



Estimation du succès reproducteur dans une population sauvage d'épinoche à trois-épines (*Gasterosteus aculeatus*) par l'utilisation de juvéniles

Mémoire

Sann Delaive

Maîtrise en biologie - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Sann Delaive, 2020

**Estimation du succès reproducteur dans une population
sauvage d'épinoche à trois-épines (*Gasterosteus
aculeatus*) par l'utilisation de juvéniles.**

Mémoire

Sann Delaive

Sous la direction de :

Nadia Aubin-Horth, directrice de recherche
Louis Bernatchez, codirecteur de recherche

Résumé

La sélection sexuellement antagoniste découle d'une différence dans la valeur optimale d'un trait qui prend des directions opposées entre les sexes. Si ce phénotype est lié à une région du génome partagée entre les sexes, cela donne naissance à un conflit entre mâles et femelles qu'on appelle conflit sexuel intra-locus, de telle façon qu'un allèle donné mènera à un phénotype augmentant le fitness des femelles et diminuant celui des mâles ou inversement. De plus en plus de traits présentant un conflit sont découverts chez de multiples taxa, mettant ainsi en évidence les nombreuses conséquences que ce processus peut avoir d'un point de vue évolutif. Néanmoins, les mesures de fitness des individus sont absentes de la plupart des études sur l'identification génomique des conflits. Comprendre les conséquences des conflits sexuels intra-locus sur le fitness d'individus en milieu naturel nous éclairera sur le potentiel rôle que joue la sélection sexuellement antagoniste dans des procédés tel que le maintien de la diversité génétique au sein d'une population/espèce.

L'objectif initial de mon projet était donc d'utiliser le succès reproducteur comme un indicateur de valeur sélective (fitness) et de faire le lien entre ce dernier et des mesures de conflit à l'échelle du génome entier chez des mâles et des femelles d'une population sauvage. Nous avons ainsi étudié la population d'épinoche à trois-épines (*Gasterosteus aculeatus*) de l'Estuaire du fleuve Saint-Laurent. Cependant, nous avons dû faire face à de nombreux obstacles dans l'obtention de nos échantillons. Ces complications ont mené à des changements importants dans le déroulement du projet et notre attention s'est finalement portée sur la compréhension de la dynamique de reproduction des épinoches à trois-épines dans les marelles. Dans un premier temps, nous avons validé l'identification visuelle des juvéniles d'épinoches par une identification génétique de l'espèce des juvéniles. Nous avons également réalisé des lectures otolithiques pour évaluer l'âge des parents potentiels. Puis, nous avons génotypé les parents potentiels et les juvéniles de l'année à l'aide de marqueurs microsatellites pour réaliser l'assignation parentale de juvéniles échantillonnés dans les marelles de la réserve nationale de l'Isle-Verte

durant la période de reproduction avec les adultes identifiées comme s'étant potentiellement reproduit. L'absence de correspondance entre les adultes et les juvéniles échantillonnés suggère que la reproduction des adultes de même que le mouvement des juvéniles sont grandement affectés par les marées du fleuve dans ce système, ce qui représentent d'importantes contraintes pour une estimation rigoureuse du succès reproducteur.

Abstract

Sexually antagonistic selection results from divergent optimal values for a trait between sexes. When this phenotype is linked to a sexually shared genomic region, it gives birth to a conflict between males and females named intra-locus sexual conflict. In this case, a given allele will enhance female fitness but will diminish male fitness or vice-versa. During the last decades, research efforts allowed to discover such traits in several taxa. These observations stress the multiple consequences that this process can have from an evolutionary standpoint. However, fitness assessment is often missing in genomic studies focusing on sexual conflict. Therefore, there is a need to provide a better understanding of the consequences of intra-locus sexual conflict on individual fitness in nature. Filling this gap of knowledge will shed light on the potential role of sexually antagonistic selection on several evolutionary processes (e.g. the maintenance of genetic diversity in populations/species).

The objective of our study was to link reproductive success measurements, used here as a proxy of fitness, with genomic data from a wild population of males and females. To do so, we studied a three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) population from the St. Lawrence River. However, we had to face numerous obstacles in the acquisition of our samples. These complications led to major changes in the project progress and our attention finally focused on the reproduction's dynamic of three spined stickleback in pounds. First, we validated a visual method of identification for the juvenile sticklebacks by using a genetic approach to determine the species of the juveniles. We also used the otolith to assess the age of the potential parents. Then, we genotyped the potential parents and some juveniles of the year with several microsatellite markers to realize a parental assignation. The juveniles were sampled from ponds of the "Réserve nationale de l'Isle-Verte" during the reproductive period. We used parentage analysis of the juveniles sampled during the reproductive period with potentially reproductive adults from the same sampling sites. Our results suggest that adult reproduction and juvenile dispersal are largely affected by tides which represent important constraints for a rigorous estimation of reproductive success.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières	vi
Liste des figures, tableaux, illustrations.....	viii
Remerciements	x
Introduction.....	1
1. Les conflits sexuels	1
2. La détection des conflits sexuels, un défi majeur.	3
3. L'épinoche à trois épines comme nouveau modèle.....	6
1. Matériels et Méthodes	8
1.1. Système d'étude.	8
1.1.1. Lieu d'étude.....	8
1.1.2. Méthode de calcul de succès reproducteur : œufs vs juvéniles.....	9
1.2. Échantillonnage.....	11
1.3. Identification de l'espèce des juvéniles d'épinoches à trois épines, à neuf épines et tacheté.	14
1.3.1. Identification morphologique.....	14
1.3.2. Identification par utilisation d'un marqueur génétique.	16
1.4. Vérification de l'âge des individus.	18
1.4.1. Lecture d'otolithes chez les épinoches adultes.....	19
1.4.2. Lecture d'otolithes chez les épinoches juvéniles.	21
1.5. Génotypage	23
1.6. Assignment parentale.....	24
1.6.1. Simulation d'assignment parentale avec CERVUS.....	26
1.6.2. Analyse d'assignment parentale à l'aide de CERVUS.	26
1.6.3. Analyse de parenté avec COLONY.	28
2. Résultats.....	30
2.1. Identification morphologique.....	30
2.2. Différenciation des adultes en fonction de leur classe d'âge.....	31
2.3. Distribution de l'âge des juvéniles échantillonnés.	32
2.4. Simulation de la puissance des assignments parentales avec 6 vs 10 microsatellites dans CERVUS.	33

2.5. Résultats d'assignation parentale avec CERVUS.	35
2.6. Résultats d'assignation parentale avec COLONY.	38
2.7. Analyse de parenté sans le marqueur <i>Gac46</i>	38
3. Discussion	40
3.1. Remise en question de l'identification morphologique à l'espèce des épinoches des marelles.	40
3.2. Utilisation de la taille comme estimateur de l'âge chez les adultes épinoche à trois épines.	42
3.3. Importance du choix des marqueurs moléculaires dans les études d'apparentement.	43
3.4. Limitation du système de marelles dans l'étude du succès reproducteur	44
Conclusion	47
Bibliographie.....	49

Liste des figures, tableaux, illustrations

Figures :

Figure 1 : Représentation temporelle de l'échantillonnage.

Figure 2 : Clé d'identification à l'espèce des juvéniles épinoches (*G. aculeatus*, *G. wheatlandi* et *P. pungitius*) des marelles.

Figure 3 : Différenciation des juvéniles *G. aculeatus* et des juvéniles *G. wheatlandi* sur gel d'agarose.

Figure 4 : Distribution de taille des adultes épinoches à trois épines mâles selon 2 modes correspondant potentiellement aux classes d'âges.

Figure 5 : Otolithe d'un adulte épinoche à trois épines 1+.

Figure 6 : Otolithe d'un adulte épinoche à trois épines 2+.

Figure 7 : Caractérisation de l'otolithe d'un juvénile d'épinoche à trois épines.

Figure 8 : Clé de décision pour le choix d'une méthode d'analyse de parenté (inspiré de Jones et al 2010)

Figure 9 : Distribution de taille des adultes épinoche à trois épines femelles.

Figure 10 : Distribution de l'âge des juvéniles d'épinoche à trois épines dans les marelles échantillonnées.

Tableaux :

Tableau 1 : Répartition des adultes épinoche à trois épines en fonction de leur sexe et de leur marelle d'origine.

Tableau 2 : Taux de réussite de la méthode d'identification morphologique après vérification avec le marqueur de la *Cytochrome oxydase I*.

Tableau 3 : Comparaison des taux d'assignation obtenus par simulation dans CERVUS avec un jeu de 6 et un jeu de 10 microsatellites.

Tableau 4 : Caractérisation des microsatellites utilisés pour les individus de la marelle 3.

Tableau 5 : Résultats de l'analyse d'assignation parentale réalisée avec CERVUS sur l'ensemble des individus de la marelle 3 avec 10 microsatellites.

Tableau 6 : Comparaison des taux d'assignations des juvéniles de la marelle 3 en fonction de la période d'échantillonnage avec CERVUS.

Tableau 7 : Résultats de l'analyse d'assignation parentale réalisée avec COLONY sur l'ensemble des individus de la marelle 3 avec 10 microsatellites.

Tableau 8 : Taux d'erreurs de chaque microsatellite utilisé obtenus dans COLONY.

Tableau 9 : Taux d'assignation obtenu dans CERVUS après avoir retiré le microsatellite *Gac46* du jeu de données.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ma maîtrise et qui m'ont aidée tout au long du périlleux processus que fut son accomplissement.

Je voudrais dans un premier temps remercier, ma directrice de maîtrise Nadia Aubin-Horth ainsi que mon co-directeur Louis Bernatchez, professeurs de biologie à l'université Laval, pour votre indéfectible optimisme, votre soutien constant et vos judicieux conseils.

Je remercie également tous les membres des laboratoires Aubin-Horth et Bernatchez pour m'avoir fait grandir en tant que scientifique mais aussi en tant que personne.

Je tiens à remercier spécialement Cécilia Hernandez, Bérénice Bougas et Alysse Perrault-Payette pour m'avoir aidé en toutes circonstances (il y a eu beaucoup de circonstances ...) et m'avoir patiemment appris les pratiques de laboratoire nécessaires à mon projet. Un remerciement spécial également à Kyle Wellband et son apport considérable aux processus d'analyses de parenté ainsi qu'à Florent Sylvestre pour son aide sur le terrain et son apport essentiel à ma réflexion.

Un grand merci à mon père, Serge Delaive, pour ses corrections orthographiques et ses conseils concernant mon style d'écriture, ils ont grandement facilité mon travail.

Enfin, je remercie ma famille et mes très chers amis qui ont toujours été là pour moi. Les espoirs qu'ils ont placés en moi ont été une source inépuisable de motivation et leur soutien inconditionnel a été d'une grande aide.

Introduction

À travers le règne du vivant, la présence de deux sexes distincts au sein d'une même espèce constitue un caractère répandu. Ce caractère est appelé gonochorisme et découle très souvent en d'importantes différences entre mâles et femelles. Ces différences sont reprises sous le nom de dimorphisme sexuel. Elles peuvent être assez évidentes comme c'est le cas pour les différences d'appareils génitaux chez l'humain ou encore la présence de patrons de coloration sexe-spécifique chez la vipère péliade, *Vipera berus* (Forsman 1995). Cependant, ces différences peuvent être observées à différents niveaux (morphologiques, comportementales, génétiques, etc) et ne sont donc pas toujours visibles comme le montrent l'anisogamie, c'est-à-dire les différences de taille des gamètes utilisés par chaque sexe et les coûts liés à ceux-ci (Schärer et al. 2012). L'existence de telles différences aboutit à des intérêts évolutifs divergents entre les individus mâles et femelles générant dans la foulée un conflit entre les sexes (Parker 2006). Par exemple, chez de nombreuses espèces sexuées, la présence d'un seul gamète immobile chez la femelle favorise un accouplement unique associé à un choix du partenaire plus méticuleux, alors que l'existence de nombreux gamètes mobiles chez le mâle favorise un grand nombre d'accouplements et réduit l'importance du choix de partenaire.

1. Les conflits sexuels.

Chaque sexe possède un optimum de fitness pour un trait donné qui s'oppose souvent entre les deux sexes (Parsch et Ellegren 2013). Si le trait a une base génétique différente chez les sexes, aucun conflit n'est engendré. Cependant, puisque la majorité du génome est partagée par tous les individus, la probabilité que les bases génétiques du trait considéré soient également partagées est élevée. Un changement quelconque causant une nouvelle pression de sélection au sein d'une population pourra avoir des conséquences différentes sur le fitness des deux sexes, engendrant ainsi un conflit (Connallon et Clark 2013). Ces processus sélectifs provenant de pressions de sélection opposées entre les sexes et engendrant un

conflit sont repris sous le nom de sélection sexuellement antagoniste. La sélection sexuellement antagoniste est elle-même une forme de sélection balancée par sa capacité à maintenir activement plusieurs allèles au sein du pool génétique d'une population (Fijarczyk et Babik 2015). Elle peut prendre plusieurs formes dont celle d'un conflit sexuel intra-locus. Un tel conflit résulte de pressions de sélections conflictuelles entre mâles et femelles pour un allèle sur un même locus (Mank et al. 2020). Un conflit sexuel intra-locus peut donc se résumer au constat « deux sexes, un génome ». En effet comme décrit précédemment, la majeure partie du génome étant partagée et les optima de fitness pour un trait donné étant différents entre les sexes, les individus d'un sexe ne peuvent atteindre l'optimum pour ce trait qu'au détriment de l'autre sexe. Ce phénomène aboutit donc à l'observation qu'un même allèle donne un phénotype « bénéfique » chez le mâle mais un phénotype « délétère » chez la femelle pour ledit trait (Innocenti et Morrow 2010). C'est le cas du scarabée *Gnatocerus cornutus* dont le développement de grandes mandibules chez le mâle pour la compétition intra-sexuelle engendre une réduction de la largeur de l'abdomen qui, lorsque présente chez les femelles, les empêche de transporter autant d'œufs que les femelles à petites mandibules (Harano et al. 2010). Ou encore des mâles chèvres de montagne (*Oreamnos americanus*) présentant une masse importante, un trait essentiel pour leur succès reproducteur, qui engendrent des mâles de haut fitness mais des femelles de fitness réduits (Mainguy et al. 2009).

Selon ces observations, il n'est pas étonnant de constater que les conflits sexuels intra-locus soient répandus à travers les taxa. En effet, des cas de conflits sexuels ont été documentés chez des hexapodes (Chippindale et al. 2001), des reptiles (Forsman 1995), des poissons (Roberts et al. 2009), des oiseaux (Merila et al. 2006) et des mammifères (Foerster et al. 2007). Outre son importance dans le maintien de la diversité génétique, les conflits sexuels intra-locus tiennent également une place centrale dans l'explication de nombreux phénomènes biologiques tels que les variations dans le rapport de sexes (Alonzo et Sinervo 2007), l'évolution des chromosomes sexuels (Van Doorn et Kirkpatrick 2007) ou encore la sélection sexuelle au sens large (Pischedda et Chippindale 2006).

