

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
FRÉDÉRIQUE BÉLANGER-LÉPINE

CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES PERCHAUDES (*PERCA FLAVESCENS*)
DU LAC SAINT-PIERRE AVEC L'ESPACEUR INTERGÉNIQUE (IGS) DE
L'ADN RIBOSOMAL ET SA RELATION AVEC LA CROISSANCE

JANVIER 2015

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

*« Rien de grand ne s'est accompli dans le
monde sans passion »*

Hegel

REMERCIEMENTS

Mille mercis à ma directrice, Hélène Glémet, qui, dès le début, a fait preuve d'un haut niveau de confiance en me soumettant un défi de taille. Sa disponibilité et ses judicieux conseils, au cours de ces deux années, doivent être soulignés. Je remercie mon codirecteur de recherche, Bernard Angers, pour son aide, son support, son encadrement, sa disponibilité, son partage de connaissance et pour sa patience. Merci aux deux autres membres de mon comité d'orientation Pierre Magnan et Andrea Bertolo pour leurs expertises et leurs précieux conseils.

Un merci spécial va à ma collègue et grande amie, Laurianne Bonin, qui en plus de son support, m'a donné énormément de son temps que ce soit pour de l'aide en laboratoire ou pour la rédaction. Je remercie également Dave Gadbois-Côté, collègue et ami, pour son soutien et pour les nombreuses rigolades qu'on a eues. Gros mercis à la gang du laboratoire de Bernard Angers de l'Université de Montréal pour leur accueil et spécialement Phillippe Lamarre et Christelle Leung pour leur immense aide et pour toutes les réponses apportées à mes nombreuses questions. Je tiens également à souligner le soutien de mes amis et collègues, soit Mélissa Lemire-Lamothe, Justine Giroux, Nathalie Bourdeau, Raphaëlle Landry ainsi que tous ceux et celles que j'ai côtoyés durant ma maîtrise.

En terminant, je ne peux passer sous silence le soutien de ma famille. Je remercie tout d'abord mes parents pour leur support, leurs encouragements et toute la fierté qu'ils me portent et ce, depuis toujours. Je remercie également mon copain pour sa patience et son support. Finalement, je remercie ma grand-mère, qui est malheureusement partie trop tôt. Malgré le fait qu'elle n'ait pas pu voir le résultat final de mon projet de recherche, j'ai senti la force, le support et la fierté qu'elle m'a insufflés afin de compléter cette maîtrise.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire de maîtrise est le fruit de mes travaux de recherche effectués pendant deux ans, de septembre 2012 à mai 2014, sous la direction d'Hélène Glémet de l'Université du Québec à Trois-Rivières et sous la co-direction de Bernard Angers de l'Université de Montréal. Ce mémoire comporte trois principaux chapitres. Le premier chapitre est un résumé substantiel en français divisé en trois sections, soit l'introduction, la problématique et les objectifs. Le deuxième chapitre est l'article scientifique en anglais intitulé : « *Balancing selection in natural populations : the case of ribosomal RNA intergenic spacer in yellow perch (*Perca flavescens*)* ». Cet article sera soumis au journal scientifique *Molecular Ecology*. Finalement, le troisième chapitre est une conclusion générale de ce mémoire et se compose de deux sections, soit les principaux résultats et une conclusion.

RÉSUMÉ

L'espaceur intergénique (IGS) de l'ADN ribosomal est associé à la transcription des gènes d'ARNr. Chez les invertébrés, l'hétérogénéité de la longueur de l'IGS causée par la variation du nombre de copies d'éléments de régulation serait liée à la croissance des organismes. Une étude antérieure effectuée sur l'IGS de la perchaude (*Perca flavescens*) au lac Saint-Pierre (LSP), a révélé la présence de deux allèles qui diffèrent par 1 kb due à la variation du nombre d'unités de répétition. Ceci fournit une occasion unique d'évaluer si cette hétérogénéité au niveau de la longueur de l'IGS est associée à la sélection et pourrait s'exercer dans les populations naturelles. L'objectif de cette étude était double. Le premier objectif était de déterminer si ces allèles sont soumis à une sélection génotypique tout en regardant, si la sélection s'exerce, ce qui se passe au niveau spatial et ontogénique. Le deuxième objectif était de déterminer si la longueur de l'IGS est liée à la croissance des individus, comme ce qui a été observé chez les invertébrés. Ce projet a été réalisé sur 353 perchaudes provenant de cinq populations naturelles différentes, soit celle du LSP ainsi que celles provenant de quatre autres lacs se trouvant à la limite du Bouclier canadien et des Basses terres du Saint-Laurent. Les résultats n'ont révélé aucun excès d'hétérozygote par rapport à un modèle de neutralité et il n'y avait aucune relation significative entre la longueur des IGS et la croissance à court terme des organismes. De plus, aucune sélection ne s'effectuait au niveau spatial et ontogénique. Par contre, les deux allèles (4 et 22) étaient toujours présents et dans les mêmes fréquences entre les populations échantillonnées. La valeur du F_{ST} effectué sur l'IGS pour quantifier la différenciation génétique entre les différentes populations de perchaudes n'était pas significativement différente de zéro, contrairement à la valeur du F_{ST} effectué à partir des marqueurs neutres, les microsatellites ($p = 0,1665$). Ces résultats suggèrent qu'il s'agit d'un premier cas de sélection balancée qui agit sur une région régulatrice plutôt que sur une région codante. Par ailleurs, il s'agit d'une première démonstration de sélection balancée dans des populations naturelles et qui agit sur une région régulatrice, comme l'IGS.

Mots-clés : Perchaudes (*Perca flavescens*), sélection balancée, espaceur intergénique (IGS), lac Saint-Pierre (LSP), croissance.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-------------|
| REMERCIEMENTS | iii |
| AVANT-PROPOS | iv |
| RÉSUMÉ | v |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES | viii |
| CHAPITRE I | |
| RÉSUMÉ SUBSTANTIEL | 1 |
| 1.1 Introduction | 1 |
| 1.1.1 Mise en contexte | 1 |
| 1.1.2 Importance de la croissance pour la valeur sélective | 2 |
| 1.1.3 Détermination de la croissance | 3 |
| 1.1.3.1 Facteurs environnementaux | 3 |
| 1.1.3.2 Base génétique | 4 |
| 1.1.4 Espaceur intergénique (IGS) | 6 |
| 1.1.4.1 Aspects structurel et fonctionnel | 6 |
| 1.1.4.2 IGS de la perchaude | 9 |
| 1.1.5 Lac Saint-Pierre | 9 |
| 1.1.5.1 Croissance des perchaudes au lac Saint-Pierre | 10 |
| 1.1.6 Biologie de l'espèce (<i>Perca flavescens</i>) | 12 |
| 1.1.7 Structure génétique des perchaudes | 15 |
| 1.1.7.1 Population de perchaudes du fleuve Saint-Laurent et au LSP .. | 15 |
| 1.1.8 Facteurs susceptibles de structurer les populations | 16 |
| 1.1.8.1 Sélection naturelle | 16 |
| 1.2 Problématique | 17 |
| 1.3 Objectifs | 19 |
| 1.3.1 Objectif général | 19 |
| 1.3.2 Objectifs spécifiques | 19 |

| | |
|---|-----------|
| CHAPITRE II | |
| BALANCING SELECTION IN NATURAL POPULATIONS: THE CASE OF RIBOSOMAL RNA INTERGENIC SPACER IN YELLOW PERCH (<i>PERCA FLAVESCENS</i>)..... | 21 |
| Abstract | 22 |
| Introduction | 23 |
| Materials and Methods..... | 24 |
| Results | 28 |
| Discussion | 30 |
| Acknowledgements | 31 |
| References | 32 |
| Figure legends | 35 |
| Tables | 36 |
| Figures..... | 39 |
| CHAPITRE III | |
| CONCLUSION GÉNÉRALE | 42 |
| 3.1 Principaux résultats | 42 |
| 3.2 Conclusion..... | 47 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 49 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

| | |
|-----------------|---|
| A | Allèle |
| ADH | Alcohol dehydrogenase |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AFLP | Amplified fragment length polymorphism |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| ARNt | ARN de transfert |
| ARNr | ADN ribosomal |
| dNTP | Deoxynucleotide triphosphates |
| F _{ST} | Indice de diversité inter-population |
| HWE | Équilibre Hardy-Weinberg / Hardy-Weinberg equilibrium |
| IGS | Espaceur intergénique / intergenic spacer |
| ITS | Internal transcribed spacer |
| Kb | Kilobase |
| LSP | Lac Saint-Pierre / Lake Saint-Pierre |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| MENR | Ministry of Energy and Natural Resources |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| S | Unité Svedberg |
| ω | Valeur sélective |

CHAPITRE I

RÉSUMÉ SUBSTANTIEL

1.1 Introduction

1.1.1 Mise en contexte

La croissance est un processus fondamental et crucial pour la reproduction et la survie des organismes. Dans les écosystèmes aquatiques, les organismes affichent une grande variation du taux de croissance, ce dernier étant influencé à la fois par des facteurs environnementaux et par des mécanismes génétiques (McDowall 1994). Chez les poissons, la relation entre les taux de croissance et les facteurs environnementaux a été abondamment examinée en milieu naturel. Il en ressort que la température et la disponibilité de la nourriture, qui déterminent le taux métabolique et la quantité d'énergie par nutriments respectivement, sont deux facteurs particulièrement importants chez les larves (Graeb et al. 2004; Tardif et al. 2005). Ces facteurs déterminent le taux de croissance des individus qui, à son tour, influence fortement leur survie (McDowall 1994). À la base de la capacité de croissance, les mécanismes génétiques sont, quant à eux, peu étudiés et beaucoup moins compris. En effet, plusieurs facteurs génétiques peuvent influencer la croissance des individus. Dans cette étude, l'emphase sera mise sur la variation génétique impliquée dans la fabrication des ribosomes qui affecte directement la croissance des individus.

Au niveau du génome nucléaire chez les eucaryotes, les gènes de l'ARN ribosomal se retrouvent en unité de répétition. Les gènes des ribosomes, 18S, 5.8S et 28S, constituent une unité et se comptent en milliers de copies, toutes identiques et qui se suivent une à la suite de l'autre. Ces unités de répétition sont séparées par des espaceurs intergéniques, les IGS. Les IGS contiennent plusieurs éléments de régulation pour terminer la transcription du gène d'avant et pour débiter celle du gène suivant,

comme des promoteurs, des amplificateurs et des terminateurs qui contiennent à leur tour de courtes unités répétitives. L'IGS est donc responsable de la transcription des gènes ribosomaux en ARN ribosomaux. Lors de la synthèse protéique, la quantité de ribosomes peut être modulée selon les besoins pour la croissance. Comme l'IGS est responsable de la transcription de l'ADNr en ARNr, il joue un rôle central dans la régulation des ribosomes lors de la croissance.

1.1.2 Importance de la croissance pour la valeur sélective

La valeur sélective (valeur adaptative) est un concept central dans la théorie de l'évolution. Elle dépend à la fois de la survie d'un organisme entre le stade zygote et le stade adulte et de sa fécondité (nombre de descendants viables, capables de se reproduire). La valeur sélective d'un génotype correspond donc au nombre de descendants viables et fertiles, que laisse ce génotype, à la génération suivante (Shaw et al. 2008).

La croissance est un trait de vie important au niveau de la valeur sélective en influençant à la fois la survie des larves et la fécondité des adultes. Chez les poissons, le recrutement des larves à des classes d'âge supérieures, est dépendant de l'atteinte d'une taille optimum. En effet, Post et Evans (1989) ont montré que les individus de petite taille, dans une cohorte de juvéniles, étaient plus exposés à la mortalité en raison de la prédation sélective que les individus de plus grande taille. La croissance et la taille atteintes par ces derniers étaient ainsi optimales pour leur survie, les permettant de passer à travers leur premier hiver et minimiser le risque de prédation (Post et Evans 1989). Par ailleurs, au cours de leur vie, les poissons suivent généralement deux stratégies de croissance. Au début de leur vie, les ressources vont servir presque exclusivement à la croissance et ce, jusqu'à la maturité (Kozłowski 1996 ; Heino et Kaitala 1999). Par la suite, les ressources acquises vont être acheminées pour la reproduction ce qui va ralentir la croissance (Kozłowski 1996 ; Heino et Kaitala 1999). En effet, Flokvord et al. (2014) ont montré que les morues (*Gadus morhua*) qui atteignent la maturité sexuelle plus rapidement sont de plus grande taille à trois ans que les poissons immatures. Par contre, le début de la reproduction ralentit leur croissance

par rapport à celle des individus immatures. De plus, il a aussi été démontré que de retarder le moment de la reproduction peut constituer une stratégie d'adaptation favorisant la fécondité au sein des populations et même entre les espèces (Rideout et al. 2005 ; Jørgensen et al. 2006 ; Rideout et Tomkiewicz 2011; Flokvord et al. 2014 ;). Le fait de retarder le moment de la reproduction peut procurer deux avantages aux individus qui optent pour cette stratégie. Tout d'abord, ces individus posséderont de plus grandes réserves d'énergie et les jeunes femelles pourront investir davantage dans la croissance, leur permettant une plus grande fécondité future (Rideout et al. 2005; Jørgensen et al. 2006; Flokvord et al. 2014). Deuxièmement, il a été démontré que les femelles morue de 6 et 7 ans qui sautent une année de frai, vont croître significativement plus durant cette année-là que les femelles qui vont frayer deux années consécutives (Flokvard et al. 2014). Il est donc important pour un individu de posséder un génotype avantage par la sélection, puisqu'il laissera davantage de descendants avec ce génotype et pourra permettre une adaptation locale de la population.

