la dispersion des gènes dans le bassin versant. Ces mouvements vont donc avoir un effet sur les variations de la diversité génétique entre les populations en amont et les populations plus en aval (Congdon 1995; Lowe 2006).

Nous croyons en une colonisation vers l'amont des ouaouarons de la rivière Yamaska à partir d'une population fondatrice située à l'embouchure de la rivière. Cette colonisation aurait eu lieu vers des sites en périphérie du système hydrologique avec comme conséquence une diminution de la diversité génétique de ces populations périphériques. Cette hypothèse est congruente avec d'autres observations ayant été faites sur une espèce de poisson. Une étude sur l'omble à tête plate (*Salvelinus confluentus*) avec des marqueurs microsatellites qui a révélé que les colonisations historiques, à partir d'une ou de plusieurs populations fondatrices, participent à la perte de variabilité génétique (Costello AB & al. 2003).

Bien que nous puissions expliquer les résultats obtenus, nous restons tout de même prudents face à ceux-ci. En effet, plusieurs études ont démontré les conséquences et problèmes engendrés par la contamination agricole au niveau des individus. Malheureusement, la technique génétique employée n'a pas réussi à rendre compte de ces effets au niveau des populations. Les effets tératogènes de la pollution agricole sur les grenouilles ont été démontrées dans plusieurs études (Fort & al., 1999; McCallum, 1999; Meteyer & al., 2000; Vandenlangenberg & al., 2003; Mann & al., 2009). Un accroissement significatif de la fréquence des membres postérieurs surnuméraires et de malformations digitales a été signalé dans les régions agricoles (Linzey & al., 2003; McCallum & Trauth, 2003, Taylor & al., 2005; Gurushankara & al., 2007). Ces malformations sont principalement observées chez les juvéniles (Ouellet & al., 1997; Meteyer & al., 2000), ce qui suppose un effet léthal. Aussi, les individus exposés aux pesticides et aux fertilisants présentent souvent des troubles du système reproducteur (Belfroid & al., 1999; Korner & al., 2000; Tavera-Mendoza & al., 2002; Hayes & al., 2002; 2006; Plouffe-Malette & al.,

2009a, 2009b). Par conséquent, le recrutement est faible et l'apport limité de nouveaux allèles peut mener éventuellement à une réduction de ces populations. Ainsi, la taille efficace ( $N_e$ ) des populations est faible puisque seuls quelques individus réussissent à se reproduire. La réduction de la diversité génétique de ces populations exposées est à envisager. De plus, des événements stochastiques (dérive génique) peuvent avoir tendance à s'accroître chez les petites populations efficaces (Reed et Frankham, 2003). La pérennité des populations est donc à risque puisque la diversité génétique est liée à la survie des individus; une faible diversité génétique réduit la capacité d'une espèce à s'adapter aux changements environnementaux (Young & al. 1996). Il serait donc important de poursuivre les analyses chez les ouaouarons de la rivière Yamaska en incluant de nouveaux marqueurs génétiques plus susceptibles de relier les effets individuels des polluants agricoles au niveau des processus populationnels.

### **3.3 Différenciation génétique**

Les analyses génétiques ont aussi détecté une différenciation significative entre quelques paires de populations (Tableau 2-V). Le modèle d'isolement par distance n'était pas significatif et on ne peut donc pas expliquer la différenciation génétique des populations en fonction de la géographie. La population de Cowansville est la seule à être génétiquement différente de toutes les autres populations. Ce site est aussi le seul à être situé en zone urbaine. En effet, nos mesures d'écologie du paysage ont démontré que pour un rayon de 1 km, 66,89% du territoire était urbain. Par contre, il faudrait effectuer de plus amples analyses incluant d'autres sites en zone urbaine pour confirmer cette hypothèse. La différenciation génétique de la population de Cowansville pourrait aussi s'expliquer par le fait que ce site, étant un délaissé de la rivière Yamaska, est très isolé et ne comporte presque qu'aucune connexion avec celle-ci (observations personnelles).