2. La détection des conflits sexuels, un défi majeur.

Le défi majeur dans l'étude des conflits sexuels a très longtemps résidé dans sa détection (Bonduriansky 2011). En effet, son apparition est souvent suivie du développement de modifications génétiques spécifiques à chaque sexe, tel l'épissage alternatif, les changements épigénétiques ou encore le dimorphisme de l'expression de gènes qui permettent la résolution du conflit (Cox et Calsbeek 2009). La résolution d'un conflit engendrera dans la majorité des cas un dimorphisme sexuel permettant aux sexes de développer des phénotypes distincts dans le but d'atteindre leur optimum de fitness (Parsch et Ellegren 2013). Du fait de leur capacité à être résolus, les conflits sexuels peuvent être considérés par moment comme étant transitoires et donc difficiles à détecter (Bonduriansky et Chenoweth 2009). Cependant, la résolution immédiate de ces derniers est souvent impossible en raison de l'architecture génétique sous-jacente au trait. C'est le cas lorsqu'une interaction pléiotropique existe entre des gènes sous conflits et d'autres qui ne le sont pas ou encore lorsqu'un gène sous conflit se retrouve sous sélection de par sa proximité avec un autre gène d'intérêt (Pennell et Morrow 2013). Malgré leur possible résolution, les conflits sexuels peuvent donc également être maintenus dans le génome et participer au maintien du polymorphisme en agissant comme un processus de sélection balancée (Rowe et al. 2018). Néanmoins, le manque de puissance des méthodes utilisées par le passé pour analyser sa détection empêchait de déterminer l'importance des conflits sexuels intra-locus dans le maintien de cette diversité génétique (Fijarczyk et Babik 2015). Son identification était limitée à des études de différences de fitness par sélection artificielle (Rice 2002) ou par analyses d'hémi clones (Chippindale et al. 2001), c'est-à-dire d'individus pour lesquels un chromosome de chaque paire est identique. Avec le développement des techniques de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS), la puissance suffisante pour détecter les changements de fréquences d'allèles à l'échelle du génome entier a été acquise tel que démontré par de récentes études (Jones et al. 2012, Lien et al. 2016).

Depuis que la détection des conflits est rendue plus efficace, quelques rares études ont commencé à s'intéresser aux bases génétiques de ces conflits. Par exemple, Lucotte et al. (2016) ont développé une méthode consistant à calculer des différences de fréquences alléliques entre les deux sexes sous forme de F_{st} (un indice de différenciation génétique) pour détecter les allèles conflictuels. De plus, ils ont proposé que ces variations génétiques intersexuelles se situent surtout au niveau du chromosome sexuel. Ceci est en accord avec d'autres études ayant démontré la propension du chromosome X à accumuler les allèles présentant un conflit sexuel intra-locus (Gibson et al. 2002). Dutoit et al. (2018), de leur côté, ont choisi d'utiliser une mesure d'association entre le biais d'expression des gènes entre les deux sexes et la diversité génétique estimée pour ces locus afin d'identifier la présence de conflits chez le gobemouche à collier (*Ficedula albicollis*). Cependant, cette méthode ne permet pas de garantir que l'association détectée entre ces deux mesures est une conséquence directe de la présence de conflits sexuels mais donne juste une piste sur les régions génomiques à explorer plus en profondeur. Une autre étude marquante est celle de Cheng et Kirkpatrick (2016) dans laquelle est identifié un patron de type « Twin Peaks » représentant la force de sélection sexe-spécifique en fonction du biais d'expression entre les sexes. Ce patron démontre que le niveau de divergence génétique intersexuelle est maximisé chez les locus présentant un biais d'expression modéré vers l'un des deux sexes alors que ce niveau est plus faible (voir même nul) pour des locus exprimés uniquement chez un des deux sexes ou encore pour des locus ne présentant pas de biais d'expression entre les sexes.

Cependant, des études plus récentes ont remis en question l'utilisation des différentes métriques précédemment utilisées pour catégoriser un locus comme étant soumis à un conflit sexuel. Par exemple, Wright et al. (2019) ont démontré que la détection de conflit à partir de valeur de F_{st} intersexuelle est hautement improbable en raison des pressions sélectives et du taux de mortalité irréaliste nécessaire pour les générer. L'étude de Ruzicka et al. (2019) vient également mettre en doute les résultats obtenus par Cheng et Kirkpatrick en 2016. En effet, cette étude

ne détecte aucunement le patron de type Twin Peaks et ce malgré l'utilisation de la même population de *Drosophila melanogaster*.

Une autre méthode pour détecter la présence de conflit sexuel consiste à combiner les métriques génétiques précédemment discutées avec des mesures de fitness. En investiguant l'effet d'un gène détecté comme potentiellement sous conflit sur le fitness d'un individu, il est possible de définir si celui-ci est un conflit anciennement résolu, un conflit en cours ou encore un faux positif lié aux méthodes utilisées. En effet, un gène sous conflit sera associé à une différence de fitness entre sexe alors qu'un gène anciennement sous conflit ou un faux positif n'auront aucun impact sur le fitness des deux sexes. Néanmoins, cette méthode a très peu été utilisée dans les études sur les conflits sexuels de par la difficulté à obtenir des données de fitness fiables. Mis à part Innocenti et Morrow (2010) très peu d'études ont associé l'utilisation de mesures de fitness à la détection de gènes potentiellement sous conflit.

L'étude d'Innocenti et Morrow (2010) s'est basée sur l'utilisation d'une centaine d'haplotypes potentiellement sous sélection sexuellement antagoniste chez des lignées de laboratoire de *D.melanogaster*. Tout d'abord, ils ont identifié les haplotypes potentiellement sous sélection sexuellement antagoniste comme ceux montrant une forte corrélation négative entre le succès reproducteur des mâles et celui des femelles. Ensuite, ils ont caractérisé le profil d'expression de gènes de ces individus afin de détecter des gènes différenciellement exprimés entre les sexes et donc potentiellement conflictuels. Ces observations montrent la valeur ajoutée qu'apporte les mesures de fitness à l'identification de conflits sexuels à l'échelle génomique. Néanmoins, malgré son caractère novateur, le fait que l'expérience ait été réalisée en laboratoire peut entraîner une diminution de la variation du fitness chez les individus. En effet, une population naturelle atteindra rarement son optimum de fitness du fait des fluctuations d'environnement et du flux de gènes provenant d'individus utilisant des habitats différents (Connallon et Clark 2013) . L'utilisation d'individus élevés en laboratoire peut ainsi engendrer une surestimation conséquente de la participation des allèles potentiellement sous sélection sexuellement antagoniste à la variation de fitness observée (Chapman et al. 2003).

Réaliser une étude des bases génétiques des conflits sexuels intra-locus en se basant sur une population naturelle puis confirmer les observations par une étude de fitness sur cette même population permettrait de pallier les lacunes citées plus haut.

3. L'épinoche à trois épines comme nouveau modèle.

L'espèce choisie pour réaliser ce projet est l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). Ce poisson a la particularité de se trouver à la fois dans des milieux d'eau douce (lacs, rivières), mais aussi en milieu marin, autant saumâtre que de fortes salinités où il est soumis à des pressions environnementales de température et de salinité bien différentes.

Son aire de répartition couvre l'ensemble de l'hémisphère Nord, faisant de ce poisson une espèce commune. Cette répartition mondiale permet également d'investiguer des processus évolutifs tels que la radiation adaptative (Hohenlohe et al. 2010) ou encore l'évolution parallèle (Hohenlohe and Magalhaes 2019). Toutes ces caractéristiques font de l'épinoche à trois-épines une espèce modèle pour laquelle un grand nombre d'informations tant écologiques que génétiques (génome de référence) sont disponibles, lui donnant un avantage de poids dans l'étude des conflits sexuels.

De plus, beaucoup d'informations ont été récoltées précédemment sur le cycle de vie et la structure de population des épinoches à trois-épines du Saint-Laurent depuis les années 80 (Vickery et al. 1988, Rico et al. 1991, Fitzgerald et al. 1993, Candolin 2000, Blais et al. 2004, McCairns et Bernatchez 2008), ce qui s'avère crucial dans l'étude des conflits sexuels. Par exemple, il a été démontré que les mâles étaient seuls responsables des soins parentaux que constituent la construction d'un nid, son aération ainsi que sa défense (Vickery et al. 1988). Ces soins sont très coûteux et empêchent le poisson de réaliser d'autres activités vitales telles que la recherche de nourriture. À l'inverse, les femelles ne fournissent aucun

soin parental et réalisent fréquemment des actes de cannibalisme dans le but de retirer les œufs d'une autre femelle d'un nid avant d'y pondre (FitzGerald 1991). Enfin, les mâles se parent d'une couleur rouge durant la période de reproduction. Cette couleur, bien qu'elle joue un rôle majeur dans le choix du partenaire par les femelles (Candolin 2000) rend aussi les individus plus visibles par les prédateurs. Cette multitude de facteurs se traduit en une différence notable dans les coûts de reproduction entre les sexes de cette espèce (Whoriskey et al 1986). Ces informations permettent d'améliorer la compréhension des conflits sexuels potentiellement observés et leur importance en condition naturelle.

Dans ce contexte mon projet avait pour objectif principal l'élaboration d'une méthode de mesure de succès reproducteur en milieu naturel dans le cadre de la détection de conflits sexuels intra-locus. Pour se faire, je voulais tester l'hypothèse selon laquelle la variation allélique des gènes sous sélection sexuellement antagoniste affecte le succès reproducteur chez les deux sexes. Dans ce but, nous avons échantillonné des juvéniles de l'année ainsi que leurs parents potentiels. Tout d'abord, nous avons procédé à la mise au point d'une méthode de différenciation des juvéniles des différentes espèces d'épinoches présentes dans les marelles à l'aide de critères morphologiques et d'une vérification par marqueurs génétiques (objectif spécifique 1). Nous avons également déterminé l'âge de chaque parent potentiel à l'aide d'une lecture d'otolithe et d'observations morphologiques (objectif spécifique 2). Ensuite, nous avons effectué des analyses d'assignation parentale pour quantifier le succès reproducteur en termes de nombre de juvéniles assignés à chaque parent potentiel (objectif spécifique 3).

Cependant, nos analyses ont démontré l'absence de correspondance entre les juvéniles et les parents échantillonnés dans les marelles. Notre étude a donc fini par se focaliser sur l'explication de cette absence de résultat en explorant diverses pistes dans le but de proposer des méthodes d'échantillonnage pertinentes dans des systèmes potentiellement ouverts tel que celui à l'étude.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Système d'étude.

1.1.1. Lieu d'étude.

Plusieurs populations d'épinoches à trois épines vivent dans la région du Québec. La population qui nous intéressait dans cette étude est la population anadrome du Saint-Laurent.

Une étude avait permis de caractériser la structure génétique de cette dernière à l'aide de 10 microsatellites (McCairns et Bernatchez 2008). L'étude a montré que la population se subdivise en deux sous-groupes d'épinoches correspondant aux différents niveaux de salinité observés lorsqu'on s'éloigne de l'embouchure. Le groupe qui a retenu notre intérêt dans la présente étude est celui du milieu de plus haute salinité, entre Cap-Chat et Kamouraska, et plus précisément les individus du site de la Réserve Nationale de Faune de la baie de l'Isle-Verte. La population d'épinoches à trois épines de l'Estuaire est particulièrement intéressante car l'absence de différenciation génétique entre les populations du milieu du fleuve permet d'éliminer le facteur confondant que pourrait être la structure de population dans notre étude (Fitzgerald et al. 1993). En effet, la présence d'une structure de population pourrait engendrer une estimation biaisée de la présence/absence de conflit au niveau d'un locus étant donné que ces deux phénomènes sont détectés à partir de l'indice de différenciation F_{st} .

Un autre avantage majeur réside dans la topologie du lieu. En effet, le domaine de l'Isle-Verte est composé d'une multitude de marelles de tailles et de profondeurs variables. Ces marelles se trouvent enclavées entre le fleuve et une digue et sont distribuées le long du fleuve sur une largeur d'environ 500 mètres. Cette courte distance permet le recouvrement de l'entièreté des marelles lors des marées de grandes amplitudes qui ont lieu au printemps (entre avril et juillet). Ces

marées ont lieu tous les 9 à 15 jours et correspondent dans le même temps à l'arrivée des épinoches qui s'installent pour s'y reproduire (Fitzgerald et al. 1993). Ce système de marées/marelles est particulièrement intéressant car il permet de considérer chaque marelle comme un environnement clos à l'intérieur duquel les poissons effectuent l'ensemble de leur activité de reproduction.

1.1.2. Méthode de calcul de succès reproducteur : œufs vs juvéniles.

Dans notre étude, il était nécessaire d'obtenir des mesures de fitness pour chaque sexe et ce de façon précise due à la faiblesse habituelle des signaux renvoyés par les conflits sexuels à l'échelle génomique (Mank 2017). La façon de calculer le succès reproducteur était donc d'une importance primordiale.

Toutes les études ayant estimé le succès reproducteur d'épinoches à trois épines anadromes se sont basées jusqu'à présent sur le calcul du nombre d'œufs obtenus par chaque mâle (Blais et al. 2004). Cette méthode est rendue possible par les comportements territoriaux adoptés par les mâles lors de la période de reproduction. En effet, tout le procédé d'échantillonnage d'un nid est basé sur l'observation des comportements de défense pour identifier le territoire, de construction pour identifier le nid puis d'aération pour définir la présence d'œufs. Cependant, cette méthode comporte deux inconvénients majeurs et peut rapidement mener à un biais d'estimation du succès reproducteur des individus.

Premièrement, un des critères de choix du partenaire chez la femelle est le nombre d'œufs déjà présents dans un nid. Plus le nombre d'œufs est élevé, plus un mâle est favorisé par une femelle (Belles-Isles et al. 1990). Un mâle échantillonné juste après son premier événement de reproduction pourrait donc voir son succès reproducteur sous-estimé. En effet, au lieu de voir ses chances de se reproduire à nouveau s'accroître dû à la présence d'œufs dans son nid, le mâle capturé voit sa période de reproduction s'arrêter prématurément.

À l'inverse, d'autres facteurs peuvent causer une surestimation du succès reproducteur d'un individu. Par exemple, les œufs subissent des actes de cannibalisme fréquents par des femelles et, plus rarement, par des mâles. Chez les mâles ces actes de cannibalisme ont pour but de combler un éventuel manque de nourriture causé par l'obligation de rester à portée de son nid (FitzGerald 1991). Pour les femelles, le cannibalisme correspond plus à une stratégie d'augmentation de leur fitness au détriment des autres femelles (Whoriskey 1991). Un œuf peut donc être compté alors que ce dernier n'aurait potentiellement jamais éclos. En sus, les œufs sont entassés par grappes à l'intérieur du nid ce qui, s'ils ne sont pas suffisamment oxygénés, aura tendance à engendrer l'asphyxie au centre du nid (Whoriskey et Fitzgerald 1994). Deuxièmement, d'un point de vue plus technique, cette méthode nécessite une expertise dans l'observation des comportements des épinoches qui est difficilement accessible. En effet, les comportements d'aération et de construction sont très similaires et le nid n'est accessible qu'en détruisant toute la zone à proximité ce qui rend le procédé hautement risqué car non reproductible en cas d'échec de la récupération du nid, ce dernier s'étant fait détruire lors de la manœuvre.

