

Université de Montréal

**Dynamique de la variation génétique et épigénétique chez
un vertébré kleptogène**

par
France Beauregard

Département de Sciences biologiques
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Arts et des Sciences
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences biologiques

janvier 2016

© France Beauregard, 2015

Résumé

La variation phénotypique est essentielle à la persistance des organismes dans le temps ainsi qu'à la colonisation de nouveaux habitats. Les principales sources de variation phénotypique sont la génétique et l'épigénétique. L'épigénétique a été proposée comme un atout important pour les organismes asexués pour compenser le manque de diversité génétique. L'objectif de cette étude est d'évaluer si l'absence de variation génétique est compensée par l'épigénétique en comparant les profils de méthylation d'individus gynogènes et kleptogènes des hybrides de salamandre à points bleus. Les individus échantillonnés s'organisent en cinq groupes génétiquement différenciés, provenant du même haplome paternel *A. jeffersonianum*. Deux des cinq groupes sont exclusivement gynogènes, pour des raisons écologiques ou génomiques. Les trois autres groupes sont formés d'individus parfois kleptogènes, car ils présentent une variation génétique plus élevée au sein d'un site qu'entre les sites, en plus de porter des allèles très divergents par rapport à la distribution globale des allèles hybrides, trouvés en haute fréquence dans les populations sympatriques de *A. laterale*. Les patrons épigénétiques sont variables et distincts entre les cinq groupes génétiques. Les groupes gynogènes sont les seuls à présenter un effet environnemental significatif sur leurs patrons épigénétiques, suggérant que ces individus clonaux doivent être en mesure de maximiser leur potentiel de variation épigénétique pour faire face à des variations environnementales.

Mots-clés : Épigénétique, Variation génétique, Kleptogénèse, Plasticité phénotypique, Unisexués, *Ambystoma*

Abstract

Phenotypic variation is critical to the persistence of organisms over time and the colonization of new habitats. The main consistent sources of phenotypic variation are genetics and epigenetics. Epigenetics was proposed as a valuable asset for asexual organisms to compensate or to complete genetic diversity. The objective of this study is to assess whether lack of genetic variation is compensated by epigenetics by comparing methylation patterns of gynogen and kleptogen individuals of the blue-spotted salamander hybrids. Individuals sampled clustered in five genetically differentiated groups, derived from the very same paternal *A. jeffersonianum* haplome. Two out of the five groups are exclusively gynogenetic, for either ecological or genomic factors. The other three groups occasionally formed kleptogen individuals, since they display a higher genetic variation within sites than among sites, in addition of displaying highly divergent alleles found in high frequency in the sympatric *A. laterale* populations. Epigenetic patterns are variable and distinct among the five genetic groups. Gynogenetic groups are the only one to display a significant environmental effect on their epigenetic pattern, suggesting clonal individuals must be able to make the most from their epigenetic variation potential to deal with environmental variations.

Keywords : Epigenetics, Genetic variation, Kleptogenesis, Unisexuality, Phenotypic plasticity, *Ambystoma*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
1. L'importance de la variabilité phénotypique.....	1
1.1. La reproduction sexuée comme facteur de variabilité phénotypique.....	1
1.1.1. Les coûts du sexe.....	2
1.1.2. Les avantages de la reproduction sexuée.....	2
1.1.3. Le succès d'organismes asexués.....	3
1.2. Les stratégies alternatives au sexe.....	3
1.2.1. La plasticité phénotypique.....	3
1.2.2. La flexibilité développementale.....	4
1.2.3. Relation entre plasticité phénotypique et diversité génétique.....	5
1.2.4. Le <i>bet-hedging</i>	6
2. L'épigénétique.....	7
2.1. L'étude de l'épigénome.....	8
2.2. Épigénétique et variation phénotypique.....	9
2.2.1. Épigénétique et plasticité phénotypique.....	9
2.2.2. L'influence de l'environnement sur l'épigénétique.....	10
2.2.3. Épigénétique et instabilité développementale.....	11
2.3. L'intérêt évolutif de l'épigénétique.....	12
2.3.1. L'acclimatation.....	12
2.3.2. L'assimilation génétique.....	12

2.3.3.	Spéciation à partir d'un génome plastique.....	13
2.3.4.	L'avantage d'un génome polyvalent.....	13
3.	L'hybridation : créatrice de génomes polyvalents	14
3.1.	L'avantage des hybrides de F1	14
3.2.	Hybrides des générations subséquentes	15
3.3.	L'avantage des hybrides asexués	15
4.	Le complexe de la salamandre à points bleus.....	16
4.1.	Mode de reproduction du complexe	17
4.1.1.	Gynogénèse.....	17
4.1.2.	Origine unique des hybrides	17
4.1.3.	Remplacement de génome	18
4.1.4.	Élévation de ploïdie	19
4.2.	Études génétiques des allopolyploïdes unisexués.....	19
4.2.1.	Les allozymes.....	20
4.2.2.	Les microsatellites	20
4.2.3.	Les AFLP (Amplified fragment length polymorphism).....	21
4.3.	Situation du complexe au nord-est de la répartition et au Québec	22
5.	Objectif	23
6.	Hypothèses.....	23
6.1.	Origine du génome J	23
6.2.	Prévalence du remplacement de génome	24
6.3.	Dynamique de la variation épigénétique.....	24
Article		25
Increasing potential for phenotypic variation through kleptogenesis or epigenetics.....		25
Abstract.....		26
Introduction.....		27
Method		30
Sampling and DNA extraction.....		30
Genotype determination: Microsatellites		31
Epigenetic pattern determination: MSAP		33

Analysis.....	33
Sampling sites ecological analysis.....	33
Genetic data analysis.....	34
Epigenetic data analysis.....	36
Results.....	37
Origin of the J-haplomes.....	38
Prevalence of genome replacement.....	42
Epigenetic variation.....	46
Discussion.....	49
A single origin of the J-haplomes.....	49
Prevalence of genome replacement.....	50
Epigenetic variation.....	52
Conclusion.....	55
Acknowledgments.....	56
Discussion.....	58
1. Origine des unisexués au Québec.....	58
2. Diversité génétique des unisexués.....	59
3. L'organisation de la variation épigénétique.....	60
3.1. Effet de la génétique et de l'environnement.....	60
3.2. Effet de la ploïdie.....	61
4. Compétitivité des unisexués du complexe.....	62
4.1. L'hybridation.....	63
4.2. Reproduction unisexuée.....	63
4.3. Polyploidie.....	64
5. Les stratégies pour pallier aux changements environnementaux.....	64
5.1. Le sexe.....	64
5.2. La plasticité et la flexibilité.....	65
5.3. Le <i>bet-hedging</i>	66
Conclusion.....	68
Bibliographie.....	i

Annexe 1 Conditions environnementales des sites échantillonnés..... i
Annexe 2 Scores microsattellites des hybrides iii

Liste des tableaux

Table I: Geographic coordinates and year of sampling for the sampling sites.....	31
Table II: Primers, and ranges of the loci used in the study.....	32
Table III: Proportion of each biotypes of the sampled individuals.....	37
Table IV: Consensus score of the J-alleles for the five main genetic groups.....	39
Table V: Frequency of highly divergent alleles in triploid hybrids (LLJ) and in parental species populations.....	43
Table VI: Distribution of the genetic diversity among and within sites for the five groups.	44
Table VII: Allelic and genotypic basic statistics for the five main groups.....	45
Table VIII: Variance partitioning results for epigenetic data of individuals according to genetics, sampling site and ploidy level data.....	48
Table IX: Environmental and genetic effect on the epigenetic pattern of hybrid individuals..	49

ANNEXES

Tableau X : Description des variables environnementales prélevées.....	i
Tableau XI : Valeurs des variables environnementales prélevées sur les sites échantillonnés. .	ii
Tableau XII : Scores microsatellites des loci J-spécifiques pour les hybrides <i>Ambystoma</i> mentionnés dans l'étude.....	iii
Tableau XIII : Scores microsatellites des loci L-spécifiques et les loci pour lesquels l'origine des allèles est indéterminée pour les hybrides <i>Ambystoma</i> mentionnés dans l'étude.....	v

Liste des figures

Figure 1 : Répartition des unisexués et des différentes espèces impliquées dans le complexe des hybrides de la salamandre à points bleus.....	18
Figure 2: Distribution of the sampling sites according to environmental conditions.....	38
Figure 3: Organisation of the five main genetic groups according to different genetic data....	40
Figure 4: Geographic distribution and organisation of the sampled hybrids.....	41
Figure 5: Principal coordinates analysis of the distribution of hybrid individuals according to their epigenetic pattern.....	47

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates
e.g.	Exempli gratia (par exemple)
et al.	Et alii (et autres)
FRQNT	Fonds de recherche du Québec : nature et les technologies
i.e.	Id est (c'est-à-dire)
km	Kilomètre
m	Mètre
mm	Millimètre
MSAP	Methylation Sensitive Amplified Polymorphism
n	Taille de l'échantillon
ng	Nanogramme
nj	Neighbour joining
NSERC	Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada
PCA	Principal component analysis
PCoA	Principal coordinates analysis
PCR	Polymerase chain reaction
p-value	Valeur de probabilité
SMM	Stepwise mutation model
µl	Microlitre
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
10x	Dix fois concentré

Aux salamandres, petites choses visqueuses et indolentes

Remerciements

J'aimerais tout d'abord adresser mes remerciements à Bernard Angers, mon directeur de recherche. Son soutien a été grandement apprécié lors de la réalisation de toutes les étapes menant à la réalisation de ce mémoire. Un grand merci à sa générosité, sa confiance, son optimisme et son sens de l'humour qui ont contribué à faire de ces années de recherche une période que je n'oublierai jamais.

Merci également aux membres du laboratoire, à mon conjoint, ma famille et mes amis proches qui m'ont aidée tout au long de ma maîtrise et sans qui je n'aurais pas pu réaliser autant. Leur support et leur compagnie ont contribué à rendre les jours légers. J'ai reçu de l'aide dans mon échantillonnage de plusieurs d'entre eux et j'ai apprécié le temps et l'aide de chacun, surtout ceux qui sont venus si souvent dans les plans d'eau, la nuit, parfois avec des pantalons de pluie collés aux bottes avec du *tape*. J'ai apprécié les conseils, les discussions et les moments fous partagés avec tous les membres du laboratoire. Un merci spécial à tous ceux qui m'ont épaulée et fait partager leur expérience de laboratoire et d'analyse. Merci également à Clément Coupé, qui a contribué à la réalisation de ce projet à travers plusieurs volets.

J'aimerais également remercier James Bogart, Patrick Labonté, et François-Joseph Lapointe pour m'avoir éclairée sur la situation du complexe au Québec. J'ai reçu de leur part de précieuses informations qui m'ont permis de passer en deuxième vitesse lors de la conception du projet. Un merci particulier à Martin Savard, du Parc de la Rivière Batiscan, et Alain Mochon, du Parc National de la Yamaska, qui m'ont aidée à étendre mon échantillonnage dans l'est du Québec, et ce pour deux années consécutives. Leur énergie et détermination ont contribué à donner une portée significative à ce projet. Merci à tous les autres partenaires qui ont permis, facilité ou enrichi mes échantillonnages. J'apprécie également le support que m'ont offert les membres de mon comité conseil.

Merci à tous ceux et celles qui ont apporté leur aide à la réalisation de ce projet!

Introduction

1. L'importance de la variabilité phénotypique

La persistance d'un organisme, d'une population ou d'une espèce à travers le temps dépend de sa capacité à répondre aux changements du milieu (Lande et Shannon 1996). Pour ce faire, les organismes doivent présenter un phénotype ajusté aux conditions environnementales (Stearns 1989). Le phénotype correspond à l'ensemble des caractères observables d'un individu et comprend ainsi des traits de natures variées, tels que des traits morphologiques, comportementaux, ou physiologiques. Ainsi, pour répondre à des conditions changeantes dans le temps ou dans l'espace, il est essentiel de pouvoir générer de la variabilité phénotypique. La capacité à créer des descendants aux phénotypes variables peut dans ces situations augmenter la valeur adaptative d'un individu, et à long terme favoriser la persistance d'une espèce à travers le temps (Thoday 1953; Beaumont *et al.* 2009; Crean et Marshall 2009).

1.1. La reproduction sexuée comme facteur de variabilité phénotypique

Il est généralement admis que la capacité de la reproduction sexuée à créer une grande variabilité phénotypique via la recombinaison explique sa prédominance chez les Eucaryotes (Vrijenhoek 1978; Vrijenhoek 1989; Crow 1994; Lande et Shannon 1996; Barton et Charlesworth 1998). La recombinaison réorganise les allèles et augmente la variabilité génétique entre les individus d'une population, et génère ainsi une diversité phénotypique importante. En présence de conditions instables, un organisme a intérêt à produire des descendants ayant une grande variance phénotypique afin d'assurer la survie et la reproduction d'au moins une partie d'entre eux. Une variabilité phénotypique importante permet de générer au moins quelques descendants qui pourront assurer la survie de la population en ayant un phénotype ajusté aux nouvelles conditions du milieu. L'importante variabilité génétique chez les organismes sexués contribue donc à la persistance des populations dans le temps, ainsi qu'à la colonisation d'habitats nouveaux, à l'exploitation de nouvelles ressources et à la survie des populations dans un environnement biotique en constant changement (l'hypothèse de la Reine Rouge : Van Valen (1973)).

1.1.1. Les coûts du sexe

Créer de la variabilité phénotypique par reproduction sexuée est toutefois coûteux. La méiose implique que la quantité de matériel génétique passée à la génération suivante par un individu est deux fois moindre que par reproduction asexuée, où la totalité du génome est transmise (Williams 1975). De plus, la combinaison de gènes favorables ayant passé le test de la sélection est également brisée par la recombinaison et la réduction de ploïdie lors de la production de la méiose (Williams 1975; Crow 1994; Barton et Charlesworth 1998). Chez les organismes à sexes séparés, la reproduction sexuée implique aussi le coût de la production des mâles, qui diminue de 50% la progéniture apte à produire la prochaine génération (Maynard Smith 1978). Les organismes sexués ne peuvent donc, en théorie, se reproduire aussi efficacement que les organismes asexués dans un environnement constant puisqu'ils ont ce désavantage démographique de devoir produire des mâles (Maynard Smith 1978; Crow 1994; Barton et Charlesworth 1998). Finalement, la copulation comporte aussi son lot d'inconvénients, tels la nécessité de trouver un partenaire ainsi que des risques de contagion et de prédation accrus (Crow 1994; Schlupp 2005).

1.1.2. Les avantages de la reproduction sexuée

Considérant la prédominance du sexe chez les Eucaryotes, il a été suggéré que ce mode de reproduction doit forcément comprendre des avantages qui en surpassent les inconvénients (Barton et Charlesworth 1998). La possibilité de créer une grande variation génétique, et donc une grande variation phénotypique potentielle, afin de pallier aux fluctuations des conditions a déjà été mentionnée. Un autre avantage du sexe a été mis de l'avant par Muller (1964). En recombinant les gènes, il est possible de recréer des individus exempts de mutations défavorables. À l'inverse, les mutations défavorables s'accumulent chez les organismes asexués qui n'ont pas cette possibilité de purger ces mutations, ce que l'on nomme le cliquet de Muller. De plus, chez les organismes sexués, il est possible que deux mutations favorables apparues chez deux individus différents soient réunies sur un même chromosome lors de la production de gamètes à la génération suivante (Muller 1964; Crow 1994). Ceci permet de combiner plus rapidement de nouvelles mutations avantageuses, contrairement aux organismes asexués, pour lesquels ces deux mutations devront survenir séquentiellement chez une même lignée. Les

organismes asexués sont donc uniquement dépendants du taux de mutation pour accumuler des mutations favorables. Finalement, la reproduction sexuée permet de produire des descendants ayant une plus grande variance dans leur génotype, ce qui contribue à réduire la compétition entre les descendants puisque ceux-ci peuvent exploiter des niches écologiques légèrement différentes (*Tangled Bank hypothesis* : Ghiselin (1974)).

1.1.3. Le succès d'organismes asexués

Si l'avantage principal de la reproduction sexuée est de créer une plus grande variabilité de phénotypes qui permettent à la population de survivre à des environnements changeants, comment expliquer le succès d'organismes asexués à persister dans le temps ou même à occuper des aires géographiques très vastes? (Lynch 1984; Vrijenhoek 1998; Le Roux *et al.* 2007)

Un des exemples les plus éloquentes est celui du millet soyeux (*Pennisetum setaceum*). Il s'agit d'un organisme monoclonal retrouvé sur plusieurs continents. Les populations étudiées par Le Roux *et al.* (2007) en Égypte (où il est indigène), en Afrique du Sud, en Namibie et à Hawaii sont toutes extrêmement similaires d'un point de vue génétique. Pourtant, ces populations colonisent des habitats assez variés, comme les bords de routes, les plaines désertiques, les prairies et les abords de volcans. Non seulement cet organisme est apte à coloniser des habitats perturbés et variés qui diffèrent de son habitat original, mais il est reconnu comme étant invasif, et donc performant, dans plusieurs milieux où il a été introduit. Le Roux *et al.* (2007) proposent que cette importante versatilité soit due à un génotype extrêmement généraliste. Ce génotype serait issu d'une forte sélection en faveur d'une grande plasticité.

1.2. Les stratégies alternatives au sexe

1.2.1. La plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique est cette capacité à exprimer différents phénotypes à partir d'un même génotype en fonction de l'environnement (Agrawal 2001; Pigliucci *et al.* 2006). Des clones au génome plastique peuvent donc présenter différents phénotypes, même en absence de toute diversité génétique. La plasticité est avantageuse lorsque le milieu est assez stable pour que les signaux perçus au début de la vie d'un individu soient conséquents avec l'environnement

dans lequel il se trouvera à l'âge adulte, tout en étant assez instable pour que la fixation génétique d'un phénotype ne soit pas favorable.

Par exemple, chez le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), il existe deux types de mâles ayant deux tactiques de reproduction différentes en fonction de la disponibilité des ressources alimentaires. Les mâles qui atteignent un certain seuil de taille et d'accumulation de réserve alimentaire avant une période critique avant la migration deviennent de grands mâles combattant qui migrent vers la mer avant de retourner à leur lieu de naissance pour se reproduire (Aubin-Horth *et al.* 2004). Ces mâles ont généralement la faveur des femelles. Ceux qui n'atteignent pas ce seuil deviennent des mâles précoces; ils atteignent leur maturité sexuelle avant d'entamer la migration et sont plus petits et restent en eau douce. Ils se reproduisent en se glissant furtivement dans le nid d'une femelle. Le seuil est influencé par la génétique, cependant, tous les mâles ont le potentiel de devenir combattant ou précoce dans des conditions adéquates (Aubin-Horth *et al.* 2004). Les deux types de mâles diffèrent par leur taux de croissance, leur comportement, leur taux d'agressivité ainsi que par leurs capacités cognitives, notamment la mémoire et l'apprentissage, qui sont plus développés chez le mâle précoce. Une fois la période pré-migratoire passée, les mâles ne changent plus d'un type à l'autre (Aubin-Horth *et al.* 2004). Cette plasticité est adaptative potentiellement parce que les conditions alimentaires varient trop pour que la fixation d'un seul type de mâle soit avantageuse, mais le signal environnemental perçu (la disponibilité des ressources alimentaires) reste un bon indicateur des conditions à venir durant la vie du saumon.

1.2.2. La flexibilité développementale

La flexibilité développementale est un concept similaire à la plasticité, à la différence que le signal environnemental induit un phénotype réversible: il est possible pour un organisme flexible de modifier continuellement son phénotype en fonction des signaux environnementaux perçus (Levins 1963). La flexibilité développementale comprend par exemple la capacité pour un même individu d'aller et venir entre différents phénotypes au cours de son développement. La flexibilité développementale est avantageuse lors que l'environnement perçu lors des premiers stades de développement risque de différer à l'âge adulte (Levins 1963).

Un exemple de flexibilité développementale se trouve chez les cichlides africains : les mâles peuvent être soit dominants, territoriaux, reproducteurs et vivement colorés, ou soit subordonnés, non territoriaux, sexuellement inactifs et ternes (Fernald et Hirata 1977). L'appartenance à un type ou l'autre dépend de l'environnement social. Il est possible d'induire un phénotype dominant chez un mâle subordonné en retirant tous les mâles territoriaux de l'environnement. À l'inverse, il est possible de transformer un mâle dominant en mâle subordonné en l'entourant de plusieurs mâles dominants plus gros (Fernald et Hirata 1977). Un phénotype flexible est donc adaptatif dans ce contexte puisque les conditions environnementales changent rapidement au cours de la vie d'un individu en fonction de sa taille et de l'environnement social. Un poisson a une petite taille au début de sa vie, et a donc intérêt à ce stade à maximiser sa croissance et ses chances de survie. Cependant, au fur et à mesure qu'il grossit, l'environnement social change relativement à sa taille et il a plutôt intérêt à maximiser ses capacités reproductrices.

1.2.3. Relation entre plasticité phénotypique et diversité génétique

Pour plusieurs organismes ayant très peu ou pas de diversité génétique, la plasticité phénotypique constitue une source majeure de variation phénotypique. En revanche, dans un milieu stable, la fixation génétique d'un phénotype serait plutôt préférable étant donné que la plasticité implique un coût lié au maintien de plusieurs voies alternatives (Frank 2011). Plusieurs auteurs ont donc avancé que la diversité génétique et la plasticité seraient des stratégies alternatives pour faire face aux changements de l'environnement. Dépendamment de la capacité à percevoir les changements du milieu et de la fréquence de ces changements, les organismes auraient soit intérêt à maximiser leur diversité génétique, soit intérêt à avoir un génome plastique ou flexible capable de s'acclimater à différents milieux. Si les changements écologiques sont graduels et ont lieu sur plusieurs générations, l'adaptation est possible. Les organismes ont donc avantage à produire une grande diversité de phénotypes à soumettre à la sélection naturelle afin que la population s'adapte aux changements en cours. Si ces changements ont lieu au cours de la vie de l'individu ou sur trop peu de générations pour permettre l'adaptation, la plasticité serait une stratégie plus avantageuse que la diversité génétique dans ce cas.

La plasticité pourrait aussi servir à compenser le manque de diversité génétique. En augmentant le potentiel de variabilité phénotypique, la plasticité joue un rôle non négligeable dans la persistance d'organismes ayant peu ou pas de diversité génétique. Plusieurs études confirment d'ailleurs que la diversité génétique et le niveau de plasticité phénotypique seraient corrélés négativement (Jain 1978; Zangerl et Bazzaz 1983; Silander 1985; Macdonald et Chinnappa 1989).

Cependant, il a aussi été avancé qu'une forte plasticité contribuerait à masquer la diversité génétique n'affectant pas le phénotype produit et la sélection n'aurait pas de prise sur ces mutations génétiques latentes (Gillespie et Turelli 1989). Les mutations n'affectant pas le phénotype généré par une réponse plastique à un environnement donné peuvent donc s'accumuler en étant à l'abri de la sélection, qui n'agit directement que sur un phénotype. Supposons un organisme plastique maintenu dans des conditions où un signal environnemental toujours présent conduit à un même phénotype associé : toutes les mutations n'altérant pas ce phénotype seront libres de s'accumuler sans être affectées par l'effet de la sélection. Si le signal disparaît, les individus produiront un phénotype alternatif et une partie de la variation génétique pourra ainsi être révélée à la sélection.

D'un autre côté, beaucoup d'études n'ont pas relevé de relation particulière entre le niveau de plasticité et la variation génétique (Moran *et al.* 1981; Hume et Cavers 1982; Scheiner et Goodnight 1984; Counts 1993; Stewart Jr et Nilsen 1995). Pour ces auteurs, la plasticité phénotypique et la variation génétique sont tout simplement deux stratégies différentes pour pallier aux fluctuations environnementales qui ne sont ni mutuellement exclusives, ni dépendantes l'une de l'autre. En effet, il est possible qu'un organisme doit faire face à la fois à des changements graduels sur plusieurs générations ainsi qu'à des changements plus rapides au cours d'une ou de quelques générations.

1.2.4. Le *bet-hedging*

Le *bet-hedging* est une stratégie qui consiste à produire des descendants aux phénotypes diversifiés, par pur hasard, dans l'espoir que certains phénotypes assurent la survie et la performance d'au moins une partie des descendants (Veening *et al.* 2008; Müller *et al.* 2013). L'esprit de cette stratégie s'apparente donc à la reproduction sexuée. Le *bet-hedging* emploie

cependant d'autres mécanismes que la variation des combinaisons génétiques. Une variation phénotypique aléatoire au cours du développement de même que la répartition inégale des ressources lors de la formation des œufs créeraient également une diversité phénotypique supplémentaire chez les descendants (Crean et Marshall 2009).

