

2011-2018-5

Université de Montréal

Caractérisation de la biodiversité à l'aide d'une analyse génétique chez les moules d'eau douce du genre *Pyganodon* (*Unionidae*) dans le nord est de l'Amérique du Nord.

Par
Frédéric Cyr

Département des Sciences biologiques
Faculté Arts et Sciences

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



Septembre 2007

©, Frédéric Cyr, 2007

211

302

US4

2007

V.010

AVIS

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

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
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation de la biodiversité à l'aide d'une analyse génétique chez les moules d'eau douce du genre *Pyganodon* (*Unionidae*) dans le nord est de l'Amérique du Nord.

Présenté par
Frédéric Cyr

Ce mémoire a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Bernadette Pinel-Alloul.....président-rapporteur
Christopher Cameron.....membre du jury
Bernard Angers.....directeur de recherche
André Martel.....directeur de recherche

Septembre 2007

Sommaire

Les moules d'eau douce du genre *Pyganodon* ont jusqu'à présent été principalement caractérisées à l'aide de caractères conchologiques. Malheureusement, les identifications réalisées sur cette base sont parfois incertaines. L'objectif principal de ce projet est de valider, à l'aide de marqueurs génétiques, la répartition des *Pyganodon* dans le nord-est de l'Amérique du nord, avec une emphase sur le Québec. Tel qu'attendu, *P. grandis* et *P. cataracta* ainsi que *P. fragilis* se retrouvent au sud de la péninsule québécoise. Cependant, deux lignées cryptiques de *Pyganodon* sont également retrouvées. *Pyganodon grandis* se distingue des autres *Pyganodon* par un umbo proéminent et une coquille moins allongée. La divergence entre *P. grandis* et les autres lignées de *Pyganodon* est estimée à l'époque du Pliocène. *Pyganodon grandis* aurait occupé le refuge Mississippien lors de la dernière glaciation et aurait colonisé le territoire via les Grands Lacs. La distinction morphologique entre *P. fragilis* et *P. cataracta* est parfois problématique. Néanmoins, *P. fragilis* et *P. cataracta* représentent deux lignées distinctes probablement depuis l'époque du Pléistocène. Suite au retrait des glaces, ces deux lignées seraient toutes deux issues du refuge Atlantique. *Pyganodon fragilis* aurait colonisé le territoire du Québec via l'estuaire du St-Laurent, en tant que parasite (au stade larvaire) de poissons euryhalins, alors que *P. cataracta* aurait colonisé le territoire via la rivière Hudson. La divergence entre ces deux lignées aurait pu être favorisée par le biais d'associations biologiques différentes avec les poissons hôtes.

Mots clés : moules d'eau douce, *Pyganodon*, morphologie, génétique, biogéographie, glaciation, parasitisme, double héritabilité uniparentale, divergence.

Summary

Freshwater mussels of the genus *Pyganodon* have been traditionally characterized with shell characters. Unfortunately, identifications made on this basis alone are somewhat uncertain. The aim of this study is to validate, with genetic markers, the distribution of *Pyganodon* species in Northeastern North America, with the main emphasis on Quebec. As expected *P. grandis*, *P. cataracta* and *P. fragilis* are found in southern Quebec. However, two cryptic *Pyganodon* lineages are also found. *Pyganodon grandis* is distinguished from other *Pyganodon* by a prominent umbo and a less elongated shell. The divergence between *P. grandis* and the others *Pyganodon* lineages is estimated to have occurred in the Pliocene period. *Pyganodon grandis* may have invaded the territory by the Great Lakes from the Mississippian refugium. The morphological distinction between *P. fragilis* and *P. cataracta* is much more challenging. Nonetheless, *P. cataracta* and *P. fragilis* likely represent distinct lineages since the Pleistocene epoch. The two lineages both originated from the Atlantic refugium *Pyganodon fragilis* may have colonized the territory via the St. Lawrence estuary, as parasites of euryhaline fishes hosts, while *P. cataracta* may have come from the Hudson River. The divergence between the two lineages may have occurred through biological association with host fishes.

Keywords: freshwater mussels, *Pyganodon*, morphology, genetic, biogeography, glaciations, parasitism, doubly uniparental inheritance, divergence.

Table des matières

Sommaire-----	iii
Summary-----	iv
Table des matières-----	v
Liste des tableaux-----	vii
Liste des figures-----	viii
Liste des sigles et des abréviations-----	x
Remerciements-----	xiii

1. Introduction ----- 1

1.1 Conservation-----	2
1.2 Biogéographie-----	2
1.3 Les glaciations du Pléistocène-----	4
1.4 La fonte des glaces en Amérique du Nord de 18 000 à 7000 ans AA-----	4
1.5 Les impacts sur la répartition des espèces-----	5
1.6 Les moules d'eau douce -----	6
1.7 Dispersion et parasitisme-----	7
1.8 La double héritabilité uniparentale-----	9
1.9 Le genre <i>Pyganodon</i> -----	11
1.10 Objectifs de l'étude-----	13

2. Article: Cryptic lineages and hybridization in freshwater mussel of the genus *Pyganodon* (*Unionidae*) in north-eastern North America ----- 14

Abstract-----	16
Résumé-----	16
2.1 Introduction-----	17
2.2 Methodology-----	18
2.2.1 Genetic identification-----	18
2.2.2 Extent of hybridization-----	23
2.2.3 Phylogenetic relationships-----	24
2.2.4 Morphological analysis-----	25
2.3 Results-----	27

2.3.1 Female mitochondrial genome-----	27
2.3.2 Male mitochondrial genome-----	28
2.3.3 Nuclear genome-----	29
2.3.4 Phylogenetic relationships-----	29
2.3.4 Distribution of <i>Pyganodon</i> -----	33
2.3.5 Morphological analyses-----	33
2.4 Discussion-----	36
2.4.1 Post glacial history of colonization-----	38
2.5 Acknowledgments-----	39
3 Discussion -----	40
3.1 Distinction génétique et morphologique-----	41
3.2 Biogéographie des <i>Pyganodon</i> -----	42
3.3 Conservation-----	45
3.4 Conclusions-----	46
4 Références-----	48
5 Annexes-----	51

Liste des tableaux

Table 1 Samples location, expected phenotypes from previous morphological survey (Clarke 1981) and genetic identification over three different genomes, for each *Pyganodon* sample. Identifiers gr, si, ca, fr, A and B refer to *Pyganodon grandis* (Say 1829), *Pyganodon simpsonaia* (Lea 1861), *Pyganodon cataracta* (Say 1817), *Pyganodon fragilis* (Lamarck 1819), Unidentified *Pyganodon* lineage A and Unidentified *Pyganodon* lineage B respectively. Numbers between parentheses indicate sample size for each analyzed genome.

----- p.19

Table 2 Size of the DNA segments and primers used in this study, each set of primers have been designed from Genbank sequences, published by various authors.-----p.23

Table 3 Pairwise percentage of divergence among *Pyganodon* lineages, estimated from different regions on the three sampled genomes.----- p.28

Table 4: Number of individuals, for each genetic lineage, that have been classified correctly by discriminant functions based on shell characteristics (percentage of correct classification is indicated in parenthesis). -----p.34

Liste des figures

Figure 1 : **A)** Transmission uniparentale de l'ADNmt (la norme chez les animaux). **B)** Double héritabilité uniparentale observée chez les moules. P : génération parentale ; F1 : première génération ; la couleur noire représente l'ADNmt transmis par la mère à toute sa progéniture ; le blanc représente l'ADNmt que le père a reçu de sa mère, non transmis à la génération suivante ; le gris en **B)** représente l'ADNmt mâle transmis de père en fils.-----p.9

Figure 2: Geographic distribution of *Pyganodon* lineages (*Pyganodon grandis* (Say, 1829), *Pyganodon fragilis* (Lamarck, 1819), *Pyganodon cataracta* (Say, 1817), lineage A and lineage B) inferred from genetic identification of the lineages.----- p.21

Figure 3: Diagram depicting shell measurements. Shell length (SL), shell height at ligament (HL), shell height at umbo (HU), height from umbo to ventral line (HV), shell width (SW), distance between umbo and posterior end (UP), distance between point of dorsal curvature and posterior end (PP), distance between the ligament and the point of dorsal curvature (LP), ligament length (LL), height of longest axis (HA), umbo thickness (UT), umbo height (UH)
-----p.24

Figure 4: Neighbour joining trees of the A) 16S and COI female mtDNA with a sequence of *Lampsilis ornata* (NC_005335.1) used as outgroup. B) COI and COII male mtDNA with a sequence of *Anodonta wahlamatisensis* (AY493493.1) used as outgroup (only COI was available for the outgroup) C) Nuclear ITS 1 and 2 with a sequence of *Pseudanodonta complanata* used as outgroup.(DQ060184.1) D) Concatenated unrooted tree realized from the sequences of the three sampled genomes pooled together. Reference individuals were discarded from this latest analysis. Bootstrap values - for the three phylogenetic methods used in this study (NJ, MP, ML) - are shown under the branches.----- p.30

Figure 5: The first two functions of a discriminant analysis, explaining 91.1% of the variability. The points represent individuals of each *Pyganodon* taxa, randomly selected and the centroid of each taxa. The arrows represent conchological descriptors (shell height at ligament (HL); shell height at umbo (HU); height from umbo to ventral line (HV); shell width (SW); distance between umbo and posterior end (UP); distance between point of dorsal curvature and posterior end (PP); distance between the ligament and the point of dorsal curvature (LP); ligament length (LL); height of longest axis (HA); umbo thickness (UT); umbo height (UH)).-----p.35

Figure A1: Variable sites for each sampled loci. Haplotypes of COI (A) and 16S (B) female mtDNA. Haplotypes of COII and COI male mtDNA (C). Alleles of ITS 1 (D) and ITS 2 (E) from the nuclear genome. Indels are indicated by (-). Haplotypes of female mtDNA and nuclear alleles are compared to references individuals (see text for details) Male mtDNA sequences are compared to sequences found on gene bank: *P. grandis* (AF406801.1) and *P. fragilis* (AF406800.1).-----p.55

Liste des sigles et des abréviations

A	Lineage A
AA	Avant aujourd'hui
B	Lineage B
bp	Base pairs
ca	<i>Pyganodon cataracta</i>
COI	Cytochrome oxydase subunit I
COII	Cytochrome oxydase subunit II
°C	Degré Celsius
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates
DUI	Double uniparental heritability
fr	<i>Pyganodon fragilis</i>
gr	<i>Pyganodon grandis</i>
HA	Height of longest axis
HL	Shell height at ligament
HU	Shell height at umbo
HV	Height from umbo to ventral line
ITS	Internal transcribed spacer
ITS-1	Internal transcribed spacer 1
ITS-2	Internal transcribed spacer 2
Km	Kilomètre
L	Litre
LL	Ligament length
LP	Distance between the ligament and the point of dorsal curvature
MgCl ₂	Dichlorure de Magnésium
MB	Manitoba
ME	Maine
mtDNA	Mitochondrial desoxynucleotide acid
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
NF	Terre-Neuve
ng	Nanogramme

NJ	Neighbor joining
nM	Nanomolaire
PCR	Polymerase chain reaction
gr	<i>Pyganodon grandis</i>
pmol	Picomolaire
PP	Distance between point of dorsal curvature and posterior end
R.	River
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic acid
sec	Secondes
SL	Shell length
SSCP	Single strand conformation polymorphism
SW	Shell width
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borate-EDTA
U	Unité
UH	Umbo height
UP	Distance between umbo and posterior end
UT	Umbo thickness
µl	Microlitre
%	Pourcentage
10X	Dix fois concentré
0.5X	0,5 fois concentré

*J'ai travaillé toute la matinée à la lecture des épreuves
d'un de mes poèmes et j'ai enlevé une virgule.
Cet après-midi, je l'ai remise
Oscar Wilde*

Remerciements

Mes premiers remerciements vont évidemment à mon directeur de recherche qui a bien voulu me donner ma chance. Il faut dire que Bernard a pour philosophie de toujours laisser sa chance au coureur. Néanmoins, il a su me guider au travers les méandres de ma maîtrise me permettant d'acquérir la confiance en moi et l'autonomie essentiels aux chercheurs jeunes et moins jeunes.

Merci à tout ceux et celles qui ont réussi à force d'acharnement à m'inculquer quelques notions au cours de mes études graduées et sous graduées à l'Université de Montréal et qui surtout ont contribué à nourrir ma curiosité scientifique. Un merci spécial à André, mon codirecteur, et à Annie Paquet, pour leur enthousiasme à mesurer des coquilles vides et toutes les belles histoires partagées. Merci à Philippe qui a su être un modèle tout au long de mes études.

Merci à tous les stagiaires du laboratoire, à ceux et celles qui ne font que passer, mais qui contribuent à enrichir notre quotidien le temps de leur trop brève présence, un merci tout particulier à Maude pour son implication dans mon projet.

Enfin, je me suis souvent demandé où en serait ma vie si je n'avais jamais franchi la porte du laboratoire Angers. Cet après midi d'hiver, jour de mon entrevue au laboratoire, j'ai franchi le seuil de ce qu'allait devenir ma vie pour les trois prochaines années. Au delà, des heures de labeurs, j'y ai gagné de formidables amitiés et des souvenirs impérissables. Alors merci à vous, mes amis : Bernard, Philippe, Marie-Claire, Marie-Claude, Rachel, Daniel, Joëlle, Claude-Olivier, Martin et Émilie.

1. Introduction

1.1 Conservation

La conservation de la biodiversité est actuellement un des enjeux les plus importants sur la planète. Les écosystèmes permettent notamment l'assainissement de l'eau, de l'air et sont essentiels à toute forme de vie sur terre (y compris la nôtre) (Pullin 2002). Les organismes y vivant sont intimement inter-reliés et participent au bon fonctionnement des écosystèmes, la disparition de quelques espèces seulement pouvant menacer ce fragile équilibre (Pullin 2002).

Ainsi, la protection des écosystèmes passe par la protection des espèces, mais aussi par la protection de la diversité génétique au sein des espèces. En effet, la variabilité génétique est le moteur de la sélection naturelle (Darwin 1859); préserver une importante variabilité génétique augmente la probabilité que quelques populations puissent répondre de façon adéquate à une perturbation, assurant ainsi la pérennité des fonctions de l'écosystème.

Enfin, le monde vivant constitue depuis toujours le laboratoire de l'humanité; il a inspiré quantité d'artistes et de scientifiques et il constitue la source de nombreuses découvertes. Il y a donc plusieurs arguments d'ordre scientifique et culturel à la conservation de la biodiversité.

1.2 Biogéographie

La biogéographie est une science qui tente d'expliquer la répartition de la biodiversité dans le temps et l'espace. L'approche préconisée est souvent multidisciplinaire et fait entre autre appel à l'écologie, à l'évolution, à la géologie et à la climatologie (Cox et Moore 2000). D'un point de vue pragmatique, une bonne connaissance de la répartition de la biodiversité dans le temps et l'espace devrait en favoriser la conservation. Par exemple, bien qu'il soit extrêmement répandu en Amérique du Nord, le papillon Monarque (*Danaus plexippus*) passe l'hiver, dans quelques sites seulement, au Mexique, à Cuba et en Californie. La protection de ces sites est primordiale à la protection de l'espèce. Plus loin de chez nous, en Australie, Baker et al. (2003) ont caractérisé génétiquement deux espèces de moules connues (*Velesunio ambiguus* et *Velesunio wilsonii*) pour constater qu'il s'agissait, en réalité, de quatre espèces très divergentes, mais morphologiquement très similaires. La protection de la biodiversité au sein de ce groupe passe évidemment par la reconnaissance de l'ensemble de ces taxons.

Les espèces ne sont pas réparties uniformément dans l'espace; l'aire de répartition d'une espèce est souvent entrecoupée d'habitats inhospitaliers où elle ne se retrouve pas. Ces habitats inhospitaliers agissent comme des barrières isolant les populations les unes des autres; cet isolement pouvant mener à des événements de spéciation (Mayr 1963). Historiquement, de tels schismes dans les répartitions ont d'abord été expliqués par la dispersion d'organismes au-delà des barrières préexistantes (i.e., dispersion) (Cox et Moore 2000). La répartition d'une plante au-delà d'un lac ou d'une chaîne de montagne est un bon exemple de dispersion. La dispersion des organismes peut parfois être accidentelle. À titre d'exemple, mentionnons la moule zébré (*Dreissena polymorpha*), originaire d'Europe et récemment introduite en Amérique du Nord, via le déversement des eaux de lest (ballast waters) transportées par les grands navires cargos transocéaniques (Hebert et al. 1989, Britton et McMahon 2005).

Pourtant, il est rapidement apparu que la dispersion seule n'arrivait pas à expliquer la discontinuité dans la répartition des espèces. Parfois, de nouvelles barrières peuvent surgir et couper une répartition jusqu'alors continue (i.e., vicariance) (Cox et Moore 2000). La théorie de la vicariance est née lors de la découverte de la tectonique des plaques (Cox et Moore 2000). Il est alors apparu que la présence d'espèces fortement apparentées sur plusieurs continents pouvait s'expliquer par la dérive des continents et non par la dispersion de ces organismes par delà les océans. Néanmoins, les phénomènes de vicariance peuvent se produire à de moindres échelles spatiales et temporelles. L'isolement des espèces dans des refuges différents, lors des dernières glaciations, en constitue un bon exemple (voir sections 1.3 à 1.5). Plus récemment encore, la fragmentation des habitats causée par l'homme en est un autre bon exemple.

