

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Expression des allèles spécifiques chez l'hybride clonal *Phoxinus eos-neogaeus*  
(Pisces : Cyprinidae)**

par  
Emilie Castonguay

Département de sciences biologiques  
Faculté des Arts et des Sciences

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

Octobre 2008

© Emilie Castonguay, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Expression des allèles spécifiques chez l'hybride clonal *Phoxinus eos-neogaeus***  
**(Pisces : Cyprinidae)**

Présenté par :  
Emilie Castonguay

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Annie Angers  
*présidente-rapporteuse*

Bernard Angers  
*directeur de recherche*

Christopher Cameron  
*membre du jury*

## Résumé

La mutation est habituellement perçue comme le mécanisme de la variation phénotypique. Or, d'autres mécanismes affectant le taux de changement phénotypique ont récemment été découverts. D'une part, il existe des mécanismes de robustesse qui diminuent la sensibilité des phénotypes à la mutation. À l'opposé, les mécanismes épigénétiques permettent la variation phénotypique rapide et ce, en absence de variation génotypique. La méthylation de l'ADN est la mieux connue des modifications épigénétiques. Dans certains cas, elle assurerait une transmission héréditaire de changements phénotypiques induits par l'environnement. Chez l'hybride asexué *Phoxinus eos-neogaeus* (Pisces : Cyprinidae), des individus d'une même lignée hybride occupent des environnements hétérogènes et démontrent une plasticité phénotypique qui pourrait dépendre de mécanismes épigénétiques. Les hybrides pourraient effectivement procéder à une régulation différentielle de la transcription de leurs gènes ou des allèles spécifiques de leurs gènes par un mécanisme tel la méthylation de l'ADN. La comparaison par AFLP-ADNc de leurs profils de transcription a toutefois permis de démontrer qu'il n'y a aucune différence dans la transcription des gènes ou des allèles chez des hybrides matures provenant de lacs différents. Par contre, des mutations ont été détectées dans les gènes de certains hybrides. Ainsi, les épimutations n'apparaîtraient pas toujours à un taux plus rapide que les mutations et ne seraient donc pas toujours importantes dans la création de variation phénotypique. La variation phénotypique observée chez les hybrides *Phoxinus* aurait plutôt le potentiel d'être associée à des modifications épigénétiques se produisant durant le développement ou au niveau post-transcriptionnel.

*Mots-clés* : Épigénétique, hérédité épigénétique, méthylation de l'ADN, plasticité phénotypique, régulation de l'expression génique, vertébrés unisexués.

## Summary

Mutation is commonly seen as the sole mechanism for phenotypic variation. However, other mechanisms affecting rates of phenotypic change have recently been discovered. On one side, there are robustness mechanisms that decrease the sensitivity of a phenotype to mutation. In contrast, epigenetic mechanisms allow rapid phenotypic variation in the absence of underlying genotypic variation. DNA methylation is the best studied epigenetic modification. In particular cases, this modification has been known to allow the inheritance of environmentally induced phenotypic changes. In the asexual hybrid *Phoxinus eos-neogaeus* (Pisces: Cyprinidae), individuals from the same hybrid lineage occur in heterogeneous environments where they display high levels of phenotypic plasticity that could depend on epigenetic mechanisms. Hybrids could differentially regulate the transcription of their genes or of the specific alleles of their genes by a mechanism such as DNA methylation. The present study compared *Phoxinus eos-neogaeus* transcription profiles by cDNA-AFLP and found no differences in gene or allele transcription among mature hybrids from different lakes, although mutations were detected in the genes of some hybrids. Therefore, we conclude that epimutations do not always appear at a greater rate than mutations and are therefore not always important in creating phenotypic variability. The phenotypic variation observed in *Phoxinus* hybrids could rather be associated with epigenetic modifications occurring during the development or at the posttranscriptional level.

*Key words:* DNA methylation, epigenetics, epigenetic inheritance, phenotypic plasticity, regulation of gene expression, unisexual vertebrates.

## Table des matières

Résumé-----	iii
Summary-----	iv
Table des matières-----	v
Liste des tableaux -----	vii
Liste des figures -----	viii
Liste des sigles et des abréviations-----	x
Remerciements-----	xii
<b>1. Introduction .....</b>	<b>1</b>
1.1 La synthèse moderne de l'évolution -----	2
1.2 La robustesse -----	4
1.2.1 Les mécanismes de la robustesse-----	4
1.2.2 La robustesse et la capacité d'évoluer -----	5
1.3 L'épigénétique -----	5
1.3.1 Les modifications épigénétiques -----	5
1.3.2 La méthylation de l'ADN à travers les taxons -----	7
1.3.3 Les fonctions de la méthylation de l'ADN-----	8
1.4 Épigénétique et évolution-----	9
1.4.1 Les épiallèles métastables -----	9
1.4.2 Plasticité phénotypique et modifications épigénétiques -----	10
1.4.3 Héritabilité épigénétique -----	13
1.5 Le complexe <i>Phoxinus eos-neogaeus</i> -----	13
1.6 Objectifs de l'étude -----	20
<b>2. Article : Comparison of gene transcription in phenotypically variable <i>Phoxinus eos-neogaeus</i> clonal hybrids (Pisces: Cyprinidae) ...</b>	<b>23</b>
Accord des coauteurs -----	24
Abstract -----	25
2.1 Introduction-----	26

2.2 Materials and Methods	29
2.2.1 Study species	29
2.2.2 Field sampling	30
2.2.3 Identification of diploid <i>Phoxinus eos-neogaeus</i>	31
2.2.4 RNA preparation and cDNA synthesis	32
2.2.5 Identification of differentially expressed transcripts	32
2.2.6 Assessment of the expression of both parental alleles	34
2.3 Results	35
2.4 Discussion	41
2.4.1 Absence of difference in gene transcription in mature <i>Phoxinus eos-neogaeus</i>	41
2.4.2 Mutations in the absence of difference in gene transcription	43
2.4.3 Early-life differences in gene transcription	44
2.4.4 Posttranscriptional and posttranslational modifications in gene expression	45
2.5 Acknowledgements	47
<b>3. Discussion</b>	<b>48</b>
3.1 Régulation de la transcription durant le développement	50
3.1.1 Les protéines PcG et trxG	50
3.1.2 La méthylation de l'ADN	51
3.2 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes	52
3.2.1 Les microARNs	52
3.2.2 Le chaperon moléculaire Hsp 90 et la robustesse phénotypique	54
3.3 Perspectives	55
<b>4. Références</b>	<b>57</b>
Annexe	xiii
Annexe 1	xiv

**Liste des tableaux**

<b>Tableau I</b> Mesures corporelles prises par Doeringsfeld et al. (2004) sur des individus de <i>Phoxinus eos</i> , de <i>P. neogaeus</i> et de <i>P. eos-neogaeus</i> .-----	20
<b>Table II.a</b> Lakes sampled during the study -----	31
<b>Table II.b</b> Primers used for assessment of the expression of the <i>Phoxinus eos</i> and the <i>Phoxinus neogaeus</i> alleles. In TDF names, the letter represents a primer combination and the number is the length of the TDF.-----	35
<b>Table II.c</b> Transcript-derived fragments (TDFs) isolated and sequenced following cDNA-AFLP expression profiling of <i>Phoxinus eos-neogaeus</i> muscle tissue. Sequence comparisons were performed using BLASTN in NCBI databases. In TDF names, the letter represents a primer combination and the number is the length of the TDF.-----	38

## Liste des figures

**Figure 1.1** Différents biotypes du complexe *Phoxinus eos-neogaeus*. Les individus sont des femelles matures. A- *Phoxinus neogaeus*; B- *P. eos*; C- *P. eos-neogaeus*.----- 14

**Figure 1.2** Distribution du complexe *Phoxinus eos-neogaeus* en Amérique du Nord. (A) Distribution géographique du complexe *P. eos-neogaeus* selon Scott et Crossman (1973) et étendue maximale (ligne pointillée) de la dernière glaciation du Pléistocène. Composition des communautés pour des sites du Montana (B), du Nebraska (C), du Minnesota (D) et du Québec (E) (adaptée de Angers et Schlosser, 2007).----- 15

**Figure 1.3** Reproduction dans le complexe gynogénétique *Phoxinus eos-neogaeus*. E : *Phoxinus eos* ; N : *Phoxinus neogaeus*. Les lettres normales désignent la composition du génome nucléaire et celles en indices, la composition du génome mitochondrial. Les mosaïques (EN-EEN<sub>N</sub> et EN-ENN<sub>N</sub>) sont triploïdes pour certaines de leurs cellules et diploïdes pour d'autres. Le cybride (EE<sub>N</sub>) résulte de la reproduction d'un triploïde EEN<sub>N</sub> avec un *P. eos* et aura donc un génome nucléaire *P. eos* et un génome mitochondrial *P. neogaeus*. ----- 16

**Figure 1.4** Distribution des lignées clonales d'hybrides dans la région des Laurentides au Québec. Noir : lignée A; Gris: lignée B (adaptée de Angers et Schlosser, 2007). ----- 18

**Figure 1.5** Relations morphométriques de la forme corporelle entre les espèces *Phoxinus* parentales et les clones diploïdes. Les points représentent les valeurs pour chaque individu pour la composante principale corrigée pour les effets confondants de la taille (*sheared PCA*) de 10 mesures de distances corporelles et pour la première composante résultant d'une ACP traditionnelle faite avec des caractères corporels ne constituant pas des mesures de distance (adaptée de Doeringsfeld et al., 2004). ----- 21

**Figure 2.1** Part of a cDNA-AFLP gel with primer combination A. All individuals are triplicated. Letters represent the lakes from which the fish come: T, Triton; S, Saad; B, Barbotte; J, Jonction; M, Merde; Sau, Saumon. T1 and T3: *Phoxinus eos*; S27 and S44: *P. neogaeus*; others: *P. eos-neogaeus*. Arrows 1 and 2 represent TDFs specific to *P. eos* and to *P. neogaeus*, respectively, equally expressed among the hybrids. Arrow 3 is a TDF seemingly specific to *P. eos* that shows different intensities among the hybrids (TDF A-185). It is not possible to attribute a parental origin to the differentially expressed TDF identified by arrow 4 (TDF A-410).----- 39

**Figure 2.2** Part of a denaturing polyacrylamide gel revealing the *Phoxinus eos* allele (E) and the *P. neogaeus* allele (N) for TDF A-410. Every lane corresponds to a single individual. G is a positive control reaction with hybrid genomic DNA. The asterisks designate individuals for which no band was detected in the cDNA-AFLP analysis. ----- 40

## Liste des sigles et des abréviations

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
A <sup>vy</sup>	Agouti viable yellow
BLASTN	basic local alignment search tool N
bp	base pair
C	cytosine
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cDNA-AFLP	complementary deoxyribonucleic acid – amplified fragment-length polymorphism
cds	coding sequence
CpG	cytosine et guanine séparées par un groupement phosphate
DNase I	deoxyribonuclease I
Dnmt3a	deoxyribonucleic acid methyltransferase 3 a
Dnmt3b	deoxyribonucleic acid methyltransferase 3 b
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
Egr-1	early growth response 1
E-value	expect value
G	guanine
Hsp90	heat shock protein 90
IAP	intracisternal A-particle
mg	milligram
miRNA	micro ribonucleic acid
miARN	micro acide ribonucléique
miR-1	micro acide ribonucléique 1
N	north

NCBI	National Centre of Biotechnology Information
ng	nanogram
PcG	Polycomb group
PCR	polymerase chain reaction
<i>Rbl2</i>	retinoblastoma-like protein 2
RG	récepteur des glucocorticoïdes
RNA	ribonucleic acid
SSCP	single-strand conformation polymorphism
T	thymine
TDF	transcript-derived fragment
$T_m$	melting temperature
U	uracile
trxG	trithorax group
W	west
$\mu\text{g}$	microgram
$\mu\text{l}$	microliter
%	pour cent
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
3' UTR	three prime untranslated region

## Remerciements

Je remercie d'abord mon directeur de recherche Bernard Angers pour son esprit scientifique ouvert et pour la confiance qu'il m'a accordée. Ce projet fut un beau « trip » scientifique.

Je suis aussi reconnaissante envers Nadia Aubin-Horth et Annie Angers qui ont partagé avec moi leur expertise et qui m'ont offert un support technique. Je me souviendrai aussi de mes compagnons de laboratoire pour leurs rigolotes fanfaronnades et leurs propos parfois édifiants, parfois discutables. Je tiens plus particulièrement à remercier les personnes qui m'ont assistée au laboratoire et sur le terrain, soit Joëlle Boizard, Guillaume Desrochers, Martin Laporte, Rachel Massicotte, Claude-Olivier Silva-Beaudry et Francis Vallières. Je serai aussi éternellement reconnaissante envers ma famille, mes amis et Mario pour leur support, leur amitié et leur amour inconditionnels.

Je remercie finalement le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) pour le support financier qu'ils m'ont accordé durant ma maîtrise.

## **1. Introduction**

Dans cette étude, la question de l'influence de l'environnement sur le phénotype a été examinée avec des individus génétiquement identiques. Dans cette introduction, cette question sera d'abord placée dans un contexte évolutif plus large, le modèle biologique utilisé sera ensuite présenté et les objectifs de l'étude seront spécifiés dans la dernière section.

### **1.1 La synthèse moderne de l'évolution**

La synthèse moderne de l'évolution est une théorie regroupant des idées de plusieurs disciplines de la biologie et qui explique l'évolution. Le développement de la génétique des populations dans les décennies précédentes fut l'instigateur de son développement. Cette théorie a alors permis de réconcilier la théorie de l'évolution graduelle avec les travaux de génétique mendélienne, qui semblaient plutôt prétendre que l'évolution se faisait par saltation.

Selon cette théorie, la seule source de variation héréditaire dans les populations naturelles est de nature génétique. Contrairement à la théorie originelle de Darwin, la synthèse moderne (aussi appelée *Néo-darwinisme*) rejette fermement les idées de Lamarck selon lesquelles les organismes peuvent transmettre aux générations suivantes des caractéristiques acquises durant leur vie (Weismann, 1889). Ainsi, l'évolution dépendrait de mutations aléatoires dans les lignées germinales suivies par une sélection naturelle sur la progéniture (Mayr et Provine, 1980).