La variation phénotypique n'est donc pas dans ce cas associée à la réception d'un signal environnemental. Cette stratégie peut être adaptative lorsque l'environnement change si rapidement qu'il n'est pas possible pour l'organisme de s'y ajuster par adaptation ou par acclimatation (Beaumont *et al.* 2009; Müller *et al.* 2013). Le *bet-hedging* est également favorable lorsque le changement environnemental ne peut être perçu par l'organisme.

Par exemple, il a été démontré que le développement des têtards de la grenouille *Rana temporaria* est beaucoup plus instable en dehors des conditions optimales habituellement rencontrées par les populations de cette espèce (Olsson et Uller 2002). Une telle instabilité permettrait de faire face à des conditions ayant peu été expérimentées pour l'organisme et pour laquelle la réponse phénotypique optimale est incertaine.

2. L'épigénétique

Un mécanisme à l'origine de la plasticité serait l'épigénétique (Newman et Müller 2000; Aubin-Horth et Renn 2009; Castonguay et Angers 2012; Verhoeven et Preite 2013). L'épigénétique réfère aux changements de chromatine et d'expression des gènes, sans en altérer la séquence (Jaenisch et Bird 2003; Bossdorf *et al.* 2008). Bien que ces modifications soient généralement stables à travers les mitoses, elles demeurent toutefois réversibles (Reik 2007). Il s'agit principalement de modifications chimiques à l'ADN (la méthylation) ou aux histones (dont l'acétylation et la méthylation), ainsi que l'intervention de petits ARN, tels que les ARN interférants, qui permettent un remodelage de la chromatine. Ces modifications sont coordonnées et travaillent de concert afin de garder stable le niveau d'expression d'un gène (Jaenisch et Bird 2003).

La méthylation de l'ADN est le mécanisme épigénétique le mieux connu. Cette modification épigénétique est partagée par l'ensemble des trois domaines – Bacteria, Archaea, Eucarya – ce qui suggère une origine commune et un taux de conservation élevé (Ponger et Li 2005). Dans le scénario le plus commun chez les Eucaryotes, un groupement méthyle est ajouté

à une cytosine adjacente à une guanine (CpG) par une méthyltransférase. D'autres types de séquences sont toutefois reconnus par des méthylases spécialisées chez les bactéries et les plantes (Ponger et Li 2005). La méthylation des groupements CpG d'un promoteur a été fortement associée à une inhibition de l'expression du gène (Attwood *et al.* 2002; Jaenisch et Bird 2003; Ponger et Li 2005). La méthylation de l'ADN altère la structure de la chromatine, ce qui recrute des histones-désacétylases. La désacétylation des histones modifie en retour l'affinité des protéines de transcription de l'ADN (Richards 2006). La méthylation de l'ADN semble toutefois plus stable que l'acétylation des histones (Reik 2007).

Les marques épigénétiques sont largement conservées lors des mitoses, mais la plupart ne sont pas transmises par la méiose, surtout chez les animaux (Reik 2007). Les marques épigénétiques des gamètes sont généralement effacées une première fois lors du développement du zygote pour être ensuite rétablies *de novo* lors de la différenciation cellulaire, ainsi qu'une deuxième fois lors de la formation des gamètes de la génération suivante (Richards 2006; Reik 2007). Bien que les empreintes génomiques chez les mammifères persistent lors de la formation des gamètes, elles sont effacées lors des premiers stades de développement de l'embryon (Rakyan *et al.* 2002). Certaines marques épigénétiques persistent par contre sur plusieurs générations, surtout chez les plantes (Richards 2006; Bossdorf *et al.* 2008). Toutefois, la très grande majorité des marques épigénétiques sont effacées dans l'embryon, et sont donc limitées à une seule génération. La remise à zéro des marques épigénétiques chez l'embryon serait en effet nécessaire à une coordination adéquate des cellules lors de la différenciation cellulaire (Richards 2006).

2.1. L'étude de l'épigénome

Différentes méthodes existent pour étudier l'épigénome, les plus utilisées étant celles associées au méthylome (l'ensemble des marques de méthylation associées à l'ADN). Une technique qui a été souvent appliquée est une version sensible à la méthylation de la méthode du polymorphisme de taille des fragments amplifiés (AFLP: *Amplified Fragment-Length Polymorphism*), soit la méthode MSAP (*Methylation-sensitive amplification polymorphism*) (Xiong *et al.* 1999). Cette technique consiste à comparer l'ADN digéré par deux isoenzymes, l'une sensible à la présence d'une cytosine méthylée sur son site de restriction (HpaII) et l'autre,

non (MspI). Les fragments d'ADN résultants sont ensuite ligués puis amplifiés. La comparaison des patrons des deux enzymes permet de retirer l'effet corrélé à la génétique, pour ne garder que les différences dues à la méthylation des cytosines au site de restriction. Cette méthode permet d'obtenir de l'information générale associée aux différences épigénétiques entre les individus sur l'ensemble du génome, mais ne fournit pas d'indication quant à la séquence des fragments, et donc à l'identité du gène associé (Xiong *et al.* 1999). D'autres techniques peuvent fournir de l'information sur la séquence associée à une différence de méthylation, comme entre autre le séquençage au bisulfite (Laird 2003) et le RAD-Seq (Davey et Blaxter 2010) pouvant être employé avec des enzymes qui répondent différemment à la méthylation. Ces méthodes sont toutefois beaucoup plus coûteuses, et plusieurs demandent soit un génome de référence pour l'assemblage, soit des connaissances préalables sur une section précise à étudier et sont donc utilisés davantage avec les organismes modèles (Schones et Zhao 2008).

2.2. Épigénétique et variation phénotypique

En modifiant l'expression des gènes, l'épigénétique altère donc la quantité des produits de gènes responsables du phénotype d'un individu. La variation épigénétique serait donc une source additionnelle de diversité phénotypique, qui se superpose à la variation induite directement par la génétique. Plusieurs facteurs affectent la variation épigénétique, tels que le génotype lui-même, mais aussi l'environnement au sens large, ainsi que d'autres éléments relatifs au génome mais indépendants de sa séquence telle quelle, comme le niveau de ploïdie par exemple. Les prochaines sections traiteront de l'effet de l'environnement sur l'épigénétique.

2.2.1. Épigénétique et plasticité phénotypique

L'épigénétique est donc un mécanisme permettant la plasticité phénotypique. En modifiant l'expression de différents gènes en réponse à un signal environnemental, l'épigénétique permet à un même génome d'exprimer différents phénotypes en fonction du milieu, bien que les processus reliant la perception du signal environnemental et la modification d'expression génique sont encore peu connus, surtout chez les vertébrés (Jaenisch et Bird 2003). La différenciation cellulaire est un exemple probant de l'importance de l'épigénétique comme mécanisme de variation phénotypique. Toutes les cellules d'un organisme donné contiennent l'information génétique nécessaire pour coder l'ensemble des protéines présentes chez tous les

types cellulaires. Cependant, un type cellulaire donné n'exprimera que les gènes nécessaires à son fonctionnement, ce qui engendre une très grande variété de phénotypes cellulaires à partir du même génome (Waddington 1942; Paldi 2003).

2.2.2. L'influence de l'environnement sur l'épigénétique

Les marques épigénétiques responsables de la plasticité sont influencées par des signaux environnementaux. Dans le cas de la différenciation cellulaire, ces signaux correspondent à l'environnement cellulaire, pouvant être induits par la disposition spatiale de protéines, la nature des cellules adjacentes, les changements de concentrations ou de nature des nutriments, ou encore la déformation physique des cellules (Paldi 2003). Au niveau de l'organisme, les signaux peuvent toutefois être de natures très variées, telles que la diète, l'exposition aux parasites, le milieu physique (dont la température) et même le comportement (Richards 2008).

Les exemples où le phénotype est déterminé par des signaux externes à un génome plastique sont nombreux. Le polyphénisme est cette capacité qu'ont certains organismes à présenter des morphes bien distincts selon les conditions et indépendamment de leur génome. Par exemple, à leur naissance, les larves d'abeilles ont toutes le potentiel de devenir reine ou ouvrière. C'est le type de nourriture ingéré pendant leur développement qui détermine leur phénotype. Les futures reines sont nourries avec la gelée royale, une mixture hypométhylante qui permettra l'expression des gènes de fertilité (Kucharski *et al.* 2008). De façon analogue, chez les tortues dont le sexe est déterminé par l'environnement, les embryons ont tous le potentiel génétique de devenir soit mâle ou femelle. La température à laquelle les œufs sont incubés détermine si le gène de l'aromatase, enzyme responsable de convertir la testostérone en œstradiol, sera méthylé ou non (Matsumoto *et al.* 2013). Le sexe est donc déterminé selon les hormones sexuelles produites, en fonction de la température.

D'autres signaux environnementaux peuvent affecter le phénotype d'un organisme. Il a par exemple été démontré que les comportements affectifs de la mère envers ses nouveau-nés pouvaient influencer leur réponse au stress en modifiant le taux de méthylation d'un récepteur à glucocorticoïde dans l'hypothalamus chez les rats (Weaver *et al.* 2004). La réponse au stress des nouveau-nés est réversible en bas âge, puis se fixe à l'âge adulte.

Bien que la sensibilité à l'environnement soit plus prononcée durant le développement, les marques épigénétiques peuvent être influencées par des signaux externes tout au long de la vie de l'individu. Ainsi, Fraga *et al.* (2005) ont démontré que, bien qu'ayant des marques épigénétiques similaires à la naissance, les jumeaux identiques accumulaient des différences épigénétiques au cours de leur vie. Ces différences épigénétiques étaient plus marquées avec l'âge et si les jumeaux avaient un mode de vie très différent. Ces jumeaux présentaient conséquemment de plus grandes variations dans l'expression de leurs gènes.

2.2.3. Épigenétique et instabilité développementale

Les signaux environnementaux ne seraient pas les seuls instigateurs de changements épigénétiques. Certaines épimutations peuvent également survenir par hasard, c'est-à-dire sans avoir été dictées par le génotype ni par la perception d'un signal environnemental (Jaenisch et Bird 2003; Verhoeven et Preite 2013). Le développement étant régi par une séquence coordonnée de modifications épigénétiques, ces épimutations peuvent avoir des conséquences importantes sur le développement d'un individu. Un cumul trop important d'épimutations non programmées mène d'ailleurs à l'apoptose cellulaire chez l'embryon (Jaenisch et Bird 2003).

Certaines de ces épimutations peuvent cependant engendrer la production de phénotypes viables et différents chez des individus génétiquement identiques et placés dans les mêmes conditions. Ce phénomène peut être observé chez les bactéries. Beaumont *et al.* (2009) ont démontré que les bactéries misaient non seulement sur des taux de mutations génétiques élevés pour assurer la survie d'une partie de la colonie dans l'éventualité d'un changement brusque dans l'environnement, mais également sur des épimutations. Les cellules bactériennes utilisent parfois une stratégie de *bet-hedging*: en fixant aléatoirement un état d'expression ou l'autre pour certains gènes, les colonies peuvent pallier aux fluctuations rapides et imprévisibles de l'environnement en maximisant la variance phénotypique au sein de la colonie et assurant ainsi la survie d'au moins une partie de leurs descendants (Beaumont *et al.* 2009). La variation épigénétique stochastique est donc susceptible de s'ajouter aux autres sources de variation phénotypique, telles que la plasticité ou la diversité génétique.

2.3. L'intérêt évolutif de l'épigénétique

L'expression des gènes peut donc être influencée par le milieu génomique ou environnemental, parfois tout au long de la vie de l'individu. L'épigénétique permet ainsi une réponse à court terme face à l'environnement, contrairement aux mutations génétiques qui n'apparaissent qu'au hasard et qui doivent être sélectionnées à travers plusieurs générations (Bossdorf *et al.* 2008; Castonguay et Angers 2012).

2.3.1. L'acclimatation

En référence à cette réponse à l'échelle d'une seule génération, on parle d'acclimatation plutôt que d'adaptation. L'acclimatation correspond à la capacité d'un individu à ajuster son phénotype en fonction de l'environnement et rappelle la vision de Lamarck selon laquelle les organismes s'accliment à leur environnement pour augmenter leur performance, à la différence que ces modifications ne sont pas héréditaires (Agrawal 2001). La capacité d'acclimatation permet donc d'augmenter le succès écologique d'un organisme. Dans la mesure où elle peut être transmise aux descendants, cette capacité d'acclimatation peut ainsi être favorisée par sélection naturelle lorsque les conditions du milieu fluctuent trop rapidement pour que l'adaptation soit possible. L'acclimatation comprend la plasticité phénotypique et la flexibilité développementale.

2.3.2. L'assimilation génétique

Certaines marques épigénétiques peuvent toutefois persister plus d'une génération, en particulier chez les plantes, où les structures germinales sont isolées plus tard du reste du soma (Jablonka et Lamb 1998; Richards 2006). Dans ce cas, l'épigénétique consiste en un chemin alternatif sur lequel la sélection peut agir, mais dont la source de variation peut être induite directement par l'environnement, ce qui rend le processus plus rapide (Bossdorf *et al.* 2008).

L'épigénétique peut aussi influencer les mutations génétiques aux loci concernés, en favorisant les transitions cytosine-thymine et en altérant la recombinaison et la mobilité des transposons (Richards 2008). Dans certaines conditions, l'épigénétique pourrait donc faciliter l'assimilation génétique (Angers *et al.* 2010), qui correspond à l'expression spontanée d'un phénotype en absence du signal environnemental auparavant nécessaire à son induction

(Waddington 1953; Pál et Miklós 1999). Si l'épigénome n'est pas héritable, le phénotype le plus performant ne pourra être transmis et favorisé par la sélection naturelle. Il est cependant possible que la sélection favorise indirectement des génomes plastiques et épigénétiquement sensibles dans des conditions où l'environnement varie de façon importante et où la capacité d'acclimatation est vitale (Pál et Miklós 1999).

2.3.3. Spéciation à partir d'un génome plastique

Que les marques soient héritable ou non, l'épigénétique pourrait être le mécanisme derrière la plasticité phénotypique et le concept de norme de réaction. La norme de réaction décrit l'éventail de phénotypes pouvant être produits à travers différents environnements pour un génotype donné (Stearns 1989). L'épigénétique a aussi son rôle dans la métaphore du paysage adaptatif, où les différents génotypes sont représentés dans un plan et leur relation à leur valeur adaptative est représentée par des pics et des vallées (voir Wright (1932)). En permettant une plus large gamme de phénotypes pour un génotype donné, l'épigénétique permettrait de diminuer la profondeur des vallées entre les différents pics adaptatifs, et faciliterait la transition d'un pic à l'autre (Pál et Miklós 1999; Frank 2011). Si les conditions restent stables, le phénotype idéal aura tendance à être fixé dans le génome, par assimilation génétique, puisque la fixation d'un phénotype optimal serait moins coûteuse que la plasticité: c'est ainsi que la spéciation peut être facilitée par l'épigénétique (Pál et Miklós 1999). Cependant, dans un contexte de conditions variables, il peut être plus avantageux de conserver une plasticité phénotypique en dépit des coûts qui y sont associés (Stearns 1989). Les organismes avec un génome polyvalent n'auront pas nécessairement la meilleure performance dans la niche exploitée, mais auront la possibilité d'en exploiter plusieurs, si par exemple, la compétition se fait trop importante (Schlosser *et al.* 1998).

2.3.4. L'avantage d'un génome polyvalent

En modulant l'expression des gènes en fonction des conditions, un organisme peut donc s'acclimater à son milieu durant sa vie, à la condition qu'il dispose de plusieurs « voies » alternatives (Jaenisch et Bird 2003; Massicotte et Angers 2012). Par exemple, l'exposition de bactéries à des conditions hautement changeantes et imprévisibles a provoqué l'apparition et la persistance d'un génotype capable de produire rapidement des phénotypes diversifiés

(Beaumont *et al.* 2009). Plusieurs organismes asexués peuvent donc occuper des habitats variés ou nouveaux en raison d'un génome polyvalent, disposant de plusieurs voies alternatives (Lynch 1984; Elder et Schlosser 1995; Schlosser *et al.* 1998; Le Roux *et al.* 2007).

3. L'hybridation : créatrice de génomes polyvalents

L'hybridation est un moyen efficace de créer des génomes polyvalents, en réunissant dans un même organisme des lots de gènes ayant évolué séparément et adaptés à des niches écologiques différentes (Anderson 1953). L'hybride a donc la possibilité d'exprimer des gènes de ses différents génomes pour s'acclimater à différentes conditions. Les hybrides asexués occupent souvent un habitat moins clément que leurs espèces parentales, mais où la compétition est moindre, possiblement en raison d'exigences écologiques moins sévères (Lynch 1984). Bien que toutes les combinaisons de gènes ne soient pas favorables, les hybrides qui passent à travers le filtre de la sélection peuvent performer aussi bien que les espèces parentales dans leurs milieux respectifs, et performant souvent mieux que celles-ci dans un milieu intermédiaire (Stutz et Thomas 1964; Rolan-Alvarez *et al.* 1997; Arnold *et al.* 2001).

3.1. L'avantage des hybrides de F1

Les hybrides de première génération ont souvent une plus grande biomasse et parfois une meilleure fertilité que les organismes parentaux, ce phénomène étant qualifié de vigueur hybride (Birchler *et al.* 2006). Deux phénomènes non exclusifs peuvent expliquer la vigueur hybride. Soit les hybrides peuvent pallier aux allèles déficients d'une espèce en compensant par l'expression de l'allèle équivalent de l'autre espèce (modèle de dominance), soit l'interaction d'allèles équivalents provoque l'expression d'un phénotype supérieur aux espèces parentales (modèle de surdominance) (Birchler *et al.* 2006). Le modèle de surdominance pourrait expliquer la capacité de certains hybrides à coloniser des habitats non seulement intermédiaires, mais nouveaux (Arnold 2004). La présence d'une variété de combinaisons de gènes qui ont coévolué au sein d'espèces différentes et qui sont donc adaptées à des niches écologiques spécifiques permet aux hybrides de F1 de disposer de plusieurs voies alternatives complètes et éprouvées afin de s'acclimater à leur environnement.

3.2. Hybrides des générations subséquentes

Les hybrides des générations suivantes peuvent toutefois être sujets à la dépression hybride, un phénomène caractérisé par une baisse de moyenne de la valeur adaptative et une augmentation de sa variance, en comparaison avec les organismes parentaux et les hybrides de F1 (Burton 1990). Cette moindre performance des générations hybrides subséquentes serait due à la révélation de mutations récessives auparavant masquées ainsi qu'à la ségrégation des chromosomes qui briserait des associations de gènes ayant évolué au sein d'une même espèce (Burton 1990). La ségrégation des gènes coadaptés annulerait donc les avantages mentionnés pour les hybrides de F1. Des interactions nécessaires entre certains loci d'une même espèce ne sont alors plus possibles. Burton (1990) a même observé que des segments de chromosomes viables chez les parents devenaient létaux chez des homozygotes de F2. Les hybrides de F1 n'y sont pas sujets, étant donné qu'ils possèdent un jeu de chromosomes complet de chacune des deux espèces parentales.

Plusieurs hybrides dont la reproduction sexuée est perturbée se reproduisent d'ailleurs de façon asexuée (Vrijenhoek 1989), ce qui leur permet de toujours se maintenir en F1. Une autre façon de maintenir l'intégralité des combinaisons de gènes parentales se fait également via la polyploïdisation (Madlung 2013). En produisant des gamètes non réduits, les deux génomes parentaux sont transmis entièrement à la génération suivante. Cette alternative demande toutefois une bonne tolérance de la polyploïdie et est fréquente chez les plantes (Madlung 2013).

3.3. L'avantage des hybrides asexués

La reproduction asexuée permet de perpétuer l'hybride de première génération et de profiter de la vigueur hybride sur plusieurs générations, aussi longtemps que persiste la lignée clonale. En gardant l'intégralité des génomes parentaux, les hybrides auraient donc la possibilité d'exprimer l'allèle qui convient le mieux aux conditions, ou encore d'exprimer une combinaison des deux. Une expression gène-spécifique et dépendante du tissu étudié a en effet été relevée chez les poissons hybrides du complexe *Squalius alburnoides* (Pala *et al.* 2008; Pala *et al.* 2010). Ces hybrides triploïdes expriment soit uniquement les allèles spécifiques provenant de l'espèce majoritaire dans le génome, soit à la fois les allèles provenant des deux espèces. L'expression des gènes semble donc s'ajuster au contexte.

Dans la mesure où l'organisme a la capacité d'exprimer soit la totalité ou soit l'un ou l'autre de ses allèles parentaux de façon différente pour chacun de ses gènes, le potentiel de variabilité épigénétique, et indirectement de variation phénotypique, est substantiellement accru. Si le niveau d'expression de chaque allèle est dû au hasard, il y a occurrence d'une stratégie de type *bet-hedging*, où plusieurs individus présentent des phénotypes différents dans l'espoir qu'au moins certains d'entre eux survivent à la génération suivante et perpétuent la lignée. Si le niveau d'expression de chaque allèle est dû à des signaux environnementaux, le phénotype résultant peut donc être acclimaté au milieu et assure la survie d'un maximum d'individus. L'épigénétique pourrait donc permettre aux hybrides asexués de moduler leur phénotype selon les conditions génomiques et environnementales, leur permettant de s'acclimater à leur milieu avec succès, en dépit d'une reproduction asexuée.

4. Le complexe de la salamandre à points bleus

Le complexe de la salamandre à points bleus est un exemple d'hybrides de première génération qui persistent depuis plusieurs milliers d'années (Bi et Bogart 2010). Les hybrides, pratiquement tous des femelles, comprennent tous au moins un jeu de chromosomes provenant de la salamandre à points bleus (*Ambystoma laterale*, dont un jeu de chromosome est désigné L) (Bonen *et al.* 2007; Charney 2012). On retrouve généralement des hybrides entre la salamandre à points bleus et la salamandre de Jefferson (*Ambystoma jeffersonianum*, désigné J), mais deux autres espèces d'ambystomes participent au complexe : la salamandre à nez court (*Ambystoma texanum*, désigné T) et la salamandre tigrée (*Ambystoma tigrinum*, désigné Ti) (Bonen *et al.* 2007). Des hybrides diploïdes, triploïdes, tétraploïdes et pentaploïdes ont été trouvés (Lowcock *et al.* 1991). Les hybrides sont désignés par le nombre et la provenance de leur jeu de chromosome; un hybride triploïde ayant deux jeux de chromosomes de *A. laterale* et un de *A. jeffersonianum* sera désigné LLJ. Les triploïdes sont les plus fréquents (Bi *et al.* 2009; Bogart et Bi 2013), de sorte que les triploïdes LLJ et LJJ ont longtemps porté une appellation spécifique distincte : la salamandre de Tremblay (LLJ) et la salamandre argentée (LJJ) (Uzzell 1964). Cette désignation a été abandonnée notamment en raison du très grand nombre de biotypes possibles entre les quatre espèces et les différents niveaux de ploïdie possibles. Des hybrides présentant des jeux de chromosomes provenant de trois, voire quatre espèces différentes ont été trouvés (Bonen *et al.* 2007).

4.1. Mode de reproduction du complexe

Le mode de reproduction de ces hybrides est sujet à débat, quoique plusieurs s'entendent pour dire que le mode de reproduction principal s'apparente à la gynogénèse (Kraus et Miyamoto 1990; Elinson *et al.* 1992; Spolsky *et al.* 1992b; Robertson *et al.* 2006; Bonen *et al.* 2007; Bi *et al.* 2008; Ramsden 2008).

4.1.1. Gynogénèse

La gynogénèse est un mode de reproduction clonal où le sperme d'un mâle est nécessaire pour activer la division de l'œuf, mais sans qu'il y ait incorporation du génome mâle. L'œuf produit est de même ploïdie que les tissus somatiques de la femelle. La mère et ses descendants possèdent donc exactement le même génome. Chez les hybrides *Ambystoma*, l'œuf non réduit est produit par dédoublement des chromosomes avant la méiose, ce qui restaure le niveau de ploïdie dans l'œuf (Cuellar 1976). Le sperme utilisé peut provenir de n'importe laquelle des espèces sexuées du complexe. Certaines populations où aucun mâle d'une espèce sexuée parentale n'a été trouvé ont toutefois soulevé un doute quant à la nécessité du sperme pour déclencher la division de l'œuf chez les hybrides (Bogart et Licht 1987; Noël *et al.* 2011). Il n'existe cependant aucune preuve que les œufs des hybrides peuvent se diviser spontanément en absence de spermatozoïdes, malgré plusieurs études sur le sujet (Wilbur 1971; Bogart et Licht 1986; Bogart et Licht 1987; Bogart *et al.* 1989). Il a été proposé alors que ces populations pourraient utiliser le sperme d'autres espèces en sympatrie, telles que la salamandre maculée (*Ambystoma maculatum*), qui ne fait pourtant pas partie intégrante du complexe d'hybrides (Noël *et al.* 2011).