En revanche, un grand nombre de juvéniles est présent dans les marelles. Ils sont pour la plupart assez gros pour être observés et attrapés avec une seine (maille de ~5mm). De plus, le système étant fermé entre deux marées, si les juvéniles sont récoltés avec la première vague d'adultes reproducteurs, ils devraient forcément être apparentés à ces derniers. L'utilisation de juvéniles permettrait donc de limiter le biais de survie causé par un échantillonnage trop précoce des œufs ainsi que le biais lié au choix du partenaire par les femelles. Cependant, il existe également quelques obstacles à cette méthode. En effet, il est à première vue très difficile de différencier les juvéniles des différentes espèces d'épinoches présentes dans les marelles (*Gasterosteus aculeatus*, *Pungitius pungitius* et *Gasterosteus wheatlandi*) et de nombreuses contradictions existent dans la littérature quant au taux de remplacement des individus d'une marelle lors des marées. Certains articles stipulent que celui-ci est de presque 100% (Fitzgerald et al. 1993) alors que d'autres le considèrent comme pratiquement nul (Blais et al. 2004). Or, connaître ce taux de

remplacement est d'un intérêt majeur pour notre étude car si la connectivité entre les marelles était élevée, il nous serait impossible d'effectuer le calcul du succès reproducteur.

Néanmoins, les avantages apportés par l'échantillonnage des juvéniles étant considérables, nous avons pris la décision d'utiliser cette méthode pour nos calculs de succès reproducteur tout en échantillonnant le maximum d'œufs possible afin d'apporter un point de comparaison entre les deux méthodes.

1.2. Échantillonnage.

Pour notre échantillonnage, trois marelles de grandeurs (i.e. $\sim 10\text{m}^2$) et de profondeurs adéquates (i.e. $\sim 1\text{m}30$) pour pouvoir à la fois observer les comportements reproducteurs des mâles mais aussi pour abriter une vingtaine d'individus au minimum ont été sélectionnées. Des allées et venues répétées ont été effectuées après chaque marée d'intérêt à partir du début du mois de mai 2019 afin de vérifier la présence des épinoches à trois épines dans les marelles (Figure 1).

Les marées d'intérêt, c'est-à-dire d'amplitude suffisante pour recouvrir tous les sites observés, ont été déterminées à partir des données fournies par le site de Marée-Pêche (<https://mareespeche.com/ca/quebec>). Le coefficient de marée de 4,5 correspondait à l'amplitude à laquelle la totalité des sites étaient recouverts. Les poissons ont pu être observés en nombre important après la marée du 7 juin 2019. C'est à partir de ce moment que des observations comportementales ont été initiées

par une équipe composée de trois étudiants et ce jusqu'à la marée suivante (1^{er} juillet 2019).

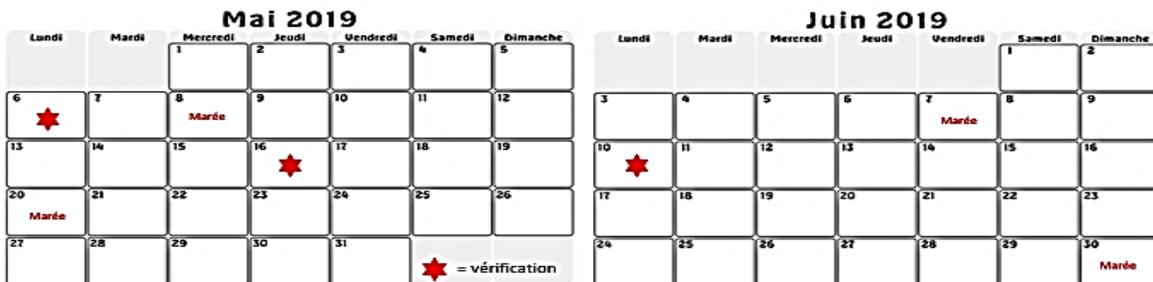
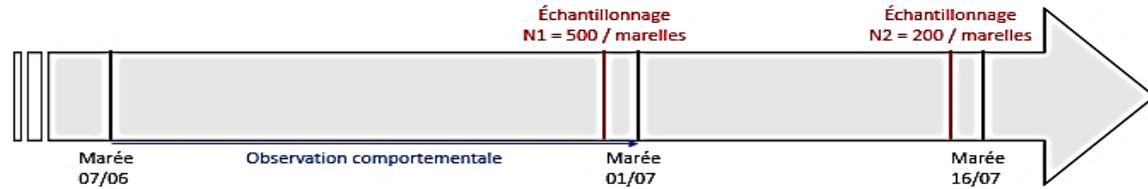


Figure 1 : Représentation temporelle de l'échantillonnage. N1 et N2 correspondent au nombre de juvéniles échantillonnés. Les étoiles rouges représentent les périodes de vérification des marelles pour la présence ou non d'épinoches à trois épines.

Puis, nous avons organisé nos suivis comportementaux de façon à être capables d'observer l'ensemble des mâles reproducteurs de chaque marelle au moins une fois par jour. Pour ce faire, nous avons réalisé des observations quotidiennes de 30 minutes par adulte mâle identifié. Durant ces observations, nous déterminions l'activité principale du poisson en nous basant sur trois critères : le nombre d'interactions mâle-mâle et mâle-femelle était caractérisé comme un comportement de défense du territoire; le nombre de fois ou le mâle enfouissait sa tête à un point précis était caractérisé comme un comportement de construction du nid; le nombre de fois ou le poisson se tenait dos à son nid en agitant fortement les nageoires était caractérisé comme un comportement de ventilation et finalement, le nombre de fois que ce dernier tentait de ramener des femelles à son nid était caractérisé comme un comportement de reproduction.

Si le comportement dominant chez le mâle, c'est-à-dire le comportement effectué plus de 50% du temps dédiés à l'observation, était l'aération / reproduction, le nid était identifié comme prêt à l'échantillonnage et était ramassé dans les 2 jours suivants. Cependant, comme mentionné précédemment, la distinction entre les comportements d'aérations et ceux de constructions s'est avérée bien moins aisée qu'initialement suggérée. De ce fait, beaucoup de comportements d'aération ont été confondus menant à un échantillonnage trop tardif des œufs, ces derniers ayant déjà éclos. Néanmoins, un échantillon de quatre nids a pu être prélevé.

Pour s'assurer de récolter le nid et le mâle correspondant, le mâle reproducteur était d'abord capturé à la pousse. Ensuite, un prélèvement de l'entièreté de la zone potentielle où se trouve le nid était réalisé à l'aide d'une pelle. Cette méthode a forcément créé beaucoup d'agitation dans la marelle et par conséquent a pu créer l'abandon des nids par certains mâles et, dès lors, entraîner un nouveau biais pour les calculs de succès reproducteur, justifiant une nouvelle fois l'utilisation des juvéniles.

Une fois extraits du nid, les œufs étaient séparés en grappes, elles-mêmes placées individuellement dans un tube de 500ml remplis d'éthanol. Enfin, le poisson était sacrifié par exposition prolongée au MS222. Il était pesé au décigramme près, mesuré au millimètre près puis ses deux nageoires pectorales étaient prélevées et placées dans 2ml d'éthanol pour analyses génétiques ultérieures. Chaque poisson était identifié par un numéro de marelle, un sexe ainsi qu'un identifiant individuel.

Une fois le maximum de nids et les mâles reproducteurs correspondant récoltés, nous avons récolté toutes les épinoches à trois épines adultes présentes dans les marelles avant l'arrivée de la grande marée à l'aide d'une seine. Dans le même temps, les juvéniles seinés étaient placés dans des chaudières approvisionnées en oxygène afin d'être triés *a posteriori*.

La différenciation des juvéniles *G.aculeatus*, *G.wheatlandi* et *P.pungitius* était complexifiée par leur petite taille (~1 mm) et aucune clé d'identification

morphologique n'était à notre disposition. Nous avons donc procédé à un premier tri assez sommaire basé principalement sur le nombre d'épines des individus, un caractère facilement identifiable à l'œil nu. Les épinoches tachetées et les épinoches à trois épines possèdent trois épines sur leur dos à l'inverse des épinoches à neuf épines qui en possèdent neuf. De ce fait, seuls les individus ayant trois épines étaient conservés dans la mesure du possible. Un total de 500 juvéniles a été récolté pour chaque marelle afin de s'assurer de posséder un minimum de 300 juvéniles d'épinoche à trois épines une fois une identification plus formelle réalisée. Pour ce qui est des adultes, nous avons récoltés un total de 106 individus adultes (Tableau 1).

Tableau 1: Répartition des adultes épinoches à trois épines en fonction de leur sexe et de leur marelle d'origine.

Sexe	Marelle 1	Marelle 2	Marelle 3	Total
Mâle	17	24	15	55
Femelle	18	19	14	51

1.3. Identification de l'espèce des juvéniles d'épinoches à trois épines, à neuf épines et tachetées.

Un protocole d'identification des espèces à partir des juvéniles a été mis en place en laboratoire. Celui-ci se divisait en deux étapes : une identification morphologique suivie d'une vérification par l'utilisation d'un marqueur génétique.

1.3.1. Identification morphologique.

À partir d'observations répétées de juvéniles, une clé d'identification basée sur trois caractères morphologiques a été testée.

Les trois traits choisis ont été déterminés en premier lieu selon plusieurs caractéristiques que l'on retrouve chez les adultes de la même espèce, puis affinés à la suite d'observations personnelles.

Le premier trait choisi était le nombre d'épines. Ce trait permettait de différencier directement les juvéniles d'épinoche à neuf épines des deux autres espèces présentes dans les marelles. Le deuxième trait utilisé était la brillance du corps des juvéniles. Les adultes épinoche à trois épines sont gris argentés, on a donc considéré que les juvéniles présentant un patron argenté étaient des épinoches à trois épines. Pour les juvéniles présentant un patron tacheté et une couleur plus brunâtre, une dernière observation basée sur la symétrie des taches le long de la ligne latérale était réalisée. Si les tâches étaient distribuées de manière symétrique, on considérait que le juvénile était une épinoche à trois épines. En revanche, si les tâches étaient distribuées sans réelle symétrie, on considérait que le juvénile était une épinoche tachetée (Figure 2).

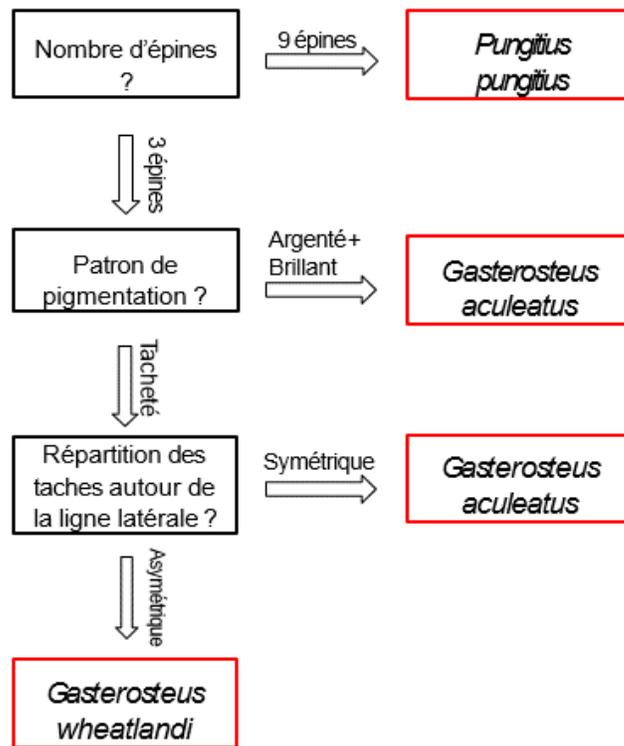


Figure 2 : Clé d'indentification à l'espèce des juvéniles épineches (*G.aculeatus*, *G.wheatlandi* et *P.pungitius*) des marelles.

1.3.2. Identification par utilisation d'un marqueur génétique.

Puisque les caractères morphologiques choisis n'ont jamais été testés de manière empirique, nous avons réalisé une vérification de l'espèce pour les juvéniles identifiés en tant qu'épineches à trois épines. Cette vérification s'est faite à l'aide d'un marqueur génétique. Le marqueur utilisé était le gène de la *cytochrome oxydase I* (ou COI) des poissons. D'origine mitochondriale, ce gène est impliqué dans la réduction de l'oxygène moléculaire. Son intérêt majeur est qu'il présente un taux de mutation élevé permettant de différencier deux espèces étroitement liées tout en étant suffisamment conservé pour être identique entre les individus de la même espèce (Ivanova et al. 2007). De ce fait, il constitue un code barre génétique très utilisé chez les vertébrés. Cette méthode de vérification était relativement rapide

et ne nécessitait qu'une extraction d'ADN suivie d'une simple amplification par PCR (polymerase chain reaction).

Pour ce protocole, une première phase d'extraction d'ADN était nécessaire. Cependant, le nombre d'individus étant très élevé, celle-ci était réalisée à partir d'un protocole de lyse rapide. Ce protocole se base sur la digestion des tissus par un tampon contenant de la protéinase K afin de solubiliser l'ADN. La solution était ensuite centrifugée afin de condenser les déchets dans le fond du tube. Enfin, le surnageant était directement prélevé et l'ADN amplifié à l'aide d'une PCR. Ce protocole permettait d'extraire un ADN de basse qualité mais suffisante pour la suite de l'identification et ce en moins de 24 heures. Après dilution, nous avons utilisé une procédure dite de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) à l'aide de l'enzyme ALU I pour couper le gène COI en deux fragments (Kochzius et al. 2010). Les sites de restriction étant différents entre les espèces, cela nous permettait d'obtenir des fragments de longueurs différentes pour chaque espèce. Enfin, nous avons migré le produit PCR digéré sur un gel d'agarose à 1,5% et nous avons obtenu des patrons de bandes spécifiques à chaque espèce (Figure 3). Pour chaque gel, l'ADN d'une épinoche à trois épines adulte était ajouté afin de servir de contrôle positif. Le processus a été répété jusqu'à l'obtention de 300 juvéniles épinoches à trois épines. Finalement, sept répétitions / essais ont été nécessaires. Ces juvéniles étaient ensuite extraits à nouveau à partir d'une procédure d'extraction au sel afin

d'obtenir de l'ADN de meilleure qualité nécessaire au génotypage par microsatellites (Aljanabi ET Martinez 1997).

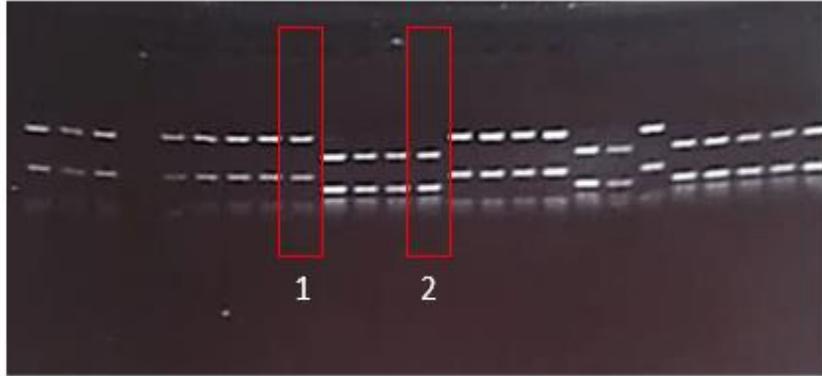


Figure 3 : Différenciation des juvéniles *G.aculeatus* (1) et des juvéniles *G.wheatlandi* (2) sur gel d'agarose. La position d'une bande sur le gel représente la taille du fragment d'ADN résultant de la digestion enzymatique du gène de la *cytochrome oxydase I*.