Parfois, la répartition discontinue d'une espèce s'explique par un effet conjoint des phénomènes de vicariance et de dispersion. À titre d'exemple mentionnons l'apparition temporaire du détroit de Béring qui a permis à notre espèce de se disperser en Amérique du Nord (Pielou 1991). La dispersion des organismes d'eau douce, suite au retrait des glaciers, via d'immenses lacs proglaciaires aujourd'hui disparus, constitue un autre exemple où les phénomènes de dispersion et de vicariance sont inter-reliés (voir sections 1.3 à 1.5).

Les phénomènes de dispersion et de vicariance peuvent causer l'isolement entre les populations et les espèces, mais peuvent également être responsables de l'apparition d'une

zone de contact entre deux groupes jusqu'alors isolés. La biogéographie s'intéresse à tous les phénomènes pouvant générer ou inversement réduire la biodiversité et s'intéresse donc également à l'apparition ou la disparition des zones d'hybridation, dans le temps et l'espace.

1.3 Les glaciations du Pléistocène

L'époque du Pléistocène débute il y a 1,8 MA, par un refroidissement général du climat ayant provoqué d'intenses bouleversements dans la répartition des espèces (Pielou 1991). D'immenses glaciers ont pris d'assaut les continents emprisonnant sous les glaces d'immenses territoires, provoquant tour à tour l'écrasement isostatique de la croûte terrestre et la baisse du niveau des océans. L'avènement de ces immenses glaciers a provoqué la destruction de nombreux écosystèmes ; les espèces, extirpées de ces territoires, ont dû trouver refuge en marge des glaciers.

Le Pléistocène est entrecoupé par de brèves périodes interglaciaires d'environ 50 000 ans caractérisées par un réchauffement du climat et par la fonte des glaces. La fonte de gigantesques masses de glace a provoqué l'avènement d'immenses lacs, la brusque remontée du niveau des océans et enfin d'importantes incursions marines sur les continents, encore écrasés par le poids des glaciers (Pielou 1991).

Les glaciations du Pléistocène ont donc constitué une période d'intenses bouleversements dans le paysage par la compression des habitats, des biomes, et par des changements climatiques et hydrologiques dramatiques. Les impacts géologiques des premières périodes glaciaires et interglaciaires ont été effacés par l'avancée des glaciers lors de la dernière période glaciaire (dites Wisconsinienne), de 80 000 à 18 000 AA (Mandrak et Crossman 1992). Nous vivons actuellement la dernière période interglaciaire (l'Holocène), alors que la fonte des glaces, en Amérique du Nord, s'est échelonnée de 18 000 à 7 000 ans AA (Dyke et Prest 1987).

1.4 La fonte des glaces en Amérique du Nord, de 18 000 à 7 000 ans AA

La fonte des glaciers a provoqué l'avènement d'immenses lacs proglaciaires qui auraient favorisé la dispersion des organismes d'eau douce (e.g., Wilson et Hebert 1998), tout en ralentissant la dispersion des organismes terrestres (Pielou 1991). En Amérique du Nord, le

plus important de ces lacs, le lac Agassiz, était localisé au centre du Canada et occupait, à son extension maximale, pas moins de 350 000 km², soit une superficie quatre fois plus grande que celle du lac Supérieur (Pielou 1991). Le lac Ojibway Barlow, quant à lui, était localisé à l'est du lac Agassiz et occupait le nord de l'Ontario et le nord ouest du Québec (Bailey et Smith 1980). Ces deux immenses lacs se sont rejoints, 9500 ans AA, pour former une gigantesque étendue d'eau de 3000 km de longueur qui a finalement été drainée dans la mer Tyrell, 8000 AA, lorsque la langue de glace occupant la rive nord du lac Ojibway Barlow s'est effondrée (Pielou 1991). Enfin, la région des Grands lacs a été occupée tour à tour par nombreux lacs proglaciaires se déversant d'abord vers le Mississippi, puis, plus tard, vers le St-Laurent. Un compte rendu détaillé de l'histoire hydrographique de la région est fourni par Bailey et Smith (1980), puis par Crossman et McAllister (1986).

La fonte des glaces a également provoqué une rapide montée du niveau des océans, entraînant l'avancée de la mer loin sur le continent, bloquant le passage à la fois aux organismes terrestres et aux organismes essentiellement d'eau douce. En revanche, certains poissons euryhalins (i.e., tolérant une large gamme de salinité) ont pu tirer partie de ces vastes étendues comme couloir de migration (Legendre et Legendre 1984). À l'est, le golf du Maine occupait le coeur de la Nouvelle Écosse et du Maine (Curry 2007); au nord, la mer Tyrell (la Baie d'Hudson actuelle) s'étendait jusqu'au centre de l'Ontario (Pielou 1991); enfin la mer Champlain et la mer Laflamme occupaient respectivement les basses terres du St Laurent et les basses terres du Saguenay-Lac-St-Jean (Crossman et McAllister 1986). La mer de Champlain a existé de 12 000 à 10 000 ans AA, les conditions y régnant ont beaucoup évoluées au cours de son histoire, la température et la salinité de l'eau étant influencées par les apports de l'océan, du glacier et des lacs proglaciaires (Pielou 1991). Finalement, mentionnons que le redressement isostatique de la croûte terrestre ayant causé le drainage de ces mers vers l'océan est encore en cours de nos jours (Pielou 1991).

1.5 Les impacts sur la répartition des espèces

En Amérique du Nord, les organismes se sont dispersés à partir de cinq centres de biodiversité élevée, exempt de glace au maximum de la dernière glaciation, soit le refuge Béringien situé à l'ouest du glacier, au niveau de l'Alaska et du Yukon (Crossman et McAllister 1986); les refuges Mississippien et Missourien situés au sud du glacier et séparés par une avancée du glacier (Dyke et Prest 1987); le refuge Atlantique à l'est des Appalaches (Crossman et

McAllister 1986) et enfin le refuge Acadien constitué d'un archipel d'îles au large de Terre-Neuve et de la Nouvelle Écosse, aujourd'hui submergé (Pielou 1991).

En Amérique du Nord, les poissons constituent le groupe taxonomique ayant fait l'objet de la majorité des études biogéographiques en raison, peut être, de leur grande diversité et de leur intérêt commercial. Une approche comparative a permis de constater que les espèces colonisatrices ont une faible diversité taxonomique et génétique et elles ont pour la plupart expérimenté de graves effondrements démographiques entraînant d'importants effets fondateurs au sein des populations (Bernatchez et Wilson 1998). La répartition actuelle des populations et des espèces a grandement été influencée par leur refuge d'origine (e.g., Crossman et McAllister 1986). Les organismes se dispersant depuis différents refuges glaciaires n'ayant pas pu bénéficier des mêmes opportunités de colonisation.

Enfin, l'étude de la dispersion des organismes suite aux bouleversements climatiques du Pléistocène constitue un formidable laboratoire pour prévoir les impacts des changements climatiques à venir. Évidemment, la capacité de prévoir ces changements découle directement de notre capacité à modéliser adéquatement le climat (Cox et Moore 2000). Néanmoins, une bonne connaissance des espèces, de leur capacité de dispersion et de leurs préférences environnementales, sera nécessaire. De telles connaissances permettront d'identifier les espèces particulièrement vulnérables et permettront de concevoir des réserves écologiques propices à la migration des espèces vers les pôles (Primack 2004). En réalité, de telles connaissances sont d'ores et déjà nécessaires afin de concevoir des réserves écologiques permettant le passage d'organismes au travers d'habitats fragmentés (Primack 2004).

1.6. Les moules d'eau douce

L'ordre des moules d'eau douce (*Unionoidea*), également appelées naïades ou mulettes, comprend six familles dont deux sont présentes sur le continent Nord Américain soit les *Unionidae* et *Margaritiferidae*. Ces deux familles ont des répartitions mondiales, mais atteignent leur maximum de biodiversité en Amérique du Nord, où plus de 290 espèces ou sous espèces ont été dénombrées (Williams et al. 1993, Turgeon et al. 1998, et Bogan 1993). Les représentants de l'ordre des *Unionoidea* se distinguent par leur restriction aux habitats d'eau douce, un cycle de vie complexe impliquant un stade larvaire unique et ectoparasite des poissons, une longévité élevée et un faible recrutement (Graf 2000, McMahon et Bogan 1991,

Paquet et al. 2005). Les moules d'eau douce occupent des rôles écologiques importants dans les écosystèmes d'eau douce. En plus d'être d'importants filtreurs, elles sont capables, par leur déplacement (reptation à l'aide du pied), de mélanger ou brasser le substrat au fond des lacs et des rivières, occasionnant ainsi une oxygénation des sédiments (Strayer et al. 1999, Vaughn et Hakenkamp 2001). De plus, les moules peuvent servir d'hôtes à une importante diversité d'organismes (Fuller 1974) et de nourriture à certains mammifères, entre autre le rat musqué, leur prédateur principal (Hanson et al. 1989). Enfin, les moules d'eau douce constituent l'un des taxons les plus diversifiés d'Amérique du Nord, mais également l'un des plus menacés, principalement en raison de la destruction des habitats, ainsi que par l'introduction d'espèces exotiques (Bogan 1993, Mulvey et al. 1997). La première étape à la conservation de cette importante biodiversité est évidemment de bien la décrire.

Les premiers naturalistes qui se sont attelés à décrire l'incroyable biodiversité des moules d'eau douce ont dû faire face à tout un casse-tête, se heurtant, notamment, aux problèmes de la convergence évolutive et de la plasticité phénotypique des caractères morphologiques, tant au niveau de la coquille que de l'anatomie interne (Kat 1983). Un tel imbroglio a engendré, on l'aura deviné, beaucoup de confusion. Certains chercheurs ont décrit chaque phénotype comme étant une espèce. Ainsi, au 19ème siècle, Isaac Lea a décrit plus de 800 espèces différentes (cité dans Mulvey et al. 1997), alors que d'autres chercheurs ont montré une tendance inverse, confondant plusieurs taxons (Mulvey et al. 1997).

1.7 Dispersion et parasitisme

La dispersion des moules d'eau douce s'effectue au stade larvaire alors que la larve, ou glochidie, est le parasite obligatoire d'un poisson (Fuller 1974, McMahon et Bogan 1991). Le développement des larves débute par une période de gestation à l'intérieur des poches branchiales spécialisées de la moule adulte (Kat 1984). En temps opportun, les larves seront relâchées par la femelle et un certain nombre d'entre elles réussiront à s'accrocher aux nageoires ou aux branchies d'un poisson, où elles pourront s'enkyster, poursuivre leur développement jusqu'à la métamorphose, puis se détacher pour compléter leur cycle de vie, en tant qu'organisme benthique (Kat 1984, McMahon et Bogan 1991). L'aire de répartition d'une espèce de moule d'eau douce est donc un corollaire aux aires de répartition des ses hôtes. Il existe d'ailleurs une bonne corrélation entre la diversité spécifique des poissons et celle des moules dans un endroit donné (Watters 1992, Haag et Warren 1998). L'histoire

évolutive des moules dépendra donc de la capacité de dispersion et des limites physiologiques des poissons hôtes (e.g., Bauer 1997, Metcalfe-Smith et al. 1997).

On distingue deux modes de parasitisme chez les moules d'eau douce, soit les moules spécialistes et les moules généralistes. Les moules spécialistes vont parasiter une seule ou peu d'espèces de poissons. Certaines moules spécialistes ont développé différents leurres pour attirer leurs hôtes. Par exemple, les moules femelles du genre *Lampsilis* ont développé une extension de leur manteau qui mime l'apparence et le comportement d'un petit poisson (Fuller 1974, Kat 1984). À l'opposé du spectre, les moules dites généralistes ne possèdent aucun moyen de sélectionner un hôte. En temps opportun, les larves sont relâchées en grand nombre et peuvent s'attacher à plusieurs espèces différentes de poissons et ainsi compléter leur développement (Trdan 1981, Haag et Warren 1998). L'infection d'un poisson particulier dépendra donc de la présence et de la réaction immunitaire de ce dernier (Kat 1984). La force de la réaction immunitaire peut varier en fonction de l'espèce de poisson impliquée (Fuller 1974), mais également en fonction de l'âge du poisson (Jansen et Hanson 1991) et du taux d'infection par le ou les parasites (Trdan et Hoeh 1982). Ainsi, il existerait une pression de sélection pour décaler les périodes de largages des moules vivant en sympatrie, afin de minimiser le taux d'infection des poissons hôtes (Trdan et Hoeh 1982). La larve est dépourvue de moyens pour sélectionner un hôte. Un stimulus tactile avec un morceau de bois, de papier, ou de plastique est suffisant pour induire une réponse d'attachement chez la larve (Kat 1984). En revanche, un stimulus chimique est nécessaire pour prolonger cet attachement (Fuller 1974).

En attirant leur hôte, les moules, dites spécialistes, ont un meilleur taux d'infection. Par conséquent, ces moules produisent généralement moins de larves (Kat 1984) et ce mode de parasitisme engendre moins de coûts reproductifs. En revanche, la capacité d'infecter différents hôtes permet aux moules généralistes d'être bien adaptées aux variations démographiques des populations d'hôtes (Haag et Warren 1998). Les moules généralistes sont donc davantage susceptibles de coloniser rapidement un nouveau milieu et de persister dans les environnements instables.

1.8 La double hérabilité uniparentale

Outre leur mode de dispersion particulier, les moules d'eau douce (ordre : *Unionoidea*) ont une autre caractéristique d'importance susceptible d'intéresser le biogéographe. Les moules d'eau douce ont un mode de transmission des mitochondries, pour le moins, fascinant, appelé la double hérabilité uniparentale (DUI). Règle générale chez les eucaryotes (incluant le règne animal), les mitochondries sont transmises par la mère à sa progéniture, via l'ovule (Figure 1a). En revanche, chez les moules, en plus de la lignée mitochondriale maternelle, il existe une lignée mitochondriale paternelle transmise de père en fils (Figure 1b). À ce jour, la DUI a été observé chez trois famille de l'ordre des *Unionoidea* soit les *Unionidae* (Liu et al. 1996) ; les *Margaritiferidae* (Curole et Kocher 2002) et les *Hyriidae* (retrouvée en Australie) (Hoeh et al. 2002), mais également chez deux familles de bivalves marins, les *Mytilidae* (Zouros et al. 1992, 1994, Skibinski et al. 1994) et les *Veneridae* (Curole et Kocher 2005). De plus, des évidences phylogénétiques portent à croire que la DUI serait également présent chez les *Trigoniidae* (Hoeh et al. 2002), soit une autre famille de bivalves marins, dont la plupart des représentants sont aujourd'hui éteints. Enfin, mentionnons que tous les taxons de bivalves n'ont pas encore testés quant à la présence de la DUI et ce mécanisme pourrait être fort répandu au sein de cette classe.

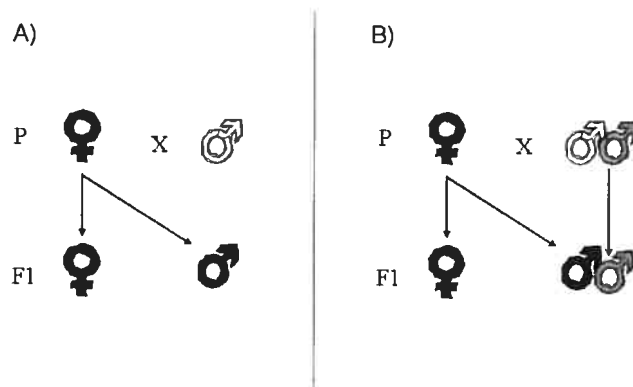


Figure 1 : **A)** Transmission uniparentale de l'ADNmt (la norme chez les animaux). **B)** Double hérabilité uniparentale observée chez les moules. P : génération parentale; F1 : première génération ; la couleur noire représente l'ADNmt transmis par la mère à toute sa progéniture ; le blanc représente l'ADNmt que le père a reçu de sa mère, non transmis à la génération suivante ; le gris en **B)** représente l'ADNmt mâle transmis de père en fils.

Puisqu'elle est présente chez les moules d'eau douce et chez les moules marines, la DUI a pu apparaître plusieurs fois au cours de l'évolution des bivalves. Alternativement, elle aurait pu apparaître une seule fois, son origine serait alors beaucoup plus ancienne remontant à l'ancêtre commun de tous ces taxons. La DUI cause une scission des lignées mitochondriales mâle et femelle, ainsi l'estimation du temps de divergence entre ces lignées devrait permettre de dater l'origine de la DUI (e.g., Hoeh et al. 2002). L'origine de la DUI chez les bivalves marins demeure nébuleuse en raison de son instabilité au sein de ce groupe. En effet, il a été démontré, chez les *Mytillidae*, que la lignée mitochondriale femelle pouvait parfois remplacer la lignée mitochondriale mâle, effaçant du même coup la divergence accumulée entre les deux lignées et masquant l'origine de la DUI dans ce groupe (Hoeh et al. 1997). Chez les *Unionoidea*, en revanche, la DUI est beaucoup plus stable et la divergence entre les lignées mâle et femelle est antérieure à la divergence des *Margaritiferidae*, soit la famille la plus ancienne des *Unionoidea*, il y a au moins 213 MA (Curole et Kocher 2005).

