

DAVID MÉRETTE

**DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET MORPHOLOGIQUE  
DES HYBRIDES ASEXUÉS *FUNDULUS DIAPHANUS*  
X *F. HETEROCLITUS***

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie  
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE  
FACULTÉ DE SCIENCES ET GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2009

© David Mérette, 2009

## Résumé

La présence d'hybrides asexués gynogénétiques entre *Fundulus diaphanus* et *F. heteroclitus* à deux sites en Nouvelle-Écosse (Porter's Lake et Saint-Mary's River) est documentée dans la littérature. Un échantillonnage aléatoire de *Fundulus* à douze stations le long du gradient de salinité de Porter's Lake et le génotypage à l'aide de huit marqueurs microsatellites a permis de découvrir la présence d'un clone principal et de ses dérivés mutationnels, constituant ensemble 97% des hybrides. D'autre part, une méthode d'identification morphologique des *F. diaphanus*, des *F. heteroclitus* et des hybrides basée sur un algorithme de vraisemblance maximale a été élaborée pour utilisation sur le terrain, permettant une diagnose rapide et efficace à plus de 90%. Une grande variabilité morphologique des hybrides a été observée à l'aide de la morphométrie géométrique. Finalement, la vaste répartition d'un clone principal et de ses dérivés mutationnels, morphologiquement variables, laisse supposer la présence un génotype généraliste à Porter's Lake.

## **Abstract**

Presence of asexual hybrids between *Fundulus diaphanus* and *F. heteroclitus* at two sites in Nova Scotia (Porter's Lake and Saint-Mary's River) has been documented in the literature. Random sampling of *Fundulus* along the salinity gradient of Porter's Lake and genotyping using eight microsatellite markers revealed one main clone and its mutational derivatives in the lake, representing 97% of hybrids encountered. Also, a novel method of morphological identification of *F. diaphanus*, *F. heteroclitus* and hybrids based on a maximum likelihood algorithm has been elaborated for fieldwork purposes, allowing a quick, over 90% efficient, way to diagnose the three *Fundulus* types. Morphological analyses performed using geometric morphometrics also revealed that hybrids were no less variable morphologically than parental species. Finally, the presence of one main clone in different salinities and an important morphological variability suggest the presence of a General-Purpose Genotype in Porter's Lake.

## Avant-Propos

Le présent mémoire est constitué d'une introduction et d'une conclusion en français, entourant deux chapitres en anglais. Ces deux chapitres sont des articles rédigés en anglais en vue d'être soumis dans des revues spécialisées. Les auteurs de ces deux articles sont Julie Turgeon, directrice de recherche, moi-même, ainsi qu'un troisième collaborateur. Audrey Bourret a participé au premier article de par sa contribution importante en laboratoire sur le plan de l'identification génétique des hybrides et des clones, et Pierre Duchesne s'est avéré d'une aide inestimable pour le deuxième article au niveau de la programmation des algorithmes d'assignation morphologique des hybrides. Il est à noter que le premier article (Chapitre 1), sera soumis sous la forme d'une « *Brief Communication* », ce qui explique le format particulier de ce chapitre (absence de sections). La rédaction des articles, l'échantillonnage, de même qu'une bonne partie des manipulations en laboratoire et du travail d'analyse morphométrique ont été effectués par l'étudiant sous la supervision de sa directrice.

En premier lieu, je désire remercier ma directrice, Julie Turgeon, pour m'avoir proposé ce projet vraiment intéressant sur un système biologique pour le moins étrange, mais tellement fascinant, et m'avoir supporté dans mes hauts et mes bas des deux dernières années. Je me souviens de notre première rencontre, où les mots « clonalité », « microsattellites » et « gynogenèse » me donnaient encore des maux de tête, mais au cours de laquelle j'ai été convaincu par l'enthousiasme de Julie pour un sujet qui la passionne. Cet enthousiasme a été contagieux, m'ayant peu à peu contaminé jusqu'à ce que je ne devienne presque aussi passionné qu'elle. Je lui suis également très reconnaissant de m'avoir fait énormément progresser au cours de ma maîtrise, de par un encadrement constant et formateur.

Je tiens également à remercier mes collègues du laboratoire, qui m'ont beaucoup aidé de par leur amitié et leur générosité de leur temps et leurs connaissances. Vous côtoyer a été un pur bonheur et vous allez me manquer! Un merci tout particulier à Marie-Claude

Gagnon, ma partenaire des premières heures, pour m'avoir enduré au laboratoire quand je n'étais qu'un empoté et pour sa patience à m'apprendre les rudiments de la biologie moléculaire. Mention spéciale à Audrey Bourret, dont le travail au laboratoire a fait énormément progresser mes recherches, et tout ça dans le sourire. Dire que j'avais le mandat de la former! Je n'ai pas eu grand-chose à faire, avec une élève si mature et brillante. Merci aussi à Pierre Duchesne, qui m'a permis de sauver tellement de temps de par son expertise en Maple et son intelligence holistique, qui m'a fait déceler des problèmes potentiels alors qu'ils n'étaient qu'au stade embryonnaire. Je tiens aussi à remercier Sébastien Bélanger, pour le sourire le plus intense qu'il m'ait été donné de rencontrer, et son aide au niveau de la morphométrie géométrique. Et enfin, pêle-mêle, merci à Charlotte Roby, Geneviève Parent, Catherine Potvin et Jason Talbot, qui, bien que nous n'ayons pas directement travaillé ensemble, ont rendu ma maîtrise une expérience si formidable à l'intérieur comme à l'extérieur des murs de l'université.

Dans le cadre de mon projet de maîtrise, j'ai également eu la chance de côtoyer d'autres chercheurs dont l'aide a été très précieuse. Pour leur assistance au niveau de l'échantillonnage et leur joie de vivre, merci au Dr. David Cone et à Stanley King, de Saint-Mary's University, à Halifax. Merci aussi à Pierre Blier et Véronique Desrosiers, qui m'ont grandement aidé pour les dosages enzymatiques effectués à l'UQAR. Il ne faudrait pas oublier Arne Nolte, qui m'a fait faire un bond de géant au niveau de ma compréhension de la morphométrie géométrique. Finalement, merci à tous les professeurs qui ont enrichi mon travail de leurs commentaires, tant lors de ma présentation de projet que pour les corrections de ce présent mémoire, et je cite : Julian Dodson, France Dufresne et Bernard Angers.

*« Un expert est une personne qui a fait toutes  
les erreurs qui peuvent être faites dans un  
domaine très étroit. »*

**Neils Bohr**

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Avant-Propos</b> .....	iii
<b>Table des matières</b> .....	vi
<b>Liste des tableaux</b> .....	viii
<b>Liste des figures</b> .....	ix
<b>Introduction générale</b> .....	1
i.1) Sexe vs. Asexualité – définitions, avantages et inconvénients.....	1
i.2) Asexués anciens .....	5
i.3) Principaux types de reproduction asexuée .....	7
i.3.1) Problèmes spécifiques liés à la persistance de taxons gynogènes.....	8
i.4) Génération de diversité phénotypique chez les asexués.....	9
i.5) Système biologique à l'étude .....	14
i.6) Sites d'étude .....	17
i.7) Objectifs .....	17
<b>Chapitre 1:</b> Distribution of gynogenetic hybrids between <i>Fundulus diaphanus</i> and <i>F. heteroclitus</i> in Porter's Lake, Nova Scotia, in relation with salinity and parental species.....	19
RÉSUMÉ .....	20
ABSTRACT.....	20
<b>Chapitre 2:</b> A novel maximum-likelihood method to identify hybrids on the basis of morphological features: the case of asexual hybrids between <i>Fundulus diaphanus</i> and <i>F. heteroclitus</i> (Teleost: Cyprinodontidae) .....	31
RÉSUMÉ .....	32
ABSTRACT.....	32
2.1) INTRODUCTION .....	33
2.2) MATERIAL AND METHODS .....	36
2.2.1) Data collection.....	36
2.2.2) Morphological variation in <i>Fundulus spp.</i> .....	36
2.2.3) Field identification of hybrids: A novel maximum likelihood assignment method .....	38
2.3) RESULTS.....	41
2.3.1) Morphological variation in <i>Fundulus spp.</i> .....	41
2.3.2) Field identification of hybrids: A novel maximum likelihood assignment method .....	42
2.4) DISCUSSION.....	44
2.5) APPENDIX I.....	53
2.6) APPENDIX II.....	56

<b>Conclusion générale</b> .....	58
c.1) Hypothèse du génotype généraliste et hybrides <i>Fundulus diaphanus</i> X <i>F. heteroclitus</i> .....	58
c.2) Apprentissages concrets sur le système <i>F. diaphanus</i> , <i>F. heteroclitus</i> et leurs hybrides pouvant aider aux échantillonnages futurs.....	60
c.3) Portée scientifique et avenues de recherche possibles.....	61
<b>Bibliographie</b> .....	64
<b>Annexe:</b> Activités enzymatiques chez <i>Fundulus diaphanus</i> , <i>F. heteroclitus</i> et leurs hybrides gynogènes après un transfert de salinité .....	78



## Liste des tableaux

<b>Table 1.1:</b> Distribution of three <i>Fundulus</i> types ( <i>F. diaphanus</i> , <i>F. heteroclitus</i> and hybrids) and multilocus genotypes (MLG, see Table 1.2) among 12 sampling stations covering Porter's Lake (Nova Scotia) salinity gradient in May-June of 2007.	27
<b>Table 1.2:</b> Hybrid multilocus genotypes (MLG) found in Porter's Lake in two sampling events (2004 and 2007). Diagnostic alleles of <i>Fundulus diaphanus</i> and <i>F. heteroclitus</i> are in bold and italics, respectively. Loci that differ from Clone A are shown in grey. A + sign shows an obvious double contribution of a given allele.....	29
<b>Table 2.1:</b> ANOVA table for the effect of <i>Fundulus</i> type on traditional morphometrics PCA axes obtained using 153 linear measurements taken on 270 <i>Fundulus spp.</i> ....	47
<b>Table 2.5.1:</b> Maximum likelihood assignment method for <i>Fundulus spp.</i> Frequencies of values for each character in each class and for each <i>Fundulus</i> type (see Material and Methods). Frequencies are shown for the selected characters (traits and ratios, see Results), and an example of assignment is given below the table.....	53
<b>Tableau A.1:</b> Effet du type de <i>Fundulus</i> ( <i>F. diaphanus</i> , <i>F. heteroclitus</i> , hybrides asexués) ou du jour du sacrifice sur l'activité de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase, de la CCO et de la MDH chez des individus utilisés dans le cadre d'une expérience sur l'effet de la salinité.....	86

## Liste des figures

<b>Figure 1.1:</b> Map of Porter's Lake, Nova Scotia, showing 12 stations sampled in 2007 and the relative proportions of the three <i>Fundulus</i> types. Proportions of <i>F. diaphanus</i> , <i>F. heteroclitus</i> and hybrids are represented respectively in the pie charts by black, white and grey sections. On the left corner, Porter's Lake is represented by a star on a general map showing Eastern Canada (light grey) and United States of America (dark grey). .....	30
<b>Figure 2.1:</b> Eighteen landmarks and semi-landmarks on the left side of a <i>Fundulus diaphanus</i> X <i>F. heteroclitus</i> hybrid. ....	48
<b>Figure 2.2 :</b> Individual fish coordinates on traditional morphometrics PCA axes 2 and 3 defined by 153 linear measurements (N=270 <i>Fundulus spp.</i> from Porter's Lake, 2004 and 2007, and Saint-Mary's River, 2004). <i>F. diaphanus</i> are represented by white triangles, <i>F. heteroclitus</i> by black squares and hybrids by grey circles. ....	49
<b>Figure 2.3 :</b> Individual fish coordinates on traditional morphometrics canonical DA axes 1 and 2 (N=270 <i>Fundulus spp.</i> from Porter's Lake, 2004 and 2007, and Saint-Mary's River, 2004). <i>F. diaphanus</i> are represented by white triangles, <i>F. heteroclitus</i> by black squares and hybrids by grey circles. ....	50
<b>Figure 2.6.1:</b> Vectors explaining morphological variation along CV1 for all fishes (N=270). The origin of each vector is a landmark or a semi-landmark. ....	56
<b>Figure 2.6.2:</b> Vectors explaining morphological variation along CV2 for all fishes (N=270). The origin of each vector is a landmark or a semi-landmark. ....	57
<b>Figure A.1 :</b> Activité moyenne de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase, exprimée en µmol ADP/mg protéine/h, pour chacun des trois types de <i>Fundulus</i> ayant subi des transferts de salinité. D : <i>F. diaphanus</i> (N=46), A : hybrides asexués (N=43), H : <i>F. heteroclitus</i> (N=48). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type sur la moyenne. Les groupes significatifs (p < 0.05) obtenus par test de LSD sont représentés par des lettres minuscules. ....	87
<b>Figure A.2 :</b> Activité moyenne de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase, exprimée en µmol ADP/mg protéine/h, au premier (J1) et au quatrième jour (J4) pour chacun des trois types de <i>Fundulus</i> ayant subi des transferts de salinité. D : <i>F. diaphanus</i> (J1, N=21; J4, N=25), A : hybrides asexués (J1, N=21; J4, N=22), H : <i>F. heteroclitus</i> (J1, N=21; J4, N=27). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type sur la moyenne. ....	88
<b>Figure A.3 :</b> Activité moyenne de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase, exprimée en µmol ADP/mg protéine/h, au premier (J1) et au quatrième jour (J4) pour chacun des trois types de <i>Fundulus</i> ayant été assigné au traitement de salinité intermédiaire (10 ppt; conditions témoin). D : <i>F. diaphanus</i> (J1, N=7; J4, N=8), A : hybrides asexués (J1, N=6; J4, N=9), H : <i>F. heteroclitus</i> (J1, N=6; J4, N=7). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type sur la moyenne. ....	89

**Figure A.4:** Activité moyenne de la cytochrome c oxydase (CCO), exprimée en  $\mu\text{mol}$  cytochrome c oxydé/mg protéine/min, pour chacun des trois types de *Fundulus* ayant subi des transferts de salinité. D : *F. diaphanus* (N=46), A : hybrides asexués (N=43), H : *F. heteroclitus* (N=48). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type sur la moyenne. Les groupes significatifs ( $p < 0.05$ ) obtenus par test de LSD sont représentés par des lettres minuscules.....90

**Figure A.5:** Activité moyenne de la malate déhydrogénase (MDH), exprimée en  $\mu\text{mol}$   $\text{NAD}^+$ /mg protéine/min, pour chacun des trois types de *Fundulus* ayant subi des transferts de salinité. D : *F. diaphanus* (N=46), A : hybrides asexués (N=43), H : *F. heteroclitus* (N=48). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type sur la moyenne. Les groupes significatifs ( $p < 0.05$ ) obtenus par test de LSD sont représentés par des lettres minuscules. ....91

## **Introduction générale**

Aux origines du vivant, la reproduction était essentiellement asexuée (Margulis et Sagan 1986). Depuis, on a observé une diversification des modes de reproduction le long d'un continuum allant de l'apomixie (asexualité) au sexe à plus de deux genres chez des Ciliata et des Fungi, en passant par des intermédiaires comme la parthénogenèse cyclique (Bell 1982). Un constat demeure cependant : chez les eucaryotes, le sexe est présent dans presque tous les taxons, et l'asexualité est l'exception qui semble confirmer la règle (Barton et Charlesworth 1998). L'analyse comparative de taxons sexués et asexués sympatriques et phylogénétiquement proches s'avère un outil pour faire progresser notre compréhension générale de la stabilité évolutive du sexe à long terme, alors que des êtres asexués apparaissent sporadiquement au sein de nombreux taxons (Maynard Smith 1978, Vrijenhoek 1994).

### **i.1) Sexe vs. Asexualité – définitions, avantages et inconvénients**

À travers le présent mémoire, j'utiliserai la définition du sexe de Ghiselin (1974), reprise par Bell (1982), soit que le sexe est synonyme de mixie (ou brassage de gènes). Il s'agit d'un procédé qui change les relations entre différents éléments du génome, avec ou sans l'introduction de matériel génétique neuf. Ainsi, en utilisant cette définition large, un individu seul peut par lui-même engendrer une descendance issue du sexe si ses gènes sont mélangés par un quelconque processus, ce qui génère une descendance qui lui est génétiquement différente (automixie). De même, un individu dont la reproduction nécessite l'assistance d'un second individu sans intégrer le matériel génétique de ce dernier dans sa descendance sera considéré comme asexué. Un autre point à clarifier ici concerne la distinction entre sexe et reproduction. La reproduction est la génération d'un nouvel organisme à partir d'un ou de plusieurs organismes existants. Bien que cet événement soit souvent concomitant au sexe, les deux processus n'en sont pas moins distincts. Ainsi, si

l'organisme généré par la reproduction est génétiquement identique à son parent, nous sommes en présence de ce que j'appellerai « reproduction asexuée ».

Toutes choses étant égales, un organisme asexué devrait posséder un taux d'accroissement deux fois plus important que celui d'un organisme équivalent se reproduisant de manière sexuée (« *two-fold cost of sex* »). Ceci s'explique par le fait que l'organisme asexué transmet la totalité de ses gènes (en opposition à la moitié) et il ne lui est pas nécessaire de produire des mâles (Bell 1982). Au bout de  $n$  générations, la lignée asexuée, en tout point équivalente à celle utilisant la reproduction sexuée, pourrait donc produire  $2^n$  fois plus de descendants que la lignée sexuée. Éventuellement la lignée asexuée pourrait complètement remplacer la lignée sexuée puisque la taille maximale de population que peut soutenir un quelconque milieu est finie. Par ailleurs, en plus d'une infériorité théorique sur le plan démographique, la reproduction sexuée comporte d'autres inconvénients à court terme, dont le principal est en lien avec la nature même de la méiose. Cette dernière, de par le caractère aléatoire de l'assortiment et de la recombinaison des chromosomes, peut briser des combinaisons de gènes favorables, et ce à chaque nouvelle génération. Par ailleurs, on doit également compter parmi les coûts du sexe les risques associés à la recherche de partenaire et à l'accouplement, tels qu'un danger accru de prédation et une exposition aux maladies transmises sexuellement (Schlupp 2005). Les inconvénients du sexe, a priori majeurs, sont certainement contrebalancés par des avantages à court et à long terme puisque la vaste majorité des taxons sexués persiste plus longtemps à l'échelle évolutive que leurs parents asexués (Maynard Smith 1978, Barton et Charlesworth 1998). Les deux avantages majeurs du sexe se situent au niveau de la génération de diversité génotypique (court et long terme) et la purge de mutations délétères (long terme).

À court terme, le principal avantage du sexe se situe sur le plan de la génération de diversité génotypique au sein de la descendance (Maynard Smith 1978, Bell 1982). Dans le cas standard, chaque parent contribue au bagage génétique de sa descendance en transmettant

la moitié de son génome, sélectionnée aléatoirement lors de la méiose, ce qui produit des descendants génétiquement différents de chacun des parents et différents entre eux. En ajoutant à cela la possibilité de se reproduire plusieurs fois, avec des partenaires différents, la diversité génétique pouvant être observée chez les descendants d'un individu est nettement plus grande que celle issue de reproduction asexuée. A priori, cette diversité génétique est plus susceptible d'engendrer une vaste gamme de phénotypes qu'un génotype unique. C'est ici que l'argument écologique entre en ligne de compte. Une descendance où plusieurs phénotypes sont exprimés sera plus apte à faire face à une plus grande variété de contraintes biotiques ou abiotiques qu'une descendance en tout point identique à la génération précédente. Cet avantage peut s'exprimer sur le plan de la persistance temporelle, alors que les conditions écologiques en tout lieu sont en perpétuel changement, ou de l'étalement géographique, alors que la colonisation de nouveaux milieux écologiquement différents du milieu d'origine peut être facilitée. Williams (1975), avec sa théorie de la loterie, présentait la situation de la manière suivante : ne sachant pas ce que l'avenir réserve, mieux vaut posséder plusieurs combinaisons génétiques parmi ses descendants, dans l'espoir qu'au moins l'une d'elles s'avère gagnante. De plus, une descendance génétiquement diversifiée par la recombinaison peut aider à contrer la spécialisation des ennemis naturels, qu'ils soient des parasites, des prédateurs ou des compétiteurs, face à des génotypes stables, telle qu'exposée dans la théorie de la Reine rouge (Hamilton *et al.*, 1990, Salathé *et al.* 2008, Tobler et Shlupp 2008).

Les organismes asexués peuvent échapper de plusieurs façons à quelques uns des inconvénients associés à la faible diversité génétique de leur progéniture et à la spécialisation des ennemis naturels. Tout d'abord, la dispersion dans l'espace et le temps peut leur permettre de conserver une diversité génétique populationnelle à travers la migration ou la production d'œufs en dormance (Ghiselin 1974, Tooby 1982). D'autre part, c'est la diversité phénotypique réalisée qui confère la plupart des avantages écologiques à la descendance, et non la diversité génétique en tant que telle. Donc, un génotype unique permettant l'expression d'une vaste gamme de phénotypes pourrait être malgré tout plus

durable qu'une population sexuée avec une faible diversité génétique et phénotypique. D'autre part, une manière de lutter contre les ennemis naturels pour certains asexués pourrait se trouver au niveau de la sélection de l'habitat. Par exemple, il a été observé chez le poisson *Poecilia mexicana* que les individus vivant dans des habitats extrêmes (e.g. avec de fortes concentrations de sulfure d'hydrogène) avaient une moins grande prévalence de trématodes parasites que ceux vivant dans des eaux non-sulfureuses (Tobler *et al.* 2007), ce qui démontre que l'on peut réduire l'influence des parasites par le choix de l'habitat. Bien que ces échappatoires ne soient pas exclusifs aux asexués (rien n'empêche les sexués d'adopter ces stratégies), la sélection pour ces stratégies évolutives pourrait s'avérer plus forte chez les asexués, puisqu'ils ne possèdent pas de levier aussi puissant que le sexe pour créer de la diversité génétique (Judson et Normark 1996).

À plus long terme, le principal problème lié à l'asexualité est l'accumulation de mutations délétères (« Muller's ratchet », Muller 1964). En l'absence de recombinaison génétique, les mutations (qui sont pour la plupart délétères et récessives) tendent à s'accumuler. À chaque fois qu'une nouvelle mutation apparaît, elle se taille une place dans le génome et est là pour y rester pour toutes les générations à venir. Peu à peu, toutes les versions saines des gènes s'effritent et des effets défavorables apparaissent au niveau de l'individu. Le sexe permet de purger les mutations délétères, en offrant la possibilité, grâce à la méiose qui a lieu à chaque génération, d'engendrer une descendance saine ne possédant pas lesdites mutations. Ce problème s'avère très difficile à surmonter pour les lignées asexuées (voir la Section i.2 - Asexués anciens). Un moyen de ralentir les effets d'accumulation de mutations délétères pour les asexués est la polyploïdisation, puisqu'elle augmente le nombre de copies saines de chaque gène (Mogie et Ford 1988). Toutefois, des coûts sont également rattachés à la préservation et la copie d'une plus grande quantité d'ADN, et au bout de très nombreuses générations, la lutte aura été vaine, puisque l'accumulation de mutations délétères est un processus inévitable et sans possibilité de retour chez les asexués.