Pour les autres populations ayant des différences génétiques significatives, nous supposons un effet plus important de la fragmentation de l'habitat pour expliquer cette différenciation

génétique. Le bassin versant de la rivière Yamaska se caractérise par une utilisation intensive des terres principalement pour l'agriculture (52,4%) et les zones forestières de friches ou en régénération (42,8%) (COGEBY). L'expansion anthropique de ces 30 dernières années a largement contribué à réduire le nombre d'habitats appropriés et à isoler les habitats résiduels. La fragmentation a un effet néfaste sur la structure génétique des populations (Noël & al., 2007), et de nombreuses études ont également démontré qu'elle influence le flux génique et la dispersion de plusieurs espèces d'amphibiens (Funk & al., 2005; Spear & al., 2005 ; Richards-Zawacki, 2009). Ainsi, les populations sont génétiquement isolées dans tout le bassin versant de la rivière Yamaska où elles se sont différenciées. La dérive génique, combinée à l'isolement géographique (Reed et Frankham, 2003), favorise la différenciation génétique des populations.

### **3.4 Impact des polluants et de l'écologie du paysage en milieu agricole**

Nos résultats écotoxicologiques ont révélé que le bassin versant de la rivière Yamaska est contaminé par une combinaison de pesticides et de nutriments dont la concentration ne reflète pas parfaitement la classification originales des sites d'échantillonnage en trois catégories. En effet, pour chacune des mesures de pollution nous avons notés des exceptions concernant la classification de certains sites ce qui ne nous permet pas d'établir une nouvelle classification et peut possiblement diminuer la puissance de certains tests statistiques.

L'exposition chronique à la pollution agricole a des effets directs et indirects sur la diversité génétique des populations (Yauk & Quinn, 1997) et, dans certains cas peut augmenter le taux de nouvelles mutations dans le génome (Bickham & al., 2000). Nos résultats ont montré une relation positive entre le nombre de locus polymorphes et l'atrazine, l'indice de contamination (atrazine + métolachlore) et la concentration en azote (nitrite + nitrate) des sites à l'étude. Le nombre de locus polymorphes nous renseigne sur l'introduction de nouvelles mutations dans une population (Whitehead & al., 2003) et ce paramètre est

significativement plus élevé chez les populations associées à une exposition modérée et élevée aux contaminants. À notre connaissance, une seule étude a observé un plus grand nombre de nouvelles mutations de l'ADN mitochondriales pour des populations de grenouilles (*Rana ridibunda*) exposées à des pesticides (Matson & al., 2006). Cependant, les résultats de travaux menés sur d'autres polluants chimiques ont montré une augmentation du nombre de nouvelles mutations pour les populations exposées (Marvin & al., 1993; Malins & Gunselman, 1994; Yauk, 1998).

Les mutations représentent la matière première sur laquelle agit la sélection. Elles représentent la source des variations génétiques pouvant être observées. L'apparition de nouvelles mutations liées aux pressions anthropiques est nuisible car elles entraînent une réduction de l'aptitude (Bickham & al., 2000). Leurs effets sont significatifs pour toutes les populations, mais ils sont plus importants au sein des populations où l'hétérozygotie est faible (Barrett & Charlesworth, 1991; Kondrashov, 1995; Lande, 1995). L'exposition chronique à un contaminant peut augmenter l'incidence de mutations susceptibles d'interagir avec les modifications génétiques stochastiques auxquelles sont soumises les populations (Belfiore et Anderson, 2001). La détection de nouvelles mutations dans le génome des populations de ouaouarons du bassin versant de la rivière Yamaska est importante, mais des recherches additionnelles serviront à évaluer si ces mutations sont héréditaires et néfastes pour la santé.

Chez les amphibiens, l'écologie du paysage peut également affecter la diversité génétique des populations (Semlitsch & Bodie, 2003). La composition du paysage entourant les plans d'eau contrôle les processus physiques et chimiques, influence la qualité des ressources et fournit des habitats pour la dispersion (Semlitsch & Bodie, 2003; Richards-Zawacki, 2009; Wang, 2009). Malheureusement, les variables d'écologie du paysage mesurées dans le cadre de cette étude n'ont démontré aucune corrélation significative avec les indices de diversité génétique. Ceci est une indication que la composition du paysage affecte les populations à une plus grande échelle que ce que nous avons mesuré. Une analyse plus approfondie serait nécessaire afin de déterminer la taille de la zone tampon adéquate pour

les populations de ouaouarons de la rivière Yamaska.