1.1.3 Détermination de la croissance

1.1.3.1 Facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux, tel que la température de l'eau (Beitinger et al. 1999), la disponibilité et la qualité de la nourriture (Graeb et al. 2004), la photopériode (Huh et al. 1976), la vitesse de courant (Fortin et Magnin 1972) et la prédation (Bertolo et Magnan 2005) peuvent influencer la croissance des poissons. La température de l'eau et la disponibilité alimentaire sont connues pour être les deux facteurs les plus importants au niveau de l'influence du taux de croissance chez les poissons.

La température de l'eau affecte les processus biochimiques, physiologiques et les activités reliées au cycle de vie des poissons (Beitinger et al. 1999). En effet, la température de l'eau peut influencer la croissance en accélérant la production cellulaire de l'organisme. Plus indirectement, elle peut accélérer la digestion des proies, ce qui entraîne une augmentation de la prise de nourriture, donc la croissance (Buckley et al.

1999). Par ailleurs, Malzhan et al. (2003) ont montré que des températures plus élevées de l'eau favorisaient la croissance des larves, ce qui devenait un avantage pour fuir les prédateurs et pour survivre au premier hiver.

Pendant la phase larvaire, la croissance, la survie et le recrutement des poissons dépendent fortement de la disponibilité et de la qualité de la nourriture (Graeb et al. 2004). En effet, Graeb et al. (2004) ont étudié les différents types de zooplancton qui peuvent affecter la croissance, la survie et la sélection des proies, chez des larves de perchaudes (*Perca flavescens*), dans une série d'expériences effectuées en laboratoire. Les résultats de cette étude ont montré que la croissance et la survie des larves de perchaudes de 5 à 12 mm étaient plus importantes quand elles se nourrissaient de nauplii et de copépodes. En revanche, les taux de croissance et de survie étaient plus élevés chez les larves de perchaudes de plus de 12 mm, lorsque ces dernières se nourrissaient de copépodes et de petits cladocères. Le changement de nourriture, selon le stade de développement larvaire peut s'expliquer par différentes raisons. Tout d'abord, l'efficacité de capture des cladocères est plus élevée chez les larves de plus de 12 mm, puisque leur acuité visuelle est beaucoup plus développée que chez les larves de moins de 12 mm (Wahl et al. 1993). De plus, la digestibilité des cladocères peut être inférieure à celle des copépodes (Confer et Lake 1987). Donc selon le stade de développement larvaire, il y a des proies qui ont une meilleure qualité nutritionnelle et qui leur permettent d'atteindre de meilleurs taux de croissance et de survie. L'absence de certains types de zooplancton peut mettre en péril la survie de certaines larves, mais en avantager une autre classe par la présence abondante de cladocères, par exemple.

1.1.3.2 Base génétique

Métabolisme et synthèse des protéines

En plus des facteurs environnementaux qui influencent la croissance, il y a aussi des facteurs génétiques sous-jacents au métabolisme et à la synthèse des protéines. La croissance des organismes repose sur la synthèse des protéines qui est très bien documentée dans la littérature (Campbell et Reece 2007 ; Griffiths et al. 2010). La

synthèse des protéines se fait via un processus cellulaire qui implique d'abord l'expression des gènes où l'ADN est transcrit en ARN messager (ARNm) qui sera alors traduit en protéines, au niveau des ribosomes. Ces derniers sont les sites de la synthèse protéique. Ainsi, les ribosomes sont considérés comme les unités limitantes de la synthèse protéique. Leur régulation, c'est-à-dire leur propre fabrication en termes de quantité est donc primordiale pour la croissance des organismes.

La structure des organismes ainsi que leurs processus physiologiques actifs reposent principalement sur les protéines. Ces dernières influencent aussi fortement la forme, la couleur, la taille et le comportement des organismes. Par ailleurs, l'ADN contient l'information génétique nécessaire à la synthèse des protéines par les cellules.

Pour que la transcription ait lieu, trois étapes sont nécessaires : l'amorçage (initiation), l'élongation et la terminaison. La transcription est un processus complexe chez les eucaryotes, car leur génome est grand et ils possèdent un nombre très élevé de gènes (des dizaines de milliers) qui doivent être reconnus et transcrits. Chez les eucaryotes, la transcription a lieu dans le noyau et la traduction dans le cytoplasme. L'ARNm est donc synthétisé dans le noyau, qui contient l'ADN, et doit, par la suite, être exporté hors du noyau afin de se rendre dans le cytoplasme pour y être traduit. Avant que l'ARNm quitte le noyau, il doit être modifié de plusieurs façons différentes (maturation de l'ARN). Lorsqu'un transcrit primaire a subi une maturation complète et est devenu une molécule d'ARN mature, la traduction en protéine peut avoir lieu.

Chez tous les organismes, le ribosome est constitué d'une petite et d'une grande sous-unité qui forment ensemble de gros complexes macromoléculaires. Chaque sous-unité est formée d'ARNr (28S, 18S et 5.8S) et peut contenir jusqu'à 50 protéines supplémentaires. Les sous-unités du ribosome ont été caractérisées par leur vitesse de sédimentation au cours d'une ultracentrifugation, ce qui donne une idée de leur taille moléculaire. Leurs noms correspondent donc à leur coefficient de sédimentation en unités Svedberg (S). Chez les eucaryotes, la petite et la grande sous-unité sont appelées respectivement 40S et 60S et elles s'associent en un complexe de 80S.

Par ailleurs, il existe d'autres classes d'ARN fonctionnels qui sont importants dans la synthèse protéique, les ARN de transferts (ARNt) et les ARN ribosomiaux (ARNr), mentionnés ci-haut. Les ARNt font la charnière entre l'ARNm et les protéines.

Les ARNr sont les principaux constituants des ribosomes, ces derniers assemblent les acides aminés afin de former les protéines dont la séquence est codée par un ARNm spécifique. La synthèse protéique a lieu lorsque les molécules d'ARNt et d'ARNm s'associent avec des ribosomes.

1.1.4 Espaceur intergénique (IGS)

1.1.4.1 Aspects structurel et fonctionnel

Au niveau du génome nucléaire, chez les eucaryotes, les gènes de l'ARNr, le 28 S, 18S et 5.8S constituent un opéron et se retrouvent en multiples copies répétées sur l'ADN ribosomal (ADNr). Ces gènes répétés sont séparés les uns des autres par un espaceur intergénique (IGS). L'IGS (Figure 1.1) possède plusieurs éléments de régulation, tel que des promoteurs, des amplificateurs et des terminateurs qui contiennent à leur tour de courtes unités répétitives (Weider et al. 2005). Ces éléments de régulation sont impliqués au niveau du contrôle de la transcription de l'ADNr (Alvares et al. 1998). En effet, l'efficacité de la transcription peut être influencée par les différents éléments de régulation. Tout d'abord, les promoteurs, qui sont situés en amont du site de démarrage, sont essentiels à la transcription de l'ADN en ARNm. En effet, c'est au niveau du promoteur que se fixe l'ARN polymérase juste avant le démarrage de la synthèse de l'ARNm. Pour leur part, les amplificateurs servent à fixer des protéines ce qui stimule la transcription d'un gène. Finalement, les terminateurs marquent la fin de la transcription d'un gène en ARN messager. Ces éléments de régulation permettent donc de réguler le taux de transcription et, par conséquent, le taux de croissance. Plus le nombre de ces éléments est élevé, plus le potentiel de régulation augmente, permettant ainsi de supporter un niveau de transcription et de production suffisante de ribosomes pour une croissance rapide (Alvares et al. 1998).

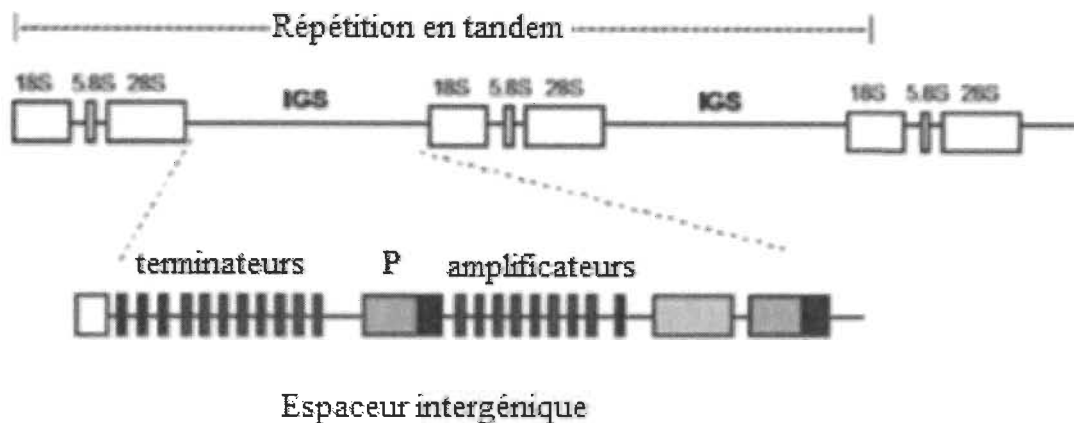


Figure 1.1 Arrangement des gènes d'ARN ribosomal (ARNr) chez les eucaryotes. L'espaceur intergénique (IGS) a été agrandi afin d'indiquer l'emplacement des éléments de régulation (promoteurs (P), amplificateurs et terminateurs) qui influencent l'hétérogénéité de la longueur de l'IGS selon le nombre de copies (Weider et al. 2005).

Par ailleurs, il a aussi été démontré que la taille de l'IGS est très variable au sein d'une espèce et que cette variabilité est due à la différence du nombre d'éléments de régulation contenus dans chaque IGS (Pikaard 2000). En effet, de nombreuses études ont porté sur le rôle de l'hétérogénéité de la longueur de l'IGS qui est due à la variation du nombre d'éléments de régulation dans l'IGS (Cluster et al. 1987; Grimaldi et Di Nocera 1988; Gorokhova et al. 2002).

Il a été proposé que la variation de la longueur de l'IGS puisse avoir des impacts considérables sur l'écologie et l'évolution des organismes, de par son effet sur le taux de croissance provenant du rôle de l'IGS dans la production d'ARNr (Cluster et al. 1987; Grimaldi et Di Nocera 1988; Gorokhova et al. 2002). En effet, Cluster et al. (1987) ont démontré que l'efficacité de la transcription de l'ADNr affecte les taux de développement, et de croissance. Dans cette étude, il a été démontré que les individus qui possédaient plus d'ARNr avaient des taux de développement et de croissance plus élevés. Par ailleurs, une meilleure efficacité de la transcription de l'ADNr, donc une plus grande production d'ARNr, améliore la capacité d'un individu à survivre et à se reproduire, puisque ses taux de développement et de croissance sont plus élevés (Cluster et al. 1987).

L'importance fonctionnelle de l'IGS, c'est-à-dire le lien entre la longueur de l'IGS et le taux de croissance a été démontré chez des Arthropodes, notamment chez la drosophile, *Drosophila melanogaster* (Cluster et al. 1987 ; Grimaldi et Di Nocera 1988) et la daphnie, *Daphnia pulex* (Gorokhova et al. 2002). L'idée générale est que les plus longs IGS possèdent plus d'éléments de régulation et peuvent supporter un taux de croissance plus élevé. Les variations numériques des éléments de régulations sont donc associées aux différents taux de métabolisme et de croissance des individus (Weider et al. 2005).

Dans l'étude de Gorokhova et al. (2002), le lien entre la longueur de l'IGS et le taux de croissance a été démontré chez des populations de daphnie qui avaient des croissances différentes. Les expériences menées dans le cadre de cette étude ont été réalisées en laboratoire sous un régime de sélection artificielle. La progéniture d'une femelle daphnie a été soumise à la sélection divergente au niveau du poids spécifique de la fécondité (PSF). Trois lignées ont été comparées ; une avec un faible PSF, une avec un haut PSF et finalement, une lignée contrôle. Dans chacune des populations, il y avait deux génotypes présents, soit un génotype à simple bande composé d'un seul fragment de 1,45 kb et un génotype à double bande composé du fragment de 1,45 kb et d'un autre fragment de 0,92 kb. L'analyse des fréquences des génotypes dans les populations a montré que la population qui possédait le plus d'individus à simple bande avait un taux de croissance plus élevé que la population qui possédait le plus d'individus à double bande. En raison du nombre total de répétitions, le génotype à simple bande représente le plus long IGS par rapport au génotype à double bande qui représente un plus court IGS. Les individus au génotype à simple bande possèdent deux longs IGS favorisant ainsi un meilleur taux de croissance que les individus au génotype à double bande qui possèdent un court et un long IGS. L'établissement de ce lien est important, car cela démontre, chez les invertébrés du moins et sous un régime de sélection artificielle, qu'il y existe un potentiel pour un changement adaptatif rapide, et ce, pour un trait de vie important, comme la croissance.