1.4. Vérification de l'âge des individus.

L'incertitude de l'espèce étant levée, il nous restait à vérifier si les juvéniles échantillonnés étaient susceptibles d'appartenir aux parents récoltés. Sachant que les parents sont demeurés dans une même marelle pour une durée minimum de 15 jours, nous nous attendions à observer des juvéniles âgés de 10 jours ou moins. Des juvéniles plus âgés auraient certainement été issus d'une période de reproduction antérieure et donc probablement apparentés à d'autres adultes.

Pour ce faire, l'extraction d'otolithes de 90 juvéniles tirés au hasard parmi les individus échantillonnés a été réalisé ainsi que celle des adultes pour déterminer leur âge. Les otolithes sont de petits os situés dans l'oreille interne des poissons téléostéens. Ils croissent tout au long de la vie de l'individu par superposition de couches d'aragonites à la manière des cernes des arbres. Il est donc possible en observant attentivement ces cernes de déterminer l'âge du poisson en années ou même au jour près dans le cas des juvéniles, notamment chez l'épinoche à trois-épines (von Hippel et al. 2013).

L'extraction d'otolithe se déroulait de la même manière que ce soit pour les adultes ou pour les juvéniles. Nous commençons par couper la tête en longueur, puis nous extrayons le cerveau. Ensuite, nous extrayons la poche otolithique sous la loupe binoculaire. Nous en sortions uniquement l'otolithe sagittale que nous placions sur une lame après l'avoir nettoyé à l'eau.

1.4.1. Lecture d'otolithes chez les épinoches adultes.

La lecture des otolithes se déroulait différemment en fonction de si nous considérons un adulte ou un juvénile. Dans la population d'épinoche à trois épines du Saint-Laurent, il existe deux classes d'âges possibles chez les adultes : 1+ (entre un an et deux ans) et 2+ (entre deux ans et trois ans) ((Lieutenant-Gosselin and Bernatchez 2006). Les distributions de taille des individus 1+ sont différentes des distributions de taille des 2+ (Coad and Power 1973). Bien que ce patron semblait se vérifier dans notre échantillon (Figure 4), certains individus se trouvaient dans une zone grise. Nous avons donc pris un sous-échantillon pour la lecture d'otolithe composé de tous les individus compris dans cette zone grise et de certains individus situés au niveau des 2 modes. La différenciation entre les deux classes d'âge s'est faite par l'observation de bandes plus foncées sur l'otolithe correspondant au passage de l'hiver. En résumé, les individus 1+ présentaient une bande (Figure 5) et les 2+ en présentaient 2 (Figure 6).

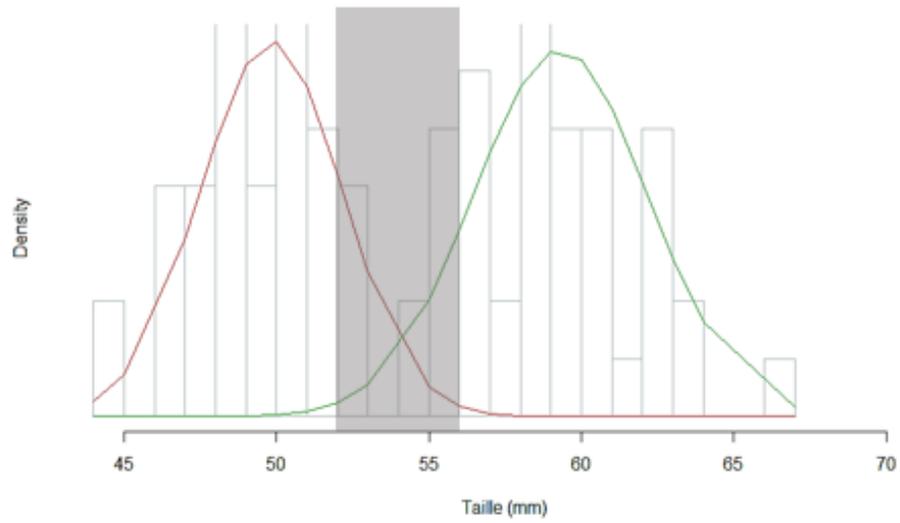


Figure 4 : Distribution de taille des adultes *G. aculeatus* mâles selon 2 modes correspondant potentiellement aux classes d'âges (rouge = 1+, vert = 2+).

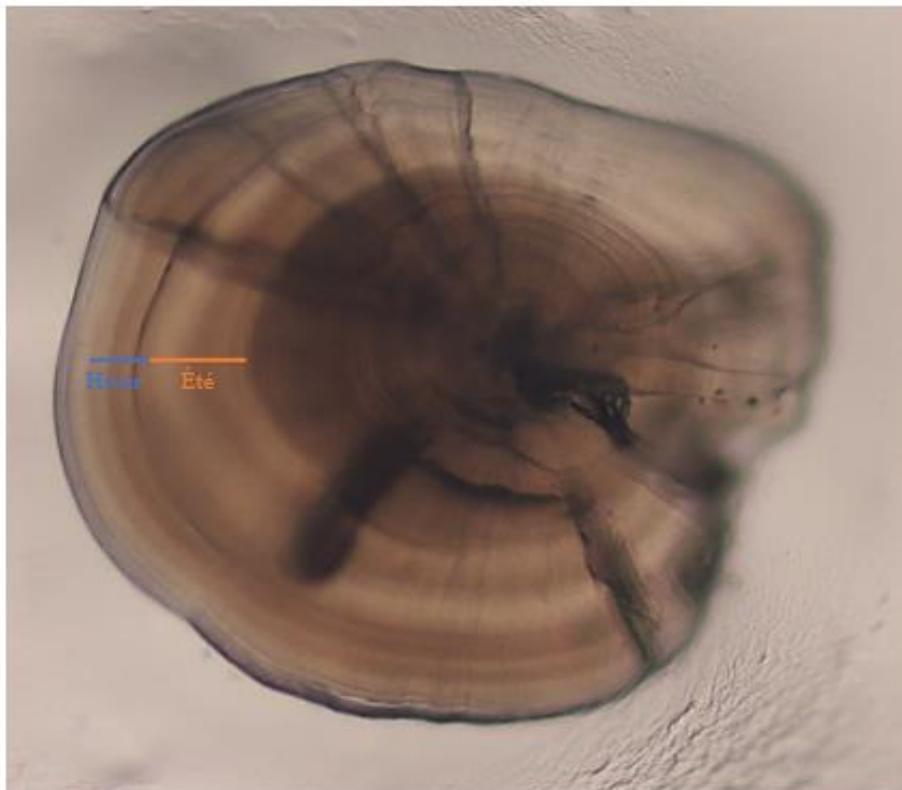


Figure 5 : Otolithe d'un adulte épinoche à trois épines 1+

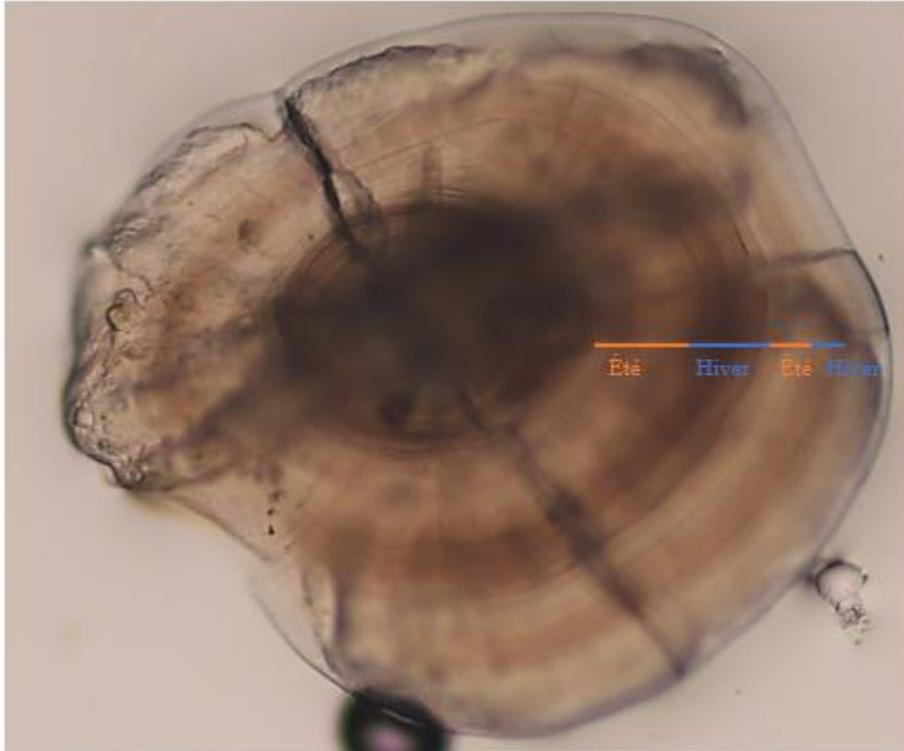


Figure 6 : Otolithe d'un adulte épinoche à trois épines 2+

1.4.2. Lecture d'otolithes chez les épinoches juvéniles.

La lecture d'otolithes chez les juvéniles s'est faite au jour près, un jour correspondant à une bande sombre sur l'otolithe. Cette lecture était plus complexe que celle effectuée pour les adultes et nécessitait donc d'autres précautions (Campana 1992). Premièrement, une lecture en deux temps a été réalisée à l'aveugle. Les otolithes ont été lu 2 fois et chaque lecture a été réalisé sans avoir pris connaissance de l'âge estimé précédemment. Puis, nous nous assurons de toujours positionner le sulcus, c'est-à-dire la partie concave de l'otolithe, vers la gauche du microscope. Pour finir, il nous a également fallu identifier la période que l'individu a passée dans l'œuf. Celle-ci correspondait à une zone centrale plus foncée d'une largeur maximale de 30 μm (Figure 7). Un sous-échantillon de 72 juvéniles (24 par marelle) a été utilisé pour cette étape afin d'obtenir un aperçu approximatif de la distribution de l'âge des juvéniles échantillonnés.

Après une première lecture de l'âge des juvéniles, nous nous sommes aperçus que les individus pêchés étaient anormalement âgés. En effet, ces derniers présentaient une moyenne d'âge de 14 jours au lieu d'un âge moyen attendu d'une dizaine de jours. Nous avons donc pris la décision de retourner sur le site d'échantillonnage le 16 juillet afin de récolter 200 juvéniles pour chacune des marelles. Ainsi, les juvéniles pêchés à la seine devraient correspondre aux juvéniles manqués lors de la première phase d'échantillonnage en raison de leur trop petite taille (âgés de moins de 10 jours).

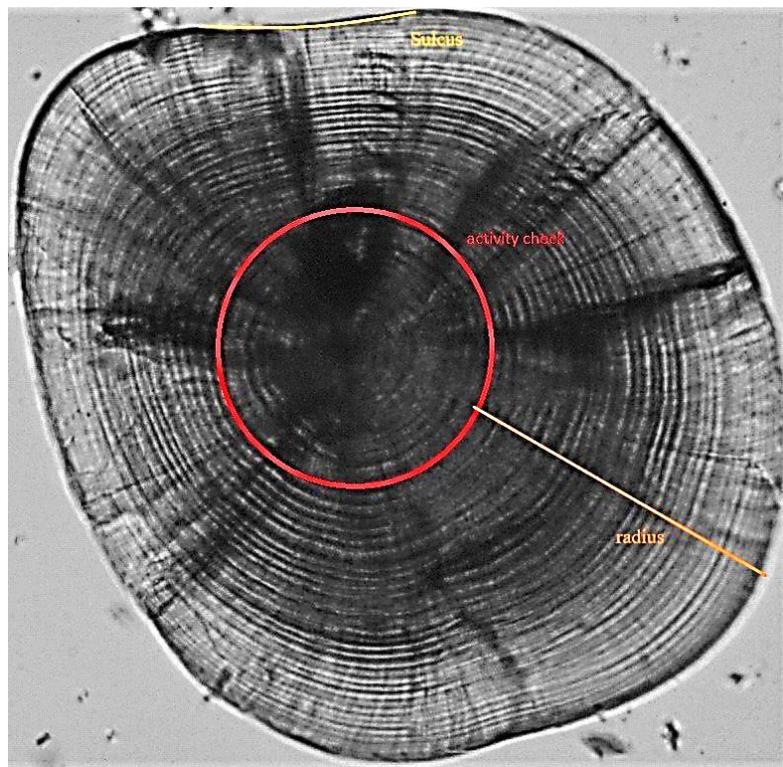


Figure 7 : Caractérisation de l'otolithe d'un juvénile d'épinoche à trois épines. Le cercle rouge représente la période d'activity check. L'arc de cercle jaune représente le sulcus. La ligne orange représente le radius le long duquel la lecture de l'âge est effectuée.

1.5. Génométypage.

Pour estimer le succès reproducteur de chaque adulte, nous voulions réaliser un décompte du nombre de juvéniles leur étant apparentés. Ce procédé nécessitait tout d'abord d'identifier les génotypes individuels afin d'être capable de reconstruire les potentielles relations de parenté entre les individus. La première étape consistait donc à génotyper l'ensemble des individus. Seul le génotypage de tous les adultes de toutes les marelles et de 300 juvéniles de la marelle 3 a été effectué. En effet, les procédés d'identification d'espèce et de génotypage étant fastidieux, tester les relations de parenté au sein d'une seule marelle permettait un gain de temps considérable. Cependant, à la suite de l'absence de correspondance entre les juvéniles et les adultes de la marelle 3, les juvéniles des deux premières marelles n'ont finalement pas été génotypés. Parmi ces 300 juvéniles, 150 ont été associés à la première période d'échantillonnage et 150 à la deuxième. Considérer ces deux périodes permettait de vérifier si les juvéniles provenant d'une des deux périodes présentaient un pourcentage d'assignation supérieur à celui des juvéniles de l'autre période et ainsi d'explorer l'hypothèse de potentiels mouvements des juvéniles / adultes entre les marelles.

Le génotypage a été initialement réalisé à partir de six marqueurs moléculaires de type microsatellites. Ces marqueurs ont en général un caractère hautement polymorphique et codominant qui font d'eux d'excellents outils pour les études d'assignation parentales (Blais et al. 2004, Lieutenant-Gosselin et Bernatchez 2006, McCairns et Bernatchez 2008). Les marqueurs microsatellites choisis comme point de départ étaient des marqueurs ayant déjà été caractérisés comme polymorphiques dans la population de l'Isle-Verte (McCairns et Bernatchez 2008).