En raison de son statut d'espèce sentinelle, ces résultats devraient être pris en compte dans les recommandations d'aménagements futurs des milieux riverains.

### **3.5 Bilan et recherches futures**

Ce projet de recherche a contribué à l'avancement des connaissances sur les populations de ouaouarons du bassin versant de la rivière Yamaska. Bien qu'un effet direct des polluants agricoles n'ait pu être démontré en relation avec tous les paramètres génétiques étudiés, nous avons détecté une tendance de l'influence des pesticides et des nutriments sur la structure génétique des populations. Ces résultats sont très prometteurs et ils justifient des recherches futures qui viseront à établir une relation plus claire entre les polluants agricoles et la diversité génétique.

En ce sens, il serait intéressant d'évaluer la diversité génétique des juvéniles pour percevoir l'impact direct des mutations et des problèmes de reproduction sur cette cohorte d'individus. On pourrait s'attendre à obtenir des valeurs de diversité génétique plus élevées puisque les désordres provoqués par les polluants affectent principalement les juvéniles. Il serait également utile de combiner l'étude des marqueurs neutres que sont les AFLP à l'étude de gènes nucléaires pour nous informer sur l'hérédité des mutations observée au niveau des membres. Finalement, il serait nécessaire de retourner sur le terrain afin de vérifier l'état des populations que nous avons retirées de l'étude à cause de leur petit effectif. Nous serions ainsi à même de compléter l'échantillonnage de ces sites et d'inclure ces populations additionnelles dans des analyses futures. Un plan d'échantillonnage plus ambitieux aiderait certainement à démontrer le véritable impact des polluants agricoles au niveau génétique.

## RÉFÉRENCES

---

AARQ (2007) Atlas des amphibiens et reptiles du Québec : banque de données active depuis 1988 alimentée par des bénévoles et professionnels de la faune. Société d'histoire naturelle de la vallée du Saint-Laurent et ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec.

Agriculture et agroalimentaire Canada. <http://www.agr.gc.ca/nlwis-snite>. Page consultée le 4 décembre 2009.

Alonso-Blanco C, Peters AJM, Koornneef M, Lister C, Dean C, Van den Bosch N, Pot J et Kuiper MTR (1998) Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *The Plant Journal* 14: 259-271.

Alvarez R, Honrubia MP et Herraéz MP (1995) Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox and Folidol during larval development of *Rana perezi*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28: 349-356.

Austin JD, Davila JA, Loughheed SC et Boag PT (2003) Genetic evidence for female-biased dispersal in the bullfrog, *Rana catesbeiana* (Ranidae). *Molecular Ecology* 12: 3165-3172.

Barrett SHC et Charlesworth D (1991) Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature* 352: 522-526.

Belfiore NM et Anderson SL (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research* 489: 97-122.

Belfroid A, Van Der Horst A, Vethaak AD, Schafer AJ, Rijs GB et Wegener J (1999) Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in The Netherlands. *Science of Total Environment* 225:101-108.

Bensch S et Akesson M (2005) Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology* 14: 2899-2914.

Bérubé VE, Boily MH, DeBlois C, Dassylva N et Spear PA (2005) Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Quebec, Canada. *Aquatic Toxicology* 71: 109-120.

Bickham JW, Sandhu S, Hebert PDN, Chikhi L et Athwal R (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 463: 33-51.

Bickham JW et Smolen MJ (1994) Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environment Health Perspective* 102: 25–28.

Blaustein AR, Kiesecker JM, Chivers DP, Hokit DG, Marco A, Belden LK et Hatch A (2003) Effects of ultraviolet radiation on amphibians: field experiments. *American Zoologist* 38: 799-812.