1.1.4.2 IGS de la perchaude

La séquence de l'IGS est déjà connue chez plusieurs espèces de poissons (Castro et al. 1997; Pelan 2000; Reed et Phillips 2000), dont la perchaude provenant du lac Saint-Pierre, Qc (Kakou 2008). L'IGS de la perchaude possède une organisation structurale qui est semblable à celle de la majorité des eucaryotes, en ce sens qu'elle est constituée de séquences répétées en tandem. Spécifiquement, l'IGS de la perchaude est formée de quatre régions constituées de séquences répétées en tandem (R1, R2, R3 et R4) séparées par de courtes régions non répétitives (Kakou 2008). Chez les perchaudes au LSP, le nombre de répétition au sein d'une région donnée est variable et la distribution d'allèles pour chacune des régions, sauf la région R2, suit approximativement une loi normale (Kakou 2008). Pour la région R2, il y a principalement deux allèles composés soit de 4 répétitions, soit de 22 répétitions, se traduisant en une différence d'environ 1000 nucléotides pour cette portion d'IGS. Étant donné la présence d'un court et d'un long IGS, la région R2 a été ciblée comme marqueur génétique pour l'étude du potentiel lien entre l'hétérogénéité de la longueur de l'IGS et la croissance chez la perchaude (Kakou 2008).

Trois génotypes ont été observés au niveau de la région R2 de l'IGS chez les perchaudes du LSP. L'homozygote 22-22 qui possède deux allèles de 22 répétitions chacun, donc le génotype qui contient le plus de répétitions. L'hétérozygote 4-22 qui possède un allèle de 4 répétitions et un autre de 22 répétitions, donc un IGS avec un nombre de répétitions intermédiaire. Finalement, l'homozygote 4-4 possède deux allèles de 4 répétitions chacun, donc il représente le génotype ayant le moins de répétitions.

1.1.5 Lac Saint-Pierre

Le lac Saint-Pierre (LSP) (46° 12' N, 72° 50' O) est situé sur le fleuve Saint-Laurent entre Sorel-Tracy et Trois-Rivières. Il s'agit du plus grand lac fluvial du fleuve Saint-Laurent et le dernier élargissement majeur avant l'estuaire. Le LSP est aussi considérée comme la plus grande plaine d'inondation d'eau douce au Québec, Canada. Sa surface varie entre 387 et 501 km² et est fonction du niveau d'eau qui fluctue selon

les saisons (Hudon, 1997). Ce lac est généralement peu profond (plus ou moins 3 mètres) et il possède un grand rapport largeur/profondeur qui est responsable du mélange très restreint des trois masses d'eau principales (la rive nord, le chenal maritime au centre et la rive sud) qui le constituent. Ces trois masses d'eau ont des propriétés physico-chimiques qui leur sont propres et qui créent des habitats uniques augmentant l'hétérogénéité spatiale dans ce lac (Frenette et al. 2003). L'hétérogénéité créée par les trois masses d'eau et par les différents tributaires peut influencer la croissance d'organismes aquatiques, ainsi que la structure des communautés de poissons entre les différentes rives. En effet, les masses d'eau de la rive nord sont troubles et riches en particules en suspension et en carbone organique dissous (COD). Les masses d'eau de la rive sud, alimentées par des tributaires qui proviennent de zones agricoles, contiennent beaucoup plus d'éléments nutritifs. Une plus grande productivité est observée au niveau de la rive sud due aux nombreux éléments nutritifs qui enrichissent les eaux. Finalement, comme le chenal maritime est une zone profonde, ses eaux ne contiennent presque pas de matière en suspension, puisque les particules se retrouvent sédimentées au fond.

1.1.5.1 Croissance des perchaudes au lac Saint-Pierre

Variation temporelle

Tardif et al. (2005) ont étudié l'effet temporel des facteurs environnementaux en 2002 et 2003 sur la croissance des larves de perchaudes du LSP en utilisant deux indices de croissance, les rapports ARN/ADN pour suivre l'évolution rapide des conditions environnementales et les longueurs totales qui intègrent la croissance depuis le début de leur vie. Le rapport ARN/ADN est un indice de la croissance somatique chez les poissons (Bulow 1987). La quantité d'ARN dans les cellules varie en fonction de la quantité de protéines nécessaires à la croissance. Pour sa part, la quantité d'ADN par cellule demeure constante. Cet indicateur permet donc de détecter la variation de la synthèse protéique à court terme et par le fait même, le taux de croissance récent (1 à 3 jours) (Martin et Wright 1987).

En 2002, il y avait une corrélation positive entre la croissance des individus et la température pour les rapports ARN/ADN et pour la longueur totale. En 2003, aucune corrélation n'a été observée et ceci s'expliquerait par le fait que d'autres facteurs, tels que la disponibilité des proies, la qualité de la nourriture et la compétition auraient pu influencer la croissance. Par ailleurs, l'année 2002 fut une année particulièrement froide et ceci pourrait expliquer que la température de l'eau, à cette année, se serait avéré un facteur limitant pour la croissance des larves.

Glémet et Rodriguez (2007) ont aussi étudié l'effet saisonnier des facteurs environnementaux sur la croissance des perchaudes du LSP en utilisant les rapports ARN/ADN qui ont permis de suivre les réponses à court terme des fluctuations environnementales. Parmi toutes les variables indépendantes étudiées, c'est la température qui a semblé avoir la plus grande influence sur la croissance à court terme des perchaudes. La température est un facteur particulièrement important dans les lacs fluviaux qui sont peu profonds, puisque la colonne d'eau ne se stratifie que très rarement. Les refuges thermiques ne sont donc pas disponibles aux poissons qui deviennent alors plus sensibles aux variations de températures (Glémet et Rodriguez 2007). Les résultats ont montré que la croissance à court terme atteint un maximum quand la température de l'eau est de 20,5 °C (Glémet et Rodriguez, 2007). Lorsque les valeurs de température étaient inférieures ou supérieures à la température optimale de 20,5 °C, la croissance à court terme diminuait.

Par ailleurs, Glémet et Rodriguez (2007) ont observé une relation positive entre la croissance à court terme des perchaudes et le niveau de l'eau dans le LSP. En effet, dans le LSP, la production de poissons est fortement liée à l'étendue de la zone inondable. Lorsque le niveau d'eau monte, lors des inondations, les zones littorales se développent rendant accessibles et disponibles des ressources alimentaires d'origine terrestre. Cette disponibilité de nourriture supplémentaire permet alors une meilleure productivité et croissance des poissons. La croissance des perchaudes semblait être stimulée lorsque le niveau de l'eau était supérieur à 4 mètres, ce qui coïncide avec le début de la période de croissance estivale.

Variation spatiale

Tardif et al (2005) ont mis en évidence que la croissance et la longueur totale atteintes par les larves de perchaudes en été sur la rive sud est généralement plus élevée que sur la rive nord et semble être en lien avec un gradient de productivité nord-sud dans le LSP. Des biofilms venant de sites au sud présentaient une quantité supérieure de nourriture impliquant un meilleur statut nutritionnel pour les organismes benthiques et leurs prédateurs (Huggins et al. 2004). Ceci pourrait expliquer la croissance des larves de perchaudes qui est plus élevée sur la rive sud, due à une plus grande disponibilité de la nourriture. La rive sud sur son ensemble, fournirait donc un habitat plus productif que la rive nord (Tardif et al. 2005).

Glémet et Rodriguez (2007) ont également observée une croissance à court terme (en moyenne de 11 %) plus élevée sur la rive sud que sur la rive nord pour les perchaudes juvéniles et adultes. De plus, une plus grande variabilité de la croissance à court terme, le long de la rive nord, a été détectée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la composition des masses d'eau de la rive nord présentent une grande variabilité longitudinale due à l'influence des nombreux tributaires qui l'alimentent.

1.1.6 Biologie de l'espèce (*Perca flavescens*)

Ontogénie

Tout au long de leur ontogénie, les perchaudes vont occuper des habitats différents. Les changements alimentaires qu'elles vont effectuer au cours de leur vie vont accompagner les changements d'habitats, surtout dans leur première année de vie (Whiteside et al. 1985). La reproduction, qui a lieu une seule fois par année, se passe au printemps et se termine vers le mois de mai. Celle-ci est généralement déclenchée par l'augmentation de la température de l'eau (Thorpe 1977). Le choix des sites de fraie est influencé par la densité des macrophytes et du type de substrat. Chez la perchaude, le choix du substrat dépend de ce qui est disponible, car c'est une espèce qui est reconnue

pour être opportuniste dans la sélection du substrat sur lequel elle dépose ses œufs (Brodeur et al. 2004).

Une fois les œufs déposés sur le substrat choisi, ils sont incubés entre 10 à 20 jours avant leur éclosion (Whiteside et al. 1985). Les larves de perchaudes vont rester dans les eaux peu profondes jusqu'à ce que la température de l'eau se réchauffe et atteigne des températures proches de 15 ° C (Whiteside et al. 1985). Par la suite, la croissance des larves en juvéniles se fait en milieu pélagique et dure environ 40 jours. Rendues au stade juvénile, les perchaudes retournent dans la partie littorale afin d'avoir accès à des ressources alimentaires plus abondantes. Finalement, les perchaudes adultes quittent le littoral vers le milieu pélagique.

La distribution des perchaudes entre les habitats est fortement dépendante de leur ontogénie. En effet, du stade larvaire au stade adulte, les perchaudes vont avoir à changer d'habitat, passant de la zone littorale à la zone pélagique et ce, en fonction de la pression de prédation et de la disponibilité de la nourriture. Comme elles sont considérées comme des espèces sédentaires (Thorpe 1977), les perchaudes se retrouvant dans une même zone, donc avec des probabilités plus élevées de se reproduire entre elles, vont former une seule population. Les perchaudes situées plus loin géographiquement, formeront une autre population. En plus de l'ontogénie de cette espèce qui structure les populations, d'autres facteurs tel que : les barrières de dispersion et la fidélité au site de natalité, peuvent influencer la structure des populations de perchaudes dans un même lac.

Barrière de dispersion

Dans les environnements aquatiques, il existe souvent peu de barrières physiques comme celles retrouvées en milieu terrestre, comme par exemple les montagnes ou une fragmentation de l'habitat empêchant la migration des organismes. Cependant, certaines barrières telle que des barrages, des chutes d'eau ou des discontinuités dans un habitat de fraie peuvent exister (Leclerc et al. 2008). Lorsque des barrages ou des chutes sont présents dans un environnement aquatique donné, le flux de gènes entre des populations séparées ne peut se faire aisément. Au fil du temps, un isolement génétique est observé

dû au flux de gènes restreint. Par ailleurs, lorsqu'il y a des discontinuités dans un habitat de fraie, deux processus s'observent, soit une restriction des flux de gènes et une dispersion limitée des poissons adultes (Leclerc et al. 2008).

Au LSP, le chenal maritime, qui est la masse d'eau centrale, peut jouer le rôle d'une barrière géographique en empêchant les individus de traverser cette zone en raison du fort débit. La vitesse de courant de l'eau est aussi un facteur à prendre en considération concernant la dispersion des individus. En effet, lorsque la vitesse de courant est trop élevée, les poissons auront tendance à fuir cette région, car elle ne représente pas une condition optimale pour la croissance. C'est d'ailleurs ce qui a été observé chez la perchaude. Dans une étude de Fortin et Magnin (1972), il a été démontré que lorsqu'il y a des zones avec une forte vitesse de courant, les perchaudes vont fuir ces milieux.

Fidélité aux sites

Il a été démontré que plusieurs espèces de poissons, dont la perchaude, retournent souvent au même site de fraie. La fidélité au site de reproduction peut conduire à l'isolement de certaines populations et par conséquent, une différenciation génétique sera observée entre les populations (Miller et al. 2000). En effet, les individus d'un même site de reproduction vont avoir tendance à se reproduire entre eux présentant ainsi une probabilité plus faible de se reproduire avec des individus d'un autre site de fraie (Leung et al. 2011). Ce comportement divise l'espèce en plusieurs populations qui présenteront, au fil du temps, leur propre diversité génétique.

Bien que les perchaudes adultes ne semblent pas se déplacer à plus de 4 km de l'endroit où elles sont installées (Thorpe 1977), Glover et al. (2008) ont observé en analysant des expériences de marquages-recapture que ce n'était pas tous les individus qui étaient sédentaires. En effet, Glover et al. (2008) ont évalué la structure du stock de perchaudes dans le bassin sud du lac Michigan et dans Green Bay (Wisconsin, États-Unis) en analysant les recaptures provenant d'une étude capture-recapture menée sur l'ensemble du lac entre 1996 et 2001. Les résultats ont montré que 35 à 80 % des individus recapturés étaient retournés à leur site de marquage (site de fraie). Cependant,

du nomadisme a été observé chez certains individus. Ceux-ci ne retournaient pas au même site de reproduction. Ce comportement favoriserait ainsi l'échange de flux de gènes entre les différents individus, contrairement au comportement de fidélité au site de reproduction qui empêche le flux de gènes favorisant la différenciation génétique entre les populations de perchaudes.

1.1.7 Structure génétique des perchaudes

1.1.7.1 Population de perchaudes du fleuve Saint-Laurent et au LSP

Leclerc et al. (2008) ont documenté la structure de la population de perchaudes adultes sur 310 km d'eau douce du fleuve Saint-Laurent en utilisant des marqueurs microsatellites. Les résultats ont montré qu'il existe trois zones de flux génique restreint caractérisées par des barrières (barrage ou cascade) délimitant quatre populations distinctes sur tout le fleuve Saint-Laurent. Une seule population distincte a été identifiée pour le LSP. Dans cette étude, les barrières physiques, comme la cascade naturelle en aval du lac Saint-François causant un haut niveau de discontinuité génétique et, les cinq petits barrages à l'entrée du LSP, ont joué un rôle plus important sur le flux de gènes et la structure génétique que la distance géographique.

