

**UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
CENTRE D'OCEANOLOGIE DE MARSEILLE**

DIPLOME D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Par Didier AURELLE

**De l'évolution moléculaire à l'adaptation :
approches de génétique des populations en milieu aquatique**

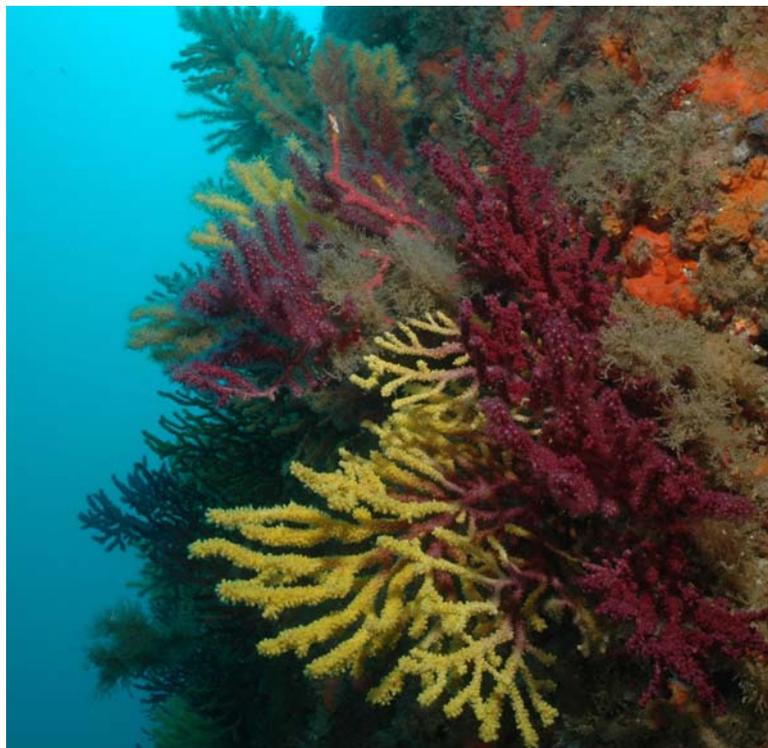


Photo O. Bianchimani

Soutenu le 6 février 2009 devant le jury constitué de :

Denis Allemand, Professeur au Centre Scientifique de Monaco
Carole Borchiellini, Maître de Conférences à Aix-Marseille Université
Charles-François Boudouresque, Professeur à Aix-Marseille Université
Jean-Pierre Féral, DR CNRS, Directeur de l'UMR 6540 DIMAR
Pascale Garcia, Professeur à l'Université de La Rochelle
Pierre Pontarotti, DR CNRS, Aix-Marseille Université

Remerciements...

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté de sacrifier une partie de leur temps pour juger ce travail et assister à cette soutenance. Il a été difficile de fixer un choix dans la date, mais nous y voilà enfin.

Merci donc à Pascale Garcia d'avoir fait le voyage depuis la Rochelle et à Denis Allemand depuis Monaco. Merci à Carole Borchellini d'avoir bien voulu s'éloigner des éponges et de l'évo-dévo pour se pencher sur la génétique des populations. Merci à Charles-François Boudouresque d'avoir accepté de se pencher sur ce travail de génétique. Merci à Jean-Pierre Féral d'avoir soutenu ces recherches. Un grand merci à Pierre Pontarotti d'être là !

Merci également à tous les membres du laboratoire avec qui je collabore ou j'ai collaboré : Anne Chenuil, Emmanuelle Renard, Caroline Rocher, Valérie Lemesle, Joaquim Garrabou, Marc Bally, Christian Marschal, Pierre Chevaldonné, Olivier Bianchimani et tous ceux qui aident au fonctionnement quotidien : Joelle, Serge...

Merci à Patrick Berrebi qui a encadré mes premiers travaux de recherches et une pensée pour Ghislaine.

Merci aux étudiants qui sont à l'origine de la plupart des résultats présentés ici et qui par leur motivation nous aident à avancer : Kenza, Gwilherm, Emilie, Isabel, Marie, Pascal, Eve, Sarah, Marion, Caroline, Flora...

Sommaire

I. Curriculum vitae:	4
Formations suivies	6
Responsabilités et activités scientifiques et administratives	7
II. Activités d'enseignement:	8
III. Activités de recherches:	13
A) Recherche de marqueurs chez les Octocoralliaires: évolution moléculaire et considérations méthodologiques:	15
1) Problématique générale:	15
2) Faible variabilité l'ADN mitochondrial chez les Octocoralliaires:	19
3) Evolution des marqueurs ITS	20
4) Développement et application de marqueurs nucléaires:	21
a) Analyses préliminaires des AFLPs:	21
b) Diversité de séquences d'introns:	22
B) De la différenciation à la spéciation: le cas des Téléostéens:	24
1) Phylogénie et évolution des Siganiidae:	25
2) Phylogéographie de la truite, <i>Salmo trutta</i>: analyse des populations du sud-ouest de la France :	27
C) Structure génétique des populations et flux de gènes en milieu aquatique:	30
1) Des flux de gènes à grande distance : le cas de la girelle, <i>Coris julis</i> :	30
2) Isolement et contacts secondaires chez la truite, <i>Salmo trutta</i> :	32
3) Différenciation à courte distance sans isolement à long terme chez les Octocoralliaires méditerranéens ?	37
D) Perspectives de recherches: sélection et adaptation en milieu marin:	41
1) Plasticité et réponse des Octocoralliaires au changement climatique:	41
2) Diversité génétique et résistance aux perturbations:	42
3) Plasticité écologique chez l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>:	43
Conclusion:	44
Publications dans des revues à comité de lecture	49
Actes de congrès ou chapitres d'ouvrages	49
Communications scientifiques	50

I. Curriculum vitae:**Didier AURELLE**

Maître de Conférences au Centre d'Océanologie de Marseille / Université de la Méditerranée

Laboratoire d'affectation: UMR 6540 DIMAR: Diversité, Evolution et Ecologie Fonctionnelle Marine.

né le 04 octobre 1972 à Saint-Etienne (42)
nationalité française

Adresse professionnelle:

Station Marine d'Endoume, rue de la batterie des Lions, 13007 Marseille

Adresse personnelle:

23 traverse de la Roseraie, 13007 Marseille

Téléphone: 04 91 04 16 18

Courriels: didier.aurelle@univmed.fr / aurelle.didier@gmail.com

Site internet: <http://www.com.univ-mrs.fr/DIMAR/perso/DA/index.html>

Parcours universitaire et professionnel:

1990/1992 **classes préparatoires** mathématiques supérieures et spéciales biologie au lycée Claude Fauriel de Saint-Etienne (42).
Reçu 2^{ème} au concours d'entrée de l'Ecole Normale Supérieure de Paris (option biologie / géologie)

1992/1996 scolarité à l'Ecole Normale Supérieure de Paris; **magistère de biologie-biochimie.**

Juillet 1993 stage au laboratoire d'Ecologie de l'Ecole Normale Supérieure de Paris sous la direction de Gérard Lacroix

1994/1995 **Agrégation de Sciences de la Vie et de la Terre;** reçu (6^{ème}).

1995/1996 **DEA Biologie de l'Evolution et Ecologie à l'Université Montpellier II.**
Stage effectué au Laboratoire Génome et Populations (directeur du laboratoire: F. Bonhomme, directeur de stage: P. Berrebi)
Sujet: Différenciation génétique chez la truite commune (*Salmo trutta*, L.) des Pyrénées Atlantiques: apport des microsatellites. Mention Bien

1996/1999 Thèse à l'Université Montpellier II. **Financement: Allocataire Moniteur Normalien.**

Thèse effectuée au laboratoire Génome et Populations (directeur du laboratoire: F. Bonhomme, directeur de stage: P. Berrebi)

Sujet: Contacts secondaires naturels et artificiels chez la truite commune (*Salmo trutta*, L.) des Pyrénées occidentales françaises: utilisation de marqueurs microsatellites pour la distinction de taxons faiblement différenciés.

Soutenue le 09 juillet 1999. Mention Très Honorable.

2000 **Stage de recherche post-doctoral** à l'Universidade do Algarve, Faro, Portugal.

Sujet: Différenciation génétique chez les poissons marins (*Coris julis* et *Lipophrys pholis*).

2000/2002 **Professeur agrégé de Sciences de la Vie et de la Terre** aux collèges Eustache Deschamps de Vertus et Stéphane Mallarmé de Fère Champenoise (51)

2002/actuel **Maître de Conférences au Centre d'Océanologie de Marseille.** Affecté à l'UMR 6540 DIMAR (Diversité, Evolution et Ecologie Fonctionnelle Marines)

2006/2008 **En délégation au CNRS** (affecté à l'UMR DIMAR).

Formations suivies

Depuis mon arrivée au laboratoire DIMAR j'ai suivi diverses formations qui m'ont notamment permis d'apprendre de nouvelles techniques expérimentales nécessaires à l'évolution de mes projets de recherche. J'ai transmis au sein du laboratoire DIMAR les connaissances acquises lors de certaines de ces formations que ce soit par des démonstrations directes (séquenceur automatique, automate...) ou lors de séminaire spécifiques (séquenceur automatique, PCR en temps réel).