Blaustein AR, Wake DB et Sousa WP (1994) Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology* 8: 60-71.

Bleas MJ, De Grandis SA, Lee H et Trevors JT (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) : a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21: 99-114.



Boily M (2004) Projet sur les amphibiens en milieu agricoles: état des connaissances et protocole expérimental. Réseau de recherche en écotoxicologie du Saint-Laurent, Université du Québec à Montréal et Centre TOXEN. 26 pages.

Boily M, Bérubé V, DeBlois C, Dassylva N et Spear P (2005) Hepatic retinoids in bullfrogs, *Rana catesbeiana* in relation to pesticide agricultural exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1099-1106.

Boily M, Thibodeau J et Bisson M (2009) Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination. *Aquatic Toxicology* 91: 118-125.

Bridges CM et Semlitsch RD (2000) Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of ranidae and patterns of amphibian decline. *Conservation Biology* 14: 1490-1499.

Bruce RC (1986) Upstream and downstream movements of *Eurycea Bislineata* and other salamanders in the southern Appalachian stream. *Herpetologica* 42: 149-155.

Bruneau M et Magnin E (1980) Croissance, nutrition et reproduction des ouaouarons *Rana catesbeiana* shaw (Amphibia Anura) des Laurentides au nord de Montréal. *Canadian Journal of Zoology* 58: 174-183.

Bush JD, Miller MP, Paxton EH, Sogge MK et Keim P (2000) Genetic variation in the endangered southwestern willow flycatcher. *Auk* 117: 586-595.

Campbell D, Duchesne P et Bernatchez L (2003) Blackwell Publishing Ltd. AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites. *Molecular Ecology* 12: 1979-1991.

Cecala KK, Price SJ et Dorcas ME (2009) Evaluating existing movement hypotheses in linear systems using larval stream salamander. *Canadian journal of zoology* 87: 292-298.

Cevasco A, Urbatzka R, Bottero S, Massari A, Pedemonte F, Kloas W et Mandich A (2008) Endocrine disrupting chemicals (EDC) with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: II. Effects on gonad histomorphology. *Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology and Pharmacology* 147: 241-251.

COGEBY (2008) Conseil de gestion du bassin versant de la rivière Yamaska : <http://www.cogebly.qc.ca/portrait-du-bassin-versant>. Page consultée le 8 novembre 2009.

Collins JP et Storfer A (2003) Global amphibian decline : sorting the hypotheses. *Diversity and Distribution* 9: 89-98.

Congdon BC (1995) Unidirectional gene flow and maintenance of genetic diversity in mosquitofish *Gambusia holbrooki* (Teleostei: Poeciliidae). *Copeia* 1: 162-172.

Cooper GM (1999) *La cellule: une approche moléculaire*. DeBoeck Université, Paris et Bruxelles. 674 pages.

Costello AB, Down TE, Pollard SM, Pacas CJ et Taylor EB (2003) The influence of history and contemporary stream hydrology on the evolution of genetic diversity within species: an examination of microsatellite dna variation in bull trout, *Salvelinus confluentus* (pisces: Salmonidae). *Evolution* 57: 328-344.

Culley DD et Gravois C (1970) Frog culture... a new look at an old problem. *American Fish Farmer* 1: 5-10.

Desroches JF et Rodrigue D (2004) Amphibiens et reptiles du Québec et des Maritimes. Édition Michel Quintin, Québec (Canada). 288 pages.

Emlen S (1976) Lek organisation and mating strategies in the bullfrog. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 1: 283-313.

Environnement Québec (2002) L'utilisation des pesticides dans le maïs et le soya – Qualité de l'eau en milieu agricole. *Envirodoq*: ENV/2002/0340.

Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi KI, Hayes TB, Takayanagi R et Nawata H (2007) Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives* 115: 720-727.

Fort DJ, Rogers RL, Copley HF, Bruning LA, Stover EL, Helgen JC et Burkhart JG (1999) Progress toward identifying causes of maldevelopment induced in *Xenopus* by pond water and sediment extracts from Minnesota, USA. *Environmental toxicology and Chemistry* 18: 2316-2324.