Leung et al. (2011) ont tenté de déterminer s'il y avait une différenciation génétique entre les larves de perchaudes provenant de différents sites de fraie du LSP, et ce, en utilisant des marqueurs AFLP. Les résultats ont confirmé la présence de plusieurs populations distinctes qui coexistent dans le LSP. Les perchaudes du LSP qui vivent dans une même zone étaient génétiquement similaires entre elles comparativement à des perchaudes situées plus loin géographiquement. La présence de plusieurs populations sympatriques dans le LSP est compatible avec le comportement de fidélité au site de natalité qui s'observe chez la perchaude adulte. La différenciation génétique entre les populations est faible, car la colonisation s'est faite récemment. Par contre, chaque population représente une unité démographique distincte avec des taux de recrutements, de croissance et de mortalité spécifiques (Leung et al. 2011).

La différence observée au niveau de la structure des populations au LSP de ces deux études (1 vs 4 populations) peut s'expliquer par le fait que ce n'était pas les mêmes cohortes qui étaient étudiées. De plus, cette différence peut aussi s'expliquer par le fait que ce ne sont pas les mêmes marqueurs qui ont été utilisés dans chacune des études. En effet, l'étude de Leclerc et al. (2008) a été effectuée sur des adultes en utilisant des marqueurs microsatellites, alors que celle de Leung et al. (2011) a été réalisée sur des larves en utilisant des marqueurs AFLP.

1.1.8 Facteurs susceptibles de structurer les populations

1.1.8.1 Sélection naturelle

La sélection naturelle est une des quatre forces évolutives (mutation, dérive, migration et sélection) susceptible de modifier la constitution génétique (nombre d'allèles et fréquences) des populations (Griffiths et al. 2010). Les changements produits par la sélection ne sont pas aléatoires. Si les pressions sont constantes, les fréquences alléliques vont se diriger vers une valeur adaptative maximale de la population. La sélection entraîne donc une modification des fréquences alléliques. Par ailleurs, en fonction de l'évolution du résultat, la sélection peut être subdivisée en différents types.

Sélection directionnelle

La sélection directionnelle va entraîner au fil du temps une population vers l'homozygotie (Griffiths et al. 2010). Au cours des générations, il va y avoir un allèle qui va être fixé dans la population. L'allèle fixé sera celui qui a la meilleure valeur sélective ($w_{11} > w_{12} > w_{22}$). Par exemple, dans une population à deux allèles, A1 et A2, un de ces allèles sera fixé au fil du temps. Si A1 possède la meilleure valeur sélective, sa fréquence va se voir augmenter en même temps que la valeur sélective de la population. L'allèle 1 va donc se fixer dans la population et l'allèle 2 sera éliminé. La sélection directionnelle va réduire la variation génétique (Campbell et Reece 2007).

Sélection balancée

La sélection balancée peut être le résultat de divers processus sélectifs. Ces derniers vont maintenir activement plusieurs allèles dans le patrimoine génétique d'une population à des fréquences supérieures à ce qui est attendu dans une population à l'équilibre mutation-dérive. Il existe différents mécanismes par lesquels la sélection balancée tend à maintenir ce polymorphisme (O'Farrell et al. 2012; Arbanasic et al. 2014). Il y a tout d'abord l'avantage ou la surdominance des hétérozygotes qui survient lorsque les individus hétérozygotes possèdent une plus grande valeur sélective que les individus homozygotes ($w_{12} > w_{11}$ et $w_{12} > w_{22}$) (Doherty et Zinkernagel 1975 ; Hughes et Nei 1988). Par exemple, si $w_{11} = w_{22}$, la valeur sélective de la population sera donc maximale lorsqu'il y aura un maximum d'hétérozygotes et ainsi, la fréquence de chacun des allèles A1 et A2 convergera vers 0,5 au cours des générations. Ce type de sélection va favoriser la diversité allélique à l'intérieur d'une espèce, puisque les deux allèles sont conservés tant et aussi longtemps que les forces sélectives sont en place (Griffiths et al. 2010). Il existe aussi la sélection dépendante de la fréquence négative, qui est une autre forme de sélection balancée qui avantage les allèles rares (O'Farrell et al. 2012; Arbanasic et al. 2014). Ce type de sélection favorise les génotypes contenant un allèle rare lorsque par exemple, ils confèrent une plus grande résistance à de nouveaux agents pathogènes (Clarke et Kirby 1966; Takahata et Nei 1990; Slade et McCallum 1992). Il existe également la variation spatiale ou temporelle de la sélection, où la valeur sélective d'un génotype varie en fonction du temps (ex : stade larvaire par rapport aux adultes) ou de l'espace (ex : hétérogénéité spatiale des conditions physico-chimiques). Dans ces cas, puisque plus d'un allèle aura la meilleure valeur sélective (soit dans le temps d'une génération, soit dans l'espace d'une population), ces allèles persisteront plus longtemps qu'attendu pour un cas d'équilibre mutation-dérive.

1.2 Problématique

Il a été démontré que la taille de l'IGS est très variable au sein des espèces et que cette variabilité est due à la différence du nombre d'éléments de régulation contenus

dans chaque IGS (Cluster et al. 1987; Grimaldi et Di Nocera 1988; Pikaard 2000; Gorokhova et al. 2002). Cette hétérogénéité de la longueur de l'IGS est due au nombre répétés de chacun des éléments qui la compose. L'importance fonctionnelle de l'IGS, c'est-à-dire le lien entre la longueur de l'IGS et le taux de croissance a été démontré chez des Arthropodes. Chez les invertébrés et sous un régime de sélection artificielle, les plus longs IGS possèdent plus d'éléments de régulation et peuvent supporter un taux de croissance plus élevé. En revanche, de plus courts IGS contiennent moins d'éléments de régulation et les taux de croissance supportés sont plus faibles. Jusqu'à maintenant, ce lien fonctionnel entre la croissance et l'IGS n'a pas encore été examiné chez des vertébrés, comme les poissons, et ni dans des populations naturelles où leur milieu pourrait offrir des habitats hétérogènes et où le potentiel pour la sélection sur l'IGS est clair.

Un marqueur génétique, l'IGS, a été identifié chez des poissons pour examiner ce lien fonctionnel. Plus spécifiquement chez la perchaude, la région R2 de l'IGS présente deux allèles composés soit de 4 répétitions, soit de 22 répétitions, se traduisant en une différence d'environ 1000 nucléotides pour cette portion d'IGS. De plus, trois génotypes ont été repérés au niveau de la région R2 de l'IGS, soit l'homozygote 22-22, l'hétérozygote 4-22 et l'homozygote 4-4 représentant respectivement des génotypes avec un nombre total de répétitions élevé, intermédiaire et bas. Cette variation numérique dans le nombre de répétitions d'éléments de régulation, présente chez les individus, pourrait être en lien avec leur potentiel de croissance.

Le lac Saint-Pierre (LSP) est un lac fluvial du fleuve Saint-Laurent considéré comme extrêmement hétérogène en raison des propriétés physico-chimiques de ses trois masses d'eau (Frenette et al. 2003). L'hétérogénéité créée par les trois masses d'eau influence la croissance des poissons, notamment celle de la perchaude (La Violette et al. 2003). En effet, la croissance à court terme des larves et des adultes sur la rive sud est généralement plus élevée que sur la rive nord et semble être en lien avec un gradient de productivité nord-sud dans le LSP (Huggins et al. 2004; Tardif et al. 2005; Glémet et Rodriguez 2007). La structure génétique des perchaudes au LSP a été déterminée préalablement chez les adultes et les larves en utilisant des marqueurs neutres (Leclerc et al. 2008; Leung et al. 2011). En utilisant les adultes comme modèle, l'existence d'une

seule population de perchaude a été démontré (Leclerc et al. 2008), alors qu'en utilisant les larves comme modèle, quatre populations distinctes a été trouvées (Leung et al. 2011).

L'utilisation d'un marqueur génétique comme l'IGS pourrait nous permettre d'examiner chez des poissons et dans des populations naturelles s'il existe un lien entre l'hétérogénéité de la longueur de l'IGS et le taux de croissance en plus de nous confirmer si une force évolutive, comme la sélection, s'exerce sur les génotypes de l'IGS au niveau de la région R2.

1.3 Objectifs

1.3.1 Objectif général

L'objectif principal de ma maîtrise était de caractériser la structure génétique des perchaudes au LSP en utilisant le marqueur de l'IGS qui serait en lien avec la croissance. Comme la littérature propose que la taille de l'IGS soit associée à la croissance, il est vraisemblablement sous contrainte sélective. Pour répondre à l'objectif principal, plusieurs objectifs spécifiques ont été traités.

1.3.2 Objectifs spécifiques

Le premier objectif était de déterminer s'il y avait une sélection sur les génotypes du marqueur de l'IGS qui s'exerce au niveau de l'ensemble des perchaudes du LSP.

Compte tenu des différences de croissance observées chez les perchaudes du LSP entre la rive nord et la rive sud, le deuxième objectif était de déterminer si la sélection agit de façon spatialement différente, au niveau de ce marqueur.

Le troisième objectif était de déterminer si les effets de la sélection s'accumulaient avec le temps au niveau du marqueur de l'IGS. Nous voulions tester spécifiquement la variation temporelle dans la sélection, afin de connaître la survie différentielle de certains génotypes des adultes par rapport aux larves.

Le quatrième objectif était de déterminer s'il existait un lien fonctionnel entre le génotype des individus et leur taux de croissance à court terme comme ce qui a déjà été observé dans la littérature chez les invertébrés.

CHAPITRE II

BALANCING SELECTION IN NATURAL POPULATIONS: THE CASE OF RIBOSOMAL RNA INTERGENIC SPACER IN YELLOW PERCH (*PERCA FLAVESCENS*)

Frédérique Bélanger-Lépine*, Christelle Leung, Bernard Angers, Hélène Glémet

*Corresponding author; Email address: frederique.belanger-lepine@uqtr.ca;

Département des Sciences de l'environnement, Laboratoire d'écophysiologie et d'évolution moléculaire, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 Des Forges, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

Abstract

Ribosomal intergenic spacer (IGS) is responsible for the rate of transcription of rRNA genes. In invertebrates, variation of IGS length due to different number of copies of regulatory elements is linked to the growth of organisms. A previous study of yellow perch IGS revealed the presence of 2 alleles that differ by 1 kb due to variation in the number of repeat units. This provides a unique opportunity to assess whether length variation of IGS is under selection in natural populations. The objective of this study was twofold: to determine whether IGS is related to growth as observed in invertebrates and to determine whether these alleles are subject to balancing selection. The variation of IGS and neutral microsatellite loci was assessed on 353 yellow perch individuals from 5 natural populations. The results revealed no excess of heterozygotes with respect to a model under neutrality, neither was there a significant relationship with growth. On the other hand, both alleles were present and did not differ in frequencies among the populations sampled. As a result, IGS displayed an F_{ST} not significantly different from zero, strongly differing from neutral microsatellite loci ($F_{ST} = 0.16651$). In addition IGS was identified as an outlier when using LOSITAN program. These results suggest that although selective processes are acting to maintain both alleles in the populations, differences in genotype fitness are likely very low. This represents the first case of selection operating on regulatory elements via the number of repeats rather than on a coding sequence.

Key-words: balancing selection, intergenic spacer (IGS), yellow perch (*Perca flavescens*), growth, genotype.

Introduction

The functional eukaryotic ribosome is composed of a small and a large subunit (Weider et al. 2005). The small subunit contains a 18S rRNA molecule while the large a 5S, 5.8S and a 28S rRNA molecule (Weider et al. 2005). The genes encoding 5,8S 18S and 28S rRNA are found together in tandem arrays of a repeat unit (rDNA) that consists of the three coding regions separated by internal transcribed spacers (ITS). These repeating units of rRNA genes are separated by intergenic spacers (IGS) (Weider et al. 2005). The IGS contains a variable number of regulatory elements for rRNA gene transcription such as enhancers, promoters and terminators (Alvares et al. 1998). These regulatory elements of rRNA genes are responsible for gene expression rate and vary among species and even within the same specie inducing length heterogeneity of the IGS (Pikaard 2000). Since rRNA transcription is directly related to the growth, development, and survivorship of individuals (Flavell 1986; Weider et al. 2005), length heterogeneity of the IGS is of functional importance to organisms.

The functional importance of the IGS, the link between IGS length and growth rate has been demonstrated experimentally in arthropods, for the fruit fly, *Drosophila melanogaster* (Cluster et al. 1987; Grimaldi and Di Nocera 1988) and the daphnia, *Daphnia pulex* (Gorokhova et al. 2002). Indeed, Cluster et al. (1987) improved efficiency of rDNA transcription, produced individuals with more rRNAs, improving the ability of an individual to survive and reproduce through, higher developmental and growth rates. Gorokhova et al. (2002), showed that for clonal lineages of daphnia subjected to divergent selection, progeny with long IGS had higher growth rates compared to individuals with shorter IGS. In addition, individuals with longer IGS had higher development rates than individuals with shorter IGS.

Selective processes responsible of the maintenance of such variation in natural populations have never been studied. A previous study reports the organisation of yellow perch (*Perca flavescens*) IGS as having four distinct regions containing tandem repeats. Size variation of alleles of these regions showed a normal distribution except for the R2 region where only 2 alleles present differing by 1 kb due to variation in the number of repeat units. Given the presence of a short and a long IGS allele, we targeted the R2

region as a genetic marker for studying the potential link between IGS length heterogeneity and growth rate in yellow perch. Moreover, this provides a unique opportunity to assess whether length variation of IGS is under selection in natural populations. The maintenance of these two different alleles in a population is one of the signatures typical of balancing selection (Hughes and Nei 1988).