- **Formation à l'enseignement supérieur:** au cours de mon monitorat (1996-1999) j'ai suivi les cours du Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur de Montpellier.
- **Introduction aux puces à ADN** dans le cadre du réseau d'excellence Marine Genomics. 4-5 mars 2005, Bremerhaven (Allemagne) – Alfred Wegener Institute
- **Utilisation de l'analyseur génétique ABI 3130:** manipulation de l'appareil et utilisation des logiciels d'analyses de séquences et de fragments. Applied Biosystems. 11-13 décembre 2006, Courtaboeuf.
- **Analyse de la biodiversité moléculaire.** 29 novembre 2004. Formation assurée par N. Galtier dans le cadre du Plan de Formation de l'UMR DIMAR.
- **Utilisation de l'automate de pipettage EpMotion d'Eppendorf.** Formation assurée par Eppendorf au laboratoire DIMAR le 11 janvier 2007.
- **Théorie de la coalescence.** 12 et 13 avril 2007. Formation assurée par Michel Veuille et Raphaël Leblois dans le cadre du Plan de Formation de l'UMR DIMAR.
- **Communication.** 4-5 octobre et 3-4 décembre 2007. Formation assurée par Sud Performance dans le cadre du Plan de Formation de l'UMR DIMAR.
- **Utilisation de l'appareil de PCR en temps réel Realplex d'Eppendorf.** Formation assurée par Eppendorf au laboratoire DIMAR le 11 mars 2008.
- **Utilisation du logiciel Matlab.** Formation assurée par J.-C. Poggiale au Centre d'Océanologie de Marseille les 20 et 21 mars 2008.
- **PCR en temps réel.** Université Claude Bernard Lyon 1 du 31 mars au 4 avril 2008. Formation assurée par Laurent Bezin et Anne Morales.
- **Pratique et interprétation des analyses de variance ANOVA.** Formation proposée par la délégation Provence et Corse du CNRS, les 5 et 6 juin 2008.
- **Formation de chargé d'évacuation.** Formation des personnels de l'Université de la Méditerranée, le 17 juin 2008 à Marseille.
- **Formation au rôle de chefs d'équipe.** Dans le cadre du plan de formation de l'UMR DIMAR. Formation assurée par Sud Performance, le 9 octobre 2008 à Saint-Cyr sur Mer.

Responsabilités et activités scientifiques et administratives

Responsabilités administratives:

- membre du **conseil d'administration** du collège Eustache Deschamps de Vertus (année scolaire 2000-2001)
- membre du **conseil d'administration** du Centre d'Océanologie de Marseille de 2003 à 2005
- membre de la **commission de spécialistes** du Centre d'Océanologie de Marseille, section 67
- membre du **conseil de laboratoire** de l'UMR DIMAR
- membre de la **commission informatique** du Centre d'Océanologie de Marseille
- **responsable d'une demande de financement pour l'acquisition d'un séquenceur automatique d'ADN** auprès du CNRS (SDU et SDV) et de la région PACA (appareil acquis en 2006). J'ai suivi une formation concernant l'utilisation de cet appareil. Je suis **co-responsable de la gestion des consommables et de la formation des nouveaux utilisateurs** au sein du COM
- **responsable de l'achat d'un automate de pipetage** (achat effectué en décembre 2006)
- **responsable de l'achat d'un appareil de PCR quantitative** (achat effectué en décembre 2007) et de l'installation de cet appareil dans l'UMR DIMAR.
- **représentation du directeur de l'UMR** à diverses réunions : école doctorale, conseil scientifique du COM, réunion des directeurs d'unité EDD...
- **délégation de signature par la direction de l'UMR**

Responsabilités et autres activités scientifiques:

- participation au **programme européen "Concerted action on identification, management and exploitation of genetic resources in the brown trout (*Salmo trutta*)"** ("TROUTCONCERT" EU FAIR CT 97-3882). Intervention au congrès TROUTCONCERT, Silkeborg (Danemark), 30 juin-4 juillet 1998.
- participation à la rédaction de l'appel d'offre 2003 de l'Institut Français de la Biodiversité (financement obtenu)
- participation au **réseau d'excellence européen Marine Genomics**. Dans le cadre de ce réseau, participation au **cours introductif sur les puces à ADN** (Bremerhaven, Allemagne, 4-5 mars 2005) et à l'**atelier sur la réponse au stress** (Cambridge, UK, 26-28 octobre 2005) ainsi qu'à plusieurs réunions sur le fonctionnement général du réseau.
- obtention d'une **ACI jeunes chercheurs** en collaboration avec Joaquim Garrabou (2003-2006)
- participation à la rédaction du **projet Medchange financé par l'Agence Nationale de la Recherche**. Ce projet a été accepté pour la période 2005-2008 et je suis responsable de sa partie génétique.
- **rapporteur d'articles** pour les revues Molecular Ecology, Heredity, Fisheries Research, Cybium, Marine Ecology Progress Series, Marine Biology, Marine Ecology.

II. Activités d'enseignement:

Moniteur à l'Université Montpellier II (1996-1999):

- Travaux pratiques et travaux dirigés de biologie cellulaire (DEUG)
- Travaux pratiques et travaux dirigés de biologie végétale (DEUG)
- Travaux dirigés de génétique des populations (Licence et Maîtrise)

Enseignement dans le secondaire (2000-2002):

- **Professeur agrégé de Sciences de la Vie et de la Terre** aux collèges Eustache Deschamps de Vertus (2000-2001 et 2001-2002) et Stéphane Mallarmé de Fère Champenoise (2001-2002), département de la Marne (51)
- Enseignements aux niveaux 5^{ème}, 4^{ème} et 3^{ème} selon les programmes officiels: géologie, évolution de la vie, biologie de la reproduction, immunité, locomotion, respiration...

Maître de Conférences au Centre d'Océanologie de Marseille (COM)

Bilan des enseignements:

Les unités dont je suis (ou j'étais) responsable sont indiquées en gras.

Unités dans lesquelles je n'interviens plus (non renouvelées ou changement de contenu) :

- Travaux pratiques de biologie moléculaire (licence 3^{ème} année)
- Ecologie des milieux extrêmes (licence 3^{ème} année)
- **Dynamique et génétique des populations** (licence 3^{ème} année)
- **Faune et flore terrestres méditerranéennes** (licence 3^{ème} année): cours et sortie de terrain sur le littoral des Calanques

Unités dans lesquelles j'interviens actuellement :

- Observation de la diversité du monde vivant (licence 1^{ère} année): interventions sur certaines séances de travaux pratiques
- Processus et théories écologiques (licence 3^{ème} année): interventions ponctuelles en cours et travaux dirigés
- **Evolution et génétique des populations** (licence 3^{ème} année)
- **Génétique des populations** (master 1^{ère} année)
- **Génétique de la conservation** (au sein de l'unité Protection; master 2^{ème} année)

Bilan des enseignements:

Mes enseignements couvrent des domaines variés (de la génétique des populations à la biologie animale) et se s'effectuent selon également diverses modalités: cours, travaux dirigés, travaux pratiques, sorties de terrain (découverte de la flore méditerranéenne). Ceci me permet de m'intéresser à d'autres thèmes que ceux qui concernent directement mes recherches. J'interviens par exemple dans l'unité "Observation du monde vivant" (responsable: Emmanuelle Renard) et j'essaie ainsi de me tenir au courant des principaux changements dans la classification du monde vivant. Par ailleurs les interventions en travaux pratiques, bien que très injustement considérées en terme de rémunérations horaires, ont à mes yeux une très grande importance pédagogique en biologie et sont d'ailleurs réclamées par les étudiants. Ceci est également le cas pour les sorties de terrain.

D'un point de vue quantitatif mes cours concernent principalement **la génétique des populations et les théories de l'évolution** qui y sont associées. C'était l'élément central affiché dans le profil lors de mon recrutement car ces thématiques n'étaient que peu développées dans les unités d'enseignement proposées par le COM. J'ai donc mis en place une unité d'introduction à la dynamique et à la génétique des populations en troisième année de licence, ainsi qu'une unité spécifique de génétique des populations en master, qui permet un approfondissement des notions abordées en licence. Ces unités en dehors des heures de cours magistraux comportent des séances de travaux dirigés et, certaines années, de travaux pratiques. D'autre part au niveau master des études d'article scientifique permettent aux étudiants de se familiariser avec les travaux de recherche. Dans ce domaine j'effectue aussi des interventions plus ponctuelles dans d'autres unités où l'outil génétique peut s'avérer informatif (par exemple dans le domaine de la biologie de la conservation en 2^{ème} année de master).