Alors que les sexués semblent posséder de nombreux avantages sur leur contreparties asexuées, il n'a pas encore été possible de démontrer théoriquement qu'un facteur unique (parmi ceux présentés ci-haut) pouvait à lui seul contrecarrer l'avantage démographique supposé des asexués. Une théorie unificatrice du maintien du sexe a été avancée et porte le nom d'approche pluraliste (Howard et Lively 1994, West *et al.* 1999). L'action coordonnée de la spécialisation parasitaire face à un génotype unique et de taux de mutation suffisamment élevés pour s'avérer problématiques pour la pérennité de lignées asexuées rendrait le sexe stable dans un contexte évolutif. L'approche pluraliste permet de faire face à la question des intermédiaires biologiques à la dichotomie sexe/asexualité, tels que le sexe rare, ou cyclique, qui permet de bénéficier des avantages à long terme du sexe, sans avoir à payer le plein coût du sexe à chaque génération (Hurst et Peck 1996). Ainsi, tout en expérimentant un taux d'accroissement similaire à celui d'individus asexués, des lignées présentant des taux faibles de sexe peuvent s'avérer pratiquement aussi efficaces que le sexe à chaque génération pour intégrer des mutations bénéfiques et pour prévenir l'accumulation de mutations délétères (Green et Noakes 1995).

## **i.2) Asexués anciens**

Bien que le sexe soit la condition dominante chez les eucaryotes, on observe des asexués dans une grande majorité des taxons, comme il a été mentionné plus tôt (Bell 1982). En outre, la plupart des lignées asexuées connues et contemporaines sont relativement jeunes à l'échelle évolutive, bien que des exceptions notables existent (Judson et Normark 1996). Ces exceptions sont autant d'opportunités d'explorer les limites des avantages du sexe. La classe Bdelloidea (phylum Rotifera) est de loin le taxon métazoaire le plus vaste dans lequel aucun indice de reproduction sexuée n'a été noté (Bell 1982, Judson et Normark 1996). Les rotifères bdelloïdes ont existé depuis au moins 35-40 millions d'années, soit l'âge des plus anciens spécimens découvert dans l'ambre (Waggoner et Poinar 1993). En plus d'être ancien, ce groupe est également très diversifié, comptant plus de 400 espèces



décrites sur une base morphologique (Segers 2007). Une étude ayant porté sur des divergences de séquences sur quatre gènes (*hsp82*, *tbp*, *rpol3I*, *tpi*) à l'intérieur de quatre espèces de bdelloïdes et de sept espèces de rotifères sexués semble confirmer la théorie selon laquelle il n'y aurait pas eu de flux de gènes (ou une quantité infime) au sein de la classe Bdelloidea sur le très long terme (Welch et Meselson 2000). Outre les bdelloïdes, on soupçonne aussi des lignées asexuées anciennes chez des mites oribatides, des mollusques prosobranches, des ostracodes (clade Darwinulidea) des artémies (*Artemia parthenogenetica*) et des pucerons du groupe d'espèces *Tramini* (Ladle *et al.* 1993, Judson et Normark 1996).

Toutefois, il est possible que les lignées d'asexués supposées anciennes ne soient peut-être pas toutes véritablement asexuées (Hurst *et al.* 1992, Judson et Normark 1996). Par exemple, on a découvert des mâles chez un ostracode de la famille des Darwinulidae (*Vestalenula cornelia*), un groupe phylogénétique que l'on supposait jusqu'alors comme étant l'un des vieux groupes asexués sur Terre (Smith *et al.* 2006). L'absence de mâle observé n'est donc pas une preuve suffisante pour classer des taxons comme étant asexués. Par ailleurs, le flux génique peut se présenter d'autre manière que par le mélange de gènes entre deux représentants d'une même espèce. Une étude récente de Gladyshev *et al.* (2008) suggère l'existence d'une forme de transfert génétique inter-taxon chez les bdelloïdes, puisque de nombreux gènes d'origine étrangère (provenant de bactéries, de plantes ou de champignons) ont été découverts dans le génome d'*Adineta vaga*. La capture et l'assimilation de gènes d'autres taxons pourraient ainsi avoir joué un rôle clé dans l'évolution des bdelloïdes.

### **i.3) Principaux types de reproduction asexuée**

La plupart des lignées asexuées connues chez les organismes pluricellulaires sont relativement jeunes et ont été dérivées de lignées sexuées, soit par mutation, par hybridation et/ou par polyploïdisation (Bell 1982). Par ailleurs, elles ne forment pas un groupe monolithique en ce qui a trait à leur reproduction. Nous allons ici nous attarder sur trois grands types connus de reproduction asexuée: la parthénogenèse, l'hybridogenèse et la gynogenèse.

Le premier, la parthénogénèse, consiste en la production de clones par un seul individu à partir d'un œuf non fertilisé (Bell 1982). Chez les *Daphnia*, il existe des lignées où la parthénogénèse est la seule option, et d'autres où elle est cyclique ou ponctuelle, n'ayant lieu que de temps à autre. Certains reptiles sont parthénogènes, dont des lézards du genre *Cnemidophorus* (Cullum, 1997) et des geckos du genre *Heteronotia* (Kearney et Shine, 2004).

Les deux autres types de reproduction asexuée qui seront traités, soit l'hybridogénèse et la gynogénèse, sont généralement issus d'événements d'hybridation interspécifiques (Beukeboom et Vrijenhoek 1998, Vrijenhoek 1998). L'hybridogénèse consiste en la production d'œufs hémi-clonaux non recombinants par les femelles (Shultz 1969, Bell 1982). Une méiose sélective conserve l'ADN nucléaire d'origine maternelle mais élimine celui d'origine paternelle. Les gènes du mâle seront intégrés à l'individu à naître, mais sans être passés à la génération suivante. On a retrouvé des hybridogènes chez plusieurs taxons, notamment chez certains poissons (*Poeciliopsis*: Shultz 1969, Vrijenhoek 1994; *Tropidophoxinellus alburnoides*: Carmona *et al.* 1997), un insecte (*Bacillus*: Mantovani et Scali 1992) et un amphibien (*Rana esculenta*: Pagano *et al.* 2008).

Un troisième type de reproduction asexuée, la gynogénèse, implique l'absence de méiose dans la formation des ovules. Toutefois, le sperme d'une espèce proche est nécessaire pour enclencher le développement d'œufs clonaux chez les hybrides gynogènes, sans que le matériel génétique paternel ne contribue à la progéniture (Bell 1982, Schlupp 2005). Bien qu'il ne s'agisse pas d'un mode de reproduction commun dans le monde animal, la gynogénèse est apparue indépendamment dans 24 genres différents, issus de sept phyla : Rotifera, Platyhelminthes, Nematoda, Annelida, Mollusca, Arthropoda et Chordata (Beukeboom et Vrijenhoek, 1998). Chez les vertébrés, les gynogènes se concentrent chez les amphibiens et les poissons (Beukeboom et Vrijenhoek, 1998), incluant les hybrides *Fundulus diaphanus* X *F. heteroclitus*, qui sont l'objet du présent projet de recherche (Fritz et Garside 1974a, Dawley 1992, Hernández Chávez et Turgeon 2007).

### **i.3.1) Problèmes spécifiques liés à la persistance de taxons gynogènes**

La persistance des asexués gynogènes représente un casse-tête car ils cumulent des inconvénients des modes de reproduction sexuée (e.g. besoin de sperme) et asexuée (e.g. faible variabilité génétique) (Schlupp 2005). De plus, les gynogènes peuvent difficilement se servir de leur spécificité par rapport aux espèces parentales pour aller coloniser de nouvelles zones, puisqu'ils demeurent dépendants du sperme des mâles d'espèces proches (Schlupp 2005). Cette dépendance implique aussi une limite au taux d'accroissement populationnel des gynogènes, puisqu'un trop grand succès reproducteur des asexués limiterait grandement la fréquence relative de mâles aux générations suivantes et pourrait pousser à l'extinction les formes sexuées et asexuées (Schlupp 2005). Les gynogènes sont en quelque sorte des parasites de sperme (Beukeboom et Vrijenhoek 1998), devant séduire les mâles et utiliser leurs gamètes sans pour autant contribuer à leur succès reproducteur. Ainsi, la sélection devrait être forte chez les mâles pour reconnaître les hybrides gynogènes et leur préférer des partenaires de leur propre espèce (Beukeboom et Vrijenhoek 1998), ce

qui fut observé chez *Poecilia latipinna* et *P. mexicana* (Ryan *et al.* 1996, Robinson *et al.* 2008, Riesch *et al.* 2008). Par ailleurs, le fardeau mutationnel des gynogènes, augmente inévitablement avec le temps, comme celui de tout taxon asexué (Muller 1964). De plus, la faible diversité génétique les rend aussi plus susceptibles à la spécialisation des ennemis naturels. Chez *Carassius auratus*, les taux d'infection par des parasites observés étaient plus grands chez les formes gynogènes que sexuées (Hakoyama *et al.* 2001). Le même phénomène a été observé chez les hybrides *Phoxinus eos* X *P. neogaeus*, en rapport aux infections de *Gyrodactylus eos* (Mee et Rowe 2006). Par contre, chez quatre populations de *Poecilia* au Texas, la faune parasitaire de la forme gynogène *P. formosa* ne différait pas significativement de *P. latipinna* ni en diversité ni en composition (Tobler *et al.* 2005), en plus de présenter des niveaux de prévalence similaires (effet espèce non significatif). Ainsi, une spécialisation des parasites, ou d'autres ennemis naturels, face à un génotype n'est pas nécessairement observable chez tous les taxons asexués.

#### **i.4) Génération de diversité phénotypique chez les asexués**

De tous les problèmes conceptuels posés par la persistance de taxons asexués, celui de la génération de diversité phénotypique est l'un des plus importants à court terme, tel qu'il a été discuté dans la section i.1. Alors que le sexe permet de générer une grande variété de génotypes, il est à noter que la sélection s'opère sur le phénotype des individus, et non sur les gènes directement, et que la diversité phénotypique n'est pas réservée aux seuls descendants d'unions sexuées. Par exemple, dans le complexe *Phoxinus eos*, *P. neogaeus* et leurs hybrides gynogènes, il a été démontré que les asexués n'étaient pas moins variables morphologiquement que leurs contreparties sexuées (Doeringsfeld *et al.* 2004). Aussi, on peut noter une influence très forte de facteurs environnementaux dans la variation phénotypique. Par exemple, chez des *Poeciliopsis* hybridogènes, on a estimé que les facteurs non génétiques comptaient pour 50 à 59% de la variation de la longueur à la naissance, pour 60 à 71% du poids à la naissance et pour 87 à 90% des taux de croissance

juvénile (Wetherington *et al.* 1989). Par ailleurs, les mécanismes d'exclusion des gènes paternels chez les gynogènes et hybridogènes n'est pas toujours parfait. On a observé l'intégration de parties d'ADN paternel (microchromosomes) transmissibles aux générations suivantes chez des individus gynogènes *Poecilia formosa* (Schartl *et al.* 1995) ainsi que l'inclusion occasionnelle du génome entier du mâle engendrant la polyploïdie, chez *Ambystoma* et *Poecilia* (Schlupp 2005). Ces apports génétiques inopinés s'avèrent des sources de nouveauté au sein de lignées asexuées, permettant de générer ponctuellement de la variabilité phénotypique. Toutefois, ces événements rares n'expliquent pas à eux seuls la variabilité phénotypique observée chez les asexués au niveau populationnel. Deux hypothèses principales tentent d'expliquer la variabilité phénotypique similaire ou plus grande observée au sein de certains groupes de clones par rapport aux populations sexuées dont ils sont issus : l'hypothèse du génotype généraliste et l'hypothèse de la variation figée de niches.

La première hypothèse, celle du génotype généraliste (GPG, de l'anglais « *General Purpose Genotype* »), avance que les lignées clonales qui perdurent dans le temps sont celles qui conservent une certaine aptitude dans une vaste gamme d'environnements (Richards *et al.*, 2006). Cette hypothèse s'appuie, entre autres, sur le fait qu'un génotype peut être sélectionné sur la base même de sa plasticité phénotypique (Pigliucci 2005), définie comme étant la diversité de phénotypes pouvant être exprimés par un seul génotype (Pigliucci 1998). Ainsi, puisque tout environnement est appelé à fluctuer sur le long terme, on s'attend des lignées clonales les plus plastiques phénotypiquement qu'elles perdurent plus longtemps que celles qui le sont moins.

Cette hypothèse a été formulée pour la première fois par Baker (1965). Ce dernier, traitant des plantes envahissantes, décrit les caractéristiques qui permettraient à certaines plantes de coloniser de vastes territoires. Par la suite, ce concept a été généralisé afin d'expliquer pourquoi seules certaines lignées clonales parvenaient à survivre sur de très nombreuses

généralistes, utilisant une variété de ressources et de milieux, devraient obtenir plus de succès à long terme que leurs contreparties très spécialisées. Certains corollaires découlent de la théorie du GPG. D'abord, si cette théorie s'applique dans un système biologique réel, on s'attend à ce que la robustesse des clones GPG aux variations environnementales soit plus étendue que celle d'un individu moyen appartenant aux populations sexuées. De plus, on ne devrait observer qu'un faible nombre de lignées clonales différentes, soit celles permettant l'utilisation de la plus vaste gamme de ressources dans la plus vaste gamme de conditions environnementales rencontrées en un lieu. Quelques cas de GPG possible ont été documentés. Par exemple, Vorburger *et al.* (2003a) ont noté la présence de deux « super-clones » du puceron *Myzus persicae* (dont la représentation respective comptait pour 24,0 et 17,4% de tous les individus génotypés) dans la province de Victoria en Australie, dans des sites à l'altitude et au climat variés. Par ailleurs, il a été observé dans des populations hybrides clonales de *Phoxinus eos* X *P. neogaeus* que la variabilité phénotypique au sein d'une lignée clonale diploïde était au moins aussi grande au sein des individus gynogènes qu'au sein des espèces parentales, dans une analyse multivariée comportant différentes mesures morphologiques communément utilisées en morphométrie traditionnelle (Doeringsfeld *et al.* 2004). Cette variabilité observée semble due à la présence d'un GPG plutôt que celle de multiples génotypes spécialisés (Schlosser *et al.* 1998, Doeringsfeld *et al.* 2004). Un autre exemple probable de GPG se retrouve chez le puceron *Sitobion avenae* (Haack 2000). Pour cette étude, 237 génotypes ont été découverts parmi les 867 pucerons testés, mais deux de ces génotypes étaient particulièrement fréquents (retrouvés respectivement 320 et 105 fois dans l'échantillon). En plus d'être fréquents, ces génotypes ont été retrouvés sur les quatre types de plantes hôtes, alors que la plupart des autres génotypes semblaient spécialisés par rapport à une seule de celles-ci.

Bien que des clones GPG semblent exister dans la nature, il faut faire attention à ne pas sauter aux conclusions trop rapidement. Par exemple, bien que deux « super-clones » ont été répertoriés chez *Myzus persicae* en Australie (Vorburger *et al.* 2003a), il n'a pas été

possible de démontrer que ces clones possédaient une plus grande tolérance à différentes plantes hôtes que les autres lignées (Vorburger *et al.* 2003b), ce à quoi on se serait attendu d'un GPG. D'autre part, les hybrides gynogènes *Phoxinus eos* X *P. neogaeus*, qui possèdent des caractéristiques de GPG dans une partie de leur distribution (Nord du Minnesota; Schlosser *et al.* 1998, Doeringsfeld *et al.* 2004), démontrent une importante diversité clonale lorsqu'une plus grande portion de leur distribution est échantillonnée, allant du Montana au Québec (Angers et Schlosser 2007). Cette diversité clonale présente à une échelle plus vaste remet en cause certaines conclusions concernant la présence d'un GPG dans le système, bien qu'il demeure qu'un clone principal est largement répandu au Minnesota. Par ailleurs, le cas de l'ostracode *Darwinula stevensoni* est un autre exemple des dangers liés à des conclusions hâtives lorsque l'on parle de GPG. Chez cette espèce, une tolérance particulièrement prononcée aux variations de température et de salinité a poussé Van Doninck *et al.* (2002) à avancer qu'il s'agissait fort probablement d'un GPG, en se basant sur des études antérieures à l'effet que la diversité clonale était très faible au sein de cette espèce. Toutefois, une analyse ultérieure par RAPD (amplification aléatoire de polymorphismes d'ADN) par Van Doninck *et al.* (2004) a indiqué une vaste diversité clonale dans cette espèce, de même que l'absence de clone généraliste dans les sept populations échantillonnées. Il ne pouvait donc y avoir de GPG dans ce système.

Outre la variabilité permise par des génotypes généralistes, la coexistence de multiples lignées clonales (peu variables phénotypiquement) peut expliquer une partie importante de la variabilité observée au sein de certains groupes de clones. L'hypothèse de la variation figée de niches (FNV, de « *Frozen Niche Variation* ») se fonde sur cette idée. Ainsi, l'apparition constante de nouvelles lignées clonales spécialisées à partir de populations sexuées possédant une variabilité pour des traits fonctionnels permet à des plantes et des animaux clonaux vivant en sympatrie de présenter des différences considérables au niveau des traits d'histoire de vie et dans leur utilisation de ressources naturelles (Wetherington *et al.* 1989). Cette variabilité fonctionnelle au niveau du groupe de clones pourrait aider à circonvenir aux problèmes liés à la faible diversité génotypique au sein de chaque lignée

clonale. Ainsi, à chaque production d'un nouveau clone, une portion de la variation éco-phénotypique des espèces parentales se trouve figée. Des clones spécialisés face aux conditions actuelles survivent un temps, puis s'éteignent pour être remplacés par d'autres clones spécialisés face aux nouvelles conditions. Par ailleurs, la migration et la mutation sont des facteurs contribuant à augmenter la diversité génétique chez les populations de clones (Vrijenhoek 1979). Un bon exemple de FNV est un système de poissons gynogènes, hybridogènes et sexués du genre *Poeciliopsis*, dans lequel Vrijenhoek (1979) a établi une relation claire entre le succès des populations clonales, sous la forme de densité de populations atteintes, et leur diversité génétique. En plus de permettre une utilisation de ressources écologiques différentes (i.e. ressources alimentaires différentes pour différents clones, Vrijenhoek 1978), une diversité génétique au sein de groupes de clones permet aussi de lutter contre la spécialisation parasitaire. En résumé, on s'attend des systèmes où la diversité des asexués est principalement causée par la variation figée de niches de comporter de nombreuses lignées clonales en sympatrie, chacune relativement spécialisée dans un mode de vie, et de présenter un fort taux de génération et d'extinction de lignées clonales.

Les hypothèses du génotype généraliste et de la variation figée de niches ne sont pas mutuellement exclusives. Par exemple, dans le complexe de grenouilles hybridogènes du genre *Rana*, des hémiclones généralistes et spécialistes ont été retrouvés (Pagano *et al.* 2008). Cette étude, basée sur les données génétiques d'un millier de grenouilles en provenance de 37 populations différentes a révélé trois hémiclones largement distribués, tant au niveau géographique qu'écologique, et 10 autres à distribution plus réduite, restreints à des types d'habitats particuliers. La persistance des asexués dans ce système pourrait donc s'expliquer partiellement par les deux modèles.



### **i.5) Système biologique à l'étude**

La famille des Cyprinodontidés comporte environ 45 genres et 300 espèces de poissons, qui se retrouvent en Europe méridionale, en Asie du Sud, en Amérique du Nord et du Sud (Scott et Crossman 1974). Deux espèces sont communes dans les eaux de la côte est canadienne, *Fundulus diaphanus* (fondule barré) et *F. heteroclitus* (choquemort). Comme bien des espèces de leur famille, les deux sont euryhalines et survivent à des salinités allant de l'eau douce à une eau plusieurs fois plus salée que l'eau de mer (Griffith 1974, Nordlie 2006). Toutefois, les deux espèces ont des préférences différentes en terme de salinité. *F. diaphanus* présente une forte sélectivité pour les sites d'eau douce, alors que *F. heteroclitus* préfère les zones de salinité intermédiaire (Fritz et Garside 1974b). Ces préférences influencent la distribution géographique des deux espèces ; *F. diaphanus* se retrouve surtout dans des habitats continentaux d'eau douce, alors que *F. heteroclitus* est surtout présent dans les marais salins et les estuaires (Scott et Crossman 1974). Ainsi, ces deux espèces sont supposément rarement sympatriques (Fritz et Garside 1974b). Leur cohabitation se traduit par un déplacement d'habitat de *F. diaphanus*, qui se retrouve alors plus haut dans la colonne d'eau qu'en l'absence de *F. heteroclitus* (Heckert *et al.* 1999).

La grande variété de salinités à laquelle survivent ces deux espèces est une réussite au niveau évolutif, puisqu'elle implique des mécanismes antagonistes. Alors qu'en eau salée, les organismes ont tendance à perdre de l'eau par osmose à travers leur épithélium, ils ont tendance à en gagner en eau douce. Ainsi, il est nécessaire d'ingérer de l'eau et d'excréter des ions en eau salée et l'inverse en eau douce. Chez les poissons, la régulation du flux ionique se fait surtout au niveau branchial, operculaire et intestinal, dans des cellules riches en mitochondries, aussi appelées cellules cuboïdales ou chlorées (Kato et Kaneko 2003). Deux des ions dont le flux fait l'objet de régulation chez les poissons sont le  $\text{Cl}^-$  et le  $\text{Na}^+$ . La sécrétion d'ions par les branchies implique au moins trois complexes membranaires de transport (Marshall 2002). Le dosage de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase au niveau branchial s'avère un

bon indicateur de l'acclimatation à court terme à un changement de salinité. Les niveaux de  $\text{Cl}^-$  et de  $\text{Na}^+$  plasmiqque, peu importe si on augmente ou diminue la salinité ambiante, sont aussi d'excellents indicateurs de l'efficacité accomplie à l'ionorégulation (Scott *et al.* 2004, Scott et Schulte 2005).

En 1974, une première étude d'importance a documenté la présence d'hybrides entre *Fundulus heteroclitus* X *F. diaphanus* en Nouvelle-Ecosse, au site de Porter's Lake (Fritz et Garside, 1974a). Tous les 170 hybrides suspectés, à la morphologie intermédiaire mais chevauchante pour plusieurs caractères, étaient des femelles. Dawley (1992) reprend l'étude de ces poissons et trouve des *Fundulus* hybrides dans un autre site de Nouvelle-Écosse, l'estuaire de Saint-Mary's River. Par ailleurs, il explique la surabondance de femelles hybrides par une reproduction asexuée par gynogénèse (Dawley 1992). Une analyse de la variation au niveau d'allozymes (Dawley *et al.* 1999) de même qu'une étude d'histocompatibilité (Dawley *et al.* 2000) entre différents individus clonaux et parentaux suggère une faible diversité clonale chez les asexués. Ces résultats sont corroborés par Hernández Chávez et Turgeon (2007), dont l'analyse de variabilité à huit loci microsattellites semble confirmer le faible nombre de souches clonales et la rareté des événements donnant naissance à des lignées gynogénétiques. La présence de rares hybrides sexués est aussi relevée. Une autre conclusion de cette étude est que tous les hybrides asexués observés ont pour espèce maternelle *F. diaphanus*, comme en témoigne une analyse de PCR-RFLP sur le génome mitochondrial. Ceci pourrait être dû à la survie réduite des œufs de *F. heteroclitus* en eau douce (Able et Palmer 1988), le milieu privilégié de *F. diaphanus*. La rareté présumée des événements d'hybridation pourrait en partie être expliquée par les différences dans la phénologie de reproduction des deux espèces parentales. La période de fraie de *F. diaphanus* est induite par la température (Fournier et Magnin 1975) alors que celle de *F. heteroclitus* suit un cycle semi-lunaire en lien avec les grandes marées printanières (Taylor *et al.* 1979). D'autre part, on connaît encore peu de choses sur l'écologie des asexués *F. diaphanus* X *F. heteroclitus*, entre autres en ce qui

concerne la période de fraie et les préférences en salinité, qui sont très différentes entre les deux espèces parentales.