Suite au développement de la théorie néo-darwiniste, la mutation s'est imposée comme le mécanisme de la variation phénotypique et beaucoup d'efforts de recherche ont été consacrés à la mesure des taux de mutations. Les taux de mutations ponctuelles varient entre les organismes (Rando et Verstrepen, 2007) et il serait possible, en théorie, de prédire le nombre de mutations par génome par génération. Ce n'est toutefois pas aussi simple puisque le taux de mutation varie à travers les régions du génome. Dans le génome humain, par exemple, il existe des points chauds et des points froids pour la mutation qui couvrent plusieurs centaines de kilobases d'ADN (Chuang et Li, 2004). Même si le taux de mutation était uniforme à travers toutes les régions du génome, les différents phénotypes varieraient tout de même à des taux différents puisqu'ils ont des cibles mutationnelles de tailles différentes. Par exemple, la taille de la cible mutationnelle d'un phénotype qui dépend d'une protéine avec plusieurs acides aminés essentiels sera plus grande que celle d'un phénotype dépendant d'une protéine avec peu de domaines essentiels et le taux de variation de ces deux phénotypes risque ainsi de ne pas être le même.

La stabilité d'un phénotype est définie par son taux de changement par génération cellulaire. En principe, en connaissant le taux de mutation et la taille de la cible mutationnelle d'un phénotype donné, il serait possible d'en prédire la stabilité. Beaucoup de recherches ont été entreprises pour établir la stabilité de phénotypes donnés à partir de la connaissance de ces deux éléments. De façon importante, il en est ressorti que plusieurs phénotypes avaient des stabilités différent de ce qui était attendu. Plusieurs mécanismes cellulaires permettant de ralentir ou d'accélérer le taux de changement phénotypique ont été découverts. Il existe d'une part des mécanismes

qui diminuent la sensibilité d'un phénotype à la mutation ; ce sont des mécanismes de robustesse (section 1.2). À l'opposé, d'autres phénotypes varient plus rapidement que ce qui serait attendu simplement par la mutation. Dans cette classe de phénotypes, il existe plus particulièrement des phénotypes dont la variation rapide n'est pas attribuable à de la variation génotypique, mais plutôt à de la variation épigénétique (sections 1.3 et 1.4).

## 1.2 La robustesse

Il existe deux sortes de robustesse. Lorsqu'un phénotype demeure stable dans une grande gamme d'environnements, on parle de robustesse environnementale, tandis que lorsqu'un phénotype ne change pas sous l'effet des mutations, on parle de robustesse génétique (Wagner, 2005). La robustesse génétique a probablement évolué afin de préserver des phénotypes vitaux contre l'effet possiblement néfaste de mutations aléatoires. Waddington (1942, 1953) fut le premier à traiter du phénomène de robustesse, qu'il nomma *canalisation*, lorsqu'il remarqua la stabilité du développement des organismes face aux mutations et aux perturbations environnementales.

### 1.2.1 Les mécanismes de la robustesse

Il existe plusieurs manières de coder un gène robustement. Par exemple, plusieurs acides aminés sont codés par plusieurs codons différents. La leucine, le plus courant des acides aminés, a pour codons UUA, UUG, CUA, CUG, CUC et CUU. Il est plus robuste de coder la leucine avec un codon CUX qu'avec un codon UUX car, dans le premier cas, une mutation du troisième nucléotide ne changera pas l'acide aminé

encodé alors que dans le deuxième cas, une telle mutation fera en sorte que le codon code plutôt pour la phénylalanine. Advenant que la séquence peptidique d'une protéine soit changée, il existe aussi des mécanismes permettant aux protéines de fonctionner normalement en dépit de ces « erreurs ». La protéine Hsp90 est un exemple de ce type de mécanisme (Rutherford et Lindquist, 1998). Cette protéine chaperonne s'assure du bon repliement tridimensionnel des polypeptides en protéines, même si ces polypeptides n'ont pas leur séquence habituelle.

### *1.2.2 La robustesse et la capacité d'évoluer*

Certains stress environnementaux peuvent compromettre les mécanismes de robustesse comme Hsp90, révélant ainsi la variation génétique « cachée » (concept de *capacitance évolutive*) (Rutherford et Lindquist, 1998; Masel, 2005). S'ils s'avèrent favorables, ces phénotypes « découverts » peuvent être sélectionnés, menant à des changements phénotypiques héréditaires (concept d'*assimilation* : Waddington, 1953; Durrant, 1962; McLaren, 1999). Ce mécanisme pourrait donc représenter une voie alternative pour l'évolution de nouveaux phénotypes qui contredirait un des piliers de la synthèse moderne de l'évolution, soit que l'évolution de nouveaux phénotypes se fait de façon graduelle.

## **1.3 L'épigénétique**

### *1.3.1 Les modifications épigénétiques*

L'épigénétique est l'étude des changements stables et réversibles dans le potentiel d'expression des gènes qui se font sans changement de la séquence d'acides nucléiques (Jaenisch et Bird, 2003). La façon la plus directe d'étiqueter un gène pour

l'activation ou pour la répression est de déposer une étiquette chimique directement sur son ADN. La méthylation de l'ADN est probablement la mieux connue des modifications épigénétiques. Les modifications des histones sont un autre type de modifications épigénétiques qui ont traditionnellement été étudiées. Les histones sont des protéines qui s'assemblent en octamères pour former les nucléosomes. L'ADN se compacte en s'enroulant autour des nucléosomes pour former la chromatine. Plusieurs types de modifications covalentes peuvent se produire sur les acides aminés des queues N-terminales des histones. Ces modifications entraînent un changement dans la force de l'interaction ADN-histones et par conséquent, un changement dans l'expression des gènes associés (Muller et al., 2002) (revues sur les modifications des histones : Berger, 2002 ; Jenuwein et Allis, 2001).

Récemment, avec le développement des technologies, d'autres catégories de modifications épigénétiques ont été identifiées telles la répression génique post-transcriptionnelle par des ARN non-codants (Ambros, 2004; Bartel, 2004), la répression génique transcriptionnelle par des ARN interférents double-brins (Mette et al., 2000) et le contrôle de l'activité des gènes en fonction de leur position dans le noyau des cellules (Fraser et Bickmore, 2007). Ces processus sont tous liés aux modifications des histones et ont tous comme résultat d'affecter la structure de la chromatine, altérant par le fait même l'expression des gènes associés (Bird et Macleod, 2004).

### 1.3.2 La méthylation de l'ADN à travers les taxons

Il y a beaucoup de variations dans les types de patrons de méthylation trouvés chez les êtres vivants. Chez les eucaryotes multicellulaires, seuls les résidus cytosines sont méthylés. Chez les vertébrés, la méthylation de l'ADN ne se produit que sur le dinucléotide CpG. Les sites méthylés sont distribués globalement à travers le génome des vertébrés, c'est-à-dire que tous les types de séquences d'ADN (gènes, transposons et ADN intergénique) sont sujets à la méthylation (Rabinowicz et al., 2003; Eckhardt et al., 2006). L'exception à cette méthylation globale est constituée par de courtes régions non méthylées qu'on nomme les îlots CpG et qui représentent seulement 1-2 % du génome (Bird, 1986). Chez les invertébrés, la méthylation ne domine pas ainsi le génome. Le patron de méthylation est généralement en mosaïque, avec des domaines méthylés entremêlés de domaines non méthylés ; les deux types de domaines étant en proportion égale (Tweedie et al., 1997). Les plus hauts niveaux de méthylation chez les eucaryotes ont été observés chez les plantes où jusqu'à 50 % des cytosines sont méthylées chez certaines espèces (Montero et al., 1992). Chez le maïs, par exemple, cette forte méthylation serait associée au nombre élevé de transposons ; ces derniers étant des cibles de cette modification. D'autres plantes comme *Arabidopsis thaliana* montrent par contre un patron de méthylation en mosaïque comparable à celui observé chez les invertébrés.

Il existe d'autres types de modifications de l'ADN que la méthylation de la cytosine, mais leur distribution phylogénétique s'avère limitée. Il est possible que les autres groupements chimiques, tels les groupements phosphate ou acétyle, et que la méthylation à une autre position sur l'ADN interfèrent avec la fonction normale de

l'ADN, expliquant ainsi cette absence de diversité dans les types de modifications de l'ADN (Bird et Macleod, 2004). Même la méthylation de la cytosine a des inconvénients puisque c'est une base mutagène chez les vertébrés et chez les bactéries (Coulondre et al., 1978 ; Bird, 1980). La méthylation de la cytosine semble donc avoir ses avantages et ses désavantages. Les désavantages pourraient parfois supplanter les avantages, expliquant possiblement la disparition de cette modification à quelques reprises durant l'évolution. Effectivement, on observe que certains organismes ont perdu la méthylation de l'ADN alors que des organismes apparentés l'ont conservée. Par exemple, le mycète *Neurospora crassa* montre de la méthylation de l'ADN (Selker et al., 2003) tandis que les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* en sont entièrement dépourvues. Le nématode *Caenorhabditis elegans*, un autre organisme modèle, ne présente également pas de méthylation de l'ADN.

### 1.3.3 Les fonctions de la méthylation de l'ADN

Selon la conception générale, la méthylation de l'ADN sert à réprimer irrévocablement la transcription d'un gène (Bird et Wolffe, 1999). La méthylation de l'ADN du promoteur peut bloquer la transcription d'un gène de deux façons. D'abord, elle modifie les séquences d'ADN reconnues par les facteurs de transcription qui ne pourront alors plus se lier et s'assembler au promoteur pour amorcer la transcription. Il existe aussi des protéines qui se lient spécifiquement aux CpG méthylés et qui agissent comme répresseurs transcriptionnels (Boyes et Bird, 1991).

Dans les dernières années, de nouvelles techniques ont permis de cartographier à l'échelle du génome entier les patrons de méthylation de l'ADN (Suzuki et Bird, 2008). La plante *Arabidopsis thaliana* est le premier organisme dont les marques de méthylation ont été ainsi cartographiées et ces travaux ont amené des découvertes surprenantes (Zilberman et al., 2007). Plusieurs des séquences d'ADN méthylées étaient, tel qu'attendu, des régions transcriptionnellement silencieuses. Or, la méthylation de l'ADN a aussi été observée sur de l'euchromatine sans transposons. Effectivement, 33 % des gènes d'*A. thaliana* possédaient des CpG méthylés dans leurs portions transcrites. Dans ce cas, la méthylation ne réprime donc pas l'expression des gènes touchés. À première vue, ces observations ne cadrent pas avec le rôle répressif traditionnellement associé à la méthylation de l'ADN. Toutefois, il a été suggéré que cette méthylation intra-génique servirait à prévenir le bruit transcriptionnel dû une initiation « illégitime » à l'intérieur d'unités transcriptionnellement actives (Zilberman et al., 2007). La méthylation de l'ADN dirigée spécifiquement sur des gènes transcriptionnellement actifs n'est pas unique aux plantes et a également été observée chez des invertébrés, tels l'ascidie *Ciona intestinalis* (Suzuki et al., 2007) et le puceron *Myzus persicae* (Field et al., 1989). De plus, des études sur le chromosome X chez l'humain suggèrent que ce phénomène est aussi présent chez les mammifères (Hellman et Chess, 2007).

## 1.4 Épigénétique et évolution

### 1.4.1 Les épiallèles métastables

Les épiallèles sont des allèles avec la même séquence nucléotidique qui diffèrent les uns des autres par leur état épigénétique. Un épiallèle métastable est un épiallèle où

l'état épigénétique peut changer et où l'établissement de cet état se fait de façon probabiliste (Rakyan et al., 2002). Différents épiallèles entraînent des différences de phénotypes qui elles entraînent des différences dans la valeur adaptative des individus. L'allèle  $A^{vy}$  (*Agouti viable yellow*) chez la souris est un exemple d'un tel épiallèle métastable (Morgan et al., 1999). Le degré de méthylation est établi de façon stochastique sur un rétrotransposon IAP (Intracisternal A-particle) inséré en amont du gène *Agouti*, menant à une expression variable d'*Agouti* et à des différences phénotypiques. Par exemple, si l'élément IAP est hypométhylé, *Agouti* sera exprimé de façon ectopique et les souris auront un pelage jaune et elles seront obèses et susceptibles au cancer et au diabète; si l'élément IAP est hyperméthylé, *Agouti* aura une expression normale et les souris auront un phénotype normal. Ainsi, l'état épigénétique détermine le phénotype; le génotype seul ne peut expliquer le phénotype des souris  $A^{vy}$ . Aussi, de façon importante, cet épiallèle est transmis méiotiquement sans que son état épigénétique ne soit effacé.

#### *1.4.2 Plasticité phénotypique et modifications épigénétiques*

La plasticité phénotypique est la capacité de produire des phénotypes différents à partir d'un unique génotype en réponse à des stimuli environnementaux (Agrawal, 2001; Price et al., 2003). Elle se situe donc à l'opposé de la robustesse environnementale. La plasticité a souvent une base génétique (Agrawal, 2001). Effectivement, il existe de la variation génétique pour la plasticité dans presque toutes les espèces où celle-ci a été cherchée (Pigliucci, 2007). La plasticité phénotypique évoluerait afin de maximiser la valeur adaptative des individus dans des environnements variables (Dudley et Schmitt, 1996). La plasticité phénotypique

serait donc une propriété qui peut évoluer et être adaptative si la valeur adaptative d'un individu augmente lorsqu'il change son phénotype (de Jong, 2005). L'interaction entre la plasticité phénotypique et la sélection est très complexe puisque la plasticité est, dans certains cas, une propriété qui peut être sélectionnée tandis que dans d'autres cas, elle peut plutôt agir comme un tampon à l'action de la sélection, menant à l'accumulation de redondance génétique. Bien que plusieurs exemples de plasticité phénotypique aient été décrits, les mécanismes qui en sont responsables sont encore peu compris.

Un changement dans l'expression des gènes en réponse à l'environnement peut être dû à des interactions transitoires ADN–protéines. Supposons par exemple qu'un certain stimulus environnemental déclenche des voies de signalisation cellulaire spécifiques. Ces voies activeront des facteurs de transcription déjà présents dans le cytosol de la cellule par des modifications post-traductionnelles. Les facteurs de transcription activés se déplaceront alors au noyau pour activer la transcription de leur gène cible. Ce gène cible code pour un facteur de transcription qui peut, à son tour, changer l'activité de ses propres gènes cibles, soit en les activant, soit en les réprimant. Ensemble, ces phénomènes permettront un changement à court terme de l'expression des gènes dont la perpétuation dépendra de la présence du stimulus environnemental.