In the present study, we investigated whether balancing selection is acting on the IGS marker, since there are always two alleles maintained in population of yellow perch from the Lake St. Pierre (LSP) (Kakou et al. 2014 unpublished). Additionally, we examine if there is a link between IGS length and growth rate of individuals similar to what has been observed for invertebrates (Cluster et al. 1987, Grimaldi et Di Nocera 1988; Gorokhova et al. 2002).

To address these objectives, we looked for signatures of balancing selection within and among yellow perch populations. In the case of heterozygote advantage, an excess of heterozygotes (individuals carrying both alleles of different sizes) was expected within a given population and was expected to increase gradually as a given generation ages. Greater genetic similarity for the IGS marker was also expected among different populations than would be for neutral markers such as microsatellites.

Materials and Methods

Fish sampling

In this study, sampling is performed on a total of five lakes. A total of 175 juvenile and adult yellow perch individuals from the LSP (Figure 2.1 and Table 2.1) were analysed in the present study. Sampling was carried out previously by electric fishing (Cataraft SR- 17) in 2006 (Glémet and Rodriguez 2007). Briefly, 50-meter transects parallel to the north and south shores, to less than 2.5 meters deep were sampled. Two additional transects were sampled upstream and downstream, near the navigational channel. The captured fish were measured (total length in mm), weighed (wet weight in g) and immediately placed on dry ice. Once in the laboratory, a sample of white muscle (1-2g) was taken from the left side of each fish behind the dorsal fin,

above the lateral line and frozen at -80°C for RNA: DNA ratio analysis. Liver of each individual was also collected for genetic analysis.

A total of 125 yellow perch larvae captured previously in LSP after their appearance in May and June (2008-2009) (Leung et al. 2011), using push net methods (Paradis et al. 2008). Larvae were frozen at -20°C for future analysis.

Finally, yellow perch sampled previously from four additional lakes located on the edge of the Canadian Shield and the lowlands of the St. Lawrence in 2010 were used in the present study (Figure 2.1 and Table 2.1). Fish were caught using gill and seine net from the shore. The catches were made in the littoral and sublittoral zone of each lake. Of those captured, a total of 53 adults, approximately 13 per lake, were used in the present study. A sample of white muscle was taken from the dorsal region and the liver of each individual was also collected and were frozen at -80°C for genetic analysis.

Age determination of yellow perch

In order to account for possible age differences in the yellow perch individuals used for short-term growth rate analyses, the relative age class of yellow perch sampled in 2006 was estimated from a total age class-length relationship previously established by MERN (Ministry of Energy and Natural Resources). The total lengths of yellow perch sampled in 2006 were compared with those captured in the same year and whose total age class-length relationship was already determined. For the most part, individuals could be attributed a discrete age class, 1 +, 2+ or > 3 +. However, some individuals overlapped two age classes, e.g. 1 + and 2 + and their age class could not be accurately estimated.

RNA: DNA ratio

The ratio of ribonucleic (RNA) to deoxyribonucleic acid (DNA) of yellow perch juveniles and adults sampled in 2006, were determined previously according to the microfluorometric method proposed by Kyle et al. (2003). Briefly, nucleic acids were extracted from muscle samples homogenized in a solution of N-lauroylsarcosine (0.1%

final concentration; Sigma-Aldrich®) in Tris buffer (10mM Tris, 1mM Na EDTA, pH 7.5; Molecular Probes®). Aliquots of the extract were distributed onto three 96-well microplates. Nuclease-free water was added to plate 1 (control), whereas nucleases were added to plates 2 (RNase) and 3 (RNase + DNase). Nucleic acids were stained using the cyanine base fluorescent dye RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc), which binds non-specifically to nitrogenous bases of nucleic acids. RNA and DNA concentrations were determined from fluorescence readings (530 nm excitation, 590 nm emission filters) using a Varian™ Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer. Readings of plates 1 (DNA + RNA concentrations) and 2 (DNA concentration) were corrected for background fluorescence (plate 3). RNA concentrations were then determined by subtracting the corrected fluorescence of plate 2 from that of plate 1.

DNA extraction and amplification of the IGS and microsatellite markers

Total DNA was extracted by proteinase K digestion, followed by purification with phenol-chloroform and an ethanol precipital (Sambrook et al. 1989). Extraction of genomic DNA of whole larvae from LSP was performed previously by Leung et al. (2011).

PCR reaction was performed in a total volume of 25 µl containing: 2.5 µl 10X Taq reaction buffer, 0.4 mM of each dNTP, 1 µl of BS (band sharpening Feldan®), 0.8 µM of each primer, 1.0 U of Taq DNA polymerase (Feldan®). The PCR conditions were as follows: an initial denaturation at 92 ° C for 30 seconds, the three subsequent steps repeated a total of 45 cycles, denaturation at 92 ° C for 30 seconds, annealing step at 62 ° C for 30 seconds and extension at 68 ° C for 120 seconds. A final extension was carried out at 68 ° C for 5 minutes.

Ten microsatellites loci designed for yellow perch (Li et al. 2007; Zhan et al. 2009) were also analyzed. PCR reaction was performed in a total volume of 12.5 µl containing: 1.25 µl 10X Taq reaction buffer, 0.4 mM of each dNTP, 0.8 µM of each primer, 1.0 U of Taq DNA polymerase (Feldan®). The PCR conditions were as follows: an initial denaturation at 92 ° C for 30 seconds, the three subsequent steps repeated a total of 45 cycles, denaturation at 92 ° C for 15 seconds, annealing step at 52 ° C for

15 seconds and extension at 68 ° C for 30 seconds. A final extension was carried out 68 ° C for 120 seconds.

The amplification products were discriminated on of 5% and 6% polyacrylamide denaturing gels for the IGS region and microsatellites respectively. Staining with silver nitrate was used to visualize the genotypes (Benbouza et al. 2006).

Population-based analysis and statistics

The excess of heterozygotes was tested in yellow perch adults, juveniles and larvae of LSP using GENEPOP version 1.2 (Raymond and Rousset 2008). Genetic differentiation was tested for all lakes using GENEPOP version 1.2 (Raymond and Rousset 2008; Rousset 2008). To support these results and thus suggest balancing selection at IGS repeat region 2 (R2), we quantified the difference observed with the F_{ST} , which is an index of population differentiation. F_{ST} distribution is strongly related to heterozygosity of a locus (Beaumont and Nichols 1996). The neutral expectations of the population differentiation were assessed by simulation using the method proposed by Beaumont and Nichols (1996) with the software LOSITAN (Antao et al. 2008). When taking account for the marker's H_E , observed F_{ST} value out of the confidence intervals is likely to have been influenced by natural selection.

Finally, a two-way analysis of variance (two-way ANOVA) was performed to determine whether there is a functional link between the genotypes of individuals and their short-term growth. This test compares the genotypes with the RNA/DNA ratios and uses age class as a covariate. The two-way ANOVA was performed using the R software version 2.15.2.

Results

Selection

Within population

The Hardy-Weinberg equilibrium was first tested on the genotypes of yellow perch (larvae and juveniles/adults) in LSP. No significant difference between the observed and expected numbers of IGS genotypes was detected for the larvae ($p = 0.1034$) and juveniles/adults ($p = 0.4583$). The LSP yellow perch population appears to be in Hardy-Weinberg equilibrium, where no excess of heterozygotes is observed.

Subsequently, a test of genetic differentiation was performed on the allele frequencies for the IGS marker of yellow perch for the different shores of LSP (north and south). No significant difference between the north and south shores was observed for the larvae ($p = 0.9048$) and juveniles/adults ($p = 1$). The selection does not act differently between the north and south shores. Thus, the presence of the two alleles in the LSP is not a selection in favor of an allele in the south and another to the north (spatial variation in the selection).

To determine whether selection effects accumulate over time, two tests were performed. Firstly, the Hardy-Weinberg equilibrium was tested on the genotypes of yellow perch (larvae and juveniles/adults together) in LSP. No significant difference between observed and expected numbers of IGS genotypes was observed ($p = 0.6383$). Then, a genetic differentiation test was conducted in allele frequencies of yellow perch larvae and adults to verify the differences in allele abundance. Statistical analyzes revealed no significant difference ($p = 0.0798$) between larvae and adults.

A two-way analysis of variance (two-way ANOVA) with age classes as a covariate, was used to compare the three different genotypes of adult and juveniles yellow perch (4-4, 4-22 and 22-22) with RNA/DNA ratios (Figure 2.3). No statistical difference between short-term growth rates of genotypes was observed for yellow perch in LSP ($F = 0.8278$ and $p = 0.5794$).

Inter population

The Hardy-Weinberg equilibrium was also tested on the genotypes of yellow perch from the other four lakes. No significant difference between the observed and expected numbers of IGS genotypes was observed for lake Traverse ($p = 0.9774$), lake Thomas ($p = 0.8518$), lake Second Roberge ($p = 0.6408$) and lake Goulet ($p = 0.9564$). Even when pooling the four lakes together, the result is still not significant ($p = 0.9079$). Yellow perch from lakes located on the edge of the Canadian Shield and the lowlands of the St. Lawrence River appear, as for the yellow perch from LSP, to be in Hardy-Weinberg equilibrium.

A genetic differentiation test was also performed on the allele frequencies for the IGS marker of yellow perch for the four different lakes. No significant difference between the four lakes was observed for the yellow perch ($p = 0.8249$).

A genetic differentiation test was performed comparing the allelic frequencies of LSP larvae and adults and those of other populations of yellow perch from the Canadian Shield and the lowlands of the St. Lawrence. A common factor between each the four lakes from the Canadian Shield and the lowlands of the St. Lawrence and the LSP was that, there was always the maintenance of the two IGS alleles (4 and 22) present at the same frequencies.

For the IGS marker, there was a high genetic similarity among yellow perch populations with no genetic differentiation among populations ($p = 0.9460$). In contrast, the test was highly significant when performed with the eleven microsatellites loci ($p < 0.0001$) indicating high differentiation among populations. Analyses performed with LOSITAN revealed that most of the microsatellite markers were in accordance with neutral expectations and were within the confidence interval of the F_{ST} (Figure 2.2). On the other hand the F_{ST} computed on IGS was clearly below the lower limit of the neutral confidence interval and was clearly identified as an outlier (Figure 2.2 and Table 2.3). Regardless that two of the microsatellite markers were identified as candidates for positive selection, it remains that the majority of neutral markers support a significant differentiation among populations, while IGS does not.

Discussion

To address our objective, we looked for signatures of balancing selection within and among yellow perch populations. The results suggest that selective processes are acting on IGS R2 to maintain both alleles in similar frequencies across populations. The absence of differentiation among populations at this locus strongly contrasts with that detected using neutral microsatellite loci. This signature is consistent with balancing selection (Hughes and Nei 1988).

Surprisingly, only a few cases of balancing selection in natural populations are reported in the literature. Striking examples of balancing selection are those such as the hemoglobin gene in human (Stuart and Nagel 2004), alcohol dehydrogenase (ADH) in drosophila (Kreitman and Hudson 1991) or major histocompatibility complex (MHC) (Hedrick 1999).

In our study, the analyses performed on IGS R2 region failed to reveal selection acting within populations when comparing observed vs expected genotypes. Under balancing selection, disequilibrium between expected and predicted genotype by HW was expected. The results have shown that yellow perch in LSP are in Hardy-Weinberg equilibrium. Multiple populations are expected to coexist in LSP (Leung et al. 2011) and a neutral hypothesis is that persistence of both alleles results of a population structure within LSP. The absence of significant deficit of heterozygotes in LSP rule out this hypothesis.

If selective processes are acting to maintain both alleles, the difference in genotypes fitness is however very low and could not be discriminated from random processes, even when using a large number of individuals in LSP with larvae and juveniles/adults. This suggests a situation different from heterozygote advantage as observed in hemoglobin gene in human – sickle cell anemia malaria (Stuart et al. 2004), ADH in drosophila (Kreitman and Hudson 1991) or MHC (Hedrick 1999).

Consequently, it is not surprising that the analyses failed to reveal a functional link between IGS genotypes and RNA/DNA ratios in yellow perch in LSP, contrasting with previous studies in invertebrates in laboratory (Cluster et al. 1987; Grimaldi and Di Nocera 1988; Gorokhova et al. 2002). Instead, we observed a large variability of

RNA/DNA ratio for each genotype. The short-term growth was similar for all genotypes and the proposed functional link was not apparent. The observed variability could be explained by the fact that the RNA/DNA ratio is a biochemical index of short term growth that responds quickly to environmental changes, especially to recent changes in temperature and diet environment (Bulow 1987; Martin and Wright 1987). As LSP is an extremely heterogeneous fluvial lake both spatially and temporally (Frenette et al. 2003; Tardif et al. 2005; Glémet and Rodriguez 2007), environmental influences may mask the contribution of genetics making the detection of a functional link between IGS and growth very difficult.

In conclusion, the results of this study represent a rare demonstration of balancing selection in nature. Surprisingly, the selection highlighted in this system is not acting on the coding sequence of a gene, as is the case with sickle cell disease (Nagel and Stuart 2004), ADH in drosophila (Kreitman and Hudson 1991) and MHC in vertebrates (Hedrick 1999). In yellow perch, balancing selection is carried out on a regulatory region, in our case on one of the repeats regions of IGS, which presumably is involved in the control of the expression of ribosomal DNA genes.

Acknowledgements

This research was supported by the Group for Interuniversity Research in Limnology and Aquatic Environment (GRIL). We also wish to thank Mr. Gadbois-Côté for sampling yellow perch and Mr. Lèveillé for the analyses of RNA: DNA ratio.