Souvent, les hybrides présentent des caractères dont les valeurs sont intermédiaires entre celles des espèces qui les ont engendrées (Grant & Grant 1994, Vinšálková & Gvoždík 2007, Cole *et al.* 2008). Ce système ne semble pas faire exception. Chez les *Fundulus* asexués, le nombre de branchicténies, la distance de l'origine de la nageoire dorsale à l'os hypural, le nombre de rayons caudaux, la hauteur du pédoncule caudal tout comme le nombre de vertèbres se sont tous avérés intermédiaires entre les caractères des espèces parentales, avec des niveaux de chevauchement variables (Fritz et Garside, 1974a). Cependant, la littérature démontre que les hybrides ne sont pas toujours intermédiaires pour un trait donné (Neff & Smith 1979, Ross & Cavender 1981, Bell & Travis 2005). Il ne faut donc pas extrapoler trop vite sur le caractère intermédiaire des *Fundulus* hybrides pour d'autres traits.

Par ailleurs, on a observé une plus grande variation interindividuelle chez les asexués que chez chacune des espèces parentales au niveau du nombre d'écailles sur la ligne latérale, un trait supposé neutre (Hernández Chávez et Turgeon 2007). Dans le cas ici à l'étude, un clone principal a été identifié à chacun des sites où ils étaient présents (Hernández Chávez et Turgeon 2007). Ces données suggèrent que nous pourrions être en présence d'un génotype généraliste pour chaque site, présentant une variabilité phénotypique potentiellement efficace dans une variété de conditions.

## **i.6) Sites d'étude**

Le présent projet s'est concentré sur Porter's Lake et dans une moindre mesure sur Saint-Mary's River, Nouvelle-Écosse, où la présence de *Fundulus heteroclitus*, de *F. diaphanus*, d'hybrides sexués et asexués a été confirmée (Dawley 1992, Hernández Chávez et Turgeon 2007). Il s'agit de milieux à salinité variable, ce qui explique sans doute la sympatrie entre une espèce préférant l'eau douce et une autre préférant l'eau salée. Porter's Lake est un lac côtier à 30 km au Nord de Halifax avec une embouchure donnant sur la mer, et les salinités mesurées à l'intérieur du lac se situent entre 0 et 16 ppt dépendamment de la proximité avec l'océan atlantique. Notons qu'avant la présente étude, les hybrides n'avaient été échantillonnés qu'en un seul lieu, en eau douce très faiblement saline (Hernández Chávez et Turgeon 2007). L'autre site d'étude, l'estuaire de Saint-Mary's River, est localisé à proximité de la ville de Sherbrooke, à environ 125 km au Nord de Porter's Lake, et est une section tidale de la rivière, dont la concentration en sels varie avec les marées.

## **i.7) Objectifs**

L'objectif principal de la présente recherche est de tester si l'hypothèse du génotype généraliste peut s'appliquer au système d'hybrides *Fundulus diaphanus* X *F. heteroclitus*, étant donné les résultats antérieurs indiquant la présence d'un clone principal. Pour ce faire, il faut à la fois tester la répartition des différents clones en lien avec une variable environnementale et leur plasticité phénotypique. La répartition des hybrides en général et de chacun des clones est établie le long du gradient de salinité présent à Porter's Lake, Nouvelle-Écosse (Chapitre 1). La plasticité phénotypique est testée sous deux angles: la variabilité morphologique, par l'analyse de la variation intra-type au niveau de la forme du corps (Chapitre 2), et la variabilité physiologique, par une évaluation de la capacité à composer avec des variations de salinité (Annexe). Le choix de la variable salinité se

justifie par les préférences différentes sur ce plan pour les espèces parentales. De plus, les hybrides asexués se retrouvent dans des sites à salinité variable. Si nous étions en présence d'un génotype généraliste, on s'attendrait à la présence d'un clone principal dans une variété d'environnements différents, une grande variabilité morphologique (similaire à celle des individus sexués ou plus grande) et une aptitude égale ou supérieure aux espèces parentales à composer avec les variations de salinité. Le détail des expériences de physiologie effectuées se retrouvent en Annexe plutôt que dans le corps du mémoire parce que les résultats obtenus concernant les réactions physiologiques à un changement de salinité (activité branchiale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase) n'étaient pas concluants en vertu de l'objectif visé au départ. Toutefois, nous avons obtenu des résultats intéressants qu'il aurait été triste de passer sous silence pour deux enzymes, soit la CCO et la MDH, qui présentent une différence d'activité entre les types de *Fundulus*. D'autre part, la démarche infructueuse que nous avons effectuée afin de détecter une influence de la salinité sur l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase branchiale pourrait aider de futurs chercheurs à éviter certains pièges.

Par ailleurs, des besoins d'identification rapide des types sur le terrain nous ont guidés vers la considération pratique de devoir développer des outils d'identification morphologique des hybrides sur le terrain (Chapitre 2). Cet objectif, secondaire au début, est devenu de plus en plus important dans nos recherches au fur et à mesure que les résultats s'accumulaient.

## **Chapitre 1:**

### **Distribution of gynogenetic hybrids between *Fundulus diaphanus* and *F. heteroclitus* in Porter's Lake, Nova Scotia, in relation with salinity and parental species**

Mérette, D., Bourret, A., Turgeon, J.

Note : Le format du chapitre 1 est de type article scientifique court (« brief communication ») en vue de soumission à une revue spécialisée, ce qui explique l'absence de division au sein de ce chapitre

**RÉSUMÉ:** La répartition des hybrides gynogènes entre *F. diaphanus* et *F. heteroclitus* dans un lac tidal (Porter's Lake, Nouvelle-Écosse) a été établie. On a retrouvé des hybrides en faible proportion (5% en moyenne pour le lac) dans huit stations de salinité intermédiaire sur les douze échantillonnées. La proportion d'hybrides varie selon les stations, allant de 0 à 15%. Les trois stations où se retrouvent la plus grande fréquence d'hybrides ne sont pas groupées géographiquement et présentent des salinités différentes (0 à 10,5 ppt). L'étude de la diversité des lignées clonales a révélé qu'un clone est particulièrement abondant (72% des hybrides échantillonnés). La grande majorité des autres hybrides semblent être des dérivés mutationnels du clone principal. Deux hybrides potentiellement sexués ont été découverts, de même qu'un triploïde. Le clone principal est présent dans une vaste gamme de salinité, laissant supposer qu'il s'agit d'un génotype généraliste.

**ABSTRACT:** The distribution of gynogenetic hybrids between *F. diaphanus* and *F. heteroclitus* in a tidal lake (Porter's Lake, Nova Scotia) has been established. Hybrids were found in low proportions (5% over the entire lake) in eight of the twelve stations sampled. Hybrids represented 0 to 15% of the *Fundulus* randomly sampled in different stations. The three stations where the highest proportion of hybrids was found are not clustered geographically and present different salinities (from 0 to 10.5 ppt). A clonal diversity survey revealed that one clone is particularly abundant (72% of hybrids sampled). A large majority of the remaining hybrids appear to be mutational derivatives of the main clone. Two potentially sexual hybrids were found, as well as a triploid individual. The main clone is present in various salinities, suggesting it could be a General-Purpose Genotype.

Sex is still an evolutionary enigma, and asexuality remains widely distributed in the animal kingdom (Bell 1982). While asexuals are at a demographic advantage, their mutational load cannot be purged and they have lower adaptation rate in changing environments (Muller 1964, Maynard-Smith 1978, Kondrashov 1993, West *et al.* 1999). In order to persist, asexuals must generate phenotypic diversity. Two models have been proposed to explain the maintenance of ecologically variable asexuals. The General-Purpose Genotype model (GPG) states that clones with wide ecological tolerance will spread in time and space (Baker 1965, Lynch 1984). Asexual populations persist because of the success of a few plastic lineages that can thrive under a wide range of conditions. The Frozen Niche Variation model (FNV) rather proposes that new clones are constantly formed from genetically variable sexual populations (Vrijenhoek 1979). Clonal populations persist because they are an assemblage of narrowly-adapted specialised genotypes, each clone having “frozen” part of the ecological variation present in the sexual populations. Thus, combined analysis of population genetics, phenotypic variability and/or environmental tolerance allow testing which models accounts for the persistence of asexuals in a given system (Schlosser *et al.* 1998, Vrijenhoek 1998, Vorburger *et al.* 2003a, Van Doninck *et al.* 2004, Groot *et al.* 2005, Edmunds 2007, Terhivuo & Saura 2008).

Gynogenesis is an unusual mode of asexual reproduction involving the production of ameiotic eggs whose development must be triggered by the contact of sperm from relative species. The persistence of gynogens thus necessarily involves coexistence with their sexual relatives which they cannot outcompete nor outnumber (Schlupp 2005). Gynogenetic hybrids between banded killifish (*Fundulus diaphanus* Lesueur 1817) and mummichog (*F. heteroclitus* Linnaeus 1766) live in sympatry with parental species at two coastal locations in Nova Scotia, Canada (Fritz and Garside 1974a, Dawley 1992). At both locations, single site survey revealed low frequency of asexual hybrids as well as the prevalence of one main clone (allozymes: Dawley 1992, Dawley *et al.* 1999; microsatellites: Hernández Chávez & Turgeon 2007).



The natural distribution of *F. diaphanus* and *F. heteroclitus* clearly indicate their preference for low and high water salinity, respectively (Fritz & Garside 1974b, Scott & Crossman 1974). However, the ecological distribution of hybrids and clones relative to salinity is unknown. The aim of this study was to establish the distribution of hybrids along the salinity gradient present in Porter's Lake (Nova Scotia). A broad distribution of a dominant clone across this environmental gradient would argue for the presence of a GPG whereas the occurrence of many clones each in a narrow range of salinities would favour the hypothesis of specialised FNV clones.

Sampling of *Fundulus spp.* was conducted in Porter's Lake, between May 20<sup>th</sup> and June 3<sup>rd</sup>, 2007. Using a beach seine (¼ inch-mesh), fish were collected at 12 stations along the full salinity gradient present in the lake (Figure 1.1). Salinity was measured at each station and ranged from 0 to 16 ppt. At each station, the initial objective was to collect a random sample of at least 50 individuals to establish the distribution and relative abundance of the three *Fundulus* types in the lake, namely *F. diaphanus*, *F. heteroclitus*, and hybrids. Sample sizes per station varied between 41 and 201 for a total of 1091 *Fundulus* (Table 1.1). In addition, additional putative hybrids were retained in order to better estimate clonal diversity and distribution. Whole fish or anal fins were preserved in 95% ethanol (Université Laval Animal Care Committee Permit No. 2007-013).

Given that gynogens morphology overlaps with that of parental species (Fritz and Garside 1974a, Hernández Chávez & Turgeon 2007), *Fundulus* types were genetically determined. DNA was extracted from muscle or fin tissue using the method of Aljanabi and Martinez (1997). Genetic identification of *Fundulus* types was based on three microsatellite loci displaying distinct allele sizes in each parental species (*FhCA-1*, *FhCA-21*, and *Fhe57*; Hernández Chávez & Turgeon 2007), providing unambiguous and diagnostic genotypes on 2% agarose gel. PCR conditions were similar to those used in Hernández Chávez &

Turgeon (2007) but with a higher primer concentration (0.33  $\mu$ M) and a lower annealing temperature (55°C).

A total of 105 fish were genetically identified as hybrids. For each fish, the methods of Hernández Chávez and Turgeon (2007) were used to obtain detailed genotypes at eight microsatellite loci and so define clonal identity. In essence, clones are recognized as repeated multilocus genotypes (MLG) with extremely low probability of occurrence given the allelic diversity in parental species, or, when a single hybrid genotype is observed, on the basis of similarity to repeated MLGs and the presence of a *F. diaphanus* allele absent in individuals of that species in Porter's Lake (Dawley *et al.* 1999, Hernández Chávez & Turgeon 2007).

Statistical analyses were based on permutations performed with PERM 1.0 (Duchesne *et al.* 2006). The first test assessed the homogeneity of *Fundulus* type distribution within stations given the overall proportion of each type in the lake. The second test compared the relative abundance of hybrids at each station given the overall distribution of hybrid in the lake. For both tests, 100 permutations and 100 iterations were used.

One parental species was generally clearly prevailing at any given station. Out of the 1091 *Fundulus* sampled along the salinity gradient in Porter' Lake, 67.0 % (N = 731) were diagnosed as *F. diaphanus*, 28.1 % (N = 307) as *F. heteroclitus* and 4.9 % (N = 53) as hybrids (Table 1.1). Unsurprisingly, the distribution of parental species confirms each species opposite salinity preference (Fritz and Garside 1974b) and only one parental species was detected at each end of the salinity gradient (Station 1: *F. diaphanus*; Station 12: *F. heteroclitus*). *F. diaphanus* was the most abundant type at eight of the 12 stations sampled (salinity: 0 to 10 ppt), whereas *F. heteroclitus* was most abundant in the remaining four stations (salinity: 10.5 to 15 ppt). Overall, the distribution of *Fundulus* types found at each

station was homogeneous (global P-value < 0.001). However, two stations harboured types in proportions that differed from those expected if distributions were homogeneous within stations (Station 3 and 10,  $P = 0.85$  and  $P = 0.93$ , respectively). These are the two stations where neither parental species was overtly dominant, representing less than 65% of the individuals.

Hybrids were generally rare and never exceeded 15% of the captured *Fundulus* (Table 1.1). They were found at eight of the stations located in the central part of the lake, but were nevertheless present over most of the salinity gradient (0 to 14 ppt). Pairwise comparisons of hybrid abundance revealed significant differences among groups of stations. The highest proportion of hybrids was found at Station 3 (14.5%), where hybrids were significantly more frequent ( $P < 0.05$ ) than at all but two stations, namely Stations 2 (7.4%) and 9 (9.6%). It is worth noting that these three stations are not clustered geographically and span a wide range of salinities (Figure 1; 0 to 10.5 ppt). The proportion of hybrids at Station 3 is concordant with estimates reported by Fritz & Garside (1974a; 7.9%) but low if compared to those of Dawley *et al.* (2000; 14-38%). Hybrid abundance was intermediate at Stations 5 (5.7%) and 10 (5.4%) and significantly higher ( $P < 0.05$ ) than at Station 8 (1%). Comparisons involving the four stations where no hybrids were found are not significant. Sample size at these stations was low (from 41 to 55, Table 1.1), which certainly lowered statistical power. While salinity doesn't seem to be the main structuring factor of hybrid distribution, it is interesting to note that all hybrids were sampled in the middle part of the lake, at the heart of the salinity gradient. Various hypotheses could explain this distribution, such as a higher survival of hybrid eggs at intermediate salinities or release of competition with parental species in suboptimal habitat, but further research is necessary to conclude on that issue.

A total of 105 hybrids from the 2007 sampling in Porter's Lake were considered in the analysis of clonal distribution, including 52 individuals obtained from non-random

sampling. Using the criteria defined in Hernández Chávez & Turgeon (2007), nine clones were identified among the hybrids sampled in 2007 (Table 1.2). These multilocus genotypes (MLG) were repeated at least twice, they bear alleles known to be diagnostic of each parental species at most locus, and each possessed allele 179 at locus *FhCA-1*, an allele from *F. diaphanus* absent in Porter's Lake. Three MLGs were observed only once. Two of these were from station Station 11 and are suspected sexual hybrids, given that unlike all repeated MLGs, they do not possess the allele 179 at *FhCA-1* (Table 1.2; see Hernández Chávez & Turgeon 2007). Given the very strong dominance of *F. heteroclitus* at that station, hybridization may follow from the rarity of conspecific mates for *F. diaphanus*. The other unique MLG appears to be a triploid. It possessed three distinct alleles at locus *FhATG-B103*, and clearly had double dose (relative electropherogram peak height) of species specific alleles at three other loci (Table 1.2; loci *Fhe127*, *FhCA-21*, and *Fhe177*). Triploid individuals have been reported from Porter's Lake *Fundulus* hybrids but seem to be a rarity (Dawley 1992, Dawley *et al.* 1999).

The clonal assemblage documented from Porter's Lake in 2007 compares very well with data from a single site in 2004. The same clone was dominant (clone A), representing ca. 72% of hybrid individuals at the station sampled in both years (Station 3, Tables 1.1 and 1.2). Moreover, this widespread clone is accompanied by a few rare clones (four in 2004; eight in 2007), two of which were sampled on both occasions (Table 1.2). These rare clones differed from Clone A by one or two alleles.

The prevalence of Clone A over the entire range of salinities where asexuals thrive, along with the absence of any other clone particularly abundant at any other site, strongly argues for a General-Purpose Genotype (Table 1.1). Indeed, Clone A is most abundant at all but one station where asexual hybrids were found. At Station 5, a single individual of Clone A occurred, but no other clone was clearly dominant. In fact, the high genetic similarity among clones suggests that they may form a single lineage of monophyletic origin. This

contention is also supported by the fact that interspecific hybridisation is rare, as indicated by the low frequency of sexual hybrids. Altogether, these results certainly advocate against the predictions of the FNV model.

This study shows that one main clone, along with few mutational derivatives, are present at low frequency over the entire salinity gradient of Porter's Lake. However, the data from this study alone cannot prove that the main clone (or the group of clones of common origin) is a GPG. It is also important to show that the main clone is phenotypically variable and that this variation is selected for. Hernández Chávez & Turgeon (2007) found that clonal hybrids were more variable than parental species with regards to the number of scales on the lateral line. Likewise, geometric morphometrics indicate that hybrids are no less variable in shape than sympatric individuals of the parental species (see Chapitre 2). While these results testify to the relatively high phenotypic plasticity of clonal genotypes, the adaptive value of this variation has not been assessed, such that it is not yet possible to conclude that this clonal lineage has been selected for its generalist capabilities. Rather, it may simply be the descendant of single hybrid that underwent a very rare event of meiosis perturbation giving rise to gynogenesis in that particular taxon. Overall, these results are very similar to those obtained for the *Phoxinus eos-neogaeus* gynogens, where a main clone and its derivatives was distributed over a wide range of habitats and was no less morphologically variable than the parental species (Schlosser *et al.* 1998, Doeringsfeld 2004). In conclusion, these results will set the stage for further investigations on the factors explaining the paradoxical persistence of gynogen fish.



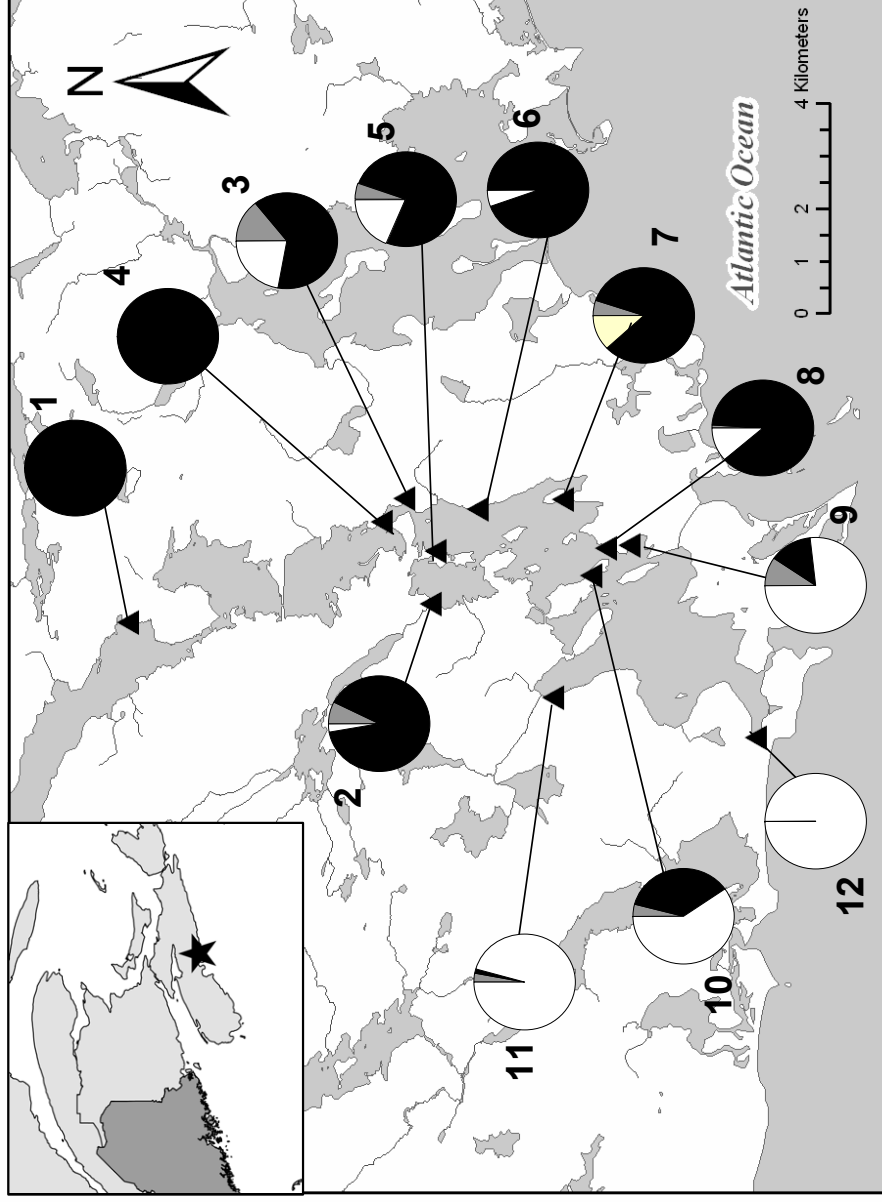
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$

<sup>1</sup> A high p-value means that the sample composition in fish type is less homogeneous than what would be expected from a random distribution of the types given the total numbers of each type in the lake. The random distribution is obtained through 100 permutations and 100 iterations in PERM 1.0 (Duchesne *et al.* 2006).

<sup>2</sup> More hybrids are presented in the right-hand side of the table (hybrid MLGs) than in the left-hand side, because hybrids (N=52) obtained through biased sampling are also considered.







**Figure 1.1:** Map of Porter's Lake, Nova Scotia, showing 12 stations sampled in 2007 and the relative proportions of the three *Fundulus* types. Proportions of *F. diaphanus*, *F. heteroclitus* and hybrids are represented respectively in the pie charts by black, white and grey sections. On the left corner, Porter's Lake is represented by a star on a general map showing Eastern Canada (light grey) and United States of America (dark grey).

## **Chapitre 2:**

**A novel maximum-likelihood method to identify hybrids on the basis of morphological features: the case of asexual hybrids between *Fundulus diaphanus* and *F. heteroclitus* (Teleost: Cyprinodontidae)**

Mérette, D., Duchesne, P., Turgeon, J.