Puisque la DUI est stable au sein des *Unionoidea*, les relations phylogénétiques au sein de ce groupe peuvent à la fois être déduites de marqueurs mitochondriaux mâle et femelle. En l'absence d'hybridation, ces deux phylogénies, tirées des marqueurs mâles et femelles respectivement, devraient représenter une image miroir l'une de l'autre. La phylogénie mâle, cependant, est généralement plus résolue avec des branches terminales plus longues en raison du taux d'évolution accru des lignées mitochondriales mâles par rapport aux lignées femelles (e.g., Quesada et al. 1998). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer le taux d'évolution accru des lignées mitochondriales mâles (e.g., Stewart et al. 1996). Ces hypothèses supposant, tour à tour, un taux de mutation accru au sein des lignées mâles ou une relaxation des contraintes sélectives par rapport au génome mitochondrial femelle (Hoeh et al. 2002).

La présence de deux lignées mitochondriales, transmises de manière indépendante au sein d'un même organisme, constitue un outil intéressant pour les inférences biogéographiques, en favorisant une détection rapide et sensible des événements d'hybridation, via l'analyse de leur génome. En théorie, les lignées hybrides devraient présenter une lignée mitochondriale de chacune des espèces parentales, de même que la moitié de leurs allèles nucléaires. Si l'hybridation cesse, le signal d'hybridation se diluera rapidement au niveau nucléaire, en raison de la transmission biparentale et de la recombinaison génétique (e.g., Kimura 1983),

rendant ce signal difficilement détectable. En revanche, au niveau mitochondrial, la transmission uniparentale et l'absence de recombinaison (Brown 1983) font en sorte que l'intégrité du signal d'hybridation devrait persister chez tous les descendants de cet événement d'hybridation. Cependant, s'il y a rétrocroisement avec une des espèces parentales, plusieurs scénarios sont envisageables quant au destin du signal d'hybridation, allant jusqu'à sa disparition complète de l'ensemble des génomes.

1.9 Le genre *Pyganodon*

Le genre *Pyganodon* (famille : *Unionidae*) est restreint à l'Amérique du Nord. Jusqu'à présent cinq espèces de *Pyganodon* ont été décrites, soit *P. grandis*, *P. cataracta*, *P. fragilis*, *P. gibbosa* et *P. lacustris* (Hoeh 1990). Les moules de ce groupe se distinguent morphologiquement des autres *Unionidae* par une coquille mince, renflée sur le dessus et dotée d'une charnière sans dents. Ces caractères, cependant, ne sont pas des synapomorphies puisqu'ils sont apparus de façon indépendante dans plusieurs groupes d'*Unionidae* (Hoeh 1990). Néanmoins, la monophylie du genre *Pyganodon* a été démontrée à l'aide d'études systématiques basées sur le système enzymatique des branchies (Hoeh 1990).

En ce qui concerne le mode d'infection d'un hôte, les *Pyganodon* sont considérés comme des généralistes. Au-delà de 30 espèces de poissons hôtes ont été rapportées pour *Pyganodon grandis*, alors que six hôtes seulement ont été identifiés pour *P. cataracta* et aucun hôte n'a encore été rapporté pour les autres espèces de *Pyganodon* (Fuller 1974, Hoggarth 1992, Watters 1994). Toutefois, l'effort d'échantillonnage varie grandement d'une espèce de moule à l'autre. De plus, pour beaucoup d'hôtes désignés, l'ensemble du cycle du parasite n'a pas été observé (Trdan et Hoeh 1982, Hoggarth 1992). Ainsi, la variabilité observée pourrait n'être qu'un artefact de l'échantillonnage. Enfin, les *Pyganodon* relâchent leurs larves à l'automne ou à l'hiver, bien que des largages printaniers aient déjà été observés (Watters et O'Dee 2000). Cette plasticité dans leur cycle de vie, couplée à une grande capacité infectieuse, pourraient s'avérer être des atouts très précieux dans des environnements instables ou lors de la colonisation de nouveaux milieux.

Les moules du genre *Pyganodon* sont très répandues dans les lacs et rivières de l'Amérique du Nord. Comparativement aux autres *Unionidae*, les *Pyganodon* affichent une certaine tolérance à la sédimentation, la coquille mince des *Pyganodon* leur permettant de se maintenir

à la surface des sédiments meubles et peu compactés (Metcalf-Smith et al. 1997). Au Canada, trois espèces sont susceptibles d'être retrouvées, soit *P. grandis* retrouvée à l'est des montagnes Rocheuses et à l'ouest des Appalaches; *P. cataracta* localisée dans le bassin versant de l'Atlantique et enfin *P. fragilis*, limitée au Maritimes (Clarke 1981, Kat 1985, 1986, Metcalf-Smith et al. 1997). Jusqu'à ce jour, les moules *Pyganodon* ont été principalement décrites sur la base de caractères de la coquilles (e.g., Clarke 1981). Sans remettre en doute les observations récoltées, une certaine confusion demeure quant aux relations évolutives entre les différents phénotypes observés, au sein des *Pyganodon*.

Dans les provinces maritimes, Clarke et Rick (1963) ont observés des caractères de la coquille intermédiaires entre *Pyganodon cataracta* et *P. fragilis* dans la majeure partie de l'aire de répartition de *P. fragilis*. Sur la base de ces observations les auteurs ont suggéré que ces deux taxons devraient être considérés comme deux sous-espèces capables d'hybridation. Or, lors d'une étude menée dans les provinces maritimes et le Nord Est des Etats-Unis, Kat (1983, 1986) a trouvé des différences significatives entre ces deux taxons et aucune évidence d'hybridation. À la différence de Clarke et Rick, (1963) les études de Kat étaient effectuées à partir de caractères morphologiques de l'estomac et des allozymes. Plus récemment, dans une étude conduite au Maine sur des spécimens de musée (coquille) ainsi que sur des spécimens provenant de populations actuelles, Hanlon et Smith (1999) contestent les mentions précédentes de *P. fragilis* dans la région qu'ils croient plutôt être attribuables à *P. cataracta*. De plus, un examen de la morphologie de l'estomac de ces spécimens pousse Hanlon et Smith (1999) à remettre en doute les observations de Kat (1983, 1986). Enfin, sur la base de caractères de la coquille, Clarke (1981) a identifié deux sous-espèces de *P. grandis* (*P. grandis grandis* et *P. grandis simpsonaia*). Toutefois, cette distinction entre deux groupes de *P. grandis* n'est pas reconnue par tous les malacologistes (Turgeon et al. 1988).

La confusion entourant l'identification morphologique des espèces de *Pyganodon* souligne, en quelque sorte, la subjectivité de certains caractères anatomiques. De plus, l'utilisation conjointe de caractères morphologiques et de données moléculaires dans une étude phylogénétique a démontré la faiblesse des caractères anatomiques pour décrire les espèces d'*Anodontinae* (sous-famille dont font partie les *Pyganodons*) (Hoeh 1990, voir aussi Lydeard et al. 1996 et Graf et O'Foighil 2000 pour des exemples similaires). Malheureusement, l'identification morphologique est souvent la méthode préconisée lors des relevés d'une grande étendue géographique (e.g., Clarke 1981). D'un point de vue de conservation, le plus

grand danger dans ce type de relevé est de confondre plusieurs taxons morphologiquement similaires, voire identiques (Baker et al. 2003), ce qui peut conduire à de mauvaises politiques de conservation de la biodiversité.

1.10 Objectifs de l'étude

Dans un optique de conservation, le but principal de cette étude est de valider, à l'aide de marqueurs génétiques, la répartition des *Pyganodon* au Québec, d'abord établie sur la base de caractères de la coquille (Clarke 1981). Pour ce faire, 66 populations de *Pyganodon*, au Québec, ont été caractérisées à l'aide de marqueurs issus de trois génomes différents (génome nucléaire ; ADNmt femelle ; ADNmt mâle) et 6 objectifs ont été poursuivis. L'utilisation de marqueurs issus de génomes différents va permettre de bien identifier les lignées de *Pyganodon* présentes (1), d'établir leur répartition (2), de cerner les zones d'hybridation (3) et de déterminer les relations entre les différentes lignées à l'aide de méthodes phylogénétiques (4). De plus, l'examen de douze caractères morphologiques de la coquille sur des individus préalablement identifiés génétiquement va permettre d'évaluer l'efficacité de caractères conchologiques pour discriminer les lignées de *Pyganodon* (5). Enfin, les patrons de colonisation de ces lignées en Amérique du Nord pourront être inférés à partir de leurs répartitions (6). La dispersion des moules d'eau douce s'effectue surtout au stade larvaire alors que la larve est le parasite obligatoire d'un poisson (McMahon et Bogan 1991). Ainsi, la biogéographie des *Pyganodon* devrait être conséquente à celle de leurs hôtes.

La réalisation des objectifs de cette étude a fait l'objet d'un manuscrit publié dans la revue : « Canadian Journal of Zoology », ce manuscrit est présenté à la section 2 de ce mémoire. Enfin, la section 3 est consacrée à la présentation des principales contributions et conclusions de cette étude. Bonne lecture!

2. Article: Cryptic lineages and hybridization in freshwater mussel of the genus *Pyganodon* (*Unionidae*) in north-eastern North America.

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1) Identification de l'étudiant

Frédéric Cyr

M.Sc. (Sciences biologiques)(2-235-1-0)

2) Liste des auteurs

Frédéric Cyr

Annie Paquet

André Martel

Bernard Angers

Titre : Cryptic lineages and hybridization in freshwater mussel of the genus *Pyganodon (Unionidae)* in north-eastern North America.

Article soumis en avril 2007 à la revue Canadian Journal of Zoology

3) Déclaration des coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Frédéric Cyr inclue cet article dans son mémoire de maîtrise intitulé **Caractérisation de la biodiversité à l'aide d'une analyse génétique chez les moules d'eau douce du genre *Pyganodon (Unionidae)* dans le nord est de l'Amérique du Nord.**

BERNARD ANGERS

Coauteur

25 MAI 2007

Date

André Martel

Coauteur

Signature

28 mai 2007

Date

Annie Paquet

Coauteur

Signature

1^{er} juin 2007

Date

Abstract

The distribution of freshwater mussels *Pyganodon* traditionally inferred from morphological characters was validated by a genetic characterization of the genus within the Quebec peninsula. Individuals were identified by comparing the sequences from the female mitochondrial genome (COI and 16S) to those of reference individuals, while hybridization was assessed with male mitochondrial (COI and COII) and nuclear genomes (ITS 1 and ITS 2). The results confirmed most of the previous morphological identifications but revealed unexpected results. Both male and female mitochondrial genomes support the distinction between *Pyganodon fragilis* (Lamarck 1819) and *Pyganodon cataracta* (Say 1817). However, only one lineage of *Pyganodon grandis* (Say 1829), instead of the two expected, was detected in the sampled area. The genetic survey also revealed the presence of two unidentified *Pyganodon* lineages, previously unreported within the Quebec peninsula. These extremely rare lineages harbour the signature of ancestral hybridizations. Finally, recent divergence and hybridizations make shell characters only partially efficient to discriminate *Pyganodon* lineages.

Résumé

La répartition des *Pyganodon*, d'abord établie sur la base de caractères morphologiques, a été validée par la caractérisation génétique du genre au Québec. Les individus ont été identifiés en comparant les séquences provenant du génome mitochondrial femelle (COI et 16S) avec les séquences d'individus types et l'hybridation a été estimée à l'aide du génome mitochondrial mâle (COI et COII) et du génome nucléaire (ITS 1 et ITS 2). Les résultats confirment la plupart des précédentes identifications morphologiques, bien que plusieurs résultats inattendus ont été révélés. La distinction entre *Pyganodon fragilis* (Lamarck 1819) et *Pyganodon cataracta* (Say 1817) est supportée par les génomes mitochondriaux mâle et femelle. Cependant, bien que deux lignées de *Pyganodon grandis* (Say 1829) étaient attendues, une seule lignée a été détectée dans l'aire échantillonnée. Cette étude génétique a également révélé la présence de deux lignées de *Pyganodon* non identifiées, jamais répertoriées sur le territoire québécois. Ces deux lignées sont extrêmement rares et présentent la signature d'évènements ancestraux d'hybridation. Enfin, en raison de la divergence récente et de l'hybridation, les caractères de la coquille ne sont que partiellement efficaces pour discriminer les lignées de *Pyganodon*.

Introduction

Freshwater mussels of the *Unionidae* family represent one of the most diversified taxonomic groups of the North American continent. It is also one of the most imperilled, with approximately 70% of the 297 recognized taxa considered as endangered, threatened, or of special concern (Williams et al. 1993, Lydeard et al. 2004). The identification of freshwater mussels is mainly performed on the basis of conchological and anatomical characters. However, an increasing number of studies revealed numerous inconsistencies between genetic and morphological variation and highlighted the usefulness of genetic markers to assess the biodiversity within morphologically similar unionid lineages (e.g., Mulvey et al. 1997, Roe and Lydeard 1998, King et al. 1999, Baker et al. 2003). The use of genetic markers also revealed that some morphological characteristics used to delineate unionid species have appeared several times within this group leading to possibly erroneous phylogenies (Hoeh 1990, Lydeard et al. 1996, Graf and Foighil 2000).

In freshwater mussels, the advantages of genetic markers are strengthened by the presence of two mitochondrial lineages. Freshwater unionid mussels, like marine mytilid mussels (*Mytilidae*), possess an unusual mode of mitochondrial DNA inheritance, termed doubly uniparental inheritance (DUI). DUI involves not only the females, but also the males in the transmission of the mitochondria through generations (Zouros et al. 1992, Liu et al. 1996). While the transmission of the female mitochondria in mussels is similar to that of other organisms, male mitochondria are strictly transmitted paternally to male progeny. In addition, male mtDNA is expected to display a higher evolution rate than the female counterpart (e.g., Hoeh et al. 2002). Therefore the male mitochondrial genome represents a tool that complements information from female mtDNA, allowing higher resolution to discriminate between closely related taxa (Krebs 2004), as well as to detect hybridization and to identify lineages involved.

Mussels of the genus *Pyganodon* are widespread in river, lake and pond habitats of the United States and Canada. Despite the relevance of genetic markers, this genus has mainly been described using morphological characteristics. In eastern Canada, based on shell characteristics, Clarke (1981) inferred the distribution of four lineages of *Pyganodon*: *Pyganodon cataracta* (Say 1817), *Pyganodon fragilis* (Lamarck 1819), *Pyganodon grandis* (Say 1829) and *Pyganodon simpsonaia* (Lea 1861). However, these distributions overlap

widely and many intergrades among lineages have been reported (Clarke 1981). Moreover, the divergence and the reproductive isolation between *P. fragilis* and *P. cataracta* (Say, 1817) is debated (Clarke and Rick 1963, Kat 1983, 1986) and previous morphological identification of *P. fragilis* outside Newfoundland was questioned by a recent study (Hanlon and Smith 1999). Finally, based on shell morphology, numerous subspecies of *Pyganodon grandis* have been proposed (including *P. simpsonaia*), while those delineations have not received general acceptance (e.g., Turgeon et al. 1988).

This study reports the distribution of the *Pyganodon* lineages in the Quebec peninsula as inferred from genetic markers. The objectives of the study were to: i) identify individuals using female mtDNA; ii) determine the extent of hybridization with nuclear markers and male mtDNA; iii) assess the relationships among lineages using phylogenetic methods, and iv) determine the efficiency of morphological characteristics (conchological measurements) to discriminate the lineages detected with genetic markers. Moreover, the pursuit of these objectives also enabled an assessment of the history of the *Pyganodon* lineages since the last glaciations.

Methodology

Genetic identification

Pyganodon mussels were collected in 66 sites (lakes or rivers) located in the Quebec peninsula (Table 1; Figure 2). Samples from regions where *Pyganodon* lineages are found in allopatry (referred to as reference individuals) were also included in the analysis: *P. grandis* from Manitoba (provided by Dr. J. Carney, Lakehead University), *P. cataracta* from Maine (Dr. J. Rhymer, University of Maine) and *P. fragilis* from Newfoundland (Dr. D. McAlpine, New Brunswick Museum). Comparison of the sequence of each sampled individual to those of reference individuals is expected to provide formal genetic identification of the lineages found within Quebec.

Table 1. Samples location, expected phenotypes from previous morphological survey (Clarke 1981) and genetic identification over three different genomes, for each *Pyganodon* sample. Identifiers gr, si, ca, fr, A and B refer to *Pyganodon grandis* (Say 1829), *Pyganodon simpsonaia* (Lea 1861), *Pyganodon cataracta* (Say 1817), *Pyganodon fragilis* (Lamarck 1819), Unidentified *Pyganodon* lineage A and Unidentified *Pyganodon* lineage B respectively. Numbers between parentheses indicate sample size for each analyzed genome.