References

- Alvares LE, Brison O, Ruiz IRG (1998) Identification of enhancer-like elements in the ribosomal intergenic spacer of *Odontophrynus americanus* 2n and 4n (Amphibia, Anura). *Genetica*, **104**(1): 41-44.
- Antao T, Lopes RJ, Beja-Pereira A, Luikart G (2008) LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a F_{ST} -outlier method. *BMC bioinformatics*, **9**:323.
- Beaumont MA and Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **263**(1377): 1619-1626.
- Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP, Mergeai G (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **10** (2):77-81.
- Bulow FJ (1987) RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: a review. In: Summerfelt RC and Hall GC (eds). *The age and growth of fish*. The Iowa State University Press, Ames, 45-64.
- Cluster PD, Marinkovic D, Allard RW, Ayala FJ (1987) Correlations between development rates, enzyme-activities, ribosomal DNA spacer-length phenotypes, and adaptation and in *drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**(2): 610-614.
- Flavell, RB (1986) The structure and control of expression of ribosomal RNA genes. *Oxford Survey of Plant Molecular and Cell Biology* **3**:251-74
- Frenette JJ, Arts MT, Morin J (2003) Spectral gradients of downwelling light in a fluvial lake (Lake Saint-Pierre, St-Lawrence River). *Aquatic Ecology*, **37**(1): 77-85.
- Glemet H and Rodriguez MA (2007) Short-term growth (RNA/DNA ratio) of yellow perch (*Perca flavescens*) in relation to environmental influences and spatio-temporal variation in a shallow fluvial lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **64**(12): 1646-1655.
- Gorokhova E, Dowling TE, Weider LJ, Crease TJ, Elser JJ (2002) Functional and ecological significance of rDNA intergenic spacer variation in a clonal organism under divergent selection for production rate. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **269**(1507): 2373-2379.

Grimaldi G and Di Nocera PP (1988) Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate ribosomal-RNA precursor transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **85**(15): 5502-5506.

Hedrick PW (1999) Balancing selection and MHC. *Genetica*, **104**: 207-214.

Kakou, Bidénam (2008) Hétérogénéité de l'espaceur intergénique et croissance chez la perchaude (*Perca flavescens*). Mémoire. Trois-Rivières, Université du Québec à Trois-Rivières, 65 p.

Kreitman M and Hudson RR (1991) Inferring the evolutionary histories of the Adh and Adh-dup loci in *Drosophila melanogaster* from patterns of polymorphism and divergence. *Genetics society of America*, **127**: 565-582.

Kyle M, Watts T, Schade J, Elser JJ (2003) A microfluorometric method for quantifying RNA and DNA in terrestrial insects. *Journal of Insect Science*, **3**:1-7

Leung C, Magnan P, Angers B (2011) Genetic evidence for sympatric populations of yellow perch (*Perca flavescens*) in lake Saint-Pierre (Canada): the crucial first step in developing a fishery management plan. *Journal Aquaculture research and development* **S6**:001.

Léveillé, Maxime (2009) Effets des changements ontogéniques du régime alimentaire et de la biomasse des producteurs primaires sur la croissance à court terme des poissons. Mémoire. Trois-Rivières, Université du Québec à Trois-Rivières, 53 p.

Li L, Wang HP, Givens C, Czesny S, Brown B (2007) Isolation and characterization of microsatellites in yellow perch (*Perca flavescens*). *Molecular Ecology Notes* **7**, 600-603.

Martin FD and Wright DA (1987) Nutritional state analysis and its use in predicting striped bass recruitment: laboratory calibration. *American Fisheries Society Symposium* **2**:109-114

Paradis Y, Mingelbier M, Brodeur P, Magnan P (2008) Comparisons of catch and precision of pop nets, push nets, and seines for sampling larval and juvenile yellow perch. *North American Journal of Fisheries Management* **28**, 1554-1562.

Pikaard CS (2000) Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. *Plant Molecular Biology*, **43**(2-3): 163-177.

Raymond M and Rousset F (2008) Gene pop on the web., from <http://genepop.curtin.edu.au/>.

Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implémentation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**(1): 103-106.

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

Stuart MJ and Nagel RL (2004) Sickle-cell disease. *Lancet*, **364**(9442) :1343-1360.

Tardif D, Glémet H, Brodeur P, Mingelbier M (2005) RNA/DNA ratio and total length of yellow perch (*Perca flavescens*) in managed and natural wetlands of a large fluvial lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **62**(10): 2211-2218.

Weider LJ, Mateos M, Cotner JB, Markow TA (2005) The functional significance of ribosomal (r)DNA variation: Impacts on the evolutionary ecology of organisms. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, Palo Alto, Annual Reviews, **36**: 219-242.

Zhan A, Wang Y, Brown B, Wang HP (2009) Isolation and Characterization of novel microsatellite markers for Yellow Perch (*Perca flavescens*). *International Journal of Molecular Sciences* **10**, 18-27.

Figure legends

Figure 2.1: Lake St. Pierre and the four other lakes from the Canadian Shield and the lowlands of the St. Lawrence.

Figure 2.2: Confidence interval of F_{ST} based on heterozygosity for IGS and eleven different microsatellite markers.

Figure 2.3: RNA: DNA ratios for IGS genotypes of juvenile and adult yellow perch from lake St. Pierre.

Tables

Table 2.1. Geographical coordinates of Lake Saint-Pierre and lakes located at the edge of the Canadian Shield and the lowlands of the St. Lawrence.

| Lakes | Latitude (degree, min.) | Longitude (degree, min.) |
|----------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Saint-Pierre | 46°12' | 72°50' |
| Thomas | 46°23' | 73°14' |
| Goulet | 46°36' | 72°57' |
| Second Roberge | 46°47' | 72°43' |
| Traverse | 46°50' | 72°32' |

Table 2.2. Primer sequences used to amplify IGS and microsatellites in yellow perch.
*To avoid null alleles detected in other studies, some primers were modified (Li et al. 2007; Zhan et al. 2009).

| Primers Name | Sequences |
|-----------------|--|
| IGS-R2F | 5'CTGGAGGGTTAGGGTTAGGG3' |
| IGS-R2R | 5'CTGCCTTGTAAGCCCAAGTT3' |
| YP23 | TTGGACAAAAATAACTCACT |
| YP86* | 5'CCGGCTACTTCATGTTAA AAC to 5'CTGTCTCGCCGTCACAATGTCC |
| YP90 | AGAAAAGAGGGAAAGAAGG |
| YP105* | 5'CATAGAAGCAAAACCCGTG to 5'CATCACTGAGACCTTGTC |
| YP78 | GCAGCCCCTACAATGGTT |
| YP81 | CAGTCGGGCGTCATCACACGAAGGGAATCAAGTTTT |
| YP96 | CTAACACAAGTTTCCACCGC |
| YP99 | ACACAGAGCAATACCATCGTCA |
| YP108* | 5'GGAGATGGCGTGTGTCTTTTAC to 5'GCTGTCACTTCATTACCGTGG |
| YP110 | CAGTCGGGCGTCATCATTAGACCCCTTCACTTTTG |

Table 2.3 F_{ST} values for each genetic marker used.

| Marker | F_{st} |
|--------|----------|
| IGS-R2 | 0.00001 |
| YP23 | 0.1534 |
| YP41 | 0.1382 |
| YP60 | 0.0768 |
| YP78 | 0.1014 |
| YP81 | 0.1564 |
| YP86 | 0.2173 |
| YP90 | 0.1262 |
| YP96 | 0.1061 |
| YP99 | 0.0294 |
| YP108 | 0.4433 |
| YP110 | 0.2181 |