**RÉSUMÉ** : L'identification morphologique des espèces et des hybrides présente souvent des avantages pratiques sur l'utilisation d'outils moléculaires. Une nouvelle méthode d'identification morphologique des hybrides basée sur un algorithme de vraisemblance maximale a été développée. Tout d'abord, il a été démontré avec des outils de la morphométrie traditionnelle et géométrique que *Fundulus diaphanus*, *F. heteroclitus* et leurs hybrides asexués sont morphologiquement distincts. Nous avons également noté que les hybrides n'étaient pas moins variables au niveau de la forme que leurs espèces parentales, ce qui est étonnant chez des hybrides asexués appartenant à une seule lignée clonale. Finalement, l'assignation de 270 *Fundulus spp.* à leur type génétique en utilisant la méthode d'identification morphologique s'est avérée efficace à 91.5%. Cette méthode présente un vaste potentiel d'application dans d'autres systèmes où il existe des chevauchements entre des types qui sont néanmoins morphologiquement distincts.

**ABSTRACT** : The morphological identification of species and hybrids often offers practical advantages over the use of molecular markers. A novel method of morphological identification of hybrids based on a maximum likelihood algorithm has been developed. First, it has been shown that *Fundulus diaphanus*, *F. heteroclitus*, and their hybrids are morphologically different, using traditional and geometric morphometrics. Second, we also found hybrids to be at least as variable in shape as their parental species, which is surprising for asexual hybrids belonging to a single clonal lineage. Finally, assignment of 270 *Fundulus spp.* to their genetic type using the novel morphological method of identification was 91.5% efficient. This method has a vast potential for application in other systems where differences exist among overlapping morphological types.

## 2.1) INTRODUCTION

Morphological features define the most intuitive concept of species. However, this concept has been challenged by recent advances in molecular biology (Hebert *et al.* 2003). New cryptic species are found among taxa that are morphologically similar (Mauk *et al.* 1999, King *et al.* 2008, Lue & Lin 2008), while very different morphotypes can belong to the same biological or evolutionary species (e.g. *Salvelinus alpinus*: Snorasson *et al.* 1994, *Coregonus spp.*: Turgeon *et al.* 1999, *Argania spinosa*: Majourhat *et al.* 2008, *Herichthys minckleyi*: Swanson *et al.* 2008). However imperfect it may be, morphology is nevertheless a useful means to identify species when diagnostic morphological characters exist (Dayrat 2005). Morphology-based appraisal of species status is often easier to master than molecular techniques and quicker to provide species diagnose. It also requires less equipment and can be used in field conditions.

Given the difficulty in recognizing species morphologically, identifying hybrids between two species often poses an even greater challenge. Hybrids can be morphologically intermediate between parental species (Grant & Grant 1994, Vinšálková & Gvoždík 2007, Cole *et al.* 2008), but the distinction between hybrids and parental species is often blurred by intraspecific variation overlapping with that of hybrids. Also, hybrids are not always clearly intermediate between parental species (Neff & Smith 1979, Ross & Cavender 1981, Bell & Travis 2005), and not all morphological intermediates are hybrids (Wilson 1992). As a result, problems in the morphological identification of hybrids have been encountered in a wide range of taxa, including cladocerans (e.g. *Daphnia*: Gieβler 1987), insects (e.g. *Culex*: Sanogo *et al.* 2008), fish (e.g. *Luxilus*: Meagher & Dowling 1991, *Carassius*: Igushi *et al.* 2003, *Phoxinus*: Doeringsfeld *et al.* 2004, *Cobitis*: Janko *et al.* 2007, *Chasmistes*: Cole *et al.* 2008), and plants (e.g. *Juglans*: Ross-Davis *et al.* 2007).

Hybrid fish between *Fundulus diaphanus* (Lesueur 1817) and *F. heteroclitus* (Linnaeus 1766) are known to occur in eastern Canada (Fritz & Garside 1974a, Dawley 1992, Hernández Chávez & Turgeon 2007). Most hybrids are females that reproduce through gynogenesis (Dawley 1992, Hernández Chávez & Turgeon 2007), a type of clonal reproduction that requires sperm from a related species to trigger embryogenesis without being incorporated in the egg (Shlupp 2005). Hybrids are reliably distinguished from parental species with genetic markers and past studies indicate that asexual hybrids belong to a single clonal lineage (Dawley 1992, Dawley et al. 1999, Hernández Chávez and Turgeon 2007, Chapitre 1).

In the field, however, it is difficult to identify *Fundulus* hybrids on the sole basis of morphology. Field inspection of ca. 1000 *Fundulus* fishes by trained biologists indicated that the identity of fish diagnosed as either *F. diaphanus* or *F. heteroclitus* were always genetically confirmed (Chapitre 1). However, among specimens deemed “intermediate” in morphology, only 53% were truly hybrids, the remainder being *F. heteroclitus*. Quantitative analysis of specific morphological traits has been helpful to identify hybrids, but not all hybrids are recognized with such methods. For example, the ratio between the distance from the origin of the dorsal fin to the top of the caudal peduncle and the peduncle height (DP/PH) allows identifying several hybrids (Fritz & Garside 1974a). However, while this ratio helped recognize 95% of hybrids from Saint-Mary’s River (Nova Scotia, Canada), only 56% of hybrids from Porter’s Lake (Nova Scotia) were recognized (Hernández Chávez & Turgeon 2007). Likewise, a multivariate combination of four morphological and meristic traits merged into a hybrid index provided different mean values for each type of *Fundulus* (Fritz & Garside 1974a). Yet again, hybrid values overlapped with both parental species. Moreover, this method cannot be used in the field because it necessitates fish dissection to count vertebrae and gill rakers. In all, morphological trait variation within *Fundulus* parental species overlaps with that of their hybrids, such that field identification of hybrids poses a real challenge. This problem is

particularly acute when one wants to collect several hybrids in the field because of the low lakewide proportion of hybrids (ca. 5% in Porter's Lake, Chapitre 1).

Here we describe a mixed approach where type identification is based on genetics first but then serves as basis to build a set of morphological criteria. These require little equipment and are easily applied under field conditions. First, using traditional and geometric morphometrics, we will evaluate if discrimination among the three *Fundulus* types (i.e. *Fundulus diaphanus*, *F. heteroclitus*, and their hybrids) may be done on a morphological basis. Second, having shown that such a morphological basis does exist, a maximum-likelihood assignment method for the efficient and quick identification of hybrids in the field will be described and its performance assessed. The extent and impact of hybrid morphological variation on *Fundulus* type classification will also be appraised.

## 2.2) MATERIAL AND METHODS

### 2.2.1) Data collection

*Fundulus spp.* were sampled using a beach seine or minnow traps in Porter's Lake (2004 and 2007) and in St. Mary's River estuary (2004). Both sites are in Nova Scotia, Canada, and are known to harbour the three *Fundulus* types, i.e. pure parental species *F. diaphanus* and *F. heteroclitus*, and their asexual all-female hybrids (Fritz & Garside 1974a, Dawley 1992, Hernández Chávez & Turgeon 2007). Given that all hybrids are females, only females were used in the following analyses. Individuals were diagnosed as *F. diaphanus*, *F. heteroclitus* or hybrids using a genetic method based on three diagnostic microsatellite loci (Hernández Chávez & Turgeon 2007, Chapitre 1). Color pictures of the left side of freshly caught fishes were taken using a 6 megapixel digital camera. Eighteen anatomical landmarks and semi-landmarks were selected for their easiness of recognition on all fishes (Figure 2.1). Semi-landmarks were used to increase the potential of detecting shape variation in areas where no true landmark were present. Landmarks and semi-landmarks were placed on digital pictures by a single experimenter using tpsDig software (Rohlf 2006). In all, the entire dataset comprised a total of 270 fishes, including 98 *F. diaphanus*, 86 *F. heteroclitus*, and 86 hybrids. For validation purposes, this dataset could be split by year and site (Porter's Lake 2007, N=162; Porter's Lake 2004, N=57; Saint-Mary's River 2004, N=51).

### 2.2.2) Morphological variation in *Fundulus spp.*

First, the potential of morphological variation to discriminate among the three types of *Fundulus* was assessed. Using traditional and geometric morphometrics, a Principal Component Analysis (PCA) was first performed. PCA analysis maximizes variation among

individuals without *a priori* information on type membership and so will reveal differences among *Fundulus* types only if those differences outweigh the inter-individual variation within types. Then, canonical analyses were performed on the same datasets. These analyses are informed of type membership and, consequently, are likely to provide better type separation than PCA. All analyses used the 18 landmarks and semi-landmarks defined for the entire dataset (N=270). Unless specified, all statistical analyses were done with SAS Version 9.0 (SAS Institute Inc. 2002)

For traditional morphometrics, the 153 lengths defined by the landmarks were obtained with the tmorphgen6 program from the Integrated Morphometrics Package (IMP, Sheets 2004). After the PCA, a canonical Discriminant Analysis (DA) was performed on individual coordinates for every PC axes except PC1, which represented mostly size variation among individuals (see Results). Finally, ANOVAs were performed on PCA and DA coordinates in order to test for significant differences among fish types. Moreover, a jack-knife re-assignment of all fishes using the DA functions was performed to further assess the robustness of the type separation.

In order to facilitate visual interpretation of shape differences among types, geometric morphometrics analysis was also carried out. First, a generalised least-squares Procrustes superimposition is performed using Coordgen6f (in IMP, Sheets 2004). This method creates an optimal alignment of all specimens and takes away the effects of position and size. This is done by performing rotations, translations and by scaling the individuals to unit centroid size (Rohlf & Marcus 1993, Zelditch *et al.* 2004). PCA and Canonical Variates Analysis (CVA) were performed using the PCAGen6p and CVAgen6o softwares, respectively (in IMP, Sheets 2004). PCA type separation was tested with an ANOVA using individual coordinates for each significant PC axis (Zelditch *et al.* 2004). The robustness of the CVA was assessed in two ways. First, a CVA function was created based on individuals from Porter's Lake in 2007 (N=162) and it was used to assign fish of known type caught in



2004 in Porter's Lake or Saint-Mary's River (N=57; N=51, respectively). Second, shape differences among types were further appraised by bootstrapping individual CVA assignments using canonical variates functions defined on the basis of 40% of the individuals. This subset was created randomly, and then the CVA function was used to assign the remaining 60% of individuals ("unknowns"). This operation was performed 1000 times.

Variance of geometric morphometrics PCA coordinates was used as a proxy for shape variance within *Fundulus* type. Geometric morphometrics better represents overall shape variation than the traditional morphometrics approach because it conveys more information about the geometric structure of the shape of individuals (Zelditch *et al.* 2004). Levene's test of homogeneity of variance was performed on the coordinates for each PC axis explaining more than 5% of the total variation, as suggested by Zelditch *et al.* (2004).

### **2.2.3) Field identification of hybrids: A novel maximum likelihood assignment method**

Once morphological difference among types was confirmed, a maximum likelihood approach was developed to find a set of linear measurements (and all possible ratios among them) that could be used in the field to identify *Fundulus* types. Although somewhat disputed (Albrecht *et al.* 1993), we chose to use linear measurements ratios to alleviate the effects of allometry, because field use of the method calls for simple calculations.

The general approach of the maximum likelihood assignment method comprises three steps. First, given the available dataset, classes are created for each character (linear measurement or ratio). To do so, character values from all fishes are sorted in increasing

order. If there are more than five consecutive values from the same fish type that are at the low or high end of the data spectrum, a low/high class is created. The remaining values are split into classes according to pre-defined percentiles. In this case, we defined five equally spaced percentiles. Second, frequencies of values falling in each class are calculated for each fish type. This is done for each character in the analysis. Third, the re-assignment procedure takes place. For each character, the class where an individual value falls is selected, and the frequency of observations in that class for the fish type under consideration defines the likelihood that this individual belongs to this fish type when this character is considered. This procedure is repeated for each character. Then, the likelihoods are multiplied over all characters to define the likelihood that this individual belongs to this type. Each type is considered in turn and its likelihood for that fish calculated. Each individual is assigned to the type with the highest likelihood. For a numerical example of fish classification using three linear measurements and their ratios, see Appendix I.

In order to apply the maximum likelihood approach, potentially discriminant characters had to be selected. Visual observation of the shape-shifting vectors explaining the first and second axes of the geometric morphometrics CVA (Appendix II; Figures 2.6.1, 2.6.2) revealed 37 linear measurements that contributed most to shape differences among fish types. Every possible combination of two, three and four of these linear measurements was tested with the maximum likelihood method described above. Thus, 666 two-trait combinations, 7700 three-trait combinations and 66045 four-trait combinations were tested. This process was performed in a MAPLE 11 (Maplesoft 2007) iterative procedure comparing the re-assignment efficiency of every combination. The best combination of traits was chosen on the basis of re-assignment success, frequency of appearance of each trait among the most successful combinations as well as easiness of measurements on live fishes.

Finally, a permutation-based random re-sampling procedure was used to test for the robustness of the method. The entire dataset was considered ( $N = 270$ ), but only thirty randomly selected fishes of each type were used to define class boundaries and frequency values for each fish type. Then, every specimen, including those used to create classes, was re-assigned to the fish type with the highest likelihood. This procedure was performed 150 times and the rate of correct re-assignment was evaluated at each run.

## 2.3) RESULTS

### 2.3.1) Morphological variation in *Fundulus spp.*

Traditional morphometrics PCA on linear measurements provided good separation among fish types. PC1 explained 91.5% of the variation and was discarded from the analysis because it represents mainly differences in size. PC2 and PC3 respectively explained 2.5 and 1.2% of the variation and were considered in the analysis. Differences among *Fundulus* types were significant on all three PC axes (Table 2.1), as shown on Figure 2.2. It is also worth noting that hybrids more strongly overlapped with *F. heteroclitus* than with *F. diaphanus*. Canonical DA confirmed PCA results in clearly revealing three groups (Figure 2.3). Jackknife re-assignment validated the groupings, with only one *F. heteroclitus* misclassified as a hybrid among all specimens.

The three fish types were slightly different along the first two axes of the geometric morphometrics PCA (Figure 2.4). The first PC axis represented 38.8% of the variation and was the only significant PC axis. The effect of fish type was highly significant for PC1 ( $F_{2, 267} = 324.5$ ,  $p < 0.0001$ ). Fish types were clearly different along the two first significant CV axes (Figure 2.5). The CVA assignment proved to be very robust. First, assignment of fish caught in 2004 in Porter's Lake and Saint-Mary's River using the CVA function built with the 2007 sample yielded 92.6% and 90,6% correct assignment when all fish types or only hybrids are considered. Second, the CVA function built with a subset of the individuals permitted to correctly assign 93.0% of all "unknowns" while only 3.4% of the individuals were unassigned.

Comparisons of intra-type variance along geometric morphometrics PC axes revealed that hybrids were at least as variable in shape as their parental species. Intra-type variances

along PC1 varied from  $1.71$  to  $2.82 * 10^{-4}$ , respectively, for *F. diaphanus* and *F. heteroclitus*. Hybrids had a variance of  $2.23 * 10^{-4}$  that was intermediate between parental species along that PC. Levene's test of homogeneity of variances confirmed that the variances were not heterogeneous ( $F_{2, 267} = 2.88$ ,  $P=0.058$ ), but nearly so. However, the main source of heterogeneity stemmed from the low variance of PC1 for *F. diaphanus* as compared to that for *F. heteroclitus*. Levene's test was also performed on PC2 to PC5, each of which represented more than 5% of the total variation. This was done to add some power to the conclusions based on only PC1, even though these axes were not considered significant. Hybrids had an intermediate variance between parental species on four PC axes, and the highest variance on PC3 (*F. diaphanus* =  $1.21 * 10^{-4}$ , *F. heteroclitus* =  $1.33 * 10^{-4}$ , hybrids =  $2.41 * 10^{-4}$ ). Variances were heterogeneous on PC3 ( $F_{2, 267} = 4.03$ ,  $P = 0.019$ ) but not so on all four other PCs. All together, there is good evidence that hybrid shape variation is at least as important as that of parental species.

### **2.3.2) Field identification of hybrids: A novel maximum likelihood assignment method**

No two-trait combination allowed correct assignment of *Fundulus* type with a 90% success rate. However, 40 three-trait combinations had an assignment success rate over 90%. Testing for four-trait combinations confirmed that an asymptotic success rate had already been reached with three-trait combinations. Given that we wish to use this method in the field, there seems to be no advantage in taking four rather than three measurements.

There were many good three-trait combinations, which gives the user flexibility in the selection of the combination to use on the field. Here, the 13-17, 16-18 and 17-18 combination was selected. These lengths represent classic anatomical features on fish: 13-17 is the length between the anterior insertion of the dorsal fin to the dorsal end of the

caudal peduncle (DP in Fritz & Garside 1974a), 16-18 is the length between the posterior insertion of the anal fin to the ventral end of the caudal peduncle (AP) and 17-18 is the peduncle height (PH in Fritz & Garside 1974a). Many reasons justified this choice of trait combination. First, it yielded a very good assignment success rate of 91.5% for all fishes and of 87.0% for hybrids. Second, each of these three traits was widely represented in the best three-trait combinations, with lengths 13-17 and 17-18 present in 72.5 and 67.5% of the best 40 three-trait combinations, respectively. Finally, these three lengths are easy to measure on live fish without harming them (measurements on the head are not recommended). Class boundaries and frequencies are presented in Appendix I (Table 2.5.1).

The selected combination of traits allowed robust identification of fish type. Indeed, the permutation-based random re-sampling procedure yielded an average overall assignment success of 89.8% (from 87.0 to 92.2% per iteration). This confirms that the method is stable no matter which specimens are used to make up the categories, and that it can be used to assign fishes not used to define class boundaries and frequencies, e.g. from a different sampling event.

An interesting finding from this last test is that the assignment success of hybrids using re-sampling is much more variable than the overall assignment success, ranging from 76.7 to 89.5%, with an average of 82.5%. The variance on the percentage of hybrids correctly assigned at each iteration is 6.4, which is almost six times higher than the variance for the overall assignment percentage (variance of 1.1).

## 2.4) DISCUSSION

Traditional and geometric morphometrics approaches established that *F. diaphanus*, *F. heteroclitus* and their hybrids are truly different morphologically. Type morphologies overlap, especially so between *F. heteroclitus* and the asexual hybrids. This is concordant with the type of errors made in the field when simple visual inspection is used to identify types. However, the overlap is reduced drastically when DA or CVA were performed, confirming significant differences in morphology. No confusion between the two parental species was observed in any of the multivariate analyses.

The maximum-likelihood assignment method developed in this study offers a practical field alternative to the burden of traditional and geometric morphometrics, which allowed *Fundulus* type identification but cannot be used in the field. In fact, since each PCA/CVA coordinate combines numerous measurements, the calculation of such coordinates in the field is not feasible. Moreover, the new method offers both power and flexibility. Indeed, 40 three-trait combinations allowed assigning ca. 90% of the fishes to their true type. Interestingly, the three traits that we selected (13-17, 16-18, 17-18, Figure 2.1) have already been used in hybrid and species recognition. Fritz and Garside (1974a) used the 13-17/17-18 ratio to define *F. diaphanus* X *F. heteroclitus* hybrids. Likewise, Scott & Crossman (1974) used the relative position of the anal and dorsal fins as a character discriminating *F. diaphanus* and *F. heteroclitus*. Therefore, our method relies on morphological traits known to contribute to define each type, but that our algorithm relates in a new and efficient way. Indeed, using classes and frequencies defined by our analysis (Appendix I), a simple program can be coded in a graphic calculator or on a field laptop and be used while sampling. The user would be prompted to write down the three measurements, the only information necessary for the machine to immediately provide *Fundulus* type diagnosis.

Moreover, we believe that this maximum-likelihood assignment method has the potential to be applied not only on other hybrid systems, but to other classification schemes. Indeed, as long as the types under consideration are truly different, classes of values and frequencies of occurrence within each type can be calculated to apply the logic of maximum-likelihood assignment. Certainly, types could be defined by morphological differences among species, ecotypes, age classes, etc. It can also be envisioned that differences may be defined along variables such as hormone concentrations, enzymatic activities or color as measured by a wavelength.

With respect to the biological oddity that asexual all-female hybrid fish represent among metazoans, the morphological variation of hybrid *Fundulus* deserves some attention. Two results suggest that *Fundulus* hybrids are at least as variable in shape as the parental species, a result that is all the more surprising given that 97% of asexual *Fundulus* belong to a single clonal lineage in Porter's Lake (Hernández Chávez and Turgeon 2007, Chapitre 1). First, intra-type shape variance of hybrids was intermediate or larger than that of parental species when PCA scores were considered. Second, when testing the robustness of the maximum-likelihood method with a re-sampling procedure, the variance in the assignment success of hybrids was nearly six times larger than when considering all *Fundulus* types. In other words, the assignment of hybrids is more sensitive to the sample used to define classes, suggesting that intra-type morphological variation for the characters selected in the analysis was greater among hybrids. In fact, this variability might set the upper limit of morphological assignment efficiency. Finally, these observations parallel a result obtained for a meristic trait, the number of scales on the fish lateral line, which presented a higher variance in hybrids than in parental species (Hernández Chávez & Turgeon 2007).

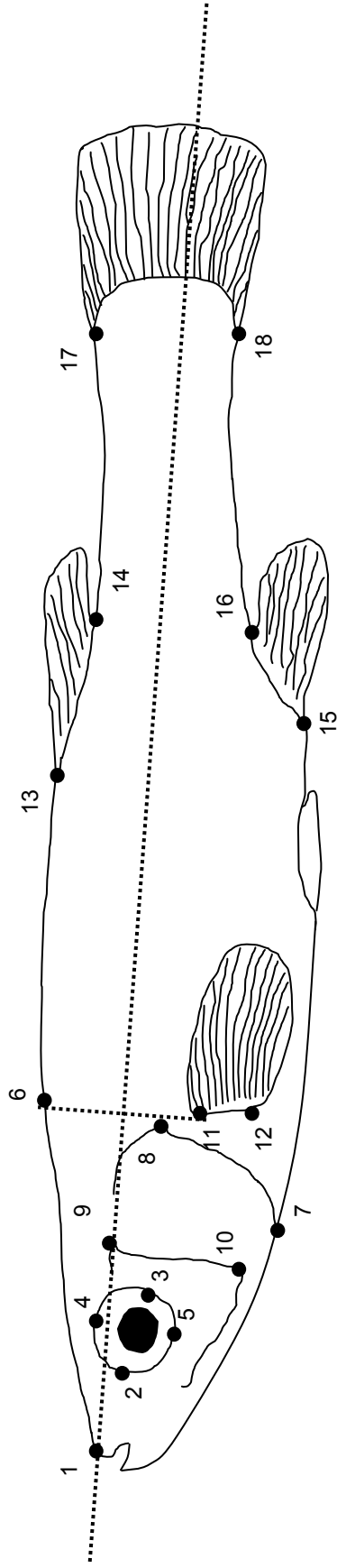
The high morphological variability of hybrids is really surprising, given that these fish are asexual and that all clones come from a single lineage (Dawley *et al.* 1999, Hernández Chávez & Turgeon 2007, Chapitre 1). Similar results have been seen for *Phoxinus eos* X P.