Regions/Sites		Geogr. coordinates		Morph	Genetic identification		
		Lat.	Long.		Female mt	Male mt	Nuclear
James Bay							
1	Chassignol L.	48.292	-78.447	Si	gr (2)	-	gr (2)
2	Preissac L.	48.329	-78.358	Si	gr (3)	-	gr (2)
3	Fontbonne L.	48.355	-78.410	Si	gr (2)	gr (1)	gr (2)
1	Chicobi L.	48.845	-78.501	Si	gr (13)	-	gr (8)
2	Scott L.	49.802	-74.667	?	ca (2)	-	ca (2)
					gr (14)	-	gr (12)
3	Caché L.	49.830	-74.403	?	ca (12)	-	ca (12)
					gr (3)	-	gr (2)
4	Simon L.	49.832	-74.585	?	ca (10)	-	ca (10)
					gr (4)	-	gr (3)
5	Doré L.	49.878	-74.309	?	ca (5)	-	ca (5)
6	Gilman L.	49.902	-74.342	?	gr (4)	-	gr (4)
7	David B.	49.909	-74.362	?	gr (4)	-	gr (5)
8	Waconichi R.	50.242	-73.814	?	ca (10)	-	ca (11)
9	Ruppert R.	51.482	-78.697	?	gr (18)	-	gr (16)
St. Lawrence R.							
10	Tomifobia R.	45.090	-72.090	gr / ca	ca (5)	-	ca (5)
11	Noire R.	45.502	-72.914	gr / ca	gr (8)	-	gr (5)
12	Connely L.	45.904	-73.963	gr / ca	ca (8)	-	ca (4)
					ca (1)	-	A / ca (1)
13	St. François R.	45.959	-72.537	gr / ca	ca (4)	-	ca (4)
14	St. François R.	46.105	-72.881	gr / ca	gr (21)	-	gr (12)
15	Nicolet R.	46.234	-72.638	gr / ca	gr (1)	-	gr (1)
16	Bourbon R.	46.277	-71.837	gr / ca	B (1)	-	gr (1)
17	Jouet L.	46.672	-73.307	gr / ca	ca (3)	-	ca (3)
18	St. Joseph L.	46.911	-71.641	gr / ca	ca (6)	-	ca (6)
19	St. Charles L.	46.923	-71.382	gr / ca	ca (16)	ca (1)	ca (17)
20	Missionnaire L.	46.974	-72.635	gr / ca	ca (9)	-	ca (8)
21	Bouffe L.	47.038	-74.212	Gr	ca (3)	-	ca (3)
22	Bellevue L.	47.183	-72.233	gr / ca	ca (2)	-	ca (2)
23	St. Denis R.	47.408	-69.790	Ca	ca (4)	-	ca (3)
24	Kamouraska R.	47.475	-69.790	Ca	ca (4)	-	ca (4)
25	Macpès L.	48.305	-68.495	?	fr (18)	fr (1)	ca (20)
26	Five Milles L.	48.317	-74.550	?	ca (5)	-	ca (3)
					gr (2)	-	gr (1)
27	Cailloux L.	49.699	-63.856	Fr	fr (4)	fr (1)	ca (3)
28	Elsie L.	49.748	-63.882	Fr	fr (4)	-	ca (1)
29	Plantin L.	49.870	-64.392	Fr	fr (2)	-	ca (1)
Outaouais R.							
30	East Castor R.	45.266	-75.285	gr / ca	gr (4)	-	gr (4)
31	Leamy L.	45.449	-75.703	gr / ca	gr (1)	-	gr (1)
32	South Nation R.	45.576	-75.106	gr / ca	gr (2)	-	gr (2)
33	Philippe L.	45.616	-76.007	gr / ca	ca (10)	-	ca (4)
					A (7)	A (1)	A / ca (13)
34	Seize Iles L.	45.923	-74.469	gr / ca	ca (4)	-	ca (3)
35	Taku-Echo B.	45.939	-75.458	gr / ca	A (1)	-	A / ca (1) gr
					B (8)	-	(6)
36	St. Joseph L.	45.979	-74.353	gr / ca	ca (6)	-	ca (7)
37	Sucrierie L.	46.109	-74.916	gr / ca	B (6)	-	gr (7)
38	Montagne Noire L.	46.190	-74.277	gr / ca	ca (6)	-	ca (8)
39	Monroe L.	46.326	-74.502	gr / ca	ca (2)	-	ca (2)

40	Grandes Baies L.	46.360	-75.085	gr / ca	ca (8)	-	ca (8)
41	Nominingue L.	46.391	-74.999	gr / ca	ca (11)	-	ca (7)
42	Tibériade L.	46.515	-74.988	gr / ca	ca (9)	ca (1)	ca (8)
43	Cinq Doigts L.	46.604	-74.525	gr / ca	ca (12)	-	ca (11)
44	Aux Sables L.	47.384	-78.694	Gr	gr (11)	-	gr (12)
45	Hébert L.	48.019	-79.487	Si	gr (5)	-	gr (4)
46	Opasatica L.	48.081	-79.311	Si	gr (2)	-	gr (10)
47	Dasserat L.	48.194	-79.350	Si	gr (11) A (2)	-	gr (4) A / ca (2)
48	Tachereau L.	48.664	-78.682	Si	gr (14)	-	gr (12)
49	Chassignol L.	48.292	-78.447	Si	gr (2)	-	gr (2)
50	Preissac L.	48.329	-78.358	Si	gr (3)	-	gr (2)
51	Fontbonne L.	48.355	-78.410	Si	gr (2)	gr (1)	gr (2)
<hr/>							
Saguenay R.							
52	Tripe L.	48.164	-71.122	?	fr (1)	-	-
53	Prinzèles L.	48.187	-72.223	?	ca (6)	-	ca (4)
54	Éternité L.	48.221	-70.559	?	ca (22) fr (1)	-	ca (19) -
55	Rond L.	48.249	-70.624	?	fr (9)	-	ca (7)
56	Otis L.	48.316	-70.630	?	fr (1)	-	ca (1)
57	Croix L.	48.412	-71.794	?	ca (2)	-	ca (3)
58	François L.	48.523	-72.567	?	ca (1)	-	ca (1)
59	Côté L.	48.593	-72.629	?	ca (3)	-	ca (3)
60	Claire L.	48.624	-71.067	?	ca (2) fr (2)	-	ca (2) ca (2)
61	Milieu L.	48.822	-72.808	?	ca (6)	-	ca (6)
62	Jim L.	48.969	-72.742	?	ca (6)	-	ca (6)
63	Chigoubiche L.	49.157	-73.588	?	ca (1)	-	ca (1)
64	Gabriel L.	49.325	-74.467	?	ca (11) gr (6)	ca (1) -	ca (11) gr (6)
65	Pitt L.	49.682	-73.146	?	ca (3)	-	ca (3)
66	Cygnés L.	49.889	-72.884	?	ca (3)	-	ca (3)

Note: *Pyganodon grandis* from Manitoba; *P. cataracta* from Maine and *P. fragilis* from Newfoundland were also included in the analyses.

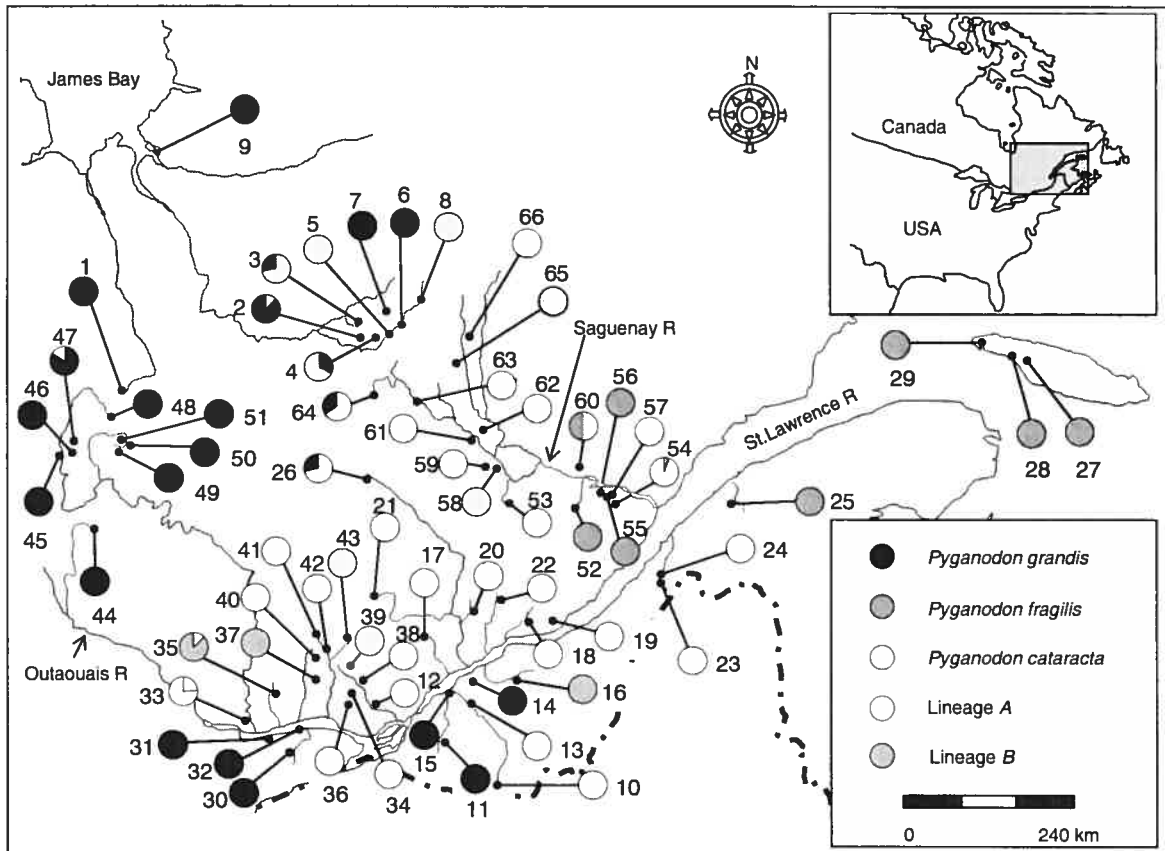


Figure 2: Geographic distribution of *Pyganodon* lineages (*Pyganodon grandis* (Say 1829), *Pyganodon fragilis* (Lamarck 1819), *Pyganodon cataracta* (Say 1817), lineage A and lineage B) inferred from genetic identification of the lineages.

In freshwater mussels, male mitochondria are restricted to the gonads while female mitochondria are found in somatic tissue (Liu et al. 1996). In order to extract both male and female mitochondrial DNA in a single extraction, a piece of gonad and the foot epithelium surrounding it was removed from each individual collected. DNA was extracted with standard phenol-chloroform procedures (Sambrook et al. 1989).

To assess the composition of *Pyganodon* communities, two segments (296 and 212 pb) of the cytochrome oxidase subunit I (COI) mitochondrial gene were amplified with primers specific to female mitochondria (Table 2). In order to design sex-specific primers, female and male mitochondrial sequences released on the Genbank sequence database were aligned using Clustal W (version 1.83) (Thompson et al. 1994). The 3' extremity of primers was located on sex-specific mismatches to provide specificity. PCR reactions were conducted from a template of 12.5 μ l including 1.25 μ l of 10x buffer (Invitrogen Corp., Burlington Ontario); 2.5 nM L⁻¹ of each dNTP; 10 pmol of each primer; 1.5 mM L⁻¹ of MgCl₂; 0.2 Unity of *Taq* polymerase; and 100 ng of DNA. PCR reactions were conducted on 45 cycles of 3 steps (15 sec. at 92°C; 15 sec. at 52°C and 15 sec at 68°C). Variability of these segments was then screened using the SSCP (Single stranded conformation polymorphism). This method allows the discrimination of sequences even differing by a single substitution (Orita et al. 1989, Sheffield et al. 1993). PCR products were electrophorezed into 6% non-denaturant acrylamid gel (37.5:1 ratio acrylamide-bisacrylamide) for 9 hours at 20 watts at 4°C in 0.5 X TBE.

For each conformant detected with the SSCP method, a larger portion of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene (579pb) and a segment of the 16S rDNA (399 pb) were PCR-amplified and sequenced using primers described in Table 2. Whenever possible three to five individuals from different populations were used to validate the accuracy of the SSCP method.

Table 2 Size of the DNA segments and primers used in this study, each set of primers have been designed from Genbank sequences, published by various authors.

Amplified segments	Size (bp)	Primers (5' - 3')
Female mtDNA		
COI (SSCP segment 1)	296	GGKCAACCAGGAAGGTTAC CCCAGAATGAGCAATATTCC
COI (SSCP segment 2)	212	ATCTWAGGTTYTACTYCTTG CCAGCCAAAACAGGYAAAGC
COI	579	AATTTGTGGTGTTAATCATT CCAGCCAAAACAGGYAAAGC
16S	399	CGATAGAAAATAATGCCTGC GGTATAATAGTCGAACAGAC
Male mtDNA		
COII and COI	685	GTTTCTCCAATTGATGCTTC TCARCTTGCATTACYTCAAC
Nuclear DNA		
ITS 1 (SSCP segment)	285	GGAGGTGACAAGAGCGCTTC GCTCGTCGATAAGAAGGAC
ITS 1	553	GTTTCCGTAGGTGAACCTG GCAATATGCGTTCAAGATG
ITS 2	429	CTCGTGGGTCGATGAAGAGC CTCGTCTGATCTGAGGTCG

Note: The primers used to amplify COI gene of the female mitochondrial genome were designed from sequences found by Hoeh et al. (2002), whereas the primers used to amplify 16S region were designed from sequences found by Krebs (2004). The male specific primers have been designed from sequences found by Curole and Kocher (2005) and Hoeh et al. (2002). Finally, the ITS primers were designed from unpublished data found on Genbank (accession number: AY319385).

Extent of hybridization

Signature of hybridization was evidenced by inconsistencies across assignments inferred from female mtDNA, male mtDNA and nuclear DNA. From a sub sample of each lineages identified with female mtDNA, a portion of the cytochrome oxydase subunit II and I gene (COII and COI) (685 pb) of the male mitochondria was PCR-amplified and sequenced using male specific primers (Table 2). Amplification of male mtDNA from reference individuals was not possible because samples were provided from somatic tissues. Instead, male haplotypes were compared to sequences of *P. grandis* and *P. fragilis* found in Hoeh et al. (2002) and deposited on Genbank (AF406800.1 and AF406801.1).

Similarly, two non-overlapping segments of 553 and 429 pb from the nuclear genome encompassing both internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS 1 and ITS2) were amplified and sequenced (Table 2). Because numerous individuals appear to host trematodes, primers specific to mussel were designed based on aligned sequences of mussels and trematodes (Genbank accession number: AY277705.1). Hybridization was also examined at the level of individuals. Variation of a shorter segment of the ITS 1 region (285 pb; Table 2) was screened over all individuals using the SSCP method. According to the codominant properties of nuclear loci, alleles of different lineages can be discriminate unambiguously.

Phylogenetic relationships

Homologous sequences were aligned using Clustal W (version 1.83) (Thompson et al. 1994). Relationships among *Pyganodon* lineages were inferred using Neighbour Joining algorithm (NJ) (Saitou and Nei 1987) and a distance calculation based on the F84 model of nucleotide substitution, allowing for different rates of transition and transversion and for different frequencies of the four nucleotides (Felsenstein and Churchill 1996). NJ trees were compared to those inferred from a maximum likelihood (ML) analysis computed using the same model of nucleotide substitution and from a heuristic algorithm of maximum of parsimony (MP). Maximum likelihood analysis was runned with the assumption of constant rate of changes among sites and without corrections for the molecular clock. Internal nodes were tested by bootstrap with 1000 replications for NJ and MP analyses and with 100 replications for ML analysis (Hillis and Bull 1993). Phylogenetic analyses were performed with the Phylip package version 3.5 (Felsenstein 2005) and were visualized with Treeview, version 1.6.6 (Page 1996). The sequences of the three sampled genomes were first analysed separately and then pooled together, per lineages, to realize a concatenated, unrooted tree. For this latest analysis, different weights have been given to the different loci according to their rate of evolution. The sequences of the reference individuals were not included in the concatenated tree due to the absence of male mitochondrial information.

Morphological analysis

A subsample was randomly drawn for morphological analyses from each *Pyganodon* lineage identified with genetic markers, for a total of 63 individuals. Twelve conchological measures were taken, using a digital calliper (± 0.1 mm): shell length (SL), shell height at ligament (HL), shell height at umbo (HU), height from umbo to ventral line (HV), shell width (SW), distance between umbo and posterior end (UP), distance between point of dorsal curvature and posterior end (PP), distance between the ligament and the point of dorsal curvature (LP), ligament length (LL), height of longest axis (HA), umbo thickness (UT), umbo height (UH) (Figure 3). All measures were log-transformed and regressed on shell length to remove the size effect. A discriminant analysis was computed with the residuals using SPSS software (version 13.0) (SPSS Inc., Chicago IL). Given the small sample size, U-method was employed to evaluate the classification accuracy of the model. This is calculated by removing one observation at a time, estimating the discriminant function based on the remaining samples and using the resulting function to classify the holdout individual (Lachenbruch and Mickey 1968).