Projets pédagogiques:

Pour les prochaines années j'envisage de réintroduire des séances de **travaux pratiques de génétique des populations** qui soient plus en lien avec les pratiques actuelles de l'UMR DIMAR et des autres laboratoires qui travaillent dans ce domaine en milieu marin. Le but et la difficulté, seraient en partant de tissus ou éventuellement d'ADN déjà extrait, de faire réaliser aux étudiants les différentes étapes permettant la mise en évidence et l'analyse de polymorphisme au niveau de l'ADN: PCR, électrophorèses... Ceci pourrait concerner par exemple l'étude du polymorphisme de longueur de locus microsatellites ou le séquençage de locus mitochondriaux d'espèces déjà étudiées dans notre unité. Les résultats obtenus seraient ensuite analysés avec des outils statistiques appropriés en les comparant avec ceux issus d'études précédentes. Cette dernière étape aura pour but de familiariser les étudiants avec la manipulation des données et l'utilisation de certains logiciels de génétique des populations. La mise en place de tels travaux pratiques est cependant dépendante des effectifs des étudiants par rapport au matériel et aux locaux disponibles.

Au niveau des exercices d'analyses d'article, dès la rentrée 2007 j'ai fait mettre en place, dans l'unité de génétique des populations de Master 1, la méthode C.R.E.A.T.E. (*Consider, Read, Elucidate hypotheses, Analyze and interpret the data, and Think of the next Experiment*; Hoskins *et al.*, 2007¹). Selon cette approche pédagogique, nous fournissons aux étudiants les parties introduction, matériel et méthodes et résultats d'un article de recherches. Ils doivent en tirer leurs propres interprétations qui seront par la suite comparées aux interprétations originales des auteurs. Ils proposeront également des stratégies expérimentales permettant de tester leurs hypothèses. Ils défendront ces choix en présentant une demande de financement

¹ S.G. Hoskins, L.M. Stevens, R.H. Nehm. Genetics (2007) Selective use of the primary literature transforms the classroom into a virtual laboratory. **176**: 1381–1389. DOI: 10.1534/genetics.107.071183

fictive qui sera mise en concurrence au sein du groupe d'étudiants. Selon les créateurs de cette méthode, le but général est de mieux impliquer les étudiants dans l'analyse des données, ainsi que de leur permettre se représenter et de s'approprier la démarche scientifique, voire de se projeter dans le métier de chercheur.

En ce qui concerne le contenu des cours, depuis la rentrée 2008 j'ai recentré *l'unité de licence* (actuellement intitulée "dynamique et génétique des populations") sur la *génétique des populations et les théories de l'évolution*. Ceci s'est fait en éliminant la partie "dynamique des populations" proprement dite qui est traitée dans d'autres unités proposée par le COM en lien avec la modélisation. En licence je développe maintenant plus généralement l'étude des théories de l'évolution et j'ai introduit un TD de simulations grâce au programme Populus. Cette réorientation me permettra également de développer de nouveaux thèmes dans *l'unité de Master première année*, notamment une introduction à la *théorie de la coalescence* (principe général, lien entre démographie et coalescence, approche qualitative et quantitative des effets des changements démographiques et de la sélection), ainsi que des développements en ce qui concerne la *phylogéographie* et les outils d'analyse qui y sont associés. Je compte notamment présenter les techniques d'analyses de données de séquences : analyses d'arbres ou de réseaux, tests de détection d'événements démographiques ou sélectifs particuliers, etc.

Le contenu des enseignements en biologie évolutive au Centre d'Océanologie de Marseille sera très probablement amené à fortement évoluer dans les prochaines années. D'une part il s'agit d'une thématique en plein essor qui utilise entre autres les apports de la génomique ou s'intéresse à des problèmes de grande importance sociétale (rôle de la biodiversité, changement global...) et ces évolutions devront être prises en compte dans les enseignements (elles le sont déjà en partie). D'autre part, dans le cadre de la fusion prévue entre les 3 universités d'Aix-Marseille et de la création de l'Institut Pythéas², cette réflexion pourrait s'enrichir d'échanges avec d'autres laboratoires marseillais travaillant sur des thématiques similaires mais en milieu terrestre.

Dans tous les cas, je souhaite, dans la mesure du possible, conserver la diversité d'enseignements que j'assure actuellement et notamment continuer à intervenir dans les unités concernant l'étude pratique des organismes vivants. Il faut aussi garder à l'esprit que l'attractivité actuelle de la filière biologie et écologie marine du COM est en grande partie liée aux enseignements ayant trait à l'écologie et à l'étude de la biodiversité. Ces thèmes doivent évidemment être conservés et renforcés (par un rapprochement avec d'autres unités comme déjà évoqué). Cependant à mon avis, il est également nécessaire que les étudiants puissent acquérir une formation solide dans d'autres domaines (par exemple en biologie cellulaire ou en biochimie) qui leur sera ensuite utile que ce soit au niveau de la recherche ou pour d'éventuelles reconversions. De manière plus générale, il me semble important que les enseignements assurés dans les premières années de licence contribuent à fournir aux étudiants une culture générale plus large dans le domaine de la biologie. Ceci leur serait permettrait d'être plus polyvalents dans le choix de leur cursus après la licence Le master permet ensuite une spécialisation sur le milieu marin, d'un point de vue professionnel ou dans une optique de recherche.

² Il s'agit du nom donné au futur grand observatoire des sciences de l'univers à Marseille qui rassemblera de manière cohérente des astronomes, des océanographes et des écologistes terrestres et marins.

Formation à la recherche / encadrements de stagiaires

Depuis mon recrutement au COM j'ai *encadré 3 stages de Master 2 / DEA et je codirige actuellement 2 thèses*. J'ai aussi encadré plusieurs étudiants de Licence ou de Master 1 pour des durées plus courtes. Ces derniers types de stage, bien que moins productifs en résultats, sont importants afin de commencer à familiariser les étudiants avec le travail de laboratoire ainsi que pour entretenir des liens entre les filières d'enseignement et le monde de la recherche.

Directions ou co-directions de thèse:

(pour la description des sujets, voir la partie recherches)

Etudiant	Jean-Baptiste Ledoux	Gwilherm Penant	Kenza Mokhtar-Jamaï
Date	2004-2008	2006-2009	2007-2010
Financement	Région PACA	Région PACA	Allocation Ministère
Sujet	<i>Biologie de la conservation des Octocoralliaires dans un contexte de changement climatique: une approche génétique et écologique</i>	<i>Etude génétique de l'impact des aires marines protégées: le cas du parc national de Port-Cros</i>	<i>Diversité génétique et biologie de la conservation d'invertébrés sessiles longévifs: Paramuricea clavata comme espèce modèle</i>
Directeurs	J.P.Féral (HDR; 10%), D.Aurelle (45%), J.Garrabou (45%)	J.P.Féral (HDR; 10%), A.Chenuil (45%) D.Aurelle (45%)	J.P.Féral (HDR; 10%), D.Aurelle (90%)
Situation actuelle	Thèse en cours; fin prévue 10/2008	Thèse en cours	Thèse en cours
Publications	-	-	-

Directions de Master 2 (ou DEA):

Etudiant	Isabel Calderón	Sarah Lemer	Kenza Mokhtar Jamaï
Date	2004	2006	2007
Diplôme	DEA Océanographie / COM	Master 2 Océanographie / COM	Master 2 Océanographie / COM
Sujet	<i>Analyse de l'intérêt des marqueurs ITS2 nucléaires et COI mitochondriale pour déterminer la structure génétique des populations d'Eunicella cavolinii dans la Méditerranée nord-occidentale: application à l'étude des effets du réchauffement climatique</i>	<i>Phylogénie des Siganidae, poissons récifo-lagonaires de l'Indo-Pacifique</i>	<i>Génétique des populations du corail rouge (Corallium rubrum): estimation de la diversité génétique et des capacités de dispersion</i>
Directeurs	D.Aurelle et J.Garrabou	P.Borsa (IRD Nouméa) et D.Aurelle	D.Aurelle et J.-B.Ledoux
Situation actuelle	Doctorante (Barcelone)	Doctorante (Perpignan)	Doctorante (DIMAR)
Publications sur le sujet	- Calderón <i>et al.</i> (2006)	- Lemer <i>et al.</i> (2007) - Borsa <i>et al.</i> (2007)	-

Liste des publications associées à ces encadrements:

Borsa P., Lemer S., **Aurelle D.** (2007) Patterns of lineage diversification in rabbitfishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, 427-435. doi:10.1016/j.ympev.2007.01.015.

Calderón I., Garrabou J., **Aurelle D.** (2006) Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **336**, 184-197. doi:10.1016/j.jembe.2006.05.006

Lemer S., **Aurelle D.**, Vigliola L., Durand J.-D., Borsa P. (2007) Cytochrome *b* barcoding, molecular systematics, and geographic differentiation in rabbitfishes (Siganidae). *C.R. Biologie*, **330**, 86-94. doi:10.1016/j.crv.2006.09.002

Autres directions de stages

Niveau	Nom	Date	Titre du stage
L3	Caroline GEANT	Mai 2005	Impacts du changement climatique en Méditerranée occidentale: intérêt de l'étude génétique des populations d' <i>Eunicella cavolinii</i>
M1	Flora SALVO	Février-juin 2005	Développement et utilisation de marqueurs moléculaires pour l'étude génétique des populations de <i>Paramuricea clavata</i>
M1	Aude PASCO	Février-juin 2006	Mise au point de marqueurs pour l'étude de la structuration génétique d' <i>Aplidium fuscum</i>

Autres responsabilités pédagogiques:**Tutorat de moniteurs:**

- Julie Mosséri, monitrice au COM (2003-2006)
- KENZA Mokhtar-Jamaï, monitrice au COM (2007-2010)

Responsable de plusieurs unités d'enseignements (voir précédemment)

Membre du jury de master d'Océanographie de 2^{ème} année, spécialité Biologie et Ecologie Marines: évaluation des rapports de stage et des exposés oraux.