Frost SW (1935) The food of *Rana catesbeiana* shaw. *Copeia* 1:15-18.

Funk WC, Blouin MS, Corn PS, Maxell BA, Pilliod DS, Amish S et Allendorf FW (2005) Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Molecular Ecology*, 14: 483-496.

Garber EAE (2002) Mineral deficiency and the use of the FETAX bioassay to study environmental teratogens. *Journal of Applied Toxicology* 22: 237-240.

Garber EAE, Erb JL, Magner J et Larsen G (2004) Low levels of sodium and potassium in the water from wetlands in Minnesota that contained malformed frogs affect the rate of *Xenopus* development. *Environmental Monitoring and Assessment* 90: 45-64.

Gaudeul M, Till-Bottraud I, Barjon F et Manel S (2004) Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 92: 508-518.

Gurushankara HP, Krishnamurthy SV et Vasudev V (2007) Morphological abnormalities in natural populations of common frogs inhabiting agroecosystems of central Western Ghats. *Applied Herpetology* 4: 39-45.

Hanlin HG, Martin FD, Wike LD et Bennett S.H. (2000) Terrestrial activity, abundance and species richness of amphibians in managed forests in South Carolina. *American Midland Naturalist* 143: 70-83.

Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA et Vonk A (2002) Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 5476-5480.

Hayes TB, Stuart AA, Mendoza M, Collins A, Noriega N, Vonk A, Johnston G, Liu R et Kpodzo D (2006) Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17  $\beta$ -estradiol): support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environmental Health Perspectives* 114: 134-141.

Hewitt OH (1950) The bullfrog as a predator on duckling. *Journal of Wildlife Management* 14: 244.

Hoffman JI, Dasmahapatra KK, Amos W, Phillips CD, Gelatt TS et Bickham JW (2009) Contrasting patterns of genetic diversity at three different genetic markers in a marine mammal metapopulation. *Molecular Ecology* 18: 2961-2978.

Houlahan JE, Findlay CS, Schmidt BR, Meyer AH et Kuzmin SL (2000) Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404: 752-755.

Howard RD (1978) The evolution of mating strategies in bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Evolution* 32: 850-871.

Howard RD (1988) Reproductive success in two species of anurans. In: *Reproductive Success*. Ed Clutton-Brock TH, University of Chicago Press, Chicago: 99-118.

Ingram MW et Raney EC (1943) Additional studies on the movement of tagged bullfrogs, *Rana catesbeiana* shaw. *The American Midland Naturalist* 29: s239-241.

Ihaka R. et Gentleman R. (1996) R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5: 299-314.

Jarne P et Lagoda PJJ (1996) "Microsatellites, from molecules to populations and back". *Trends in Evolution and Ecology* 11: 424-429.

Kaplan HM et Overpeck JM (1964) Toxicity of halogenated hydrocarbon insecticides for the frog *Rana pipiens*. *Herpetologica* 20: 163-169.

Keane B, Collier MH, Rogstad S.H. (2005) Pollution and genetic structure of North American populations of the common dandelion (*Taraxacum officinale*). *Environmental Monitoring and Assessment* 105: 341-357.

Kiesecker JM et Blaustein AR (1998) Effects of introduced bullfrogs and smallmouth bass on microhabitat use, growth, and survival of native Red-legged Frogs (*Rana aurora*). Conservation Biology 12: 776-787.

Kohler SL (1985) Identification of stream drift mechanisms: an experimental and observational approach. Ecology 66: 1749-1761.

Korner W, Bolz U, Sussmuth W, Hiller G, Schuller W et Hanf V (2000) Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. Chemosphere 40: 1131-1142.

Korschgen LJ et Baskett TS (1963) Foods of impoundments and streams dwelling bullfrogs in Missouri. Herpetologica 19: 89-99.

Korschgen LJ et Moyle DL (1955). Food habits of the bullfrog in central Missouri farm ponds. American Midland Naturalist 54: 332-341.

Kupferberg SJ (1997) Bullfrog (*Rana catesbeiana*) invasion of a California river: the role of larval competition. Ecology 6: 1736-1751.