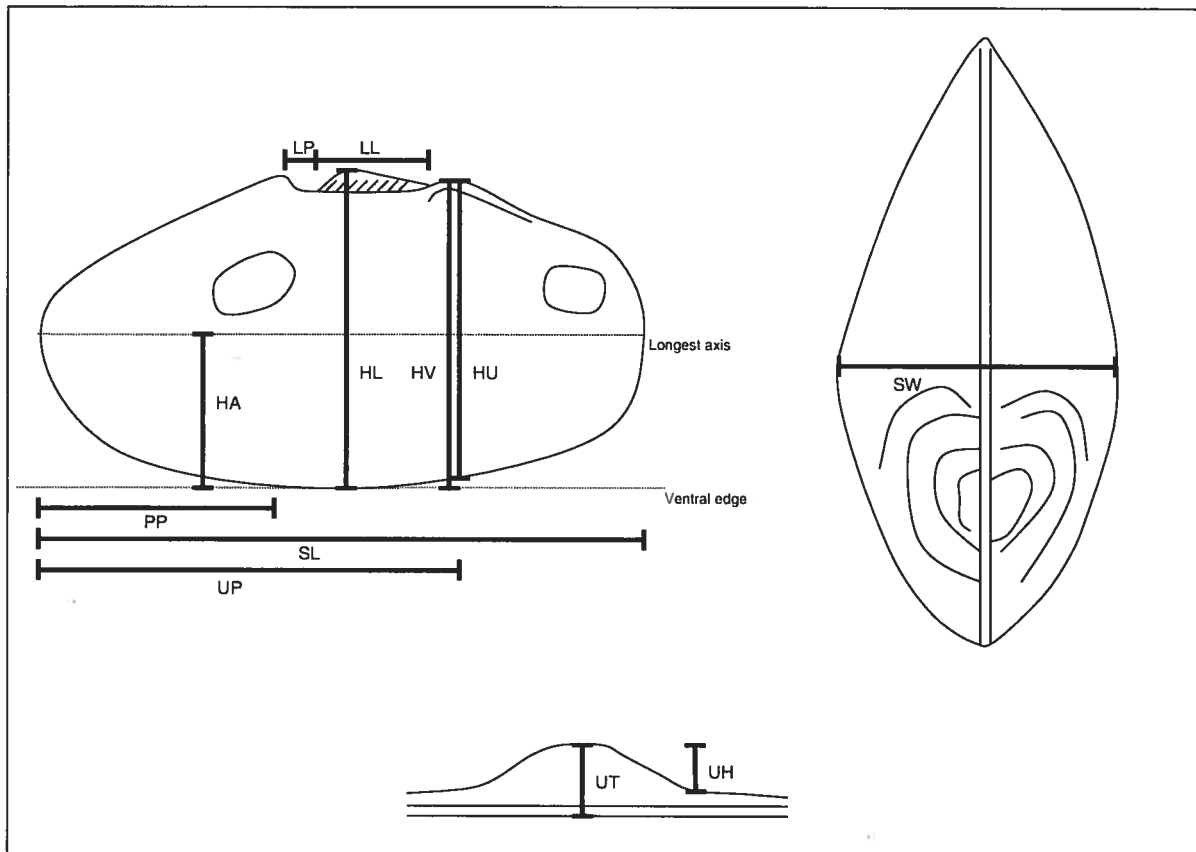


Figure 3: Diagram depicting shell measurements. Shell length (SL), shell height at ligament (HL), shell height at umbo (HU), height from umbo to ventral line (HV), shell width (SW), distance between umbo and posterior end (UP), distance between point of dorsal curvature and posterior end (PP), distance between the ligament and the point of dorsal curvature (LP), ligament length (LL), height of longest axis (HA), umbo thickness (UT), umbo height (UH)

Results

Female mitochondrial genome

The analysis of female mtDNA performed on 471 individuals from 66 populations, revealed only eight haplotypes within Quebec (Genbank accession numbers: COI: EF418016-EF418024; 16S: EF488179-EF488183). The comparison of COI and 16S sequences (976pb) obtained with reference individuals allows unambiguous assignment of haplotypes to *P. cataracta* (2 haplotypes), *P. fragilis* (1) and *P. grandis* (2) in the present survey. Alternative haplotypes detected within *P. cataracta* and *P. grandis* differed by one or two mutations respectively and were restricted to few individuals from a single site. *P. fragilis* and *P. cataracta* haplotypes were separated by only two mutations (0.2% of divergence) while haplotypes of *P. grandis* strongly differed from both *P. fragilis* and *P. cataracta* haplotypes (7.1 % of divergence) (Table 3).

The three remaining haplotypes were highly divergent (> 3.6% of divergence) from reference individuals and could not be assigned to these lineages. Two of these haplotypes are separated by only two mutations and differed by 8.4% from the third one (Table 3). In absence of taxonomic groups for these haplotypes, we have considered these individuals as belonging to two additional lineages, hereafter referred to as lineages A and B.

Table 3 Pairwise percentage of divergence among *Pyganodon* lineages, estimated from different regions on the three sampled genomes.

	Female mtDNA			Male mtDNA			Nuclear genome		
	COI	16S	COI+16S	COII	COI	COII+COI	ITS-1	ITS-2	ITS-1+2
fr-gr	9.3	3.8	7.1	17.4	11.9	14.2	0.9	3.0	1.8
fr-ca	0.3	0.0	0.2	2.8	1.7	2.2	0.0	0.0	0.0
fr-A	5.2	1.3	3.6	6.4	5.2	5.7	0.5	0.7	0.6
fr-B	8.6	3.8	6.6	-	-	14.3	-	-	1.7
gr-ca	9.3	3.8	7.1	17.0	12.4	14.3	0.9	3.0	1.8
gr-A	10.0	4.5	7.8	17.4	12.9	14.7	1.3	2.8	1.9
gr-B	9.3	4.3	7.3	0.4	0.0	0.1	0.2	0.0	0.1
ca-A	5.2	1.3	3.6	5.0	6.0	5.5	0.5	0.7	0.6
ca-B	8.6	3.8	6.6	-	-	-	-	-	-
A-B	11.2	4.3	8.4	-	-	-	-	-	-

Notes: Estimations of divergence between lineage A and other taxa for the nuclear genome were calculated from the allele specific to this lineage. Estimations of divergence between lineage B and other taxa for male mitochondrial genome as well for nuclear genome were not provided except for *P. grandis*, the expected lineage involved in the hybridization events.

Male mitochondrial genome

A specific male haplotype was detected for each of the individuals identified as *P. grandis*, *P. fragilis*, *P. cataracta* and lineage A (Genbank accession numbers: EF488184-EF488189). The comparison to sequences deposited on Genbank confirmed identification of *P. grandis* and *P. fragilis*. Male sequences from *P. cataracta* and lineage A differed from *P. fragilis* by 15 (2.2%) and 38 (5.7%) mutations respectively. Surprisingly, individuals from lineage B that displayed a highly divergent female mtDNA, had no equivalent in male mitochondrial genome. These individuals carried a male mitochondrial haplotype similar to the one of *P. grandis*, indicating hybridization between both lineages.

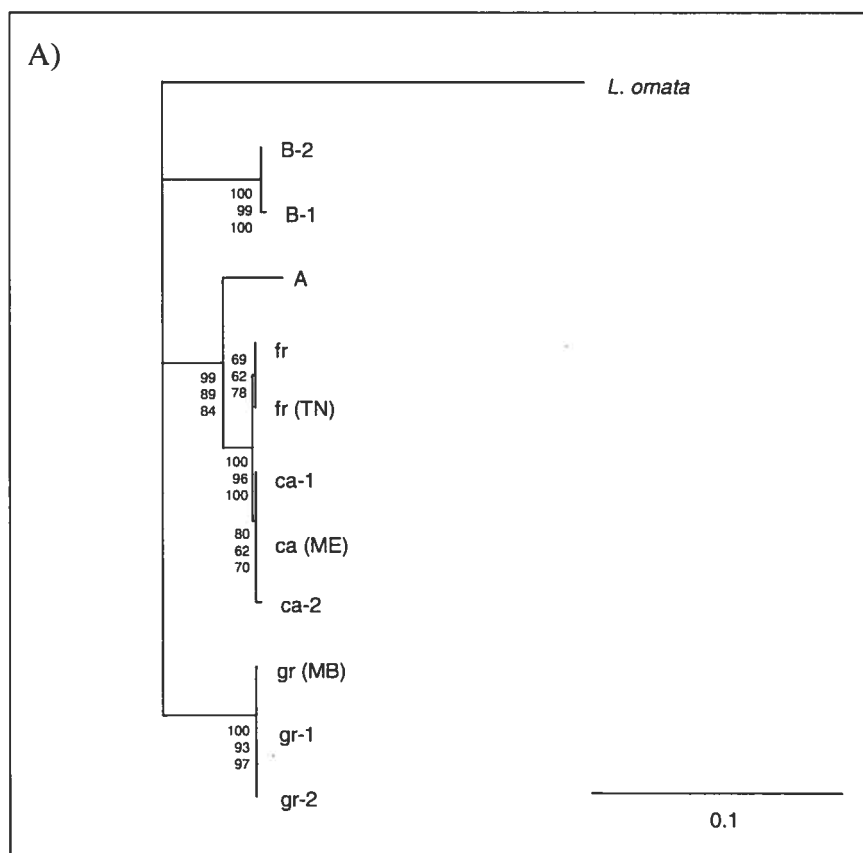
Nuclear genome

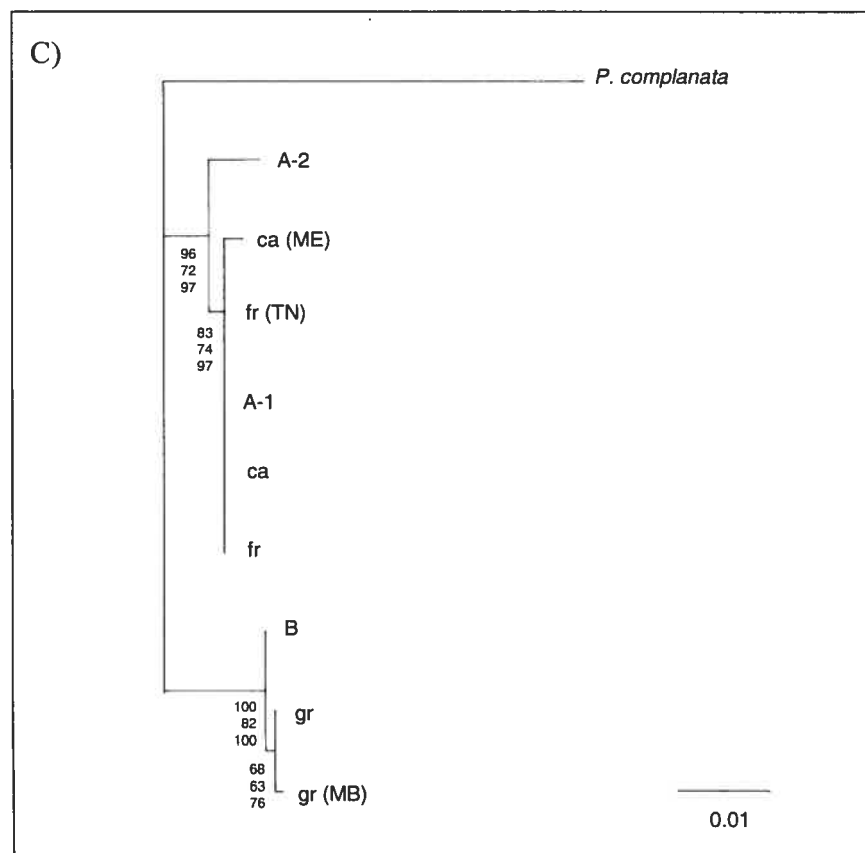
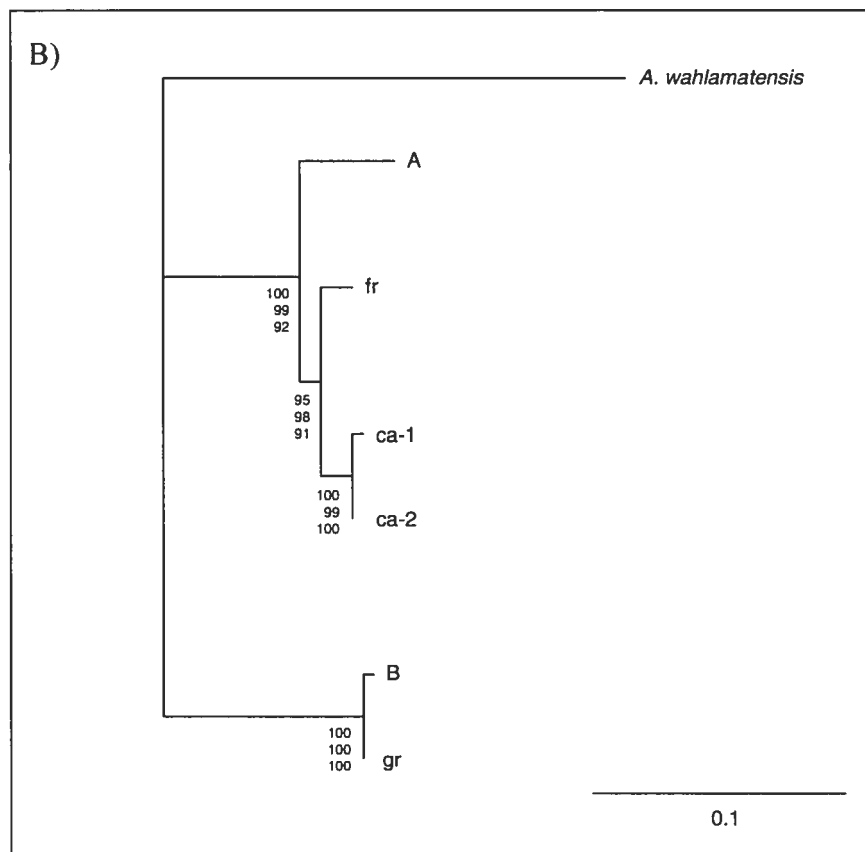
Comparison with reference individuals confirmed the identification of *Pyganodon grandis*, *P. fragilis* and *P. cataracta* shared the same nuclear allele, in samples from Quebec as well as in reference individuals. Lineage A displayed two distinct alleles diverging by five mutations. One of these alleles was unique to this lineage while the other was identical to the one shared by *P. cataracta* and *P. fragilis*. As observed for male mtDNA, allele of lineage B is similar to the ones of *P. grandis* (Genbank accession numbers: EF488190-EF488199).

The SSCP survey confirmed the absence of hybridization within *P. grandis*. Unfortunately, lack of difference between *P. fragilis* and *P. cataracta* hampered assessment of hybridization between these taxa. Surprisingly, all individuals of the lineage A displayed both divergent alleles and confirmed hybridization (Table 1). No alternative allele was detected for the lineage B indicating complete introgression of these loci by *P. grandis*.

Phylogenetic relationships

Relationships among lineages inferred with NJ, ML and MP were fully congruent. Therefore, only the NJ trees are shown (Figure 4). The NJ trees inferred from female mtDNA, male mtDNA, nuclear DNA and the pooled sequences from these three genomes were consistent in that *P. fragilis*, *P. cataracta* and the lineage A form a strongly supported clade, highly divergent from *P. grandis*. The female mtDNA and the concatenated tree indicated that *Pyganodon* lineages are organized in three distinct clades where *P. grandis* as well as the lineage B form additional distinct clades. However, the lineage B clustered with *P. grandis* for the male mitochondrial and the nuclear genomes as expected following a severe introgression.