Enseignant référent pour des étudiants du COM (à partir de septembre 2008)

III. Activités de recherches:

Mots clés: évolution, génétique des populations, phylogéographie

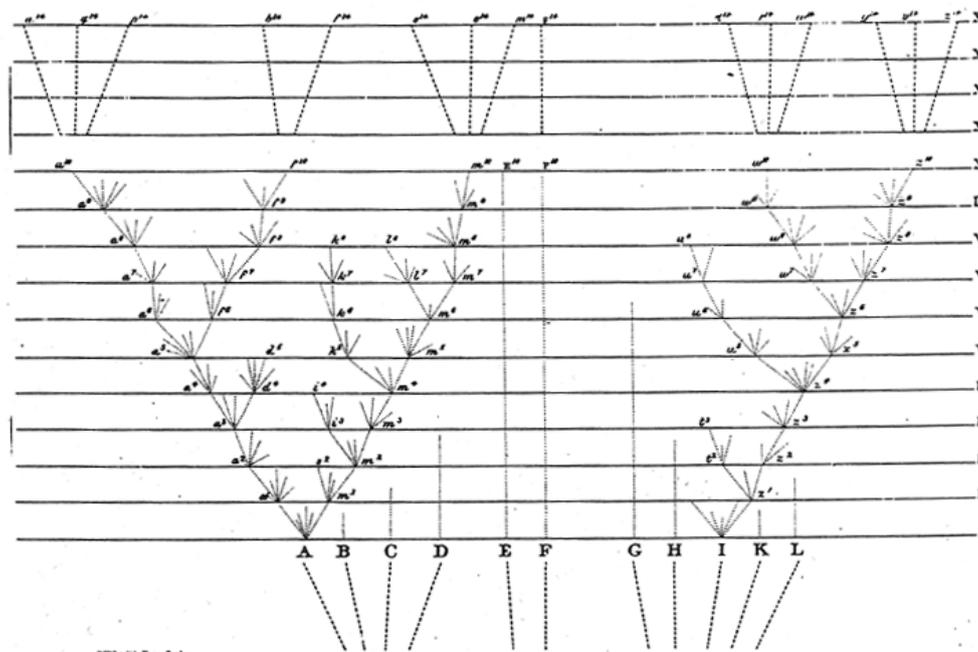


Fig.1 Figure publiée dans le livre de C. Darwin, "The origin of species" (1859).

Introduction:

Mes thèmes de recherche concernent principalement l'étude de l'évolution biologique à l'intérieur d'une espèce voire entre espèces proches afin de tenter de comprendre ***comment se structure la diversité intra-spécifique et quelle est sa signification***. En effet la coexistence au sein d'une même espèce de plusieurs génotypes ou phénotypes pose tout d'abord la question de l'origine et du maintien de ce ***polymorphisme***: quels sont les mécanismes qui peuvent permettre d'expliquer la coexistence de ces variations? D'autre part, cette étude pose aussi le problème de l'importance de cette diversité à l'échelle de l'évolution des espèces et notamment du lien qui peut exister entre différenciation intra-spécifique et spéciation. Le problème avait déjà été abordé par Darwin (1859) qui dans l'Origine des Espèces schématisait l'évolution selon un continuum de dichotomies successives allant des divergences entre populations d'une même espèce aux différences entre espèces, familles... jusqu'aux grands phylums (fig.1). Si cette représentation apparaît aujourd'hui trop simplifiée, la question de l'importance relative des ***différentes forces évolutives (dérive, sélection, migration, mutation)*** aux différentes échelles de l'évolution reste posée (voir par exemple le récent point de vue de Nei, 2007, sur l'importance de la mutation). Dans ce cadre, la génétique des populations contribue à évaluer le rôle de ces mécanismes dans l'évolution passée ou en cours des espèces. Cette approche concerne par définition l'analyse des différences génétiques existant entre individus issus d'une même population³ ou de populations différentes d'une même espèce. Or, malgré les

3 Le terme population sera ici défini comme un ensemble d'individus se reproduisant entre eux par la voie sexuée; définition de Johannsen, 1903, citée dans Gouyon *et al.*, 1997.

développements méthodologiques et conceptuels importants que cette discipline a connu, que ce soit en termes de nombre d'espèces étudiées ou des outils utilisés (avec l'avènement des marqueurs ADN et des outils de modélisation), diverses questions subsistent. Parmi ces problématiques, mes activités de recherches passées ou à venir s'articulent principalement autour des quatre points suivants:

i) Tout d'abord, ***certains groupes d'organismes ont de ce point de vue été peu étudiés jusqu'à présent***. C'est le cas de nombreux invertébrés marins qui ne présentent pas les caractères "classiques" des espèces marines (grande taille de population, fécondation externe et panmixie...); comme par exemple pour certains ***cnidaires*** ou spongiaires. Comme on peut s'y attendre d'après les connaissances acquises sur la biologie et l'écologie de ces organismes, leur étude amène à relativiser les conclusions sur les distances de dispersion en milieu marin, et a mis en évidence des structurations génétiques à courte distance, par exemple chez le corail rouge, *Corallium rubrum* (Costantini *et al.*, 2007a) ou l'éponge *Crambe crambe* (Calderón *et al.*, 2007). Par ailleurs, les modalités de l'évolution d'un marqueur couramment utilisé tel que l'ADN mitochondrial, peuvent y être sensiblement différentes par rapport à d'autres phylums (Calderón *et al.*, 2006). Des analyses préliminaires plus poussées sont donc nécessaires afin de tenter d'identifier des marqueurs potentiellement informatifs.

ii) Lorsqu'on s'intéresse à l'histoire évolutive des espèces, les données de séquences d'ADN peuvent être utilisées pour une ***approche phylogéographique*** (domaine aux limites de la génétique des populations et de la phylogénie) afin de ***tenter de reconstituer les principaux événements démographiques, de migration voire de spéciation...*** De nombreux outils statistiques sont actuellement disponibles afin de tester des hypothèses évolutives à partir des informations de séquences et de fréquences d'allèles. Cependant le plus souvent cette approche ne repose que sur un locus (généralement mitochondrial) alors qu'une comparaison multilocus serait plus informative. Il est donc nécessaire d'identifier des régions de l'ADN pouvant être utilisées pour ces études.

iii) Un cas particulier concerne l'utilisation de ***marqueurs hypervariables de type microsatellites de l'ADN***. La grande variabilité de ces locus les rend très performants pour étudier la structuration entre populations même à de faibles niveaux de différenciation. Ces propriétés ont ainsi permis de mettre en évidence des différences génétiques, significatives et stables, chez plusieurs espèces de poissons marins pour lesquelles ceci n'était pas attendu (Ruzzante *et al.*, 1999; Hemmer-Hansen *et al.*, 2007). Ces résultats vont concerner ***des temps évolutifs plus récents*** que ceux issus de l'analyse de l'ADN mitochondrial. Cependant le problème de ***l'interprétation de cette micro différenciation*** se pose à la fois d'un point de vue biologique et dans une optique de conservation (Hedrick, 1999). Dans quelle mesure ces différences génétiques de faible ampleur vont-elles avoir un impact ou simplement nous renseigner sur l'évolution des espèces? D'autre part la question se pose également de savoir ***quelles méthodes statistiques sont les plus pertinentes pour analyser ces locus hypervariables***.

iv) La majorité des études de génétique des populations réalisées jusqu'à présent sont faites sous l'hypothèse d'une évolution neutre ou quasi neutre des marqueurs employés. Or d'une part ***la neutralité de divers marqueurs couramment utilisés peut être remise en cause qu'il s'agisse de l'ADN mitochondrial*** (Bazin *et al.*, 2006) ***ou des microsatellites*** (Kashi et King, 2006). D'autre part l'étude de ***l'impact des changements environnementaux*** et notamment du ***changement global*** sur les populations naturelles nécessite de prendre en compte les processus sélectifs, ou au moins de se poser la question des capacités d'évolution des organismes par rapport à la vitesse de ces changements (Berteaux *et al.*, 2004) et donc de s'intéresser à la ***diversité génétique adaptative*** et à ses relations avec la diversité neutre.