4.1.2. Origine unique des hybrides

En raison de la composition spécifique variable du génome nucléaire et de sa ressemblance locale avec les populations sexuées voisines (Lowcock et Bogart 1989; Bi *et al.* 2008), l'hypothèse a été émise que les unisexués seraient issus de plusieurs événements d'hybridation (Lowcock et Bogart 1989). Cependant, des analyses du génome mitochondrial ont révélé que les haplotypes mitochondriaux de tous les unisexués réunis comportent très peu de divergence, par rapport à ce qui est observé au sein de n'importe quelle espèce sexuée du

complexe (Kraus et Miyamoto 1990; Hedges *et al.* 1992; Spolsky *et al.* 1992a; Bonen *et al.* 2007). Des analyses approfondies incluant d'autres espèces d'ambystomes ne faisant pas partie du complexe ont révélé que le génome mitochondrial s'apparente davantage à une population d'*Ambystoma barbouri*, une espèce ayant une répartition extrêmement restreinte dans l'est des États-Unis (voir Figure 1) (Robertson *et al.* 2006).

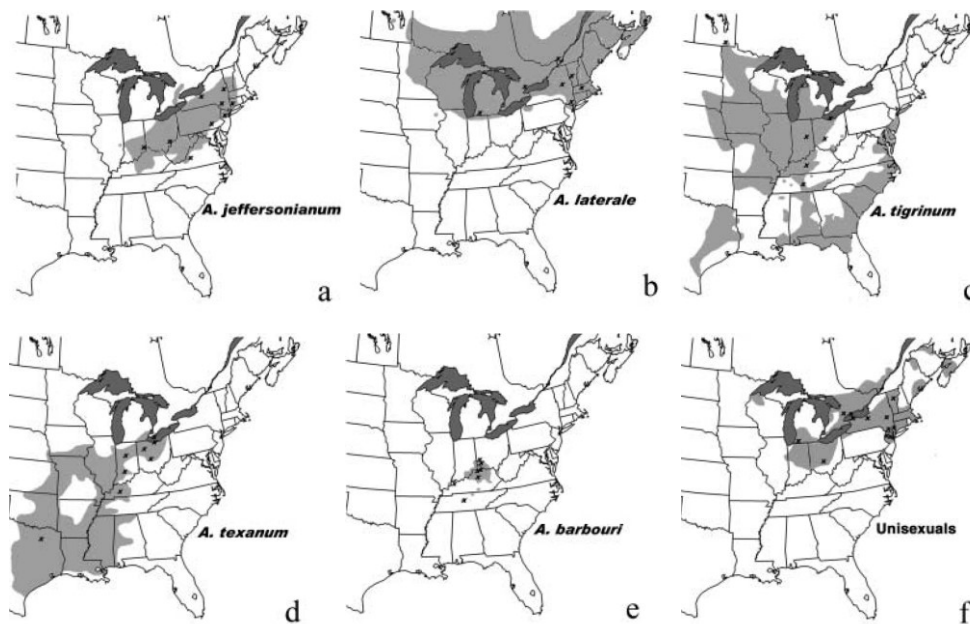


Figure 1 : Répartition des unisexués et des différentes espèces impliquées dans le complexe des hybrides de la salamandre à points bleus. Tiré de Robertson *et al.* (2006).

4.1.3. Remplacement de génome

Comme le génome nucléaire de *A. barbouri* ne fait pas partie du complexe des unisexués, il a été supposé que les hybrides unisexués seraient capables de faire du remplacement de génome, où un de leurs haplomes serait remplacé en entier par l'haplome provenant du sperme d'un mâle sexué (Bonen *et al.* 2007). Quelques études impliquant des hybrides fécondés par des mâles des différentes espèces ont produit des individus dont un haplome avait été remplacé (Bogart et Licht 1986; Bogart *et al.* 1989). La ressemblance génétique entre les populations sympatriques de salamandres hybrides et sexuées semble également indiquer que le remplacement de génome a lieu dans les populations naturelles

(Lowcock et Bogart 1989; Bonen *et al.* 2007; Bi *et al.* 2008; Ramsden 2008; Bogart *et al.* 2009). Le mécanisme permettant d'expliquer le remplacement de génome reste toutefois inconnu (Bi *et al.* 2008). Il semble néanmoins surprenant qu'on ne trouve pas d'individus LL ou LLL possédant un génome mitochondrial d'unisexué (Charney 2012). À de faibles températures, soit celles retrouvées dans les étangs de reproduction au début du printemps, la gynogénèse est cependant de loin le mode de reproduction le plus fréquent (Bogart *et al.* 1989). La prévalence des autres phénomènes (élévation de ploïdie, remplacement de génome) pourrait dépendre des conditions écologiques comme la température (Bogart *et al.* 1989) ou encore de l'espèce sexuée qui fournit le sperme (Bogart *et al.* 1989; Bi *et al.* 2009).

4.1.4. Élévation de ploïdie

Il est toutefois possible que le processus d'exclusion du génome mâle fasse défaut et que celui-ci soit intégré à l'œuf, ce qui produit une élévation de la ploïdie (Bogart et Licht 1986; Spolsky *et al.* 1992b; Bonen *et al.* 2007). Ce phénomène est plus fréquent lorsque la fécondation a lieu à des températures plus élevées (15°C au lieu de 6°C) (Bogart *et al.* 1989; Elinson *et al.* 1992). L'élévation de la ploïdie entraîne néanmoins une fécondité plus faible, une mortalité élevée des embryons et des larves ainsi qu'une plus longue durée du stade larvaire (Bogart et Licht 1986; Elinson *et al.* 1992; Phillips *et al.* 1997). Bien que l'élévation de ploïdie ne soit pas si rare, les triploïdes sont en effet plus fréquents que les tétraploïdes, et il est plus rare de trouver dans une population une lignée tétraploïde qui persiste depuis plusieurs générations (Phillips *et al.* 1997; Bogart et Bi 2013).

4.2. Études génétiques des allopolyploïdes unisexués

L'étude génétique d'allopolyploïdes ayant un mode de reproduction particulier, tel que les hybrides du complexe *Ambystoma*, peut poser certains problèmes. Il faut d'abord que la méthode utilisée s'applique à toutes les espèces qui ont engendré l'hybride, ce qui peut parfois causer problème si les espèces parentes sont très divergentes (Clark et Jasieniuk 2011). Les allopolyploïdes se reproduisant souvent de façon asexué, plusieurs analyses ne peuvent être exécutées, par exemple celles impliquant le calcul de l'équilibre d'Hardy-Weinberg ou encore le calcul de la fréquence allélique (Clark et Jasieniuk 2011; Dufresne *et al.* 2014). L'analyse commune d'individus présentant plusieurs niveaux de ploïdie peut également restreindre le

nombre de méthodes d'analyses possibles (Clark et Jasieniuk 2011). Aussi, les hétérozygotes partiels peuvent poser problème pour les marqueurs génétiques codominants (Dufresne *et al.* 2014). Les marqueurs codominants permettent de déduire si un individu diploïde est hétérozygote ou homozygote, alors que les marqueurs dominants ne s'expriment qu'en termes de présence absence, et il n'est pas possible de déduire si la présence d'une bande est due à un ou deux allèles. En analysant un triploïde avec un marqueur codominant, les allèles d'un hétérozygote total (ex: ABC) sont identifiables, les allèles d'un homozygote total (ex: AAA) peuvent être inférés, mais il n'est souvent pas possible de distinguer un hétérozygote AAB d'un hétérozygote ABB. Dans ce cas, tous les marqueurs génétiques (dominants et codominants) permettent d'analyser un phénotype, mais le génotype réel des individus demeure ambigu.

4.2.1. Les allozymes

Les allozymes ont été utilisés fréquemment pour l'analyse génétique des hybrides du complexe *Ambystoma* (Bogart 1989; Bogart *et al.* 1989; Bonen *et al.* 2007). Ce sont des marqueurs codominants relativement peu variables, mais qui permettent de différencier les allèles des différentes espèces (Bogart *et al.* 1989; Sunnucks 2000). Ils peuvent toutefois être sujets à la sélection, nécessitent des échantillons de tissu très bien préservés et leur faible variabilité ne permet souvent pas de déterminer la structure des populations à une échelle plus fine et résulte souvent en une sous-estimation de la diversité génétique (Sunnucks 2000; Turlure *et al.* 2014).

4.2.2. Les microsatellites

Les microsatellites, qui sont aussi des marqueurs codominants, sont aujourd'hui davantage utilisés (Balloux *et al.* 2000). Il s'agit de courtes séquences répétées en tandem de 2 à 10 nucléotides. Les mutations sont principalement causées par un glissement de la polymérase lors de la réplication, ce qui fait varier le nombre de répétition (Sunnucks 2000). D'importantes insertions ou délétions peuvent aussi survenir entre deux allèles lors de la recombinaison (Balloux *et al.* 2000; Sunnucks 2000). En raison de leur nature répétitive, les allèles peuvent être homoplasiques, c'est-à-dire être identiques sans pour autant être issus de la même histoire évolutive, ce qui tend à sous-estimer la divergence entre populations (Balloux *et al.* 2000). Il existe des modèles de mutations qui tiennent compte de l'homoplasie (modèle SMM, où une

mutation correspond à une augmentation ou une diminution du nombre de répétitions (Kimura et Ohta (1978)). En raison de leur haut taux de mutations, les microsatellites sont davantage adaptés à des problématiques impliquant une échelle spatio-temporelle plus fine (Sunnucks 2000). Le développement de ces marqueurs est toutefois laborieux et coûteux, mais une fois le travail préliminaire réalisé, leur utilisation est assez simple (Turlure *et al.* 2014). La nature codominante du microsatellite est de moindre intérêt pour l'étude de polyploïdes, puisque les hétérozygotes partiels restent irrésolus (Dufresne *et al.* 2014). Il est toutefois possible de développer des marqueurs spécifiques au génome de l'une ou l'autre des espèces parentales et ainsi traiter séparément les haplomes d'un triploïde ou d'un tétraploïde. Le haut taux de mutation des microsatellites permet également d'inférer le niveau de ploïdie d'un individu, qui correspond au nombre maximal d'allèle sur un nombre significatif de loci (au moins 3 loci amplifiant tous les allèles spécifiques pour avoir une correspondance de 97% entre la ploïdie inférée par les microsatellites et celle inférée par la cytométrie en flux) (Ramsden *et al.* 2006). Utilisée avec un grand nombre de loci, cette méthode est moins invasive et donne plus d'information que, par exemple, la cytométrie (Ramsden *et al.* 2006).

4.2.3. Les AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*)

Comme la méthode MSAP, cette technique consiste à amplifier des fragments préalablement découpés par une enzyme de restriction. Il s'agit d'un marqueur dominant, puisqu'il n'est pas possible de déterminer si la présence d'une bande est due à un ou plusieurs allèles (Turlure *et al.* 2014). Les patrons obtenus à l'aide de cette technique permettent toutefois de détecter plusieurs loci, répartis aléatoirement dans le génome (Sunnucks 2000). Cette technique permet la comparaison d'individus ayant différents niveaux de ploïdie (Dufresne *et al.* 2014). Une augmentation de ploïdie augmente toutefois le nombre de fragments obtenus, et donc la résolution en est diminuée (Dufresne *et al.* 2014). Indépendamment du niveau de ploïdie, la taille d'un haplome de salamandre est également très grande : Olmo (1974) a mesuré un génome d'une taille de 98,95 picogrammes pour les triploïdes du complexe, ce qui leur confère une taille par haplome (valeur C de 32,98) semblable aux salamandres maculée (26,20) et tigrée (27,48). Afin de pouvoir obtenir une bonne résolution avec autant de fragments potentiels, il faudra absolument passer par une amplification sélective pour restreindre le nombre de

fragments amplifiés. Les AFLP comportent aussi le désavantage que la comparaison entre différentes études est très limitée (Sunnucks 2000).

4.3. Situation du complexe au nord-est de la répartition et au Québec

Dans l'est des États-Unis, on retrouve les deux espèces parentales principales; *A. laterale* et *A. jeffersonianum* (Bogart et Klemens 2008). Les espèces sexuées peuvent former des populations exemptes d'unisexuées et se retrouvent presque toujours en allopatrie. Cependant, lorsque les unisexués sont présents, ceux-ci ont tendance à dominer la population (Bogart et Klemens 2008). Les espèces parentales se retrouvent fréquemment avec les unisexuées, cependant il est rare de trouver les trois types de salamandre en sympatrie (Bogart et Klemens 2008). Au Connecticut, au Massachusset et au sud de l'état de New-York, on retrouve environ autant de populations d'hybrides en sympatrie avec *A. laterale* qu'avec *A. jeffersonianum*. Lorsque l'on monte vers le nord (Maine, New Hampshire, Vermont et nord de New-York), les populations d'hybrides en sympatrie avec *A. jeffersonianum* deviennent rarissimes (Bogart et Klemens 2008).

Lorsque les unisexués sont en sympatrie avec *A. laterale*, on retrouve une majorité de LLJ, alors que lorsque qu'ils sont en sympatrie avec *A. jeffersonianum*, on retrouve des LJJ (Bogart et Bi 2013). Les triploïdes dominent donc chez les unisexués. De plus, dans l'ensemble du nord-est des États-Unis, les hybrides diploïdes sont étonnamment plus rares que les tétraploïdes (Bogart et Klemens 1997; Bogart et Klemens 2008).

Seule l'espèce parentale *A. laterale* est présente au Québec. Les unisexués portent tous un seul haplome J, avec un nombre variable d'haplome L selon leur niveau de ploïdie (Noël *et al.* 2011). Au Québec, des analyses de marqueurs microsatellites semblent indiquer que les hybrides présents sur un site donné sont issus d'un mode clonal de reproduction, avec une prédominance d'individus LLJ (Noël *et al.* 2011). Dans les sites dominés par les unisexués, les individus d'un même site étaient pratiquement identiques, à l'exception de quelques individus présentant un génotype distant de seulement un ou deux pas de mutation. Dans la mesure où les unisexués se retrouvent tout de même dans plusieurs habitats et sous différents climats, les hybrides doivent être en mesure de générer une certaine variation phénotypique afin de survivre et compétitionner avec des espèces ayant une niche écologique similaire. En absence de

variation génétique, les unisexués ne peuvent compter que sur l'épigénétique pour générer de la diversité phénotypique.

On retrouve toutefois une certaine variation génétique entre les sites, qui pourrait être due à des mutations de microsatellite, à des remplacements de génome ou encore à des origines multiples provenant de populations plus au sud. La situation au Québec est particulière, puisqu'on y retrouve des populations d'hybrides formées uniquement de diploïdes ou de triploïdes, ainsi que des populations où les deux biotypes sont présents (Noël *et al.* 2011 et communication de James Bogart). Des tétraploïdes ont également été retrouvés de façon plus ponctuelle (Noël *et al.* 2011).

5. Objectif

Le complexe de la salamandre à points bleus est donc formé d'individus se reproduisant de façon principalement asexuée, mais pouvant également se reproduire grâce à une forme de reproduction semi-sexuée, le remplacement de génome. Ce modèle d'étude est donc susceptible d'utiliser à la fois la diversité génétique et épigénétique afin de générer la variation phénotypique nécessaire à la persistance des populations dans le temps et dans les divers habitats de son aire de répartition.

L'objectif de cette étude est de déterminer le poids relatif des différentes sources de variation phénotypique, soit la génétique et l'épigénétique, chez un vertébré présumé kleptogène: les hybrides unisexués du complexe de la salamandre à points bleus.

6. Hypothèses

6.1. Origine du génome J

Étant donné la relativement faible diversité génétique et la présence d'allèles similaires entre les sites échantillonnés pour l'étude de Noël *et al.* (2011), il est possible que les populations de salamandres unisexuées au Québec proviennent de la même population à l'origine, et que les hybrides présentent un génome J ayant dérivé à partir d'un ancêtre commun. Si tel est le cas, on devrait observer une faible diversité allélique pour un locus J donné, les différents allèles étant

reliés entre eux par un ou deux pas de mutations dus à la dérive suite à la colonisation du territoire.

6.2. Prévalence du remplacement de génome

Les faibles niveaux de variation des microsatellites au sein des populations échantillonnées laissent croire que le taux de remplacement de génome est très faible sinon nul au Québec, région qui est située au nord de la répartition des unisexués. Les plus faibles températures présentes au nord de la répartition pourraient donc réduire considérablement la prévalence du remplacement de génome (Bogart *et al.* 1989). En absence de remplacement de génome, on devrait observer une faible diversité allélique pour les locus L, dont les différents allèles seraient reliés entre eux par un ou deux pas de mutation seulement. La diversité génétique intra-site serait donc presque nulle advenant le cas où les unisexués ne se reproduiraient que par gynogénèse.

6.3. Dynamique de la variation épigénétique

Un mode de reproduction clonal suppose que les organismes ne peuvent se fier à la diversité génétique pour générer de la variabilité phénotypique. En absence de variation génétique, on s'attend à avoir une forte variabilité épigénétique expliquée par l'environnement d'où proviennent les individus. En effet, un même génome pourrait donner des phénotypes différents selon les conditions environnementales par modification épigénétique. Les patrons de méthylation devraient donc être fortement similaires entre les individus provenant d'un même site, comparativement à ceux provenant de sites différents. Si par contre le remplacement de génome est plus fréquent qu'escompté, il est possible que le contraste entre la variation épigénétique au sein d'un même site et la variation épigénétique entre les sites soit plus faible, étant donné que les kleptogènes disposent d'une stratégie alternative pour générer de la variation phénotypique, soit une plus grande diversité génétique qui leur permettrait de faire face à différents milieux.

Article

Increasing potential for phenotypic variation through kleptogenesis or epigenetics

France Beaugard and Bernard Angers

Abstract

Phenotypic variation is critical to the persistence of organisms over time and the colonization of new habitats. The main consistent sources of phenotypic variation are genetics and epigenetics. Epigenetics was proposed as a valuable asset for asexual organisms to compensate for a lack of genetic diversity. The objective of this study is to assess whether lack of genetic variation is compensated by epigenetics by comparing methylation patterns of gynogen and kleptogen individuals of the blue-spotted salamander hybrids. Individuals sampled clustered in five genetically differentiated groups, derived from the very same paternal *A. jeffersonianum* haplome. Two out of the five groups are exclusively gynogenetic, for either ecological or genomic factors. The other three groups occasionally formed kleptogen individuals, since they display a higher genetic variation within sites than among sites, in addition of displaying highly divergent alleles found in high frequency in the sympatric *A. laterale* populations. Epigenetic patterns are variable and distinct among the five genetic groups. Gynogenetic groups are the only one to display a significant environmental effect on their epigenetic pattern, suggesting clonal individuals must be able to make the most from their epigenetic variation potential to deal with environmental variations.

Introduction

Organisms have various strategies to face environmental fluctuations. They have in common the need to produce phenotypic variation. One of the well-known strategies is sexual reproduction. Genetic mutations provide diversity in terms of different alleles of a given gene (or gene duplication) and are the source of phenotypic variation, but their random recombination via sexual reproduction maximise the number of phenotypic alternatives required for the population to persist in changing environments and colonise new habitats. Sexual reproduction is therefore associated with genetic diversity.

An alternative to genetic diversity is phenotypic plasticity. Phenotypic plasticity is the ability of a given genotype to produce different phenotypes depending on environmental conditions. The mechanism behind phenotypic plasticity is recognized to be epigenetics (Newman & Müller 2000; Aubin-Horth & Renn 2009; Castonguay & Angers 2012; Verhoeven & Preite 2013). Epigenetics consist in modifications of gene expression that do not affect genetic information (Jaenisch & Bird 2003). DNA methylation of CpGs is a well-known epigenetic mechanisms. Several studies has shown that epigenetic marks are influenced by environmental conditions, such as cellular environment (Paldi 2003), diets (Wolff *et al.* 1998; Cropley *et al.* 2006; Kucharski *et al.* 2008), exposure to parasites (Pavet *et al.* 2006; Boyko *et al.* 2007), temperature (Matsumoto *et al.* 2013) and behaviour (Weaver *et al.* 2004).

Several epigenetic modifications can also occur by chance, without apparent environmental or genetic influence (Massicotte *et al.* 2011; Verhoeven & Preite 2013). Stochastic epigenetic variation may then also contribute to phenotypic diversity (Schmitz *et al.* 2011).

Epigenetic potential is maximised with a polyvalent genome (in terms of heterozygosity as well as gene duplication), which provides more alternatives to cope with environmental change (Castonguay & Angers 2012). A polyvalent genome allows for different phenotypic alternatives, by having different enzymatic pathways or a high heterozygosity rate (Lynch 1984; Elder & Schlosser 1995; Schlosser *et al.* 1998). Hybridization is an efficient way to create polyvalent genomes, since it combines two genomes potentially adapted to different ecological niches in a single individual (Anderson 1953).

Epigenetic diversity is an alternative to genetic diversity for generating phenotypic variation to cope with environmental changes. Therefore, epigenetic variation is crucial for clonal organisms, which lack genetic variation as a source of phenotypic diversity (Castonguay & Angers 2012). The relationship between epigenetic and genetic variation is, however, debatable for sexual organisms, reminding the question of the relationship between phenotypic plasticity and genetic diversity. Some authors argued that phenotypic plasticity evolves to allow organisms to display phenotypes acclimated to different environments without resorting to genetic variation, implying that phenotypic plasticity is negatively correlated to genetic diversity (Jain 1978; Zangerl & Bazzaz 1983; Silander 1985; Macdonald & Chinnappa 1989). Others suspected the opposite; phenotypic plasticity would diminish the influence of natural selection on the genotype, leading to an increase in genetic mutations (Gillespie & Turelli 1989). However, more scientists have found no relationship between genetic variation and phenotypic plasticity, arguing that those characteristics evolve independently (Scheiner & Goodnight 1984; Stearns 1989; Counts 1993).

To assess the dynamic between genetic and epigenetic variation, one must compare individuals with different levels of genetic diversity. Organisms with the capacity to make both sexual and asexual reproduction are thus relevant models. Alternation of sexually and asexually reproducing generations can generate various levels of genetic diversity within the same organisms. This capacity also gives a competitive asset to a lineage, since it can benefit from the advantages of both reproduction modes. For instance, water fleas (*Daphnia magna*) and aphids (fam. *Aphididae*) reproduce clonally during the more favorable time of the year to take advantage of the demographic benefits of asexual reproduction, but start sexual reproduction when the environmental conditions tend to be less favorable, to maximise genetic diversity and therefore to ensure that at least a few offsprings will survived and prosper during the next favorable season (Kleiven *et al.* 1992; Trionnaire *et al.* 2008).

In addition to the alternation between sexual and asexual periods, several partial or fully asexual organisms are known to occasionally incorporate genetic material from other species (eg. bdelloid rotifers (Gladyshev *et al.* 2008), and tardigrades (Boothby *et al.* 2015)). Kleptogenesis is an example of mechanism used by primarily asexual organisms to occasionally incorporate new genetic material (Bonen *et al.* 2007). Kleptogens “steal” sperm from a related

species and incorporate the male haplome to the genome of their eggs. The unisexual hybrids of the *Ambystoma laterale* complex are thought to reproduce clonally using gynogenesis, and occasionally by this form of sexual reproduction, kleptogenesis (Bonen *et al.* 2007).

Gynogenesis is an asexual mode of reproduction by which an unreduced egg is produced by the female. The male sperm is necessary to trigger the egg development, but the male genome is discarded and the zygote is genetically identical to its mother. Kleptogenesis is a complex mode of reproduction by which the hybrid female can discard a whole haplome before meiosis to produce non-recombinant reduced eggs which will be combined with the genome of a sexual male from the host species, a process called genome replacement (Bonen *et al.* 2007; Bogart & Bi 2013). However, this process differ from hybridogenesis in that the conserved haplome might not necessarily be the same from one generation to another, allowing the male genome to potentially persist for several generations. Kleptogenesis is invoked to explain the high genomic diversity found in the *Ambystoma* complex (Lowcock & Bogart 1989; Bonen *et al.* 2007; Bi *et al.* 2008; Ramsden 2008; Bogart *et al.* 2009), despite the fact that all hybrids are expected to come from a unique mitochondrial origin (Kraus & Miyamoto 1990; Hedges *et al.* 1992; Spolsky *et al.* 1992a; Robertson *et al.* 2006). Indeed, the genome of five different species are found in the hybrids of this complex, although mitochondrial diversity is almost inexistent across the distribution of the unisexuals (Bogart *et al.* 2009).