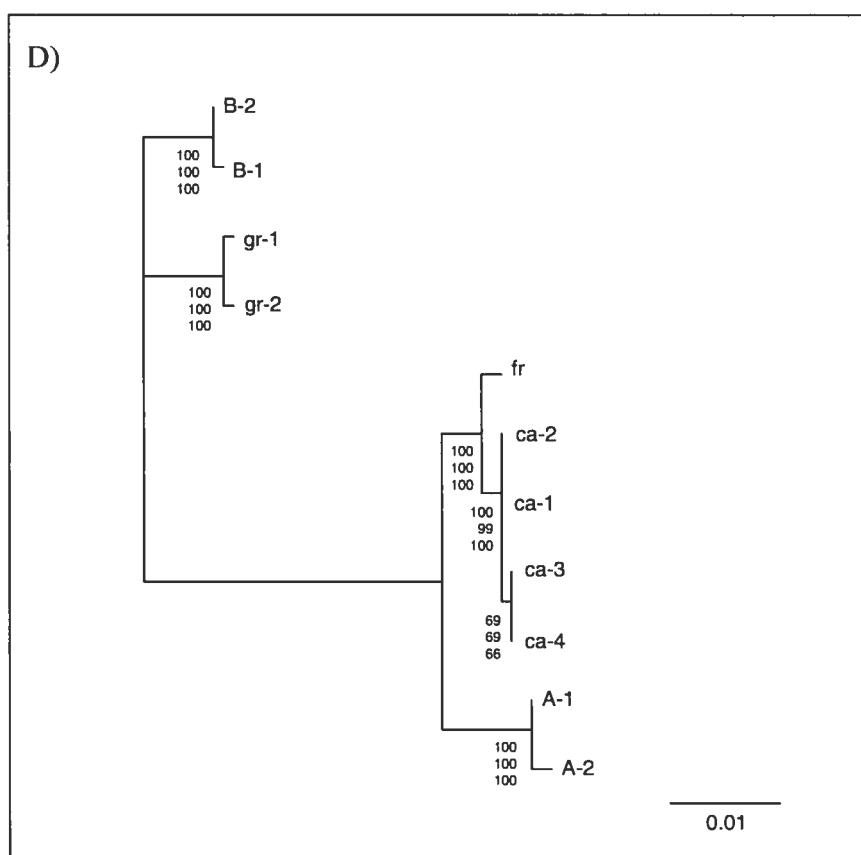


Figure 4: Neighbour joining trees of the A) 16S and COI female mtDNA with a sequence of *Lampsilis ornata* (NC_005335.1) used as outgroup. B) COI and COII male mtDNA with a sequence of *Anodonta wahlamatensis* (AY493493.1) used as outgroup (only COI was available for the outgroup) C) Nuclear ITS 1 and 2 with a sequence of *Pseudanodonta complanata* used as outgroup.(DQ060184.1) D) Concatenated unrooted tree realized from the sequences of the three sampled genomes pooled together. Reference individuals were discarded from this latest analysis. Bootstrap values - for the three phylogenetic methods used in this study (NJ, MP, ML) - are shown under the branches.

Distribution of Pyganodon

The combined information of the three genomes revealed the presence of five *Pyganodon* lineages in Quebec (Figure 2). Two lineages, *P. grandis* and *P. cataracta* displayed a widespread, but nearly disjoint distribution. *Pyganodon grandis* displayed a more western distribution than *P. cataracta* with some sympatry in the northernmost samples. The genetic analysis showed that in north-eastern Quebec, *P. cataracta* is replaced by *P. fragilis*. The analysis also revealed that both lineages live in sympatry on some sites of the Saguenay region, but *P. fragilis* is the unique lineage found in Anticosti Island and the south-eastern shore of the St. Lawrence River. The lineages A and B would be restricted to few populations in the southwestern part of the Quebec territory.

The identification of *P. cataracta* and *P. fragilis* by genetic analyses validated the distribution of these two lineages inferred by Clarke (1981) with shell characteristics (Table 1). However, the genetic lineage identified as *P. grandis* occurred in sites where either *P. simpsonaia* or *P. grandis* was expected to occur (Clarke 1981) (Table 1). Thus, no genetic evidence confirmed the presence of *P. simpsonaia* in Quebec. In addition, both lineages A and B were never detected previously.

Morphological analysis

The first two functions of the discriminant analysis performed with the residuals of the eleven conchological characteristics on shell length explain 91.1% of the variation (Figure 5). The first discriminant function is associated to the prominence of the umbo and several related variables: umbo height (UH), umbo thickness (UT) and height from umbo to ventral line (HV). Both *P. grandis* and lineage B are characterized by a prominent umbo compared to *P. cataracta*, *P. fragilis* and lineage A. The second discriminant function is associated with the length and shape of the posterior region of the shell: the distance between umbo and posterior end (UP), the distance between ligament and the posterior end (LP) and the ligament length (LL). Those variables discriminated *P. fragilis* from other *Pyganodon* lineages and to a lesser extent lineage B from *P. grandis*.

Conchological characteristics, likely because of significant overlap among certain genetic lineages, seem only partially efficient to discriminate *Pyganodon* taxa. Results of the U-

method classification indicated that there was about 80% classification accuracy for the whole model, with better success for *P. grandis* (100%) and *P. cataracta* (76%) (Table 4). The discriminant functions are less efficient to distinguish other lineages, particularly the lineage B which had weak discrimination success (33%) (Table 4).

Table 4: Number of individuals, for each genetic lineage, that have been classified correctly by discriminant functions based on shell characteristics (percentage of correct classification is indicated in parenthesis). The signification of the abbreviations is shown in Table 1.

Lineages	Predicted Lineages					Total
	ca	fr	gr	A	B	
ca	13 (76.5)	1 (5.9)	1 (5.9)	2 (11.7)	0	17
fr	2 (20)	6 (60)	0	1 (10)	1 (10)	10
gr	0	0	24 (100)	0	0	24
A	0	1 (16.7)	1 (16.7)	4 (66.7)	0	6
B	0	1 (16.7)	3 (50)	0	2 (33.3)	6

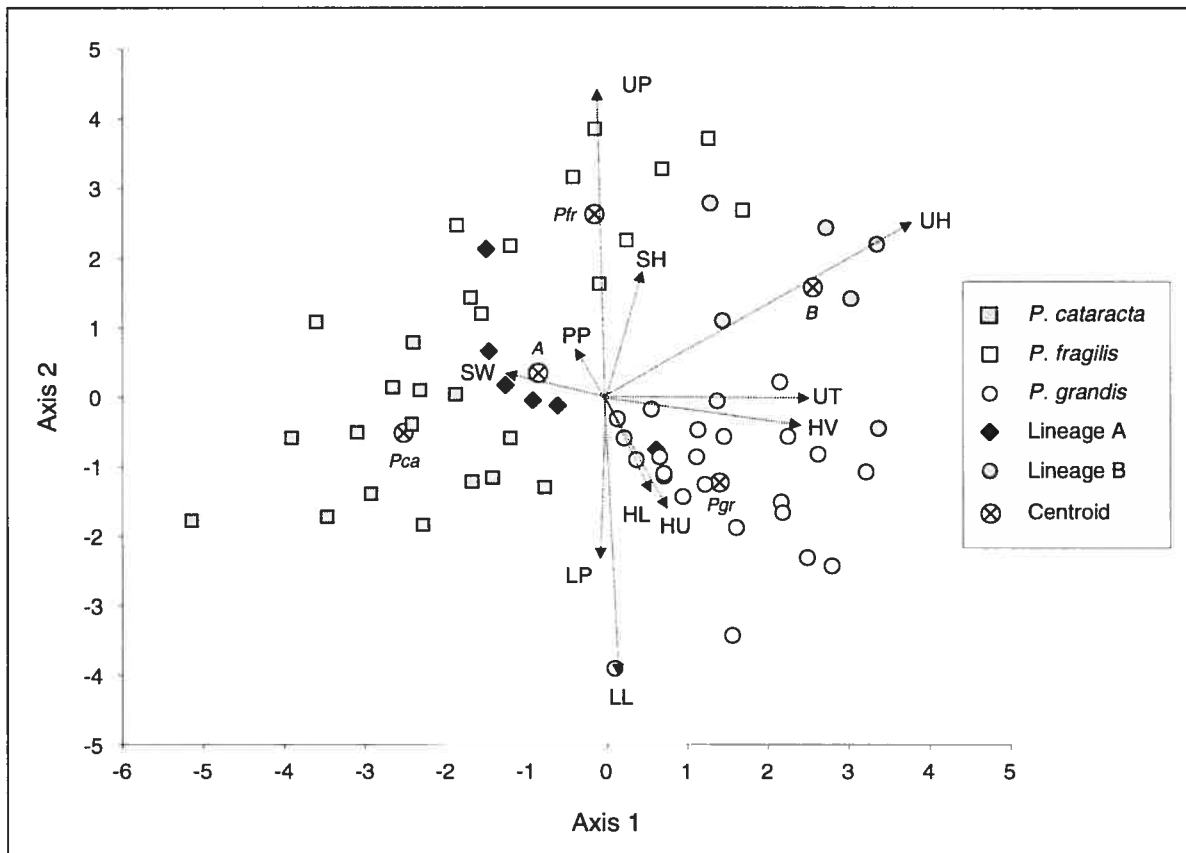


Figure 5: The first two functions of a discriminant analysis, explaining 91.1% of the variability. The points represent individuals of each *Pyganodon* taxa, randomly selected and the centroid of each taxa. The arrows represent conchological descriptors (shell height at ligament (HL); shell height at umbo (HU); height from umbo to ventral line (HV); shell width (SW); distance between umbo and posterior end (UP); distance between point of dorsal curvature and posterior end (PP); distance between the ligament and the point of dorsal curvature (LP); ligament length (LL); height of longest axis (HA); umbo thickness (UT); umbo height (UH)).

Discussion

Genetic markers allowed the identification of *Pyganodon* mussels and the assessment of the relationships among the *Pyganodon* lineages. In addition, the inconsistencies among identifications performed with female, male and nuclear genomes reveal past events of hybridization among some lineages. At the opposite, morphological characteristics, seem only partially revealing and some confusion remain about the morphological identification of the lineages. This confusion could be partly attributable to hybridization phenomena and to the retention of ancestral morphological characteristics.

The divergence and the reproductive isolation between *P. fragilis* and *P. cataracta* have been debated (Kat 1983, 1986, Clarke and Rick 1963). The divergence observed on female mitochondrial genome between those two lineages is very weak and suggests a recent separation. It is, however, noteworthy that the difference between *P. cataracta* and *P. fragilis* is 5.7 times higher at COI gene on male mtDNA than for its counterpart on female mtDNA. While male mtDNA is expected to evolve faster (e.g., Krebs 2004), the divergence among *Pyganodon* lineages observed on the male mitochondrial genome is similar or only slightly higher (from 1 to 1.44%) to the one observed on the female mitochondrial genome. The larger difference between *P. cataracta* and *P. fragilis* may be attributable to past hybridization that may have erased prior divergence of the female mitochondrial genome. However, both lineages exhibit specific female and male mtDNA haplotypes, suggesting absence of current hybridization. Unfortunately, it has not been possible to further assess the extent of hybridization since both *P. cataracta* and *P. fragilis* share the same nuclear alleles at ITS loci. A more intensive survey of the nuclear genome will be required to definitively conclude this debate. Morphological analysis also suggests a recent and possibly incomplete separation between *P. fragilis* and *P. cataracta*. As observed in previous studies (e.g., Hanlon and Smith 1999), morphological identification of *P. fragilis* is often problematic, at least with shell characteristics. According to Clarke (1981), both *P. cataracta* and *P. fragilis* are differentiated by the beak sculpture and the coloration of the periostracum. However, the latest characteristic is plastic with trophic level (Hanlon and Smith 1999), while the beak sculpture is subject to erosion, particularly in old specimen and many intermediates between *P. fragilis* and *P. cataracta* have been found (Clarke 1981).

In agreement with previous studies (Kat 1983, 1986), the divergence between *P. grandis* and the other *Pyganodon* lineages is by far more important. The morphological distinction of *P. grandis* is also more obvious. On the other hand, the subdivision of *P. grandis* into subspecies has never received general acceptance (e.g., Williams et al. 1993, Turgeon et al. 1998). In the present study, no genetic evidence was found that could confirm the presence of *P. simpsonaia* in Quebec as reported by Clarke (1981) (Table 1). *P. simpsonaia* is characterized by the absence of double loop and nodule on beak sculpture. However, in the present study, nodules and double loops are observed on all specimens identified as *P. grandis* (results not shown). Moreover, the specimens sampled in the distribution area of *P. simpsonaia* showed no differences (morphologic or genetic) with the specimens from the distribution area of *P. grandis* (Table 1). Therefore, the subdivision of *P. grandis* into two lineages is doubtful and the variation observed by Clarke (1981) remains to be confirmed.

This genetic survey also reveals the presence of two previously undetected cryptic *Pyganodon* lineages. This is the first mention of *Pyganodon* mussels other than *P. cataracta*, *P. fragilis*, *P. grandis* or *P. simpsonaia* within the Quebec peninsula. The heterozygous composition of lineage A at nuclear loci reveals evidence of hybridization with *P. cataracta* or *P. fragilis*. The presence of both male and female mtDNA genomes specific to lineage A suggests that hybridization is not ongoing but rather ancestral. The resilience of both parental alleles into the nuclear genome of lineage A could be explained by the concerted evolution at rDNA loci (e.g., Parkin and Butlin 2004). The presence of this lineage in distinct sites suggests that hybridization took place before the postglacial colonization. However, a better knowledge of the distribution of the unknown parental lineage is necessary to elucidate this question. Finally, the morphological discriminant functions could only partially distinguish lineage A from other *Pyganodon* lineages (Table 4; Figure 5) and the search of morphological diagnostic characters will also necessitate a larger sampling effort.

The female mitochondrial genome of the lineage B is highly divergent from other *Pyganodon* lineages (Figure 4a) but constitutes the unique genetic signature of this lineage. Male mtDNA as well as nuclear genome appeared to be completely replaced by *P. grandis* material. Moreover, the lineage B is morphologically nearly indiscernible from *P. grandis* (Table 4). The subsistence of female mtDNA is often the unique remains of severe introgression (eg., Bernatchez 1995). The absence of *P. grandis* in sympatry with lineage B suggests that hybridization is likely ancestral and predates postglacial dispersion. However, a more detailed

analysis of the nuclear genome of the lineage B is required to assess whether the nuclear genome is completely introgressed by *P. grandis*.

Post glacial history of colonization

The low genetic diversity detected within each lineage examined in this study suggests that each one of them colonized the Quebec territory from a single glacial refuge. According to Kat (1985, 1986), *P. grandis* and *P. cataracta* originated from the Mississippi watershed and Atlantic slopes respectively. The geographic distribution of both lineages is consistent with this hypothesis. The distribution of *P. fragilis* in Newfoundland (e.g., Clarke and Rick 1963) and Quebec also suggests an Atlantic origin. However, the nearly disjoint distribution with *P. cataracta* suggests they persisted through the last glaciations episode in distinct regions and dispersed via different routes. The dispersal of freshwater mussels mainly occurs at larval stage while the glochidia parasitize host fish (e.g., Kat 1984). *Pyganodon* mussels are known to infect a vast array of host fishes (e.g., Fuller 1974) and may have colonized the territory with numerous hosts. Nevertheless, the distribution of *P. fragilis* and *P. cataracta* can be associated with different fish communities in the Quebec peninsula (Legendre and Legendre 1984). For instance, *P. fragilis* is associated with euryhaline fishes, particularly on Anticosti Island and Newfoundland where no stenohaline fishes occur (Scott and Crossman 1973). Therefore, *P. fragilis* could have colonized these territories from the Atlantic coastal region with a euryhaline fish whereas, *P. cataracta*, likely invaded the previously glaciated area by the Hudson River (Kat 1985, 1986). A close examination of the hosts used by different *Pyganodon* lineages would allow a better understanding of their dispersion.

The distribution of lineages A and B within Quebec is extremely limited and hamper formal assessment of the origin of these taxa. They appear to originate from extremely rare *Pyganodon* lineages that only persist within Quebec as more or less introgressed lineages. Even though the reproductive isolation and fate of these lineages will require further investigations, they represent an important contribution to the *Pyganodon* biodiversity within Quebec. Moreover, the maternal contribution of the lineages A and B have not yet been identified. They may have emerged from the other *Pyganodon* taxa described in North-America, such as *Pyganodon lacustris* (Lea 1857) (Hoeh and Burch 1989) or *Pyganodon gibbosa* (Say 1824) (Johnson 1970) which display a more southern distribution. Alternatively,

they may represent resilient populations of extinct lineages. Since those perspectives lead to contrasting conservation issues, an additional research is required to address these questions.

Acknowledgments

The authors are very grateful to Robert Krebs and one anonymous reviewer for their helpful and constructive comments on the ms. We are in debt to numerous biologists and technicians of the Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec (MNR-F) without whom, this wide survey would not have been possible. We also thank the colleagues of B. Angers' laboratory for their support and advice during this study, with special thanks to Claude Olivier, Sylva Beaudry and Maude Larochelle for their help in the dissection and DNA extraction of the specimens. We are grateful to Jacqueline Madill from the Canadian Museum of Nature (CMN) for her support and to Kathy Klein for her most valuable comments on earlier versions of the ms. Joe Carney (Lakehead University, ON), Judith Rhymer (University of Maine, ME), Don McAlpine (New Brunswick Museum, NB) and Hélène Doucet Beaubré (University of Rimouski, QC) kindly provided tissue samples. This work was supported by a CMN research grant to ALM and a "Fonds Québécois de Recherche en Nature et Technologie" (FQRNT, Quebec) new researchers grant to BA.

3. Discussion

3.1 Distinction génétique et morphologique

La caractérisation génétique des communautés de *Pyganodon* au Québec a permis de valider la plupart des identifications morphologiques réalisées par Clarke (1981). Bien que la subdivision de *P. grandis* en deux sous-espèces ne soit pas supportée par les données génétiques et morphologiques récoltées dans cette étude, la présence de *P. cataracta*, *P. fragilis* et *P. grandis* dans l'est du Canada a correctement été inférée par ce dernier. L'acuité des résultats obtenus par Clarke (1981) est particulièrement impressionnante compte tenu du haut taux d'erreur encouru lors de l'identification morphologique des individus, réalisée dans le cadre de la présente étude.