D'un point de vue chronologique, mes recherches ont d'abord concerné l'étude de la différenciation et des interactions génétiques entre populations faiblement différenciées à l'aide de marqueurs hypervariables (point iii). Les modèles biologiques concernaient les poissons d'eau douce (thèse) ou marins (post-doctorat). Suite à mon recrutement au Centre d'Océanologie de Marseille, j'ai étudié des organismes peu connus au plan génétique, les Octocoralliaires de Méditerranée (point i) et pour lesquels les problématiques liées aux perturbations vont m'amener à m'intéresser prochainement aux aspects génétiques des processus adaptatifs (perspectives et travaux en cours, point iv). Par ailleurs dans le cadre de collaborations, ou en lien avec mes autres recherches, j'ai effectué plusieurs travaux portant sur la phylogéographie ou les processus de spéciation (point ii).

Dans un souci de cohérence, je ne présenterai donc pas mes travaux selon un ordre chronologique mais en fonction des thématiques abordées.

A) Recherche de marqueurs chez les Octocoralliaires: évolution moléculaire et considérations méthodologiques:

Cadre des recherches: UMR 6540 DIMAR

Etudiants: Isabel Calderón (DEA), Jean-Baptiste Ledoux (thèse)

Période: 2002-actuel

1) Problématique générale:

L'UMR DIMAR étudie les processus qui sont responsables de la **structuration actuelle de la biodiversité marine ainsi que l'impact potentiel des perturbations naturelles ou d'origine anthropique sur cette diversité**. Ces recherches concernent principalement les écosystèmes benthiques côtiers, qui sont particulièrement exposés à des modifications environnementales et au changement climatique. Au niveau génétique j'étudie principalement des invertébrés sessiles longévifs, avec les objectifs suivants:

- Dans un premier temps il est nécessaire de tester la **présence éventuelle d'espèces cryptiques**, phénomène fréquent en milieu marin (voir Knowlton, 1993, 2000; Chenuil et Féral, 2003). Ceci nécessite le recours aux outils génétiques.
- Au sein d'une même espèce il faut identifier les **principales subdivisions génétiques** qui reflètent les séparations historiques et peuvent correspondre à des unités évolutives majeures à prendre en compte en biologie de la conservation. L'étude de différences de séquences au niveau de l'ADN permet de fournir cette dimension historique dans l'évolution des populations, grâce à une approche de **phylogéographie**.
- L'impact des perturbations chez les invertébrés sessiles dépendra notamment de la **connectivité entre populations**. Elle conditionnera les capacités de colonisation ou recolonisation à l'échelle locale. Or les phénomènes de dispersion sont difficiles à appréhender directement en milieu marin du fait de l'existence d'une phase larvaire pélagique pour peut être 70% des invertébrés benthiques (Mileikovsky, 1971). L'étude des flux de gènes constitue une approche indirecte d'estimation des capacités de dispersion (Féral, 2002). Selon les dimensions temporelles ou spatiales considérées ceci pourra se faire soit à partir de données de séquences soit à l'aide de marqueurs microsatellites. Ces derniers permettront également de **délimiter les populations et d'évaluer leur niveau de diversité génétique**.
- Par ailleurs il faut envisager **quels rôles respectifs pourront jouer l'acclimatation et l'adaptation** dans la réponse des espèces aux perturbations, l'adaptation génétique supposant l'existence de différences héritables de valeur sélective face au facteur considéré.

Parmi les différentes perturbations susceptibles d'affecter le milieu marin, les **effets du changement climatique** actuel constituent une priorité de recherche du fait de l'ampleur du phénomène, de ses interactions possibles avec les autres sources de perturbations et de ses effets déjà sensibles (Hughes, 2000; Hughes *et al.*, 2003). En Méditerranée nord-occidentale, des événements de mortalités massives d'invertébrés sessiles ont été observés en 1999 et 2003. Ces événements sont apparus suite à des épisodes de températures des eaux anormalement élevées et stables, qui pourraient être liés au changement climatique global (Romano *et al.*, 2000). Les organismes les plus touchés étaient des Spongiaires et des Cnidaires Anthozoaires (Perez *et al.*, 2000). Cependant au sein d'une même espèce, une grande variabilité de réponse a été observée entre populations et entre individus d'une même population (Garrabou *et al.*, 2001). L'analyse des conséquences possibles de telles perturbations nécessite donc d'une part de comprendre l'origine de cette diversité de réponse et d'autre part d'évaluer les capacités de récupération des populations. Une approche multidisciplinaire est pour cela nécessaire et elle a été mise en place dans le cadre d'abord d'une Action Concertée Incitative, puis du **programme Medchange** (www.medchange.org) financé par l'ANR et piloté par DIMAR. Dans le cadre de ce projet je suis responsable de la partie génétique qui a pour objectifs principaux les trois problématiques précédemment citées (espèces cryptiques, phylogéographie, connectivité des populations) mais aussi d'évaluer le niveau de diversité génétique des populations.

Parmi les espèces marines, les **Octocoralliaires** constituent un modèle de choix pour l'analyse de l'impact des perturbations sur les écosystèmes benthiques. Il s'agit en effet d'organismes sessiles et longévifs qui vont donc intégrer les modifications de leur environnement et qui seront potentiellement plus exposés aux perturbations. D'autre part plusieurs de ces espèces ont une place écologique importante dans les communautés du coralligène en Méditerranée et ont été affectées par les événements de mortalités massives (Garrabou *et al.*, 2001). Or le coralligène constitue, après les herbiers de posidonie, le deuxième "point chaud" de la biodiversité marine en Méditerranée (Ballesteros, 2006). Bien que des données existent sur la biologie des Octocoralliaires, leurs capacités réelles de dispersion et le niveau d'échanges intra et inter sites restent largement inconnus. Du point de vue génétique les niveaux de diversité, la structuration et l'évolution de ces populations à dynamique lente restent à étudier.

Dans le cadre du développement de la génétique des populations au laboratoire DIMAR j'ai donc choisi comme **modèles d'études plusieurs espèces d'Octocoralliaires présentes en Méditerranée occidentale: le corail rouge, *Corallium rubrum* et les gorgones *Paramuricea clavata* et *Eunicella cavolinii***. Ces 3 espèces de Cnidaires font partie du groupe des Octocoralliaires⁴ (voir encadré 1 pour une présentation de ces organismes).

⁴ Au sein du programme Medchange, une quatrième espèce est étudiée par Didier Forcioli (du laboratoire ECOMERS, Université de Nice Sophia Antipolis) : la gorgone *E. singularis*.

-1- Les espèces modèles en génétique dans le cadre du programme Medchange:

Au plan génétique j'étudie trois espèces de Cnidaires Octocoralliaires: le corail rouge, *Corallium rubrum* (Corallidae) et les gorgones *Paramuricea clavata* (Paramuriceidae) et *Eunicella cavolinii* (Gorgoniidae). Dans le genre *Eunicella*, à titre comparatif, j'analyse ponctuellement des séquences des espèces *E. singularis* et *E. verrucosa*. Ce sont des organismes coloniaux, sessiles sur substrat dur, longévifs et non symbiotiques, à l'exception d'*E. singularis* qui héberge des Dinobiontes du genre *Symbiodinium*. Ces organismes présentent des polypes à huit tentacules et s'alimentent de particules organiques en suspension (mortes ou vivantes). La position phylogénétique relative de ces espèces au sein des Octocoralliaires resterait à préciser (McFadden *et al.*, 2006).

Le corail rouge *Corallium rubrum* (Linné, 1758) :

Il se caractérise par un squelette de calcaire rouge massif utilisé en bijouterie, ce qui a entraîné son exploitation depuis l'antiquité. Le corail rouge est une espèce principalement méditerranéenne mais il est aussi connu du proche Atlantique (Maroc, Portugal, Cap-Vert ; Zibrowius, 1984). C'est une espèce de substrat dur observée dans les grottes semi-obscurtes ou les surplombs à faible éclaircissement. Il a déjà été récolté à plus de 600m de profondeur (H. Zibrowius, comm. pers.).

Les colonies peuvent atteindre 50cm de haut, mais celles de plus de 20 cm de haut et 2 cm de diamètre à la base sont devenues rares du fait de la pêche (Marschal *et al.*, 2004 et références correspondantes). La croissance est lente (0,35mm par an pour le diamètre basal) et une colonie pourrait vivre plusieurs dizaines d'années. Il s'agit d'une espèce à sexes séparés avec fécondation interne dans les polypes femelles et dont la biologie larvaire implique probablement de faibles capacités de dispersion (Vighi, 1972). L'âge à la première reproduction serait compris entre 7 et 10 ans (Torrents *et al.*, 2005).

La gorgone jaune *Eunicella cavolinii* (von Koch, 1887):

C'est une espèce endémique de Méditerranée, largement répandue dans le bassin occidental et l'Adriatique mais qui se fait plus rare dans le bassin oriental (Carpine et Grasshoff, 1975). La fécondation est interne et suivie d'une phase larvaire libre de courte durée (von Koch, 1887 *in* Weinberg et Weinberg, 1979). Les colonies présentent une couleur jaune à orangée, sont ramifiées dans un plan et font jusqu'à 30 cm de haut et de large. On la trouve essentiellement entre 10 et 30 m de profondeur (Carpine et Grasshoff, 1975) mais elle pourrait descendre jusqu'à 150 m. Lors d'une mission sur l'Urania en 2005, H. Zibrowius a pu ramener des échantillons prélevés à 115 et 127m de profondeur près de l'île Gavdos (sud de la Crète).