Figures

Figure 2.1

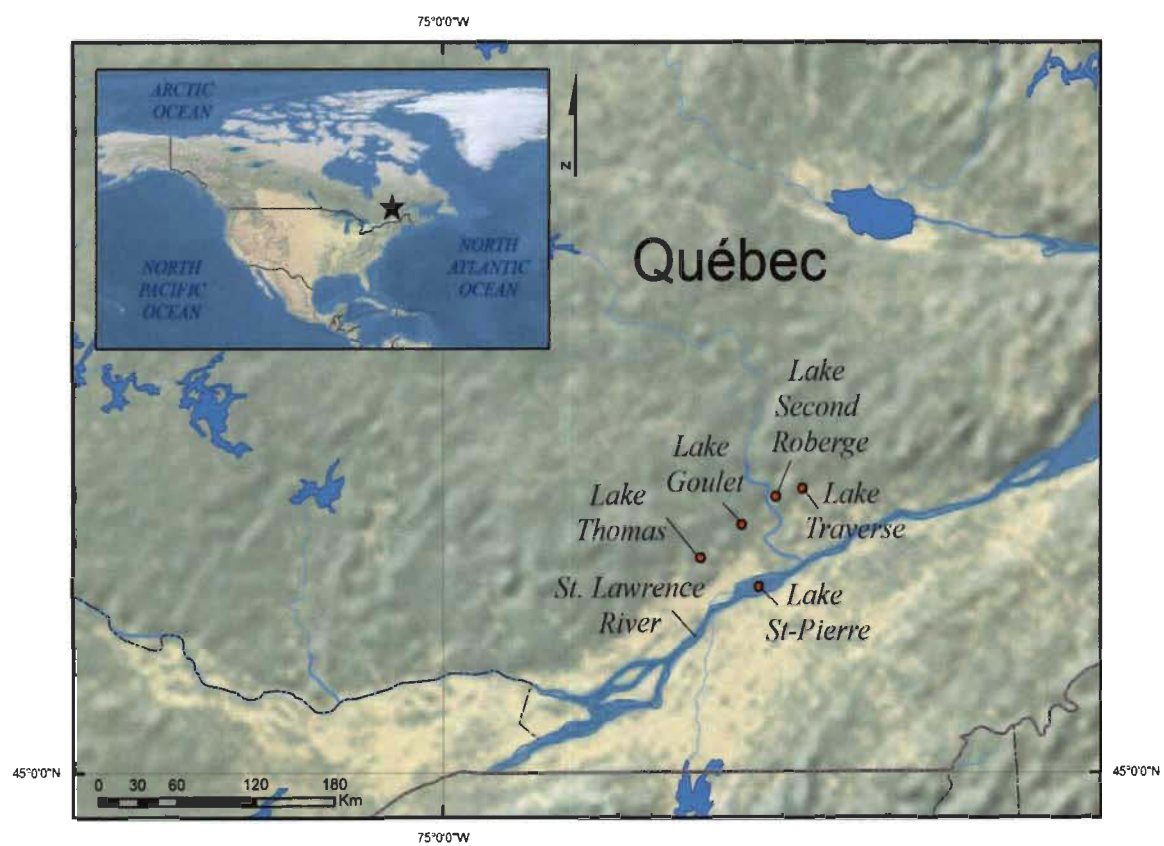


Figure 2.2

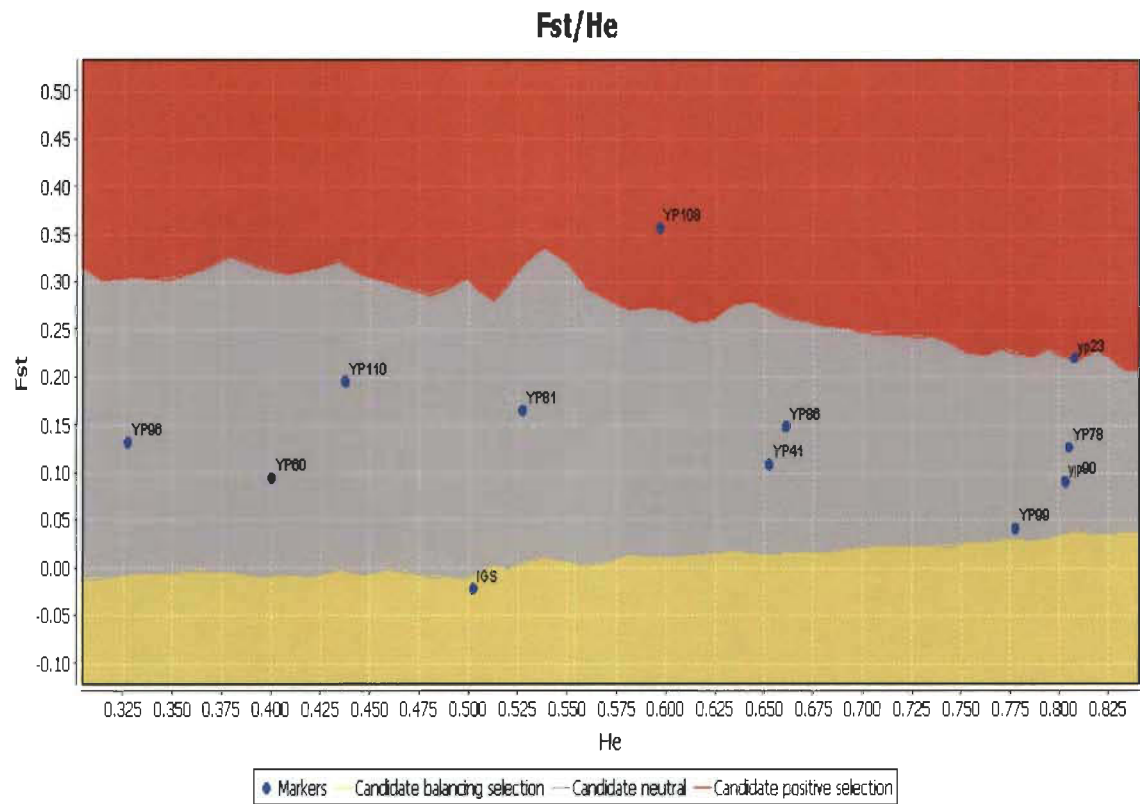
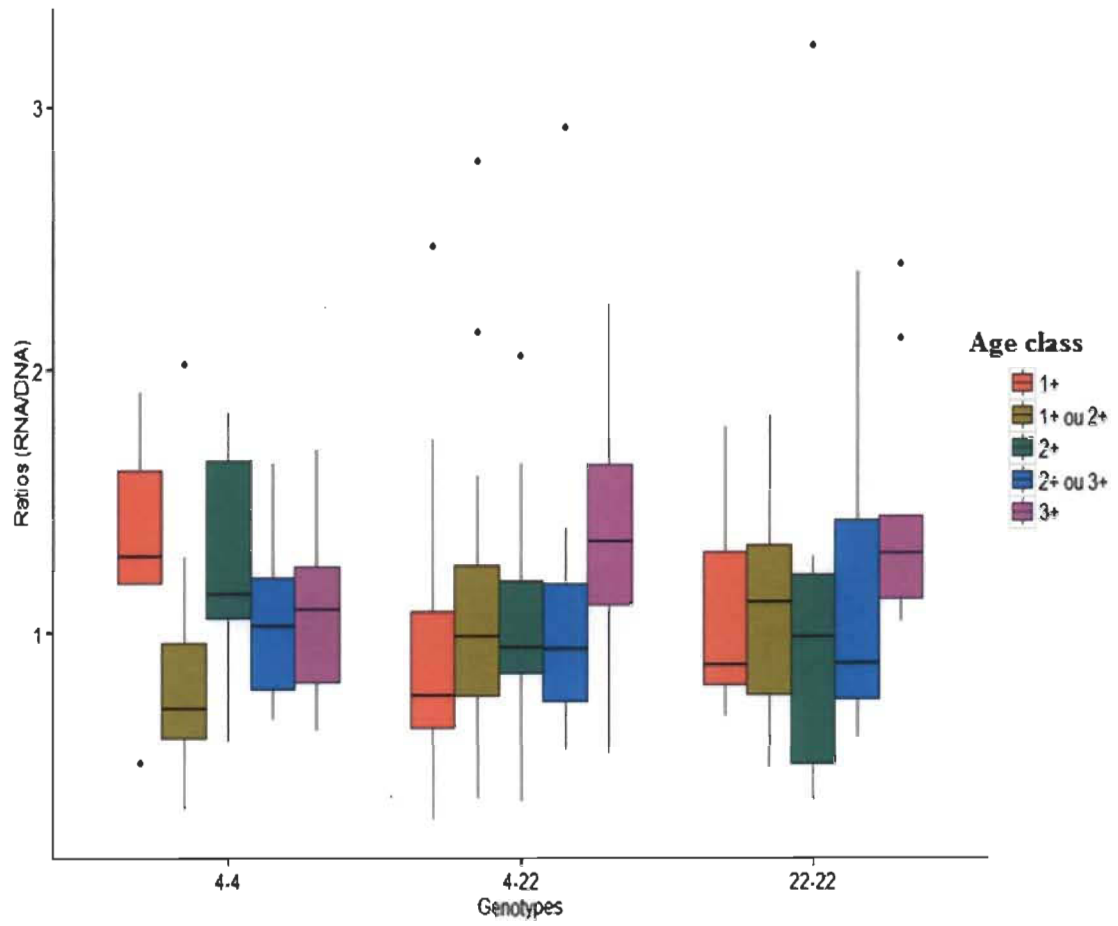


Figure 2.3



CHAPITRE III

CONCLUSION GÉNÉRALE

3.1 Principaux résultats

Sélection balancée

Si la taille de l'IGS des perchaudes est associée au métabolisme et à la croissance (Cluster et al. 1987; Grimaldi et Di Nocera 1988; Gorokhova et al. 2002), le fait de retrouver deux tailles d'allèles différentes pour la région 2 de l'IGS (4 et 22 répétitions) suggère qu'il est plus avantageux pour un individu de posséder les deux allèles plutôt qu'un seul. Nous nous attendions donc à ce que toutes les populations conservent ces deux allèles plutôt que de fixer l'un ou l'autre. Notre premier objectif était donc de détecter si ces deux allèles font l'objet de sélection. Si ces deux allèles sont préservés en raison de la sélection balancée, deux prédictions étaient possibles. La première prédiction concernait le nombre d'hétérozygotes retrouvé dans la population. Nous devrions observer plus d'hétérozygotes (individus qui portent les deux allèles de tailles différentes) que ce que nous nous attendons d'avoir selon un modèle sous neutralité.

Pour répondre à cette prédiction, nous avons fait un test d'équilibre d'Hardy-Weinberg sur les génotypes des perchaudes du lac Saint-Pierre (LSP). Nous avons testé l'hypothèse nulle, selon laquelle le nombre observé et prédit des génotypes ne sont pas différents, donc la population est à l'équilibre. Les résultats du premier test effectué d'Hardy-Weinberg, sur les génotypes d'IGS (larves et juvéniles/adultes) n'était pas significatif ($p = 0,6383$). Les cohortes du LSP semblent être à l'équilibre avec aucun excès d'hétérozygote, mais l'hypothèse de la sélection balancée n'est pas encore écartée.

La deuxième prédiction concerne la similarité génétique entre les populations. Si la sélection balancée agit dans toutes les populations, nous devrions observer une plus grande similarité génétique entre les populations pour le marqueur de l'IGS (puisque ce sont toujours les deux mêmes allèles qui sont conservés), comparativement aux

marqueurs neutres, comme les microsatellites où différents allèles peuvent s'accumuler dans les populations. Nous avons fait un test de différenciation génétique en comparant les fréquences alléliques des cohortes du LSP et celles de d'autres populations de perchaudes provenant de quatre lacs se retrouvant entre la limite du Bouclier Canadien et des Basses terres du Saint-Laurent. Nous avons testé l'hypothèse nulle que les fréquences alléliques de l'IGS ne sont pas différentes entre les populations du lac Saint-Pierre et celles des quatre autres lacs.

Le résultat de ce test ($p = 0,9460$) nous a démontré qu'il y avait une très grande similarité génétique pour les allèles de l'IGS entre les perchaudes du LSP et celles des autres lacs. De plus, en utilisant onze marqueurs neutres (microsatellites), il n'y avait aucune similarité génétique entre les perchaudes provenant des différentes populations ($p < 0.0001$). Pour appuyer ces résultats et ainsi confirmer qu'il y a de la sélection balancée au niveau de la région 2 (R2) de l'IGS des perchaudes, nous avons quantifié la différence observée avec le F_{ST} qui est un indice de diversification des populations. La distribution du F_{ST} est fortement liée à l'hétérozygotie d'un locus (Beaumont et Nichols 1996). Ce test crée un F_{ST} global pour toutes les populations des perchaudes en simulant un intervalle de confiance en fonction de l'hétérozygotie. La variation génétique qu'il va avoir par rapport à l'intervalle de confiance est susceptible d'être influencée par la sélection naturelle (Beaumont et Nichols 1996). Les marqueurs neutres sont dans cet intervalle de confiance du F_{ST} alors que le marqueur de l'IGS se démarque de l'intervalle de confiance (Figure 2.2 et Table 2.3).

Étonnamment, quelques cas seulement de sélection balancée dans des populations naturelles ont été rapportés dans la littérature. Il y a notamment le cas du gène de la drépanocytose chez les humains (Stuart et Nagel 2004), le gène de la déshydrogénase alcoolique (ADH) chez la drosophile (Kreitman et Hudson 1991) et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chez l'humain (Hedrick 1999). L'exemple le plus commun pour la sélection balancée reste le cas du gène de la drépanocytose chez les humains (Stuart et Nagel 2004). La drépanocytose est une maladie génétique qui touche les globules rouges. Elle est causée par une mutation récessive et entraîne généralement la mort en bas âge des homozygotes mutants (hh). Dans ce cas de figure, il n'y aurait que la sélection directionnelle. Toutefois, dans les régions où le paludisme est présent, on

constate que non seulement la maladie ne disparaît pas, mais augmente même en fréquence. Le paludisme est une maladie causée par un eucaryote unicellulaire qui se reproduit dans les globules sanguins. Les individus hétérozygotes Hh pour la drépanocytose sont moins susceptibles au paludisme que les individus homozygotes HH. Ainsi, cela représente un système de sélection balancée où la valeur sélective des homozygotes hh est très faible (presque 0) et en présence de paludisme, celle des homozygotes HH sera plus faible que celle des hétérozygotes Hh. Il y a donc à chaque génération un nombre d'individus possédant le génotype hh qui sont produits suite à la reproduction des hétérozygotes Hh. Plus il y a de paludisme, plus la valeur sélective des hétérozygotes Hh est élevée et plus il y a de décès par drépanocytose.

Les résultats observés dans mon projet de recherche représentent une des rares démonstrations en nature de la sélection balancée. Ce qui est également novateur, c'est que la sélection balancée ne s'effectue pas sur un seul gène comme c'est le cas pour la drépanocytose, où c'est la protéine hémoglobine qui est en cause. Chez les perchaudes, la sélection balancée s'effectue sur une partie d'une région régulatrice, dans notre cas sur la région répétée R2 de l'IGS, qui contrôle l'expression des gènes, la transcription de l'ADN ribosomal. Cette différence pourrait représenter une solution évolutive simple et efficace, c'est-à-dire, plutôt que de favoriser des allèles qui modifient la structure et la fonction des protéines, comme c'est le cas pour la drépanocytose, les allèles maintenus chez les perchaudes modifient ce qui contrôle la quantité de protéines. Ceci pourrait être un ajustement évolutif plus simple et efficace.

Sélection au niveau spatial et ontogénique

Notre deuxième objectif était de déterminer s'il y avait une sélection de nature spatiale, au niveau du marqueur de l'IGS qui s'exerce sur les différentes rives du LSP (rive nord et rive sud). Étant donné les différences de croissance observées chez les perchaudes du LSP entre les différentes rives (Tardif et al. 2005; Glémet et Rodriguez 2007), notre prédiction était qu'il y aurait une différence spatiale au niveau des génotypes entre les perchaudes des rives nord et sud. En d'autres termes, le génotype 22-22 serait favorisé au niveau de la rive sud, alors qu'au niveau de la rive nord, c'est le

génotype 4-4 qui serait favorisé, créant une différence spatiale au niveau des génotypes entre les perchaudes des différentes rives.

Pour répondre à cet objectif, nous avons fait un test de différenciation entre les perchaudes de la rive nord et celles de la rive sud. Nous avons testé l'hypothèse nulle qui dit que les fréquences alléliques sont identiques entre les individus des rives nord et sud, donc qu'il n'existe pas de différence entre les deux rives. Ce test a été effectué chez les larves ($p = 0,9049$) et chez les adultes ($p = 0,99$) provenant des rives nord et sud. Les résultats ne sont pas significatifs et il n'y a pas de différence entre les rives nord et sud.

Notre troisième objectif consistait à déterminer si les effets de la sélection s'accumulent avec le temps au niveau du marqueur de l'IGS. Nous voulions tester spécifiquement la variation temporelle dans la sélection, afin de connaître la survie différentielle de certains génotypes des adultes par rapport aux larves. De façon plus précise, nous voulions déterminer si les proportions des deux homozygotes 4-4 et 22-22 ainsi que celle de l'hétérozygote 4-22 allaient changer entre le stade larvaire et le stade adulte. Est-ce que la sélection favoriserait un génotype plus qu'un autre au cours de l'ontogénie de la perchaude, forçant la proportion à changer au stade adulte? Nos prédictions étaient qu'au stade larvaire, nous nous attendions à retrouver les trois différents génotypes (4-4, 4-22 et 22-22). Puis, au cours de l'ontogénie la sélection favoriserait les génotypes permettant de meilleurs taux de croissance, donc une majorité d'adultes possédant le génotype 22-22 était attendu.

Afin de répondre à cet objectif, deux tests ont été effectués. Tout d'abord, nous avons fait un test d'équilibre d'Hardy-Weinberg sur les génotypes d'IGS des perchaudes larves et juvéniles/adultes ensemble. Ce test nous permettait de vérifier en premier lieu s'il existe une inadéquation entre les génotypes et les allèles. Le résultat de ce test n'est pas significatif ($p = 0,6383$), ce qui signifie que les génotypes des larves et des juvéniles/adultes au LSP sont en équilibre. Par la suite, nous avons effectué un test de différenciation sur les perchaudes en séparant les adultes et les larves en deux populations distinctes. Ce second test nous permettait de vérifier les différences au niveau de l'abondance des allèles. Les analyses statistiques nous confirment qu'il n'y a pas de différence significative ($p = 0,0798$) entre les larves et les adultes. Contrairement

à ce que nous nous attendions au départ au niveau de la variation temporelle dans la sélection, la survie différentielle des adultes par rapport aux larves reste inchangée.

Taux de croissance et importance fonctionnelle de l'hétérogénéité de la longueur de l'IGS

Notre quatrième objectif était de déterminer s'il existe un lien fonctionnel entre le génotype des individus et le taux de croissance à court terme, comme ce qui a déjà été observé dans la littérature chez les invertébrés. En effet, l'importance fonctionnelle de l'IGS a déjà été démontrée chez des Arthropodes comme la drosophile (Cluster et al. 1987; Grimaldi et Di Nocera 1988) et la daphnie (Gorokhova et al. 2002). Dans ces trois études, les individus qui possédaient de plus longs IGS avaient de meilleurs taux de croissance que les individus qui possédaient de plus courts IGS, en raison du nombre plus élevé d'éléments de régulation capables de supporter de plus haut taux de croissance.