Les marqueurs en question étaient Stn 16, Stn 23, Stn 96, Stn 107, Stn 209 et Gac46 (Peichel et al. 2004). Deux mélanges ont été réalisés en conséquence de la différence de température d'hybridation entre Gac46 (60°C) et les autres (56°C). Pour chacun de ces mélanges, une PCR a été réalisée afin d'amplifier les fragments

d'intérêt puis le produit résultant a été migré avec un mélange de Liz (un marqueur de taille) et de formamide. Cette opération a été réalisée à la plateforme de séquençage de l'IBIS (Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes).

Le fichier de migration contient des données de fluorescence qui sont lues dans le logiciel GeneMapper v4.1. Ce logiciel permet de visualiser les pics de fluorescence correspondant aux allèles amplifiés chez un individu. Puisque les pics peuvent prendre plusieurs formes ou résulter de simples artefacts, il faut porter une attention très particulière à cette étape. Pour ce faire, le génotypage a été réalisé à trois reprises et les patrons les plus difficiles à discerner ont été vérifiés par une tierce personne expérimentée dans le domaine. Enfin, la lecture des données de fluorescence est réalisée un marqueur à la fois et non pas individu par individu afin de faciliter la visualisation d'éventuels patrons.

1.6. Assignation parentale.

Une fois l'information sur les génotypes des parents candidats et celle des juvéniles obtenue, l'assignation de chaque juvénile à la paire de parents la plus probable a été réalisée par des méthodes dites d'assignation parentale. Il existe plusieurs types de techniques d'analyses de parenté selon le type d'informations à disposition après échantillonnage. Pour orienter notre choix, nous avons utilisé une clé basée sur des critères d'échantillonnage précis (Jones et al. 2010).

Pour la présente étude, deux hypothèses étaient possibles quant à la disponibilité des génotypes des parents candidats. Soit ceux-ci étaient presque tous disponibles, soit presque aucun parent n'était présent dans notre échantillon. De plus, si l'échantillonnage correspondait à nos espérances, nous nous serions attendus à retrouver un grand nombre de juvéniles pour chaque paire de parents s'étant reproduites. En suivant la clé, nous avons donc abouti soit à une méthode de reconstruction parentale augmentée par un modèle d'exclusion/assignation soit à une méthode de reproduction de fratrie (Figure 8).

Dans le cas où les parents étaient présents dans notre échantillon, nous utilisons un programme d'allocation catégorique nommé CERVUS 3.0 (Kalinowski et al. 2007). Les méthodes d'allocation catégoriques consistent à choisir l'unique individu possédant la plus haute probabilité d'être le parent parmi un groupe de parents candidats (Jones et al 2010).

Les méthodes de reconstruction de fratries permettent d'utiliser les génotypes des individus échantillonnés pour partitionner les individus en fratries. Le programme de reconstruction choisi pour cette étude était COLONY 2.0 ((Wang 2004). Ce programme a déjà démontré son utilité pour des analyses réalisées à partir de microsattellites (Johnston et al. 2014) et permet de prendre en compte les erreurs de génotypage, les potentielles mutations et la présence d'allèles nuls (Wang 2018).

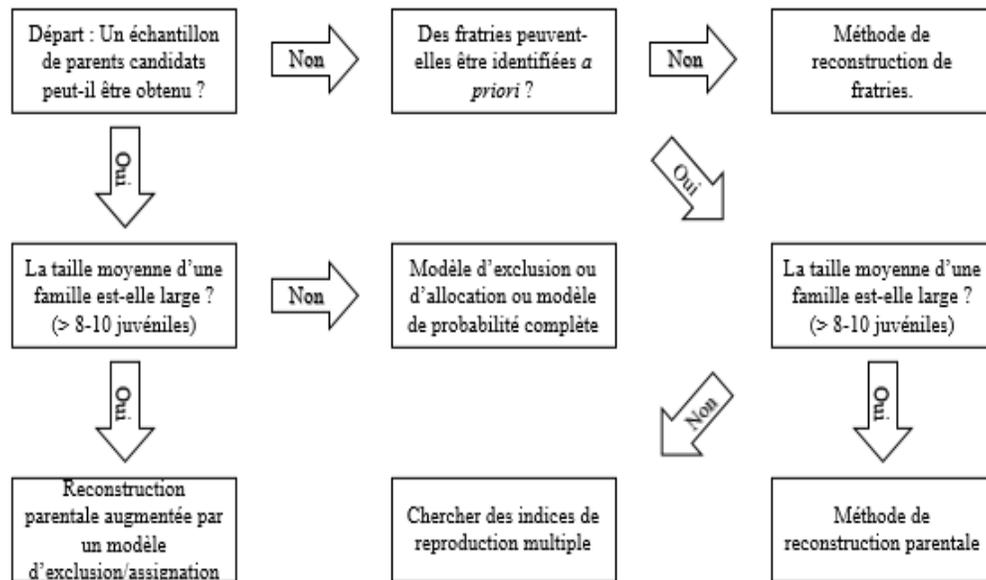


Figure 8 : Clé de décision pour le choix d'une méthode d'analyse de parenté (inspiré de Jones et al 2010)

1.6.1. Simulation d'assignation parentale avec CERVUS.

Pour s'assurer de la capacité du jeu de marqueurs moléculaires utilisés à assigner un juvénile à une paire de parents, des simulations de puissance ont été réalisées dans CERVUS. Ces simulations consistaient à utiliser les fréquences alléliques calculées pour chaque microsatellite afin de générer des génotypes. Des informations telles que le nombre de parents candidats, la proportion de parents candidats échantillonnés ou encore la proportion de locus potentiellement mal identifiés ont été ajoutées. Pour représenter de façon optimale notre système, les simulations ont été réalisées en désignant 20 mères et 20 pères candidats avec un pourcentage de parents échantillonnés de 75% pour chaque sexe. De plus, le pourcentage de locus mal identifiés qui a été utilisé a été fixé à 5%. Enfin, le nombre de juvéniles générés a été fixé à 10 000.

Nous avons constaté qu'avec l'utilisation des six microsatellites, un pourcentage d'assignation maximal de 50% des assignations totales était atteint en ce qui concerne la paire de parents. C'est-à-dire qu'avec le jeu de microsatellites utilisé au départ, seules 50% des relations d'apparentement pouvaient être résolues dans le meilleur des cas. Cette observation sera détaillée en profondeur dans la section Résultats.

Nous avons donc décidé d'ajouter quatre microsatellites à notre jeu de données afin d'augmenter la précision. Les microsatellites ajoutés étaient Stn 14, Stn 70, Stn 78 et Stn 130 (Peichel et al. 2004). La même démarche de génotypage a été répétée pour ce nouveau mélange.

1.6.2. Analyse d'assignation parentale à l'aide de CERVUS.

CERVUS est un programme d'assignation parentale basé sur le principe d'allocation catégorique. Cette méthode est de loin la plus courante dans les études d'analyse de parenté. L'utilisation de CERVUS permet d'obtenir pour chaque juvénile le père et la mère avec la plus haute probabilité d'avoir transmis leurs allèles à l'individu en question. Néanmoins, ces résultats doivent être interprétés avec précaution car la méthode d'allocation catégorique va forcer l'assignation et ce même si la probabilité d'observer une telle combinaison de parents est faible. En effet, les calculs de probabilité sont basés sur des analyses de vraisemblance prenant comme point de départ le jeu de données pour évaluer les hypothèses sous-jacentes.

Dans le cas des analyses de parenté, l'hypothèse testée est de préciser si oui ou non le parent candidat est le vrai parent. Le programme calcule donc une valeur de vraisemblance pour le cas où le parent est le bon et une pour le cas où le parent n'est pas le vrai parent recherché. Il sauvegarde ces valeurs sous forme de ratio. Les valeurs fournies dans les résultats apparaissent sous forme de LOD, c'est-à-dire la transformation logarithmique du ratio de vraisemblance (Jones and Wang 2010). Le programme divise les résultats en trois parties. Une première partie montrant les probabilités d'assignation à la mère seule pour des niveaux de confiance de 80 et 95 pourcents. Une deuxième pour le père seul et une troisième pour le couple de parents, avec les mêmes niveaux de confiance.

Dans le cadre de l'étude, plusieurs analyses ont été réalisées dans CERVUS v 3.0.7 afin d'explorer plusieurs scénarii. Premièrement, l'analyse a été réalisée sur l'ensemble des génotypes des juvéniles et des adultes de la marelle 3 (1). Ensuite, une analyse pour chaque période d'échantillonnage a été réalisée avec tous les parents échantillonnés (2). Pour finir, une dernière analyse a été réalisée en enlevant le microsatellite *Gac46* du jeu de données en raison du haut taux d'erreur de génotypage (voir le chapitre discussion pour plus de détails) (3). Chacune de ces analyses a été réalisées à deux reprises : une première fois avec tous les parents et une seconde avec uniquement les parents de la marelle 3. Lorsque nous avons utilisé l'ensemble des parents des trois marelles, deux valeurs de pourcentage de

parents échantillonnés ont été utilisées, soit 50% et 75%. L'utilisation de ces deux valeurs de paramètres permettait d'estimer laquelle de ces deux méthodes représentait le mieux notre système en effectuant un ratio des pourcentages d'assignation obtenu par rapport au pourcentage attendu.

1.6.3. Analyse de parenté avec COLONY.

Pour nos analyses, COLONY a été utilisé pour des analyses de parenté par reconstruction de fratries avec ou sans génotypes des parents candidats.

1.6.3.1. Analyse d'apparentement par reconstruction de fratries avec génotypes des parents candidats.

Le principe de reconstruction de fratries avec génotypes de parents candidats consiste à évaluer les relations d'apparentement entre les juvéniles afin de reconstruire des fratries en tenant compte des fréquences alléliques présentes chez les parents candidats (Jones et Wang 2010). Les fratries peuvent être soit complètes (2 parents identiques) ou seulement à moitié apparentées (1 seul parent en commun). De plus, une des particularités de COLONY est que le calcul de vraisemblance se fait sur l'ensemble d'une fratrie et non sur les individus groupés deux par deux (Jones et Wang 2010). Dans notre cas, seules les fratries complètes ont été utilisées afin de permettre des mesures de fitness optimales pour lier à la présence de locus sous conflit sexuel.

Une fois la reconstruction de fratries réalisée, le programme reconstruit les génotypes des parents les plus probables pour chaque juvéniles. Les génotypes reconstruits sont ensuite comparés aux génotypes présents dans le groupe de parents candidats. Les parents possédant un génotype semblable ou identique au génotype reconstruit se voient assigner une valeur de vraisemblance plus ou moins

élevée. Chaque juvénile se voit donc assigner des parents qui correspondent soit à des parents échantillonnés soit à des parents putatifs générés par le programme. Cependant, ce type d'analyse s'avère biaisé lorsque les fratries se trouvent être plus petites que 8 à 10 individus. Or, ce scénario est possible dans le cas où les parents échantillonnés ne correspondent pas nécessairement aux juvéniles pris en compte.

Les analyses de reconstruction parentale ont été réalisées en tenant compte de tous les juvéniles ainsi que de tous les adultes présents dans l'échantillon. Ces analyses nous ont également permis de calculer des taux d'erreurs pour chacun de nos microsattellites et ainsi d'ajuster le jeu de données utilisé en retirant ceux présentant un taux d'erreur trop élevé.

Pour nos analyses, cinq répétitions de 100 000 itérations ont été réalisées. Étant donné que le programme fonctionne en explorant un espace de paramètres pour trouver la configuration de fratrie la plus probable, l'utilisation de cinq répétitions permettait d'augmenter le nombre d'espaces explorés et ainsi d'éviter la reconstruction de fratries due à des maximums locaux non représentatifs de la réalité (Jones et Wang 2010). De plus, les probabilités que le bon père et la bonne mère soient présents dans l'échantillon ont été paramétrées à 50%. Le choix de tels paramètres a été fait pour prendre en considération l'incertitude de notre système.

1.6.3.2. Analyse de parenté par reconstruction de fratries sans génotypes des parents candidats.

Le principe de reconstruction de fratrie sans génotype de parents candidats est identique au principe avec génotype mais ne tient compte d'aucun *a priori* lors de la reconstruction des fratries. Ceci permet donc de reconstruire les fratries plus précisément et ce surtout si l'échantillon de parents pris en compte contient de nombreux parents sans rapports avec les juvéniles échantillonnés. Ces analyses ont été réalisées avec un nombre de cinq répétitions à 100 000 itérations.

2. Résultats

2.1. Identification morphologique.

L'utilisation des trois traits morphologiques que sont le nombre d'épines, la brillance et la symétrie des taches s'est avérée utile sans pour autant être infaillible. En effet, la mise en perspective des résultats d'identification morphologique par rapport aux résultats d'identification par le marqueur *COI* a montré une efficacité croissante avec le nombre d'essais (Tableau 2). De par la nature de nos analyses, aucun faux négatif, c'est-à-dire d'épinoche à trois épines ayant été identifiés comme une épinoche tachetée n'a été obtenu. Ceci est dû au fait que seul les poissons ayant été identifiés comme étant potentiellement des trois épines ont été testés lors des analyses. Nous pouvons constater que malgré le faible pourcentage d'identification correcte extrêmement faible de la méthode lors du premier essai (51,2 %), celui-ci monte drastiquement lors des essais suivants jusqu'à atteindre une moyenne de 84,8% entre les essais 2 à 6 avec un maximum à 95,8% d'identifications correctes. L'essai numéro 7 a été réalisé plusieurs semaines après les autres et montre une nouvelle baisse dans le taux d'identifications correctes (68.4%).

Tableau 2 : Taux de réussite de la méthode d'identification morphologique après vérification avec le marqueur de la Cytochrome oxydase I. Le nombre de faux positifs correspond au nombre de poissons identifiés comme étant des épinoches à trois épines par leur morphologie mais comme étant des épinoches tachetés lorsqu'identifié génétiquement.

Numéro de l'essai	Nombre de <i>Gaculeatus</i> correctement identifiés	Nombre de faux positifs	Pourcentage d'identifications correctes (%)
Essai 1	22	21	51,2
Essai 2	46	2	95,8
Essai 3	46	11	80,7
Essai 4	52	4	92,8
Essai 5	62	21	74,6
Essai 6	40	10	80,0
Essai 7	39	18	68,4

2.2. Différenciation des adultes en fonction de leur classe d'âge.

La vérification de l'âge de certains poissons tirés au hasard a permis de montrer que les individus 2+ (mâles et femelles) se retrouvent dans le mode le plus à droite de la distribution. Il existe donc une corrélation positive entre l'âge et la taille du poisson. Cependant, l'âge des individus se retrouvant dans la zone de chevauchement des modes (entre 52 et 56 mm chez les mâles (Figure 4) et entre 57 et 62 mm chez les femelles (Figure 9)) ne peut être inféré uniquement sur la base de la taille et nécessite d'être vérifié par la lecture de l'otolithe.