Les modifications épigénétiques seraient un autre mécanisme moléculaire de la plasticité phénotypique qui permettrait par contre des changements à long terme de

l'expression des gènes en réponse à des stimuli environnementaux. De plus en plus de travaux indiquent que les états épigénétiques peuvent être influencés par l'environnement. Par exemple, chez la souris *A<sup>vy</sup>*, une diète riche en donneurs de groupements méthyles (supplémentée en acide folique et vitamine B<sub>12</sub>) augmentera le degré de méthylation de l'élément IAP, ce qui supprime la surexpression d'*Agouti* et procure un pelage de couleur normale à la souris (Waterland et Jirtle, 2003). Par la propagation mitotique des marques épigénétiques, les changements de l'expression des gènes induits par l'épigénétique sont stables et peuvent même être maintenus en l'absence du stimulus environnemental déclencheur.

Szyf et al. (2005) ont récemment proposé un mécanisme permettant de lier les changements à court terme de l'expression des gènes aux changements à long terme de l'épigénome. Chez les rats, des soins maternels de léchage et de toilettage déclenchent des voies de signalisation cellulaire qui augmentent l'expression de la protéine *egr-1*, un facteur de transcription activateur de l'expression du gène du récepteur des glucocorticoïdes (RG) (Meaney et al., 2000). La protéine *egr-1* recrutera à son tour des protéines qui vont créer des modifications épigénétiques sur le promoteur de RG (Weaver et al., 2007). Ces modifications transforment le promoteur du RG en un promoteur fort de sorte que l'expression accrue du RG persistera durant toute la vie du rat, bien après la fin des soins maternels. Ce modèle pourrait être un mécanisme conservé permettant de lier les changements à court et long termes de l'expression des gènes. Ainsi, les modifications épigénétiques pourraient sous-tendre plusieurs cas de plasticité phénotypique.

### 1.4.3 Héritabilité épigénétique

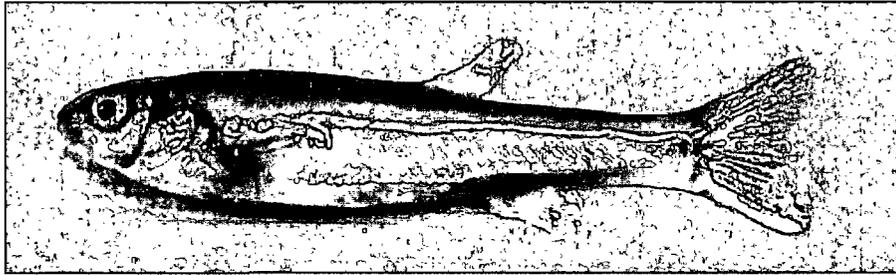
En plus de perpétuer un état d'expression génique induit par l'environnement durant toute la vie d'un individu, les modifications épigénétiques pourraient aussi transmettre les effets de l'environnement sur l'expression des gènes aux générations suivantes. Par exemple, Anway et al. (2005) ont rapporté que l'exposition de femelles de rats gestantes à des produits chimiques industriels perturbant les fonctions endocriniennes pouvait mener à des problèmes de fertilité chez les mâles qui persistent sur plusieurs générations (F1 à F4) et qui sont corrélés à des changements dans les patrons de méthylation de l'ADN.

Tous les éléments sont donc en place pour un « nouveau » système d'héritabilité où l'environnement influence la formation d'épiallèles qui sont transmis méiotiquement. Avant de remettre en question l'ensemble des modèles évolutifs, il s'avère par contre important d'établir la fréquence et l'importance réelles de la variation épigénétique dans les populations naturelles, ce que peu d'études ont tenté de faire jusqu'à maintenant (Richards, 2006). Un problème rencontré lorsqu'on veut faire ce type d'études est la difficulté de distinguer les effets du génotype et de l'épigénotype sur le phénotype (Bossdorf et al., 2008). Une façon de contourner ce problème est de travailler avec des systèmes où il n'y a pas de variation génétique, c'est-à-dire des populations naturelles d'organismes clonaux.

## 1.5 Le complexe *Phoxinus eos-neogaeus*

Le *Phoxinus eos* et le *Phoxinus neogaeus* (Pisces : Cyprinidae) sont trouvés dans le Nord des États-Unis et le Sud du Canada. Les hybrides *Phoxinus eos-neogaeus*

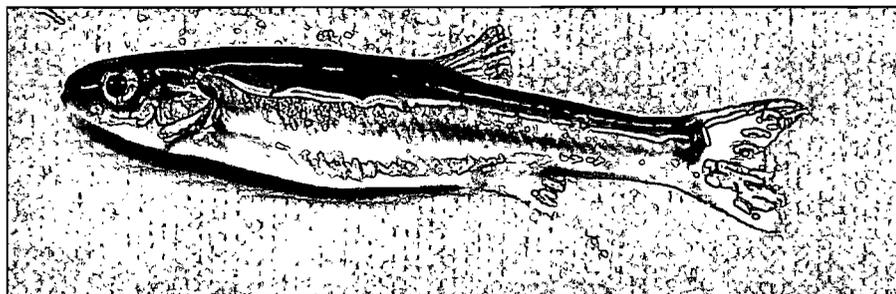
A-



B-

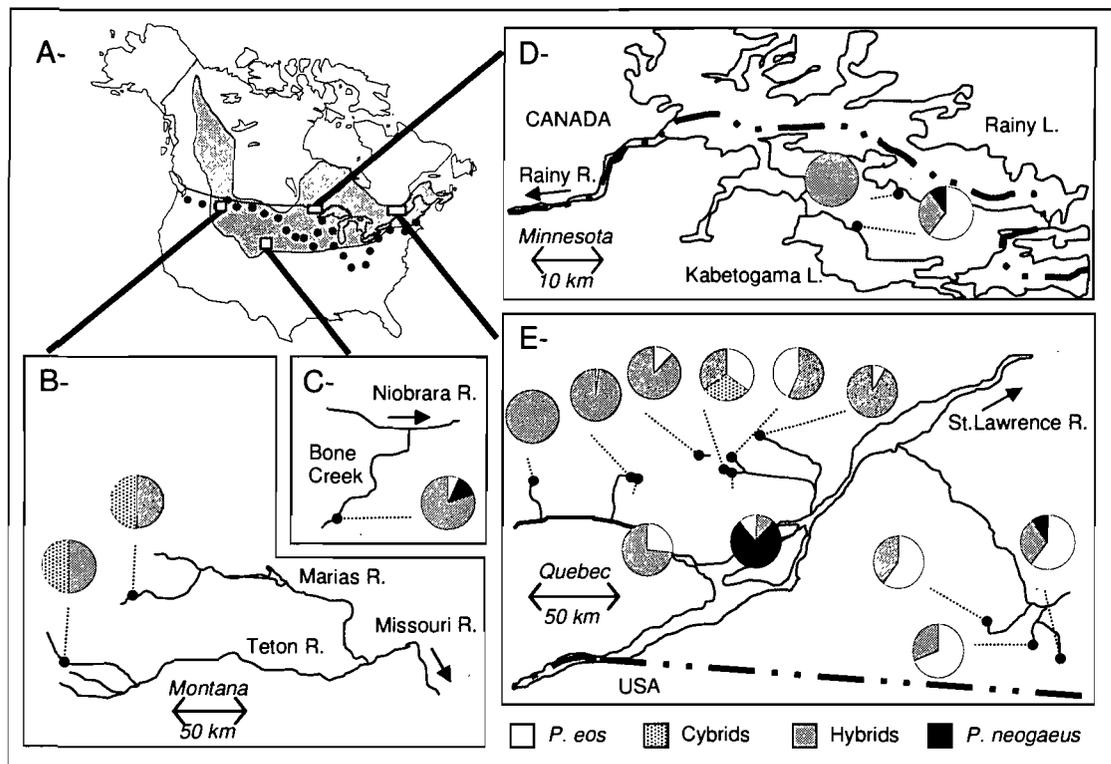


C-



**Figure 1.1** Différents biotypes du complexe *Phoxinus eos-neogaeus*. Les individus sont des femelles matures. A- *Phoxinus neogaeus* ; B- *P. eos* ; C- *P. eos-neogaeus*.

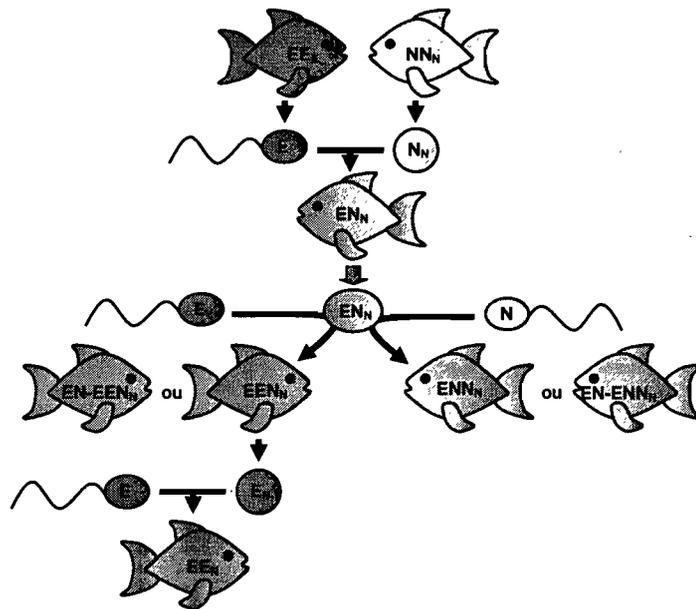
proviennent d'hybridations entre ces deux espèces qui ont eu lieu il y a moins de 50 000 ans (Angers et Schlosser, 2007) (Fig. 1.1, p. 14). Ces hybrides sont communs et ont aussi une distribution importante (Goddard et al., 1989) (Fig. 1.2, p. 15). Ils sont toujours trouvés en sympatrie avec une ou les deux espèces parentales.



**Figure 1.2** Distribution du complexe *Phoxinus eos-neogaeus* en Amérique du Nord. (A) Distribution géographique du complexe *P. eos-neogaeus* selon Scott et Crossman (1973) et étendue maximale (ligne pointillée) de la dernière glaciation du Pléistocène. Composition des communautés pour des sites du Montana (B), du Nebraska (C), du Minnesota (D) et du Québec (E) (adaptée de Angers et Schlosser, 2007).

Les hybrides *Phoxinus eos-neogaeus* sont asexués et tous femelles. L'asexualité chez les vertébrés se produit seulement chez des hybrides interspécifiques unisexués (Dawley, 1989). Les hybrides *Phoxinus eos-neogaeus* se reproduisent par gynogenèse

(Goddard et Dawley, 1990) et produisent donc des œufs diploïdes non réduits. En gynogenèse, le sperme d'une des deux espèces parentales est requis pour activer l'embryogenèse, mais il n'y a pas incorporation dans l'œuf. Le processus gamétogénique aberrant empêche la recombinaison génétique, entraînant ainsi un mode de transmission clonal chez ces hybrides: la progéniture est génétiquement identique entre elle et à sa mère.

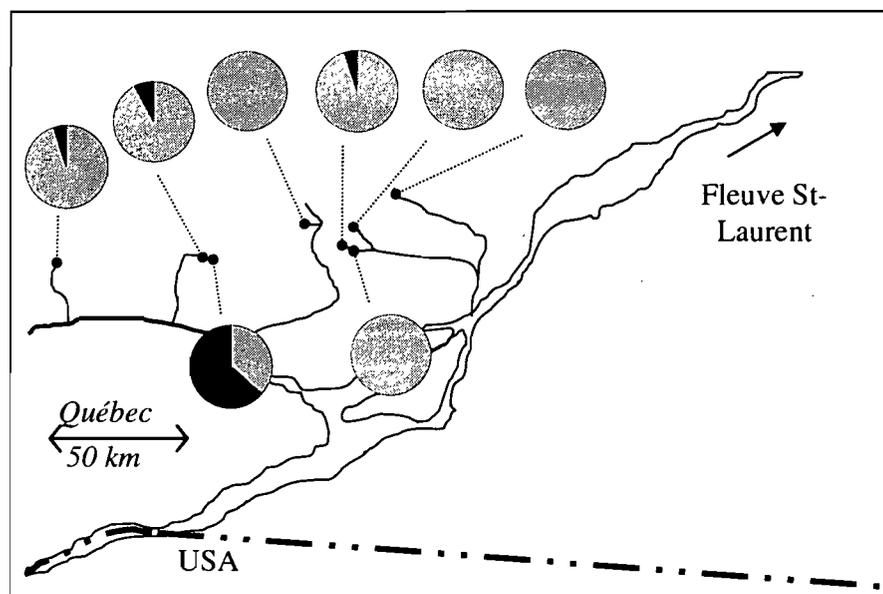


**Figure 1.3** Reproduction dans le complexe gynogénétique *Phoxinus eos-neogaeus*. E: *Phoxinus eos*; N: *Phoxinus neogaeus*. Les lettres normales désignent la composition du génome nucléaire et celles en indices, la composition du génome mitochondrial. Les mosaïques (EN-EEN<sub>N</sub> et EN-ENN<sub>N</sub>) sont triploïdes pour certaines de leurs cellules et diploïdes pour d'autres. Le cybride (EE<sub>N</sub>) résulte de la reproduction d'un triploïde EEN<sub>N</sub> avec un *P. eos* et aura donc un génome nucléaire *P. eos* et un génome mitochondrial *P. neogaeus*.

Comme chez beaucoup de vertébrés unisexués, on retrouve aussi des polyploïdes (Goddard et Dawley, 1990). Effectivement, il peut arriver que le génome nucléaire d'une espèce parentale soit incorporé dans l'œuf diploïde, produisant des individus triploïdes (e.g., *Phoxinus eos-neogaeus* x *eos*, le biotype triploïde le plus commun chez les *Phoxinus*) (Fig. 1.3, p. 16). Ces triploïdes possèdent des caractéristiques particulières les distinguant des autres vertébrés polyploïdes : ils sont fortement représentés dans le complexe *P. eos-neogaeus* (40-60% des hybrides) (Goddard et al., 1989) et ils se reproduisent sexuellement (Goddard et al., 1989).