The objective of the present study is to assess the relative importance of genetic and epigenetic variation in a kleptogen vertebrate; the unisexual hybrids of the *Ambystoma laterale* complex. In the northern part of its distribution, kleptogenesis has been inferred in multiple populations (Bonen *et al.* 2007; Bi *et al.* 2008; Ramsden 2008; Bogart *et al.* 2009) as well as the presence of apparently clonal populations (Noël *et al.* 2011). The presence of kleptogenetic and exclusively gynogenetic populations in Southern Québec will therefore allow us to test the dynamic of genetic and epigenetic variation with two populations systems: some with no genetic variation and others with a form of genetic variation.

We predict that genetically identical individuals located among sampling sites display a strong environmental effect on epigenetic variation. For individuals formed by kleptogenesis, we would expect a lower environmental effect on epigenetic variation, considering that genetic variation might be partly responsible for local phenotypic variation.

We will first assess whether hybrids all come from the same origin in terms of paternal *A. jeffersonianum* haplome. Since the parental species *A. jeffersonianum* is absent from the northern part of the distribution of unisexuals (Bogart & Klemens 2008), this species could not have been involved in recent genome replacement. If the hybrids found in the northern part of their distribution come from a same hybrid ancestor, it would be reflected by the present of a same J haplome in their genome. Then we will assess genome replacement by analyzing the *A. laterale* haplomes. More specifically, by determining whether genetic variation can be explained by processes other than single mutations. Finally, we will compare the epigenetic variation between individuals from gynogenetic or kleptogenetic origin. For the clonal individuals, we would expect a strong sampling site effect on epigenetics, in order to allow them to display a more functional phenotype in a given environment.

Method

Sampling and DNA extraction

The sampling was conducted over two consecutive years during the reproduction period in southern Québec. Sampling sites were chosen according to the presence of *Ambystoma* hybrids reported in previous surveys (personal communication of Jim Bogart, University of Guelph, and Patrick Labonté, Environment Canada). Minnow traps were placed in the ponds overnight and the salamanders were collected in the morning (Animal Deontology Committee of UdeM: # demand 13-084; Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs: # license 2014-03-18-002-00-S-F and 2015-02-27-002-00-S-P). Tissue sample was collected on the tail tip of each individual and preserved in 95% ethanol. Sampling was complemented with individuals previously collected by Noël *et al.* (2011) for a total of 10 sites (see Table 1). DNA extraction was performed according to the phenol-chloroform purification and ethanol precipitation method of Sambrook *et al.* (1989).

Table I: Geographic coordinates and year of sampling for the sampling sites.* M06 site correspond to ROY and E01 to MSH in the study of Noël *et al.* (2011).

Site	Latitude	Longitude	Region	Sampling year	Sampling duration	Total of individuals
M01	45.392639	-73.980446	Montréal Region	2015	5 days	32
M02	45.428295	-73.945999	Montréal Region	2014-15	2 + 1 days	86
M03	45.441967	-73.911049	Montréal Region	2014	6 days	2
M04	45.498646	-73.777199	Montréal Region	2014	8 days	17
M05	45.518002	-73.73967	Montréal Region	2014	8 days	19
M06	45.502444	-73.588639	Montréal Region	2006	-	14
M07	45.678432	-73.511154	Montréal Region	2014	7 days	22
E01	45.546194	-73.169944	Eastern Québec	2006	-	11
E02	45.429329	-72.62883	Eastern Québec	2014-15	6 + 3 days	16
E03	46.542873	-72.406937	Eastern Québec	2014-15	6 + 7 days	16
Total					19 + 25 days	235

In order to compare the heterogeneity among sites, environmental conditions were measured during the larvae development period from May to August 2014 for the sampling sites except for M01 and M03. Aquatic variables of the pond include conductivity, oxygen concentration, pH, oxydo-reduction potential, nature of the substratum, variation of the water level, presence of water connection, herbaceous plants and trees, and percentage of the tree cover above the pond. Terrestrial variables of the adjacent forest were also assessed for soil pH, drainage score, percentage of coniferous trees and the coverage level of the shrub and tree layers.

Genotype determination: Microsatellites

Microsatellite loci were used to discriminate between parental species (*Ambystoma laterale*) and hybrids, assess the ploidy level (Ramsden *et al.* 2006) and determine the genotype of hybrids. Several ploidy levels are also found in *Ambystoma* hybrids. Ploidy elevation happens when the male genome is combined with an unreduced egg, whereas ploidy reduction arise when no genome is included to a reduced egg. All individuals, no matters their ploidy level, have the potential to reproduce by gynogenesis, but the cumulative limitation of high ploidy level seems to limit ploidy elevation (Bogart & Licht 1986; Elinson *et al.* 1992; Phillips *et al.* 1997).

We used eight loci specific to J-genome, four loci specific to L-genome and an additional set of 4 loci for which it was not possible to discriminate between species alleles (AjeD94-AjeD283) (Table 2). Specific loci was obtained using different strategies: three loci only amplify J-genome (AjeD13-AjeD294-AjeD378), three others amplify alleles of both species but without overlapping between alleles species (AjeD23-AjeD346-AjeD422), and four other loci (AjeD84-AmaD42) were obtained using 2 distinct primer pairs, a first amplifying both genome and a second pair amplifying only one of the species.

Table II: Primers, and ranges of the loci used in the study. Sequence of the primers, specific range of alleles when known and reference are given.

Locus	For-Primer	Rev-Primer	Total range	J-alleles range	L-alleles range	Reference
AjeD13	TTTAAACCTTAAGAGAAATCCCAG	CCATGTGTCTGTCTTTGTGAG	200-228	200-228	X	Julian <i>et al.</i> 2003b
AjeD23	AAAACCTCTGGAGAAACATGAG	GAACACAGGCTACTAACAACAGG	197-253	197-229	229-253	Julian <i>et al.</i> 2003b
AjeD84	CATGCATAGCATCCTGTGAG	ATATTTAACTGAGGCCTTTGGG	148-196	148-196	X	Julian <i>et al.</i> 2003b
AjeD84b	CCCACACAGTCAATCCAC	CAAGAGCAAAGATGGTTG	150-234	150-198	182-234	Present Study
AjeD94	ATATCCCATTCCATTGTTCTG	ATGGACATTCACATGATCACC	142-242	?	?	Julian <i>et al.</i> 2003b
AjeD283	TTGCACCCTTGGCAGATG	TGTAATGGGTCAGGCAATAATC	118-194	?	?	Julian <i>et al.</i> 2003b
AjeD294	GTTAGTCGAACCTCCGTTGAG	GTTTCTGTCCGTTGTTGTCTG	234-250	234-250	X	Julian <i>et al.</i> 2003b
AjeD346	AGCAGGATTAGTGCTTAGATGC	TGGCAATGTTTACCTAAGAGAG	180-200	180-200	unused	Julian <i>et al.</i> 2003b
AjeD378	GGCAAACCATATTTCCATAAC	AGAAACCTCTGGGTATTAAGGC	220-276	220-276	X	Julian <i>et al.</i> 2003b
AjeD422	CAAGGTGCTCAAGTTACTGTTC	CAAATCTGTACCTGACTGCTG	220-252	244-252	220-236	Julian <i>et al.</i> 2003b
AmaD42	GATGGAAAATCAATCAAGTGTG	TAACTAGCTGTCAATCGCTCTC	133-257	133-193	165-257	Julian <i>et al.</i> 2003a
AmaD42b	CAATCAAGTGTGACTTCAAGG	TAACTAGCTGTCAATCGCTCTC	153-245	X	153-245	Present study

PCR amplification was performed in 12.5 μ L reaction with 2 μ L of individual DNA (approx. 30-40 ng), 1.25 μ L of 10x Taq Buffer, 0.4 mM of dNTP mix, 0.6 mM of each primer and 0.2 U of Taq DNA polymerase. PCR consisted of an initial denaturation of 30 sec at 92°C, followed by 45 cycles of 92°C for 30 sec, 57C for 30 sec and 68°C for 45 sec, with a final extension of 5 min at 68°C. PCR products were run on denaturing 6% polyacrylamide (19:1 acrylamide:bis-acrylamide) gel. Electrophoresis was conducted at 1750 V for 2h15 to 2h45

(depending on the size of the marker). Silver nitrate staining was used to visualize results (Baudoin *et al.* 2007).

Epigenetic pattern determination: MSAP

A total of 71 individuals were selected to conduct MSAP analysis (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) according to a protocol modified from Xiong *et al.* (1999). The frequent cutter is MspI or HpaII but the rare cutter is KpnI. Preamplification targeted a selection of two nucleotides and involved 5'-ACGATGAGTCCTGAGCGGCC for MspI/HpaII-CC extremities and 5'-GTAGACTGCGTACCGTACCGC for KpnI-GC extremities. Selective amplification required the following primers: 5'-GATGAGTCCTGAGCGGCCGC for MspI/HpaII-CCGC extremities (the unique combination producing unambiguous results) and 5'-GACTGCGTACCGTACCGCNN for KpnI-GCNN extremities (variable combinations: GCTA, GCTT, GCAA, GCAG). Electrophoresis was conducted at 1750 V for 3h30 to 4h00 (depending on the combination). At least two replicate for each combination were scored to identify loci providing reliable results. Only the bands with a clear and constant outcome between the gels were kept for analysis. Unclear loci or loci displaying diverging results between replicate were not kept for analysis.

Analysis

Sampling sites ecological analysis

Euclidian distance between sampling sites was computed according to their scaled environmental variables and represented by PCA. Environmental variables were only used to assess differences among sites and direct correlation between epigenetic pattern and sampled environmental conditions was avoided because of the high ecological variation among years for some ponds.

To assess whether geographic distance was correlated with genotype abundance among sites, the relationship between the principal coordinates of the geographic euclidian distance matrix between sites and the genetic distance between sites (according to genotype abundance with a hellinger distance) was computed using the the function RDA and RSQUAREADJ of the package VEGAN (Oksanen *et al.* 2007). The p-value of the correlation was obtained with the function ANOVA.CCA of the package VEGAN. This method was favored over a Mantel test, because of the greater power of canonical analysis than that of the derived forms of the Mantel

test (Legendre & Anderson 1999; Legendre & Fortin 2010). A mantel correlogram was also computed between those two matrixes, using the `mantel.correlog` function with 20 classes.

Genetic data analysis

The unisexual hybrids of the *Ambystoma* complex represent a challenge because it may include the haplome of multiple species in a same individual as well as multiple ploidy levels among populations. The package POLYSAT for R v. 3.2 is appropriate for such complexes (Clark & Jasieniuk 2011). Most loci used allowed to identify which alleles belong to which genome, either because of the different alleles length between L and J (AjeD422, AjeD23, AjeD346), or because of the specific primer version for a locus (AjeD378, AjeD294, AjeD13, AjeD84, AmaD42b). Each isoloci was therefore treated as an independent locus. It was impossible to discriminate the origin of the alleles for two loci (AjeD94 and AjeD283), so they were removed from the POLYSAT analysis but they are considered in the discussion. The segregation of the isoloci allowed the use of the function *meandist2* which extrapolate the unknown alleles of the partial heterozygote by weighting each possibility according to allele frequency. The distance measure *Bruvo2*; corresponding to the add-loss model proposed by (Bruvo *et al.* 2004), behave according to a SMM model and allow comparison between ploidy level by adding virtual alleles selected among the lower ploidy level individual's (add model) or among the higher ploidy level individual's (loss model). Both possibilities have been set as TRUE for the *Ambystoma* hybrids. An unrooted neighbour-joining tree (Saitou & Nei 1987) was therefore built from the distance matrix with the *nj* function of the APE package in R (Paradis *et al.* 2004). The tree was visualized with FIGTREE v 1.4.0 (Rambaut 2007).

The function *bruvo.boot* of the package PROPPR was used to perform bootstrap with 1000 replicates, but only with the J-alleles, since it needs haploid data. Only the nodes displaying more than 50% of bootstrap value were kept on the computed tree for J-alleles.

The presence-absence matrix obtained from the MspI treatments was used as such as a second source of genetic data: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). The MspI enzyme cuts DNA regardless of methylation state at restriction site (Jaenisch & Bird 2003), so the band pattern is representative of genetic profile. The simple-matching coefficient was used to calculate the distance matrix from the presence-absence AFLP matrix, to account both for

double presences and double absences (Kosman & Leonard 2005). The tree construction and visualization is the same as for the microsatellite data.

To assess whether AFLP distance matrix was correlated to the distance matrix of the corresponding individuals for microsatellites, principal coordinates were obtained for both matrices. Explained proportion of the microsatellite matrix by the AFLP matrix was computed using the function `RDA` and `RSQUAREADJ` of the package `VEGAN` (Oksanen *et al.* 2007). The p-value was obtained with the function `ANOVA.CCA` of the package `VEGAN`. Again, this method was favored over a Mantel test, because of its greater power (Legendre & Anderson 1999; Legendre & Fortin 2010).

Bootstraps were also computed for AFLP data, using `PHYLIP` (Felsenstein 2005). A total of 1000 data matrices were generated with the executor `SEQBOOT`. The distance matrices were then calculated with the simple-matching coefficient with a loop in R. The 1000 distance matrices were used to build as many trees by neighbour-joining, using the executor `NEIGHBOR`. All trees were finally merged into one consensus tree, using the executor `CONSENS` with the extended method of majority rule.

Alleles frequencies were computed for the pure individuals LL with `Genepop` on the web v. 4.2 (Raymond & Rousset 1995). The frequency of alleles was calculated for the triploid individuals on a diploid basis, since they all have a double copy of the L genome.

From the microsatellite data, the total number of different genotypes was calculated, and weighted according to the number of individuals in the different genetic groups by assigning a different number for each specific genotype for each individual. The function *allelic.richness* of the package `HIERFSTAT` in R was used for weighting (Goudet 2006). The weighted number of alleles for each genetic group was calculated in order to take into account the different number of individuals and the different ploidy levels: each individual was multiplied by its ploidy level and each copy was associated to a different allele of the said individual. This new allelic matrix was also run into the *allelic.richness* function. This operation was done for both the set of J-specific alleles and for all alleles L-J. For each genetic group, total number of unique 2n genotypes and 4n genotypes was counted as a proxy for the number of ploidy reduction and elevation, respectively, assuming the basic genome was triploid (Lowcock & Bogart 1989). The

total dispersion in each genetic group was computed from the microsatellite distance matrix using the function *betadisper* of the package VEGAN in R (Oksanen *et al.* 2007), which return the value of the mean distance from the centroid. Dispersion intra-sites and inter-sites were also obtained by the same method, with modification of the group's attributions.

Epigenetic data analysis

The epigenetic matrix was obtained by removing all the bands in the presence-absence HpaII matrix that matched bands in the MspI matrix, in order to remove all the variation correlated to genetics. This method has been advocated when there was uncertainty due to the lower contrast of certain bands of MspI, to avoid scoring false absences for genetic patterns. Information might have been lost by using this method, but in favor of a greater certainty on the retained data.

The simple-matching coefficient was also used to calculate the distance matrix from the presence-absence AFLP matrix, again in order to account both for double presences and double absences. The inter-individual distance was represented with a PCoA, using the function *cmdscale* in R.

Variance partitioning was computed for all individual from the presence-absence epigenetic matrix with the function *VARPART* of the package VEGAN (Oksanen *et al.* 2007). Site of sampling, ploidy level and genetics were taken into account as constraining matrices. The descriptive genetic matrix was a compilation of presence-absence of some divergent microsatellites alleles and the MspI genetic matrix.

Total and partial environmental effect for each main genetic group was also tested with the function *RDA* and *RSQUAREADJ* of the package VEGAN. For total environmental effect, only site of sampling was taken into account as constraining matrix. For partial environmental effect, site of sampling, ploidy level and genetics were all taken into account as constraining matrices. The p-value of partial and total environmental effect on epigenetic patterns was obtained with the function *ANOVA.CCA* of the package VEGAN. Total and partial environmental effect for all kleptogenetic groups and all gynogenetic groups was computed using the same method.

Results

A total of 207 hybrid individuals were captured. The hybrids are dominated by triploids (LLJ; n=161; 77.8%), but also include diploids (LJ; 18.8%) and a few tetraploids (LLLJ; 3.38%) (Table 3). Most sites include individuals of different levels of ploidy, except two sites exclusively composed of diploid individuals (E01 and E02). An additional 26 individuals of the parental species *A. laterale* (LL) was captured. Their distribution was, however, limited as they were captured in only two sites: (M07: n = 6; 27.3% and M02: n = 20; 23.3%). Sampling success was not the same between sites; the effort was maximised in the sites where the capture rate was lower (Table 1).

Table III: Proportion of each biotypes of the sampled individuals.

Site	Total of individuals	Total hybrids	Number of diploids	Number of triploids	Number of tetraploids	Number of pure LL
M01	34	32	7	24	1	2
M02	82	62	5	54	3	20
M03	2	2	0	2	0	0
M04	17	17	0	16	1	0
M05	19	19	0	18	1	0
M06	14	14	0	13	1	0
M07	22	16	0	16	0	6
E01	11	11	11	0	0	0
E02	16	16	16	0	0	0
E03	16	16	0	16	0	0

According to the environmental conditions measured, sampling sites are similar, except for E02 and M06. The pond of the M06 almost dried out in July, affecting the aquatic parameters. While most sites were forest wetlands, the E02 site was more coniferous and the pond was well delimited and deeper, with a lot of herbaceous plants (Figure 2).

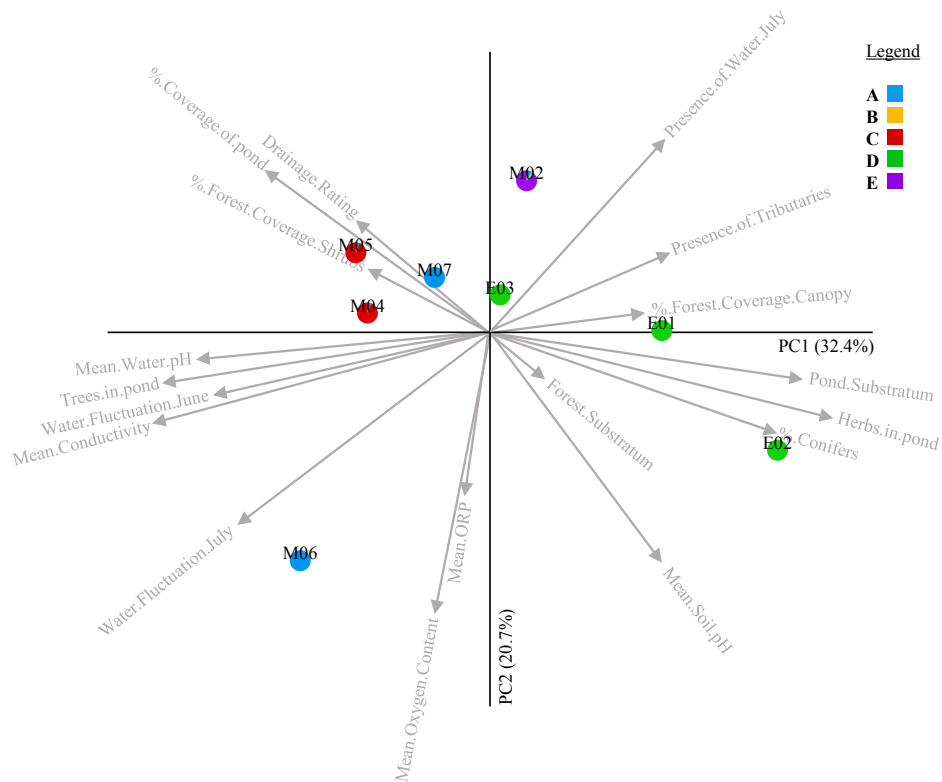


Figure 2: Distribution of the sampling sites according to environmental conditions. Explanatory vectors have been enlarged by four times in order to show them clearly. Pie charts represent the proportion of each genetic groups (see Results: Origin of the J-haplome).

Origin of the J-haplomes

We expect that the J-haplome of the unisexuals of those populations can only be transmitted clonally since genome replacement with another J-haplome is not possible because of the absence of the parental species *A. jeffersonianum* (JJ) in Québec. It is therefore possible to infer the relationships among these hybrids and their origin by analyzing the J-haplomes.

For most of the J-loci, individuals are only different by one or a few mutation steps. However, four loci are characterized by a large gap between alleles without intermediate (see Table 4: AmaD42, AjeD378, AjeD13 and AjeD23). Using these loci, five groups of individuals could be formed. All five groups are not very different from the consensus, except for a few alleles that diverge from more than two mutation steps (A: AmaD42-137, B: none, C: AjeD13-224 and AjeD23-197, D: AjeD378-264, E: AmaD42-193).

Table IV: Consensus score of the J-alleles for the five main genetic groups. The most abundant allele is in bold character, whereas the other possible alleles are listed aside. Number of individuals carrying a given allele is indicated below the allele. Boxes represent alleles approaching the consensus score.

		AmaD42	AjeD378	AjeD13	AjeD346	AjeD294	AjeD422	AjeD23	AjeD84
A	score	137 133	232 220	212 216	180 184	246 242	244	225	194 198 190
n = 37	n	19 18	31 6	36 1	33 4	23 14	37	37	35 1 1
B	score	177	236	200	192 188	238 234	244	217 221	190
n = 19	n	19	19	19	11 8	18 1	19	11 8	19
C	score	177	244	224 228	184 188 180	246	244	197	190 194
n = 34	n	34	34	32 2	31 2 1	34	34	34	32 2
D (2n)	score	177	268 272 276	208	184 188	242	252	221 225	190 194
n = 27	n	27	15 11 1	27	21 6	27	27	16 11	22 5
D (3n)	score	177 181	264 260 268 272	208 204 212	188 184 192	250 246	248 252	229 225	194 190
n = 17	n	16 1	14 1 1 1	12 4 1	8 8 1	14 3	11 6	16 1	16 1
E	score	193	240 244 236	208	184 188	246	244	225	190 194
n = 63	n	63	57 3 3	63	61 2	63	63	63	61 2
Consensus	score	177	240 ±8	208 ±8	184 ±8	246 ±8	244 ±8	225 ±8	190 ±8
n = 197	n	159	57 116	102 163	125 197	123 196	153 197	112 163	136 197

Neighbour-joining trees made with only J-haplome data, L-J haplome data and AFLP data recovered the very same clusters of individuals. The bootstrap analysis indicate that the five genetic groups are supported by the microsatellites data for the J-alleles. The main groups are, however, not supported by bootstrap analysis of the AFLP data. The AFLP analysis included a total of 27 loci, of which 19 were variable, 17 were informative and 8 explained the association to a given group.

The relative positioning among groups slightly differs between the methods due to the inconsistent position of the group D (Figure 3). Despite this difference, individuals from a given

genetic group cluster together with both the microsatellite and the AFLP data analysis. The two matrices are significantly correlated ($R^2_{\text{adjust.}} = 0.5605$, $p < 0.001$).