Notre prédiction par rapport à cet objectif était qu'il allait y avoir un lien entre les taux de croissance et les génotypes des individus. Nous nous attendions donc à ce que les individus possédant le plus court IGS (génotype 4-4) possèdent les plus bas taux de croissance par rapport aux individus possédant le plus long IGS (génotype 22-22) et ayant les plus haut taux de croissance. En revanche, les individus possédant un IGS intermédiaire (génotype 4-22) auraient des taux de croissances intermédiaires.

Les résultats de nos analyses nous ont montré qu'il n'existe pas de lien entre les taux de croissance à court terme et les génotypes des perchaudes au LSP. En effet, nous avons tout d'abord effectué une analyse de la variance à deux voies (two-way ANOVA) en comparant les rapports ARN/ADN pour les trois différents génotypes et en mettant en co-variable les différentes classes d'âge des perchaudes adultes ($F = 0,8278$ et $p = 0,5794$).

Les analyses de nos résultats confirment qu'il n'y a pas de lien fonctionnel entre les génotypes d'IGS et les rapports ARN/ADN chez les perchaudes du LSP contrairement à ce qui avait été observé dans la littérature chez des invertébrés élevés en laboratoire. Nous avons plutôt observé une grande variabilité du rapport ARN/ADN

pour chacun des génotypes. La croissance à court terme était semblable pour tous les génotypes et le lien fonctionnel proposé ne ressortait pas.

La variabilité observée pourrait s'expliquer par le fait que le rapport ARN/ADN est un indice biochimique à courts termes qui répond rapidement aux changements environnementaux, surtout aux changements récents de température et de diète dans le milieu (Bulow 1987; Martin et Wright 1987). Comme le LSP est un lac fluvial extrêmement hétérogène au niveau spatio-temporel (Frenette et al. 2003; Tardif et al. 2005; Glémet et Rodriguez 2007), les influences environnementales pourraient masquer les influences de la génétique de façon à rendre très difficile la détection d'un lien fonctionnel entre l'IGS et la croissance.

3.2 Conclusion

S'il existe réellement un lien avec le métabolisme et la croissance, il serait vraisemblablement plus avantageux pour un individu d'être hétérozygote en possédant deux allèles (4 et 22) afin de pouvoir compter sur l'un ou l'autre. En effet, dans les milieux naturels, les organismes n'ont pas toujours besoin d'avoir une grande production de ribosomes (Cluster et al. 1987). Le fait d'avoir deux allèles pourrait permettre à l'organisme de réguler la quantité de ribosomes et de ne pas en produire en excès, comme cela pourrait être le cas pour l'homozygote 22-22. Si les individus sont homozygotes (4-4 ou 22-22), ils peuvent produire trop ou pas assez de ribosomes. Dans les deux cas, ces individus pourraient atteindre une croissance adéquate. Par contre, si les individus sont hétérozygotes (4-22), la quantité de ribosomes pourrait être modulée de façon optimale pour permettre une croissance idéale. En d'autres termes, un hétérozygote 4-22 aurait une étendue plus grande d'expression possible au niveau de son taux de croissance.

Il serait intéressant, dans de futurs travaux, d'effectuer une étude en laboratoire où des perchaudes seraient élevées sous des conditions contrôlées. En effet, les conditions d'élevage susceptibles d'influencer la croissance, comme la température et la diète, pourraient être contrôlées. De plus, des perchaudes qui sont au même stade de vie pourront être suivies et analysées. Le taux de croissance absolu, basé sur la prise de poids et l'indice biochimique du rapport ARN/ADN pourront être déterminés chez les

individus et mis en lien avec leur génotype d'IGS. De cette façon, le lien fonctionnel entre la croissance et le génotype d'IGS, s'il est présent, pourrait être plus facilement observable.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alvares LE, Brison O, Ruiz IRG (1998) Identification of enhancer-like elements in the ribosomal intergenic spacer of *Odontophrynus americanus* 2n and 4n (Amphibia, Anura). *Genetica* **104**(1): 41-44.
- Arbanasic H, Duras M, Podnar M, Gomercic T, Curkovic S, Galov A (2014) Major histocompatibility complex class II variation in bottlenose dolphin from Adriatic Sea : inferences about the extent of balancing selection. *Marine Biology* **161** : 2407-2422.
- Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **263**(1377): 1619-1626.
- Beitinger TL (2000) Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes* **58**(3): 237-275.
- Bertolo A and Magnan P (2005) The relationship between piscivory and growth of white sucker (*Catostomus commersoni*) and yellow perch (*Perca flavescens*) in headwater lakes of the Canadian Shield. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **62**(12): 2706-2715.
- Brodeur P, Mingelbier M, Morin J (2004) Impacts des variations hydrologiques sur les poissons des marais aménagés le long du Saint-Laurent fluvial. *Société de la faune et des parcs du Québec, Direction de la recherche sur la faune*, 60 p.
- Buckley L, Caldarone E, Ong TL (1999) RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia* **401**: 265-277.
- Bulow FJ (1987) RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: a review. In: Summerfelt RC and Hall GC (eds). *The age and growth of fish*. The Iowa State University Press, Ames, 45-64.
- Cambell NA et Reece JB (2007) Biologie. Saint-Laurent (Québec): Éditions du Renouveau Pédagogique Inc. 1440 p.
- Castro J, Sanchez L, Martinez P, Lucchini SD (1997) Molecular analysis of a NOR site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*): organization of rDNA intergenic spacers. *Genome* **40**(6): 916-922.

Clarke B, Kirby D (1966) Maintenance of histocompatibility polymorphism. *Nature* **211** : 999-1000.

Confer JL, Lake GJ (1987) Influence of prey type on growth of young yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **44** : 2028-2033.

Cluster PD, Marinkovic D, Allard RW, Ayala FJ (1987) Correlations between development rates, enzyme-activities, ribosomal DNA spacer-length phenotypes, and adaptation and in drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(2): 610-614.

Doherty PC, Zinkernagel RM (1975) Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* **256** : 50-52.

Folkvord A, Jørgensen C, Korsbrette K, Nash RDM, Nilsen T (2014) Trade-offs between growth and reproduction in wild Atlantic cod. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **71** : 1-7.

Fortin R, Magnin E (1972) Croissance en longueur et en poids des perchaudes *Perca flavescens* de la Grande Anse de l'île Perrot au lac Saint-Louis. *Journal of the fisheries board of Canada* **29**: 517-523.

Frenette JJ, Arts MT, Morin J (2003) Spectral gradients of downwelling light in a fluvial lake (Lake Saint-Pierre, St-Lawrence River). *Aquatic Ecology* **37**(1): 77-85.

Glemet H, Rodriguez MA (2007) Short-term growth (RNA/DNA ratio) of yellow perch (*Perca flavescens*) in relation to environmental influences and spatio-temporal variation in a shallow fluvial lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **64**(12): 1646-1655.

Glover DC, Dettmers JM, Wahl DH (2008) Yellow perch (*Perca flavescens*) stock structure in Lake Michigan: an analysis using mark-recapture data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **65**(9): 1919-1930.

Gorokhova E, Dowling TE, Weider LJ, Crease TJ, Elser JJ (2002) Functional and ecological significance of rDNA intergenic spacer variation in a clonal organism under divergent selection for production rate. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **269**(1507): 2373-2379.

Graeb BDS, Dettmers JM, Wahl DH, Caceres CE (2004) Fish size and prey availability affect growth, survival, prey selection, and foraging behavior of larval yellow perch. *Transactions of the American Fisheries Society* **133**(3): 504-514.

Griffiths A, Wessler S, Lewontin R, Carroll S (2010) Introduction à l'analyse génétique. Bruxelles : Éditions De Boek. 856 p.

Grimaldi G, Di Nocera PP (1988) Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate ribosomal-RNA precursor transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(15): 5502-5506.

Hedrick PW (1999) Balancing selection and MHC. *Genetica*, **104**: 207-214.

Heino M, Kaitala V (1999) Evolution of resource allocation between growth and reproduction in animals with indeterminate growth. *Journal of Evolution Biology* **12**: 423-429.

Hudon C (1997) Impact of water level fluctuations on St. Lawrence River aquatic vegetation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**(12): 2853-2865.

Huggins K, Frenette JJ, Arts MF (2004) Nutritional quality of biofilms with respect to light regime in Lake Saint-Pierre (Québec, Canada). *Freshwater biology* **49**: 945-959.

Hughes AL, Nei M (1988) Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* **335**: 167-170.

Huh HT, Calbert HE, Stuibler DA (1976) Effects of temperature and light on growth of yellow perch and walleye using formulated feed. *Transactions of the American Fisheries Society* **105**(2): 254-258.

Jorgensen C, Ernande B, Fiksen O, Dieckmann U (2006) The logic of skipped spawning in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **63**(1): 200-211.

Kakou, Bidénam (2008) Hétérogénéité de l'espaceur intergénique et croissance chez la perchaude (*Perca flavescens*). Mémoire. Trois-Rivières, Université du Québec à Trois-Rivières, 65 p.

Kozlowski J (1996) Optimal allocation of resources explains interspecific lifehistory patterns in animals with indeterminate growth. *Proceeding of the Royal Society Biology* **263**(1370): 559-566.

Kreitman M, Hudson RR (1991) Inferring the evolutionary histories of the Adh and Adh-dup loci in *Drosophila melanogaster* from patterns of polymorphism and divergence. *Genetics society of America*, **127**: 565-582.

La Violette N, Fournier D, Dumont P, Mailhot Y (2003) Caractérisation des communautés de poissons et développement d'un indice d'intégrité biotique pour le fleuve Saint-Laurent, 1995-1997. Société de la faune et des parcs du Québec, Direction de la recherche sur la faune, 237 p.

Leclerc E, Mailhot Y, Mingelbier M, Bernatchez L (2008) The landscape genetics of yellow perch (*Perca flavescens*) in a large fluvial ecosystem. *Molecular Ecology* **17**(7): 1702-1717.

Leung C, Magnan P, Angers B (2011) Genetic evidence for sympatric populations of yellow perch (*Perca flavescens*) in lake Saint-Pierre (Canada): the crucial first step in developing a fishery management plan. *Journal Aquaculture research and development* **S6**:001.

Malzahn AM, Clemmenson C, Rosenthal H (2003) Temperature effects on growth and nucleic acids in laboratory-reared larval coregonid fish. *Marine Ecology Progress Series* **259**: 285-293.

Martin FD et Wright DA (1987) Nutritional state analysis and its use in predicting striped bass recruitment: laboratory calibration. American Fisheries Society Symposium **2**:109-114

McDowall RM (1994) On size and growth fish. *Ecology of freshwater fish* **3**(2): 67-79.

Miller LM, Kallemeyn L, Senanan W (2000) Spawning-site and natal-site fidelity by northern pike in a large lake : mark-recapture and genetic evidence. *Transactions of the American fisheries Society* **130** : 307-316.

O'Farrell B, Dennis C, Benzie JA, McGinnity P, Carlsson J, De Eytos E, Coughlan JP, Igoe F, Meehan R, Cross TF (2012) Balancing selection on MHC class I in wild brown trout *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology* **81** : 1357-1374.

Pelan S (2004) Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-208G1 in linkage group 14, complete sequence., from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>.

Pikaard CS (2000) Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. *Plant Molecular Biology* **43**(2-3): 163-177.

Post JR, Evans DO (1989) Experimental-evidence of size-dependent predation mortality in juvenile yellow perch. *Canadian Journal of Zoology* **67**(2): 521-523.

Reed KM, Phillips RB (2000) Structure and organization of the rDNA intergenic spacer in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Chromosome Research* **8**(1): 5-16.

Rideout RM, Rose GA, Burton MP (2005) Skipped spawning in female iteroparous fishes. *Fish and Fisheries* **6**: 50-72.

Rideout RM, Tomkiewicz J (2011) Skipped spawning in fishes : more common than you might think. *Marine and Coastal Fisheries : Dynamics, Management and Ecosystem Science* **3**: 176-189.

Shaw R.G, Geyer CJ, Wagenius S, Hangelbroek HH, Etterson JR (2008) Unifying life-history analyses for inference of fitness and population growth. *American Naturalist* **172**(1): E35-E47.

Slade RW, McCallum HI (1992) Overdominant vs. frequency-dependent selection at MHC loci. *Genetics* **132**: 861-864.

Stuart MJ, Nagel RL (2004) Sickle-cell disease. *Lancet* **364**(9442) :1343-1360.

Takahata N, Nei M (1990) Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* **124**: 967-978.

Tardif D, Glémet H, Brodeur P, Mingelbier M (2005) RNA/DNA ratio and total length of yellow perch (*Perca flavescens*) in managed and natural wetlands of a large fluvial lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **62**(10): 2211-2218.

Thorpe JE (1977) Morphology, physiology, behavior, and ecology of *Perca fluviatilis* and *Perca flavescens* Mitchill. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **34**: 1504-1514.

Wahl CM, Mills EL, McFarland WN, DeGisi JS (1993) Ontogenic changes in prey selection and visual acuity of yellow perch, *Perca flavescens*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**: 743-749.

Weider LJ, Mateos M, Cotner JB, Markow TA (2005) The functional significance of ribosomal (r)DNA variation: Impacts on the evolutionary ecology of organisms. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. Palo Alto, Annual Reviews. **36**: 219-242.

Whiteside MC, Swindoll CM, Doolittle WL (1985) Factors affecting the early life-history of yellow perch, *Perca flavescens*. *Environmental Biology of Fishes* **12**(1): 47-56.