La production continue de variabilité génétique est un argument souvent évoqué pour expliquer la prédominance de la sexualité plutôt que celle de l'asexualité chez les vertébrés (Maynard Smith, 1978). Le fait que la plupart des populations de vertébrés unisexués présentent une diversité génétique significative supporte ceci (Vrijenhoek, 1978). Cette diversité est représentée par différents clones résultant d'hybridations indépendantes entre les espèces parentales et vivant au sein d'une même population. Une sélection s'opère afin qu'il y ait un chevauchement minimal entre les niches écologiques des différents clones et des espèces parentales. On obtient ainsi des lignées clonales spécialisées avec une adaptation locale très forte (hypothèse du gel de la variation de la niche (Vrijenhoek, 1979, 1984)). Il semble donc que la condition d'hybridations multiples soit nécessaire au maintien de l'asexualité.

Or, contrairement à beaucoup d'autres espèces asexuées, le *Phoxinus eos-neogaeus* est plutôt caractérisé par une relative uniformité génétique. Effectivement, dans plusieurs lacs où on le trouve, une seule lignée clonale est présente et seulement quelques lignées ont été détectées dans les régions étudiées jusqu'à maintenant (Goddard et al., 1989; Elder et Schlosser, 1995; Doeringsfeld et al., 2004; Angers et Schlosser, 2007 (Fig. 1.4, p. 18)). Aussi, Goddard et al. (1998) ont montré que les hybrides d'une population en 1994 étaient génétiquement identiques aux hybrides de 1983 de cette même population. Cette uniformité génétique temporelle et spatiale suggère que les *Phoxinus eos-neogaeus* ne dépendent pas de multiples hybridations pour se maintenir et que ce phénomène ne permet pas ici d'expliquer le maintien de l'asexualité.



**Figure 1.4** Distribution des lignées clonales d'hybrides dans la région des Laurentides au Québec. Noir : lignée A; Gris: lignée B (adaptée de Angers et Schlosser, 2007).

Les hybrides se sont dispersés à travers l'Amérique du Nord à partir des refuges glaciaires où se sont produites les hybridations (Angers et Schlosser, 2007). Ils occupent par conséquent des environnements hétérogènes. La diversité dans l'utilisation de l'habitat par des individus appartenant à une seule lignée hybride a été documentée par Schlosser et al. (1998) et par Doeringsfeld et al. (2004). Par exemple, Schlosser et al. (1998) ont montré que les abondances absolues de *P. eos*, de *P. neogaeus* et des hybrides gynogènes étaient les plus élevées dans les zones littorales oxygénées. Par contre, une fréquence accrue des gynogènes par rapport aux autres biotypes a été observée dans les zones pélagiques et benthiques, indiquant que les gynogènes peuvent utiliser une plus grande diversité d'habitats et sont plus physiologiquement tolérants aux conditions anoxiques que leurs géniteurs sexués.

Comment les hybrides ont-ils pu faire face à cette variabilité environnementale en absence de diversité génétique ? Lorsque des organismes font face à un nouvel environnement auquel ils ne sont pas adaptés, on observe souvent une augmentation de leur variabilité phénotypique. Une des façons d'augmenter leur variabilité phénotypique est d'augmenter la fréquence de la reproduction sexuée (Greig et al., 1998). Malgré leur incapacité à faire de la reproduction sexuée, les hybrides *Phoxinus eos-neogaeus* démontrent beaucoup de variabilité phénotypique (Schlosser et al., 1998; Doeringsfeld et al., 2004). Effectivement, par la mesure de différents caractères morphologiques (Tab. I, p. 20), Doeringsfeld et al. (2004) ont montré que les hybrides clonaux de la péninsule de Kabetogama au Minnesota possédaient au moins autant de variabilité morphologique que leurs espèces parentales ; certains des

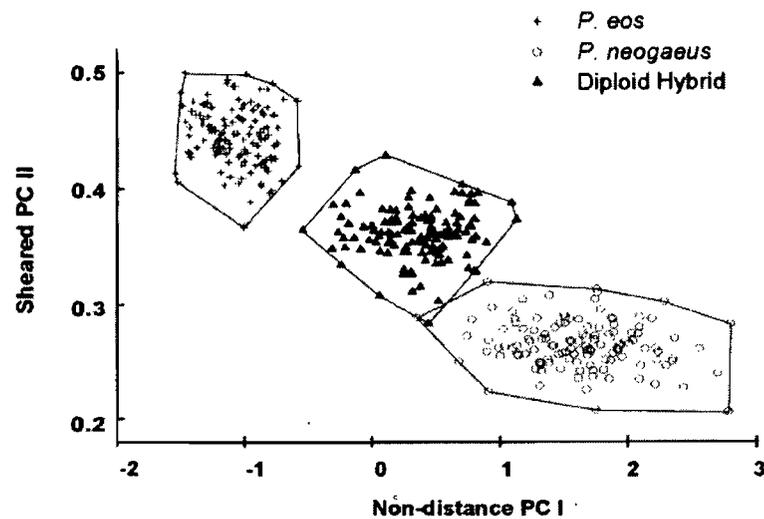
**Tableau I** Mesures corporelles prises par Doeringsfeld et al. (2004) sur des individus de *Phoxinus eos*, de *P. neogaeus* et de *P. eos-neogaeus*.

<i>Mesures de distances corporelles</i>	Longueur, longueur prédorsale, profondeur corporelle maximale, largeur corporelle maximale, profondeur du pédoncule caudal, longueur de la tête, largeur de l'espace interorbital, position de la nageoire pectorale, longueur de la mâchoire supérieure, largeur de la bouche
<i>Autres mesures corporelles</i>	Angle de la bouche, masse corporelle, conformation de l'intestin, nombre de dents pharyngiennes

hybrides étant plus semblables aux *Phoxinus eos*, d'autres, aux *Phoxinus neogaeus* (Fig. 1.5, p. 21). Il doit donc y avoir d'autres mécanismes qui permettent aux hybrides d'augmenter leur variabilité phénotypique en réponse à l'environnement. Par leurs propriétés énumérées plus haut, les processus épigénétiques pourraient jouer un rôle dans la création de cette plasticité phénotypique.

### 1.6 Objectifs de l'étude

Quels mécanismes permettent la production à partir d'un unique génotype de la variabilité phénotypique observée chez le *Phoxinus eos-neogaeus* ? La première étape vers l'élucidation de cette question consiste en l'identification des gènes dont l'expression diffère entre les hybrides. Pour chacun de leur gène, les hybrides possèdent un allèle *P. eos* et un allèle *P. neogaeus*, leur conférant ainsi un potentiel de produire une grande diversité de protéines. Les deux allèles spécifiques d'un seul gène pourraient être exprimés à des niveaux différents. En supposant qu'à un gène donné, différents hybrides sur-expriment et sous-expriment des allèles spécifiques différents via un contrôle épigénétique de la transcription, des variations



**Figure 1.5** Relations morphométriques de la forme corporelle entre les espèces *Phoxinus* parentales et les clones diploïdes. Les points représentent les valeurs pour chaque individu pour la composante principale corrigée pour les effets confondants de la taille (*sheared PCA*) de 10 mesures de distances corporelles et pour la première composante résultant d'une ACP traditionnelle faite avec des caractères corporels ne constituant pas des mesures de distance (adaptée de Doeringsfeld et al., 2004).

phénotypiques pourraient être créées chez ces individus génétiquement identiques. Alternativement, ces variations phénotypiques pourraient aussi être le résultat de la régulation différentielle de la transcription de gènes entiers.

Afin de vérifier ces hypothèses, les profils de transcription de *Phoxinus eos-neogaeus* d'une même lignée hybride provenant de différents lacs ont été comparés afin d'identifier des allèles pour lesquels les hybrides sont hémizygotes et qui démontrent une expression différentielle. Les séquences et l'identité de ces allèles ont été établies et le niveau d'expression de l'autre allèle spécifique a ensuite été déterminé. Dans le cas où des allèles spécifiques seraient régulés différemment, on s'attend à ce que

certains hybrides expriment un allèle spécifique et que d'autres hybrides expriment l'autre allèle spécifique, tandis que dans le cas où des gènes entiers sont régulés différemment, certains hybrides exprimeront les deux allèles et d'autres n'exprimeront rien du tout.

Une différenciation significative de l'expression des gènes ou des allèles entre les populations d'hybrides pourrait être associée à de la variation épigénétique sous-jacente. Cette étude se veut une première étape vers l'élucidation des mécanismes de la plasticité phénotypique chez ces hybrides. À partir de la connaissance des séquences exprimées différemment, les mécanismes responsables des différences d'expression pourront ultérieurement être examinés plus spécifiquement, par exemple en comparant le degré de méthylation du promoteur de ces gènes. La capacité de réguler différemment les allèles de plusieurs gènes de cette façon permettrait de produire une grande gamme de phénotypes différents. Des modifications épigénétiques pourraient être sous-jacentes à ces différences d'expression et ces modifications pourraient avoir été induites directement par l'environnement. Si ces marques épigénétiques induites par l'environnement sont transmises de génération en génération, ceci représenterait un potentiel d'adaptation et une capacité à évoluer chez cette lignée asexuée.

**2. Article : Comparison of gene transcription in phenotypically variable *Phoxinus eos-neogaeus* clonal hybrids (Pisces: Cyprinidae)**

**Abstract**

Clonal reproduction and, by extension, absence of genetic variation are normally associated with constrained evolutionary potential. Nevertheless, asexual *Phoxinus eos-neogaeus* fish from a single hybrid lineage occur in heterogeneous environments and are phenotypically diverse. The aim of this study was to identify the gene expression differences underlying the phenotypic variability of *Phoxinus eos-neogaeus* individuals from a single hybrid lineage living in different environments. Our hypothesis was that genetically identical hybrids could differentially regulate the transcription of their genes or of their alleles through epigenetic modifications to create phenotypic plasticity. By cDNA-AFLP, we sought to identify genes or specific alleles differentially expressed among the hybrids. Unexpectedly, no differences in gene transcription were detected among mature individuals of *Phoxinus eos-neogaeus*, but the presence of mutations in the gene sequences of some hybrids was revealed. These results contradict those of studies with organisms in which epimutations appeared at greater rates than mutations. Finally, even though they do not induce gene expression differences among mature hybrids at the transcriptional level, epigenetic mechanisms might still play an important role in the creation of phenotypic plasticity in the hybrids, but at different levels of gene regulation or during development.

## 2.1 Introduction

The continuous creation of genetic variability is one of the most widely accepted arguments for the predominance of sexual over asexual reproduction (Weissman, 1889; Maynard Smith, 1978). Indeed, in asexual organisms, fixed genotypes are transmitted from parent to offspring, leaving no room for variation or adaptation to a new environment. In vertebrates in particular, asexuality is restricted to unisexual taxa resulting from interspecific hybridizations (Vrijenhoek, 1989; Schlupp, 2005). Because of their inherent lack of genetic variability and therefore of potential to evolve, asexual vertebrates are usually considered as evolutionary dead-ends (Rice, 2002). However, many asexual vertebrate lineages seem to possess short-term ecological success: they are abundant and have a large geographical and ecological distribution. In several cases, this success has been attributed to their populations actually being genetically diverse, this diversity taking the form of several different clones within a single population (Vrijenhoek, 1979; Lima, 1998; Gray and Weeks, 2001). These clones result from independent hybridization events (Vrijenhoek, 1978). By creating genetic diversity, multiple hybridization events thus appear to be a condition for the maintenance of asexuality in vertebrates.

In contrast, populations of the asexual fish *Phoxinus eos-neogaeus* appear to possess little or no genetic diversity. Indeed, in several lakes where it occurs, a single clonal lineage is present and only a few lineages have been detected per studied region (Goddard et al., 1989; Elder and Schlosser, 1995; Doeringsfeld et al., 2004; Angers and Schlosser, 2007). The hybridization events took place in glacial refuges during

the Pleistocene; at the end of the glaciation, hybrids dispersed throughout North America (Angers and Schlosser, 2007). The same lineage will therefore occur in heterogeneous environments. This diversity in habitat use for a single diploid clonal lineage was indeed documented by Schlosser et al. (1998) and Doeringsfeld et al. (2004). In the absence of genetic variation, the ability of an organism to adapt to environmental variability depends on its capacity for phenotypic variation. A number of studies have revealed a substantial amount of morphological variability in hybrids from a single clonal lineage (Schlosser et al., 1998; Doeringsfeld et al., 2004). For example, Doeringsfeld et al. (2004) have shown that the diploid hybrids from the Kabetogama Peninsula, Minnesota, USA were at least as morphologically variable as their parental species. With their genetic uniformity and phenotypic variability across broad geographical and ecological scales, *Phoxinus eos-neogaeus* hybrids appear to be successful without depending on multiple hybridizations to generate genetic diversity.

Since the hybridizations occurred *ca.* 50 000 years ago (Angers and Schlosser, 2007), there should be no mutations in the gene sequences of hybrids from a given lineage. Hence, it seems that mechanisms other than sex and mutations are responsible for accelerating the rate of phenotypic change in these fish. The phenotypic differences in these asexual organisms could be underlain by differences in gene expression. In the absence of genetic variation, epigenetic modifications could be the mechanism by which differences in gene expression occur. Epigenetics refers to changes in gene expression stably propagated through cellular divisions that occur without changes in

the DNA sequence but through, for example, chemical modifications to the DNA and its associated proteins, the histones (Jaenisch and Bird, 2003). These changes can induce phenotypic differences among individuals that will create differences in individual fitness (e.g., Cubas et al., 1999; Morgan et al., 1999). There are more and more examples of environmentally-induced changes in epigenetic states (Steward et al. 2002; Waterland and Jirtle, 2003; Bastow et al., 2004; Weaver et al., 2007). These changes in gene expression can persist even in the absence of the environmental stimulus that caused them and, in some cases, be transmitted through meiosis (e.g., Anway et al., 2005). By differential regulation of the expression of their genes, epigenetic marks could therefore provide an alternative system for the inheritance of phenotypic changes in the asexual *Phoxinus eos-neogaeus*.

Alternatively to differential gene regulation, the phenotypic variability observed in *Phoxinus eos-neogaeus* could also be the result of the differential regulation of the expression of the specific alleles of their genes. For every one of their genes, *Phoxinus eos-neogaeus* hybrids possess a *P. eos* allele and a *P. neogaeus* allele, enabling them to produce a great diversity of proteins. Epialleles are alleles with identical nucleotide sequences that differ from each other in the patterns of methylation of their DNA nucleotides (Kalisz and Purugganan, 2004). At a given gene, different individuals could possess different *P. eos* epialleles and different *P. neogaeus* epialleles, which could lead to different levels of expression of the these two specific alleles and to the creation of phenotypic variation among these genetically identical individuals. That the two specific alleles of a gene can be

expressed at different levels in *Phoxinus eos-neogaeus* has been reported by Letting et al. (1999) who observed at two different genes that the *P. eos* allozyme was more expressed than the *P. neogaeus* allozyme.