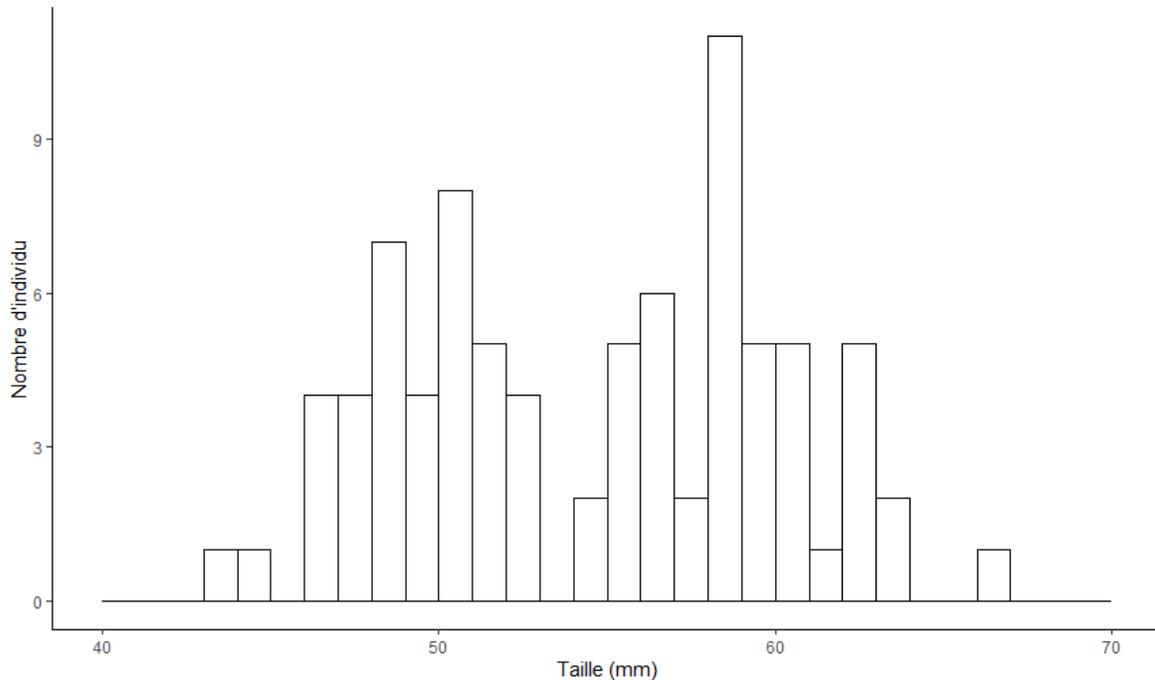


Figure 9 : Distribution de taille des adultes épinoches à trois épines femelles.

2.3. Distribution de l'âge des juvéniles échantillonnés.

Parmi les 72 juvéniles utilisés pour la lecture d'otolithes, seuls 59 ont été retenus. Les 13 juvéniles exclus correspondent aux individus dont l'otolithe n'a pas pu être extrait de façon à permettre la lecture subséquente. Comme le montre la figure 10, la majorité des individus avaient entre 10 et 20 jours au moment de l'échantillonnage. La médiane de la distribution se situe à 16 jours. De plus, la distribution présente un mode à 13-14 jours.

La période de reproduction à l'issue de laquelle l'échantillonnage a été effectué a duré 23 jours. Cette période de temps correspond à l'entièreté du cycle reproducteur de l'épinoche à trois épines. On considère qu'une durée de 10 jours est nécessaire à la mise en place d'un territoire, à la construction d'un nid et à l'accouplement (Sara Östlund-Nilsson 2007). Ensuite, une durée de 4 à 7 jours est nécessaire à l'éclosion des œufs. Cela ne laisse donc qu'une période

maximale de 9 à 6 jours aux juvéniles pour se développer avant la prochaine marée.

La médiane d'âge calculée dans notre cas (14 jours) est assez éloignée de l'estimation attendue de l'âge des juvéniles au moment de l'échantillonnage (moins de 10 jours).

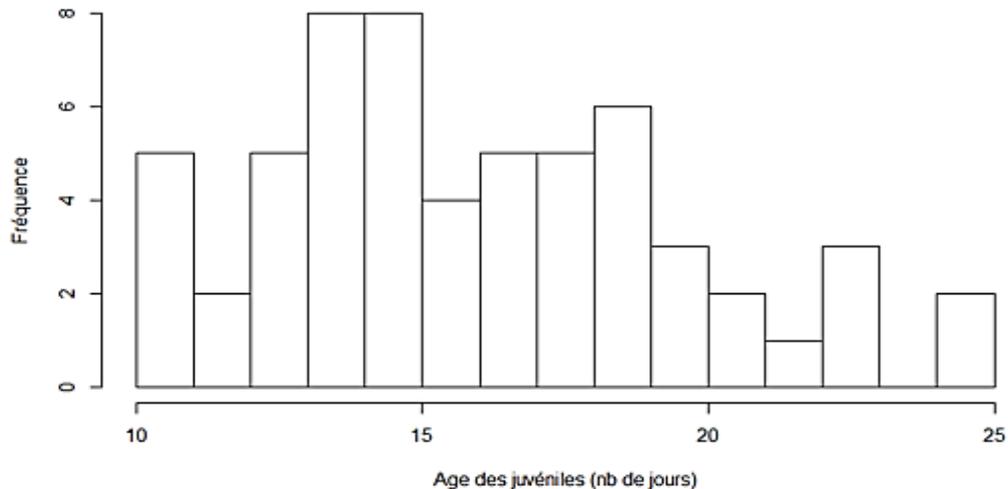


Figure 10 : Distribution de l'âge des juvéniles d'épinoches à trois épines dans les trois marelles échantillonnées (24 par marelle).

2.4. Simulation de la puissance des assignations parentales avec 6 vs 10 microsatellites dans CERVUS.

Notre jeu de microsatellites initial ne permettait d'atteindre qu'un taux d'assignation maximal de 55% (Tableau 3). Cela signifie que seuls 55% des relations de parentés pouvaient être identifiées dans le cas où tous les parents correspondant aux juvéniles étaient en notre possession. Ce pourcentage est insuffisant et est indicateur du manque de puissance de notre jeu de microsatellites. Ce manque de puissance est sans doute dû au faible nombre d'allèles des microsatellites Stn16 (7 allèles) et Stn209 (6 allèles) ou encore au fait que Stn23 et Stn96 ne respectent pas l'équilibre de Hardy Weinberg (Tableau 4).

De plus, le faible nombre d'allèles observé à certains marqueurs est associé à une surreprésentation d'un ou deux de ces allèles dans le jeu de données. Le microsatellite perd donc la majorité de son pouvoir explicatif dans un contexte d'assignation, réduisant le nombre de microsatellites explicatifs à seulement 4. Par ailleurs, les 4 microsatellites ajoutés *a posteriori* possèdent tous un nombre d'allèles au-dessus de 10 et sont en équilibre de Hardy Weinberg. De plus en considérant les 6 premiers et les 4 nouveaux microsatellites ensemble, un taux d'assignation de 100% est atteint pour la paire de parents.

Tableau 3 : Comparaison des taux d'assignation obtenus par simulation dans CERVUS avec un jeu de 6 et un jeu de 10 microsatellites.

Parents	Nombre de loci	Taux d'assignation
Père et mère	6	55 %
	10	100 %
Mère seule	6	50 %
	10	99 %
Père seul	6	49 %
	10	99 %

Tableau 4 : Caractérisation des microsatellites utilisés pour les individus de la marelle 3.

Nom du locus	Nombre d'allèles	Hétérozygotie observée (Ho)	Hétérozygotie attendue (He)	Déviaton équilibre d'Hardy-Weinberg
<i>Gac46</i>	42	0,8401	0,8607	NS
<i>Stn107</i>	11	0,6166	0,6299	NS
<i>Stn23</i>	16	0,8433	0,8091	*
<i>Stn16</i>	7	0,3884	0,3876	NS
<i>Stn209</i>	6	0,2469	0,2348	NS
<i>Stn96</i>	17	0,8481	0,8497	*
<i>Stn10</i>	19	0,8698	0,8466	NS
<i>Stn14</i>	27	0,9453	0,9207	NS
<i>Stn70</i>	10	0,6903	0,6896	NS
<i>Stn78</i>	26	0,8631	0,9101	NS

2.5. Résultats d'assignation parentale avec CERVUS.

Plusieurs combinaisons ont été testées pour établir les relations d'apparentement entre les individus de la marelle 3. Cependant, aucune d'entre elles n'a mis en évidence une relation d'apparentement solide entre les juvéniles et les adultes de la marelle à quelques exceptions près.

Premièrement, lorsqu'on ne considère que les individus échantillonnés dans la marelle 3, un taux d'assignation extrêmement faible de 2% est obtenu pour une paire de parents donnée avec une confiance stricte (95%, Tableau 5). Ce taux augmente à 10% lorsque l'on considère un seuil de confiance relaxée (80%) mais cela reste bien en dessous des taux d'assignation attendus retournés par les simulations en considérant qu'au minimum 75% des vrais parents étaient présent dans notre échantillon (68% de juvéniles assignés). Cela met donc en évidence la non-correspondance parentale entre les juvéniles et les adultes échantillonnés.

Un des paramètres primordiaux dans les analyses de parenté est le pourcentage de parents que l'on estime avoir dans notre échantillon. Lorsqu'on compare les résultats obtenus pour des estimés du nombre de parents échantillonnés de 50% et 75%, on constate que malgré le plus grand nombre d'assignation obtenue avec une valeur de paramètre de 75%, le ratio pourcentage d'assignation attendue sur observée est plus élevé lorsqu'on considère un pourcentage de parents échantillonnés de 50% (0.09 pour 50% vs 0.04 pour 75%). Cette valeur de paramètre est donc conservée pour la suite des analyses de parentés utilisant tous les parents.

Pour vérifier plus à fond l'hypothèse d'un changement de marelle des individus au moment des marées, l'ensemble des juvéniles de la marelle 3 a été séparé en deux groupes correspondant à leurs dates d'échantillonnage (Tableau 6) et une assignation parentale a été réalisée pour chacun des groupes séparément avec les parents provenant des trois marelles. Dans les deux cas, un taux très faible de respectivement 2% pour la période 1 (1^{er} juillet 2019) et de 1% pour la période 2 (16 juillet 2019) est obtenu lorsque l'on considère la paire de parents au seuil de vraisemblance à 95%. Cependant, lorsque l'on compare les taux d'assignation pour les pères et les mères séparément, le nombre de pères assignés est plus élevé pour la période 1 par rapport à la période 2 (respectivement 19% et 7%). Le nombre de mères assignées est lui identique pour les deux périodes et extrêmement faible (respectivement 2% et 3%). De plus, parmi les pères assignés, 19% seulement ont été échantillonnés dans une marelle différente de la marelle 3 pour la période 1. Par ailleurs, 31% des pères assignés proviennent d'une autre marelle pour la période 2.

Tableau 5 : Résultats de l'analyse d'assignation parentale réalisée avec CERVUS sur l'ensemble des individus de la marelle 3 avec 10 microsatellites.

Parents assignés	Niveau de confiance	Nombre d'assignation observées	Nombre d'assignation attendues	Taux d'assignation observé	Taux d'assignation attendu
Père et Mère	Stricte	6	154	2 %	52 %
	Relaxé	31	201	10 %	68 %
	Non-assigné	265	95	90 %	32 %
Mère seule	Stricte	29	214	10 %	72 %
	Relaxé	117	241	40 %	81 %
	Non-assigné	179	55	60 %	19 %
Père seul	Stricte	79	213	27 %	72 %
	Relaxé	186	239	63 %	81 %
	Non-assigné	110	57	37 %	19 %

Tableau 6 : Comparaison des taux d'assignations (P = père seul, M = mère seule, 2 = paire de parents) des juvéniles de la marelle 3 en fonction de la période d'échantillonnage avec CERVUS.

Échantillonnage	Nombre d'individus	Assignation à 80%			Assignation à 95%		
		P	M	2	P	M	2
Période 1 (01/07/2020)	177	P 39%	M 21%	2 4%	P 19%	M 2%	2 2%
Période 2 (16/07/2020)	123	P 32%	M 23%	2 3%	P 7%	M 3%	2 1%

2.6. Résultats d'assignation parentale avec COLONY.

Les résultats obtenus à l'aide de COLONY sont semblables à ceux obtenus avec CERVUS. En effet, l'analyse ne montre que très peu de juvéniles associés à un parent au minimum. Les parents assignés sont au nombre de 10 (3 mères et 7 pères) sur 29 considérés et présentent des probabilités d'assignation assez faibles pouvant descendre jusqu'à 0,03. De plus, le taux d'assignation pour un couple de parents est de 0% (Tableau 7).

L'analyse est répétée sans tenir compte des génotypes des parents candidats pour l'ensemble des juvéniles et pour toute période d'échantillonnage confondue. Ce procédé a pour but de reconstruire les fratries présentes au sein des juvéniles sans aucun *a priori* concernant les parents. Considérant notre système, on s'attend à trouver un petit nombre de fratries de grande taille. Or, un grand nombre de fratrie correspondant à un seul juvénile (222) est identifié et seulement 36 fratries de plus d'un juvénile sont reconstruite à l'aide de cette méthode.

Tableau 7 : Résultats de l'analyse d'assignation parentale réalisée avec COLONY sur l'ensemble des individus de la marelle 3 avec 10 microsatellites.

Parents	Nombre de parents assignés	Nombre d'assignation	Taux d'assignation
Père et Mère	/	1	0 %
Mère seule	3	11	4 %
Père seul	7	38	13 %

2.7. Analyse de parenté sans le marqueur *Gac46*.

Lors des analyses dans COLONY, le taux d'erreur de chaque microsatellite a été calculé. Tous les marqueurs ont été identifiés comme ayant des taux d'erreurs extrêmement faibles excepté le marqueur *Gac46* (Tableau 8). Ce marqueur est le microsatellite avec le plus d'allèles (42) et s'est avéré particulièrement difficile à génotyper. Pour vérifier son incidence sur les résultats, une analyse a été répétée

avec CERVUS sur le jeu de données en excluant *Gac46*. Le pourcentage d'assignation pour la paire de parents reste minime lorsque l'on considère un seuil de confiance de 95%. Cependant, si l'on considère un seuil de confiance plus bas de 80%, le taux d'assignation augmente drastiquement pour atteindre 41% de juvéniles assignés (Tableau 9).

Tableau 8 : Taux d'erreurs de chaque microsatellite utilisé obtenus dans COLONY. Le taux d'erreur initial correspond aux taux d'erreur systématique lors du génotypage. Le taux d'erreur estimé est le taux d'erreur observé dans l'échantillon avec un intervalle de confiance de 95%.

Nom du locus	Taux d'erreur initial	Taux d'erreur estimé	IC a 95%
<i>Gac46</i>	0,01	0,0303	[0,0146 ; 0,0467]
<i>Stn107</i>	0,01	0	[0 ; 0,01]
<i>Stn23</i>	0,01	0,0119	[0,0034 ; 0,0218]
<i>Stn16</i>	0,01	0	[0 ; 0,0090]
<i>Stn209</i>	0,01	0	[0 ; 0,0098]
<i>Stn96</i>	0,01	0,0076	[0 ; 0,0176]
<i>Stn10</i>	0,01	0,0113	[0,0010 ; 0,0212]
<i>Stn14</i>	0,01	0,0084	[0,0013 ; 0,0183]
<i>Stn70</i>	0,01	0,0079	[0,0007 ; 0,0207]
<i>Stn78</i>	0,01	0,0	[0 ; 0,0070]

Tableau 9 : Taux d'assignation obtenu dans CERVUS après avoir retiré le microsatellite *Gac46* du jeu de données.