Cependant, la caractérisation génétique des communautés a permis de révéler la présence de deux lignées de *Pyganodon* non identifiées (lignées A et B), jamais répertoriées sur le territoire québécois. Leur répartition semble limitée à quelques populations au sud-ouest de la province, aussi, dans une optique de conservation, ces lignées pourraient fort bien nécessiter une attention spéciale. De plus, les lignées A et B démontrent une composition génomique hybride avec *P. cataracta* et *P. grandis* respectivement. Aucun individu pur, pour ces lignées, n'a été détecté dans le cadre de la présente étude. Les populations recensées, pour ces deux lignées, semblent plutôt composées des descendants d'un ancien phénomène d'hybridation. La lignée B est uniquement détectée au niveau des mitochondries femelles, les individus recensés sont le produit d'un phénomène d'hybridation et de rétrocroisement avec *P. grandis*. Comme *P. grandis* est absent des lacs où la lignée B est détectée, l'hybridation entre ces deux taxons pourrait ne s'être produite qu'avant leur dispersion sur le territoire québécois. La lignée A, en revanche, est détectée au niveau des trois génomes échantillonnés et se retrouve en sympatrie avec *P. cataracta*. Ainsi, l'hybridation avec *P. cataracta* pourrait être plus récente. Toutefois, la présence de la lignée A dans des sites distincts suggère également que l'hybridation puisse être antérieure à la dispersion sur le territoire québécois.

L'échantillonnage réalisé dans le cadre de la présente étude, portant sur trois génomes et douze caractères morphologiques, a permis de bien caractériser les différences génétiques et morphologiques entre les lignées de *Pyganodon*. La distinction entre *P. fragilis* et *P. cataracta* est controversée (Clarke et Rick 1963, Kat 1983, 1986, Hanlon et Smith 1999). La présente étude révèle que la divergence entre les deux taxons est relativement faible et ce sur les trois génomes échantillonnés. Le temps de divergence entre *P. fragilis* et *P. cataracta*,

peut être estimé de 50 000 à 100 000 ans, à partir du génome mitochondrial femelle et à l'aide d'un taux d'évolution standard de 1% de divergence par million d'année (Birmingham et Avise 1986). Ce qui correspond à la dernière glaciation du Pléistocène. La distinction morphologique entre les deux taxons est aussi très ténue et ambiguë pour nombreux spécimens. Par conséquent, tel qu'il a été constaté par d'autres chercheurs (e.g., Hanlon et Smith 1999), l'identification morphologique de ces deux lignées demeure problématique.

Tel qu'attendu la divergence entre *P. grandis* et le clade formé de *P. cataracta* et *P. fragilis* est plus importante (Kat 1983, 1986); cette divergence pouvant être estimée, à partir du génome mitochondrial femelle, à l'époque du Pliocène, il y a 3,6 million d'années. Conséquemment, la distinction morphologique entre *P. grandis* et le clade formé de *P. cataracta* et *P. fragilis* est également beaucoup moins ambiguë. Enfin, les caractères morphologiques utilisés dans cette étude n'ont permis qu'une faible discrimination des lignées A et B qui peuvent être considérés comme cryptiques.

3.2 Biogéographie des *Pyganodon*

La répartition actuelle de *P. fragilis* est limitée au nord est de l'Amérique du Nord, dans le bassin versant de l'Atlantique. *P. fragilis* se retrouve au Québec, à Terre-Neuve, en Nouvelle Écosse (Clarke et Rick 1963, Kat 1983, 1986) et peut-être au Maine, bien que sa présence, sur ce territoire, soit controversée (Hanlon et Smith 1999). Au Québec, *P. fragilis* se retrouve sur l'île d'Anticosti, au Bas-St-Laurent et dans quelques populations au Saguenay. Ainsi au Québec, la répartition de *P. fragilis* correspond bien à celles de l'Esturgeon noir, de l'Alose savoureuse, du Poulamon atlantique, du Gaspareau, de l'Épinoche quatre épines et du Saumon atlantique (Bernatchez et Giroux 2000), qui sont tous des poissons euryhalins. De plus, *P. fragilis* est la seule lignée de *Pyganodon* retrouvée sur l'île d'Anticosti (cette étude) et sur l'île de Terre-Neuve (Clarke 1981) où aucune espèce de poissons sténohalins ne se retrouve (Scott et Crossman 1964). Ainsi, suite aux dernières glaciations, *P. fragilis* se serait vraisemblablement dispersé à l'aide d'un hôte euryhalin. Le refuge glaciaire le plus près de sa répartition actuelle est le refuge Atlantique acadien soit un archipel d'îles aujourd'hui submergées, localisées au large de Terre-neuve et de la Nouvelle Écosse (Pielou 1991). L'hypothèse de colonisation la plus parcimonieuse veut donc que *P. fragilis* se soit dispersé depuis ce refuge, via le golfe et l'estuaire du St-Laurent, à l'aide d'un hôte euryhalin. Ce corridor d'eau salé constitue une voie de dispersion probable pour les espèces euryhalines,

tolérant de haute teneur en sel (Legendre et Legendre 1984). En revanche, ce chemin semble inusité pour une espèce strictement d'eau douce, telle que *P. fragilis*. Quelques heures après l'attachement à un hôte, la larve de la moule s'enkyste par prolifération des tissus épithéliaux de l'hôte (Kat 1984). Peut-être cette barrière au milieu extérieur est suffisante pour permettre un passage de la larve en eau salé. Alternativement, l'arrivée massive d'eau de fonte des glaciers, au terme de la dernière période glaciaire, aurait pu permettre le passage des espèces sténohalines, via le golfe et l'estuaire du St Laurent. Toutefois, cette hypothèse de vicariance est réfutée par la répartition actuelle des poissons sténohalins (Curry 2007).

Pyganodon cataracta, tout comme *P. fragilis*, se retrouve dans le bassin versant de l'Atlantique, sa répartition, en revanche, est beaucoup plus étendue à l'intérieur du continent (Kat 1985). La répartition actuelle de *P. cataracta* chevauche les anciennes limites du refuge Atlantique localisé, sur le continent, au sud est des Appalaches (Kat 1985). L'hypothèse de colonisation la plus parcimonieuse est donc que *P. cataracta* se soit dispersé depuis ce refuge suite à la dernière glaciation. Au Québec, la répartition de *P. cataracta* est à la fois limitée à l'ouest et à l'est et elle s'étend des Laurentides au Saguenay. *P. cataracta* aurait pu pénétrer sur la péninsule québécoise via la rivière Hudson et le lac Champlain. Ainsi, sa migration au nord aurait pu être retardée par la présence de la mer de Champlain de 12 000 à 10 000 ans AA (Pielou 1991). Alternativement, *P. cataracta* aurait pu parasiter une espèce de poisson euryhalin et migrer au nord plus tôt. Cependant, contrairement à *P. fragilis*, aucune évidence géographique ne permet d'associer de façon certaine *P. cataracta* à un hôte euryhalin.

La divergence récente entre les deux taxons (cette étude) et l'incapacité des *Pyganodon* à sélectionner un hôte particulier (Fuller 1974) laissent présager que des différences quant aux mécanismes de parasitisme n'ont pas eu le temps d'évoluer. Ainsi, un poisson hôte de *P. fragilis* devrait pouvoir servir d'hôte à *P. cataracta* et inversement. Néanmoins, lors de la dernière glaciation, les moules se dispersant à l'aide d'un hôte euryhalin aurait pu coloniser le refuge acadien localisé au large du continent alors que les moules parasitant un hôte sténohalin aurait été confinées au continent. Suite à la fonte des glaciers, de façon similaire, les moules parasitant des hôtes sténohalins et euryhalins respectivement n'auraient pas pu emprunter les mêmes voies de colonisation, ni même coloniser les mêmes territoires. Ainsi cet isolement géographique causé par l'utilisation d'hôtes différents aurait pu conduire à la différenciation observée entre *P. fragilis* et *P. cataracta*. Une meilleure connaissance des

hôtes utilisés par ces deux taxons, cependant, pourrait apporter quelques lumières sur cette hypothèse.

La répartition actuelle de *P. grandis*, au Québec (cette étude) et dans le bassin versant du Mississippi et des Grands lacs (Clarke 1981, Kat 1985) suggère une origine Mississippienne pour ce taxon. Au nord-ouest de la province, la répartition de *P. grandis* correspond bien aux anciennes limites du lac Ojibway Barlow et l'espèce aurait pu bénéficier de cet immense lac proglaciaire comme couloir de dispersion. Outre au nord-ouest de la province, *P. grandis* se retrouve également de part et d'autre du St-Laurent. *Pyganodon grandis* est faiblement réparti au niveau des basses terres du St-Laurent, autrefois submergées par la mer de Champlain. Ceci laisse présager que l'espèce est arrivée relativement tardivement dans cette région, du moins après le retrait de la mer de Champlain 10 000 AA (Pielou 1991) et après *P. cataracta* davantage répandu de part et d'autre du St-Laurent. Les abords du lac Mistassini (localisé au centre de la province) constituent la seule zone de sympatrie détectée entre *P. cataracta* et *P. grandis*, pourtant tous deux largement répandus. Or, dans cette région, la contribution de deux vagues distinctes de colonisation est consistante avec le changement de direction de l'exutoire du lac Mistassini au cours de sa formation. Ce changement a permis, notamment, à deux groupes distincts d'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), de coloniser la région (Fraser et Bernatchez 2005)

Enfin, les deux lignées non identifiées sont probablement arrivées tardivement dans la péninsule québécoise, comme en témoigne leur faible répartition au sud-ouest du Québec. Les individus de la lignée B, sont les descendants de l'hybridation entre *P. grandis* et une seconde lignée inconnue. Comme il a déjà été mentionné, cet événement d'hybridation a probablement précédé la colonisation du territoire par *P. grandis* et la lignée B. Ainsi, cet événement d'hybridation aurait probablement eu lieu dans le refuge Mississippien. En revanche, l'hybridation dont est issue la lignée A (entre *P. cataracta* et une autre lignée inconnue) pourrait être plus récente et elle pourrait ne s'être produit qu'à la suite de la dernière glaciation. Ainsi, l'hybridation détectée ne constitue pas un indice de l'origine glaciaire de la lignée A. Enfin, davantage d'informations sur la répartition actuelle des lignées A et B et sur les phénomènes d'hybridation dont ces lignées sont issues seront nécessaires pour conclure sur leur origine glaciaire.

3.3 Conservation

Au-delà, de la simple volonté de préserver les richesses du monde vivant, la biodiversité au sein des moules d'eau douce devrait être préservée en raison des nombreuses fonctions, assurées par ces dernières au sein des écosystèmes lotiques et lacustres. Parmi les moules d'eau douce, les représentants du genre *Pyganodon* sont très répandus en Amérique du Nord et leur capacité de se maintenir à la surface des sédiments leur confère une certaine résilience vis-à-vis de la pollution et l'introduction de la moule zébrée (Metcalf-Smith et al. 1997). Ainsi, dans les milieux perturbés, les *Pyganodon* sont susceptibles d'assumer plus longtemps leurs fonctions dans l'écosystème. Pour cette raison, la biodiversité des *Pyganodon*, en particulier, devrait apparaître importante.

Comparativement aux lignées A et B, *P. fragilis* est largement répandue sur le territoire québécois. À l'échelle Nord Américaine, en revanche, la répartition de *P. fragilis* semble très limitée. Dès lors, dans une optique de conservation de la biodiversité, *P. fragilis* requiert une attention spéciale. Selon Clarke et Rick (1963), *P. fragilis* serait en mesure de s'hybrider avec *P. cataracta*. Or, la divergence observée au niveau du génome mitochondrial femelle laisse présager un certain degré d'isolement entre les deux lignées, depuis au moins le Pléistocène. Bien que non détectée, l'hybridation actuelle entre les deux taxons demeure probable et un plus vaste échantillonnage du génome nucléaire en zone de sympatrie et en zones allopatriques sera nécessaire pour approfondir cette question. *P. fragilis* est très peu divergent de *P. cataracta*, néanmoins, la distinction entre ces deux taxons est soutenue par leurs répartitions passées (dans deux refuges glaciaires différents), leurs répartitions actuelles et enfin par des associations biologiques différentes. *P. fragilis* est la seule lignée de *Pyganodon* retrouvée sur les îles de Terre-neuve et d'Anticosti et elle semble fortement associée à des espèces de poissons euryhalins. En raison d'une hausse possible du niveau des océans causée par le réchauffement climatique, les populations de *Pyganodon* vivant en association avec des poissons euryhalins pourraient s'avérer les plus résilientes. Dans cette optique la protection de *P. fragilis* devrait être prioritaire.

Au Québec, la répartition des lignées A et B est très restreinte. Les individus identifiés comme appartenant à la lignée A sont les descendants d'un événement d'hybridation avec *P. cataracta*, tandis que les individus identifiés comme appartenant à la lignée B sont les descendants d'un événement d'hybridation avec *P. grandis*. L'identification des autres lignées

parentales impliquées devrait être priorisée, le statut de conservation des populations du Québec découlant directement du statut de conservation de ces lignées parentales. Par exemple, les populations des lignées A et B pourraient représentées des populations satellites d'une espèce répartie plus au sud telle que *Pyganodon lacustris* (Lea 1857) (Hoeh et Burch 1989) ou *Pyganodon gibbosa* (Say 1824) (Johnson 1970). Alternativement, les populations du Québec pourraient représentées des populations rémanentes d'espèces aujourd'hui disparues. Il deviendrait alors prioritaire d'étudier davantage ces lignées afin de mieux connaître leur diversité génétique, la différenciation, la structure, la taille réelle et effective, ainsi que le taux de recrutement de leurs populations. La faisabilité de tout projet de conservation découlant de tous ces paramètres. Néanmoins, en dépit du scénario envisagé, la préservation de la diversité génétique au sein des populations du Québec devrait être considérée comme importante. Enfin, dans un contexte plus large, les bassins versants de la rivière des Outaouais et du St-Laurent abritent tous deux une faune de mollusques (cette étude, Clarke 1981), et de poissons (e.g., Legendre et Legendre 1984) très diversifiée. La préservation des habitats dans ces deux réseaux de drainage particuliers pourrait donc favoriser la protection de nombreux taxons.

3.4 Conclusions

À ce jour, les *Pyganodon* ont principalement été caractérisés à l'aide de caractères de la coquille. Or, dans cette étude, l'utilisation de marqueurs issus de génomes différents a permis une bonne identification des lignées en présence, une estimation valide de leur répartition et enfin une bonne estimation de la divergence et de l'hybridation entre les taxons. Cette étude a permis de révéler la présence de deux lignées de *Pyganodon* jamais répertoriées sur le territoire québécois, ces deux lignées présentant tous deux une composition génétique hybride. De plus cette étude a permis de bien caractériser la divergence génétique et morphologique entre *P. cataracta* et *P. fragilis*, jusqu'alors controversée. Enfin, la présente étude n'a révélé aucune trace d'hybridation actuelle entre les deux taxons bien qu'un échantillonnage plus vaste, notamment du génome nucléaire, sera nécessaire afin de conclure sur ce point.

La présence de deux lignées mitochondriales transmises de manière indépendante constitue un outil intéressant pour détecter les événements d'hybridation passée. Dans cette étude, malgré un échantillonnage très restreint du génome mitochondrial mâle, la présence de deux

lignées mitochondriales s'est avérée fort utile pour déterminer l'intégrité génétique des divers taxons.

L'approche biogéographique préconisée dans le cadre de la présente étude a permis de constater que la répartition actuelle des *Pyganodon* semble tributaire de leurs répartitions lors de la dernière glaciation. Les différents taxons n'ayant pas pu bénéficier des mêmes opportunités de colonisation. En revanche, la répartition de *P. fragilis* semble également découler de la capacité de ce taxon à parasiter des espèces de poissons euryhalins. L'utilisation de poissons hôtes différents pour *P. fragilis* et *P. cataracta*, lors de la dernière glaciation, aurait pu conduire à l'isolement allopatrique entre ces deux taxons et à la divergence observée.

De plus, l'étude de la répartition des *Pyganodon* dans le temps et l'espace a permis d'inférer le statut de conservation des différentes lignées. Ainsi, *P. fragilis* semble abondant dans l'est de la province, cependant, sa faible répartition en Amérique du Nord constitue un argument en faveur de sa conservation. Au contraire de *P. fragilis*, la répartition des lignées A et B est très limitée au Québec et la conservation de la diversité génétique au sein des *Pyganodon* passe par la protection de ces populations très divergentes. Qui plus est, il est primordial d'étudier, dans un avenir rapproché, ces lignées à une plus vaste échelle géographique afin de déterminer leur statut de conservation global.

Enfin, l'utilisation des marqueurs génétiques s'est avérée une méthode très efficace pour caractériser la biodiversité au sein des *Pyganodon*, en révélant, notamment, la présence de lignées cryptiques ayant, à ce jour, échappé aux yeux des observateurs. Un nombre croissant d'études génétiques sont effectuées sur les moules d'eau douce (ordre : *Unionoida*) et la connaissance que nous avons de cette biodiversité pourrait s'en trouver fort bouleversée. En espérant, toutefois, que de meilleures connaissances pourront un jour mener à de meilleures politiques de conservation.