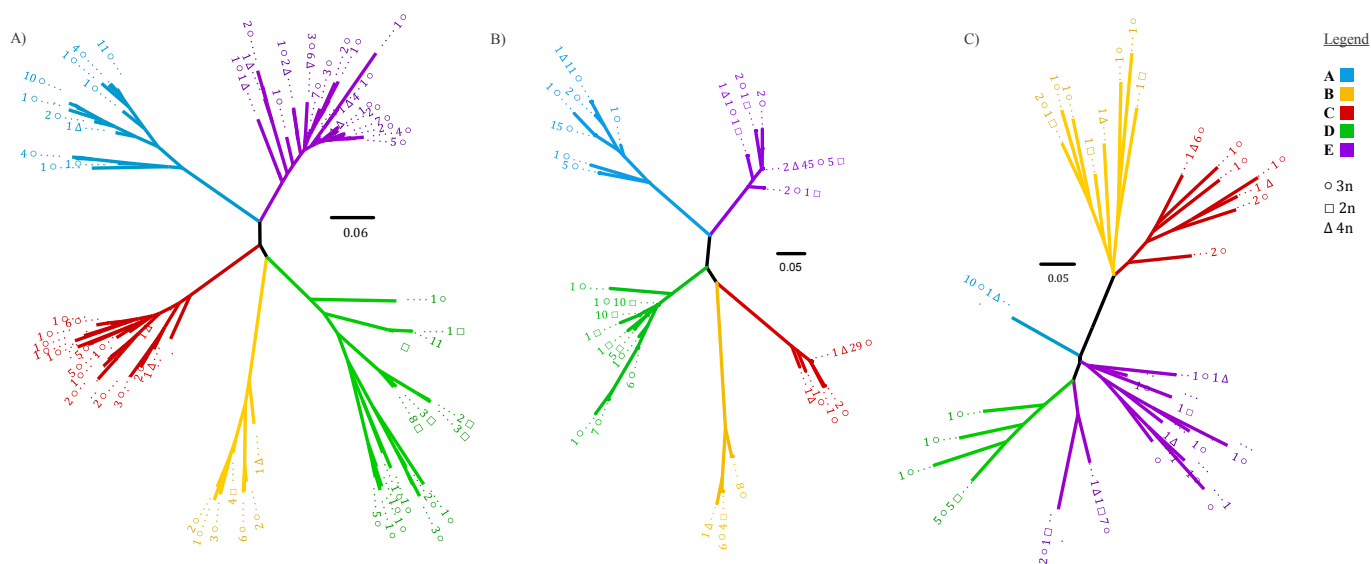


Figure 3: Organisation of the five main genetic groups according to different genetic data. Color represents each main genetic group (according to the four multimodal J-loci), and forms represent ploidy level. Number of individuals of each ploidy level are indicated at the end of the branch. **A)** Cluster of all individuals using the microsatellite data with both L and J alleles. All nodes are shown, no bootstrap values are available. **B)** Cluster of all individuals using the microsatellite data with only J-alleles. Only the nodes supported by more than 50% of the bootstrap analysis have been kept. **C)** Cluster of 71 individuals from each main genetic group using the simple matching coefficient distance with AFLP data. Bootstrap values are available, but all the nodes are supported by less than 50% of bootstrap values, so all the nodes are shown.

The five genetic groups are also spatially structured (Figure 4, right charts). A high diversity of groups is observed in Montréal, where four of the five groups were sampled. Sites are generally characterized by the dominance of individuals from a single group and included triploids, diploids and tetraploids. Neighbouring sites are characterized by the same group leading to a spatial autocorrelation: the Mantel correlation is significant between sites spread of less than 7.5 km (Mantel correlation: 0.3381; $p = 0.0406$). The E group not observed in Montréal

is the unique group detected out of this region. Interestingly, these sites are characterized by their level of ploidy (rather than their genetic identity). Diploid (E01 and E02) and triploid (E03) individuals are completely allopatric.

The correlation between the geographic distance matrix and the matrix made with the abundances of each main groups is significant, but weak ($R^2_{\text{ajust.}} = 0.1596$, $p = 0.023$). The scale of the genetic diversity is very different between the Montréal region and the South-Eastern Québec, since the area covered by the D-group is much larger than any other (Figure 4, right charts). Interestingly, in this particular group, the diploids (sites E01 and E02) and triploids (site E03) are completely allopatric. The environmental conditions of the sampled sites are, however, not indicative of the genetic composition of the hybrid population found there (Figure 2).

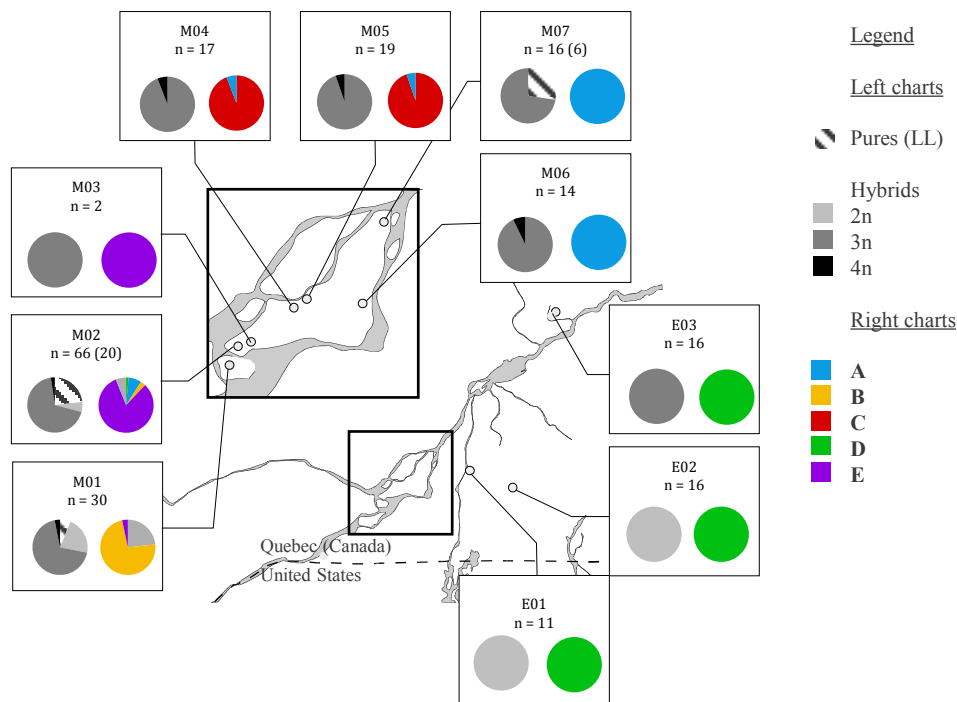


Figure 4: Geographic distribution and organisation of the sampled hybrids. The region in close-up represents the Montréal region. Number of hybrid are listed aside number of pure *A. laterale* individuals (the latter are in parentheses). **Left charts: proportion of pure (LL) individuals and diploid, triploid and tetraploid hybrids for each sampling sites. **Right charts:** proportion of individuals in each main genetic group determined by the four multimodal J-loci.**

Prevalence of genome replacement

Because *A. jeffersonianum* is absent from the study region, the hybrid populations are expected to use the sperm of parental species *A. laterale* for reproduction. Consequently, genome replacement event is expected to result in a change of alleles associated with L-haplomes. The five genetic groups have been inferred using only the J-alleles, but the allelic diversity of the L-genome provide additional genetic variation within a group. The analysis of the genetic variation of the L-alleles within a group should indicate the prevalence of genome replacement.

Genome replacement process imply that a haplome from a parental species replace any haplome of the unisexuals. We would then observe similarity between the alleles of hybrids and those of the sympatric population of parental species *A. laterale*. Individuals of *A. laterale* were found in only three sites in sympatry with populations of unisexuals (sites M01, M02 and M07), and the number of *A. laterale* was very low for M01 site (2 individuals).

Across all hybrids individuals, most loci displays a narrow range for L-alleles. Knowing that those loci have high mutation rate (Ramsden 2005), it was not clear whether the variation observed was caused by mutations or by genome replacement. However, some alleles were highly divergent from the global allelic distribution observed for a given locus in the sampled hybrids (8 to 11 mutations step from the nearest allele of the global distribution). The loci concerned are AjeD94 and AmaD42-L (Table 5). Those individuals are found mostly in the B, C and E groups, and a few of them in the D-3n group. No individuals of the A or the D-2n group display those extreme alleles, except for the tetraploid of the group A. Interestingly, the *A. laterale* individuals from the parental species also display a high frequency of the same highly divergent alleles (for AjeD94-142: M07 (100%) and M02 (77.5%); for AmaD42-241:253: M07 (20.0%) and M02 (82.5%), see Table 5). The A group is found in sympatry with LL individual in the M07 and M02 sites. LL individuals, A, B and E groups are found in sympatry in the M02 site. The B and E groups of the M02 sites also display the highly divergent L-alleles (AjeD94: 50.0% for B and 39,4% for E; AmaD42: 50.0% for B, 27.1% for E). On the other hand, the group A do not harbour these alleles for any of the sites where it is present, regardless of whether it is sympatric with other hybrids displaying those highly divergent alleles or not (Table 5). When all hybrids populations are taken into account, regardless of the presence of *A. laterale*

individual, the triploids of the groups B, C, D and E all display those highly divergent alleles, whereas no triploid individual of the A group displays them. No diploids individual of the D group displays those highly divergent alleles either (not shown). All tetraploids carry those alleles in addition to the genome of a typical triploid of their group (not shown; n = 7).

Table V: Frequency of highly divergent alleles in triploid hybrids (LLJ) and in parental species populations. For both loci AjeD94 and AmaD42, divergent alleles are given for the different hybrids (ABCDE) in the sites where triploids were found, M01 to M07 and E03.

		AjeD94 (allele 142)						AmaD42 (alleles 241-253)					
		A	B	C	D	E	LL	A	B	C	D	E	LL
M01	n		13			3	2		13			3	2
	%		38.5			0.00	25.0		46.2			0.00	50.0
M02	n	5	1		1	47	20	5	1		1	47	20
	%	0.00	50.0		0.00	38.5	77.5	0.00	50.0		0.00	27.1	82.5
M03	n					2						2	
	%					50.0						25.0	
M04	n	1		15				1		15			
	%	0.00		13.3				0.00		50.0			
M05	n	1		17				1		17			
	%	0.00		11.8				0.00		26.5			
M06	n	13						13					
	%	0.00						0.00					
M07	n	16					6	16					6
	%	0.00					100	0.00					20.0
E03	n				16						16		
	%				31.3						3.1		
Total	n	36	14	32	17	52	28	36	14	32	17	52	28
	%	0.00	39.3	12.5	29.4	37.5	78.6	0.00	46.4	37.5	2.9	26.0	66.1

Dispersion from the centroid of the groups considering the POLYSAT-Bruvo2 distance was used as an indicator of genetic variation within groups. Total dispersion for each group is similar, with no significant difference between two adjacent groups ranking from the group with maximum value (D-3n) and the group with minimum value (E) (Table 6). There is, however, two distinct trends regarding the distribution of the genetic variance between and within sites.

The A and D-2n groups have a higher inter-site dispersion for the L-J alleles, compared to their intra-site dispersion, as it is expected from genetic variation due to mutation (see Table 6). On the contrary, the B, C, D (3n) and E groups have a greater proportion of their dispersion attributed to inter-sites variation. A and D-2n groups are also the two groups with the lower allelic sum and mean ratio between L-J alleles and J-specific alleles (Table 7). The two groups with the lower intra-sites variation proportion (A and D-2n) are also the two groups without any highly divergent alleles for the loci AjeD94 and AmaD42.

Table VI: Distribution of the genetic diversity among and within sites for the five main groups. Group D is separated between diploids and triploids because it is the only case where they are only found in allopatry. Genetic diversity is measured by the dispersion of the individuals from the centroid based on the POLYSAT distance, which take the number of mutation steps into account.

Dispersion	A	B	C	D (2n)	D (3n)	E
Total	0.092	0.099	0.094	0.122	0.166	0.062
Inter-sites	0.074	0.005	0.005	0.098	0.022	0.005
Intra-sites	0.018	0.094	0.089	0.024	0.145	0.057
Intra-sites proportion	19.4%	95.0%	94.7%	19.6%	86.9%	92.3%

Table VII: Allelic and genotypic basic statistics for the five main groups. Group D is separated between diploids and triploids because it is the only case where they are only found in allopatry. All the genotypic and allelic values are weighted to account for the different number of individuals sampled for each group and the ploidy level.

	A	B	C	D (2n)	D (3n)	E
Ploidy						
Reduction (2n)	0	1	0	-	-	2
Elevation (4n)	1	1	2	0	0	3
Alleles J						
Sum (8 loci)	21.28	18.90	19.01	20.62	28.00	18.24
Mean	2.660	2.362	2.376	2.578	3.500	2.280
Genotypes J (8 loci)	5.469	3.789	4.507	6.943	9.000	3.768
Ratio alleles/genotypes J	3.891	4.987	4.217	2.970	3.111	4.840
Alleles LJ						
Sum (10 loci)	45.66	54.49	59.36	40.94	69.00	51.60
Mean	4.566	5.449	5.936	4.094	6.900	5.160
Genotypes LJ (10 loci)	10.844	11.053	16.142	8.485	13.000	15.580
Ratio alleles/genotypes LJ	4.210	4.930	3.678	4.825	5.308	3.312
Ratio LJ/J						
Genotypes	1.983	2.917	3.582	1.222	1.444	4.135
Allelic sum	2.146	2.884	3.123	1.985	2.464	2.829
Allelic mean	1.717	2.307	2.498	1.588	1.971	2.264

Epigenetic variation

A total of 134 individuals of various ploidy levels, origin of sampling and main genetic association have been analyzed for their methylation pattern. 52 loci were kept for analysis, of which 37 were variable and 31 were informative.

According to their methylation pattern, the individuals mostly clustered according to their genetic groups described above (Figure 5). Confidence ellipses (75%) indicate that individuals are also different according to sampling sites. Variance partitioning on all individuals confirms these trends (see Table 8): global effect of genetics is high (46.2%) and similar to global effect of environment (42.9%). Ploidy level has a smaller effect of 3.96%. Pure effect are considerably smaller, but significant and similar for genetics and environment, and lower for ploidy (Table 8). The genetic effect is strong when all individuals are analyzed together, but it appears to be caused by the affiliation to a given main genetic group, because the genetic effect is not significant within the genetic groups, except for the group C (Table 9). Interaction between genetics and environment (34.9%) mostly contribute to the high global effect observed for the two variables.

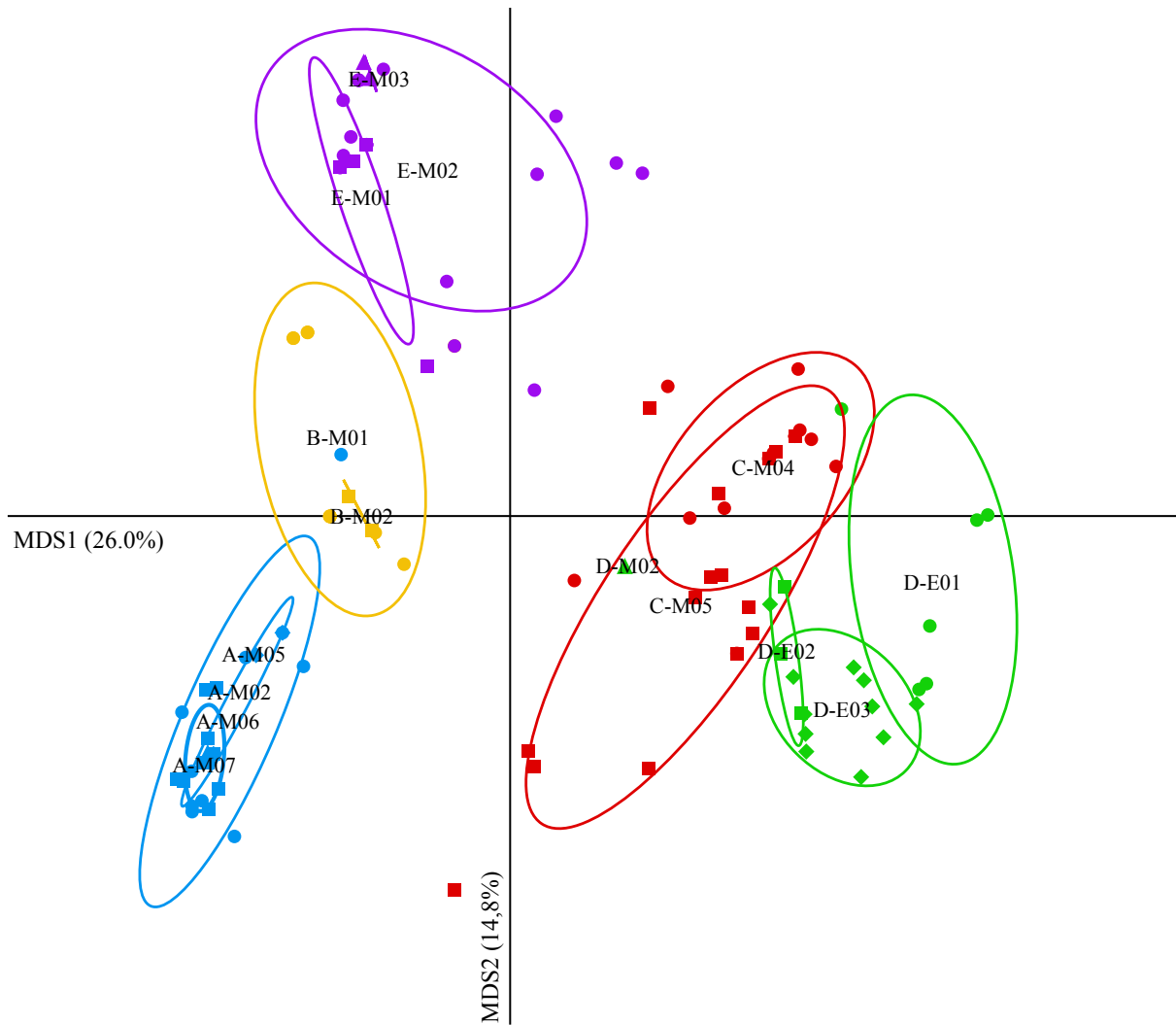


Figure 5: Principal coordinates analysis of the distribution of hybrid individuals according to their epigenetic pattern. Color represents each main genetic group (according to the four multimodal J-loci *AmaD42*, *AjeD378*, *AjeD23*, *AjeD13*), and the form-color combination represents the sampling site origin. The sampling site and genetic group combinations are represented by the ellipses, and are indicated at the center of each ellipses by the letter of the genetic group and the site code separated by a dash. Percentage of representativity of axes 1 and 2 (on 35 axes) are indicated aside.

Table VIII: Variance partitioning results for epigenetic data of individuals according to genetics, sampling site and ploidy level data.

	Ajusted R-square	p-value	Ajusted R-square	p-value
	Global effect		Pure effect	
Genetics	0.46184	< 0.001	0.09131	< 0.001
Sampling site	0.42893	< 0.001	0.04703	< 0.001
Ploidy level	0.03962	< 0.001	0.01269	< 0.001
	Interactions		Residuals	
Genetics-Sampling site	0.34948	NA		
Sampling site-Ploidy level	0.00588	NA		
Ploidy level-Genetics	0.00000	NA		
All three factors	0.02655	NA	0.47257	NA

The environmental effect is not the same for all main genetic groups (Table 9). Only three groups have a significant global effect for the sampling sites: groups A (6.6%), C (4.0%) and D (21.8%). The global effect includes also the shared effect of the ploidy level and the little genetic variations within a group. Only two groups have a significant pure effect for the environment: A (6.3%) and D (9.3%). The non-significant pure effect for the C group could have been due to confounding effect between genetics and sampling site, given the fact that the C group has higher genetic variability than the A or D-2n groups. However, a subsequent analysis using only the clonal individuals of the C group (4 from M04 and 5 from M05) reveals that the environmental effect is not significant for the clones of this group: pure environmental effect for this subsample is 0.015 (p-value = 0.691). When genetic variation and ploidy levels are taken into account, environmental effect is only significant for groups composed of strict gynogens taken together (A and D-2n), with 0.060 (p-value < 0.001), whereas it is not significant for all kleptogenetic groups taken together (B, C, and E), with 0.004 (p-value = 0.247).

Table IX: Environmental and genetic effect on the epigenetic pattern of hybrid individuals. Effects for each main genetic group determined by the four multimodal J-specific loci are listed.

Genetic group	Environmental effect	Ajusted R-square	p-value	Genetic effect	Ajusted R-square	p-value
A	partial	0.06328	0.018 *	partial	0.00000	NA
	total	0.06555	0.008 **	total	-0.00192	0.422
B	partial	0.00000	NA	partial	0.20549	0.156
	total	0.02922	0.184	total	0.17976	0.152
C	partial	0.00220	0.367	partial	0.23286	0.001 ***
	total	0.03991	0.016 *	total	0.24028	0.001 ***
D	partial	0.09327	0.001 ***	partial	0.01118	0.416
	total	0.21813	0.001 ***	total	0.08059	0.072
E	partial	-0.05478	0.894	partial	0.01441	0.422
	total	0.02901	0.151	total	0.12318	0.081

Discussion

A single origin of the J-haplomes

Five genetically distinct groups of individuals were detected in this study. Both microsatellite loci and AFLP supported these groups while groups are very similar at several microsatellite loci and revealed very low variation at AFLP. Such pattern suggests these genetic groups originate from the same ancestral lineage, and carry different derived versions of the same ancient J haplome. Several studies have focused on the origin of the unisexuals of the *Ambystoma* complex. According to the mitochondrial genome, all unisexual individuals came from a unique very ancient hybridization event (Bi & Bogart 2010). However, since this event, several genome replacement events occurred leading to a large diversity of genomic composition between *A. laterale*, *A. jeffersonianum*, *A. texanum* and *A. tigrinum* (Bonen *et al.* 2007).

Even if the mitochondrial genome was not studied in the present study, the finding that the sampled individuals come from a recent coalescing event is consistent with the results of those previous studies on mitochondrial DNA (Kraus & Miyamoto 1990; Spolsky *et al.* 1992a; Robertson *et al.* 2006). However, given the high variability of the nuclear genome across the distribution of the unisexuals, it seems surprising to find that all individuals in southern Québec share a single J haplome. The genetic similarity and the small geographic range of A, B, C and E groups found in Montréal suggests that these groups likely diverged recently, but prior to postglacial colonisation. Indeed, the divergence between A, B, C, and E groups is not higher than the divergence between those groups and the D group, despite the fact that the D group is found much further in eastern Québec. In the absence of *A. jeffersonianum* in the sampled area, the J-haplome is thought to be transmitted clonally. When compared to a widespread clonal lineage of the complex *Chrosomus eos-neogaeus* derived from a hybridization that occurred during the Pleistocene, the same pattern is observed: there is more divergence among groups than among sites, indicating that divergence occurred before colonisation (Angers & Schlosser 2007).

Prevalence of genome replacement

Considering the L loci, all groups show a similar level of intra-group variation. However, there is a clear demarcation in the distribution of this variation: for A and D-2n groups, the genetic diversity is mostly found among populations, characteristic of isolated clonal populations. On the other hand, the genetic diversity of groups B, C, D-3n and E, is mainly found within populations and suggests that additional mechanisms than punctual mutations are creating genetic variation.

The groups A and D-2n have a very low intra-site variation, most likely due to mutations since the different genotypes of a same location are separated by only one mutation step. The partition of genetic variation is clearly different among genetic groups. Despite their low diversity, groups A and D-2n display a major proportion of their genetic diversity among sites suggesting accumulation of mutation in isolated populations. Moreover, none of these groups display the highly divergent alleles found in the populations of parental species. Therefore, those groups seems to exclusively reproduce clonally by gynogenesis.

In the all-diploid population (E01 and E02, composed only of D-individuals), no *A. laterale* individual have been found, despite an important sampling effort particularly in the E01 population (personal communication from Patrick Labonté, Environment Canada). It has been argued that those populations could use the sperm of *A. maculatum* to trigger the egg development, instead of *A. laterale* (Noël *et al.* 2011). Experiment using *A. maculatum* as a sperm donor showed that the sperm of this species could activate egg development, but if the male genome was incorporated, the embryos were not viable (Bogart *et al.* 1989). Therefore, the obligatory gynogenesis of the D-2n groups might be due to ecological reasons.

Interestingly, none of the hybrids of the group A displayed highly divergent alleles, although the frequency of those alleles was frequently observed in the sympatric *A. laterale* populations. Since there is no indication of genetic exchange with the parental species, the rate of genome replacement must be null within the group A. Indeed, all individuals from the A group are highly similar one to each other, no matter if they come from uniform population (M06, M07) or very disparate ones (M02, M04 and M05).

Individuals from the group A were also in sympatry with the groups B and E in the M02 population. Since individuals of the groups B and E of this site seem to have acquired those highly divergent alleles by kleptogenesis, it is possible to assume that the lack of exchanges between the group A and the sympatric populations of *A. laterale* is not related to ecological conditions as expected for diploid hybrids from group D. The only sperm donor in the Montréal populations seems to be *A. laterale*, because *A. jeffersonianum* is not found in Québec and no *A. maculatum* has been found in this region (sampling of the present study, A.A.R.Q. (2009)). It seems that the group A reproduce exclusively by gynogenesis due to some genomic conditions. Ploidy elevation is viable since one tetraploid individual was found, but it is possible that ploidy reduction is either impossible to achieve, or nonviable. Another explanation could be that individual of this group could have loss the capacity to produce reduced eggs.

The punctual presence of highly divergent alleles found in AmaD42-L and AjeD94 loci could also hardly be explained by mutation steps. Since those alleles correspond to some of the most frequent alleles in LL corresponding population, it seems that the presence of those highly divergent alleles in some hybrids is due to genetic exchange with their local pure-LL populations. The groups with higher genetic diversity within sites than among sites are also the

same that displays the highly divergent alleles. These results suggest that genome replacement is at least one of the mechanism responsible for intra-site variation for the groups B, C, D-3n and E. Genome replacement is also a mechanism suggested by other authors who studied the similarity between unisexuals and local parental species populations (Bonen *et al.* 2007; Bogart & Klemens 2008; Ramsden 2008; Bogart *et al.* 2009). They also found a surprising allelic diversity within population (Ramsden 2008) or even within clutch (Bonen *et al.* 2007), which is not concordant to an exclusive gynogenetic mode of reproduction.