Niveau de confiance	Taux d'assignation observé	Taux d'assignation attendu
Stricte	8 %	75 %
Relaxé	41 %	97 %
Non-assigné	59 %	3 %

3. Discussion

Cette étude avait pour objectif d'estimer des mesures de succès reproducteur en milieu naturel et d'utiliser ces mesures dans le but de détecter des conflits sexuels intra-locus liés à la reproduction chez l'épinoche à trois-épines. Plusieurs études ayant déjà utilisé ce système dans un but similaire, cet objectif semblait tout à fait envisageable. Cependant, il s'est avéré que l'estimation du succès reproducteur pour les mâles et les femelles d'épinoches à trois épines était bien plus complexe que précédemment envisagé. En effet, aucune donnée de succès reproducteur interprétable n'a été obtenue et ce, dû à l'absence d'appareillage entre les juvéniles et les adultes échantillonnés. Il a donc été impossible d'effectuer un quelconque lien entre nos données de fitness et nos données génomiques dans le but d'identifier des conflits sexuels. Néanmoins, cette étude aura permis de clarifier les nombreuses inconnues liées au système de marelles de l'Isle-Verte rendant une telle expérience à nouveau envisageable. Voici plusieurs points d'éclaircissement quant à l'écologie de l'épinoche à trois-épines anadrome à considérer avec attention lors de l'estimation de mesure de succès reproducteur en milieu naturel.

3.1. Remise en question de l'identification à l'espèce des épinoches juvéniles des marelles basée sur des traits morphométriques.

Seuls les essais numéro 1 et numéro 7 montrent des pourcentages d'identifications inférieurs à 70%. Ces essais correspondent tous deux à des périodes où l'observation des caractères morphologiques n'avait plus été effectuée depuis plusieurs semaines. Cela montre la nécessité de répéter le processus un grand nombre de fois pour différencier les traits morphologiques parfois peu évidents des juvéniles. De plus, bien que la méthode permette par moment d'atteindre des pourcentages supérieurs à 90%, le seuil de 100% nécessaire pour affirmer la capacité de notre clé d'identification morphologique à différencier les juvéniles entre espèces n'est jamais atteint. L'ensemble de ces observations mettent en évidence

les faiblesses d'une méthode basée exclusivement sur l'identification morphologique pour la différenciation à l'espèce des juvéniles présents dans les marelles.

Plusieurs études antérieures ont porté sur les juvéniles épinoches à trois épines de la population de l'Isle Verte. Par exemple, Poulin et Fitzgerald (1989) ont réalisé une étude ayant pour objectif d'améliorer les connaissances quant à l'histoire de vie des juvéniles des épinoches à trois épines, tachetées et à neuf épines dans les marelles. Dans cette étude, la différenciation visuelle entre les juvéniles des différentes espèces était donc primordiale. Cependant, aucune information n'est donnée quant à la méthode utilisée à cet effet. De plus, les juvéniles utilisés dans leur étude possédaient une taille moyenne similaire à celle des juvéniles utilisés dans notre étude (entre 2 et 2,5 cm). À cette époque, aucune méthode de vérification par marqueurs génétiques ne pouvait être utilisée. Il est donc envisageable que si les méthodes de différenciation visuelle utilisées étaient similaires à celles mises en place dans notre étude, un nombre important d'erreur se soient glissés dans les résultats obtenus.

Le doute concernant l'identification morphologique des juvéniles ne peut être complètement effacé dû à l'absence dans la littérature d'une méthode standardisée et détaillée de différenciation visuelle des juvéniles des espèces d'épinoches peuplant les marelles. La création d'une telle méthode serait donc particulièrement importante pour permettre de faciliter les mesures de fitness basées sur le succès reproducteur. Ce type de mesures est essentiel chez une espèce telle que l'épinoche à trois épines au regard de son statut d'espèce modèle et de la multitude d'information qu'elle rend disponible. Par exemple, la capacité d'identifier l'espèce des juvéniles épinoches morphologiquement permettrait d'échantillonner des individus nés en condition naturelle et de les élever en laboratoire afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes évolutifs ayant façonné le génome de ce poisson.

3.2. Utilisation de la taille comme estimateur de l'âge chez les adultes épinoche à trois épines.

Une autre donnée essentielle à intégrer dans les études d'évolution utilisant les épinoches à trois épines comme espèce modèle est l'identification des classes d'âge. En effet, une telle information peut notamment permettre d'étudier les différences génétiques / épigénétiques d'une population de poissons entre ses classes d'âge. Cette différenciation entre classes d'âge peut se faire par lecture de l'otolithe des poissons étudiés. Cependant, l'otolithe des épinoches est relativement petit (22,9 μm de diamètre, von Hippel et al. 2013) et sa lecture nécessite une certaine expertise, rendant ce processus long et laborieux.

Certaines études ont déjà montré que la distinction des classes d'âge peut se faire en fonction de la taille des individus (Coad et Power 1973) mais ce n'est pas le cas pour toutes les populations d'épinoches à trois épines dans le monde (Singkam et MacColl 2018). Néanmoins, nos résultats s'accordent avec ceux de Coad et Power (1973) puisqu'une relation entre la taille et l'âge des individus a été mise en évidence malgré un chevauchement dans des mesures de tailles intermédiaires pour lesquelles la lecture de l'otolithe est requise. Les populations du Québec sont soumises à des conditions environnementales plus froides comparativement aux populations anglaises (Singkam et MacColl 2018) ce qui favoriserait une vitesse de croissance plus lente avec des pics assez marqués en été lorsque la nourriture est plus abondante.

Ce patron de croissance à deux vitesses est en opposition avec celui des populations anglaises qui grandissent de manière uniforme tout au long de l'année. La faculté de différencier les classes d'âges en se basant sur la taille du poisson serait liée aux conditions environnementales expérimentées par les individus et par conséquent à leur vitesse de croissance.

3.3. Importance du choix des marqueurs moléculaires dans les études d'apparentement.

Le retrait du microsatellite Gac46 du jeu de données a permis d'augmenter fortement le nombre de juvéniles assignés à un niveau de confiance relaxé (80%). Il est certain qu'utiliser un seuil de 80% engendre une augmentation du nombre de faux positifs. En effet, un juvénile a une chance sur cinq d'être faussement assigné. Malgré cela, le nombre de juvéniles assignés est largement plus élevé que celui obtenu à un seuil de 95% et ne pourrait pas être expliqué uniquement par la présence de faux positifs. De plus, lorsque l'on analyse les juvéniles assignés avec 80% de confiance, 46% d'entre eux présentent uniquement deux locus non correspondants ou moins par rapport à la paire de parents. Cette observation est concordante avec l'étude de Rossiter et al. (2000) sur une espèce de chauve-souris qui a révélé que 30.7% de pères assignés à 80% était identifié comme étant les vrais parents. Les taux d'assignation obtenu pour les paires de parents sont donc potentiellement fortement sous-estimés. Afin d'augmenter ce niveau de confiance de 80% à 95%, il conviendrait d'ajouter de nouveaux microsatellites à notre étude.

Néanmoins, même si l'ajout de microsatellites augmenterait certainement le nombre de juvéniles assignés, il ne serait toujours pas possible d'estimer des valeurs de fitness individuel avec précision de par l'absence de nombreux parents dans notre échantillon. Cette tâche ne sera donc pas effectuée dans le cadre de cette étude mais est conseillée pour toute étude future ayant pour but d'évaluer le succès reproducteur des épinoches à trois épines dans ce système. La nécessité d'utiliser un nombre élevé de microsatellites pour réaliser les analyses d'apparentement s'est avéré assez surprenante. En effet, une étude menée par Blais et al. (2004) avait été capable d'effectuer des analyses de parentés dans le même système de marelles à partir de 5 microsatellites seulement. Ces 5 microsatellites étaient cependant bien plus variables que ceux utilisés dans cette étude avec une moyenne de 40 allèles par marqueur, rendant leur utilisation complexe. De plus, dans leur étude, l'assignation était réalisée à partir des œufs, ces derniers ayant été échantillonnés dans un nid avec le mâle correspondant.

Ensuite, seuls les mâles étaient assignés afin de détecter la présence de mâles furtifs ou de vols d'œufs.

Dans notre étude, il était nécessaire d'obtenir de l'information sur les deux parents ce qui n'était pas le cas dans les études précédentes (Blais et al. 2004). De plus, l'utilisation de juvéniles plutôt que des œufs complexifie encore plus l'analyse car cela ne permet plus d'utiliser l'information obtenue a priori sur le père potentiel. Bien que, dans notre cas, l'absence d'apparentement entre les juvéniles et les parents échantillonnés soit due à l'absence des bons parents candidats dans l'échantillon, les éléments cités plus haut semblent suggérer que le jeu de microsatellites choisi pour notre étude reste perfectible. Pour remédier à cela, d'autres microsatellites déjà identifiés chez l'épinoche à trois épines pourraient être ajoutés. Une alternative serait également l'utilisation de SNPs pour les analyses d'apparentement. En effet, ces derniers s'avèrent être une alternative robuste et sujette à moins d'erreurs particulièrement au niveau du génotypage comme montré chez de nombreuses espèces tant marines que terrestres (Flanagan et Jones 2019). Néanmoins, les SNPs sont des marqueurs bi-allélique et apporte donc individuellement un pouvoir de résolution inférieur aux microsatellites qui sont des marqueurs poly-alléliques. Le nombre de SNPs à utiliser devrait donc être suffisant pour surpasser le nombre d'allèle total obtenu lors de l'utilisation de microsatellites.

3.4. Limitation du système de marelles dans l'étude du succès reproducteur

Que ce soit en utilisant CERVUS ou en utilisant COLONY, les pourcentages d'assignation des juvéniles aux parents échantillonnés sont extrêmement faibles (~2%) par rapport à ce qui est attendu dans les simulations en considérant que 75% des parents candidats sont présents dans la marelle (68%) et se rapproche plus des scénarii de simulation où seul une très faible proportion des parents candidats sont présents dans l'échantillon. Cette absence d'assignation peut donc s'interpréter biologiquement de trois façons différentes : soit que les parents migrent entre

marelles lors des grandes marées, soit que les juvéniles migrent ou encore que les parents et les juvéniles migrent entre marelles. La migration des parents est probable si ces derniers ont achevé leur cycle de reproduction. Cette migration entre marelles est d'autant plus probable pour les femelles qui n'effectuent aucuns soins parentaux et qui ont donc tout intérêt à changer de marelle pour trouver de nouveaux partenaires (Whoriskey et al. 1986).

Par ailleurs, il serait surprenant de voir un épinoche adulte mâle changer de marelle si son cycle de reproduction n'est pas terminé, c'est-à-dire s'il reste des œufs ou bien des juvéniles à peine éclos dans son nid. En effet, les pertes énergétiques liées à la reproduction sont telles que les mâles ne sont souvent capables de se reproduire qu'une seule fois au cours de la saison (Whoriskey et Fitzgerald 1994). L'abandon du nid lors de la marée est donc hautement improbable. De plus, nos observations de terrain s'accordent avec cette idée. En effet, nous avons pu constater que les mâles continuaient bel et bien à garder leur territoire et ce même après leur reproduction. Cette différence entre sexes dans la susceptibilité de changer de marelle lors des grandes marées pourrait potentiellement aboutir à des taux d'assignations plus élevés lorsqu'on considère l'assignation du père seul. C'est le cas dans notre échantillon avec des pourcentages d'assignations de 19% lors de la première période d'échantillonnage et de 7% pour la deuxième période (Tableau 6). Ces pourcentages sont tout de même faibles lorsqu'on considère les mères seules et ce quel que soit la période d'échantillonnage (respectivement 2% et 3%). Ces résultats s'alignent avec l'hypothèse d'une plus grande susceptibilité à changer de marelle pour la mère liée à son absence d'implication dans la survie de ses rejetons contrairement au mâle. On peut constater qu'une vérification des marelles pour déterminer la présence de poissons a été effectuée le 16 mai alors que la marée la plus haute avait lieu le 20 mai. Il est donc possible que les poissons soient arrivés entre le 16 et le 20 mai. Si tel est le cas, aucune information quant à la période du 20 mai jusqu'au 7 juin (date de début de notre échantillonnage) n'est disponible. Or, aux vues des patrons d'assignation exposés précédemment, il est envisageable que la majorité des juvéniles récoltés soient issus de la période de reproduction ayant eu lieu durant ce laps de temps non-considéré.

Les rares pères assignés correspondraient aux mâles dont les juvéniles étaient encore dans des stades trop précoces pour survivre seuls lors de la marée du 1^{er} juillet 2019. Cette observation correspond assez bien avec les âges des juvéniles déterminés par lecture d'otolithes. Il se peut également que certains des juvéniles échantillonnés proviennent de la période de reproduction observée mais que la majorité d'entre eux n'aient pas pu être échantillonnés car les mailles de la seine étaient trop grandes pour les capturer. Ces juvéniles précédemment trop petits correspondraient aux 7% de juvéniles assignés lors des analyses de la deuxième période d'échantillonnage.

Enfin, une majorité de juvéniles serait issue d'autres marelles, supportant l'hypothèse de migration des adultes et des juvéniles lors des grandes marées. Cette migration se ferait aléatoirement et ne serait dictée que par les courants de marée, les individus étant trop petits pour se déplacer à leur gré (Whoriskey et Fitzgerald 1994).

L'obtention de mesures de succès reproducteur précises dans un système aussi changeant que celui à l'étude s'avère bien plus complexe que précédemment estimé. La limite principale dans l'obtention de telles données réside dans la présence de migration des individus entre les marelles. Une possibilité réside dans l'isolement artificiel de marelles naturelles. Ce procédé consisterait à isoler physiquement une marelle une fois que cette dernière est colonisée par les poissons. Cet isolement permettrait d'empêcher les poissons de sortir / entrer lors de la grande marée tout en conservant des conditions naturelles (salinité, température, faune / flore, etc). Ensuite, une fois la grande marée terminée, les poissons pourraient être ramassés et l'assignation réalisée à partir d'un jeu de microsatellites complets. Cette méthode semble envisageable et peu coûteuse et il serait intéressant de l'explorer dans de futures études.

Conclusion

L'estimation du succès reproducteur à partir d'analyses d'apparement entre juvéniles et parents s'est avérée plus complexe qu'initialement estimé. En effet, malgré la mise en place de plusieurs mesures, il existe très peu de correspondance entre les parents et les juvéniles échantillonnés dans les marelles. Cette absence de correspondance est due principalement aux mouvements des poissons entre marelles lors des grandes marées printanières. Cependant, aux vues du nombre de juvéniles assignés avec 80% de confiance lors du retrait du marqueur Gac46, l'ajout de nouveaux marqueurs moléculaires semble préférable pour les futures études de succès reproducteur dans les populations anadromes d'épinoches à trois-épines.