La gorgone rouge *Paramuricea clavata* (Risso, 1826) :

Cette espèce est également méditerranéenne et présente depuis le bassin occidental jusqu'à la mer Egée (Carpine et Grasshof, 1975 ; Salomidi, comm. pers.) et la Turquie. Les colonies peuvent atteindre 1 m de haut et sont de couleur rouge ou jaune. Il s'agit d'une espèce gonochorique, avec une ponte en juin, une fécondation externe et une embryogénèse qui se déroule à la surface de la colonie. Les larves auraient de faibles capacités de dispersion et les taux de recrutement annuels sont généralement faibles (voir Linares *et al.*, 2007 et les références correspondantes). Les profondeurs optimales se situent entre 40 et 100 m environ mais elle peut descendre jusqu'à 200 m (Carpine et Grasshoff, 1975).



P. clavata



E. cavolinii



C. rubrum

Echantillonnage:

Le point de départ des études de génétique des populations d'Octocoralliaires (aussi bien pour les analyses de séquences que pour les microsatellites) était de disposer d'un échantillonnage adapté. Dans le cas du corail rouge, 42 sites ont été échantillonnés. Ces sites correspondent à des régions différentes (Fig. 2) ou à différentes localités au sein d'une même région. Plusieurs profondeurs ou l'intérieur et l'extérieur de grottes dans une même localité ont été considérés a priori comme des sites différents. Par la suite, l'analyse génétique a permis de tester l'hypothèse d'une homogénéité entre ces sites. Un effort particulier d'échantillonnage a été réalisé dans les régions de Marseille, Corse et des îles Medes. Cet échantillonnage structuré permet de comparer des sites séparés par une quinzaine de mètres (intérieur / extérieur de grottes par exemple) jusqu'à plus de 2000 km de

distance pour les populations les plus éloignées. Ceci était également utile pour comparer les niveaux de diversité génétique dans différentes régions et dans des environnements contrastés. Les échantillons ont été prélevés principalement par Joaquim Garrabou et Jean-Baptiste Ledoux, ainsi que d'autres personnels de DIMAR ou du COM. Ils ont servi à la fois aux analyses de séquences d'introns et d'ADN mitochondrial et aux microsatellites, avec des nombres d'individus variables selon les marqueurs.

Un échantillonnage similaire est en cours pour *Paramuricea clavata* dans le cadre de la thèse de Kenza Mokhtar-Jamai. Le nombre d'échantillons actuellement disponibles est nettement plus réduit pour *Eunicella cavolinii*.

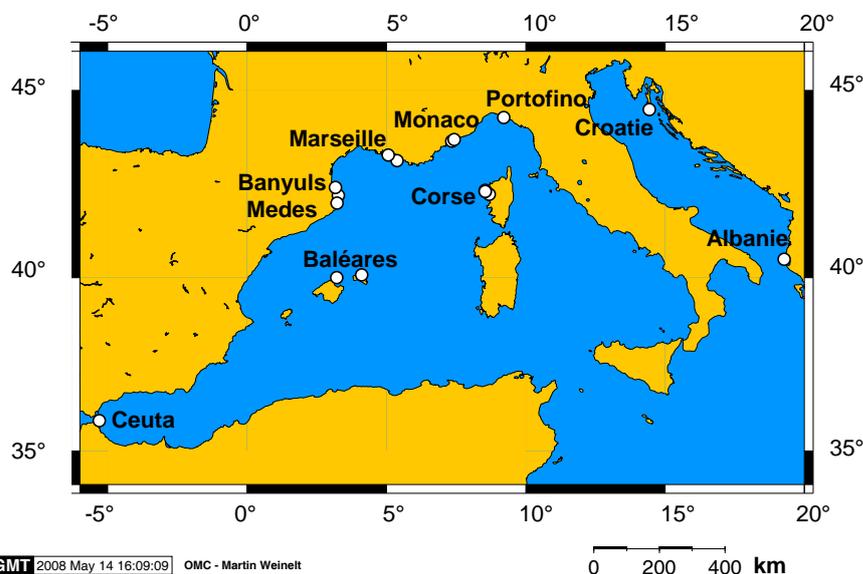


Fig. 2: principales régions échantillonnées pour l'étude génétique des populations de *C. rubrum*. Une même région peut correspondre à plusieurs sites d'étude (notamment dans le cas de Marseille, la Corse et les Medes). Les stations de travail de Medchange sont présentées sur le geoportail de Medchange: <http://piccard.esil.univmed.fr/medchange/map/activite.php>.

La première partie de cette étude a consisté en une analyse de la variabilité de séquence de locus potentiellement informatifs chez ces organismes et d'abord de l'ADN mitochondrial et des ITS nucléaires pour lesquels des amorces dites universelles étaient déjà disponibles. Etant donné le peu d'information apportée par ces locus, j'ai par la suite développé et analysé d'autres marqueurs (AFLP et introns). Par ailleurs nous avons également commandé à une société le développement de locus microsatellites pour certaines de ces espèces (voir chapitre C). Lors de ces études d'évolution moléculaire et de recherches de marqueurs, j'ai aussi contribué dans mon équipe à l'étude des processus de spéciation chez les éponges du genre *Aplysina* (encadré 2).

-2- Contribution à l'étude génétique des éponges du genre *Aplysina*:



© MedSeaWeb *Aplysina aerophoba*



© MedSeaWeb *A. cavernicola*

Ce travail consistait à étudier deux espèces supposées du genre *Aplysina* (Démospouges): *A. aerophoba* et *A. cavernicola*. Ces deux espèces, morphologiquement proches, se distinguent principalement par leur écologie : *A. aerophoba* se trouve dans des zones peu profondes et bien ensoleillées, alors que *A. cavernicola* est sciaphile. Des expériences de transplantations suggèrent l'existence d'un phénomène d'adaptation locale et donc la possibilité qu'il s'agisse effectivement de deux espèces présentes en sympatrie mais pas en syntopie.

Cependant en l'absence de critère diagnostic net pour distinguer ces organismes, il était nécessaire de réaliser des études génétiques afin de tester l'hypothèse de la présence de deux espèces et si possible d'en inférer un scénario de spéciation (sympatrique ou allopatrique). Pierre Chevaldonné, Christophe Lejeusne et Charlotte Dehollain ont analysé les séquences de la COI mitochondriale et des espacteurs intergéniques des ADN nucléaires codant pour les ARN ribosomiques (ITS pour *Internal Transcribed Spacers*). Ces locus ont montré un faible niveau de variabilité au sein du groupe *A. aerophoba / cavernicola* ce qui est compatible avec l'existence d'une seule espèce ou de deux espèces d'apparition récente. Des marqueurs plus variables sont donc nécessaires. En collaboration avec Anne Chenuil et Christophe Lejeusne j'ai développé une banque enrichie en microsatellites selon un protocole adapté par A. Chenuil à partir de la méthode Fiasco (Zane *et al.*, 2002). Ceci m'a permis d'identifier une région répétée de type minisatellite avec un motif répété de 22pb. Une analyse préliminaire a montré l'existence de 7 allèles dont certains étaient partagés entre les deux espèces supposées. Un test de différenciation, pratiqué sur un nombre relativement faible d'individus suggère l'existence de différences de fréquences significatives entre les deux formes (Dehollain, 2004). Comme les échantillons considérés pour chaque espèce potentielle couvrent une vaste zone géographique (avec plusieurs cas où des individus des deux espèces avaient été pris dans la même région), ce résultat est compatible avec l'existence de deux espèces. La présence d'allèles communs pourrait résulter soit de la rétention d'un polymorphisme ancestral, soit d'un flux de gène après hybridation. L'étude d'un plus grand nombre de populations et de marqueurs (l'analyse d'autres microsatellites est prévue) permettra de tester plus précisément ces hypothèses.

Bibliographie: rapport de DEA de Charlotte Dehollain (2004).

2) Faible variabilité l'ADN mitochondrial chez les Octocoralliaires:

Publication: Calderón *et al.*, 2006

L'ADN mitochondrial présente des propriétés qui en font *a priori* un marqueur de choix pour une étude de phylogéographie: généralement pas de recombinaison, un taux de dérive plus important que l'ADN nucléaire et un niveau élevé de polymorphisme (Avisé, 2000). Cependant comme l'ont noté Ballard et Whitlock (2004) ses propriétés biologiques peuvent aussi représenter des inconvénients: il ne reflète que l'histoire des lignées maternelles et l'absence de recombinaison associée à la forte densité en gènes le rend aussi plus sensible à la perte de variabilité suite aux fixations de mutations avantageuses ("*genetic draft*"; Bazin *et al.*, 2006). Malgré tout, ce marqueur permet de fournir une première image de la structuration génétique d'une espèce sous réserve de garder à l'esprit les contraintes précédentes.