Independent ploidy modification from a given genotype may be invoked to explain the observed variation. However, the very low abundance of diploid as well as tetraploid individuals in most populations makes this hypothesis unlikely to explain all the intra-group genetic diversity alone.

Another hypothesis to explain the nuclear diversity of the complex *Ambystoma* was proposed by (Bogart & Bi 2013). The occurrence of rare symmetric tetraploids (LLJJ) which would produce reduced eggs (LJ) by a regular meiotic process, without any premeiotic endoduplication, could be responsible for the haplome diversity found in this complex. The symmetric tetraploid would be created from a triploid individual that would include the haplome of the parental species in minority in its genome (eg. LJJ + L), therefore explaining the similarity with local parental populations. This explanation is, however, unlikely in the present case, given the fact that all triploids are LLJ and *A. jeffersonianum* is absent from the sampled area.

The two populations with substantial amount of hybrid individuals sampled by Noël *et al.* (2011) were exclusively formed with hybrids from the clonal groups, A (M06 population) and D-2n (E01 population), leading to the impression that unisexuals populations in Québec do not reproduce by kleptogenesis.

Epigenetic variation

Given the presence of both clonal gynogens and genetically diverse kleptogens, methylation pattern of individuals in two different reproductive cases were tested. Because the clonal populations have absolutely no opportunity to create phenotypic variation with genetic variation but are still found in several locations, one would expect they use alternative way to generate phenotypic variation.

Environment and genetics both had a strong and equivalent effect on epigenetic patterns. It is not so surprising that genetics drives the distribution of epigenetic variation. It is well known that genetics regulate epigenetic marks (Bender 2004; Bossdorf *et al.* 2008). Some epigenetic marks are regulated only by genetics. For those obligatory marks, there is a complete correlation between genetic variation and epigenetics (Richards 2006). Examples of obligatory marks concern genes that can be preceded by a transposons. The presence of the transposon is the only factor that determines whether the downstream gene is methylated or not (Richards & Elgin 2002). Other epigenetic marks are facilitated by genetic variation (Richards 2006). In those cases, genetic variation simply increases the probability that a given facilitated epigenetic mark is present or not. If plasticity is involved, it also make sense that the gene expression is influenced by the nature of the genes itself.

It is also well-known that the environment influence epigenetic response (Bossdorf *et al.* 2008; Richards 2008). In the present study, the environment was simply represented by the sampling site, since the individuals were sampled in the reproductive ponds. A direct correlation between epigenetic pattern and sampled environmental conditions was avoided because of the potentially high ecological variation among years for some small ponds. Epigenetic marks are highly sensitive during the development of organisms, since the development is coordinated by epigenetic responses to cellular environment, as change of concentration or nature of surrounding nutrients (Paldi 2003). Several ecological factors in the breeding ponds could interact with epigenetics during this critical period, such as resources availability and larvae density, predation, the presence of some pollutant or diverse concentration of ions and pH, the fluctuating level of the water, and others. Although epigenetics is more sensible during development, epigenetic marks remains reversible and some tend to be sensible to environment during all the life time of an organism (Fraga *et al.* 2005). For the *Ambystoma* hybrids, a life-time sensibility could mean that they are also sensible to their adult environment: the forest soil.

It is nevertheless interesting to note the strong shared effect between genetics and environment on epigenetic patterns. Since the samples are from wild populations and do not represent all environment-genetics combinations (a same genetic group tend to dominate a given population), a part of the important shared effect of genetics and environment might be explained by a confounding effect. However, all main genetic groups were found in more than

one location. Therefore, the important shared effect between genetics and environment could also represent the biological interaction between the two factors. A same genotype does not have the same epigenetic response in two different environments, and two different genotypes do not necessarily have an identical epigenetic response in the same environment (Stearns 1989).

The environmental effect was indeed not the same for all the five genetic groups, for the global as well as for the pure effect. The pure environmental effect is interesting, because it takes into account the finer genetic variation and the ploidy level. Only the gynogenetic groups, A and D-2n, have a significant pure environmental effect. The other groups appear to cluster by sampling site in the PCoA (Figure 5), but this effect is mixed with a higher genetic variation within group. The only other group with a global significant effect for environment, group C, has no pure environmental effect when only clonal individuals are analyzed together to remove any confounding effect between environment and genetics.

A higher epigenetic variation according to sampling site is observed in the groups with a potentially exclusively clonal mode of reproduction, whereas such environmental sensitivity is not observed in the kleptogenetic groups. The kleptogenetic groups have the advantage of having both genetic and epigenetic variation to create phenotypic variation. A better potential for epigenetic variation might be the key to allow clonal groups to compete with kleptogenetic groups (Castonguay & Angers 2012).

The idea of a compensation for a low genetic variation in order to generate phenotypic variation is not new (Jain 1978; Zangerl & Bazzaz 1983; Silander 1985; Macdonald & Chinnappa 1989). Since epigenetics is the mechanism underlying phenotypic plasticity (Newman & Müller 2000; Aubin-Horth & Renn 2009; Castonguay & Angers 2012; Verhoeven & Preite 2013), it is possible to explain the present results with a similar reasoning: epigenetics could compensate for an absence of genetic variation by creating the phenotypic diversity necessary to cope with environmental change.

Other authors argue that no relationship exists between phenotypic plasticity and genetic diversity since those are both traits that behave independently, in order to cope with different levels of environmental changes (Moran *et al.* 1981; Hume & Cavers 1982; Scheiner & Goodnight 1984; Counts 1993; Stewart Jr & Nilsen 1995). However, the later hypothesis may

not apply to organisms with a lower genetic potential. Since such organisms rely only on other mechanisms than genetic diversity to generate phenotypic variation, selection would have favored lineages with a strong potential for alternative sources of phenotypic variation. Macdonald & Chinnappa (1989) have argued that the survival of organisms with very low genetic variation rely on their high capacity for phenotypic plasticity.

Stochasticity may also contribute substantially to generate various phenotypes from a same genotype. The high residual epigenetic variation observed could be explain by the environmental effect of the particular ecological niche used by each individual, but could also be explained by random epimutations. Epigenetic marks also tend to have a high epimutation rate (Bossdorf *et al.* 2008) and could therefore induce stochastic variation in epigenetic patterns and resulting phenotypes.

Conclusion

The objective of this study was to assess the relative importance of genetic and epigenetic variation in a kleptogen vertebrate; the unisexual hybrids of the *Ambystoma laterale* complex. Genetic analysis revealed that both kleptogenetic and exclusively gynogenetic individuals were found in southern Québec. When genetic variation and ploidy level were taken into account, the environmental effect on epigenetic pattern was significant only for the exclusively gynogenetic individuals.

Clonal individuals only rely on epigenetic variation to generate phenotypic variation and cope with environmental changes. Kleptogens are able to create genetic variation by replacing one of their genome with a genome from a sexual species. Therefore, like sexual organisms, they have at their disposal both genetic and epigenetic variation, as well as their potential interactions. On the other hand, clonal individuals must be able to make the most from their epigenetic variation potential. Epigenetic variation leads to phenotypic diversity by phenotypic plasticity or developmental stochasticity. Clones that have survived and faced the competition with the other unisexuals or with the parental species in various environments must have the ability to get more out of their potential for phenotypic variation via epigenetics.

Whether they are asexual or not, F1 hybrids have the advantage of having at least two genomes derived from different species, and therefore suited for two different ecological niches.

Although polyploidy brings its share of disadvantages, polyploid individuals have the advantage of having more alleles per genes, and therefore more epigenetic options. Polyploid hybrid can palliate to their lack of genetic variation by having a maximised potential for epigenetic variation. All those characteristics make kleptogen individuals competitive across time and various environments.

Acknowledgments

We are grateful to James Bogart, François-Joseph Lapointe, Sarah Noël and Patrick Labonté for sharing valuable information and DNA samples on *Ambystoma* hybrid complex. We thank Clement Coupé for laboratory assistance. We are also grateful to Martin Savard (Parc de la Rivière Batiscan), Alain Mochon (Parc national de la Yamaska) and others who helped or allowed access for sampling. This study was founded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the Fonds de recherche du Québec : nature et les technologies (FRQNT).

Discussion

1. Origine des unisexués au Québec

Les analyses des données de microsatellites et d'AFLP ont révélé que les unisexués du Québec avaient une plus grande diversité génétique que ce qui avait été relevé précédemment dans l'étude de Noël *et al.* (2011). La diversité génétique n'augmente pas avec la distance, comme on pourrait s'y attendre si les hybrides avaient divergé localement. La majorité de la diversité génétique se retrouve à Montréal, comparativement aux sites plus à l'est du Québec qui sont étroitement apparentés malgré la distance. Les individus échantillonnés se répartissent en cinq grands groupes principaux, qui sont constants avec les deux méthodes. Le fait que la répartition de ces groupes ne concorde pas avec leur divergence indique qu'ils auraient divergé avant la colonisation postglaciaire du territoire.

Étant donné que l'espèce *A. jeffersonianum* est absente au Québec (Bogart et Klemens 2008), l'haplome J des unisexués échantillonnés se transmet de façon clonale par gynogénèse depuis leur établissement sur le territoire. L'analyse de l'haplome J à l'aide de loci spécifiques a permis de déterminer combien d'individus *A. jeffersonianum* avaient contribué au génome des individus échantillonnés. La forte concordance entre plusieurs loci J-spécifiques ainsi que la faible divergence entre les patrons d'AFLP indiquent que la différence entre les groupes n'est pas due à la présence de cinq haplomes J provenant d'individus distincts. Les cinq groupes auraient plutôt dérivé à partir d'un même haplome J ancestral, qui aurait accumulé des mutations avec le temps. Les individus du Québec proviennent d'un même ancêtre hybride, en dépit de la propension de ce complexe à faire du remplacement de génome.

La dérive des cinq groupes à partir de l'hybride ancestral ne semble toutefois pas avoir eu lieu localement. Le degré de divergence entre les groupes retrouvés à Montréal est en effet similaire à celui du groupe retrouvé beaucoup plus loin dans l'est du Québec. De plus, la distance entre les cinq groupes d'unisexués *Ambystoma* du Québec est supérieure à celle retrouvée entre les groupes d'un autre complexe d'unisexués retrouvé sur le territoire, les hybrides du complexe *Chrosomus eos-neogaeus*, qui ont pourtant divergé depuis le pléistocène (Angers et Schlosser

2007). La dérive des cinq groupes *Ambystoma* aurait donc vraisemblablement eu lieu bien avant la colonisation du territoire.

2. Diversité génétique des unisexués

La diversité génétique totale des unisexués va cependant au-delà de la seule divergence entre les cinq groupes génétiques principaux. Lorsque les allèles L-spécifiques sont pris en compte, on observe une grande variation génétique au sein des cinq groupes.

Cette variation génétique supplémentaire peut être attribuée en partie aux forts taux de mutation des microsatellites (Ramsden 2005). Généralement, on s'attend à ce que la variation génétique attribuable aux mutations soit typiquement plus élevée entre les sites qu'à l'intérieur d'un même site. En comparant les proportions de la dispersion des génotypes inter-sites et intra-site, uniquement deux groupes présentaient une plus grande proportion de la variation située entre les sites plutôt qu'au sein d'un même site. Un de ces groupes était majoritairement composé de triploïdes, alors que l'autre était composé exclusivement de diploïdes, ce qui est très rare chez les unisexués du complexe *Ambystoma* (Lowcock et Bogart 1989; Bogart et Klemens 2008). Les autres groupes d'unisexués présentent une situation inhabituelle par rapport à ce qui serait attendu si la diversité était due seulement à des mutations : l'essentiel de la variation génétique se trouve à l'intérieur d'un même site, et non pas entre les sites.

Le remplacement de génome permettrait d'expliquer une telle situation. Les groupes diversifiés au sein d'un même site sont également génétiquement similaires aux populations de l'espèce parentale *A. laterale* retrouvées en sympatrie. Le remplacement de génome a déjà été utilisé afin d'expliquer la forte ressemblance entre les populations d'unisexués et les populations parentales en sympatrie observée dans d'autres régions de l'aire de répartition des unisexués (Lowcock et Bogart 1989; Bonen *et al.* 2007; Bi *et al.* 2008; Ramsden 2008; Bogart *et al.* 2009). Au-delà de la simple ressemblance entre des populations sympatriques, la présente étude renforce toutefois la théorie du remplacement de génome chez cet organisme de façon beaucoup plus solide en raison de la présence d'allèles hautement divergents retrouvés en forte proportion dans les populations d'espèce parentale et uniquement chez les groupes présumés kleptogènes.

Il est toutefois surprenant que ce ne soit pas tous les groupes qui fassent du remplacement de génome. Dans le cas du groupe uniquement clonal et diploïde retrouvé dans l'est du Québec,

la raison de leur mode de reproduction exclusivement gynogène s'expliquerait par des raisons écologiques : l'absence des espèces parentales habituelles, *A. laterale* et *A. jeffersonianum*, forcerait les unisexués à utiliser le sperme d'une espèce voisine, *A. maculatum*. L'intégration du génome de cette dernière espèce serait extrêmement rare et ne produirait pas de descendant viable (Bogart *et al.* 1989), ce qui explique pourquoi les individus seraient forcés de se reproduire uniquement par gynogénèse.

En revanche, le mode de reproduction exclusivement gynogénétique du groupe retrouvé à Montréal ne s'explique pas par des raisons écologiques. En effet, des individus de ce groupe se retrouvent en sympatrie avec des individus kleptogènes. Il a déjà été démontré que la fréquence du remplacement de génome dépendait de la température (Bogart *et al.* 1989), ainsi que de l'espèce sexuée qui fournit le sperme (Bogart *et al.* 1989; Bi *et al.* 2009). Selon cette présente étude, il semblerait également que la prévalence du remplacement de génome dépendrait du génome lui-même. Il est possible que le groupe non kleptogène retrouvé à Montréal ait perdu la capacité de produire des œufs réduits. Il est aussi possible que le remplacement de génome ne soit plus viable chez ce groupe.

3. L'organisation de la variation épigénétique

3.1. Effet de la génétique et de l'environnement

La génétique et l'environnement sont les deux facteurs qui influençaient le plus la variation épigénétique des unisexués, tous groupes confondus. Les marques épigénétiques comme la méthylation se liant à des sites spécifiques sur l'ADN (Bender 2004; Bossdorf *et al.* 2008), il n'est pas surprenant que la génétique ait un effet aussi important sur l'épigénétique. L'appartenance au groupe génétique était principalement déterminante de la variation génétique. Des variations dans la nature de l'information génétique peuvent en effet influencer l'expression des gènes (Richards 2006).

Comme plusieurs études l'ont démontré auparavant avec divers organismes, l'épigénétique est également influencée par l'environnement (Wolff *et al.* 1998; Cooney *et al.* 2002; Paldi 2003; Weaver *et al.* 2004; Fraga *et al.* 2005; Cropley *et al.* 2006; Pavet *et al.* 2006; Boyko *et al.* 2007; Kucharski *et al.* 2008; Matsumoto *et al.* 2013). Les unisexués du complexe

Ambystoma ne semblent pas y faire exception. La proportion expliquée par l'environnement est en effet similaire à celle expliquée par la génétique. L'influence directe de plusieurs facteurs environnementaux pourrait être étudiée, comme la densité larvaire, la prédation, la nature et la concentration de certains ions ou polluants, la variation plus ou moins importante du niveau de l'eau, et d'autres.

Il est également possible qu'il y ait une forte interaction biologique entre le génotype d'un individu et l'environnement. Différents génotypes ne produisent pas nécessairement le même phénotype dans un même environnement et un même génome peut également produire différents phénotypes dans différents milieux (Stearns 1989). Ainsi, il est possible que les génotypes aient différentes normes de réactions dans divers environnements. Des dispositifs expérimentaux contrôlés permettraient de voir par exemple quelle serait la norme de réaction des kleptogènes par rapport aux gynogènes exclusifs. On s'attendrait d'obtenir une norme de réaction plus étendue chez les gynogènes, puisque ceux-ci ont été retrouvés sur plusieurs sites différents et ne dépendent que de l'épigénétique pour s'acclimater aux différents milieux.

En effet, l'effet pur de l'environnement est significatif uniquement chez les gynogènes exclusifs. Les individus de ces groupes ne disposent que de la variation épigénétique pour générer de la diversité phénotypique. Puisque ces groupes semblent assez anciens, il est fort probable que leur survie et leur établissement dans divers habitats soient dus à une bonne capacité de variation épigénétique en fonction de l'environnement (Castonguay et Angers 2012). On s'attendrait donc à ce que les groupes gynogènes exclusifs soient davantage plastiques et aient une plus large norme de réaction que les individus kleptogènes, pour qui la pression de sélection est moins forte sur leur potentiel épigénétique, puisqu'ils disposent également d'une certaine variation génétique.

3.2. Effet de la ploïdie

L'effet du niveau de ploïdie n'a pas été abordé en détail dans l'article, puisque ce n'était pas un élément essentiel pour répondre à l'objectif. La ploïdie avait cependant un certain effet sur la variation épigénétique, bien qu'il soit bien moindre en comparaison avec l'effet de la génétique et de l'environnement.

Cet effet pourrait être dû à la possibilité ou au besoin de réguler différemment les allèles supplémentaires (Otto et Whitton 2000). Ce ne sont pas tous les organismes qui tolèrent un niveau de ploïdie supplémentaire, puisque cela entraîne des produits de gènes additionnels qui peuvent être difficilement supportés par l'organisme (Otto et Whitton 2000; Park et Kuroda 2001; Madlung 2013). Certains organismes vont pallier à ce problème en réprimant l'expression d'un haplome en entier. C'est notamment le cas de la compensation de dose chez les mammifères, où le X supplémentaire chez les femelles est fortement réprimé épigénétiquement, afin de maintenir un niveau d'expression similaire aux mâles (Park et Kuroda 2001). Le faible effet de la ploïdie sur l'épigénétique relevé dans la présente étude ne tend cependant pas à indiquer que les unisexués du complexe *Ambystoma* gèreraient les niveaux de ploïdie plus élevés en réprimant un chromosome ou un haplome en entier.

Il est possible que la gestion des allèles supplémentaires se fasse à la pièce, et soit plutôt gène-dépendante. Ce type de régulation de la polyploïdie se trouve chez le poisson *Squalius alburnoides* (Pala *et al.* 2008; Pala *et al.* 2010). En fonction du biotype et de l'organe, les gènes peuvent avoir une expression mono-allélique ou bi-allélique, dépendamment de l'origine de l'allèle réprimé. Dans certains cas, on observait une répression de l'allèle spécifique minoritaire, alors que dans d'autres cas, il y avait répression d'un des allèles spécifiques en double copie. Cette gestion à la pièce a le potentiel de générer de la variation phénotypique supplémentaire, ce qui se traduirait par un avantage compétitif des polyploïdes. En effet, chez les unisexués du complexe *Ambystoma*, la forte dominance du biotype triploïde pourrait témoigner d'un tel avantage compétitif. Tester cette hypothèse impliquerait par exemple de comparer des normes de réactions d'individus appartenant au même groupe génétique et présents dans les mêmes environnements mais ayant divers niveaux de ploïdie. On s'attendrait à une plus grande plasticité de la part des polyploïdes, puisqu'ils disposent en principe d'options supplémentaires pour chacun de leurs gènes.

4. Compétitivité des unisexués du complexe

Les unisexués du complexe de la salamandre à points bleus présentent diverses caractéristiques habituellement considérées comme nuisibles à l'organisme, mais qui se révèlent présenter également des atouts pour leur compétitivité.

4.1. L'hybridation

D'abord, l'hybridation a souvent été présentée comme un facteur diminuant la valeur adaptative d'un organisme (Burton 1990). L'agencement hasardeux de génomes bien distincts n'est pas toujours gage d'une bonne performance de l'organisme. Cependant, les unisexués du complexe *Ambystoma* persistent depuis plusieurs générations (Bi et Bogart 2010) et arrivent à se tailler une place non négligeable aux côtés des espèces sexuées parentales, qui sont souvent beaucoup plus rares dans les populations où les deux organismes coexistent (Bogart et Klemens 2008). Leur mode de reproduction, qu'il soit kleptogénétique ou gynogénétique, leur permet de se maintenir toujours en F1, et donc d'éviter la détérioration de la valeur adaptative des hybrides de générations subséquentes (Birchler *et al.* 2006; Charney 2012). La présence de deux génomes issus d'espèces différentes et adaptés à des niches écologiques distinctes leur permet de disposer de plusieurs options pour faire face à un large éventail de conditions environnementales (Schultz 1969; Rolan-Alvarez *et al.* 1997; Arnold *et al.* 2001), qu'ils peuvent réguler avec l'épigénétique.

4.2. Reproduction unisexuée

Ensuite, l'absence ou le faible taux de reproduction sexuée est souvent associée à une brève persistance des organismes (Muller 1964; Crow 1994). Les organismes clonaux accumulent des mutations qu'ils ne peuvent purger et qui finiraient par causer leur disparition (Muller 1964). Même chez les organismes sexués, la faible diversité génétique d'une population est considérée comme une condamnation à l'extinction (Lande 1988; Frankham 2005). Les unisexués du complexe *Ambystoma* perdurent cependant depuis plusieurs dizaines de milliers d'années (Bi et Bogart 2010). Bien qu'il ne soit qu'occasionnel, l'apport de nouveaux haplomes leur confère un avantage important en leur permettant de renouveler leur génome grâce à de l'ADN d'espèce sexuées (Bonen *et al.* 2007; Charney 2012; Bogart et Bi 2013). Ce type de stratégie est également utilisé chez les bactéries (Thomas et Nielsen 2005), qui s'échangent du matériel génétique entre souches ou entre espèces malgré une reproduction clonale, ou encore chez les rotifères (Gladyshev *et al.* 2008) et les tardigrades (Boothby *et al.* 2015), qui incorporent du matériel génétique provenant d'autres individus ou organismes. La reproduction principalement asexuée leur permet toutefois de bénéficier des avantages démographiques (Maynard Smith 1978). Les coûts liés à la reproduction sexuée incombent donc majoritairement

aux espèces sexuées à qui ces organismes « volent » le génome (Charney 2012; Bogart et Bi 2013). Pour ces organismes principalement asexués, les désavantages de l'asexualité sont donc compensés efficacement par des échanges génétiques occasionnels et le potentiel de répression épigénétique des mutations délétères.

4.3. Polyploidie

Finalement, la polyploïdie est souvent associée à plusieurs désavantages (Comai 2005). Elle n'est pas viable chez un très grand nombre de vertébrés, dont les mammifères (Orr 1990; Wertheim *et al.* 2013). Peu d'organismes tolèrent une soudaine augmentation de produits de gènes après plusieurs générations de stricte diploïdie. La réplication d'une plus grande quantité d'ADN limite également la vitesse de développement (Comai 2005). Chez les unisexués *Ambystoma*, la polyploïdie est plus particulièrement associée à une plus grande mortalité embryonnaire et larvaire ainsi qu'à un retard à l'éclosion et à la métamorphose (Bogart et Licht 1986; Elinson *et al.* 1992; Phillips *et al.* 1997). Certains organismes, sans toutefois tolérer la polyploïdie, parviennent à en limiter les effets néfastes en inhibant la production des gènes supplémentaires (Beçak et Pueyo 1970; Pala *et al.* 2008). Dans la mesure où les unisexués du complexe pourraient utiliser une stratégie de compensation gène-dépendante, ils pourraient donc profiter de leur polyploïdie en disposant de plusieurs allèles et donc de plusieurs options pour un même gène (Comai 2005; Madlung 2013). Une telle stratégie expliquerait pourquoi les triploïdes sont considérablement plus abondants que leurs homologues diploïdes dans le complexe *Ambystoma* (Lowcock et Bogart 1989), en dépit des désavantages associés à la polyploïdie.