The aim of this study was to identify the expression differences that might be underlying the phenotypic variability of genetically identical *Phoxinus eos-neogaeus* individuals living in different environments. More specifically, we sought gene or allele expression differences at the transcriptional level using cDNA-AFLP. This AFLP-based transcript profiling method allows genome-wide expression analysis in any species without the need for prior sequence knowledge, making it appropriate for work with non-model organisms such as *Phoxinus eos-neogaeus* (Vuylsteke et al., 2007). Differentially expressed fragments obtained through the cDNA-AFLP analysis were sequenced and the relative expression of the two parental alleles of a given gene was then compared among the hybrids.

## **2.2 Materials and Methods**

### *2.2.1 Study species*

Asexual *Phoxinus eos-neogaeus* come from hybridizations between the northern redbelly dace *Phoxinus eos* and the finescale dace *Phoxinus neogaeus* (Pisces: Cyprinidae). They are common and are widely distributed through the northern part of North America (Scott and Crossman, 1973). These all-female hybrids produce unreduced eggs without recombination (Goddard et al., 1989, 1998). As it is characteristic of gynogenetic species, the sperm from one of the two parental species is required to activate embryogenesis but the paternal genome is not incorporated into

the egg. The offspring are thus diploid individuals genetically identical to each other and to their mother (Dawley et al., 1987; Goddard et al., 1989).

As in many other gynogenetic vertebrates, syngamy of the sperm of one of the parental species and the ova pronuclei can occur, resulting in triploid individuals (Goddard and Dawley, 1990). In contrast to other gynogenetic vertebrates, *Phoxinus* triploids are common (40-60% of the hybrids) (Goddard and Dawley 1990; Schlosser et al. 1998; Binet and Angers 2005) and reproduce sexually (Goddard et al., 1989).

### 2.2.2 Field sampling

Fish from eight lakes belonging to different watersheds of the St Lawrence River, Quebec, Canada were sampled (Tab. II.a, p. 31). These lakes were formed *ca.* 10 000 years ago and environmental heterogeneity occurs among them in the form of deep upland versus shallow lowland ponds, for example. The sampling was carried out during the reproductive period in the littoral zone of the lakes from mid-May 2007 to mid-June 2007 (Massicotte et al., 2008). The rationale for sampling during the reproductive period was to minimize differences in gene expression patterns that would be due to differences in life stage. Only mature females releasing eggs when a slight pressure was applied to their abdomen were collected. Fish were euthanized in eugenol and their muscle tissue was dissected and immediately placed in RNAlater stabilizing solution. We focused on the muscle tissue as it is highly involved in growth (Mommensen, 2001). Indeed, difference in body size was one of the important phenotypic differences observed among diploid hybrids by Schlosser et al. (1998) and Doeringsfeld et al. (2004).

**Table II.a** Lakes sampled during the study

Lake	Latitude (N)	Longitude (W)
Barbotte	46° 05' 36"	73° 52' 07"
Dépotoir	45° 50' 41"	74° 33' 21"
Jonction	45° 46' 37"	74° 34' 29"
Merde	45° 57' 56"	74° 01' 43"
Richer	45° 50' 35"	74° 11' 39"
Saad	45° 54' 51"	74° 01' 41"
Saumon	45° 59' 38.1"	74° 18' 21"
Triton	46° 59' 12.9"	74° 00' 30.6"

### 2.2.3 Identification of diploid *Phoxinus eos-neogaeus*

Genetic identification of the individuals was performed according to the procedure developed by Binet and Angers (2005). A first step consisted in conducting a PCR with primers that will give PCR products of different sizes for *P. eos* and *P. neogaeus*, thus allowing discrimination between the hybrids and the parental species. To separate the asexual diploids from the sexual triploids, the ploidy level of the different hybrids was then determined with seven hypervariable microsatellite markers (Binet and Angers, 2005; Angers and Schlosser, 2007). This step also allowed the detection of several distinct multilocus microsatellite genotypes among the diploid hybrids. These microsatellite clones were all connected to each other by a few mutations indicating that they come from the same hybridization event. A total of 26 diploid hybrids were selected according to their microsatellite genotype and to their lake of origin. When possible, individuals with the same genotype living in different lakes or alternatively, individuals with different genotypes but from the

same lake were included to assess the respective influences of the genotype and of the environment in creating similarity in expression patterns among the hybrids. Furthermore, we also chose individuals from the same lake with different genotypes to eliminate the possibility that similarities in their expression profiles were due to them sharing the same mother. Finally, three individuals from each parental species were randomly selected so that a parental origin could be attributed to the hybrid transcript-derived fragments (TDF) in the following experiments.

#### *2.2.4 RNA preparation and cDNA synthesis*

Total RNA was extracted from 50 mg of muscle tissue according to a standard Trizol protocol (Invitrogen), following tissue homogenization. The RNA was analyzed for quantity and quality on the Biophotometer (Eppendorf). Total RNA was treated with DNase I (New England Biolabs) to remove any contaminating genomic DNA. Double-stranded cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA according to standard protocols (Sambrook et al., 1989). The resulting double stranded cDNA was phenol-chloroform extracted, ethanol precipitated and dissolved in a final volume of 20 µl water.

#### *2.2.5 Identification of differentially expressed transcripts*

AFLP analyses were performed on double-stranded cDNA according to Bachem et al. (1996). All reactions were triplicated. Control reactions were performed on samples where no reverse transcriptase was used in the retro transcription to make sure there were no contaminating traces of genomic DNA. A total of 14 primer combinations were screened and cDNA bands ranging from 100 to 600 bp were considered.

In the search for differentially expressed genes or alleles, only TDFs of loci for which the hybrids were hemizygous were considered. The first step consisted of identifying TDFs specific to one of the parental species. Among these TDFs, we were interested in those displaying intensity differences among the hybrids. Since we were looking for significant differences in expression, we considered that visual assessment was precise enough. Differentially expressed TDFs were excised from the gel, eluted in water and reamplified using the appropriate set of selective primers. The specificity of the PCR reaction was then verified on a 6% denaturing polyacrylamide gel (19:1 acrylamide to bisacrylamide). This reamplification procedure was repeated until a single band was observed.

PCR reactions were then purified (QIAquick PCR Purification Kit) and cloned by ligation into the plasmid pGEM-T vector (Promega Corp., Madison, WI) followed by transformation in *E. coli* competent cells (strain JM109) according to the manufacturer's protocol. For each TDF, four colonies were sequenced (CEQ<sup>TM</sup> 8000 Genetic Analysis System, Beckman Coulter). The sequences of the TDFs (with vector sequences trimmed off) were compared to the sequences of the publicly available *nucleotide collection (nr/nt)* database of the National Centre of Biotechnology Information (NCBI) using the BLASTN algorithm (Altschul et al., 1997). Significant candidate genes were selected on the basis of their e-value (E-value cutoff =  $1e^{-5}$ ).

### 2.2.6 Assessment of the expression of both parental alleles

Primers complementary to the differentially expressed TDFs (Tab. II.b, p. 35) were designed using Primer3 software (<http://primer3.sourceforge.net>). PCR amplifications were performed with 100 ng of double-stranded cDNA and with the annealing temperatures in Tab. II.b (p. 35). For a given TDF, if the *P. eos* and the *P. neogaeus* alleles were of different sizes, the analysis was performed on a 6% denaturing polyacrylamide gel (19:1 acrylamide to bisacrylamide) whereas if they were of identical sizes, the analysis was done by SSCP (single-strand conformation polymorphism) on an 8% non-denaturing polyacrylamide gel (37.5:1 acrylamide to bisacrylamide). Negative control reactions were performed to rule out the possibility of genomic DNA contamination.

This step first allowed us to confirm that the variations in the cDNA-AFLP profiles of the different individuals reflected an absence of transcription rather than the presence of mutations in the restriction or priming sites. Subsequently, the relative intensities of the *P. eos* and of the *P. neogaeus* alleles of each TDF were compared for every hybrid. In the case where specific alleles were regulated differently, we expected some hybrids to express one parental allele and others to express the other parental allele, whereas in the case of differential gene expression, some hybrids were expected to express the two alleles and others to show no expression whatsoever.

**Table II.b** Primers used for assessment of the expression of the *Phoxinus eos* and the *Phoxinus neogaeus* alleles. In TDF names, the letter represents a primer combination and the number is the length of the TDF.

TDF	Primers (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Size of <i>P. eos</i> amplicon (bp)	Size of <i>P. neogaeus</i> amplicon (bp)
A-410	GTAAAACGCCTCAGGATGGA ACCTGGTACGGGTTTCGTATG	60	198	194
B-237	AAGCAGCAAACATATTCCTC CAAACGTAAAGCTTTACAAAAA	56	150	143
J-150	TGAACACACAGACCTACATAACCA AAAATTCTGCTGTTGTCACTTTAGAA	68	115	115
J-387	TGCTCCACGTGTACCTTCAG TCCTATGAGGAGAGCCTGGA	62	202	202

### 2.3 Results

A total of 424 cDNA fragments per hybrid were successfully amplified, with each primer combination yielding on average 30 scoreable bands. Of all the observed TDFs, 98 (23.1%) appeared to be specific to one or the other parental species (56 TDFs specific to *P. neogaeus* and 42 TDFs specific to *P. eos*). Ten of these 98 TDFs (10.2%) were identified as differentially expressed fragments (six TDFs specific to *P. neogaeus* and four TDFs specific to *P. eos*). Five additional differentially expressed TDFs to which no parental origin could be assigned were also considered, for a total of 15 TDFs showing differential expression among the hybrids. Examples of differentially expressed TDFs are shown in Fig. 2.1 (p. 39). Except for these 15 TDFs, the hybrids' transcription profiles were identical. The hybrids could not be sub-grouped by similarity of their expression patterns. That is to say that there were cases of hybrids from the same lake that differentiated themselves from the other hybrids in the expression of a few TDFs. However, different patterns of expression were observed among these same hybrids for other TDFs (Annex 1, p. xiv). Results

were reproducible as replicates of the same individual yielded identical banding patterns (Fig. 2.1, p. 39). Negative control cDNA-AFLP reactions did not yield any bands (result not shown).

Eight of these 15 differentially expressed TDFs each corresponded to 2–4 different nucleotide sequences. These different sequences were not homologous: they corresponded to different genes and not to different specific alleles of the same gene. This phenomenon is known as fragment-size homoplasy and it occurs when bands lacking homology have the same electrophoretic mobility (Caballero et al., 2008). These eight TDFs were not characterized further because it was not possible to determine which one of the gene fragments they contained was differentially expressed among the hybrids.

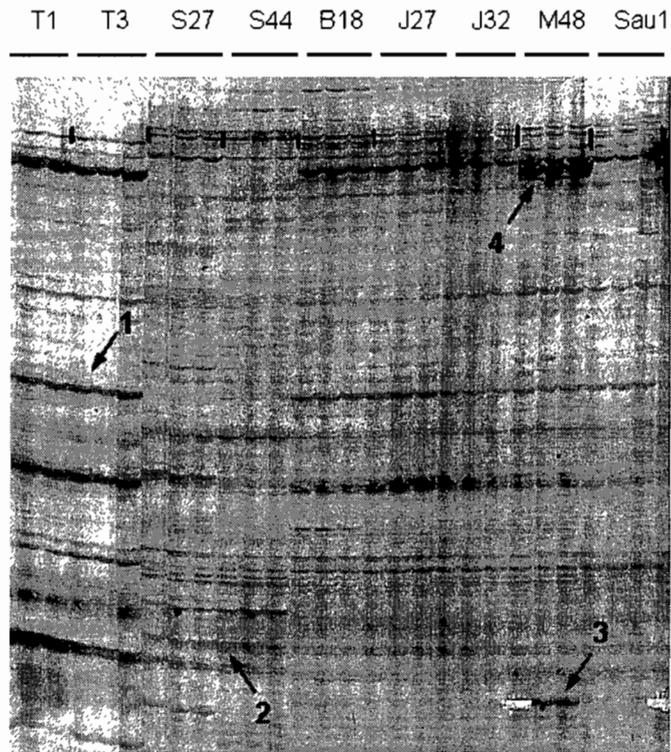
Significant sequence similarity was found for the seven TDFs where all clones had the same sequence (Tab. II.c, p. 38). Three of these TDFs corresponded to mitochondrial genes (A-185, D-387 and F-410). Because the mitochondrial genome is haploid, these TDFs were not further considered. PCR reactions with primers specific to sequences flanking these TDFs yielded amplification products for all the hybrids. Therefore it seems that the absence of amplification of these TDFs in some individuals could be due to the presence of mutations in the enzyme restriction sites or the priming sites of the primers used in the cDNA-AFLP analysis.

The analysis of the expression of both parental alleles was then performed with the four remaining TDFs. For every TDF, PCR reactions on individuals from the parental species confirmed that the primers could specifically amplify both the *P. eos* and the *P. neogaeus* alleles and further allowed the identification of these alleles in the hybrids. As for the cDNA-AFLP analysis, negative control reactions did not yield any amplification products. For every one of the four TDFs, the two parental alleles were of equal intensities for all the hybrids (Fig. 2.2, p. 40), thus revealing no differences in the transcription of genes or specific alleles among hybrids. Based on the results obtained with the mitochondrial genes, the expression differences observed for these four TDFs in the cDNA-AFLP analysis are presumably due to the existence for some hybrids of mutations in these genes, leading to an absence of amplification for these individuals that was interpreted as an absence of expression.

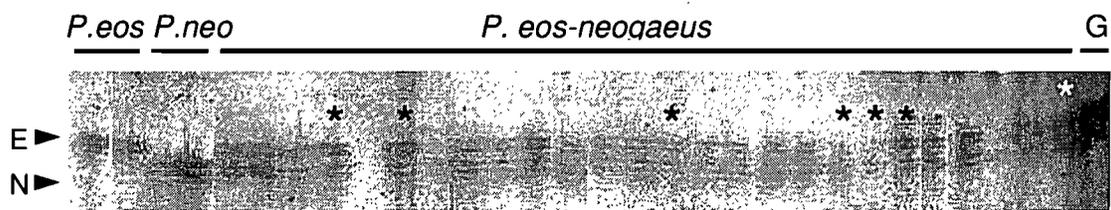
In brief, 86 of the 98 TDFs specific to one or the other parental species detected through the cDNA-AFLP analysis did not show differential expression among the hybrids. However, considering that half of the sequenced TDFs contained a single sequence, it is possible that only half of these equally expressed TDFs truly correspond to a single hemizygous locus. Of the 15 TDFs showing differential expression, three corresponded to mitochondrial genes and eight did not yield any valuable information. PCR analysis on the four remaining ones revealed that they were actually not differentially expressed among the hybrids, suggesting the presence of mutations in the hybrids where they were absent.