Dans le cadre de l'étude des populations d'octocoralliaires en Méditerranée nous avons d'abord analysé la diversité de séquences de la COI mitochondriale (stage de DEA d'Isabel Calderón). Malgré la dispersion géographique des individus analysés (de la Croatie à l'Afrique du Nord pour *Corallium rubrum* et de la Crète à l'Algérie pour *Eunicella cavolinii*) et en dépit des faibles capacités de dispersion supposées pour ces espèces, aucune variabilité n'a été observée sur les 550 nucléotides analysés. Au sein du genre *Eunicella*, les séquences étaient même identiques entre *E. cavolinii*, *E. singularis* et *E. verrucosa*⁵. Une analyse de séquences de *Paramuricea clavata* montre également une absence de polymorphisme (Mokhtar-Jamaï, non publié).

L'existence de flux de gènes élevés semble peu probable sur de telles distances et n'expliquerait pas l'absence totale de polymorphisme. Ces résultats semblent plutôt liés à un taux de mutation très réduit. Or l'ADN mitochondrial des Octocoralliaires présente un gène homologue au gène bactérien *MutS* intervenant dans la réparation de l'ADN (Pont-Kingdon *et al.*, 1995; France et Hoover, 2002). Sa présence dans le cas particulier des espèces précédemment citées a été confirmée par J.-B. Ledoux dans le cadre de sa thèse. Ceci pourrait donc expliquer le faible niveau de variabilité généralement observé pour l'ADN mitochondrial des octocoralliaires, même si il ne s'agit pas là d'une démonstration directe du rôle de ce gène.

Quoi qu'il en soit, ces données montrent l'inadéquation de l'ADN mitochondrial pour l'étude de la diversité génétique intraspécifique chez nos espèces modèles. D'autre part l'absence de différence entre plusieurs espèces du genre *Eunicella* indique également que la COI mitochondriale n'est pas adaptée à une éventuelle approche de code-barre génétique ("*barcoding*"; Hebert *et al.*, 2003) pour ces organismes.

⁵ Deux individus seulement ont été analysés chez *E. verrucosa*.

3) Evolution des marqueurs ITS

Publication: Calderón *et al.*, 2006

Le deuxième marqueur testé était l'espaceur intergénique des ADN nucléaires codant pour les ARN ribosomiques (*ITS* pour Internal Transcribed Spacers) et plus précisément l'*ITS 2* (situé entre les ADNr 5,8S et 28S). L'analyse de séquences de cette région pour des colonies d'*Eunicella cavolinii* issues de populations allant de Marseille à Minorque, a mis en évidence une variabilité de séquence élevée. Cependant le clonage des produits de PCR a aussi montré l'existence de variabilité intra-individuelle, au-delà de la simple hétérozygotie dans les cas où cela a pu être testé. D'autre part l'analyse des proximités génétiques entre les différents types de séquence n'a pas permis de révéler de structure cohérente en fonction de leur origine géographique. Cette situation semble liée à l'existence au sein du génome de copies divergentes d'*ITS* qui n'auraient pas évolué de manière concertée au sein des principales populations étudiées. Ceci peut aboutir à des niveaux de divergence apparemment comparables aux niveaux intra-individuels et inter-populationnels si les séquences considérées ne correspondent en fait pas au même locus. Il pourrait aussi s'agir de pseudogènes mais l'analyse de la structure secondaire des séquences les plus divergentes de nos données ne semble pas aller dans ce sens (données non publiées). Inversement certains types de séquences peuvent se retrouver partagés entre populations éloignées (Corse et continent). L'ensemble de ces observations ne permet donc pas d'interprétation claire des proximités génétiques entre populations.

Vollmer et Palumbi (2004) ont aussi souligné le problème que représente la variabilité intra-individuelle des *ITS* pour les études des processus d'hybridation chez les coraux du genre *Acropora*. La faible homogénéisation des différentes copies d'*ITS* au sein d'une population (voire d'une espèce dans le cas des hexacoralliaires) pourrait éventuellement être liée à un écart à la panmixie. Mais d'une part la structure génétique à l'intérieur des populations reste à évaluer plus précisément (à l'aide de marqueurs microsatellites; l'étude est en cours pour nos espèces modèles) et d'autre part son impact sur l'évolution de ces gènes multicopies n'est pas évident à évaluer. Par ailleurs, alors que les microsatellites semblent indiquer des flux de gènes réduits à courte distance (voir plus loin), les *ITS* ne montrent pas de structure nette entre sites éloignés. Ceci est peut être un indice que la séparation est relativement récente à l'échelle historique, ce qui, conjugué à un taux d'homogénéisation réduit, pourrait expliquer la situation actuelle.

Quoi qu'il en soit, les *ITS* ne semblent pas constituer un marqueur adéquat pour une analyse phylogéographique chez ces organismes, même si ils ont pu se révéler utiles chez d'autres métazoaires (Presa *et al.*, 2002). Costantini *et al.* (2007 b) ont utilisé l'*ITS 1* (entre les ADNr 18S et 5,8S) chez le corail rouge. Bien qu'ils aient noté l'existence de variabilité intra-individuelle, elle n'a pas été prise en compte, or ceci peut influencer fortement les interprétations possibles. Les premiers résultats de clonage de PCR d'*ITS 1* de corail rouge dans notre équipe semblent confirmer l'existence de cette variabilité, parfois pour des séquences très divergentes. Ce marqueur ne semble donc pas approprié pour la phylogéographie de ces espèces. De manière plus générale ces données montrent également que l'utilisation des *ITS* comme marqueurs génétiques aux niveaux intra et péri-spécifiques doit être accompagnée d'une évaluation précise de leur mode d'évolution pour les groupes considérés et qu'il ne faut pas se contenter de l'obtention de séquences propres issues directement de PCR. Or la plupart des études portant sur ces locus n'en tiennent pas compte, ce que certains auteurs justifient par la volonté d'éviter d'introduire des artéfacts par le clonage (Costantini *et al.*, 2007b). C'est aussi, à mon avis, un bon moyen de produire facilement des résultats sans recul sur leur signification réelle : quelle est l'information apportée par la comparaison de séquences probablement issues plus ou moins aléatoirement de différents locus ?

4) Développement et application de marqueurs nucléaires:

Données non publiées

En dehors du cas particulier des Octocoralliaires pour lesquels les marqueurs "courants" se révèlent donc inopérants, la recherche et l'analyse de plusieurs locus sont particulièrement utiles en phylogéographie. En effet, la plupart des études de ce type ont jusqu'à présent utilisé un nombre relativement faible de marqueurs et très souvent du même type. Or les études de génomique des populations (pour quelques espèces modèles) ont montré que les niveaux de variabilité sont très différents selon les régions considérées (voir par exemple Nordborg *et al.*, 2005; Templeton, 2007). Il est donc très probable que, dans la plupart des cas, *les études ne portant que sur un locus ne donnent accès qu'à une des facettes de l'évolution des espèces.*

Dans cette optique mes recherches actuelles comportent un important volet de développement de marqueurs utilisables pour des analyses phylogéographiques. Pour cela j'ai utilisé deux approches: d'une part l'étude de marqueurs anonymes de type AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) et d'autre part l'analyse d'introns amplifiés selon la méthode EPIC (*Exon Priming Intron Crossing*). Dans les deux cas il s'agit d'approches exploratoires étant donné l'absence d'informations génétiques pour ces espèces.

a) Analyses préliminaires des AFLPs:

Les approches de type AFLP sont encore relativement peu développées pour des études d'écologie ou évolution chez les métazoaires (Bensch et Åkesson, 2005). Bien qu'il s'agisse de marqueurs dominants et anonymes, cette technique présente l'avantage de permettre une analyse génétique sans connaissances préliminaires. Elle nécessite par contre une étape de mise au point notamment pour le choix des paires d'amorces susceptibles de fournir des profils de migration répétables et informatifs.

J'ai testé cette technique dans un premier temps chez *Corallium rubrum* pour lequel une étude très préliminaire avait été publiée (del Gaudio *et al.*, 2005). J'ai testé 6 paires d'amorces qui ont révélé un niveau de variabilité élevé. La qualité des profils de migration s'est avérée assez variable, ceci étant probablement plus lié à la qualité de l'ADN utilisé qu'à sa quantité (qui a été auparavant standardisée). Afin d'évaluer l'information apportée par ces locus pour une analyse phylogéographique, ils ont été testés sur un petit nombre d'individus issus de populations distantes (Marseille, Monaco, Corse, Minorque) et les informations de présence / absence de bandes ont été utilisées pour reconstruire un arbre de proximités génétiques entre individus (Fig. 3).