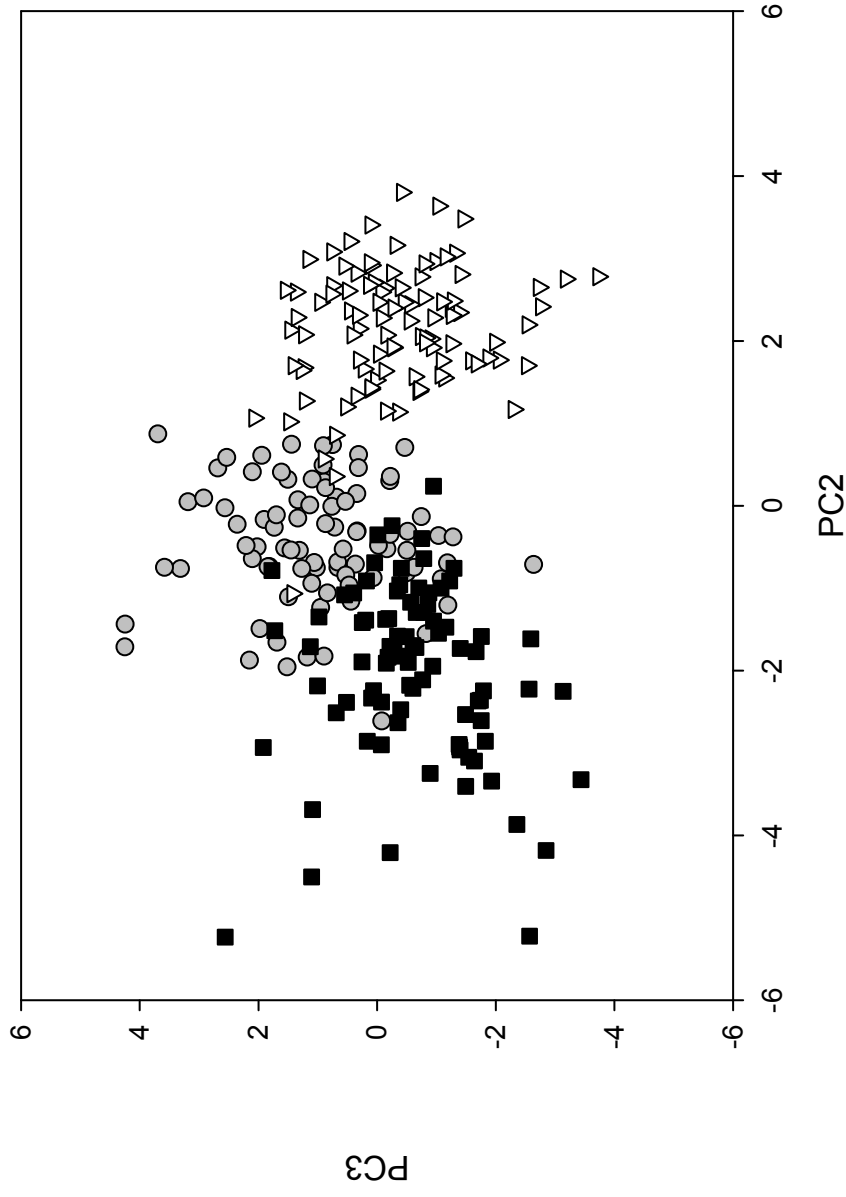
*neogaeus* asexual hybrids, where it has been shown that clonal hybrids from one sole lineage were as variable as their parental species for two size-free multivariate body shape axes (Doeringsfeld *et al.* 2004). Such high variability among clonal individuals from a single lineage suggests a large phenotypic plasticity of their genome. Further research could be done to test the origin of this plasticity. The first hypothesis is that the phenotypic variation among clonal individuals is due to developmental chaos linked to incompatibilities in the parental genomes and thus would be similar in all hybrid lineages. The alternative is that plasticity itself could be a trait selected for, and that the clones present would have been selected for their variability over time, thus bringing some evidence towards the general-purpose genotype hypothesis for the persistence of asexuals (Baker 1965, Lynch 1984).

**Table 2.1:** ANOVA table for the effect of *Fundulus* type on traditional morphometrics PCA axes obtained using 153 linear measurements taken on 270 *Fundulus* spp.

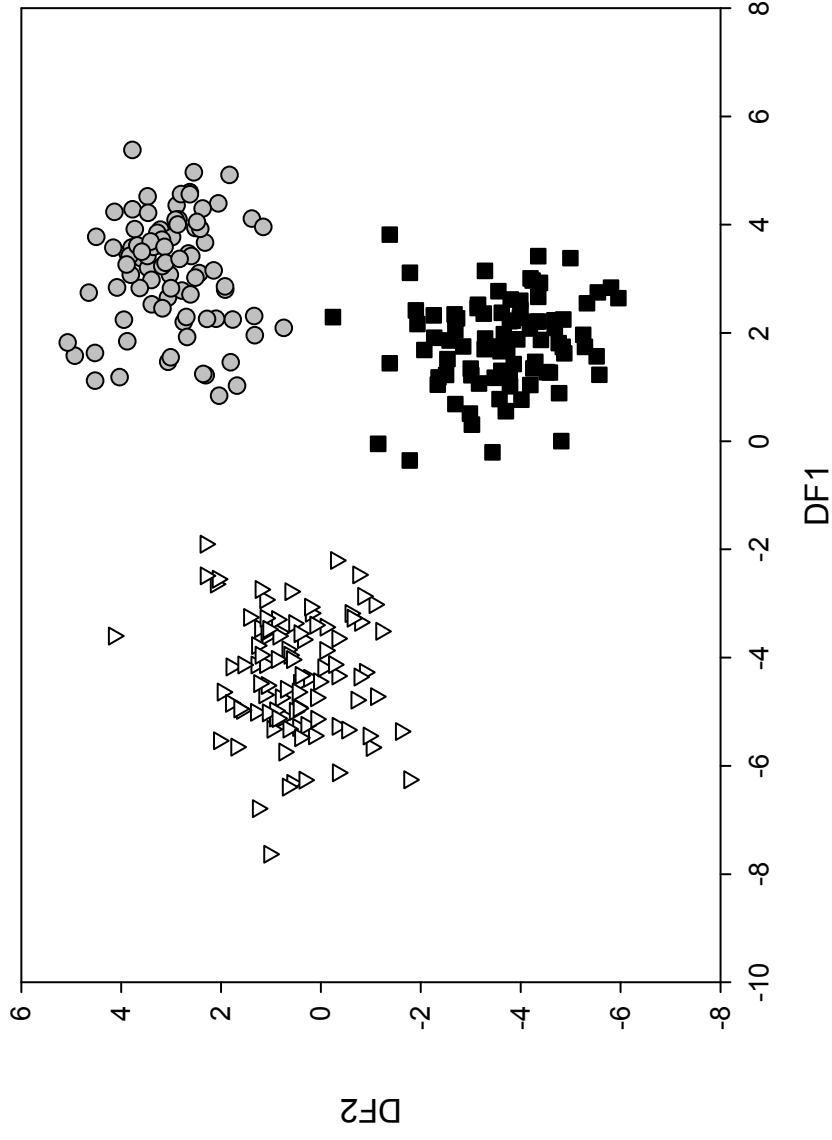
	Source	d. f.	Sum of Squares (SS)	Mean Square (MS)	F-value	p-value
PC1	<i>Fundulus</i> type	2	2499.41	1249.71	9.49	< 0.0001
	Error	267	35145.69	131.63		
	Total	269	37645.10			
PC2	<i>Fundulus</i> type	2	821.85	410.92	555.63	< 0.0001
	Error	267	197.46	0.74		
	Total	269	1019.31			
PC3	<i>Fundulus</i> type	2	127.38	63.69	45.28	< 0.0001
	Error	267	375.56	1.41		
	Total	269	502.94			



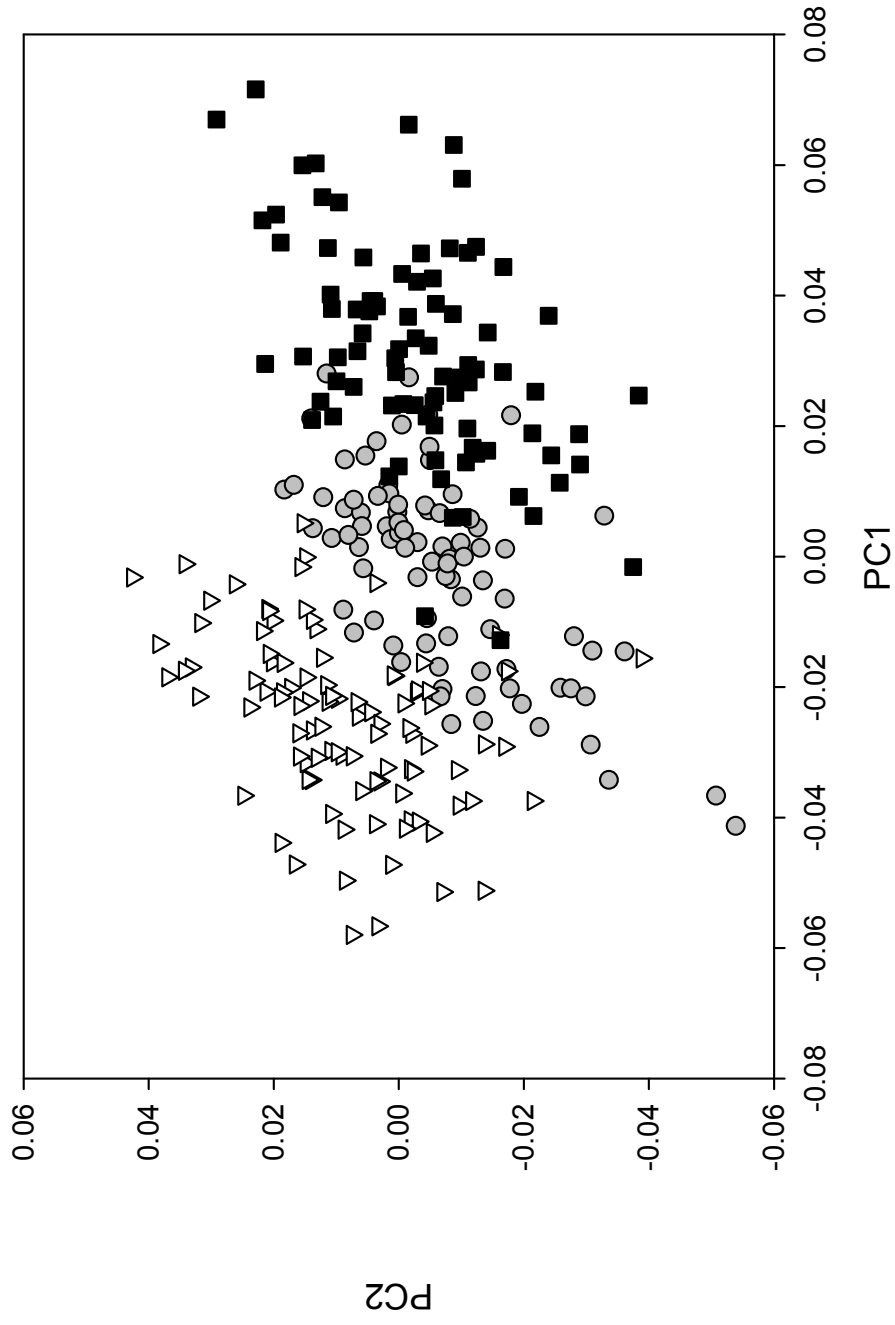
**Figure 2.1:** Eighteen landmarks and semi-landmarks on the left side of a *Fundulus diaphanus* X *F. heteroclitus* hybrid. The dashed line represents the body axis, defined as the straight line between landmark 1 and the mid-distance between landmarks 14 and 16. Landmarks are defined as follows: **1**, tip of the upper jaw; **8**, posterior extent of the operculum; **9**, **10**, dorsal and ventral extent of the preoperculum; **11**, **12**, dorsal and ventral insertions of the pectoral fin; **13**, **14**, anterior and posterior insertions of the dorsal fin; **15**, **16**, anterior and posterior insertions of the anal fin; **17**, **18**, dorsal and ventral ends of the caudal peduncle. Semi-landmarks are: **2**, **3**, **4**, **5**, anterior, posterior, dorsal and ventral ends of the eye, using body axis as reference; **6**, projection of landmark 11, perpendicular to body axis; **7**, ventral end of the operculum.



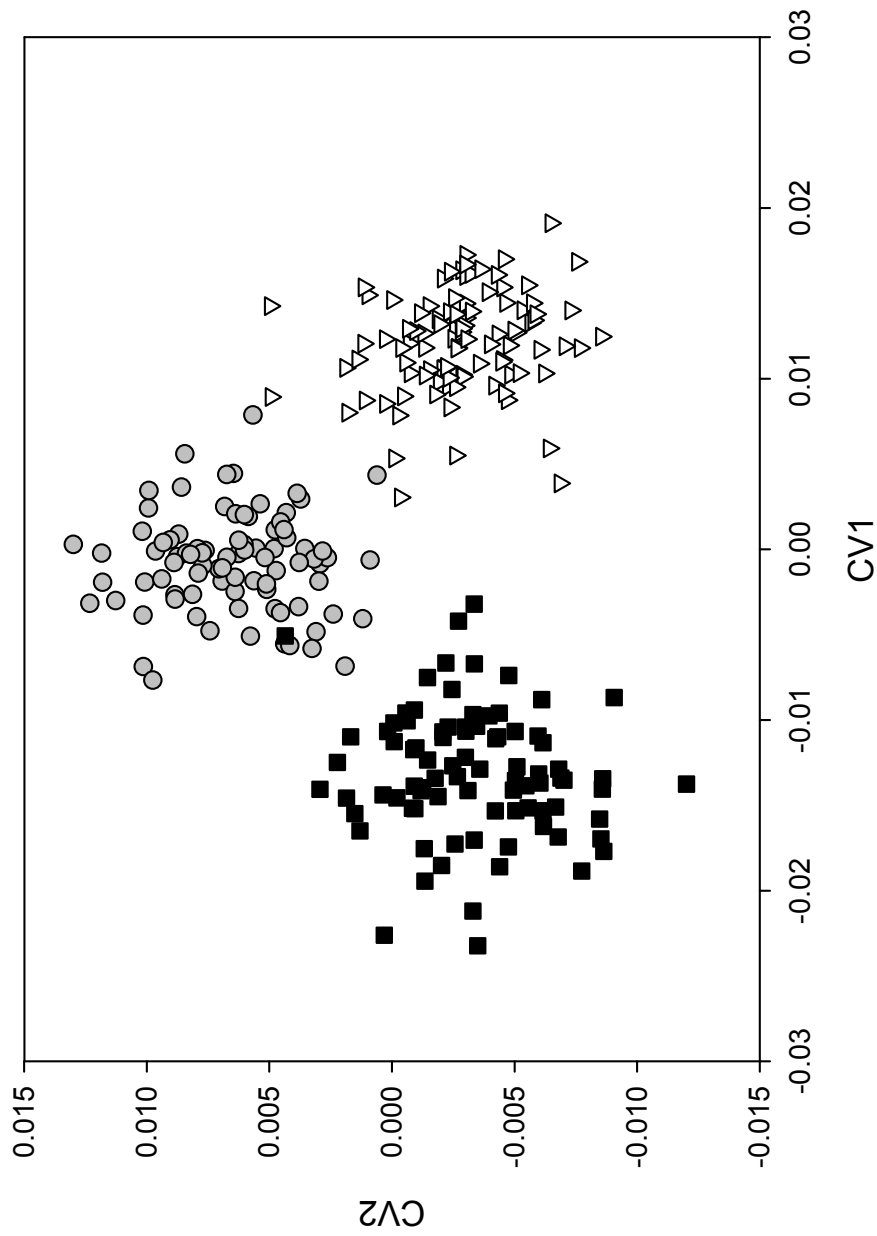
**Figure 2.2** : Individual fish coordinates on traditional morphometrics PCA axes 2 and 3 defined by 153 linear measurements (N=270 *Fundulus spp.* from Porter's Lake, 2004 and 2007, and Saint-Mary's River, 2004). *F. diaphanus* are represented by white triangles, *F. heteroclitus* by black squares and hybrids by grey circles.



**Figure 2.3 :** Individual fish coordinates on traditional morphometrics canonical DA axes 1 and 2 (N=270 *Fundulus* spp. from Porter's Lake, 2004 and 2007, and Saint-Mary's River, 2004). *F. diaphanus* are represented by white triangles, *F. heteroclitus* by black squares and hybrids by grey circles.



**Figure 2.4:** Individual fish coordinates on geometric morphometrics PCA axes 1 and 2 defined by 18 landmarks and semi-landmarks (N=270 *Fundulus* spp. from Porter's Lake, 2004 and 2007, and Saint-Mary's River, 2004). *F. diaphanus* are represented by white triangles, *F. heteroclitus* by black squares and hybrids by grey circles.



**Figure 2.5:** Individual fish coordinates on geometric morphometrics CVA axes 1 and 2 defined by 18 landmarks and semi-landmarks (N=270 *Fundulus* spp. from Porter's Lake, 2004 and 2007, and Saint-Mary's River, 2004). *F. diaphanus* are represented by white triangles, *F. heteroclitus* by black squares and hybrids by grey circles.

## 2.5) APPENDIX I

**Table 2.5.1:** Maximum likelihood assignment method for *Fundulus spp.* Frequencies of values for each character in each class and for each *Fundulus* type (see Material and Methods). Frequencies are shown for the selected characters (traits and ratios, see Results), and an example of assignment is given below the table.

Character (see Figure 2.1)	<i>Fundulus</i> type	Class boundary values (cm)						
		Low	I	II	III	IV	V	High
			0	1.8353	2.2035	2.4064	2.6865	3.4755
			1.8352	2.2034	2.4063	2.6864	3.4754	∞
13-17	Hybrid		0.116	0.128	0.279	0.279	0.198	0.001
	<i>F. diaphanus</i>		0.051	0.102	0.173	0.204	0.327	0.143
	<i>F. heteroclitus</i>		0.419	0.349	0.116	0.081	0.035	0.001
			0	1.2227	1.5122	1.6788	1.8459	2.4834
			1.2226	1.5121	1.6787	1.8458	2.4833	∞
16-18	Hybrid		0.116	0.093	0.279	0.291	0.221	0.001
	<i>F. diaphanus</i>		0.061	0.143	0.214	0.204	0.316	0.061
	<i>F. heteroclitus</i>		0.419	0.360	0.093	0.093	0.035	0.001
			0	0.5683	0.6595	0.7329	0.8484	
			0.5682	0.6594	0.7328	0.8483	∞	
17-18	Hybrid		0.174	0.105	0.279	0.267	0.174	
	<i>F. diaphanus</i>		0.224	0.265	0.184	0.143	0.184	
	<i>F. heteroclitus</i>		0.198	0.221	0.140	0.198	0.244	



Character (see Figure 2.1)	<i>Fundulus</i> type	Class boundary values (cm)						
		Low	I	II	III	IV	V	High
			0	1.4012	1.4495	1.5004	1.5507	
			1.4011	1.4494	1.5003	1.5506	∞	
13-17/16-18	Hybrid		0.384	0.291	0.174	0.105	0.047	
	<i>F. diaphanus</i>		0.041	0.092	0.204	0.327	0.337	
	<i>F. heteroclitus</i>		0.198	0.233	0.221	0.151	0.198	
			0	2.7069	3.0968	3.4508	3.7315	4.0361
			2.7068	3.0967	3.4507	3.7314	4.0360	∞
13-17/17-18	Hybrid		0.001	0.221	0.419	0.221	0.116	0.023
	<i>F. diaphanus</i>		0.001	0.001	0.010	0.224	0.337	0.429
	<i>F. heteroclitus</i>		0.628	0.279	0.070	0.023	0.001	0.001
			0	1.8565	2.1604	2.3421	2.5250	2.6590
			1.8564	2.1603	2.3420	2.5249	2.6589	∞
16-18/17-18	Hybrid		0.001	0.233	0.302	0.233	0.116	0.116
	<i>F. diaphanus</i>		0.001	0.010	0.092	0.224	0.337	0.337
	<i>F. heteroclitus</i>		0.616	0.256	0.093	0.023	0.001	0.012

### **Numerical example of the maximum likelihood assignation method:**

In order to illustrate the method, consider a particular fish genetically identified as a hybrid (POR07-266). The observed values for characters 13-17, 16-18 and 18-19 are 2.2424 cm, 1.6669 cm, and 0.7231 cm, respectively. Ratios 13-17/16-18, 13-17/17-18 and 16-18/17-18 are 1.3453, 3.1011 and 2.3052, respectively.

Looking at Table 2.5.1, one sees that the value for 13-17 (2.2424 cm) falls between 2.2035 and 2.4063 cm, which define class III. The frequencies of class III values is 0.279 in hybrids, 0.173 in *F. diaphanus* and 0.116 in *F. heteroclitus*.

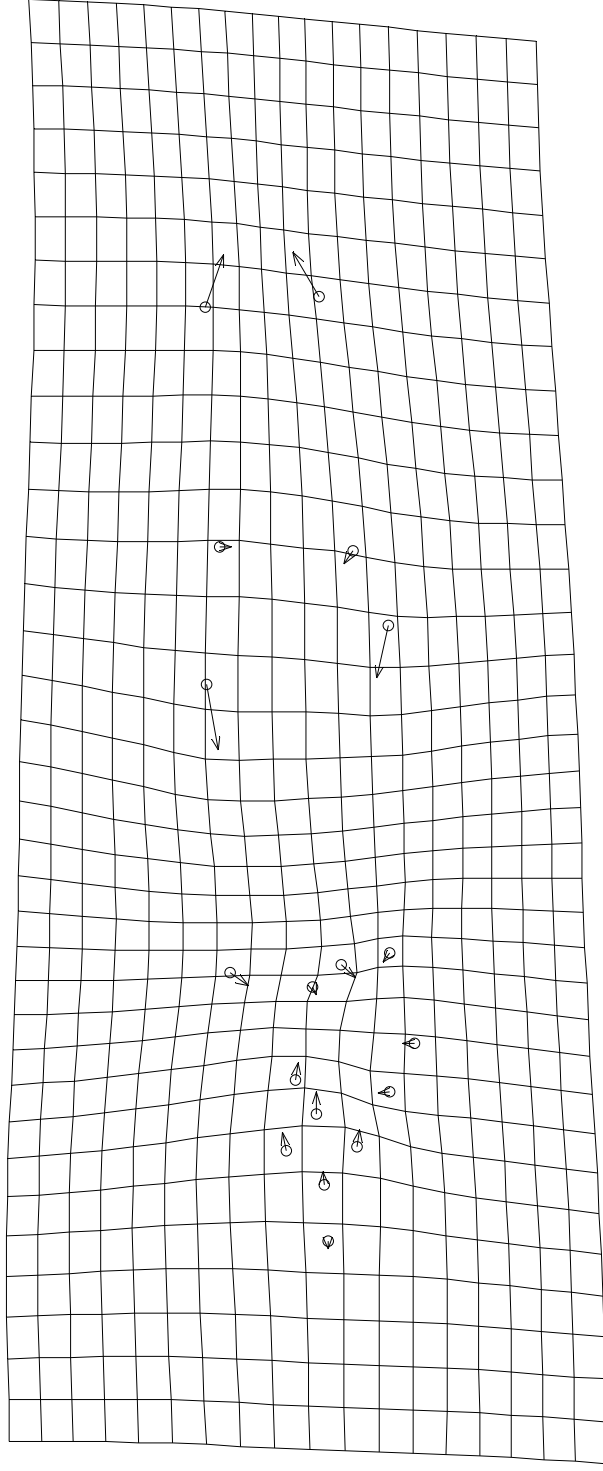
The same procedure is done for each character to determine the frequency of this fish value in the appropriate class. Then, the frequencies for each character are multiplied for each type of fish.