Lande R (1995) Mutation and conservation. Conservation Biology 9: 782-791.

Laufer G, Canavero A, Nunez D et Maneyro R (2008) Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. Biological Invasions 10: 1183-1189.

Linzey DW, Burroughs J, Hudson L, Marini M, Robertson J, Bacon JP, Nagarkatti M et Nagarkatti PS (2003) Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. International Journal of Environmental Health Research 13: 125-148.

Lowe WH (2003) Linking dispersal to local population dynamics: a case study using a headwater salamander system. *Ecology* 84: 2145-2154.

Lowe WH, Likens GE, McPeck MA et Buso DC (2006) Linking direct and indirect data on dispersal: isolation by slope in a headwater stream salamander. *Ecology* 87: 334-339.

Lowrance R, Todd R, Fail J, Hendrickson O, Leonard R et Asmussen L (1984) Riparian forests as nutrient filters in agricultural watersheds. *Bioscience* 34: 374-377.

Malins DC et Gunselman S (1994) Fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry reveal a remarkable degree of structural damage in the DNA of wild fish exposed to toxic chemicals. *Proceeding of the Natural Academy of Science of the U.S.A.* 91: 13038-13041.

Mann RM, Hyne RV, Choung CB et Wilson SP (2009) Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157: 2903-2927.

Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression Approach. *Cancer research* 27: 209-220.

Marsh DM, Thakur KA, Bulka KC et Clarke LB (2004) Dispersal and colonization through open fields by a terrestrial, woodland salamander. *Ecology* 85: 3396-3405.

Marcogliese DJ, King KC, Salo HM, Fournier M, Brousseau P, Spear P, Champoux L, McLaughlin JD et Boily M (2009) Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquatic Toxicology* 91: 126-134.

Mariette S, Chagné D, Lézier C, Pastuska P, Raffin A, Plomion C et Kremer A (2001) Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 86: 469-479.

Mariette S, Le Corre V, Austerlitz, F et Kremer A (2002) Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. *Molecular Ecology* 11: 1145-1156.

Marvin CH, Allan L, McCarry BE et Bryant DW (1993) Chemicorbiological investigation of contaminated sediments from the Hamilton Harbour area of western Lake Ontario. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 22: 61-70.

Matson CW, Lambert MM, McDonald TJ, Autenrieth RL, Donnelly KC, Islamzadeh A, Politov DI et Bickham JW (2006) Evolutionary toxicology: population-level effects of chronic contaminant exposure on the marsh frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan. *Environmental Health Perspectives* 114: 547-552.

McCallum ML (1999) *Rana sphenocephala* (southern leopard frog) malformities found in Illinois with behavioral notes. *Transactions of the Illinois State Academy of Science* 92: 257-264.

McCallum ML et Trauth SE (2003) A forty-three year museum study of northern cricket frog (*Acris crepitans*) abnormalities in Arkansas: upward trends and distributions. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 522-528.

Meteyer CU, Loeffler IK, Fallon JF, Converse KA, Green E, Helgen JC, Kersten S, Levey R, Eaton-Poole L et Burkhart JG (2000) Hind limb malformations in free-living northern leopard frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. *Teratology* 62: 151-171.



Meudt HM et Clarke AC (2007) Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12: 106-117.

MDDEP, 1998. État de l'écosystème aquatique du bassin versant de la rivière Yamaska— Synthèse 1998. Ministère du Développement durable, environnement et parcs du Québec. [http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/eco\\_aqua/yamaska/index.htm](http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/eco_aqua/yamaska/index.htm).

Minton JE (1949) Coral snake preyed upon by the bullfrog. *Copeia* 1949: 288.

Moyle PB (1973) Effects of introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*), on the native frogs of the San Joaquin Valley, California. *Copeia* 1: 18-22.

Mueller UG et Wolfenbarger L (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trend in Ecology and Evolution* 14: 398-394.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 70: 3321-3323.

Noël S, Ouellet M, Galois P et Lapointe FJ (2007) Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. *Conservation Biology* 8: 599-606.