**Table II.c** Transcript-derived fragments (TDFs) isolated and sequenced following cDNA-AFLP expression profiling of *Phoxinus eos-neogaeus* muscle tissue. Sequence comparisons were performed using BLASTN in NCBI databases. In TDF names, the letter represents a primer combination and the number is the length of the TDF.

TDF	GenBank Accession	Most significant homology	Position of TDF in mRNA	Putative function	E-value
A-185	DQ664305.1	<i>Leuciscus leuciscus</i> isolate Leon10 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	cds	Metabolism and energy	2e-53
A-410	BC152165.1	<i>Danio rerio</i> clathrin interactor 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:7926716), complete cds	3' UTR	Intracellular transport	2e-87
B-237	NM_199935.1	<i>Danio rerio</i> capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta (capzb), mRNA	3' UTR	Regulation of growth of actin filament	8e-35
D-387	U57388.1	<i>Carassius auratus</i> cytochrome C oxidase subunit III mRNA, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, partial cds	cds	Metabolism and energy	1e-115
F-410	X17006.1	<i>Cyprinus carpio</i> mitochondrial mRNA for cytochrome C oxidase subunit III (EC 1.9.3.1).	cds	Metabolism and energy	5e-101
J-150	CR545476.14	Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) DNA sequence from clone DKEYP-74A11 in linkage group 9, complete sequence	3' UTR	Unknown	9e-08
J-387	EU414733.1	<i>Ctenopharyngodon idella</i> skeletal muscle myosin heavy chain (MHY) mRNA, complete cds	cds	Regulation of muscle contraction	5e-126



**Figure 2.1** Part of a cDNA-AFLP gel with primer combination A. All individuals are triplicated. Letters represent the lakes from which the fish come: T, Triton; S, Saad; B, Barbotte; J, Jonction; M, Merde; Sau, Saumon. T1 and T3: *Phoxinus eos*; S27 and S44: *P. neogaeus*; others: *P. eos-neogaeus*. Arrows 1 and 2 represent TDFs specific to *P. eos* and to *P. neogaeus*, respectively, equally expressed among the hybrids. Arrow 3 is a TDF seemingly specific to *P. eos* that shows different intensities among the hybrids (TDF A-185). It is not possible to attribute a parental origin to the differentially expressed TDF identified by arrow 4 (TDF A-410).



**Figure 2.2** Part of a denaturing polyacrylamide gel revealing the *Phoxinus eos* allele (E) and the *P. neogaeus* allele (N) for TDF A-410. Reactions with individuals from both parental species confirm specific amplification of the *P. eos* and the *P. neogaeus* alleles. Every lane corresponds to a single individual. G is a positive control reaction with hybrid genomic DNA. The asterisks designate individuals for which no band was detected in the cDNA-AFLP analysis.

## 2.4 Discussion

In this study, a cDNA-AFLP analysis was used to identify and isolate transcript-derived fragments differentially expressed in mature *Phoxinus eos-neogaeus* individuals of the same hybrid lineage living in different lakes. A PCR analysis performed to validate the cDNA-AFLP results revealed that these fragments were actually equally expressed among the hybrids. Our results thus seem to indicate that there are no genic, let alone allelic, differences in gene transcription among the sampled fish. The absence of actual difference in gene transcription in these phenotypically diverse individuals is striking and raises important questions concerning the responsible mechanisms of phenotypic plasticity.

### 2.4.1 Absence of difference in gene transcription in mature *Phoxinus eos-neogaeus*

Since its publication by Bachem et al. (1996), the cDNA-AFLP method has proven to be a powerful tool for genome-wide expression analysis, generating quantitative data that correlate well with GeneChip and microarray data (Reijans et al., 2003). The method has been widely used for temporal quantitative gene expression analyses and for gene discovery on the basis of fragment detection. For example, it has allowed the identification of genes involved in plant defence responses against pathogens (e.g., Polesani et al., 2008) and in insecticide resistance in agriculturally important pest species (e.g., Wee et al., 2008). Through its use, genes underlying phenotypic differences in genetically distinct strains of organisms of the same species have also been identified (e.g., Habu et al., 1997; Reineke et al., 2003). The present study represents the first use of cDNA-AFLP or, as a matter of fact, of any gene expression analysis method to identify gene expression differences among genetically identical

individuals at the same life stage. The power of the cDNA-AFLP method lies in its high specificity and high sensitivity (Reijans et al., 2003), ensuring that rare transcripts were detected and false positives majorly avoided in this study. The specificity of our results was confirmed by the high reproducibility of the cDNA-AFLP banding patterns. Through the use of several combinations of primers with varying selective nucleotides, we therefore believe to have successfully screened a significant fraction of the cDNA population of the hybrids' muscle tissue. Also, based on the results of transcriptomic studies of phenotypic plasticity indicating that organisms tend to respond to environmental stimuli in a holistic manner and not with individual tissues (Miura, 2005; Cossins et al., 2006; Derome et al., 2006 and St-Cyr et al., 2008), it seems improbable that the differences in gene transcription underlying *Phoxinus* phenotypic variability would occur at genes specifically transcribed in other tissues than the muscle.

Previous studies have revealed differential transcription of specific alleles in interspecific diploid hybrids. For example, bidirectional allelic silencing was detected by Adams and Wendel (2005) in diploid hybrids of cotton in which alternative alleles are silenced in different organs. However, the authors recognized that their results could be explained by regulatory mismatches varying by organ or by tissue and could therefore not necessarily represent a change in gene expression occurring in response to the environment. In any case, the absence of difference in allele expression in our study cannot be contrasted to the results of these previous studies as their focus was on finding inter-organ and inter-tissue expression differences and not on finding inter-

individual differences for the same tissue. Finally, we note that the differences in the expression of the two specific alleles detected by Letting et al. (1999) were small, with the *P. eos* allele comprising from 51.8 % to 59.7% of the examined genes' total activity. Our experimental approach might not have allowed the detection of such subtle expression differences and further investigations through the use of a more precise quantification method such as real-time PCR could prove to be relevant. Nevertheless, based on current evidence, we conclude that the phenotypic variability observed in mature *Phoxinus eos-neogaeus* hybrids is not due to major differences in gene transcription.

#### *2.4.2 Mutations in the absence of difference in gene transcription*

We predicted that the phenotypic variability in the hybrids would be underlain by differences in gene transcription. The finding that mutations explain the cDNA-AFLP variations observed among the individuals was unexpected considering the recent origin of the hybrids. A number of studies have predicted or have evidenced in a number of organisms that epigenetic changes in gene transcription (epimutations) occur at a greater rate than mutations (e.g., Kalisz and Purugganan, 2004; Rando and Verstrepen, 2007). Our results contradict this prediction. Indeed, we found mutations in the gene sequences of individuals from the same hybrid lineage whereas we did not detect any differences in gene transcription (i.e. no epimutations). Recently, it was demonstrated that methylation marks are erased during the zebrafish development (MacKay et al., 2007). An epimutation a fish acquires during its life will therefore not be transmitted to its progeny, possibly explaining why epimutations have not accumulated in *Phoxinus* hybrids. This however should not have precluded the

existence of epigenetic changes in gene transcription affecting a single generation of *Phoxinus* hybrids. Epigenetic variation has been known to arise in precise genomic contexts. For example, in the murine  $A^{vy}$  epiallele, epigenetic variation depends on the presence of a transposon in the *Agouti* locus (Morgan et al., 1999). It then seems that the genotype potentiates the epigenotype. Therefore, epialleles might not occur in *Phoxinus* hybrids by lack of an appropriate genomic context. Nevertheless, epigenetic mechanisms might still be playing a role in the creation of phenotypic variability in *Phoxinus* hybrids but at different times and levels of gene regulation.

#### 2.4.3 Early-life differences in gene transcription

Differences in gene expression occurring during the development in response to certain environmental cues are known to produce alternative forms in adult organisms. A striking example of developmental plasticity is found in social insects, where different incubation temperatures and embryonic diets will lead to the formation of two separate castes that drastically differ in their behaviour and appearance (Miura, 2005). Polycomb group (PcG) and trithorax group (trxG) proteins are epigenetic factors that regulate transcription during the development by modulating chromatin structure (Grimaud et al., 2006; Schuettengruber et al., 2007). It was found that these key developmental regulators of hundreds of different genomic loci can be modulated by environmental conditions, thus playing a role in phenotypic plasticity (Gibert et al., 2007). In the light of these discoveries, we believe it is possible that the phenotypic differences observed in mature individuals of *Phoxinus eos-neogaeus* could be due to differences in gene or allele transcription that occurred during fish development in response to different environmental conditions

and that these early-life differences would not be reflected in the expression profiles of adult fish. PcG and trxG proteins with their activity restricted to the development and because they might be environmentally influenced epigenetic regulators of hundreds of genes could be a mechanism underlying this developmental plasticity.

#### *2.4.4 Posttranscriptional and posttranslational modifications in gene expression*

The production of a particular phenotype from a given set of genes is not only controlled at the transcriptional level but also through posttranscriptional and posttranslational regulation of gene expression. First, organisms dispose of mechanisms allowing control over which transcripts are translated. Discovered less than a decade ago, microRNAs (miRNAs) have emerged as important regulators of gene expression in virtually all eukaryotes (Ambros, 2004; Bartel, 2004). They exert their effect posttranscriptionally by binding directly to target messenger RNAs (mRNAs) and inhibiting their stability and translation. They play a role in a wide array of cellular processes and their expression and activity have been known to be influenced, among others, by temperature (Dresios et al., 2005) and by nutrition (Marsit et al., 2006). Thus, it appears that they could direct changes in gene expression in response to environmental changes. Because cDNA-AFLP is performed with mRNAs and considering the short length of the miRNA molecules (21-24 nucleotides), possible variations in the abundance of these molecules were not assessed in the present study.

Secondly, regulation of gene expression also occurs at the posttranslational level. The well-known Hsp90 protein is a molecular chaperone that assures correct folding and

function of proteins (Csermely et al., 1998), even if the latter contain “mistakes” in their sequence. Environmental changes can perturb the monitoring activity of Hsp90, unmasking the “mistakes” carried by the proteins and bringing the expression of a different phenotype (Rutherford and Lindquist, 1998). Therefore, the absence of difference in gene transcription in *Phoxinus* hybrids might not necessarily mean that their genes are not expressed differently. For example, Letting et al. (1999) revealed differences in the expression of their specific alleles by measuring protein levels and not by measuring mRNA levels. Mechanisms of gene regulation operating at the posttranscriptional level, either through differential control over which transcripts are translated or of protein activity, could indeed bring differences in gene expression among *Phoxinus eos-neogaeus* hybrids, thus playing a role in their phenotypic variability.

In conclusion, asexual populations of *Phoxinus eos-neogaeus* individuals from the same hybrid lineage at the same life stage were used to remove confounding sources of variation in gene expression and thereby isolate the effect of epigenetic mechanisms on gene transcription. While no differences in gene transcription were detected among the individuals, genetic mutations were found. This suggests that epigenetic regulation of gene transcription may not be important in creating phenotypic variation in organisms, such as mammals, that have epigenetic dynamics similar to those of fish.

## **2.5 Acknowledgements**

We are grateful to F. Vallières, C.O. Silva-Beaudry, M. Laporte, J. Boizard and R. Massicotte for their field and laboratory assistance. We thank N. Aubin-Horth and A. Angers for their advice in designing the study. This research was supported by a research grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA. EC was supported by scholarships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).

### **3. Discussion**

Chez l'hybride asexué *Phoxinus eos-neogaeus*, la stabilité phénotypique dévie clairement de ce qui serait prédit uniquement par le taux mutationnel. Effectivement, malgré qu'ils soient génétiquement identiques, des hybrides d'une même lignée démontrent beaucoup de variabilité phénotypique. Il semble donc exister des mécanismes autres que le sexe et la mutation permettant d'accélérer le taux de changement phénotypique chez ces poissons. La présente étude visait à élucider ces mécanismes en cherchant d'abord à identifier les séquences d'ADN qui sont exprimées différemment chez les hybrides et qui sont donc sous le contrôle de ces mécanismes. D'autres études ont auparavant associé la variabilité phénotypique en absence de changement génotypique aux modifications épigénétiques. L'hypothèse était donc que les hybrides pourraient tirer avantage de la combinaison des génomes *P. eos* et *P. neogaeus* au sein de leur génotype en procédant à une régulation épigénétique différentielle de l'expression des allèles spécifiques de leurs gènes. Alternativement, cette régulation épigénétique différentielle pourrait aussi se faire sur des gènes entiers. Ces hypothèses ont été vérifiées en cherchant, au niveau transcriptionnel par AFLP-ADNc, des différences d'expression des allèles ou des gènes chez les hybrides. Nos résultats ont démontré qu'il n'y a pas de différences dans la transcription des gènes ou des allèles chez des hybrides matures d'une même lignée provenant de lacs différents. Des mutations dans les gènes de certains hybrides ont par contre été détectées. Ces deux résultats pris ensemble sont en contradiction avec ceux de précédentes études indiquant que les épimutations apparaissent à un taux plus rapide que les mutations. Plusieurs de ces dernières études ont par contre été effectuées avec des plantes. Chez les plantes, les dynamiques épigénétiques sont fort

différentes de celles prévalant chez des vertébrés tels les mammifères et les poissons. Effectivement, les lignées germinales des plantes sont dérivées des lignées somatiques tard dans le développement et l'effacement des marques de méthylation s'y fait de façon moins extensive durant le développement.

L'absence de différence dans la transcription de leurs gènes suggère aussi que la plasticité phénotypique observée chez les *Phoxinus eos-neogaeus* pourrait dépendre d'autres mécanismes, tels des différences transcriptionnelles durant le développement ou des différences post-transcriptionnelles de l'expression des gènes ou des allèles. Dans les prochains paragraphes, il sera question du potentiel de ces mécanismes à diriger des changements phénotypiques héréditaires, conférant ainsi une capacité d'évoluer à ces hybrides asexués.