Le système de marelles de l'Isle-Verte avait déjà fait l'objet de nombreuses études. Cependant la majorité de celles-ci ont eu lieu avant la démocratisation des méthodes moléculaires. Or, nos observations questionnent la fiabilité de certains des résultats obtenus à l'époque, notamment pour l'identification à l'espèce des juvéniles présents dans les marelles. De ce fait, plusieurs inconnus demeuraient quant à certains aspects de l'écologie des épinoches à trois épines dans les marelles, notamment au niveau des mouvements au cours des cycles de marées. Ce mémoire répond à plusieurs de ces inconnus tels que la caractérisation des mouvements des individus entre marelles, la différenciation des classes d'âges d'adultes à partir d'un caractère morphologique ou encore le test d'une nouvelle clé d'identification à l'espèce des juvéniles présents dans les marelles.

Malgré les difficultés apparentes de l'utilisation d'un tel système pour l'estimation du succès reproducteur, plusieurs méthodes semblent envisageables et possèdent chacune des avantages et des défauts. L'utilisation d'œufs permet de s'assurer de la présence d'un des parents des rejetons au moment de l'échantillonnage mais engendre un biais sur l'estimation du succès reproducteur. L'utilisation de juvéniles, quant à elle, permet d'estimer de façon plus représentative le succès reproducteur d'un individu en tenant uniquement compte de ses rejetons ayant survécu mais sans garantir la correspondance entre les adultes et les juvéniles échantillonnés.

L'isolement artificiel des marelles à l'étude constituerait également une solution intéressante même si cette dernière entraînerait un léger biais sur les estimés de fitness. Par exemple, cette méthode pourrait causer une mauvaise estimation du fitness de certains individus pour lesquels l'arrivée de nouveaux compétiteurs lors de la marée aurait baissé leur succès reproducteur ou pour lesquels l'arrivée de nouvelles femelles aurait augmenté ce dernier.

Bibliographie

- Aljanabi, S., and I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692–4693.
- Alonzo, S. H., and B. Sinervo. 2007. The effect of sexually antagonistic selection on adaptive sex ratio allocation. *Evolutionary Ecology Research* 9:1097–1117.
- Belles-Isles, J. C., D. Cloutier, and G. J. FitzGerald. 1990. Female cannibalism and male courtship tactics in threespine sticklebacks. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 26:363–368.
- Blais, J., C. Rico, and L. Bernatchez. 2004. Nonlinear effects of female mate choice in wild threespine sticklebacks. *Evolution* 58:2498–2510.
- Bonduriansky, R. 2011. Sexual Selection and Conflict as Engines of Ecological Diversification. *The American Naturalist* 178:729–745.
- Bonduriansky R., and Chenoweth S.F. 2009. Intralocus sexual conflict. *Trends in Ecology & Evolution* 24:280–288.
- Campana, S. E. 1992. Measurement and interpretation of the microstructure of fish otoliths. Chapter 4, Page(59-70)Publ. Fish. Aquat. Sci. 117. Ed. D.K. Stevenson, S.E. Campana
- Candolin, U. 2000. Changes in expression and honesty of sexual signalling over the reproductive lifetime of sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267:2425–2430.
- Chapman, T., G. Arnqvist, J. Bangham, and L. Rowe. 2003. Sexual conflict. *Trends in Ecology & Evolution* 18:41–47.
- Cheng, C., and M. Kirkpatrick. 2016. Sex-Specific Selection and Sex-Biased Gene Expression in Humans and Flies. *PLoS Genetics* 12:1-18
- Chippindale, A. K., J. R. Gibson, and W. R. Rice. 2001. Negative genetic correlation for adult fitness between sexes reveals ontogenetic conflict in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:1671–1675.
- Coad, B. W., and G. Power. 1973. Observations on the ecology of lacustrine population of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L. 1758) in the Matamek River system, Quebec. *Nat. Can* 100:437–445.
- Connallon, T., and A. G. Clark. 2013. Evolutionary inevitability of sexual antagonism. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281:20132123.
- Cox, R. M., and R. Calsbeek. 2009. Sexually Antagonistic Selection, Sexual Dimorphism, and the Resolution of Intralocus Sexual Conflict. *The American Naturalist* 173:176–187.
- van Doorn, G. S., and M. Kirkpatrick. 2007. Turnover of sex chromosomes induced by sexual conflict. *Nature* 449:909–912.
- Dutoit, L., C. F. Mugal, P. Bolivar, M. Wang, K. Nadachowska-Brzyska, L. Smeds, H. P. Yazdi, L. Gustafsson, and H. Ellegren. 2018. Sex-biased gene expression, sexual antagonism and levels of genetic diversity in the collared flycatcher (*Ficedula albicollis*) genome. *Molecular Ecology* 27:3572–3581.
- Fijarczyk, A., and W. Babik. 2015. Detecting balancing selection in genomes: Limits and prospects. *Molecular Ecology* 24:3529–3545.
- FitzGerald, G. J. 1991. The Role of Cannibalism in the Reproductive Ecology of the Threespine Stickleback. *Ethology* 89:177–194.
- Fitzgerald, G. J., M. Fournier, and J. Morrissette. 1993. Sexual selection in an anadromous population of threespine sticklebacks-no role for parasites. *Evolutionary Ecology* 8:348–356.
- Flanagan, S. P., and A. G. Jones. 2019. The future of parentage analysis: From microsatellites to SNPs and beyond. *Molecular Ecology* 28:544–567.
- Foerster, K., T. Coulson, B. C. Sheldon, J. M. Pemberton, T. H. Clutton-Brock, and L. E. B. Kruuk. 2007. Sexually antagonistic genetic variation for fitness in red deer. *Nature* 447:1107–1110.

- Forsman, A. 1995. Heating rates and body temperature variation in melanistic and zigzag *Vipera berus*, does colour make a difference? *Annales Zoologici Fennici* 32:365–374.
- Gibson, J. R., A. K. Chippindale, and W. R. Rice. 2002. The X chromosome is a hot spot for sexually antagonistic fitness variation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269:499–505.
- Harano, T., K. Okada, S. Nakayama, T. Miyatake, and D. J. Hosken. 2010. Intralocus sexual conflict unresolved by sex-limited trait expression. *Current Biology* 20:2036–2039.
- von Hippel, F. A., L. C. Smayda, C. E. Zimmerman, and M. A. Bell. 2013. Validation of daily growth increments in otoliths to age threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Evolutionary Ecology Research* 15:947–957.
- Hohenlohe, P. A., S. Bassham, P. D. Etter, N. Stiffler, E. A. Johnson, and W. A. Cresko. 2010. Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. *PLoS Genetics* 6: 1000862
- Hohenlohe, P. A., and I. S. Magalhaes. 2019. The Population Genomics of Parallel Adaptation: Lessons from Threespine Stickleback. Page (249-276). *Population Genomics*. Springer, Cham. Oleksiak M. and Rajora O., Eds.
- Innocenti, P., and E. H. Morrow. 2010. The sexually antagonistic genes of *drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* 8: e1000335
- Ivanova, N. v., T. S. Zemlak, R. H. Hanner, and P. D. N. Hebert. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7:544–548.
- Johnston, S. E., P. Orell, V. L. Pritchard, M. P. Kent, S. Lien, E. Niemelä, J. Erkinaro, and C. R. Primmer. 2014. Genome-wide SNP analysis reveals a genetic basis for sea-age variation in a wild population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology* 23:3452–3468.
- Jones, A. G., C. M. Small, K. A. Paczolt, and N. L. Ratterman. 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10:6–30.
- Jones, F. C., M. G. Grabherr, Y. F. Chan, P. Russell, E. Mauceli, J. Johnson, R. Swofford, M. Pirun, M. C. Zody, S. White, E. Birney, S. Searle, J. Schmutz, J. Grimwood, M. C. Dickson, R. M. Myers, C. T. Miller, B. R. Summers, A. K. Knecht, S. D. Brady, H. Zhang, A. A. Pollen, T. Howes, C. Amemiya, J. Baldwin, T. Bloom, D. B. Jaffe, R. Nicol, J. Wilkinson, E. S. Lander, F. di Palma, K. Lindblad-Toh, and D. M. Kingsley. 2012. The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks. *Nature* 484:55–61.
- Jones, O. R., and J. Wang. 2010. COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10:551–555.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper, and T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099–1106.
- Kochzius, M., C. Seidel, A. Antoniou, S. K. Botla, D. Campo, A. Cariani, E. G. Vazquez, J. Hauschild, C. Herve, S. Hjörleifsdottir, G. Hreggvidsson, K. Kappel, M. Landi, A. Magoulas, V. Marteinson, M. Nölte, S. Planes, F. Tinti, C. Turan, M. N. Venugopal, H. Weber, and D. Blohm. 2010. Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. *PLoS ONE* 5:1–15.
- Lien, S., B. F. Koop, S. R. Sandve, J. R. Miller, M. P. Kent, T. Nome, T. R. Hvidsten, J. S. Leong, D. R. Minkley, A. Zimin, F. Grammes, H. Grove, A. Gjuvsland, B. Walenz, R. A. Hermansen, K. von Schalburg, E. B. Rondeau, A. di Genova, J. K. A. Samy, J. Olav Vik, M. D. Vigeland, L. Caler, U. Grimholt, S. Jentoft, D. Inge Våge, P. de Jong, T. Moen, M. Baranski, Y. Palti, D. R. Smith, J. A. Yorke, A. J. Nederbragt, A. Tooming-Klunderud, K. S. Jakobsen, X. Jiang, D. Fan, Y. Hu, D. A. Liberles, R. Vidal, P. Iturra, S. J. M. Jones, I. Jonassen, A. Maass, S. W. Omholt, and W. S. Davidson. 2016. The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature* 533:200–205.

- Lieutenant-Gosselin, M. , and L. Bernatchez. 2006. Local Heterozygosity-Fitness Correlations with Global Positive Effects on Fitness in Threespine Stickleback. *Evolution* 60:1658–1668.
- Lucotte, E. A., R. Laurent, E. Heyer, L. Ségurel, and B. Toupance. 2016. Detection of allelic frequency differences between the sexes in humans: A signature of sexually antagonistic selection. *Genome Biology and Evolution* 8:1489–1500.
- Mank, J. E. 2017. Population genetics of sexual conflict in the genomic era. *Nature Reviews Genetics* 18:721–730.
- Mank, J. E., J. J. Shu, and A. E. Wright. 2020. Signature of sexual conflict is actually conflict resolved. *Molecular ecology* 29:215–217.
- McCairns, R. J. S., and L. Bernatchez. 2008. Landscape genetic analyses reveal cryptic population structure and putative selection gradients in a large-scale estuarine environment. *Molecular Ecology* 17:3901–3916.
- Merila, J., B. C. Sheldon, and H. Ellegren. 1998. Quantitative Genetics of Sexual Size Dimorphism in the Collared Flycatcher, *Ficedula albicollis*. *Evolution* 52:870-876.
- Parker, G. A. 2006. Sexual conflict over mating and fertilization: An overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361:235–259.
- Parsch, J., and H. Ellegren. 2013. The evolutionary causes and consequences of sex-biased gene expression. *Nature Reviews Genetics* 14:83–87.
- Peichel, C. L., J. A. Ross, C. K. Matson, M. Dickson, J. Grimwood, J. Schmuts, R. M. Myers, S. Mori, D. Schluter, and D. M. Kingsley. 2004. The Master Sex-Determination Locus in Threespine Sticklebacks Is on a Nascent Y Chromosome. *Current Biology* 14:1416–1424.
- Pennell, T. M., and E. H. Morrow. 2013. Two sexes, one genome: The evolutionary dynamics of intralocus sexual conflict. *Ecology and Evolution* 3:1819–1834.
- Pischedda, A., and A. K. Chippindale. 2006. Intralocus sexual conflict diminishes the benefits of sexual selection. *PLoS Biology* 4:2099–2103.
- Poulin, R., and G. J. Fitzgerald. 1989. Early life histories of three sympatric sticklebacks in a salt-marsh. *Journal of Fish Biology* 34:207–221.
- Rice, W. R. 2002. Sexual Recombination and the Power of Natural Selection. *Science* 294:555–559.
- Rico, C., U. Kuhnlein, and G. J. FitzGerald. 1991. Spawning patterns in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.): an evaluation by DNA fingerprinting. *Journal of Fish Biology* 39:151–158.
- Roberts, R. B., J. R. Ser, and T. D. Kocher. 2009. Sexual conflict resolved by invasion of a novel sex determiner in lake malawi cichlid fishes. *Science* 326:998–1001.
- Rossiter, S. J., G. Jones, R. D. Ransome, and E. M. Barratt. 2000. Parentage, reproductive success and breeding behaviour in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*). *Proceedings of The Royal Society* 267:545–551.
- Rowe, L., S. F. Chenoweth, and A. F. Agrawal. 2018. The Genomics of Sexual Conflict. *The American Naturalist* 192:274–286.
- Ruzicka, F., M. S. Hill, T. M. Pennell, I. Flis, F. C. Ingleby, R. Mott, K. Fowler, E. H. Morrow, and M. Reuter. 2019. Genome-wide sexually antagonistic variants reveal long-standing constraints on sexual dimorphism in fruit flies. *PLoS Biology* 17: e3000244
- Sara Östlund-Nilsson. 2007. *Biology of the Three-Spined Stickleback*. Page (157-178). CRC Press. Taylor & Francis Group, Newark. S. Östlund-Nilsson, I. Mayer, and F. A. Huntingford, Eds.
- Schärer, L., L. Rowe, and G. Arnqvist. 2012. Anisogamy, chance and the evolution of sex roles. *Trends in Ecology and Evolution* 27:260–264.
- Singkam, A. R., and A. D. C. MacColl. 2018. Otolith development in wild populations of stickleback: Jones & Hynes method does not apply to most populations. *Journal of Fish Biology* 93:272–281.

- Vickery, W. L., F. G. Whoriskey, and G. J. Fitzgerald. 1988. On the Evolution of Nest Raiding and Male Defensive Behaviour in Sticklebacks (Pisces : Pisces : Gasterosteidae). *Behavioural Ecology and Sociobiology* 22:185–193.
- Wang, J. 2004. Sibship Reconstruction from Genetic Data with Typing Errors. *Genetics* 166:1963–1979.
- Wang, J. 2018. Estimating genotyping errors from genotype and reconstructed pedigree data. *Methods in Ecology and Evolution* 9:109–120.
- Whoriskey, F. G. 1991. Stickleback distraction displays: sexual or foraging deception against egg cannibalism? *The Association for the Study of Animal Behaviour* 41:989–995.
- Whoriskey, F. G., and G. J. Fitzgerald. 1994. Ecology of the threespine stickleback on the breeding grounds. Pages 399–437 *The Evolutionary Biology of the Threespine Stickleback*.
- Whoriskey, F. G., G. J. Fitzgerald, and S. G. Reebst. 1986. The breeding-season population structure of three sympatric, territorial sticklebacks (Pisces: Gasterosteidae). *Journal of Fish Biology* 29:635–648.
- Wright, A. E., T. F. Rogers, M. Fumagalli, C. R. Cooney, and J. E. Mank. 2019. Phenotypic sexual dimorphism is associated with genomic signatures of resolved sexual conflict. *Molecular Ecology* 28:2860–2871.