Osborn D, Cooke AS et Freestone S (1981) Histology of a teratogenic effect of DDT on *Rana temporaria* tadpoles. *Environmental Pollution (Series A)* 25: 305-319.

Ouellet M, Bonin J, Rodrigue J, Desgranges JL et Lair S (1997) Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 95-104.

Pechman JHK, Scott DE, Semlitsch RD, Caldwell JP, Vitt LJ et Gibbons JW (1991) Declining amphibian populations: the problem of separating human impacts from natural fluctuations. *Science* 253: 892-895.

Pennisi E (2009) Life and death play out on the skins of frogs. *Science* 326: 507-508.

Petranka JW et Murray SS (2001) Effectiveness of removal sampling for determining salamander density and biomass: a case study in an Appalachian streamside community. *Journal of Herpetology* 35: 36-44.

Plouffe-Malette M, Boily M, Spear P et Devine PJ (2009a) Sexual differentiation and development of the reproductive system of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpole in an agricultural environment. Oral presentation abstract, Aquatic Toxicology Workshop.

Plouffe-Malette M, Boily M, Spear P et Devine PJ (2009b) Influence of agricultural contamination on reproductive system of male bullfrog (*Rana catesbeiana*). Poster presentation abstract, Aquatic Toxicology Workshop.

Primeau S, La Violette N, St-Onge J et Berryman D (1999) Québec envirodoq no. ENV990224, rapport no. EA-14.

Purnima G, Altwegg R et Anholt BR (2005) Matrix model investigation of invasive species control: bullfrogs on Vancouver Island. *Ecological Applications* 15: 2161-2170.

Raney EC (1940) Summer movements of the bullfrog, *Rana catesbeiana* shaw, as determined by the jaw-tag method. *The American Midland Naturalist* 23: 733-745.

Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230-237.

Richards-Zawacki C (2009) Effects of slope and riparian habitat connectivity on gene flow in an endangered Panamanian frog, *Atelopus varius*. *Diversity and Distributions* 15: 796-806.

Ross AA et Richards SJ (1999) Global amphibian declines: A problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematic* 30: 133-165.

Ryan MJ (1980) The reproductive behavior of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Copeia* 1: 108-114.

Saliba-Colombani V, Causse M, Gervais L et Philouze J (2000) Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome* 43: 29-40.

Sambrook J, Fritsch EF et Maniatis T (1989) *Molecular cloning: Laboratory manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Santé Canada (1990) Métolachlore. <http://www.hc-sc.gc.ca/ewhsemt/pubs/water-eau/metolachlor-metolachlore/index-fra-php>. Page consultée le 8 novembre 2009.

Schneider S, Roessli D et Excoffier L (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Semlitsch RD (1998) Biological determination of terrestrial buffer zones for pond-breeding salamanders. *Conservation Biology* 12: 1113-1119.

Semlitsch RD et Bodie JR (2003) Biological criteria for buffer zones around wetlands and riparian habitats for amphibians and reptiles. *Conservation Biology* 17: 1219-1228.

Semlitsch RD, Bridges CM, Welch AM (2000) Genetic variation and a fitness tradeoff in the tolerance of gray treefrog (*Hyla versicolor*) tadpoles to the insecticide carbaryl. *Oecologia* 125: 179-185.

Shannon CE et Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

Shirose LJ, Brooks RJB et Desser SS (1993) Intersexual differences in growth, mortality, and size at maturity in bullfrogs in central Ontario. *Canadian Journal of Zoology* 71: 2363-2369.

Skalski GT et Gilliam JF (2000) Modeling diffusive spread in a heterogeneous population: a movement study of stream fish. *Ecology* 81: 1685-1700.

Smith MA et Green DM (2005) Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* 28: 110-28.

Sparling DW, Fellers GM et McConnell LL (2001) Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1591-1595.

Spear P, Boily M, Giroux I, DeBlois C, Leclair MH, Levasseur M et Leclair R (2009) Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada. *Aquatic toxicology* 91: 110-117.

Spear SF, Peterson CR, Matocq MD, Storfer A (2005) Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology* 14: 2553-2564.