### **3.1 Régulation de la transcription durant le développement**

#### *3.1.1 Les protéines PcG et trxG*

Les protéines des groupes Polycomb (PcG) et Trithorax (trxG) régulent la transcription de centaines de gènes durant le développement. Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, les protéines PcG établissent une répression génique spécifique à la lignée germinale qui est héritable par la méiose (Pirrotta, 2002). Aussi, Bantignies et al. (2003) ont montré que des interactions inter-chromosomales dépendantes de protéines PcG et menant à des changements de l'activité des gènes étaient transmises par la méiose. D'autre part, Gibert et al. (2007) ont montré que la température subie durant le développement affectait la répression et l'activation génique induites par PcG et par trxG, produisant de la plasticité phénotypique dans la

pigmentation abdominale chez la drosophile. Ces exemples laissent supposer que, dans certains cas, les protéines PcG et trxG pourraient induire des changements de la transcription des gènes en réponse à des stimuli environnementaux qui soient transmissibles aux générations suivantes.

### 3.1.2 La méthylation de l'ADN

Comme les protéines PcG et trxG, la méthylation de l'ADN régule aussi l'expression des gènes au niveau transcriptionnel et peut aussi induire des changements dans la transcription des gènes en réponse à l'environnement. Dans le cas de la méthylation, il existe par contre des exemples concrets de marques induites par l'environnement qui sont transmises par la méiose (e.g., Anway et al., 2005). Chez le *Phoxinus eos-neogaeus*, la méthylation de l'ADN pourrait-elle induire des changements de l'expression de gènes développementaux qui soient transmis aux générations suivantes?

La méthylation de l'ADN a été le plus intensivement étudiée chez les mammifères où les patrons de méthylation sont effacés et rétablis à deux reprises durant le développement (pour une revue, voir Morgan et al., 2005). La première déméthylation globale du génome se produit durant la gamétogenèse et la seconde a lieu dans la période du développement suivant la fécondation et précédant l'implantation. Récemment, il a été démontré que l'effacement des marques de méthylation se produisait également dans le développement du poisson-zèbre (MacKay et al., 2007). Ainsi, il semblerait qu'un poisson ne puisse pas transmettre à sa progéniture des marques de méthylation qu'il aura acquises durant sa vie.

L'effacement des marques de méthylation n'est par contre peut-être pas absolu. Par exemple, on trouve chez plusieurs organismes des épiallèles dont les marques de méthylation ne sont pas effacées durant le développement (e.g., *A<sup>vy</sup>* chez la souris : Morgan *et al.*, 1999; *Lcyc* chez la linare commune : Cubas *et al.*, 1999; *fwa* chez *Arabidopsis thaliana* : Soppe *et al.*, 2000; *B'* chez le maïs : Stam *et al.*, 2002; *MLH1* chez l'homme : Suter *et al.*, 2004). Il n'y a pas encore d'exemples de tels épiallèles chez les poissons, mais leur présence chez une grande diversité d'eucaryotes indique qu'ils risquent également de s'y retrouver. Malgré cette possibilité, la méthylation de l'ADN ne semble pas pouvoir assurer à elle seule la transmission intergénérationnelle de variations phénotypiques induites par l'environnement chez les poissons. Effectivement, les marques de méthylation sont effacées durant leur développement et la division des lignées germinale et somatique s'y produit très tôt, faisant en sorte que les changements épigénétiques se produisant dans les lignées somatiques ne seront pas transmis dans les lignées germinales.

### **3.2 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes**

#### *3.2.1 Les microARNs*

Les microARNs (miARNs) endogènes jouent un rôle dans plusieurs processus tels la différenciation, la prolifération et l'apoptose (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Alors que les mécanismes épigénétiques « classiques », tels les modifications des histones et la méthylation de l'ADN, régulent l'expression des gènes au niveau transcriptionnel, les miARNs agissent principalement au niveau post-transcriptionnel. Jusqu'à maintenant dans ce travail, les différents types de modifications épigénétiques ont été décrits comme des mécanismes agissant de façon distincte et indépendante, mais beaucoup

d'études suggèrent en fait que ces mécanismes interagissent à plusieurs niveaux. La méthylation de l'ADN, les modifications des histones et la régulation par les miARNs sont des exemples de mécanismes interconnectés. Par exemple, des changements dans la désacétylation et la méthylation des histones peuvent modifier la transcription des gènes des miARNs (Saito et al., 2006). Aussi, beaucoup d'études ont noté des changements de la méthylation de l'ADN dans des cas de cancers chez l'homme qui résultent en des changements de l'expression de miARNs (Calin et Croce, 2007; Esteller, 2007). De plus, beaucoup de gènes de miARNs seraient associés à des îlots CpG, les cibles de la méthylation de l'ADN. Ainsi, il semblerait que la transcription des miARNs soit contrôlée épigénétiquement. Alternativement, les miARNs peuvent aussi réguler ces facteurs épigénétiques de contrôle de la transcription. Par exemple, Chen et al. (2006) ont noté que l'ARNm de l'histone désacétylase 4 était une cible du miARN miR-1 durant la différenciation myoblastique. Aussi, des travaux plus récents de Benetti et al. (2008) lient la régulation par les miARNs à des changements dans la méthylation de l'ADN. Dans cette étude, la diminution de l'expression de *Rbl2* via la régulation post-transcriptionnelle de miARNs mène à la répression transcriptionnelle des ADN méthyltransférases *Dnmt3a* et *Dnmt3b* et, par conséquent, à des changements dans la méthylation de l'ADN. Il semble donc que la méthylation de l'ADN, un processus épigénétique influencé par l'environnement mais dont les effets se limitent à une seule génération chez plusieurs organismes, influencerait et serait influencée par les miARNs. Ainsi, l'influence de l'environnement sur l'expression des miARNs qui a auparavant été observée (e.g., Dresios et al., 2005; Marsit et al., 2006) pourrait se faire via la régulation transcriptionnelle de la méthylation de

l'ADN. Les ARNs, contrairement à la méthylation de l'ADN, ne sont pas effacés pendant le développement et peuvent être transmis dans les gamètes. Ainsi, les marques de méthylation de l'ADN induites par l'environnement pourraient, via leur effet sur des miARNs transmis méiotiquement, entraîner des variations phénotypiques héréditaires.

### 3.2.2 *Le chaperon moléculaire Hsp 90 et la robustesse phénotypique*

La protéine Hsp90 représente un mécanisme de robustesse génétique permettant le bon repliement d'une protéine en dépit des erreurs qu'elle peut contenir. Certains stress environnementaux peuvent compromettre ce système amortisseur, révélant ainsi les erreurs que contiennent ces protéines. Par exemple, Rutherford et Lindquist (1998) ont fait subir un choc thermique à des embryons de drosophiles, provoquant un recrutement massif des protéines Hsp90 présentes dans le cytoplasme pour répondre au stress. Conséquemment, l'activité de monitoring de Hsp90 a diminué, entraînant plusieurs changements morphologiques chez les mouches adultes. En supposant que, chez des individus génétiquement identiques, différents environnements compromettent à des degrés différents ce mécanisme de robustesse, les mutations masquées contenues dans leur génome pourraient être révélées à des degrés différents, créant donc de la plasticité phénotypique.

Chez des hybrides interspécifiques, certains gènes peuvent être exprimés de façon anormale à cause d'un mésappariement entre les éléments régulateurs des génomes des deux espèces (Landry et al., 2005). Par exemple, à un gène donné, l'interaction des éléments régulateurs *trans* d'une espèce avec les éléments régulateurs *cis* de

l'autre espèce peut mener à la dérégulation de ce gène. Vu le grand temps de divergence entre le *Phoxinus eos* et le *Phoxinus neogaeus*, on peut s'attendre à ce que les gènes des hybrides de ces deux espèces soient soumis à ce type de dérégulation. Leurs mécanismes de robustesse pourraient être compromis par de tels mésappariements des éléments régulateurs (i.e. l'expression du gène *Hsp90* serait anormale), leur conférant du coup une possibilité accrue à créer de la plasticité phénotypique. Paradoxalement, ce pourrait donc être un « défaut » dans la régulation de leurs gènes qui assurerait le succès évolutif de ces hybrides asexués.

### 3.3 Perspectives

L'interaction entre les mécanismes de robustesse et l'environnement mène à une réflexion plus générale sur la nature de la plasticité phénotypique. Cette dernière est-elle réellement une réaction spécifiquement déclenchée par l'organisme en réponse à l'environnement ou ne serait-elle pas plutôt le sous-produit d'une défaillance dans les mécanismes de robustesse, ne se manifestant que pour les phénotypes peu robustes?

Dans le cas où leur plasticité phénotypique serait effectivement attribuable à des « défauts » que leur procure leur condition d'hybrides, les *Phoxinus eos-neogaeus* ne s'avèreraient pas des modèles universels pour comprendre l'effet de l'environnement sur la régulation des gènes. Alors, l'utilité d'étudier ces hybrides se limiterait à comprendre le problème circonscrit mais néanmoins intrigant de la persistance évolutive des asexués. Si par contre les mécanismes assurant leur plasticité phénotypique sont communs aux espèces sexuées, les *Phoxinus eos-neogaeus*

s'avèreraient de précieux modèles pour étudier l'influence de l'environnement sur le phénotype en absence de diversité génétique.

Finalement, que le *Phoxinus eos-neogaeus* soit un bon modèle ou non, il me paraît maintenant évident que l'environnement peut influencer plusieurs niveaux de régulation de l'expression des gènes pour créer de la plasticité phénotypique. L'expression des gènes n'est pas seulement régulée lors de la transcription mais aussi après. Ainsi, de la même façon qu'une absence de différence dans la transcription des gènes ne signifie pas qu'il n'y a pas de différence d'expression, une différence dans la transcription des gènes n'équivaut pas forcément à une différence de leur expression. Ainsi, les études où des liens de causalité directs sont établis entre des différences transcriptionnelles et des différences phénotypiques sont à prendre avec un grain de sel. Les mécanismes de la plasticité phénotypique doivent plutôt être étudiés de façon globale en intégrant plusieurs niveaux de régulation.

## 4. Références

Adams, K.L. et Wendel, J.F. 2005. Allele-Specific, Bidirectional Silencing of an Alcohol Dehydrogenase Gene in Different Organs of Interspecific Diploid Cotton Hybrids. *Genetics* 171: 2139–2142.

Agrawal, A.A. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294: 321–326.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. et Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein search programs. *Nucleic Acids Research* 25 :3389–3402.

Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350–355.

Angers, B. et Schlosser, I.J. 2007. The origin of *Phoxinus eos-neogaeus* unisexual hybrids. *Molecular Ecology* 16: 4562–4571.

Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M. et Skinner, M.K. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308: 1466–1469.

Bachem, C.W.B., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M. et Visser, R.G.F. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal* 9: 745–753.

Bantignies, F., Grimaud, C., Lavrov, S., Gabut, M. et Cavalli, G. 2003. Inheritance of Polycomb-dependent chromosomal interactions in *Drosophila*. *Genes & Development* 17: 2406–2420.

Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.

Bastow, R., Mylne, J.S., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R.A. et Dean, C. 2004. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* 427: 164–167.

Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Muñoz, P., Gonzalez, S., Schoeftner, S., Murchison, E., Andl, T., Chen, T., Klatt, P., Li, E., Serrano, M. et Millar, S. 2008. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nature Structural & Molecular Biology* 15: 268–280.

Berger, S.L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinions in Genetics and Development* 12: 142–148.

Binet, M.C. et Angers, B. 2005. Genetic identification of members of the *Phoxinus eos-neogaeus* hybrid complex. *Journal of Fish Biology* 67: 1169–1177.

Bird, A.P. 1980. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 1499–1504.

Bird, A.P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209–213.

Bird, A.P. et Wolffe, A.P. 1999. Methylation-induced repression – belts, braces, and chromatin. *Cell* 99: 451–454.

Bird, A. et Macleod, D. 2004. Reading the DNA methylation signal. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 69: 113–118.

Bossdorf, O., Richards, C.L. et Pigliucci, M. 2008. Epigenetics for Ecologists. *Ecology Letters* 11: 106–115.

- Boyes, J. et Bird, A. 1991. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 64: 1123–1134.
- Caballero, A., Quesada, H. et Rolán-Alvarez, E. 2008. Impact of Amplified Fragment Length Polymorphism Size Homoplasy on the Estimation of Population Genetic Diversity and the Detection of Selective Loci. *Genetics* 179: 539–554.
- Calin, G.A. et Croce, C.M. 2007. Investigation of MicroRNA alterations in leukemias and lymphomas. *Methods in Enzymology* 427: 191–213.
- Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L. et Wang, D.Z. 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics* 38: 228–233.
- Chuang, J.G. et Li, H. 2004. Functional bias and spatial organization of genes in mutational hot and cold regions in the human genome. *PLoS Biology* 2, E29. [10.1371/journal.pbio.0020029](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020029).
- Cossins, A., Fraser, J., Hughes, M. et Gracey, A. 2006. Post-genomic approaches to understanding the mechanisms of environmentally induced phenotypic plasticity. *The Journal of Experimental Biology* 209: 2328–2336.
- Coulondre, C., Miller, J.H., Farabough, P.J. et Gilbert, W. 1978. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274: 775–780.
- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohászka, Z. et Nardai, G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics* 79: 129–68.
- Cubas, P., Vincent, C. et Coen, E. 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401: 157–161.

Dawley, R.M., Schultz, R.J. et Goddard, K.A. 1987. Clonal reproduction and polyploidy in unisexual hybrids of *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaeus* (Pisces: Cyprinidae). *Copeia* 1987: 275–283.

de Jong, G. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: patterns of plasticity and the emergence of ecotypes. *New Phytologist* 166: 101–117.

Derome, N., Duchesne, P. et Bernatchez, L. 2006. Parallelism in gene transcription among sympatric lakewhitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchill) ecotypes. *Molecular Ecology* 15: 1239–1249.

Doeringsfeld, M.R., Schlosser, I.J., Elder, J.F. et 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.

Dresios, J., Aschrafi, A., Owens, G.C., Vanderklish, P.W., Edelman, G.M. et Mauro, V.P. 2005. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:1865–1870.

Dudley, S.A. et Schmitt, J. 1996. Testing the adaptive plasticity hypothesis: Density-dependent selection on manipulated stem length in *Impatiens capensis*. *American Naturalist* 147: 445–465.