Thus, the likelihood that this particular fish belongs to each type is:

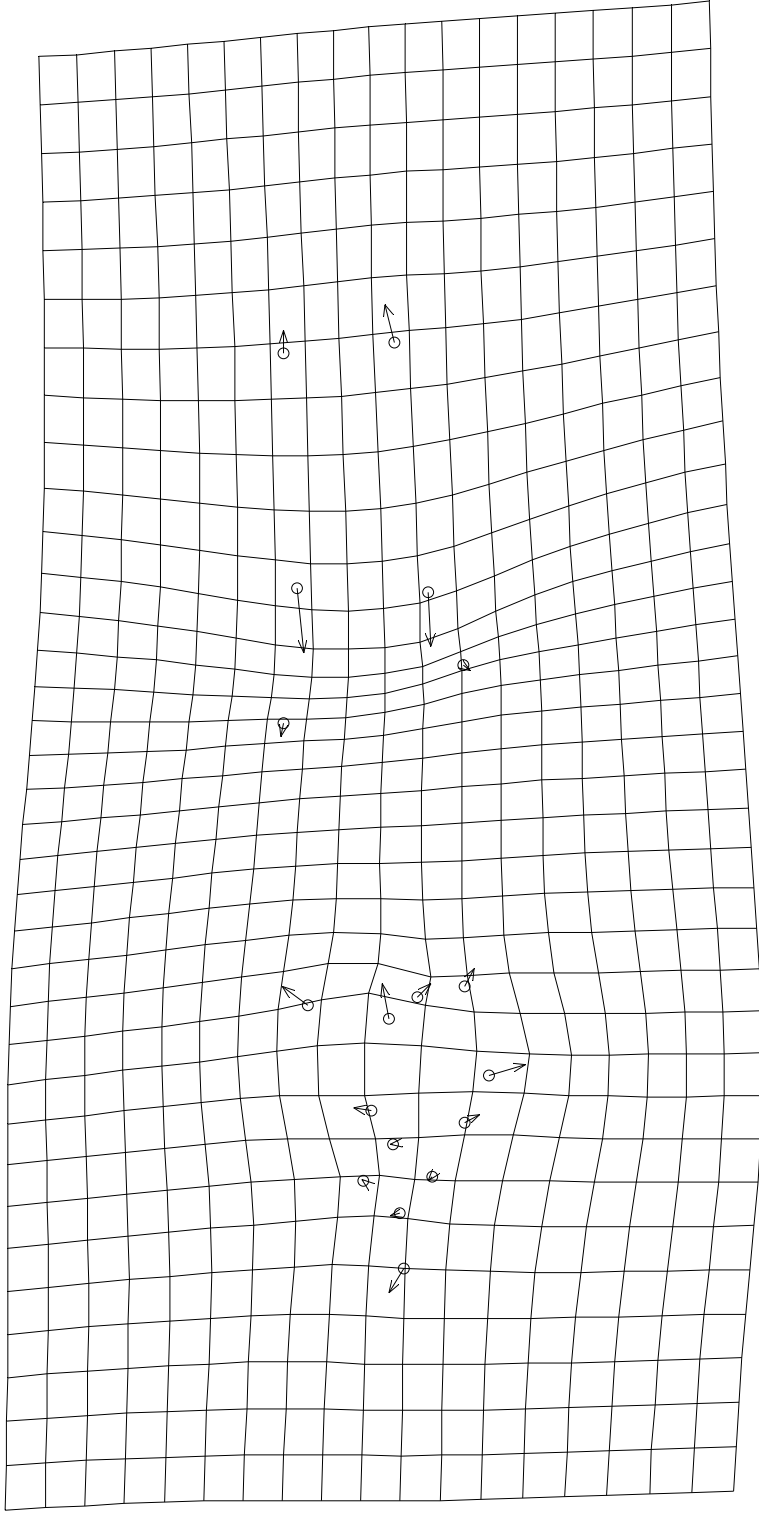
- Hybrid =  $0.279 * 0.279 * 0.279 * 0.384 * 0.419 * 0.302 = 1.06 * 10^{-3}$
- *F. diaphanus* =  $0.173 * 0.214 * 0.184 * 0.041 * 0.010 * 0.092 = 2.56 * 10^{-7}$
- *F. heteroclitus* =  $0.116 * 0.093 * 0.140 * 0.198 * 0.070 * 0.093 = 1.95 * 10^{-6}$

The highest likelihood is obtained for the hybrid morphotype. Thus, POR07-266 is classified as a hybrid.

## 2.6) APPENDIX II



**Figure 2.6.1:** Vectors explaining morphological variation along CV1 for all fishes (N=270). The origin of each vector is a landmark or a semi-landmark.



**Figure 2.6.2:** Vectors explaining morphological variation along CV2 for all fishes ( $N=270$ ). The origin of each vector is a landmark or a semi-landmark.

## Conclusion générale

### c.1) Hypothèse du génotype généraliste et hybrides *Fundulus diaphanus* X *F. heteroclitus*

L'objectif premier de la présente étude était de vérifier si parmi les hybrides asexués entre *F. diaphanus* et *F. heteroclitus* on retrouvait des individus possédant les caractéristiques de génotypes généralistes (Doeringsfeld 2004, Haack *et al.* 2000, Lynch 1984). Pour ce faire, il fallait établir la répartition des différents clones dans le milieu naturel en lien avec une variable environnementale (Chapitre 1). De plus, on voulait tester la plasticité phénotypique des hybrides asexués, en évaluant la variabilité morphologique (Chapitre 2) et la capacité d'acclimatation à des chocs osmotiques (Annexe).

La répartition des différents clones le long d'un gradient de salinité a été établie à Porter's Lake. Ainsi, nous avons observé une faible diversité clonale (soit un total de 11 clones potentiels, si on inclut les échantillonnages de 2004 et 2007) dont un se détachait du lot en représentant 72% de tous les clones. Le clone principal se retrouvait dans plusieurs stations différentes et dans une grande variété de salinités (de 0 à 12.5 ppt). Par ailleurs, les autres clones ne différaient du clone principal que pour un ou deux allèles des huit loci examinés, ce qui peut laisser supposer qu'il s'agit de dérivés mutationnels. Ainsi, nous pourrions être en présence d'un groupe de clones généralistes, possédant les mêmes gènes importants sur le plan de l'écologie, tel qu'avancé par Van Doninck (2004) en parlant de clones d'ostracodes du genre *Darwinula*. Par ailleurs, la question de la variabilité morphologique des hybrides asexués a été abordée, et nous en sommes venus à la conclusion que les hybrides n'étaient pas moins variables que les espèces parentales au niveau de la forme, malgré le fait qu'ils possèdent une diversité génétique moindre que ces derniers. De plus, on se souvient que Hernández Chávez et Turgeon (2007) ont démontré que le nombre

d'écailles sur la ligne latérale était plus variable chez les hybrides que chez les espèces parentales. Donc, la plasticité phénotypique des hybrides au niveau de la morphologie semble assez importante. Cependant, nous ne disposons pas encore d'indices sur le fait que la variabilité morphologique puisse être fonctionnelle, et encore moins sélectionnée. Il s'agit toutefois d'un indice sur le potentiel de génération de variabilité phénotypique du génome des clones, puisqu'un clone représentait la majorité des hybrides retrouvés et que les autres génotypes hybrides semblent être des dérivés mutationnels de ce dernier. Afin de vérifier si la variabilité des hybrides pouvait être écologiquement utile, nous avons choisi de comparer l'aptitude à l'acclimatation à un changement de salinité chez les hybrides à celle des espèces parentales en mesurant l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase suite à un changement brusque de salinité. Malheureusement, pour des raisons discutées dans l'Annexe, cette expérience n'a pas donné de résultats concluants, puisque nous n'avons noté aucun effet significatif de la salinité sur l'activité de l'enzyme.

En conclusion, nous pouvons avancer que le clone principal (ou le groupe de clones) possède des caractéristiques attribuables à un génotype généraliste, comme une répartition dans des milieux variés (salinités différentes) et une variabilité morphologique importante. Malgré tout, le manque de preuve concernant l'aptitude supérieure du clone principal face à une variété de conditions en comparaison avec des hybrides F1, des clones secondaires et des individus de chacune des espèces parentales empêche de conclure définitivement sur la question. Par ailleurs, il est très probable que le clone principal soit l'ancêtre de tous les autres clones observés à Porter's Lake, et que sa présence ne soit due qu'à la rareté des événements menant à l'apparition de la gynogenèse dans le système et non à des qualités intrinsèques qui lui confèreraient un avantage sur d'autres clones.

### **c.2) Apprentissages concrets sur le système *F. diaphanus*, *F. heteroclitus* et leurs hybrides pouvant aider aux échantillonnages futurs**

Outre la démarche théorique en lien avec la persistance de l'asexualité, le présent projet de maîtrise a fait avancer les connaissances sur le système *F. diaphanus*, *F. heteroclitus* et leurs hybrides asexués, un système encore bien peu documenté. De celles-ci, la méthode d'identification morphologique des types de *Fundulus*, présentée au Chapitre 2, est la plus intéressante. Cette méthode a permis d'assigner correctement plus de 90% des poissons à leur type véritable grâce à la morphologie. Celle-ci étant facilement applicable sur le terrain, elle pourrait s'avérer d'une aide précieuse afin de sélectionner rapidement des individus pour différentes expériences sur des poissons vivants, sans devoir génotyper un grand nombre de poissons qu'il faudrait soit maintenir isolés, soit marquer, en attente du diagnostic moléculaire.

D'autre part, l'observation de la répartition relative des trois types de *Fundulus spp.* à Porter's Lake a permis de mieux connaître les sites d'échantillonnage potentiels pour de futures recherches, en donnant une idée approximative des sites à plus forte présence d'hybrides asexués. La présence d'une seule des deux espèces pures dans les sites aux extrêmes du spectre de salinité du lac a été confirmée, de même que l'absence, ou à tout le moins la grande rareté, des hybrides à chacune des deux extrêmes. Par ailleurs, les hybrides sexués semblent peu abondants, représentant seulement deux individus sur les 105 hybrides détectés.

### **c.3) Portée scientifique et avenues de recherche possibles**

La portée de mon travail dépasse le cadre du seul système étudié. Tout d'abord, mes recherches sur l'hypothèse du génotype généraliste s'inscrivent dans une démarche plus vaste d'explication de la persistance de lignées asexuées. Bien que la théorie du génotype généraliste ait été formulée il y a déjà de nombreuses années, les exemples bien documentés ne sont pas légion (Doeringsfeld *et al.* 2004, Haack 2000, Terhivuo et Saura 2008, Vorburger *et al.* 2003a), et les preuves avancées ne sont pas toujours convaincantes. Ma contribution est un ajout non négligeable à la réflexion sur ce sujet. De plus, mon projet de maîtrise ouvre la porte à d'autres travaux sur la question. Tout d'abord, il est certain qu'une étude plus détaillée des stations échantillonnées pour l'étude de répartition des hybrides (en étudiant la végétation, le type de substrat, le contenu en O<sub>2</sub> de l'eau, les variations de température et de salinité pendant toute la période active des poissons) pourrait permettre de trouver un facteur expliquant la présence plus ou moins grande d'hybrides dans chaque station. Également, des comparaisons de contenu stomacal entre les hybrides et les espèces parentales permettraient de tester la sélectivité dans l'exploitation des ressources alimentaires. D'autre part, je trouverais particulièrement pertinente la mise en place d'expériences en milieu contrôlé. Parmi celles-ci, la génération d'hybrides par croisement entre les deux espèces parentales serait un point de départ intéressant pour toutes sortes d'autres recherches, à commencer par une vérification de la possibilité de générer de nouvelles lignées gynogènes. Dawley *et al.* (1999) avaient produit des hybrides F1 en milieu expérimental, dont aucun ne s'est avéré gynogène, mais le faible nombre d'hybrides générés (N=6) ne permet pas de conclure sur la rareté des événements donnant lieu à l'apparition de nouvelles lignées asexuées. Par ailleurs, le clone principal pourrait être comparé aux hybrides F1 générés et aux clones secondaires, de même qu'aux espèces parentales, en ce qui a trait à des réponses physiologiques à différents niveaux de variables environnementales (salinité, oxygène, température, etc.), afin de vérifier si le clone principal possède un potentiel d'occuper une niche plus vaste que les autres. De même, on pourrait vérifier si les hybrides F1 sont plus ou moins variables morphologiquement que les



lignées clonales, ce qui permettrait de tester si la grande variabilité observée chez les clones est due à de l'instabilité développementale des hybrides en général ou à des propriétés particulières des combinaisons génétiques des clones retrouvés en nature. De même, il serait intéressant de comparer le nombre de larves ainsi que la survie des juvéniles pour tous les types (*F. diaphanus*, *F. heteroclitus*, hybrides F1, clone principal, clones secondaires) lorsque les œufs sont incubés dans différentes conditions de salinité, température et oxygène. Dans un autre ordre d'idée, des études sur le choix de partenaire pourraient assez facilement être réalisées sur des mâles des espèces parentales en présence de femelles hybrides gynogènes, de femelles conspécifiques et hétérospécifiques. Avec ces données en main, nous aurions une bonne idée de la valeur adaptative de chaque type dans différentes conditions, et une meilleure connaissance des forces et des faiblesses du clone principal.

La méthode d'identification morphologique des hybrides sur la base d'un algorithme de vraisemblance maximale s'est avérée très puissante sur le système étudié. Ce qui est d'un intérêt particulier est que cette méthode est aisément transposable à plusieurs systèmes d'hybrides, l'algorithme étant très flexible. La seule condition essentielle est que les types doivent absolument être différents morphologiquement, ce qui n'est pas toujours le cas. Sinon, l'algorithme pourrait être utilisé avec des variables autres que des mesures linéaires, telles que couleurs, traits méristiques ou activités enzymatiques, sans devoir subir plus que des modifications mineures. Cette méthode présente un vaste éventail de possibilités en ce qui a trait à l'identification des hybrides et, d'une manière plus large, à la classification d'espèces, d'écotypes ou de stades de vie.

Pour terminer, un petit mot pour aborder le travail qui a été effectué au niveau de la physiologie des *Fundulus spp.* Les résultats de mes mesures d'activité enzymatiques n'ont pas donné les résultats escomptés, particulièrement en ce qui a trait au lien entre salinité et activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, puisque trop de variance brouillait généralement le signal à

observer. Toutefois, des tendances par espèce ont été observées pour les trois enzymes mesurées. L'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase s'est avérée significativement plus faible pour *F. diaphanus* que pour les deux autres types en présence. Toutefois, c'est l'activité de la CCO et de la MDH qui s'avèrent des pistes plus intéressantes, les hybrides présentant des activités significativement différentes des deux espèces parentales pour chacune. Alors que la CCO présente un niveau d'activité intermédiaire pour les hybrides (effet apparemment additif), on observe un effet potentiel de dépression hybride pour ce qui est de la MDH. Un portrait plus vaste incluant d'autres enzymes dont l'origine est nucléaire, mitochondriale ou mixte pourrait permettre d'élargir notre compréhension des subtiles relations de coévolution entre le génome nucléaire et mitochondrial ainsi qu'à l'intérieur du génome nucléaire de chacune des espèces.

## Bibliographie

- Able, K. W. & Palmer, R. E. (1988). Salinity effects on fertilization success and larval mortality of *Fundulus heteroclitus*. *Copeia* **2**, 345-350.
- Albrecht, G. H., Gelvin, B. R. & Hartman, S. E. (1993). Ratios as a size adjustment in morphometrics. *American Journal of Physical Anthropology* **91**, 441-468.
- Aljanabi, S. M. & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* **25**, 4692-4693.
- Angers, B. & Schlosser, I. J. (2007). The origin of *Phoxinus eos-neogaeus* unisexual hybrids. *Molecular Ecology* **16**, 4562-4571.
- Baker, H. G. (1965). Characteristics and modes of origin of weeds. In *The genetics of colonizing species* (Stebbins, H. G. B. a. G. L., ed.), pp. 147–168. New York: Academic Press.
- Barton, N. H. & Charlesworth, B. (1998). Why Sex and Recombination? *Science* **281**, 1986-1990.
- Bell, G. (1982). *The Evolution and Genetics of Sexuality*. Berkeley and Los Angeles: University of California Press. 635 p.
- Bell, M. A. & Travis, M. P. (2005). Hybridization, transgressive segregation, genetic covariation, and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 358-361.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. New York, NY: W.H Freeman and Company. 974 p.
- Beukeboom, L. W. & Vrijenhoek, R. C. (1998). Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis. *Journal of Evolutionary Biology* **11**, 755-782.

- Blier, P. U. & Lemieux, H. (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **171**, 247-253.
- Carmona, J. A., Sanjur, O. I., Doadrio, I., Machordom, A. & Vrijenhoek, R. C. (1997). Hybridogenetic reproduction and maternal ancestry of polyploid Iberian fish: the *Tropidophoxinellus alburnoides* complex. *Genetics* **146**, 983-993.
- Cole, D. D., Mock, K. E., Cardall, B. L. & Crawl, T. A. (2008). Morphological and genetic structuring in the Utah Lake sucker complex. *Molecular Ecology* **17**, 5189-5204.
- Cullum, A. J. (1997). Comparisons of physiological performance in sexual and asexual whiptail lizards (genus *Cnemidophorus*): implications for the role of heterozygosity. *American Naturalist* **150**, 24-47.
- Dawley, R. M. (1992). Clonal hybrids of the common laboratory fish *Fundulus heteroclitus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 2485-2488.
- Dawley, R. M., Chrzanowski, D., Phiel, K. L., Beaulieu, K. & Goddard, K. A. (1999). Allozyme analysis of clonal diversity among unisexual hybrids of the killifishes *Fundulus diaphanus* and *F. heteroclitus*. *Journal of Heredity* **90**, 607-612.
- Dawley, R. M., Yeakel, A. M., Beaulieu, K. A. & Phiel, K. L. (2000). Histocompatibility analysis of clonal diversity in unisexual hybrids of the killifishes *Fundulus heteroclitus* and *Fundulus diaphanus*. *Canadian Journal of Zoology* **78**, 923-930.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* **85**, 407-415.

- Doeringsfeld, M. R., Schlosser, I. J., Elder, J. F. & Evenson, D. P. (2004). Phenotypic consequences of genetic variation in a gynogenetic complex of *Phoxinus eos-neogaeus* clonal fish (Pisces : Cyprinidae) inhabiting a heterogeneous environment. *Evolution* **58**, 1261-1273.
- Duchesne, P., Etienne, C. & Bernatchez, L. (2006). PERM: a computer program to detect structuring factors in social units. *Molecular Ecology Notes* **6**, 965-967.
- Edmunds, P. J. (2007). Physiological ecology of the clonal corallimorpharian *Corynactis californica*. *Marine Biology* **150**, 783-796.
- Fournier, P. & Magnin, E. (1975). Reproduction du petit barré de l'est *Fundulus diaphanus diaphanus* (Le Sueur). *Le Naturaliste Canadien* **102**, 181-187.
- Fritz, E. S. & Garside, E. T. (1974a). Identification and description of hybrids of *Fundulus heteroclitus* and *Fundulus diaphanus* (Pisces: Cyprinodontidae) from Porters Lake, Nova-Scotia, with evidence for absence of backcrossing. *Canadian Journal of Zoology* **52**, 1433-1442.
- Fritz, E. S. & Garside, E. T. (1974b). Salinity preferences of *Fundulus heteroclitus* and *Fundulus diaphanus* (Pisces: Cyprinodontidae) - their role in geographic distribution. *Canadian Journal of Zoology* **52**, 997-1003.
- Gade, G. (2002). Sexual dimorphism in the pyrgomorphid grasshopper *Phymateus morbillosus*: from wing morphometry and flight behaviour to flight physiology and endocrinology. *Physiological Entomology* **27**, 51-57.
- Ghiselin, M. T. (1974). *The economy of nature and the evolution of sex*. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press. 346 p.

- Gießler, S. (1997). Analysis of reticulate relationships within the *Daphnia longispina* species complex: allozyme phenotype and morphology. *Journal of Evolutionary Biology* **10**, 87-105.
- Gladyshev, E. A., Meselson, M. & Arkhipova, I. R. (2008). Massive horizontal gene transfer in bdelloid rotifers. *Science* **320**, 1210-1213.
- Gonzalez, R. J., Cooper, J. & Head, D. (2005). Physiological responses to hyper-saline waters in sailfin mollies (*Poecilia latipinna*). *Comparative Biochemistry and Physiology a - Molecular & Integrative Physiology* **142**, 397-403.
- Grant, P. R. & Grant, B. R. (1994). Phenotypic and genetic effects of hybridization in Darwin's finches. *Evolution* **48**, 297-316.
- Green, R. F. & Noakes, D. L. G. (1995). Is a little bit of sex as good as a lot? *Journal of Theoretical Biology* **174**, 87-96.
- Griffith, R. W. (1974). Environment and salinity tolerance in genus *Fundulus*. *Copeia* **2**, 319-331.
- Groot, T. V. M., Janssen, A., Pallini, A. & Breeuwer, J. A. J. (2005). Adaptation in the asexual false spider mite *Brevipalpus phoenicis*: evidence for frozen niche variation. *Experimental and Applied Acarology* **36**, 165-176.
- Haack, L., Simon, J. C., Gauthier, J. P., Plantegenest, M. & Dedryver, C. A. (2000). Evidence for predominant clones in a cyclically parthenogenetic organism provided by combined demographic and genetic analyses. *Molecular Ecology* **9**, 2055-2066.
- Hakoyama, H., Nishimura, T., Matsubara, N. & Iguchi, K. (2001). Difference in parasite load and nonspecific immune reaction between sexual and gynogenetic forms of *Carassius auratus*. *Biological Journal of the Linnean Society* **72**, 401-407.

- Hamilton, W. D., Axelrod, R. & Tanese, R. (1990). Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 3566-3573.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* **270**, 313-321.
- Heckert, M., Fuselier, L. & Horwitz, R. J. (1999). Habitat use by *Fundulus heteroclitus* and *F. diaphanus* and effects of species co-occurrence. *Journal of the Pennsylvania Academy of Science* **73**, 22-26.
- Hernández Chávez, C. & Turgeon, J. (2007). Asexual and sexual hybrids between *Fundulus diaphanus* and *F. heteroclitus* in the Canadian Atlantic region. *Molecular Ecology* **16**, 1467-1480.
- Howard, R. S. & Lively, C. M. (1994). Parasitism, mutation accumulation and the maintenance of sex. *Nature* **368**, 358-358.
- Hurst, L. D., Hamilton, W. D. & Ladle, R. J. (1992). Covert sex. *Trends in Ecology & Evolution* **7**, 144-145.
- Hurst, L. D. & Peck, J. R. (1996). Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, A46-A52.
- Iguchi, K., Yamamoto, G., Matsubara, N. & Nishida, M. (2003). Morphological and genetic analysis of fish of a *Carassius complex* (Cyprinidae) in Lake Kasumigaura with reference to the taxonomic status of two all-female triploid morphs. *Biological Journal of the Linnean Society* **79**, 351-357.