5. Les stratégies pour pallier aux changements environnementaux

5.1. Le sexe

Il a été vu que la réorganisation du matériel génétique permet de générer une importante diversité phénotypique (Crow 1994; Lande et Shannon 1996; Barton et Charlesworth 1998), qui pourra ensuite être soumise à la sélection afin d'obtenir des organismes adaptés à leur environnement. Les salamandres unisexuées du complexe *Ambystoma* introduisent à l'occasion de nouveaux allèles dans le système via la kleptogénèse, par remplacement de génome à partir

d'œufs réduits (Bonen *et al.* 2007; Bi *et al.* 2009). Ce mode de reproduction leur permet de diversifier leur matériel génétique et leur potentiel de variation phénotypique. De plus, l'intégration d'un haplome issu directement d'une espèce sexuée leur permet de diminuer les risques associés au cliquet de Müller en intégrant des chromosomes pour lesquels les mutations délétères ont pu être purgées grâce à plusieurs générations de recombinaison méiotique sans assumer les coûts de la reproduction sexuée (Charney 2012; Bogart et Bi 2013). Un mode de reproduction reposant principalement sur l'hybridogénèse est également considéré comme un facteur contribuant à la persistance et au succès écologique du complexe hybride *Squalius alburnoides* (Pala *et al.* 2010). L'intégration de matériel génétique provenant d'espèces sexuées contribue également à la versatilité d'organismes à reproduction principalement asexuée, comme les rotifères (Gladyshev *et al.* 2008), les tardigrades (Boothby *et al.* 2015) et les bactéries (Thomas et Nielsen 2005). En effet, la réorganisation du matériel génétique permet à de nouvelles combinaisons adaptatives d'émerger et de produire des phénotypes optimaux pouvant être sélectionnés dans un environnement changeant. La création d'une combinaison à forte valeur adaptative dans un environnement donné dépend cependant uniquement du hasard.

5.2. La plasticité et la flexibilité

En revanche, la plasticité et la flexibilité permettent la production d'un phénotype ajusté aux conditions environnementales dans l'espace d'une même génération. Ces stratégies permettent de limiter le processus d'essai-erreur lorsque les conditions changent, dans la mesure où des phénotypes favorables se trouvent dans la gamme des phénotypes possibles de l'organisme (Jain 1979; Agrawal 2001; Ghalambor *et al.* 2007; Frank 2011). La plasticité et la flexibilité sont toutefois des caractères sous sélection (Jain 1979; Ghalambor *et al.* 2007). Maintenir inutilement des voies alternatives dans un environnement stable peut être coûteux et aurait comme conséquence de défavoriser ces stratégies (Agrawal 2001). Le développement et le maintien d'un génome polyvalent seront toutefois favorisés si l'environnement change trop rapidement pour permettre l'adaptation (Agrawal 2001; Frank 2011). Rappelons que l'épigénétique serait le mécanisme permettant la plasticité (Newman et Müller 2000; Aubin-Horth et Renn 2009; Castonguay et Angers 2012; Verhoeven et Preite 2013), par l'activation ou la répression des différentes voies alternatives en réponse à un signal environnemental (Jaenisch et Bird 2003).

L'hybridation suivie de la maintenance en F1 via la reproduction asexuée, la kleptogénèse ou l'hybridogénèse permet de profiter d'un génome polyvalent. Les combinaisons de gènes adaptées à des niches écologiques distinctes se retrouvent donc dans un même organisme (Anderson 1953). De par leur nature hybride, les unisexués du complexe *Ambystoma* auraient donc la possibilité d'exprimer des allèles de l'une ou l'autre des espèces parentales en fonction de l'environnement. La variation épigénétique dépendante de l'environnement observée dans cette étude pourrait être associée à des mécanismes de plasticité ou de flexibilité. Il reste encore beaucoup de recherche à faire afin de comprendre les voies menant de la réception d'un signal environnemental à l'expression d'un phénotype particulier (Jaenisch et Bird 2003; Verhoeven et Preite 2013). Les gynogènes du complexe *Ambystoma* permettent d'étudier ces processus en contrôlant pour l'influence de la variation génétique. La comparaison avec des kleptogènes permet cependant de comprendre le rôle de la variation génétique en regard de la plasticité phénotypique.

5.3. Le *bet-hedging*

Le *bet-hedging* est une stratégie qui consiste à produire des descendants aux phénotypes diversifiés dans l'espoir que certains phénotypes soient ajustés aux conditions à venir et assurent la survie d'au moins une partie des descendants (Crean et Marshall 2009; Olofsson *et al.* 2009; Müller *et al.* 2013). De la variation épigénétique aléatoire créerait donc une diversité phénotypique supplémentaire chez les descendants (Veening *et al.* 2008). La variation épigénétique n'est donc pas dans ce cas associée à la réception d'un signal environnemental. Cette autre stratégie peut être adaptative si le changement du milieu ne peut être prévu ou perçu par l'organisme (Müller *et al.* 2013).

Bien qu'une partie de la variation épigénétique résiduelle dans la présente étude puisse être liée à la micro-niche écologique occupée par chaque individu, elle pourrait également être due à des épimutations stochastiques qui ne sont pas influencées ni par l'environnement ni par le génome. Les salamandres se développent parfois dans des étangs ou des marécages qui tendent à s'assécher et dont les conditions sont parfois hautement instables. Elles pourraient donc bénéficier d'une stratégie de type *bet-hedging*. Chez les salamandres, un trait sous *bet-hedging* pourrait être notamment la vitesse de développement qui se fait aux dépens de la taille

à la métamorphose. Une stratégie de *bet-hedging* a été relevée chez des branchiopodes qui se développent dans des étangs comparables, instables et susceptibles de s'assécher à tout moment (Simovich et Hathaway 1997). Chez ces branchiopodes, les œufs d'une même femelle ne répondent pas tous au même seuil déterminant leur éclosion. Certains œufs commencent à éclore après la première hydratation suite au remplissage de l'étang par les pluies, alors que d'autres nécessitent un assèchement subséquent puis une seconde hydratation. Cette diversité permet d'éviter que tous les descendants ne meurent avant d'avoir pu se reproduire suite à une période d'hydratation insuffisamment longue (Simovich et Hathaway 1997). La stratégie de *bet-hedging* pourrait donc être explorée chez les salamandres en comparant les profils épigénétiques d'individus issus d'étangs hautement dépendants des pluies à ceux de plans d'eau constamment irrigués. On s'attendrait de voir une plus grande variation épigénétique non expliquée par l'environnement, le génotype ou le niveau de ploïdie chez les individus issus de milieux instables.

Conclusion

La présente étude met donc en relief la relation entre deux sources de variation phénotypique : la génétique et l'épigénétique. Les unisexués kleptogènes du complexe de la salamandre à points bleus diffèrent des unisexués exclusivement gynogènes du même complexe par leur capacité à intégrer du matériel génétique provenant d'une espèce parentale sexuée. Les populations de kleptogènes ont donc un meilleur potentiel de diversité génétique. Cette diversité génétique génère une certaine variation phénotypique qui leur permettrait de persister malgré les changements du milieu et d'occuper une large gamme d'habitat. En revanche, les gynogènes ne peuvent compter sur la diversité génétique pour agir comme source de variation phénotypique. Pourtant, on les retrouve également dans plusieurs habitats différents et, au Québec du moins, ils semblent avoir persisté depuis aussi longtemps que les groupes kleptogènes. Les gynogènes compteraient sur une plus grande variation épigénétique en fonction de l'environnement afin de générer la diversité phénotypique leur permettant de faire face à différentes conditions environnementales. La variation épigénétique compenserait donc pour le manque de diversité génétique des unisexués de ce complexe.

La comparaison des capacités plastiques des gynogènes et des kleptogènes permettrait d'élargir le lien entre la diversité génétique et épigénétique et la variation phénotypique. De plus, la comparaison entre les performances de diploïdes et de triploïdes dans divers milieux permettrait de déterminer si la polyploïdie constitue bel et bien un avantage pour les triploïdes, qui disposeraient de plus d'options que les diploïdes pour un même gène. Finalement, la comparaison de la variation épigénétique résiduelle entre individus provenant de milieux imprévisibles et ceux de milieux stables permettrait de déterminer si la stratégie de *bet-hedging* est utilisée chez ce complexe et si l'épigénétique est un mécanisme permettant cette stratégie.

Pour conclure, mentionnons que les organismes disposent de plusieurs alternatives pour faire face aux changements du milieu, la diversité génétique n'étant que l'une d'entre elles. Condamner prématurément des organismes à l'extinction en raison de leur faible diversité génétique est une approche qui mésestime la complexité du vivant. La polyvalence du génome est également un facteur déterminant dans la persistance et le succès écologiques des organismes.

Bibliographie

- A.A.R.Q. (2009). *Répartition géographique de la salamandre maculée Ambystoma maculatum*. Centre de données sur le patrimoine naturel du Québec : Atlas des Amphibiens et Reptiles du Québec.
- Agrawal AA (2001). Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294(5541):321-326.
- Anderson E (1953). Introgressive hybridization. *Biological Reviews* 28(3):280-307.
- Angers B, Castonguay E, Massicotte R (2010). Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: How to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology* 19(7):1283-1295.
- Angers B, Schlosser IJ (2007). The origin of *Phoxinus eos-neogaeus* unisexual hybrids. *Molecular Ecology* 16(21):4562-4571.
- Arnold ML (2004). Transfer and origin of adaptations through natural hybridization: Were Anderson and Stebbins right? *The Plant Cell* 16(3):562-570.
- Arnold ML, Kentner EK, Johnston JA, Cornman S, Bouck AC (2001). Natural hybridisation and fitness. *Taxon* 50(1):93-104.
- Attwood J, Yung R, Richardson B (2002). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 59(2):241-257.
- Aubin-Horth N, Dodson JJ, Sinervo B (2004). Influence of individual body size and variable thresholds on the incidence of a sneaker male reproductive tactic in Atlantic salmon. *Evolution* 58(1):136-144.
- Aubin-Horth N, Renn SC (2009). Genomic reaction norms: Using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Molecular Ecology* 18(18):3763-3780.
- Balloux F, Brunner H, Lugon-Moulin N, Hausser J, Goudet J (2000). Microsatellites can be misleading: An empirical and simulation study. *Evolution* 54(4):1414-1422.
- Barton NH, Charlesworth B (1998). Why sex and recombination? *Science* 281(5385):1986-1990.
- Baudoin J-P, Mergeai G, Benbouza H, Jacquemin J-M (2007). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Base*.
- Beaumont HJ, Gallie J, Kost C, Ferguson GC, Rainey PB (2009). Experimental evolution of bet hedging. *Nature* 462(7269):90-93.
- Beçak W, Pueyo M (1970). Gene regulation in the polyploid amphibian *Odontophrynus americanus*. *Experimental cell research* 63(2):448-451.
- Bender J (2004). DNA methylation and epigenetics. *Annual Review of Plant Biology* 55:41-68.
- Bi K, Bogart J, Fu J (2009). An examination of intergenomic exchanges in A. Laterale-dependent unisexual salamanders in the genus *Ambystoma*. *Cytogenetic and Genome Research* 124(1):44-50.
- Bi K, Bogart JP (2010). Time and time again: Unisexual salamanders (genus *Ambystoma*) are the oldest unisexual vertebrates. *BMC Evolutionary Biology* 10(1):238.

- Bi K, Bogart JP, Fu J (2008). The prevalence of genome replacement in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* (Amphibia, Caudata) revealed by nuclear gene genealogy. *BMC Evolutionary Biology* 8(1):158.
- Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S (2006). Unraveling the genetic basis of hybrid vigor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(35):12957-12958.
- Bogart J, Bartoszek J, Noble D, Bi K (2009). Sex in unisexual salamanders: Discovery of a new sperm donor with ancient affinities. *Heredity* 103(6):483-493.
- Bogart J, Bi K (2013). Genetic and genomic interactions of animals with different ploidy levels. *Cytogenetic and Genome Research*.
- Bogart J, Licht L (1987). Evidence for the requirement of sperm in unisexual salamander hybrids (genus: *Ambystoma*). *Canadian Field-Naturalist* 101:434-436.
- Bogart JP (1989). *A mechanism of interspecific gene exchange via all-female salamander hybrids*. Dans: Dawley RM, Bogart JP, editors. *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. New York, USA. 170-189.
- Bogart JP, Elinson RP, Licht LE (1989). Temperature and sperm incorporation in polyploid salamanders. *Science* 246(4933):1032-1034.
- Bogart JP, Klemens MW (1997). Hybrids and genetic interactions of mole salamanders (*Ambystoma jeffersonianum* and *A. laterale*) (Amphibia, Caudata) in New York and New England. *American Museum Novitates* no. 3218.
- Bogart JP, Klemens MW (2008). Additional distributional records of *Ambystoma laterale*, *A. jeffersonianum* (Amphibia: Caudata) and their unisexual kleptogens in northeastern North America. *American Museum Novitates* 3627(1):1.
- Bogart JP, Licht LE (1986). Reproduction and the origin of polyploids in hybrid salamanders of the genus *Ambystoma*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 28(4):605-617.
- Bonen L, Bogart JP, Bi K, Fu J, Noble DW, Niedzwiecki J (2007). Unisexual salamanders (genus *Ambystoma*) present a new reproductive mode for eukaryotes. *Genome* 50(2):119-136.
- Boothby TC, Tenlen JR, Smith FW, Wang JR, Patanella KA, Nishimura EO, Tintori SC, Li Q, Jones CD, Yandell M (2015). Evidence for extensive horizontal gene transfer from the draft genome of a tardigrade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*:201510461.
- Bossdorf O, Richards CL, Pigliucci M (2008). Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters* 11(2):106-115.
- Boyko A, Kathiria P, Zemp FJ, Yao Y, Pogribny I, Kovalchuk I (2007). Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants (virus-induced plant genome instability). *Nucleic Acids Research* 35(5):1714-1725.
- Bruvo R, Michiels NK, D'souza TG, Schulenburg H (2004). A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology* 13(7):2101-2106.
- Burton RS (1990). Hybrid breakdown in physiological response: A mechanistic approach. *Evolution*:1806-1813.
- Castonguay E, Angers B (2012). The key role of epigenetics in the persistence of asexual lineages. *Genetics Research International* 2012:534289.
- Charney ND (2012). Relating hybrid advantage and genome replacement in unisexual salamanders. *Evolution* 66(5):1387-1397.

- Clark LV, Jasieniuk M (2011). Polysat: An r package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources* 11(3):562-566.
- Comai L (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6(11):836-846.
- Cooney CA, Dave AA, Wolff GL (2002). Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *The Journal of Nutrition* 132(8):2393S-2400S.
- Counts RL (1993). Phenotypic plasticity and genetic variability in annual *Zizania* spp. Along a latitudinal gradient. *Canadian Journal of Botany* 71(1):145-154.
- Crean AJ, Marshall DJ (2009). Coping with environmental uncertainty: Dynamic bet hedging as a maternal effect. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1520):1087-1096.
- Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI (2006). Germ-line epigenetic modification of the murine avy allele by nutritional supplementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(46):17308-17312.
- Crow JF (1994). Advantages of sexual reproduction. *Developmental Genetics* 15(3):205-213.
- Cuellar O (1976). Cytology of meiosis in the triploid gynogenetic salamander *Ambystoma tremblayi*. *Chromosoma* 58(4):355-364.
- Davey JW, Blaxter ML (2010). Radseq: Next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics* 9(5-6):416-423.
- Dufresne F, Stift M, Vergilino R, Mable BK (2014). Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: An overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Molecular Ecology* 23(1):40-69.
- Elder JF, Schlosser IJ (1995). Extreme clonal uniformity of *Phoxinus eos/neogaeus* gynogens (pisces: Cyprinidae) among variable habitats in northern minnesota beaver ponds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(11):5001-5005.
- Elinson RP, Bogart JP, Licht LE, Lowcock LA (1992). Gynogenetic mechanisms in polyploid hybrid salamanders. *Journal of Experimental Zoology* 264(1):93-99.
- Emberger L, Godron M, Daget P (1968). *Code pour le relevé méthodique de la végétation et du milieu: Principes et transcription sur cartes perforées*: Éditions du Centre national de la recherche scientifique.
- Felsenstein J (2005). *Phylip (phylogeny inference package) version 3.6*. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fernald RD, Hirata NR (1977). Field study of *Haplochromis burtoni*: Habitats and co-habitant. *Environmental Biology of Fishes* 2(3):299-308.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(30):10604-10609.
- Frank SA (2011). Natural selection. II. Developmental variability and evolutionary rate*. *Journal of Evolutionary Biology* 24(11):2310-2320.
- Frankham R (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126(2):131-140.
- Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* 21(3):394-407.

- Ghiselin M (1974). *The economy of nature and the evolution of sex*. Berkeley: University of California Press.
- Gillespie JH, Turelli M (1989). Genotype-environment interactions and the maintenance of polygenic variation. *Genetics* 121(1):129-138.
- Gladyshev EA, Meselson M, Arkhipova IR (2008). Massive horizontal gene transfer in Bdelloid rotifers. *Science* 320(5880):1210-1213.
- Goudet J (2006). *Hierfstat: Estimation and tests of hierarchical f-statistics*. R package version 0.04-4.
- Hedges SB, Bogart JP, Maxson LR (1992). Ancestry of unisexual salamanders. *Nature* 356(6371):708-710.
- Hume L, Cavers P (1982). Geographic variation in a widespread perennial weed, *Rumex crispus*. The relative amounts of genetic and environmentally induced variation among populations. *Canadian Journal of Botany* 60(10):1928-1937.
- Jablonka E, Lamb MJ (1998). Epigenetic inheritance in evolution. *Journal of Evolutionary Biology* 11(2):159-183.
- Jaenisch R, Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33:245-254.
- Jain S (1978). Inheritance of phenotypic plasticity in soft chess, *Bromus mollis* L.(Gramineae). *Experientia* 34(7):835-836.
- Jain S (1979). Adaptive strategies: Polymorphism, plasticity, and homeostasis. *Topics in plant population biology* Columbia University Press, New York:160-187.
- Julian S, King T, Savage W (2003a). Isolation and characterization of novel tetranucleotide microsatellite DNA markers for the spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. *Molecular Ecology Notes* 3(1):7-9.
- Julian SE, King TL, Savage WK (2003b). Novel jefferson salamander, *Ambystoma jeffersonianum*, microsatellite DNA markers detect population structure and hybrid complexes. *Molecular Ecology Notes* 3(1):95-97.
- Kimura M, Ohta T (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(6):2868-2872.
- Kleiven OT, Larsson P, Hobæk A (1992). Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos*:197-206.
- Kosman E, Leonard KJ (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular Ecology* 14(2):415-424.
- Kraus F, Miyamoto MM (1990). Mitochondrial genotype of a unisexual salamander of hybrid origin is unrelated to either of its nuclear haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(6):2235-2238.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2008). Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319(5871):1827-1830.
- Laird PW (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer* 3(4):253-266.
- Lande R (1988). Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241(4872):1455-1460.
- Lande R, Shannon S (1996). The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution* 50(1):434-437.

- Legendre P, Anderson MJ (1999). Distance-based redundancy analysis: Testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* 69(1):1-24.
- Legendre P, Fortin MJ (2010). Comparison of the mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. *Molecular Ecology Resources* 10(5):831-844.
- Le Roux JJ, Wicczorek AM, Wright MG, Tran CT (2007). Super-genotype: Global monoclonality defies the odds of nature. *PloS One* 2(7):e590.
- Levins R (1963). Theory of fitness in a heterogeneous environment. ii. Developmental flexibility and niche selection. *American Naturalist*:75-90.
- Lowcock LA, Bogart JP (1989). Electrophoretic evidence for multiple origins of triploid forms in the *Ambystoma laterale*-*jeffersonianum* complex. *Canadian Journal of Zoology* 67(2):350-356.
- Lowcock LA, Griffith H, Murphy RW (1991). The *Ambystoma laterale*-*jeffersonianum* complex in central ontario: Ploidy structure, sex ratio, and breeding dynamics in a bisexual-unisexual community. *Copeia* 1991(1):87-105.
- Lynch M (1984). Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *Quarterly Review of Biology*:257-290.
- Macdonald SE, Chinnappa C (1989). Population differentiation for phenotypic plasticity in the *Stellaria longipes* complex. *American Journal of Botany*:1627-1637.
- Madlung A (2013). Polyploidy and its effect on evolutionary success: Old questions revisited with new tools. *Heredity* 110(2):99-104.
- Massicotte R, Angers B (2012). General-purpose genotype or how epigenetics extend the flexibility of a genotype. *Genetics Research International* 2012:317175.
- Massicotte R, Whitelaw E, Angers B (2011). DNA methylation: A source of random variation in natural populations. *Epigenetics* 6(4):421-427.
- Matsumoto Y, Buemio A, Chu R, Vafae M, Crews D (2013). Epigenetic control of gonadal aromatase (*cyp19a1*) in temperature-dependent sex determination of Red-eared slider turtles. *PLoS One* 8(6):e63599.
- Maynard Smith J (1978). *The evolution of sex*: Cambridge Univ Press.
- Moran G, Marshall D, Müller W (1981). Phenotypic variation and plasticity in the colonizing species *Xanthium strumarium* l. (Noogoora burr). *Australian Journal of Biological Sciences* 34(6):639-648.
- Muller HJ (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1(1):2-9.
- Müller J, Hense B, Fuchs T, Utz M, Pötsche C (2013). Bet-hedging in stochastically switching environments. *Journal of Theoretical Biology* 336:144-157.
- Newman SA, Müller GB (2000). Epigenetic mechanisms of character origination. *Journal of Experimental Zoology* 288(4):304-317.
- Noël S, Labonté P, Lapointe F-J (2011). Genotype frequencies and genetic diversity in urban and protected populations of blue-spotted salamanders (*Ambystoma laterale*) and related unisexuals. *Journal of Herpetology* 45(3):294-299.
- Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'hara B, Stevens MHH, Oksanen MJ, Suggests M (2007). The vegan package. *Community Ecology Package* 10.
- Olmo E (1974). Further data on the genome size in the urodeles. *Italian Journal of Zoology* 41(1):29-33.

- Olofsson H, Ripa J, Jonzén N (2009). Bet-hedging as an evolutionary game: The trade-off between egg size and number. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276(1669):2963-2969.
- Olsson M, Uller T (2002). Developmental stability and genetic architecture: A comparison within and across thermal regimes in tadpoles. *Journal of Evolutionary Biology* 15(4):625-633.
- Orr HA (1990). Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *American Naturalist*:759-770.
- Otto SP, Whitton J (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34(1):401-437.
- Pál C, Miklós I (1999). Epigenetic inheritance, genetic assimilation and speciation. *Journal of Theoretical Biology* 200(1):19-37.
- Pala I, Coelho MM, Scharl M (2008). Dosage compensation by gene-copy silencing in a triploid hybrid fish. *Current Biology* 18(17):1344-1348.
- Pala I, Scharl M, Brito M, Vacas JM, Coelho MM (2010). Gene expression regulation and lineage evolution: The north and south tale of the hybrid polyploid squalius alburnoides complex. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277(1699):3519-3525.
- Paldi A (2003). Stochastic gene expression during cell differentiation: Order from disorder? *Cellular and Molecular Life Sciences* 60(9):1775-1778.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004). Ape: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20(2):289-290.
- Park Y, Kuroda MI (2001). Epigenetic aspects of x-chromosome dosage compensation. *Science* 293(5532):1083-1085.
- Pavet V, Quintero C, Cecchini NM, Rosa AL, Alvarez ME (2006). Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(6):577-587.
- Phillips CA, Uzzell T, Spolsky CM, Serb JM, Szafoni RE, Pollock TR (1997). Persistent high levels of tetraploidy in salamanders of the *Ambystoma jeffersonianum* complex. *Journal of Herpetology*:530-535.
- Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology* 209(12):2362-2367.
- Ponger L, Li W-H (2005). Evolutionary diversification of DNA methyltransferases in eukaryotic genomes. *Molecular Biology and Evolution* 22(4):1119-1128.
- Rakyan VK, Blewitt ME, Druker R, Preis JI, Whitelaw E (2002). Metastable epialleles in mammals. *Trends in Genetics* 18(7):348-351.
- Rambaut A (2007). *Figtree, a graphical viewer of phylogenetic trees*. See [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>].
- Ramsden C (2008). Population genetics of *Ambystoma jeffersonianum* and sympatric unisexuals reveal signatures of both gynogenetic and sexual reproduction. *Journal of Information* 2008(3).
- Ramsden C, Bériault K, Bogart JP (2006). A nonlethal method of identification of *Ambystoma laterale*, *A. jeffersonianum* and sympatric unisexuals. *Molecular Ecology Notes* 6(1):261-264.
- Ramsden CB (2005). *An examination of the reproductive mechanisms operating in unisexual salamanders in the genus Ambystoma*: Thesis. University of Guelph Guelph, Ontario.