Durrant, A. 1962. The environmental induction of heritable change in *Linum*. *Heredity* 17: 27–61.

Eckhardt, F., Lewin J., Cortese, R., Rakyan, V.K., Attwood, J., Burger, M., Burton, J., Cox, T.V., Davies, R., Down, T.A., Haefliger, C., Horton, R., Howe, K., Jackson, D.K., Kunde, J., Koenig, C., Liddle, J., Niblett, D., Otto, T., Pettett, R., Seemann, S., Thompson, C., West, T., Rogers, J., Olek, A., Berlin, K. et Beck, S. 2006. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nature Genetics* 8: 1378–1385.

Elder, J.F. et Schlosser, I.J. 1995. Extreme clonal uniformity of *Phoxinus eos-neogaeus* gynogens (Pisces, Cyprinidae) among variable habitats in northern Minnesota beaver ponds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 5001–5005.

Esteller, M. 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: The DNA hypermethylome. *Human Molecular Genetics* 16: R50–R59.

Field, L.M., Devonshire, A.L., French-Constant, R.H. et Forde, B.G. 1989. Changes in DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *FEBS Letters* 243: 323–327.

Fraser, P. et Bickmore, W. 2007. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447: 413–417.

Gibert, J.M., Peronnet, F. et Schlötterer, C. 2007. Phenotypic Plasticity in *Drosophila* Pigmentation Caused by Temperature Sensitivity of a Chromatin Regulator Network. *PLoS Genetics* 3: 266–280.

Goddard, K.A., Dawley, R.M et Dowling, T.É. 1989. Origin and genetic relationships of diploid, triploid, and diploid-triploid mosaic biotypes in the *Phoxinus eos-neogaeus* unisexual complex. *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* 466: 268–280.

Goddard, K.A. et Dawley, R.M. 1990. Clonal inheritance of a diploid nuclear genome by a hybrid fresh-water minnow (*Phoxinus eos-neogaeus*, Pisces: Cyprinidae). *Evolution* 44: 1052–1065.

Goddard K.A., Megwinoff O., Wessner L.L. et Giaino F. 1998. Confirmation of gynogenesis in *Phoxinus eos-neogaeus* (Pisces: Cyprinidae). *Journal of heredity* 89: 151–157.

Gray, M.M. et Weeks, S.C. 2001. Niche breath in clonal and sexual fish (*Poeciliopsis*): a test for the frozen niche variation model. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 1313–1318.

Greig, D., Borts, R.H. et Louis, E.J. 1998. The effect of sex on adaptation to high temperature in heterozygous and homozygous yeast. *Proc. Biol. Sci.* 265: 1017–1023.

Grimaud, C., Nègre, N. et Cavalli, G. 2006. From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Research* 14: 363–375.

Habu, Y, Fukada-Tanaka, S., Hisatomi, Y. et Iida, S. 1997. Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 234: 516–521.

Hellman, A. et Chess, A. 2007. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 315: 1141–1143.

Jaenisch, R. et Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics Supplement* 33: 245–254.

Jenuwein, T. et Allis, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science* 293: 1074–1080.

Kalish, S. et Purugganan, M.D. 2004. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 309–314.

Landry, C.R., Wittkopp, P.J., Taubes, C.H., Ranz, J.M., Clark, A.G. et Hartl, D.L. 2005. Compensatory cis-trans evolution and the dysregulation of gene expression in interspecific hybrids of *Drosophila*. *Genetics* 171: 1813–1822.

Letting, D.L., Fecteau, D.A., Haws, T.F., Reed, S.L., Hopkins, R.O., Coleman R.D. et Goddard, K.A. 1999. Unexpected ratio of allozyme expression in diploid and triploid individuals of the clonal hybrid fish *Phoxinus eos-neogaeus*. *Journal of Experimental Zoology* 284: 663–674.

Lima, N.R.W. 1998. Genetic analysis of predatory efficiency in natural and laboratory made hybrids of *Poeciliopsis* (Pisces: Poeciliidae). *Behaviour* 135: 83–98.

MacKay, A.B., Mhanni, A.A., McGowan, R.A. et Krone, P.H. 2007. Immunological detection of changes in genomic DNA methylation during early zebrafish development. *Genome* 50: 778–785.

Marsit, C.J., Eddy, K. et Kelsey, K.T. 2006. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Research* 66: 10843–10848.

Masel, J. 2005. Evolutionary capacitance may be favored by natural selection. *Genetics* 170:1359–1371.

Massicotte, R., Magnan, P. et Angers, B. 2008. Intralacustrine site fidelity and nonrandom mating in the littoral-spawning northern redbelly dace (*Phoxinus eos*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 65: 2016–2025.

- Maynard Smith, J. 1978. *The Evolution of sex*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Mayr, E. et Provine, W.B. 1980. *The Evolutionary Synthesis: Perspectives on the Unification of Biology*. Harvard University Press, Cambridge.
- McLaren, A. 1999. Too late for the midwife toad: stress, variability and Hsp90. *Trends in Genetics* 15: 169–171.
- Meaney, M.J., Diorio, J., Francis, D., Weaver, S., Yau, J., Chapman, K. et Seckl, J.R. 2000. Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. *Journal of Neuroscience* 20: 3926–3935.
- Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. et Matzke, A.J. 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *European Molecular Biology Organization Journal* 19: 5194–5201.
- Miura, T. 2005. Developmental regulation of caste-specific characters in social-insect polyphenism. *Evolution & Development* 7: 122–129.
- Mommsen, T.P. 2001. Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 129: 207–219.
- Montero, L. M., Filipski, J., Gil P., Capel, J., Martinez-Zapater J.M. et Salinas, J. 1992. The distribution of 5-methylcytosine in the nuclear genome of plants. *Nucleic Acids Research* 20: 3207–3210.
- Morgan, H.D., Sutherland, H.G., Martin, D.I. et Whitelaw, E. 1999. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature Genetics* 23: 314–318.

Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W. et Reik, W. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics* 14 : R47–R58.

Muller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E. et Simon, J.A. 2002. Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* 111: 197–208.

Pigliucci, M. 2007. Do we need an extended evolutionary synthesis? *Evolution* 61: 2743–2749.

Pirrotta, V. 2002. Silence in the germ. *Cell* 110: 661–664.

Polesani, M., Desario, F., Ferrarini, A., Zamboni, A., Pezzotti, M., Kortekamp, A. et Polverari, A. 2008. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9:142.

Price T.D., Qvarnström A. et Irwin D.E. 2003. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proc. Biol. Sci.* 270: 1433–1440.

Rabinowicz, P.D., Palmer, L.E., May, B.P., Hemann, M.T., Lowe, S.W., McCombie, W.R. et Martienssen, R.A. 2003. Genes and transposons are differentially methylated in plants, but not in mammals. *Genome Research* 13: 2658–2664.

Rakyan, V.K., Blewitt, M.E., Druker, R., Preis, J.I. et Whitelaw, E. 2002. Metastable epialleles in mammals. *Trends in Genetics* 18: 348–351.

Rando, O.J. et Verstrepen, K.J. 2007. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell* 128: 655–668.

Reijans, M., Lascaris, R., Groeneger, A.O., Wittenberg, A., Wesselink, E., van Oeveren, J., de Wit, E., Boorsma, A., Voetdijk, B., van der Spek, H., Grivell, L.A. et Simonsa, G. 2003. Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and GeneChip expression data in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics* 82: 606–618.

Reineke, A., Schmidt, O. et Zebitz, C.P.W. 2003. Differential gene expression in two strains of the endoparasitic wasp *Venturia canescens* identified by cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis. *Molecular Ecology* 12: 3485–3492.

Rice, W.R. 2002. Experimental test of the adaptive significance of sexual recombination. *Nature Reviews Genetics* 3: 241–251.

Richards, E.J. 2006. Inherited epigenetic variation – revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics* 7: 395–401.

Rutherford, S.L. et Lindquist, S. 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396:336–342.

Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A. et Jones, P.A. 2006. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene *BCL6* by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9: 435–443.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schlosser, I.J., Doeringsfeld, M.R., Elder, J.F. et Arzayus, L.F. 1998. Niche relationship 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, and Systematics* 36: 399-417.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. et Cavalli, G. 2007. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell* 128: 735–745.
- Scott, W.B. et Crossman, E.J. 1973. *Freshwater fishes of Canada*. Fisheries Research Board of Canada, Bull. No. 184, Ottawa, Canada.
- Selker, E.U., Tountas, N.A., Cross, S.H., Margolin, B.S., Murphy, J.G., Bird, A.P. et Freitag, M. 2003. The methylated component of the *Neurospora crassa* genome. *Nature* 422: 893–897.
- Soppe, W.J., Jacobsen, S.E., Alonso-Blanco, C., Jackson, J.P., Kakutani, T., Koornneef, M. et Peeters, A.J. 2000. The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. *Molecular Cell* 6: 791–802.
- Stam, M., Belele, C., Dorweiler, J.E. et Chandler, V.L. 2002. Differential chromatin structure within a tandem array 100 kb upstream of the maize *b1* locus is associated with paramutation. *Genes & Development* 16: 1906–1918
- St-Cyr, J., Derome, N. et Bernatchez, L. 2008. The transcriptomics of life-history trade-offs in whitefish species pairs (*Coregonus* sp.). *Molecular Ecology* 17: 1850–1870.
- Steward, N., Ito, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. et Sano, H. 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37741–37746.

Suter, C.M., Martin, D.I. et Ward, R.L. 2004. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nature Genetics* 36: 497–501.

Suzuki, M.M., Kerr, A.R., De Sousa, D. et Bird, A. 2007. CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. *Genome Research* 17: 625–631.

Suzuki, M.M. et Bird, A. 2008. DNA methylation landscapes : provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics* 9: 465–476.

Szyf, M., Weaver, I.C., Champagne, F.A., Diorio, J. et Meaney, M.J. 2005. Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat. *Frontiers in Neuroendocrinology* 26:139–162.

Tweedie, S., Charlton, J., Clark, V. et Bird, A. 1997. Methylation of genomes and genes at the invertebrate–vertebrate boundary. *Molecular and Cellular Biology* 17: 1469–1475.

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. 1984. The evolution of clonal diversity in *Poeciliopsis*. In: B. J. Turner, ed. *Evolutionary genetics of fishes*. Plenum Press, New York. Pp 399–429.

Vrijenhoek, R.C. 1989. Genotypic diversity and coexistence among sexual and clonal forms of *Poeciliopsis*. Pp. 386-400 Dans Otte, D. et J. Endler, eds. *Speciation and its consequence*. Sinauer, Sunderland, M.A.

Vuylsteke, M., Peleman J.D. et van Eijk, M.J.T. 2007. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature Protocols* 2: 1399–1413.

Waddington, C.H. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characteristics. *Nature* 150: 563–565.

Waddington, C.H. 1953. Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* 7: 118–126.

Wagner, A. 2005. Robustness, evolvability, and neutrality. *FEBS Letters* 579:1772–1778.

Waterland, R. et Jirtle, R. 2003. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and Cellular Biology* 23: 5293–5300.

Weaver, I.C., D'Alessio, A.C., Brown, S.E., Hellstrom, I.C., Dymov, S., Sharma, S., Szyf, M. et Meaney, M.J. 2007. The transcription factor nerve growth factor-inducible protein a mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. *Journal of Neuroscience* 27:1756–1768.

Wee, C.W., Lee, S.F., Robin, C. et Heckel, D.G. 2008. Identification of candidate genes for fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* using cDNA-AFLP. *Insect Molecular Biology* 17: 351–360.

Weissman, A. 1889. *Essays upon heredity and kindred biological problems*. Clarendon Press, Oxford.

Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R. K., Ballinger, T. et Henikoff, S. 2007. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics* 39: 61–69.

## **Annexe**

## Annexe 1

Présence ou absence des TDFs différentiellement exprimés chez les hybrides *Phoxinus eos-neogaeus*. Les lettres suivies d'un nombre désignent les lacs d'où viennent les hybrides: B, Barbotte; J, Jonction; M, Merde; S, Saad; Sau, Saumon. Les lettres entre parenthèses correspondent aux différents génotypes microsatellites trouvés chez les hybrides.

TDF	Présence	Absence
A-185	M48(G), Sau11(F)	B18(E), B36(F), J27(E), J32(E), R32(B), R34(B), S33(J), Sau1(F)
A-275	B18(E), B36(F), J27(E), J32(E), M48(G), R32(B), R34(B), Sau1(F), Sau11(F)	S33(J)
A-410	B18(E), M48(G), R34(B)	B36(F), J27(E), J32(E), R32(B), S33(J), Sau1(F), Sau11(F)
B-164	B18(E), J27(E), J32(E), R32(B), R34(B), S33(J)	B36(F), M48(G), Sau1(F), Sau11(F)
B-237	B18(E), B36(F), J27(E), J32(E), M48(G), R32(B), R34(B), Sau1(F), Sau11(F)	S33(J)
C-197	B18(E), B36(F)	J27(E), J32(E), M48(G), R32(B), R34(B), S33(J), Sau1(F), Sau11(F)
D-387	B18(E), M48(G), Sau11(F)	B36(F), J27(E), J32(E), R32(B), R34(B), S33(J), Sau1(F)
D-462	B18(E), J27(E), M48(G), R32(B), R34(B), S33(J), Sau11(F)	B36(F), J32(E), Sau1(F)
F-410	M48(G), Sau11(F), B18(E)	B18(E), B36(F), J27(E), J32(E), R32(B), R34(B), S33(J), Sau1(F)
H-462	B18(E), B36(F), J27(E), J32(E), M48(G), R32(B), S33(J)	R34(B), Sau1(F), Sau11(F)
H-247	B18(E), B36(F), J27(E), J32(E), M48(G), R32(B), R34(B), S33(J)	Sau1(F), Sau11(F)
I-212	M48(G), Sau11(F)	B18(E), B36(F), J27(E), J32(E), R32(B), R34(B), S33(J), Sau1(F)
J-150	M48(G), Sau11(F)	B18(E), B36(F), J27(E), J32(E), R32(B), R34(B), S33(J), Sau1(F)
J-204	B18(E), B36(F), J27(E), J32(E), M48(G), R32(B), R34(B), S33(J)	Sau1(F), Sau11(F)
J-387	B18(E), B36(F), J27(E), M48(G)	J32(E), R32(B), R34(B), S33(J), Sau1(F), Sau11(F)