- Janko, K., Bohlen, J., Lamatsch, D., Flajshans, M., Epplen, J. T., Rab, P., Kotlik, P. & Slechtova, V. (2007). The gynogenetic reproduction of diploid and triploid hybrid spined loaches (*Cobitis*: Teleostei), and their ability to establish successful clonal lineages - on the evolution of polyploidy in asexual vertebrates. *Genetica* **131**, 185-194.
- Judson, O. P. & Normark, B. B. (1996). Ancient asexual scandals. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, A41-A46.
- Katoh, F. & Kaneko, T. (2003). Short-term transformation and long-term replacement of branchial chloride cells in killifish transferred from seawater to freshwater, revealed by morphofunctional observations and a newly established 'time-differential double fluorescent staining' technique. *Journal of Experimental Biology* **206**, 4113-4123.
- Kearney, M. & Shine, R. (2004). Developmental success, stability, and plasticity in closely related parthenogenetic and sexual lizards (*Heteronotia*, *Gekkonidae*). *Evolution* **58**, 1560-1572.
- King, R. A., Tibble, A. L. & Symondson, W. O. C. (2008). Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Molecular Ecology* **17**, 4684-4698.
- Kondrashov, A. S. (1993). Classification of hypotheses on the advantage of amphimixis. *Journal of Heredity* **84**, 372-387.
- Ladle, R. J., Johnstone, R. A. & Judson, O. P. (1993). Coevolutionary dynamics of sex in a metapopulation - escaping the Red Queen. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* **253**, 155-160.



- Lue, K. Y. & Lin, S. M. (2008). Two new cryptic species of *Takydromus* (Squamata: Lacertidae) from Taiwan. *Herpetologica* **64**, 379-395.
- Lynch, M. (1984). Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *The Quarterly Review of Biology* **59**, 257-290.
- Majourhat, K., Jabbar, Y., Hafidi, A. & Martinez-Gomez, P. (2008). Molecular characterization and genetic relationships among most common identified morphotypes of critically endangered rare Moroccan species *Argania spinosa* (Sapotaceae) using RAPD and SSR markers. *Annals of Forest Science* **65**, # 805.
- Mantovani, B. & Scali, V. (1992). Hybridogenesis and androgenesis in the stick-insect *Bacillus rossius* - *Grandii benazzii* (Insecta, Phasmatodea). *Evolution* **46**, 783-796.
- Maplesoft (2007). Maple Ver. 11.01. Waterloo, ON: Waterloo Maple Inc.
- Margulis, L. & Sagan, D. (1986). *Origins of sex: three billion years of genetic recombination*. New Haven and London: Yale University Press. 258 p.
- Marshall, W. S. (2002). Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology* **293**, 264-283.
- Mauk, C. L., Houck, M. A. & Bradley, R. D. (1999). Morphometric analysis of seven species of pocket gophers (*Geomys*). *Journal of Mammalogy* **80**, 499-511.
- Maynard-Smith, J. (1978). *The Evolution of Sex*. Cambridge: Cambridge University Press. 222 p.
- Meagher, S. & Dowling, T. E. (1991). Hybridization between the Cyprinid Fishes *Luxilus albeolus*, *L. cornutus*, and *L. cerasinus* with Comments on the Proposed Hybrid Origin of *L. albeolus*. *Copeia* **4**, 979-991.

- Mee, J. A. & Rowe, L. (2006). A comparison of parasite loads on asexual and sexual *Phoxinus* (Pisces : Cyprinidae). *Canadian Journal of Zoology* **84**, 808-816.
- Mogie, M. & Ford, H. (1988). Sexual and asexual *Taraxacum* species. *Biological Journal of the Linnean Society* **35**, 155-168.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* **1**, 2-9.
- Neff, N. A. & Smith, G. R. (1979). Multivariate analysis of hybrid fishes. *Systematic Zoology* **28**, 176-196.
- Nordlie, F. G. (2006). Physicochemical environments and tolerances of cyprinodontoid fishes found in estuaries and salt marshes of eastern North America. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **16**, 51-106.
- Pagano, A., Lesbarreres, D., O'Hara, R., Crivelli, A., Veith, M., Lode, T. & Schmeller, D. S. (2008). Geographical and ecological distributions of frog hemiclones suggest occurrence of both 'General-Purpose Genotype' and 'Frozen Niche Variation' clones. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **46**, 162-168.
- Pigliucci, M. (1998). Developmental phenotypic plasticity: where internal programming meets the external environment. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 87-91.
- Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 481-486.
- Rand, D. M., Haney, R. A. & Fry, A. J. (2004). Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 645-653.
- Rawson, P. D. & Burton, R. S. (2002). Functional coadaptation between cytochrome c and cytochrome c oxidase within allopatric populations of a marine copepod.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

**99**, 12955-12958.

Richards, C. L., Bossdorf, O., Muth, N. Z., Gurevitch, J. & Pigliucci, M. (2006). Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions.

*Ecology Letters* **9**, 981-993.

Riesch, R., Schlupp, I. & Plath, M. (2008). Female sperm limitation in natural populations of a sexual/asexual mating complex (*Poecilia latipinna*, *Poecilia formosa*). *Biology Letters* **4**, 266-269.

Robinson, D. M., Aspbury, A. S. & Gabor, C. R. (2008). Differential sperm expenditure by male sailfin mollies, *Poecilia latipinna*, in a unisexual-bisexual species complex and the influence of spermiation during mating. *Behavioral Ecology and Sociobiology*

**62**, 705-711.

Rohlf, F. J. & Marcus, L. F. (1993). A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology &*

*Evolution* **8**, 129-132.

Rohlf F.J. (2006). tpsDIG Ver. 2.10. Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

Ross, M. R. & Cavender, T. M. (1981). Morphological analyses of four experimental intergeneric cyprinid hybrid crosses. *Copeia* **2**, 377-387.

Ross-Davis, A., Huang, Z. L., McKenna, J., Ostry, M. & Woeste, K. (2008). Morphological and molecular methods to identify butternut (*Juglans cinerea*) and butternut hybrids: relevance to butternut conservation. *Tree Physiology* **28**, 1127-1133.

Ryan, M. J., Dries, L. A., Batra, P. & Hillis, D. M. (1996). Male mate preferences in a gynogenetic species complex of Amazon mollies. *Animal Behaviour* **52**, 1225-1236.

- Salathé, M., Kouyos, R. D. & Bonhoeffer, S. (2008). The state of affairs in the kingdom of the Red Queen. *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 439-445.
- Sanogo, Y. O., Kim, C. H., Lampman, R., Halvorsen, J. G., Gad, A. M. & Novak, R. J. (2008). Identification of male specimens of the *Culex pipiens* complex (Diptera : Culicidae) in the hybrid zone using morphology and molecular techniques. *Journal of Medical Entomology* **45**, 203-209.
- SAS Institute Inc. (2002). SAS Ver. 9.0. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schartl, M., Nanda, I., Schlupp, I., Wilde, B., Epplen, J. T., Schmid, M. & Parzefall, J. (1995). Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* **374**, 196-196.
- Schlosser, I. J., Doeringsfeld, M. R., Elder, J. F. & Arzayus, L. F. (1998). Niche relationships of clonal and sexual fish in a heterogeneous landscape. *Ecology* **79**, 953-968.
- Schlupp, I. (2005). The evolutionary ecology of gynogenesis. *Annual Review of Ecology, Evolution, & Systematics* **36**, 399-417.
- Schultz, R. J. (1969). Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *The American Naturalist* **103**, 605.
- Scott, G. R., Richards, J. G., Forbush, B., Isenring, P. & Schulte, P. M. (2004). Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **287**, C300-C309.
- Scott, G. R. & Schulte, P. M. (2005). Intraspecific variation in gene expression after seawater transfer in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus*.

- Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **141**, 176-182.
- Scott, W. B. & Crossman, E. J. (1974). *Poissons d'eau douce du Canada*. Ottawa : Office des recherches sur les pêcheries du Canada. 1026 p.
- Segers, H. (2007). Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa* **1564**, 3-104.
- Sheets, H. D. (2004). Integrated Morphometrics Package (IMP). Buffalo, NY: Department of Physics, Canisius College. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>
- Smith, R. J., Kamiya, T. & Horne, D. J. (2006). Living males of the 'ancient asexual' *Darwinulidae* (Ostracoda : Crustacea). *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* **273**, 1569-1578.
- Snorrason, S. S., Skulason, S., Jonsson, B., Malmquist, H. J., Jonasson, P. M., Sandlund, O. T. & Lindem, T. (1994). Trophic specialization in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (Pisces, Salmonidae) - morphological divergence and ontogenic niche shifts. *Biological Journal of the Linnean Society* **52**, 1-18.
- Stallknecht, B., Vinten, J., Ploug, T. & Galbo, H. (1991). Increased activities of mitochondrial enzymes in white adipose tissue in trained rats. *American Journal of Physiology* **261**, E410-E414.
- Swanson, B. O., Gibb, A. C., Marks, J. C. & Hendrickson, D. A. (2008). Variation in foraging behavior facilitates resource partitioning in a polymorphic cichlid, *Herichthys minckleyi*. *Environmental Biology of Fishes* **83**, 147-154.
- Systat Software Inc. (2005). SYSTAT Ver 11.0. San Jose, CA: Systat software Inc.

- Taylor, M. H., Leach, G. J., Dimichele, L., Levitan, W. M. & Jacob, W. F. (1979). Lunar spawning cycle in the mummichog, *Fundulus heteroclitus* (Pisces, Cyprinodontidae). *Copeia* **2**, 291-297.
- Terhivuo, J. & Saura, A. (2008). Clone distribution of the earthworm *Eiseniella tetraedra* (Sav.) (Oligochaeta : Lumbricidae) across an altitudinal gradient on subarctic mountains of NW Europe. *Pedobiologia* **51**, 375-384.
- Thibault, M., Blier, P. U. & Guderley, H. (1997). Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* **16**, 139-155.
- Tobler, M., Schlupp, I., García de León, F. J., Glaubrecht, M. & Plath, M. (2007). Extreme habitats as refuge from parasite infections? Evidence from an extremophile fish. *Acta Oecologica* **31**, 270-275.
- Tobler, M. & Schupp, I. (2008). Expanding the horizon: the Red Queen and potential alternatives. *Canadian Journal of Zoology* **86**, 765-773.
- Tobler, M., Wahli, T. & Schlupp, I. (2005). Comparison of parasite communities in native and introduced populations of sexual and asexual mollies of the genus *Poecilia*. *Journal of Fish Biology* **67**, 1072-1082.
- Tooby, J. (1982). Pathogens, polymorphism and the evolution of sex. *Journal of Theoretical Biology* **97**, 576.
- Turgeon, J., Estoup, A. & Bernatchez, L. (1999). Species flock in the North American Great Lakes: molecular ecology of Lake Nipigon ciscoes (Teleostei : Coregonidae : *Coregonus*). *Evolution* **53**, 1857-1871.

- Van Doninck, K., Schon, I., De Bruyn, L. & Martens, K. (2002). A general purpose genotype in an ancient asexual. *Oecologia* **132**, 205-212.
- Van Doninck, K., Schon, I., Martens, K. & Backeljau, T. (2004). Clonal diversity in the ancient asexual ostracod *Darwinula stevensoni* assessed by RAPD-PCR. *Heredity* **93**, 154-160.
- Vinšálková, T. & Gvoždík, L. (2007). Mismatch between temperature preferences and morphology in F1 hybrid newts (*Triturus carnifex* x *T. dobrogicus*). *Journal of Thermal Biology* **32**, 433-439.
- Voet, D. & Voet, J. G. (2004). *Biochemistry*. Danvers, MA: John Wiley & Sons, Inc. 1591 p.
- Vorburger, C., Lancaster, M. & Sunnucks, P. (2003a). Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two 'superclones' in Victoria, Australia. *Molecular Ecology* **12**, 3493-3504.
- Vorburger, C., Sunnucks, P. & Ward, S. A. (2003b). Explaining the coexistence of asexuals with their sexual progenitors: no evidence for general-purpose genotypes in obligate parthenogens of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Ecology Letters* **6**, 1091-1098.
- Vrijenhoek, R. C. (1978). Coexistence of Clones in a Heterogeneous Environment. *Science* **199**, 549-552.
- Vrijenhoek, R. C. (1979). Factors affecting clonal diversity and coexistence. *American Zoologist* **19**, 787-797.
- Vrijenhoek, R. C. (1994). Unisexual fish: model systems for studying ecology and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**, 71-96.

- Vrijenhoek, R. C. (1998). Animal clones and diversity. *Bioscience* **48**, 617-628.
- Waggoner, B. M. & Poinar, G. O. (1993). Fossil habrotrochid rotifers in Dominican amber. *Experientia* **49**, 354-357.
- Welch, D. M. & Meselson, M. (2000). Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* **288**, 1211-1215.
- West, Lively & Read (1999). A pluralist approach to sex and recombination. *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 1003-1012.
- Wetherington, J. D., Weeks, S. C., Kitora, K. E. & Vrijenhoek, R. C. (1989). Genotypic and environmental components of variation in growth and reproduction of fish hemiclones (*Poeciliopsis*, Poeciliidae). *Evolution* **43**, 635-645.
- Williams, G. C. (1975). *Sex and evolution*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. 200 p.
- Wilson, P. (1992). On inferring hybridity from morphological intermediacy. *Taxon* **41**, 11-23.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. & Fink, W. L. (2004). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. New York: Elsevier Academic Press. 438 p.



## **Annexe: Activités enzymatiques chez *Fundulus diaphanus*, *F. heteroclitus* et leurs hybrides gynogènes après un transfert de salinité**

Lors de l'élaboration du présent projet, un des objectifs était de tester l'efficacité des hybrides à s'adapter à des changements brusques de salinité. Dans cette optique, nous avons décidé d'effectuer des comparaisons inter-types (*F. diaphanus*, *F. heteroclitus* et hybrides asexués) sur l'activité de la sodium-potassium adénosinetriphosphatase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase) au niveau des branchies et sur la quantité d'ions  $\text{Cl}^-$  présents dans le plasma sanguin suite à un transfert de salinité chez des poissons acclimatés à une salinité intermédiaire. La réponse à court terme (après un jour) et l'acclimatation à moyen terme (quatre jours) allaient être comparées. Le choix de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, du  $\text{Cl}^-$  et des deux intervalles temporels sont inspirés des travaux de Scott *et al.* (2004) et de Scott et Schulte (2005), qui avaient travaillé sur les réactions d'acclimatation de populations de *F. heteroclitus* face à des changements de salinité. Ces derniers ont dosé l'activité de plusieurs enzymes, la concentration d'ions plasmiques et des variations de l'expression génique sur des poissons en stress osmotique. Les variations de l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et de la concentration plasmique de  $\text{Cl}^-$  leur ont permis de différencier la réponse à court et à moyen terme de deux populations de *F. heteroclitus* (Scott *et al.* 2004, Scott et Schulte 2005). Les résultats attendus, suite à la consultation de ces travaux, sont les suivants. À court terme, une bonne acclimatation à un changement de salinité devrait s'accompagner d'une hausse marquée de l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, et ce peu importe qu'il s'agisse d'une hausse ou d'une baisse de salinité. À moyen terme, si l'acclimatation se déroule toujours bien, l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase devrait redescendre à un niveau normal, puisque à ce moment, un changement morphologique au niveau des cellules riches en mitochondries, responsables des échanges ioniques, devrait avoir eu lieu (Katoh et Kaneko 2003). Pour ce qui est du  $\text{Cl}^-$  plasmique, il est à prévoir qu'il revienne rapidement à une concentration normale lorsque les poissons s'acclimatent adéquatement ou qu'il reste élevé ou faible si l'acclimatation à une salinité élevée ou faible est déficiente.

Ainsi, des *F. diaphanus*, des *F. heteroclitus* et des hybrides asexués ont été recueillis le 30 mai 2007 à la station 7 de Porter's Lake (voir Figure 1.1) à l'aide d'une seine de rivage, dans des salinités de 7 à 10 ppt et des températures de 12 à 20°C. Un total de 200 femelles *Fundulus spp.* ont été utilisées pour l'expérience, incluant 60 *F. diaphanus*, 60 *F. heteroclitus* et 80 intermédiaires morphologiques, potentiellement hybrides. L'identification des types s'est faite de manière visuelle le jour de l'échantillonnage, par Julie Turgeon, Stanley King et moi-même, sur la base d'impressions personnelles. Un nombre plus grand d'intermédiaires morphologiques que d'individus de chacune des espèces pures a été utilisé pour pallier aux erreurs d'identification qui allaient inévitablement survenir. Il est à noter que la méthode d'identification morphologique des types basée sur un algorithme de vraisemblance maximale présentée au Chapitre 2 de ce mémoire n'était pas encore au point au moment d'effectuer l'échantillonnage, ce qui explique qu'elle n'ait pas été utilisée.

L'expérience de transfert débuta le lendemain de l'échantillonnage. Les poissons ont été transférés de l'eau saumâtre dont ils provenaient vers l'un des trois traitements suivants : faible salinité (1ppt), salinité intermédiaire (10 ppt; témoin) et forte salinité (20 ppt; comparable à l'embouchure du lac sur l'océan). L'eau utilisée comme base pour tous les traitements a été récoltée dans la partie douce de Porter's Lake, et avait une salinité de 1 ppt. Pour les salinités intermédiaire et forte, 160 et 350g de sel Instant Ocean Sea Salt™ (Marineland, Inc.) ont été ajoutés à un peu moins de 18 L d'eau du lac. L'attribution d'un traitement à chaque poisson s'est faite de manière aléatoire. Un total de 12 contenants de 18 L a été utilisé pour l'expérience. Les neuf premiers contenants, remplis à pleine capacité, hébergeaient chacun vingt individus. Les trois autres contenants étaient remplis à moitié et servaient à héberger 6 ou 7 hybrides potentiels excédentaires pour chacun des traitements.

Au bout d'un et de quatre jours, la moitié des poissons ont été sacrifiés. Ces intervalles de temps ont été utilisés parce que ceux-ci se sont déjà avérés idéaux pour détecter les réactions à court et à moyen terme de l'activité branchiale de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase chez *F. heteroclitus* (Scott *et al.* 2004, Scott et Schulte 2005). Les poissons ont été tués rapidement par coup céphalique, suivi d'un sectionnement de la moelle épinière. Par la suite, les *Fundulus spp.* furent pesés. Immédiatement après la mort, les quatre arcs branchiaux étaient disséqués sur glace. Ensuite, les branchies étaient nettoyées de leur sang dans une solution S.E.I. (300 mM sucrose, 20 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  et 100 mM Imidazole, pH 7,1) puis rapidement entreposées dans de l'azote liquide. Du tissu musculaire a été prélevé sur le côté de chaque poisson et conservé dans de l'éthanol 95% à des fins d'identification génétique du type de *Fundulus*. Quant au prélèvement sanguin, nécessaire pour doser la quantité de  $\text{Cl}^-$  plasmique, la méthode employée (micropipettes) n'était pas adéquate et ce paramètre n'a pu être évalué. Étant donné la petite taille des poissons, il serait judicieux d'utiliser des capillaires pour s'acquitter des prélèvements sanguins dans des travaux ultérieurs.

Dans les semaines qui suivirent, les 200 *Fundulus spp.* utilisés pour l'expérience ont été assignés à leur type véritable en utilisant la méthode d'identification génétique à trois loci sur agarose (voir Chapitre 1). Alors qu'aucune erreur sur l'identification visuelle n'est survenue pour les *F. diaphanus* et les *F. heteroclitus*, il se trouve que seulement 49 intermédiaires morphologiques sur un total de 80 s'avérèrent être des hybrides suite à l'analyse génétique. Trente de ceux-ci étaient véritablement des *F. heteroclitus*, et un individu n'a pu être génotypé.

Les mesures d'activité enzymatique ont eu lieu entre le 16 juillet et le 15 août 2007, dans le laboratoire de Pierre Blier, à l'Université du Québec à Rimouski (UQAR). Le protocole de Gonzalez *et al.* (2005) a été utilisé pour le dosage au spectrophotomètre de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Initialement, seule cette enzyme devait être testée. Toutefois, puisque nous avons déjà les extraits de branchies, nous avons décidé de mesurer également les activités de la

cytochrome c oxydase (CCO) et de la malate déhydrogénase (MDH). L'étude de la CCO dans un système d'hybrides peut s'avérer très intéressante car il s'agit d'une enzyme dont trois sous-unités sont codées par l'ADN mitochondrial (noyau fonctionnel de l'enzyme) et dix sont codées par l'ADN nucléaire, et dont le rôle est l'oxydation du cytochrome c, codé par l'ADN nucléaire (Blier *et al.* 2001, Rand *et al.* 2004). La CCO peut donc s'avérer un indicateur de la coadaptation entre les génomes, comme il a été observé chez le copépode *Tigriopus californicus* (Rawson et Burton 2002). Le dosage de la MDH a été effectué à priori comme indicateur de la capacité oxydative des mitochondries (Stallknecht *et al.* 1991, Gade 2002) afin de tester son effet sur l'activité de la CCO. Bien qu'il existe à la fois une forme cytosolique et mitochondriale de la MDH, l'activité de la MDH peut malgré tout s'avérer un indicateur de la capacité oxydative totale des mitochondries, puisque cette enzyme fait partie intégrante du cycle de Krebs, ainsi que de la navette malate-aspartate, qui contribue à la production d'ATP, et de la navette du groupe Acetyl, qui contribue à la synthèse d'acides gras (Berg *et al.* 2002, Voet et Voet 2004). Son activité est donc étroitement liée à la capacité oxydative des mitochondries. La CCO a été dosée au spectrophotomètre suivant le protocole de Thibault *et al.* (1997), en fixant la concentration finale de dithionite à 4mM et en utilisant du cytochrome c provenant de cœur de cheval. La MDH a également été dosée au spectrophotomètre suivant le protocole de la LDH de Thibault *et al.* (1997), mais avec plusieurs modifications. Ainsi, on doit ajouter 100 mM de KCl, 100 mM de EDTA et 100 mM de  $MgSO_4$  à la solution tampon de la LDH. De plus, le milieu réactionnel est entièrement différent, avec des concentrations finales de 0,2 mM de NADH et de 5 mM d'oxaloacétate.

Une fois les manipulations terminées, la distribution des masses selon les types a été établie. Il a été possible de remarquer que les *F. diaphanus* étaient généralement plus petits que les deux autres types. Les poissons de masse entre 2 et 6 g ont été sélectionnés, aucun *F. diaphanus* n'ayant été observé dans les classes de masse plus élevées, alors que le plus gros individu de l'expérience pesait 9,2 g. Le nombre total d'individus analysés pour chacune des enzymes était de 137 pour  $Na^+/K^+$  ATPase et de 136 pour la CCO et la MDH,

incluant 43 hybrides asexués, 45-46 *F. diaphanus* et 48 *F. heteroclitus*. Chaque combinaison des trois facteurs (type, salinité et jour du sacrifice) comportait entre 6 et 10 représentants. Pour chacune des trois enzymes, l'analyse de toutes les interactions possibles entre ces trois facteurs a été effectuée grâce à des ANOVAs croisées et nichées dans SYSTAT v.11 (Systat Software Inc. 2005), et aucun effet significatif d'une quelconque interaction parmi toutes celles possibles n'a été observé. Il restait donc à voir si des effets simples pouvaient être observés entre le type, la salinité ou le jour du sacrifice pour chacune des enzymes. Si un effet significatif était observé dans l'ANOVA, des comparaisons à posteriori de type LSD avec un seuil de  $p < 0.05$  étaient effectuées en utilisant la procédure glm dans SAS v9.0 (SAS Institute Inc. 2002).