Squirrell J, Hollingsworth MP, Woodhead M, Russell J, Lowe AJ, Gibby M et Powell W (2003) How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants?

Molecular Ecology 12: 1339-1348.

Staton JL, Schizas NV, Chandler GT1, Coull BC et Quattro JM (2001) Ecotoxicology and population genetics: The emergence of “phylogeographic and evolutionary ecotoxicology”.

Ecotoxicology 10: 217-222.

Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D et Marcogliese D (2002) Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. Environmental Toxicology and Chemistry 21: 527-531.

Taylor B, Skelly D, Demarchis LK, Slade MD, Galusha D et Rabinowitz PM (2005) Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. Environmental Health Perspectives 113: 1497-1501.

Thompson EA et Meagher TR (1998) Genome sharing and the estimation of pairwise relationship. Theoretical and Applied Genetics 97: 857-864.

Vandenlangenberg SM, Canfield JT et Magner JA (2003) A regional survey of malformed frogs in Minnesota (USA) (Minnesota malformed frogs). Environmental Monitoring and Assessment 82: 45-61.

Vasconcelos D et Calhoun AJK (2004) Movement patterns of adult and juvenile *Rana sylvatica* (LeConte) and *Ambystoma maculatum* (Shaw) in three restored seasonal pools in Maine. Journal of Herpetology 38: 551-561.

Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M et Roldan-Ruiz I (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of

a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* 11: 139-151.

Veldhoen N, Skirrow RC, Ji L, Domanski D, Bonfield ER, Bailey CM et Helbing CC (2006) Use of heterologous cDNA arrays and organ culture in the detection of thyroid hormone-dependent responses in a sentinel frog, *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D* 1: 187-199.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M et Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

Wahbe TR, Bunnell FL et Bury RB (2004) Terrestrial movements of juvenile and adult tailed frog in relation to timber harvest in coastal British Columbia. *Canadian journal of forest research* 34: 2455-2466.

Wang IJ (2009) Fine-scale population structure in a desert amphibian: landscape genetics of the black toad (*Bufo exsul*). *Molecular Ecology* 18: 3847-3856.

Waters TF (1965) Interpretation of invertebrate drift in streams. *Ecology* 46: 327-334.

Watt PJ et Javis P (1997) Survival analysis in palmate newts exposed to ammonium nitrate agricultural fertilizer. *Ecotoxicology*, 6: 355-362.

Weir BS et Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Wilbur HM et Collins JP (1973) Ecological aspect of amphibian metamorphosis. *Science* 182: 1305-1314.

Willis YL, Moyle DL et Baskett TS (1956) Emergence, breeding, hibernation, movements and transformation of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in Missouri. *Copeia* 1958: 30-41.

Whitehead A, Anderson SL, Kuivila KM, Roach JL et May B (2003) Genetic variation among interconnected populations of *Catostomus occidentalis*: implications for distinguishing impacts of contaminants from biogeographical structuring. *Molecular Ecology* 12: 2817-2833.

Woodhead M, Russell J, Squirrell J, Hollingsworth PM, Mackenzie K, Gibby M et Powell W (2005) Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions. *Molecular Ecology* 14: 1681-1695.

Yauk CL (1998) Monitoring for induced heritable mutations in natural populations: application of minisatellite DNA screening. *Mutation Research* 411: 1-10.

Yauk CL et Quinn JS (1996) Multilocus DNA fingerprinting reveals high rate of heritable genetic mutation in herring gulls nesting in an industrialized urban site. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 93: 12137-12141.

Young A, Boyle T et Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 413-418.







Myclobutanol	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Azinphos-méthyl	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Phosalone	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Diméthénamide	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0,03
Méthidathion	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
1-naphtol	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Bendiocarbe	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Glyphosate	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	<b>0.22</b>
AMPA	0,2	0,2	0,2	0,2	<b>1,4</b>	0,2	0,2

\*Les valeurs en gras indiquent une mesure qui dépasse le seuil de détection de la méthode.  
Les autres chiffres représentent cette limite.