- Raymond M, Rousset F (1995). Genepop (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- Reik W (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447(7143):425-432.
- Richards EJ (2006). Inherited epigenetic variation—revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics* 7(5):395-401.
- Richards EJ (2008). Population epigenetics. *Current Opinion in Genetics & Development* 18(2):221-226.
- Richards EJ, Elgin SC (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. *Cell* 108(4):489-500.
- Robertson AV, Ramsden C, Niedzwiecki J, Fu J, Bogart JP (2006). An unexpected recent ancestor of unisexual *Ambystoma*. *Molecular Ecology* 15(11):3339-3351.
- Rolan-Alvarez E, Johannesson K, Erlandsson J (1997). The maintenance of a dine in the marine snail *Littorina saxatilis*: The role of home site advantage and hybrid fitness. *Evolution* 51:1838-1847.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-425.
- Sambrook J, Fritschi E, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheiner SM, Goodnight CJ (1984). The comparison of phenotypic plasticity and genetic variation in populations of the grass *Danthonia spicata*. *Evolution*:845-855.
- Schlösser IJ, Doeringsfeld MR, Elder JF, Arzayus LF (1998). Niche relationships of clonal and sexual fish in a heterogeneous landscape. *Ecology* 79(3):953-968.
- Schlupp I (2005). The evolutionary ecology of gynogenesis. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*:399-417.
- Schmitz RJ, Schultz MD, Lewsey MG, O'malley RC, Urich MA, Libiger O, Schork NJ, Ecker JR (2011). Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants. *Science* 334(6054):369-373.
- Schones DE, Zhao K (2008). Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nature Reviews Genetics* 9(3):179-191.
- Schultz RJ (1969). Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *American Naturalist*:605-619.
- Silander JA (1985). The genetic basis of the ecological amplitude of *Spartina patens*. ii. Variance and correlation analysis. *Evolution* 39(5):1034-1052.
- Simovich MA, Hathaway SA (1997). Diversified bet-hedging as a reproductive strategy of some ephemeral pool Anostracans (Branchiopoda). *Journal of Crustacean Biology* 17(1):38-44.
- Spolsky C, Phillips C, Uzzell T (1992a). Antiquity of clonal salamander lineages revealed by mitochondrial DNA. *Nature* 356(6371):706-708.
- Spolsky C, Phillips CA, Uzzell T (1992b). Gynogenetic reproduction in hybrid mole salamanders (genus *Ambystoma*). *Evolution*:1935-1944.
- Stearns SC (1989). The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *Bioscience* 39(7):436-445.

- Stewart Jr CN, Nilsen ET (1995). Phenotypic plasticity and genetic variation of *Vaccinium macrocarpon*, the american cranberry. i. Reaction norms of clones from central and marginal populations in a common garden. *International Journal of Plant Sciences*:687-697.
- Stutz HC, Thomas LK (1964). Hybridization and introgression in *Cowania* and *Purshia*. *Evolution* 18(2):183-195.
- Sunnucks P (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15(5):199-203.
- Thoday JM (1953). Components of fitness. *Symposia of the Society for Experimental Biology Journal* 7:96-112.
- Thomas CM, Nielsen KM (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3(9):711-721.
- Trionnaire G, Hardie J, Jaubert-Possamai S, Simon JC, Tagu D (2008). Shifting from clonal to sexual reproduction in aphids: Physiological and developmental aspects. *Biology of the Cell* 100(8):441-451.
- Turlure C, Vandewoestijne S, Baguette M (2014). Conservation genetics of a threatened butterfly: Comparison of allozymes, rapds and microsatellites. *BMC genetics* 15(1):114.
- Uzzell TM, Jr. (1964). Relations of the diploid and triploid species of the *Ambystoma jeffersonianum* complex (Amphibia, Caudata). *Copeia* 1964(2):257-300.
- Van Valen L (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary theory* 1:1-30.
- Veening J-W, Smits WK, Kuipers OP (2008). Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annual Review in Microbiology* 62:193-210.
- Verhoeven KJ, Preite V (2013). Epigenetic variation in asexually reproducing organisms. *Evolution*.
- Vrijenhoek RC (1978). Coexistence of clones in a heterogeneous environment. *Science* 199(4328):549-552.
- Vrijenhoek RC (1989). Genetic and ecological constraints on the origins and establishment of unisexual vertebrates. *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* 466:24-31.
- Vrijenhoek RC (1998). Animal clones and diversity. *Bioscience* 48(8):617-628.
- Waddington CH (1942). The epigenotype. *Endeavour*:18-20.
- Waddington CH (1953). Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution*:118-126.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience* 7(8):847-854.
- Wertheim B, Beukeboom L, Van De Zande L (2013). Polyploidy in animals: Effects of gene expression on sex determination, evolution and ecology. *Cytogenetic and Genome Research* 140(2-4):256-269.
- Wilbur HM (1971). The ecological relationship of the salamander *Ambystoma laterale* to its all-female, gynogenetic associate. *Evolution* 25(1):168-179.
- Williams GC (1975). *Sex and evolution*: Princeton University Press.
- Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA (1998). Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in avy/a mice. *The FASEB Journal* 12(11):949-957.
- Wright S. *The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution*; 1932. 356-366.

- Xiong L, Xu C, Maroof MS, Zhang Q (1999). Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular and General Genetics* 261(3):439-446.
- Zangerl A, Bazzaz F (1983). Plasticity and genotypic variation in photosynthetic behaviour of an early and a late successional species of Polygonum. *Oecologia* 57(1-2):270-273.

Annexe 1

Conditions environnementales des sites échantillonnés

Les variables environnementales ont été prélevées de mai à août 2014, durant la période de développement des larves de salamandres à points bleus. Les prélèvements aquatiques ont été faits avec la sonde de type YSI 556-MPS. Les prélèvements terrestres ont été faits sur deux quadrats de 20 x 20 m, situés à 50 m du plan d'eau et distants entre eux de 50 m. Certains types de variables ont été prises qu'une seule fois (juin) : nature du substrat du plan d'eau et du sol forestier, présence d'une connexion au plan d'eau, la présence d'herbacées et d'arbres, la cote de drainage ainsi que le pourcentage de conifères par rapport aux feuillus.

Tableau X : Description des variables environnementales prélevées.

Variable environnementale	Unités	Commentaires
Conductivité	mS/cm	Sonde, moyenne des 4 mois
Concentration d'O ₂	mg/L	Sonde, moyenne des 4 mois
pH de l'eau	pH	Sonde, moyenne des 4 mois
Potentiel d'oxydoréduction (ORP)	mV	Sonde, moyenne des 4 mois
Nature du substrat dans l'étang	NA	Qualitatif: 1 = humus 0 = argile
Niveau de l'eau	cm	Changement du niveau d'eau par rapport à la référence (mai); juin (6) et juillet (7)
Présence/absence d'eau	NA	Qualitatif. Présence (1), Absence (0), Peu (0,5) moins de 15 cm de profond
Connexion	NA	Qualitatif. Plan d'eau relié à un ruisseau (1), ou isolé (0)
Présence d'herbacées	NA	Qualitatif (présence = 1, absence = 0). Herbacées dans le plan d'eau
Présence d'arbres	NA	Qualitatif (présence = 1, absence = 0). Arbres dans le plan d'eau
Recouvrement du plan d'eau	%	Semi-Quantitatif: catégories : 0%, 25%, 50%, 75%, 100%
pH du sol forestier		Moyenne des prises faites aux quatre coins des quadrats et au centre à chaque mois
Substrat du sol forestier	NA	Qualitatif: 1 = humus 0 = argile
Cote de drainage	NA	Selon Emberger <i>et al.</i> (1968), semi-quantitatif
Pourcentage de conifères	%	Nombre de conifères/Nombre d'arbres dans les quadrats
Recouvrement de la canopée	%	Semi-Quantitatif: catégories : 0% à 100%, tous les 10%
Période de la journée	h	Moment moyen lors du relevé, en nombre d'heures à partir de minuit

Les conditions des sites M01 et M03 n'ont pas été prélevées, puisqu'ils ont été échantillonnés en 2015. Les relevés des autres sites ont été faits le 13-14 mai, 19-20 juin, 22-23 juillet, 19-20 août 2014.

Tableau XI : Valeurs des variables environnementales prélevées sur les sites échantillonnés. Les lignes non variables ont été retirées (Presence.Eau-05, Presence.Eau-06, Presence.Eau-08).

	M02	M04	M05	M06	M07	E01	E02	E03
Conductivite.moy	64,88	332,38	269,13	364,38	188,38	55,13	23,38	28,10
O2.moy	2,60	3,75	3,72	8,63	3,54	3,44	6,27	3,75
pH.eau.moy	6,87	7,79	7,51	7,46	7,09	6,21	6,49	6,00
ORP.moy	-183,75	-280,88	-186,05	-25,55	-200,05	-340,45	-58,88	-93,98
Substrat.eau	0	0	0	0	0	1	1	1
Niveau-06	1	1	2	11	5	3	-6	7
Niveau-07	-4	25	30	56	28	16	15	31
Presence.Eau-07	1	1	1	0	1	1	1	0,5
Connection	1	0	0	0	1	0	1	1
Herbacees	0	0	0	0	0	1	1	0
Arbres	0	1	1	1	1	0	0	0
Recouvrement.eau	75	50	100	50	25	25	0	75
pH.sol.moy	6,15	6,15	5,98	6,36	6,19	6,24	6,38	6,21
Substrat.sol	1	1	1	1	0	1	1	1
Cote.drainage	4	3	3,5	3,5	4,5	3	3	3,5
P.coniferes	8,00	0,00	0,00	3,03	2,94	0,00	42,11	2,17
Rec.canopée	100	60	90	80	90	100	90	70
Periode.moy	16,28	14,18	14,25	13,92	13,35	11,13	13,05	16,90

Annexe 2

Scores microsatellites des hybrides

Les scores microsatellites ont été séparés en deux tableaux. Le premier correspond aux scores des loci J-spécifiques (AjeD346-J, AjeD294, AjeD378, AmaD42-J, AjeD422-J, AjeD23-J, AjeD84-J et AjeD13). Le second correspond aux scores des loci L-spécifiques (AmaD42-L, AjeD422-L, AjeD23-L, AjeD84-L) et des loci pour lesquels l'origine des allèles n'a pu être déterminée (AjeD283 et AjeD94).

Tableau XII : Scores microsatellites des loci J-spécifiques pour les hybrides *Ambystoma* mentionnés dans l'étude. Les individus sont classés par groupes, puis par sites et sont regroupés par génotypes.

Nombre d'individus	Biotype	Aje D346	Aje D294	Aje D378	Ama D42	Aje D422	Aje D23	Aje D84	Aje D13
Groupe A									
M02									
4	LLJ	180	246	220	137	244	225	194	212
1	LLJ	180	246	220	137	244	225	190	212
M04									
1	LLJ	184	246	232	133	244	225	194	212
M05									
1	LLJ	184	246	220	133	244	225	194	216
M06									
12	LLJ	180	242	232	137	244	225	194	212
1	LLLJ	180	242	232	137	244	225	194	212
1	LLJ	184	242	232	137	244	225	194	212
M07									
16	LLJ	180	246	232	133	244	225	194	212
Groupe B									
M01									
8	LLJ	188	238	236	177	244	221	190	200
5	LLJ	192	238	236	177	244	217	190	200
4	LJ	192	238	236	177	244	217	190	200
M02									
1	LLJ	192	238	236	177	244	217	190	200
1	LLLJ	192	234	236	177	244	217	190	200

Nombre d'individus	Biotype	Aje D346	Aje D294	Aje D378	Ama D42	Aje D422	Aje D23	Aje D84	Aje D13
Groupe C									
M04									
14	LLJ	184	246	244	177	244	197	190	224
1	LLJ	180	246	244	177	244	197	190	224
1	LLLJ	184	246	244	177	244	197	190	224
M05									
14	LLJ	184	246	244	177	244	197	190	224
2	LLJ	184	246	244	177	244	197	194	224
1	LLJ	184	246	244	177	244	197	190	228
1	LLLJ	184	246	244	177	244	197	190	220
Groupe D									
M02									
1	LLJ	188	246	260	177	248	225	190	208
E01									
10	LJ	184	242	268	177	252	225	190	208
1	LJ	188	242	268	177	252	225	190	208
E02									
8	LJ	184	242	272	177	252	221	190	208
3	LJ	188	242	272	177	252	221	194	208
2	LJ	184	242	268	177	252	221	190	208
2	LJ	188	242	268	177	252	221	194	208
1	LJ	184	242	276	177	252	221	190	208
E03									
7	LLJ	188	250	264	177	248	229	194	208
2	LLJ	184	250	264	177	252	229	194	208
2	LLJ	184	250	264	177	252	229	194	204
1	LLJ	184	246	264	177	248	229	194	208
1	LLJ	192	250	264	177	248	229	194	208
1	LLJ	184	250	264	181	252	229	194	204
1	LLJ	184	246	268	177	248	229	194	212
1	LLJ	184	250	272	177	252	229	194	204
Groupe E									
M01									
3	LLJ	184	246	244	193	244	225	190	208
2	LJ	184	246	240	193	244	225	190	208
1	LJ	184	246	240	193	244	225	000	208
1	LLLJ	184	246	244	193	244	225	190	208

Nombre d'individus	Biotype	Aje D346	Aje D294	Aje D378	Ama D42	Aje D422	Aje D23	Aje D84	Aje D13
M02									
42	LLJ	184	246	240	193	244	225	190	208
4	LJ	184	246	240	193	244	225	190	208
2	LLJ	184	246	236	193	244	225	190	208
2	LLJ	184	246	240	193	244	225	194	208
1	LJ	184	246	236	193	244	225	190	208
1	LLJ	188	246	240	193	244	225	190	208
1	LLJ	180	246	240	193	244	225	190	208
1	LLLJ	184	246	240	193	244	225	190	208
M03									
2	LLJ	184	246	240	193	244	225	190	208
Autres									
M01									
2	LLJ	184	246	228	185	252	217	150	208
1	LLJ	184	246	228	185	252	213	150	212
1	LLJ	184	246	228	181	252	213	150	208
1	LLJ	188	250	232	189	244	221	186	208
1	LLJ	180	246	248	177	248	213	170	216
M02									
4	LLJ	188	250	232	189	244	221	186	208

Tableau XIII : Scores microsatellites des loci L-spécifiques et les loci pour lesquels l'origine des allèles est indéterminée pour les hybrides *Ambystoma* mentionnés dans l'étude. Les individus sont classés par groupes, puis par sites et sont regroupés par génotypes.

Nombre d'individus	Biotype	AjeD283	AjeD94	AmaD42	AjeD422	AjeD23	AjeD84
Groupe A							
M02							
1	LLJ	150-154-174	186-206-210	193-201	220	245	210
1	LLJ	150-154-174	186-206-210	193-201	220	245	218
1	LLJ	150-154-174	186-206-210	193-201	220	245	210-218
1	LLJ	150-154-174	186-210	193-201	220	245	210
1	LLJ	150-154-174	186-210	193-201	220	245-249	210
M04							
1	LLJ	150-154-174	186-206-210	201	220-232	245-249	210

Nombre d'individus	Biotype	AjeD283	AjeD94	AmaD42	AjeD422	AjeD23	AjeD84
M05							
1	LLJ	150-154-174	186-206-210	197-201	220	245	210
M06							
8	LLJ	150-154-174	186-206-210	197-201	220-232	245	206-210
3	LLJ	150-154-174	186-206-210	197-201	220-232	245	210
1	LLJ	150-154-174	186-206-210	197-201	220-232	245	206
1	LLJ	150-174	186-206-210	197-201	220-232	245	206-210
1	LLLJ	150-154-174-186	142-186-206-210	197-201-241	220-228-232	241-245	206-210-230
M07							
11	LLJ	146-154-174	186-206-210	197-201	220-232	241-245	210
2	LLJ	146-154-174	186-206-210	197-201	220-232	241	210
1	LLJ	146-154-174	186-206-210	201	220-232	241	210
1	LLJ	146-154-174	186-206-210	197-201	220-232	245	210
1	LLJ	146-154-174	186-206-210	193-197	220-232	241-245	210
Groupe B							
M01							
5	LLJ	146-154-162	142-190-194	201-253	228-236	233	214-226
4	LJ	146-154	190-194	201	236	241	214
1	LLJ	146-154-162	142-190-194	201-253	228-236	233	218-230
1	LLJ	146-154-162	142-190-194	201-253	228-236	233-241	214-226
1	LLJ	146-154-174	142-190-194	201-245	232-236	241-245	202-214
1	LLJ	146-154-162	142-190-194	201-253	228-236	233-241	210-226
1	LLJ	146-154-158	186-194	201-249	228-236	241-249	214-218
1	LLJ	146-154-178	190-194-202	201-245	220-236	241-245	214-222
1	LLJ	146-154-158	190-202	201-253	228-232	241	000
1	LLJ	146-154-174	142-190-194	201-209	224-236	241-245	214-226
M02							
1	LLJ	146-154-174	142-190-194	201-241	224-236	241-245	214-222
1	LLLJ	146-154-170-174	142-190-194-	201-249	224-232-236	241-245	218-222
Groupe C							
M04							
2	LLJ	130-146-182	194-198-214	189-241	224-228	241-245	202-218
2	LLJ	130-146-166	142-194-214	201-241	220-228	241-249	214-218
1	LLJ	130-146-182	194-198-214	189-241	224	249	210-218
1	LLJ	130-146-182	194-198-210	189-241	224-228	241	210
1	LLJ	130-146-178	194-214	205-241	224-228	237-241	214-218
1	LLJ	130-146-178	194-198-214	205-241	224-228	237-245	214-218
1	LLJ	130-146-178	190-194-214	205-241	228	253	210-218
1	LLJ	130-146-182	194-198-210	189-241	224-228	245	202-218

Nombre d'individus	Biotype	AjeD283	AjeD94	AmaD42	AjeD422	AjeD23	AjeD84
1	LLJ	130-146-182	194-198-218	189-241	228	241-245	202-218
1	LLJ	130-146-182	194-198-218	189-241	224-228	245	202-218
1	LLJ	130-146-182	194-198-218	189-241	224-228	241-245	202-218
1	LLJ	146-166-170	142-190-210	205-241	224-232	245	214-218
1	LLJ	130-146-174	142-194-214	197-241	224-228	245-249	218
1	LLLJ	130-146-166-174	142-194-210	197-201-241	224-228	241-245-249	218
M05							
3	LLJ	130-146-170	194-198-214	193	220-228	241	218
2	LLJ	130-146-170	194-198-214	193	228	241	218-222
2	LLJ	146-166-170	142-190-206	205-241	224-232	241-245	214-218
1	LLJ	130-146-170	194-198-214	193	220-228	241	214-218
1	LLJ	130-146-174	194-198-214	201-241	228	245	210-218
1	LLJ	130-146-174	194-198-214	201-241	228	245-249	210-230
1	LLJ	130-146-174	194-198-214	201-241	220-228	245	210-218
1	LLJ	130-146-174	198-214	201-241	220-228	245	210-218
1	LLJ	146-166-170	142-190-206	205-241	224	245	214-218
1	LLJ	146-166-170	142-190-210	205-241	224	245	214-218
1	LLJ	130-146-170	194-198-214	189	220-228	241	210-218
1	LLJ	130-146-170	194-198-214	193-201	220-228	241	214-218
1	LLJ	130-146-182	194-198-214	189-245	224-228	245	202-218
1	LLLJ	130-146-166-174	142-194-214	197-201-241	224-228	241	210-218-234
Groupe D							
M02							
1	LLJ	146-170-174	194-242	193-201	224	237-249	186-214
E01							
10	LJ	150-174	194-222	193	224	229	186
1	LJ	150-170	194-222	193	224	229	186
E02							
8	LJ	146-170	194-222	205	228	233	186
4	LJ	146-170	194-230	205	228	233	186
3	LJ	146-166	194-222	205	228	233	186
1	LJ	146-170	198-230	205	228	233	186
E03							
5	LLJ	154-166-174	142-194-214	197-205	232-236	241	218-222
3	LLJ	154-170	194-210-218	197-201	224-232	233-237	182-210
1	LLJ	154-170	194-210-218	197-201	224-232	233-237	182-214
1	LLJ	154-170	194-210-218	197-201	224-232	237	182-214
1	LLJ	154-166-174	142-194-218	197-205	232-236	245	218
1	LLJ	154-166-174	142-194-214	197-205	232-236	241	214-218

Nombre d'individus	Biotype	AjeD283	AjeD94	AmaD42	AjeD422	AjeD23	AjeD84
1	LLJ	154-166-174	142-194-214	197-205	232-236	233-237	218-222
1	LLJ	150-162-174	142-194-222	197-205	232	233	182-218
1	LLJ	150-166-182	142-194-226	201-205	236	233	186-218
1	LLJ	130-150-170	190-194-222	197-241	228-232	241	182-210
Groupe E							
M01							
2	LJ	146-154	190-198	201	224	245	218
1	LJ	146-154	190-198	201	224	245	210
1	LLJ	146-154-174	194-198	197-205	224-232	229-241	222-230
1	LLJ	146-154-174	194-198	197-205	224	237-241	222-230
1	LLJ	146-154-174	194-198	201-205	224-232	233-245	202-218
1	LLLJ	146-154-158-174	142-194-198-202	197-205-249	224-232	229-237-245	222-226-234
M02							
5	LJ	146-154	190-198	201	224	245	218
5	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-205	224	245	218-222
5	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-249	224	245	218
2	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-249	224	245	218-222
2	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-249	224	241-245	218
2	LLJ	146-154-174	142-190-198	201-205	224-232	241-245	218
1	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-205	224	245	218
1	LLJ	146-154-170	142-190-198	201	224	245	218
1	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-205	228	245	218-222
1	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-205	224-228	245	218-222
1	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-249	224	241-245	218-222
1	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-249	224	237-245	218
1	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-249	224	245-253	218
1	LLJ	146-154-170	142-190-198	201-253	224	245	218
1	LLJ	146-154-170	190-198	201-249	224	245	218
1	LLJ	146-154-174	142-190-198	201-249	224	245-253	218-222
1	LLJ	146-154-174	142-190-198	201-249	224	237-245	218-222
1	LLJ	146-154-174	142-190-198	201-249	224	245	218-222
1	LLJ	146-154-174	142-190-198	201-249	220-224	241-245	218-222
1	LLJ	146-154-174	142-190-198	201-205	224-232	241-245	218-222
1	LLJ	146-154-174	142-190-198	201-205	224	245	218-222
1	LLJ	146-154-174	142-190-198	201-205	224	237-245	218-230
1	LLJ	146-154-174	142-190-198	165-249	224-228	245	218-222
1	LLJ	146-154-174	142-190-194	201-249	224-232	245	218-222
1	LLJ	146-154-174	142-190-194	201-249	224-232	245	218
1	LLJ	146-154-174	178-190-198	201-249	224	237-245	218-222

Nombre d'individus	Biotype	AjeD283	AjeD94	AmaD42	AjeD422	AjeD23	AjeD84
1	LLJ	146-154-174	186-190-198	165	220-224	245	202
1	LLJ	146-154-182	190-198-210	201-205	224-232	241-245	218-222
1	LLJ	146-154-182	190-198-210	201-205	224-232	241-245	210-230
1	LLJ	146-154-182	190-198-210	201-205	224-232	245-253	218
1	LLJ	146-154-182	190-198-210	201-205	224-232	245	218
1	LLJ	146-154-178	142-190-198	201-249	224	245	218-222
1	LLJ	146-154-178	142-190-198	201-249	224-232	241-245	218-222
1	LLJ	146-154-178	178-190-202	201-249	224-228	241-249	218-222
1	LLJ	146-154-166	142-190-198	201-249	224-232	245	218-222
1	LLJ	146-154-166	186-190-198	201	224	245	218-222
1	LLJ	146-154	190-198	201	224	241	218-222
1	LLLJ	146-154-170-174	142-178-190-198	201-249	224	245	218-222
1	LLLJ	146-154-170	142-190-198	201-205-249	224	241-245-	218-222-
M03							
1	LLJ	146-154-170	142-190-198	201	224	245	218
1	LLJ	146-154-174	142-190-198	201-249	224-232	241-245	218-222
Autres							
M01							
1	LLJ	146-158-174	190-194-198	205	224	241	206-214
1	LLJ	130-146	186-198-202	197-205	228-232	237-241	230
1	LLJ	146-166-170	182-186-190	201-257	228	253	218-222
1	LLJ	146-166-170	182-194-202	201-205	228-232	241-245	214-222
1	LLJ	146-166	182-190-202	201	224-228	245	218-222
1	LLJ	146-166	182-190-202	201-205	228	253	218-222
M02							
2	LLJ	146-158-178	190-198	201-205	224	245	206-214
1	LLJ	146-158-178	190-198	205	224	245	206-214
1	LLJ	146-158-178	190-198	205	224	245	210