Étonnamment, la salinité ne s'est pas avérée avoir un effet significatif sur le taux d'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase par mg de protéine. Toutefois, un effet significatif du type sur l'activité de cette enzyme a été observée ( $p = 0,0286$ , Tableau A.1). Le test de LSD confirme que la différence se situe entre *F. diaphanus* et les deux autres types, l'activité moyenne de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase chez cette espèce étant inférieure à celle des deux autres types (voir Figure A.1). On pourrait supposer que les *F. heteroclitus* possèdent une variante de l'enzyme plus performante que celle des *F. diaphanus*. Comme il s'agit d'une enzyme nucléaire, les hybrides possèdent une copie de la variante *F. heteroclitus*, qui pourrait être dominante sur sa contrepartie *F. diaphanus*. Par ailleurs, un effet à prendre en considération dans l'interprétation des résultats est celui de la masse. En effet, un effet hautement significatif du type sur la masse moyenne des individus a été noté ( $p = 0,0034$ ), et le test de LSD a démontré que les *F. diaphanus* sont plus petits que les deux autres types. Toutefois, la différence entre les masses moyennes des hybrides et des *F. diaphanus* est très près de la valeur seuil permettant les déclarer différents (valeur seuil = 0,3066,  $\alpha = 0,05$ ; différence observée entre les moyennes = 0,3192). Ainsi, ces deux types ne sont pas très différents, mais il est tout de même plausible que les *F. diaphanus*, plus petits, auraient besoin d'une moins grande activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase au niveau branchial pour accomplir le même

travail d'ionorégulation pour tout le corps que les autres types. D'autre part, l'absence observée de lien entre l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et la salinité est plutôt étonnante.

Étant donné que des études se sont déjà penchées sur les variations d'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase après un transfert de salinité chez *F. heteroclitus* (Scott *et al.* 2004, Scott et Schulte 2005), nous nous étions attendus à obtenir des résultats semblables, à tout le moins pour cette espèce. L'absence même de tendance est de nature à laisser perplexe. La différence majeure entre notre étude et celles dont nous nous sommes inspirées est que les poissons que nous avons utilisés provenaient directement du milieu naturel et avaient été fraîchement pêchés, contrairement à Scott et Schulte (2005) qui employèrent des *F. heteroclitus* d'élevage acclimatés au milieu expérimental depuis plusieurs mois. Les effets de l'emploi de poissons issus du milieu naturel moins de 24 h avant le début de l'expérience sur les activités enzymatiques mesurées peuvent être multiples. Par exemple, un facteur important qui n'a pas été contrôlé est l'état physiologique des individus. On ne sait quel individu était malade ou affecté par des parasites (et par lesquels) et si chaque traitement comportait la même représentation d'individus malades. D'autre part, il est possible que le stress de la capture et de l'emprisonnement dans un milieu restreint ait perturbé les poissons à un point tel que les effets du changement de salinité sur la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase soient masqués. Un résultat permettant d'étayer cette hypothèse est la baisse de l'activité observée de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase entre le premier (J1) et le quatrième jour (J4) de l'expérience pour chacun des trois types de poisson, et ce pour l'ensemble des traitements (Figure A.2). Cet effet du jour du sacrifice (qui correspond à l'état d'acclimatation des poissons) est faiblement significatif ( $p = 0,0467$ , Tableau A.1). Bien que cette baisse d'activité corresponde aux résultats attendus pour les poissons ayant subi un transfert de salinité, il est étonnant de constater que l'activité de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase diminue aussi de manière marquée entre le J1 et le J4 pour les poissons transplantés vers la salinité intermédiaire, qui était celle du milieu d'origine (Figure A.3). Les réponses identiques des poissons servant de témoin (10 ppt) et de ceux ayant subi des transferts de salinité (0 et 20 ppt) suggèrent fortement qu'une ou des variables autres que la salinité, tels que le stress, amènent cette diminution de l'activité de

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase après acclimatation. Un autre facteur ayant pu jouer un rôle dans la diminution généralisée de l'activité de cette enzyme entre le J1 et le J4 est l'affaiblissement des poissons, contraints au jeûne pendant quatre jours, qui pourraient diminuer leurs taux d'activité enzymatique en réaction à la diminution de leurs réserves énergétiques.

Par ailleurs, un effet significatif du type a été observé pour la CCO ( $p < 0,0001$ , Tableau A.1). La régression de l'activité de la CCO sur l'activité de la MDH par minute par mg de protéine a été effectuée en utilisant la procédure glm dans SAS (SAS Institute Inc. 2002). La régression ne s'est pas avérée significative ( $p = 0,1057$ ), ce qui semble confirmer que l'activité de la CCO dans ce système n'est pas corrélée avec la capacité oxydative totale des mitochondries présentes dans la cellule. Les valeurs moyennes d'activité de la CCO chez les hybrides se sont avérées intermédiaires entre les deux types (voir Figure A.4) et significativement différentes de *F. diaphanus* et de *F. heteroclitus*, qui sont également significativement différentes entre elles. Ces résultats amènent à deux grandes réflexions. Premièrement, il faut se demander ce qui explique que l'activité moyenne de la CCO soit plus faible pour les *F. diaphanus* que pour les deux autres types. Parmi d'autres possibilités, il est envisageable que les *F. diaphanus* possèdent une capacité aérobie inférieure à celle de deux autres types, ce qui, bien que comportant des inconvénients certains pour ce qui est de réactions rapides faces à des stress, pourrait leur conférer une plus longue survie dans des conditions de disette. Deuxièmement, l'activité moyenne de la CCO des hybrides est intermédiaire entre celles des espèces parentales, ce qui n'est pas si facile à expliquer compte tenu de l'origine partiellement mitochondriale et partiellement nucléaire de cette enzyme. Nous avons de bonnes raisons de penser qu'il ne s'agit pas d'une question de co-adaptation des génomes nucléaires et mitochondriaux, comme Rawson et Burton (2002) avaient observés chez *Tigriopus*, puisque dans ce cas une activité inférieure des hybrides par rapport aux espèces parentales serait attendue (dépression hybride). Il est possible que la différence entre les deux espèces se situe dans la séquence des sous-unités d'origine nucléaire de la CCO et cause des variations au niveau de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Ces variations pourraient affecter l'efficacité de la

CCO et ce bien que le noyau fonctionnel de l'enzyme est constitué de ses trois sous-unités mitochondriales (Blier *et al.* 2001). Par ailleurs, la présence de cofacteurs de la CCO, d'origine nucléaire donc différents entre les deux espèces, pourraient influencer l'activité de cette enzyme et expliquer les différences observées.

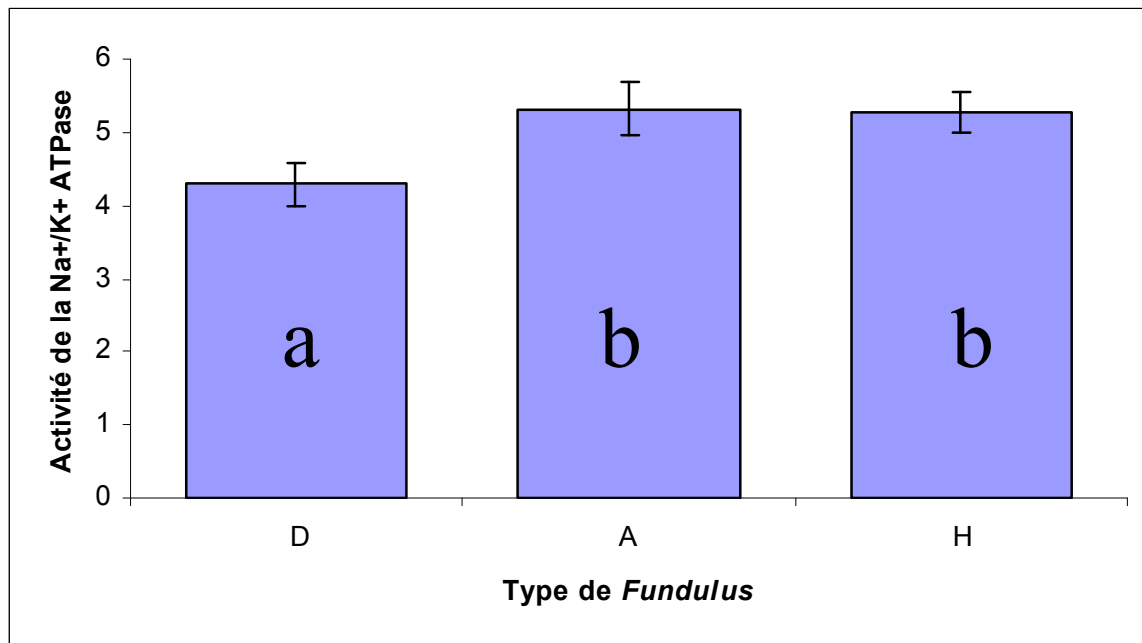
D'autre part, un effet significatif du type pour l'activité de la MDH a été observé (Tableau A.1). Les hybrides possèdent des valeurs moyennes d'activité de MDH significativement inférieures (test de LSD,  $p < 0,05$ ) aux deux autres types, dont les moyennes ne sont pas distinctes entre elles (Figure A.5). La capacité oxydative moindre des hybrides pourrait s'expliquer par la présence d'une moins grande quantité de mitochondries, ou par le bris de complexes coadaptés influant sur l'activité de la MDH.

En conclusion, bien que les objectifs premiers de cette partie de mon travail n'aient pas été remplis, l'étude au niveau enzymatique du système d'hybrides gynogènes *F. diaphanus* X *F. heteroclitus* semble suffisamment intéressante pour que des études futures s'y attardent. Des différences au niveau de l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pourraient probablement être observées à différentes salinités et peut-être même entre les types, si le travail s'effectuait dans des conditions plus contrôlées sur des poissons dûment nourris et acclimatés au milieu expérimental. Par ailleurs, les résultats inattendus pour les activités de la CCO et de la MDH s'avèrent très intéressants et ouvrent la porte à une vaste étude sur les différences d'activité entre les hybrides et leurs espèces parentales sur de nombreuses enzymes d'origine nucléaire, mitochondriale ou mixte. Un portrait plus vaste incluant d'autres enzymes pourrait permettre d'élargir notre compréhension de subtiles relations de coévolution entre le génome nucléaire et mitochondrial ainsi qu'à l'intérieur du génome nucléaire de chacune des espèces.

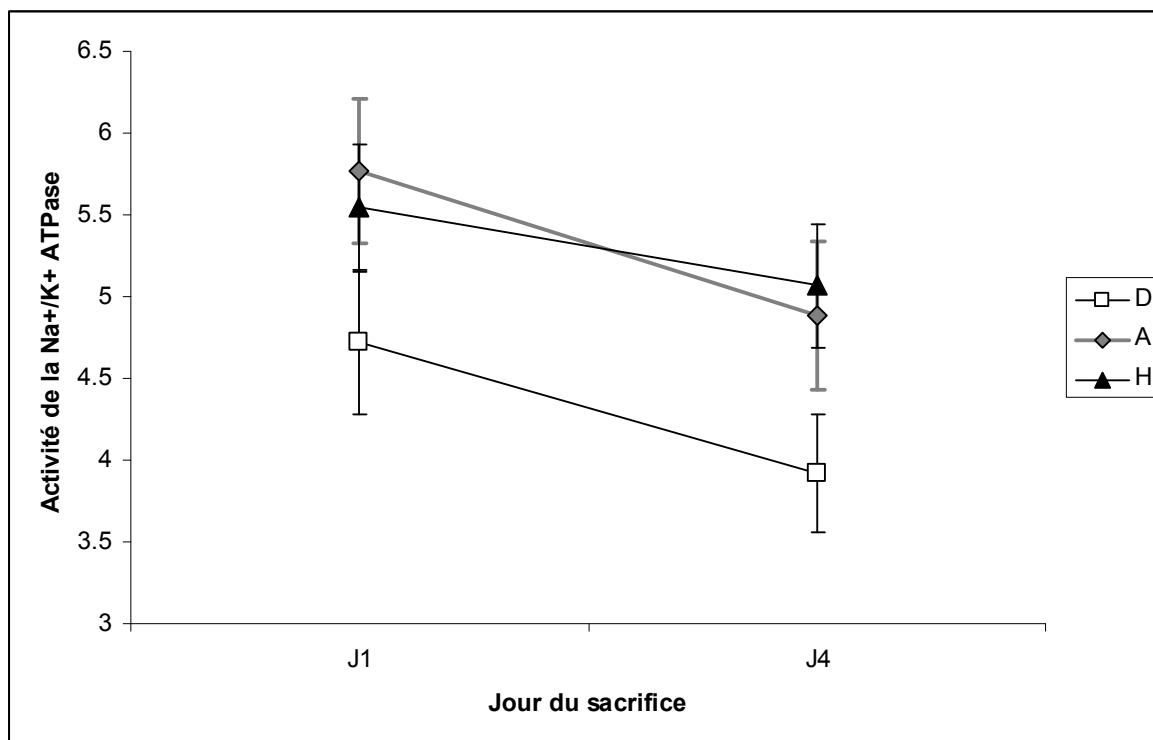


**Tableau A.1:** Effet du type de *Fundulus* (*F. diaphanus*, *F. heteroclitus*, hybrides asexués) ou du jour du sacrifice sur l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, de la CCO et de la MDH chez des individus utilisés dans le cadre d'une expérience sur l'effet de la salinité.

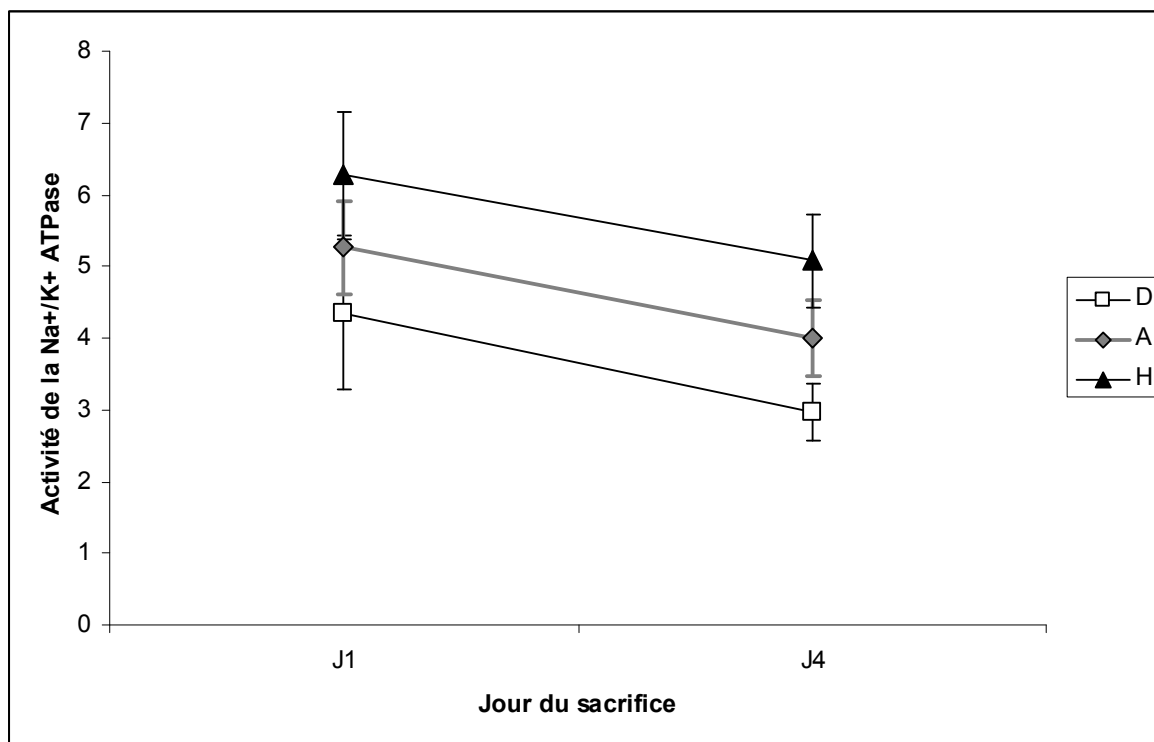
	Source de variation	Degrés de liberté	Somme des Carrés	Carré moyen	F	p-valeur
Activité $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase	Type de <i>Fundulus</i>	2	31,25	15,63	3,65	0,0286
	Erreur	134	573,55	4,28		
	Total	136	604,81			
Jour du sacrifice		1	17,53	17,53	4,03	0,0467
	Erreur	135	587,28	4,35		
	Total	136	604,81			
Activité CCO	Type de <i>Fundulus</i>	2	0,05	0,02	38,83	< 0,0001
	Erreur	133	0,08	0,00		
	Total	135	0,12			
Activité MDH	Type de <i>Fundulus</i>	2	2,38	1,19	9,67	< 0,0001
	Erreur	133	16,36	0,12		
	Total	135	18,74			



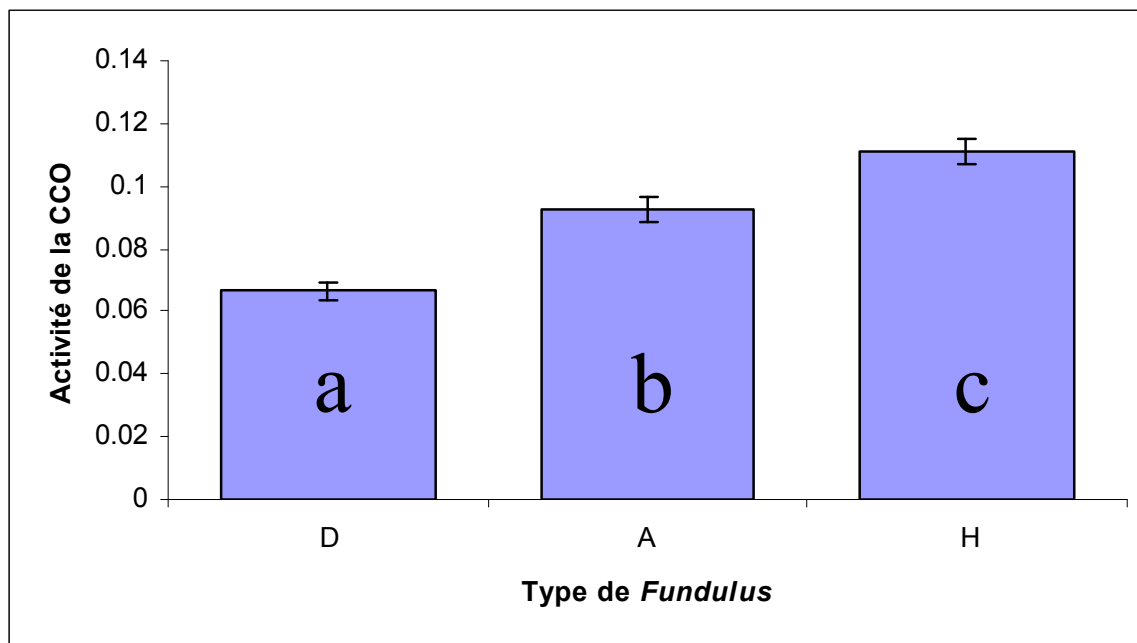
**Figure A.1 :** Activité moyenne de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, exprimée en μmol ADP/mg protéine/h, pour chacun des trois types de *Fundulus* ayant subi des transferts de salinité. D : *F. diaphanus* (N=46), A : hybrides asexués (N=43), H : *F. heteroclitus* (N=48). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type sur la moyenne. Les groupes significatifs ( $p < 0.05$ ) obtenus par test de LSD sont représentés par des lettres minuscules.



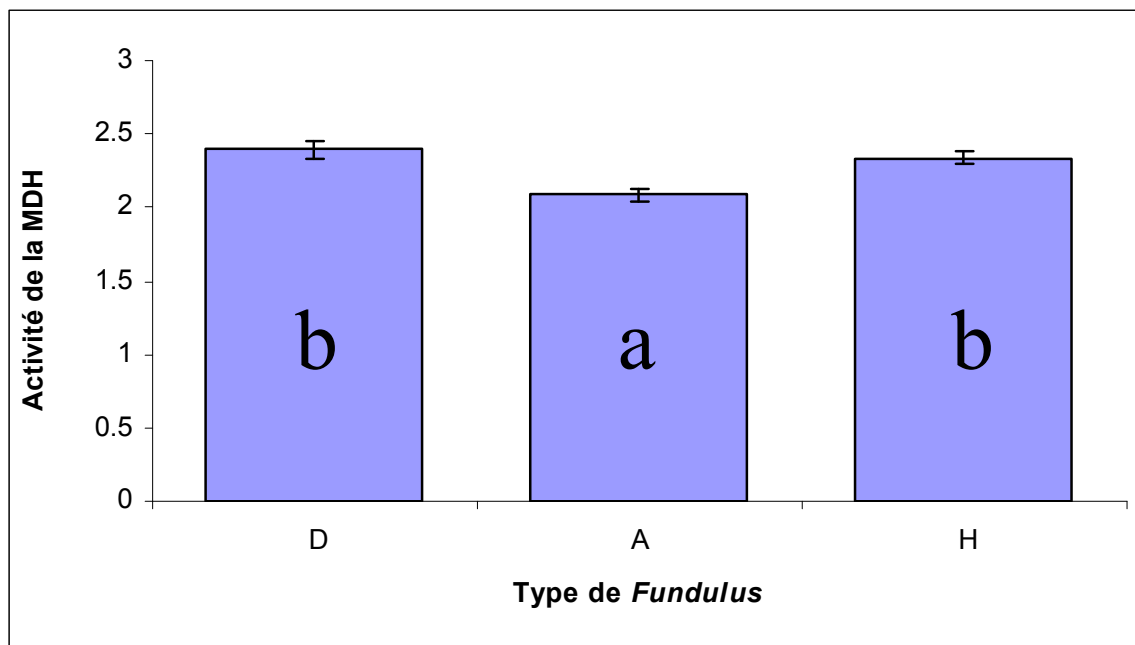
**Figure A.2 :** Activité moyenne de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, exprimée en µmol ADP/mg protéine/h, au premier (J1) et au quatrième jour (J4) pour chacun des trois types de *Fundulus* ayant subi des transferts de salinité. D : *F. diaphanus* (J1, N=21; J4, N=25), A : hybrides asexués (J1, N=21; J4, N=22), H : *F. heteroclitus* (J1, N=21; J4, N=27). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type sur la moyenne.



**Figure A.3 :** Activité moyenne de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, exprimée en μmol ADP/mg protéine/h, au premier (J1) et au quatrième jour (J4) pour chacun des trois types de *Fundulus* ayant été assigné au traitement de salinité intermédiaire (10 ppt; conditions témoin). D : *F. diaphanus* (J1, N=7; J4, N=8), A : hybrides asexués (J1, N=6; J4, N=9), H : *F. heteroclitus* (J1, N=6; J4, N=7). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type sur la moyenne.



**Figure A.4:** Activité moyenne de la cytochrome c oxydase (CCO), exprimée en  $\mu\text{mol}$  cytochrome c oxydé/mg protéine/min, pour chacun des trois types de *Fundulus* ayant subi des transferts de salinité. D : *F. diaphanus* (N=46), A : hybrides asexués (N=43), H : *F. heteroclitus* (N=48). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type sur la moyenne. Les groupes significatifs ( $p < 0.05$ ) obtenus par test de LSD sont représentés par des lettres minuscules.



**Figure A.5:** Activité moyenne de la malate déshydrogénase (MDH), exprimée en  $\mu\text{mol NAD}^+/\text{mg protéine}/\text{min}$ , pour chacun des trois types de *Fundulus* ayant subi des transferts de salinité. D : *F. diaphanus* (N=46), A : hybrides asexués (N=43), H : *F. heteroclitus* (N=48). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type sur la moyenne. Les groupes significatifs ( $p < 0.05$ ) obtenus par test de LSD sont représentés par des lettres minuscules.