4. Références

- Bailey, R.M. et Smith, G.R. (1981). Origin and geography of the fish fauna of the Laurentian Great Lakes basin. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**, 1539-1561.
- Baker, A.M., Bartlett, C., Bunn, S.E., Goodkamp, K., Sheldon, F. et Hughes, J.M. (2003). Cryptic species and morphological plasticity in long lived bivalves (Unionidea: Hyriidae) from inland Australia. *Mol. Ecol.* **12**, 2707-2717.
- Bauer, G. (1997). Host relationships at reversed generation times: *Margaritifera (Bivalvia)* and *Salmonids*. *Ecol. Stud.* **130**, 69-79.
- Bernatchez, L. (1995). A role for molecular systematics in defining evolutionarily significant units in fishes. *Dans : Evolution and aquatic ecosystem: defining units in population conservation*, pp. 114-132. *Édité par : Nielsen, J.L.*, Am. Fish. Soc. Symp. No. **17**, Bethesda Maryland.
- Bernatchez, L. et Giroux, M. (2000). Les poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'est du Canada. *Édité par : Éditions Broquet*. 350 p.
- Bernatchez, L. et Wilson, C.C. (1998). Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Mol. Ecol.* **7**, 431-452.
- Birmingham, E., et Avise, J.C. (1986). Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics* **113**, 939-965.
- Bogan, A.E. (1993). Freshwater Bivalve Extinctions (*Mollusca: Unionoida*): A Search for Causes. *Amer. Zool.* **33**, 599-609.
- Britton, D.K. et McMahon, R.F. (2005). Analysis of trailered boat traffic and the potential westward spread of zebra mussels across the 100th meridian. *Am. Malacol. Bull.* **20**, 147-159.
- Brown, W.M. (1983). Evolution of animal mitochondrial DNA. *Dans : Evolution of genes and proteins*, p. 62-88. *Édité par : Nei, M. et Koehn, R.K.*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Clarke, A.H. (1981). The freshwater Molluscs of Canada. *Édité par : National Museums of Canada*, Ottawa.
- Clarke, A.H. et Rick, A.M. (1963). Supplementary records of Unionacea from Nova Scotia with a discussion of the diversity of *Anodonta fragilis* Lamarck. *National Museum of Canada Bull.* **199**, 15-27.
- Cox, B.C. et Moore, P.D. (2000). Biogeography: an ecological and evolutionary approach. 6^{ème} édition. *Édité par : Blackwell Sciences*. 298 p.
- Crossman, E.J. et McAllister, D.E. (1986). Zoogeography of freshwater fishes of the Laurentian Great Lakes, the St. Lawrence lowlands, Newfoundland and Labrador. *Dans : The zoogeography of North American freshwater fishes*, p. 105-135. *Édité par : Hocutt, C.H. et Wiley, E.O.*, John Wiley & Sons, New York.
- Curole, J.P. et Kocher, T.D. (2002). Ancient sex-specific extension of the cytochrome c oxidase II gene in Bivalves and the fidelity of doubly-uniparental inheritance. *Mol. Biol. Evol.*, **19**, 1323-1328.

- Curole, J.P. et Kocher, T.D. (2005). Evolution of a unique mitotype-specific protein-coding extension of the cytochrome oxidase II gene in freshwater mussels (*Bivalvia: Unionoidea*). *J. Mol. Evol.* **61**, 381-389.
- Curry, R.A. (2007). Late glacial impacts on dispersal and colonization of Atlantic Canada and Maine by freshwater fishes. *Quaternary Research* **67**, 225-233.
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. Édité par : Murray, J., Londres.
- Dyke, A.S. et Prest, V.K. (1987). Late Wisconsinan and Holocene history of the Laurentide ice sheet. *Géographie Physique et Quaternaire*, **41**, 237-263.
- Felsenstein, J. (2005). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distribué par l'auteur. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fraser, D.J. et Bernatchez, L. (2005) Allopatric origins of sympatric brook charr populations colonization history and admixture. *Mol. Ecol.* **14**, 1497-1509.
- Fuller, S.L.H. (1974). Clams and Mussels (*Mollusca: Bivalvia*). Dans : *Pollution Ecology of freshwater invertebrates*, pp. 215-273. Édité par : Hart, C.W. et Fuller, S.L.H., Academic Press, New York.
- Graf D.L. (2000). The *Etherioidea* revisited: a phylogenetic analysis of hyriid relationships (*Mollusca: Bivalvia: Paleoheterodonta: Unionoidea*). *Occas. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.* **729**, 1-21.
- Graf, D.L. et Foighil, D.Ô. (2000). The evolution of brooding characters among the freshwater pearly mussels (*Bivalvia: Unionoidea*) of North America. *J. Moll. Stud.* **66**, 157-170.
- Haag, W.R., et Warren M.L. Jr. (1998). Role of ecological factors and reproductive strategies in structuring freshwater mussel communities. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**, 297-306.
- Hanlon, S.D. et Smith, D.G. (1999). An attempt to detect *Pyganodon fragilis* (Mollusca: Unionidae) in Maine. *Northeastern Naturalist* **6**(2), 119-132.
- Hanson, J.M., Mackay, W.C. et Prepas, E.E. (1989). Effect of size selective predation by muskrats (*Ondatra zebithicus*) on a population of unionid clams (*Anodonta grandis simpsonaia*). *J. Anim. Ecol.* **58**, 15-28.
- Hebert, P.D.N., Muncaster, B.W. et Mackie, G.L. (1989). Ecological studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a new mollusc in the Great Lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **46**, 1587-1591.
- Hillis, D.M. et Bull, J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**(2), 182-192.
- Hoeh, W.R. (1990). Phylogenetic relationships among eastern North American *Anodonta* (*Bivalvia : Unionidae*). *Malacol. Rev.* **23**, 63-82.
- Hoeh, W.R., Stewart, D.T., Saavedra, C., Sutherland, B.W. et Zouros E. (1997). Phylogenetic evidence for role-reversals of gender-associated mitochondrial DNA in *Mytilus* (*Bivalvia : Mytilidae*). *Mol. Biol. Evol.* **14**(9), 959-967.
- Hoeh, W.R., Stewart, D.T. et Guttman, S.I. (2002). High fidelity of mitochondrial genome transmission under the doubly uniparental mode of inheritance in freshwater mussels (*Bivalvia: Unionoidea*). *Evolution.* **56**(11), 2252-2261.

- Hoggarth, M.A. (1992). An examination of the glochidia-host relationships reported in the literature for North American species of *Unionacea* (*Mollusca-Bivalvia*). *Malacol. Data Net* **3**, 1-30.
- Jansen, W.A., et Hanson, J.M. (1991). Estimates of the number of glochidia produced by clams (*Anodonta grandis simpsoniana* Lea), attaching to yellow perch (*Perca flavescens*), and surviving to various ages in Narrow Lake, Alberta. *Can. J. zool.* **69**, 973-977.
- Johnson, R.I. (1970). The systematic and zoogeography of the *Unionidae* (*Mollusca: Bivalvia*) of the southern Atlantic slope region. *Bull. Mus. Comp. Zool.* **140**, 263-449.
- Kat, P.W. (1983). Genetic and morphological divergence among nominal species of North American *Anodonta* (*Bivalvia: Unionidae*). *Malacologia*. **23**, 361-374.
- Kat, P.W. (1984). Parasitism and the *Unionacea* (*Bivalvia*). *Biol. Rev.* **59**, 189-207.
- Kat, P.W. (1985). Historical evidence for fluctuation in levels of hybridization. *Evolution* **39**, 1164-1169.
- Kat, P.W. (1986). Hybridization in a Unionid faunal suture zone. *Malacologia* **27**, 107-125.
- Kimura, M. (1983) The neutral theory of molecular evolution *Dans : Evolution of genes and proteins.* p. 208-233. *Édité par* : Nei, M. et Koehn, R.K., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- King, T.L., Eackles, M.S., Gjetvaj, B. et Hoeh, W.R. (1999). Intraspecific phylogeography of *Lasmigona subviridis* (*Bivalvia: Unionidae*) conservation implications of range discontinuity. *Mol. Ecol.* **8**, S65-S78.
- Krebs, R.A. (2004). Combining paternally and maternally inherited mitochondrial DNA for analysis of population structure in mussels. *Mol. Ecol.* **13**, 1701-1705.
- Lachenbruch, P.A., et Mickey, M.R. (1968). Estimation of error rates in discriminant analysis. *Technometrics*, **10**, 1-11.
- Legendre, P. et Legendre, V. (1984). Postglacial dispersal of freshwater fishes in the Quebec Peninsula. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **41**, 1781-1803.
- Liu, H.P., Mitton, J.B., et Wu, S.K. (1996). Paternal mitochondrial DNA differentiation far exceeds maternal mitochondrial DNA and allozyme differentiation in the freshwater mussel, *Anodonta grandis grandis*. *Evolution* **50**, 952-957.
- Lydeard, C., Cowie, R.H., Ponder, W.F., Bogan, A.E., Bouchet, P., Clark, S.A., Cummings, K.S., Frest, T.J., Gargominy, O., Herbert, D.G., Hershler, R., Perez, K.E., Roth, B., Seddon, M., Strong, E.E., et Thompson, F.G. (2004). The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*, **54**, 321-330.
- Lydeard, C., Mulvey, M. et Davis, G.M. (1996). Molecular systematics and evolution of reproductive traits of North American freshwater *unionacean* mussels (*Mollusca: Bivalvia*) as inferred from 16S rRNA gene sequences. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **351**, 1593-1603.
- Mandrack, N.E. et Crossman, E.J. (1992). Postglacial dispersal of freshwater fishes into Ontario. *Can. J. Zool.* **70**, 2247-2259.
- Mayr, E. (1963). *Animal Species and Evolution.* *Édité par* : Cambridge, Harvard University Press, Massachusetts.

- McMahon, R.F., et Bogan, A.E. (1991). *Mollusca: Bivalvia*. Dans Ecology and classification of North American invertebrates, pp. 315-399. Édité par : Thorp, J.H et Covich, A.P., Academic Press inc., New-York.
- Metcalf-Smith, J.L., Staton, S.K., Mackie, G.L. et Lane, N.M. (1997). Biodiversity of freshwater mussels in the lower Great Lakes drainage basin. Ecological monitoring and assessment network (EMAN), 3rd national meeting, Saskatoon, Saskatchewan. 23 p.
- Mulvey, M., Lydeard, C., Pyer, D.L., Hicks, K.M, Brim-Box, J., Williams, J.D. et Butler, R.S. 1997. Conservation genetics of North American freshwater mussels *Amblema* and *Megaloniaia*s. *Conserv. Biol.* **11**, 868-878.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H. et Sckiya, T. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**, 874-879.
- Page, R. D. M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *CABIOS*, **12**, 357-358.
- Paquet, A., Picard, I., Caron, F. et Rioux, S. (2005). Les mulettes au Québec. *Le naturaliste canadien* **129**, 78-85.
- Parkin, E.J., et Butlin, R.K. (2004). Within and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1595-1601.
- Pielou, E.C. (1991). *After the Ice Age: the return of life to glaciated North America*. Édité par : University of Chicago Press, Chicago. 366 p.
- Primack, R.B. (2004). *A primer of conservation biology*. 3^{ème} édition. Édité par : Sinauer Associates, Inc. 320 p.
- Pullin, A.S. (2002). *Conservation biology*. Édité par : Cambridge University Press. 345 p.
- Quesada, H., Warren, M. et Skibinski, D.O.F. (1998). Nonneutral evolution and differential mutation rate of gender-associated mitochondrial DNA lineages in the marine mussel *Mytilus*. *Genetics* **149**, 1511-1526.
- Roe, K.J. et Lydeard, C. (1998). Species delineation and the identification of evolutionarily significant units: lessons from the freshwater mussel genus *Potamilus* (*Bivalvia: Unionidae*). *J. Shellfish Res.* **19**, 1359-1363.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., et Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^{ème} édition. Édité par : Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scott, W.B. et Crossman, E.J. (1973). *Freshwater fishes of Canada*. Bull. Fish. Res. Board Can. No. 184.
- Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.E., Sandstrom, D.W., et Stone, E.W. 1993. The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* **16**: 325-332.
- Skibinsky, D.O.F., Gallagher, C. et Beynon, C.M. (1994). Sex-limited mitochondrial DNA

transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics*, **138**, 801-809.

Stewart, D.T., Kenchington, E.R., Singh, R.K. et Zouros, E. (1996). Degree of selective constraint as an explanation of the different rates of evolution of gender-specific mitochondrial DNA lineages in the mussel *Mytilus*. *Genetics* **143**, 1349-1357.

Strayer, D.L., Caraco, N.F., Cole, J.J., Findlay, S. et Pace, M.L. (1999). Transformation of Freshwater Ecosystems by Bivalves *BioScience* **49**, 19-27.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., et Gibson, T.G. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**(22), 4673-4680.

Trdan, R.J. (1981). Reproductive biology of *Lampsilis radiata siliquoidea* (Pelecypoda: Unionidae). *Am. Midl. Nat.* **106**(2), 243-248.

Trdan, R.J., et Hoeh, W.R. (1982). Eurytopic host use by two congeneric species of freshwater mussel (*Pelecypoda : Unionidae : Anodonta*). *Am. Midl. Nat.* **108**(2), 382-388.

Turgeon, D.D., Bogan, A.E., Coan, E.V., Emerson, W.K., Lyons, W.G., Pratt, W.L., Roper, C.F.E., Scheltema, A., Thompson, F.G., et Williams, J.D. (1988). Common and scientific names of aquatic invertebrates from the United States and Canada: Mollusks. *American Fisheries Society Special Publ.* **16**, 277 p.

Vaughn, C.C et Hakenkamp, C.C. (2001). The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems *Freshwater Biology* **46** (11), 1431-1446.

Watters, G.T. (1992). Unionids, fishes, and the species-area curve. *J. biogeogr.* **19**, 481-490.

Watters, G.T. (1994). An annotated bibliography of the reproduction and propagation of the *Unionoidea* (primarily of North America). *Ohio biological survey Miscellaneous Contributions No. 1*, Columbus, Ohio. 142 p.

Watters, G.T., et O'Dee, S.H. (2000). Glochidial release as a function of water temperature : beyond bradyticty and tachyticty. *Ohio biological survey. Proceeding of the conservation, captive care, and propagation of freshwater mussel symposium, 1998*, p. 135-140.

Williams, J.D., Warren, M.L., Cummings, K.S., Harris, J.L. et Neves, R.J. (1993). Conservation status of freshwater mussels of the United States and Canada. *Fisheries* **18**, 6-22.

Wilson, C.C. et Hebert, P.D.N. (1998). Phylogeography and postglacial dispersal of lake trout (*Salvelinus namaychush*) in North America. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**, 1010-1024.

Zouros, E., Ball, A.O. Saavedra, C. et Freeman, K.R. (1994). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7463-7467.

Zouros, E., Freeman, K.R., Ball, V., et Pogson, G.H. (1992). Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* **359**, 412-414.

5. Annexes

D)		1	1	1	2	2	3	3	3	3	5	
		9	1	2	4	2	2	0	0	3	8	2
		1	9	8	6	1	9	4	5	9	3	3
ca (ME)	C	-	-	A	A	G	G	C	C	C	T	
ca	-	-	-	G	A	
fr (NF)	-	-	-	G	A	
fr	-	-	-	G	A	
qr(Mn)	A	-	-	G	A	-	-	-	-	-	T	A
qr	A	-	-	G	G	A	-	-	-	-	T	A
A-1	-	-	-	G	A	
A-2	-	T	G	G	.	.	.	T	T	.	A	
B	A	-	-	G	G	A	-	-	-	-	A	

E)		1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	
		6	7	4	4	4	4	5	5	5	5	5	7	3	3	3	5	6	8	8
		5	5	1	2	3	4	4	6	7	8	9	7	2	3	4	6	1	1	2
ca (ME)	A	T	G	C	A	C	C	T	-	-	-	-	T	C	T	A	T	-	-	
ca
fr (NF)
fr
qr(Mn)	.	C	A	G	C	A	A	A	C	C	G	T	-	-	G	-	G	A	A	
qr	.	C	A	G	C	A	A	A	C	C	G	T	-	-	G	-	G	A	A	
A-1
A-2	G	A	A	
B	.	C	A	G	C	A	A	A	C	C	G	T	-	-	G	-	G	A	A	

Figure A1: Variable sites for each sampled loci. Haplotypes of COI (A) and 16S (B) female mtDNA. Haplotypes of COII and COI male mtDNA (C). Alleles of ITS 1 (D) and ITS 2 (E) from the nuclear genome. Indels are indicated by (-). Haplotypes of female mtDNA and nuclear alleles are compared to references individuals (see text for details) Male mtDNA sequences are compared to sequences found on gene bank: *P. grandis* (AF406801.1) and *P. fragilis* (AF406800.1).