Bien que des regroupements géographiques semblent se préciser, ils sont généralement peu soutenus et les branches reliant ces groupes sont relativement courtes. Ceci pourrait être soit le résultat d'une absence de rupture phylogéographique (et donc d'isolement) à long terme entre les populations les plus éloignées, soit d'une inadéquation de cette approche dans cette gamme de distances (notamment du fait d'un niveau d'homoplasie trop élevé aux échelles considérées). Une analyse d'un plus grand nombre d'individus sur un sous-échantillon de populations permettra d'obtenir des données de fréquences alléliques pour ce type de marqueur et de préciser quelle information peut être obtenue en termes de différenciation des populations. En fonction des résultats obtenus, cette technique pourra aussi être testée en complément des microsatellites pour une étude de la différenciation génétique à courte distance. Dans ce cadre la possibilité d'analyser de manière simultanée un grand nombre de marqueurs dans des environnements différents (profondeur par exemple) permettra de rechercher d'éventuels locus impliqués dans l'adaptation locale. Ces derniers devraient se caractériser par des niveaux de différenciation s'écartant de la moyenne observée pour les autres locus. Cette évaluation du domaine d'application optimal des AFLPs pourrait contribuer à étendre le champ d'application de ces marqueurs, notamment chez les animaux où leur utilisation est encore limitée (Bensch et Åkesson, 2005).

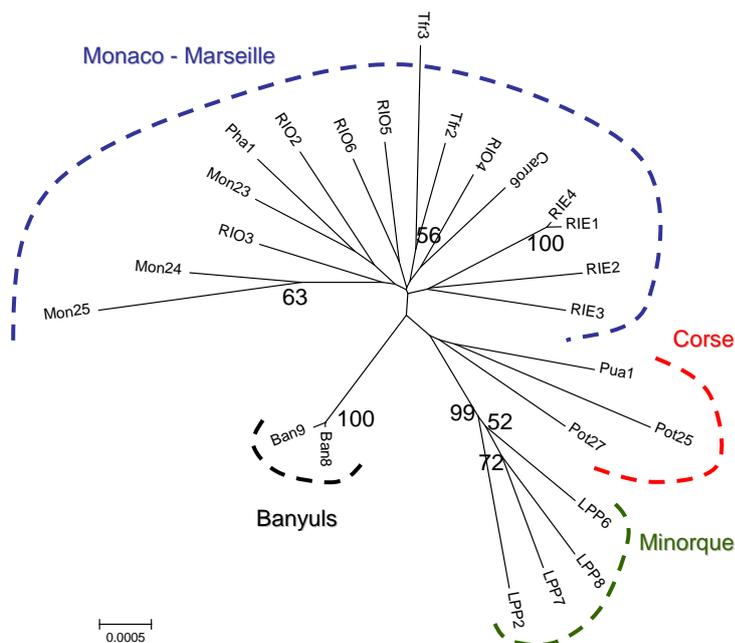


Fig. 3: arbre de proximités génétiques entre individus de corail rouge obtenu à partir de données AFLP⁶.

b) Diversité de séquences d'introns:

Les introns semblent intéressants pour une étude de phylogéographie, car ils peuvent fournir des marqueurs analysables en termes de séquence⁷ et suffisamment variables pour travailler au niveau intraspécifique. Dans cette optique, ma stratégie de développement a consisté à isoler et séquencer l'ARN messager du gène codant pour le facteur d'élongation *EF1 alpha*, afin de rechercher ensuite la présence d'introns au niveau génomique. J'ai ainsi pu séquencer un intron d'*EF1* chez *Corallium rubrum* et deux chez *Eunicella cavolini*. Kenza Mokthar-Jamaï a également séquencé un intron chez *Paramuricea clavata* dans le cadre de sa thèse. Le niveau de variabilité de ces introns est en cours d'évaluation et je présenterai ici uniquement les premiers résultats obtenus chez *C. rubrum* à partir de l'analyse d'individus allant de la Croatie à l'Afrique du nord. Les séquences d'individus hétérozygotes n'ont pas été utilisées dans la suite de l'analyse car elles ne permettaient pas la reconstruction des séquences de chaque allèle⁸, sauf dans un petit nombre de cas où j'ai cloné les produits de PCR afin de vérifier qu'il s'agissait bien d'individus hétérozygotes. Finalement l'analyse a été faite à partir de 91 séquences sur une longueur de 498 nucléotides dont 346 pour le seul intron sur la séquence de référence. Deux séquences issues d'un même individu de *Corallium regale* d'Hawaii ont été rajoutées pour comparaison⁹. Le pourcentage moyen de divergence entre les deux espèces est de 3,8%. Au sein de *C. rubrum*, la diversité nucléotidique π est de 0.6% pour 28 haplotypes différents et 39 sites variables avec une divergence maximale entre séquences de 2,6 %.

Ces séquences ont été utilisées pour construire un réseau d'haplotypes selon la méthode de "Median-Joining" (Bandelt *et al.*, 1999). Le réseau obtenu (Fig. 4) montre une

⁶ A partir de 6 paires d'amorces et en utilisant les programmes Restdist et Neighbor-Joining du programme Phylip.

⁷ Ceci est important afin de pouvoir introduire une dimension temporelle dans l'analyse ainsi que pour diverses techniques d'analyses statistiques susceptibles d'éclairer l'évolution des populations.

⁸ Des techniques permettent actuellement de tenter de reconstruire ces séquences. Voir par exemple Stephens *et al.* (2001). Par contre si un seul site est hétérozygote on peut en déduire directement les deux séquences correspondantes et les utiliser dans le jeu de données.

⁹ Les échantillons nous ont été aimablement envoyés par S.C. France (Université de Louisiane).

séparation principale entre les deux espèces de *Corallium*. Parmi les séquences de *C. rubrum* on n'observe pas de rupture phylogéographique majeure et des haplotypes fréquents dans le jeu de données sont partagés entre régions éloignées. Les connexions en réseau pourraient indiquer soit des incertitudes quant aux topologies possibles soit refléter des événements de recombinaison. Lorsque les données de fréquence des haplotypes sont utilisées pour comparer les échantillons entre eux, 13 différenciations apparaissent significatives¹⁰ sur 45 comparaisons par paires. L'absence de différenciation peut parfois être liée à de faibles tailles d'échantillons mais ce n'est pas toujours le cas, comme par exemple pour la comparaison entre Marseille et la Corse. Les données de séquence suggèrent également ***une absence d'isolement à long terme*** ce qui pose des questions concernant l'évolution et les modalités de dispersion de cette espèce (ce point sera rediscuté dans le paragraphe C.3). L'ajout d'un plus grand nombre de séquences (en cours) permettra de préciser ces résultats, mais aussi d'appliquer des ***tests d'écart à l'équilibre mutation / dérive*** susceptibles de refléter des événements démographiques (expansion récente) ou sélectifs passés (Ramos-Onsins et Rozas, 2002) qui auraient affecté la diversité observée. Nos données préliminaires suggèrent l'existence de tels déséquilibres, mais la distinction entre les divers mécanismes possibles nécessitera d'analyser plusieurs locus indépendants. En effet l'action de la sélection naturelle devrait se voir sur le locus concerné (et sur les locus qui y sont physiquement liés) tandis que les changements de taille de la population devraient laisser une trace sur l'ensemble du génome.

Dans cette optique de recherche de marqueurs, Anne Chenuil¹¹ a aussi développé une approche de bioinformatique permettant de rechercher des régions codantes et conservées qui encadrent des introns à l'intérieur de gènes si possible présents en une seule copie dans le génome (afin d'éviter l'écueil de séquences multiples). Cette recherche a été initialement effectuée à partir de séquences de Deutérostomiens mais nous testons actuellement chez les Octocoralliaires les amorces ainsi obtenues. D'autre part le séquençage d'autres introns d'EF1 en cours chez *E. cavolinii* et *P. clavata* nous permettra de vérifier si on observe le même patron de diversité pour différents Octocoralliaires et de distinguer ce qui peut être lié aux particularités d'une espèce ou d'un marqueur (sélection) des facteurs généraux structurant les populations ou les écosystèmes.

Conclusion sur les développements de marqueurs:

Dans le cadre de la recherche de marqueurs pour l'analyse génétique des Octocoralliaires, j'ai été amené à me former et à utiliser des techniques ou des problématiques que je n'avais pas ou peu abordées auparavant et ceci à deux niveaux:

- au plan des techniques de biologie moléculaire: clonage, isolement de gènes, AFLP, utilisation d'un analyseur génétique ABI 3130...
- du point de vue conceptuel: analyses de séquences aux niveaux intra et interspécifiques (paramètres d'analyses de diversités de séquences, tests d'équilibre mutation / dérive...).

Diverses particularités ont été mises en évidence au niveau du mode d'évolution moléculaire qui peuvent expliquer les difficultés rencontrées dans ces recherches : un faible taux de mutation de l'ADN mitochondrial et une hétérogénéité des marqueurs ITS à l'intérieur des populations et des individus. Néanmoins j'ai pu avancer grâce aux premières données de séquences d'introns. Même si elles doivent être complétées, elles fournissent les premiers éléments de réflexion concernant la phylogéographie de ces espèces. Par ailleurs, ces développements faits dans le cadre de mes recherches à l'UMR DIMAR me sont aussi utiles au niveau des enseignements que je souhaite développer.

¹⁰ Test basé sur une comparaison des valeurs observées de *Fst* par rapport à des valeurs obtenues en permutant les haplotypes entre populations. L'analyse a été faite à l'aide du logiciel Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

¹¹ En collaboration avec Sylvain Mousset et Laurent Duret du Pôle Bioinformatique Lyonnais, sur la base d'un financement par le réseau européen Marine Genomics

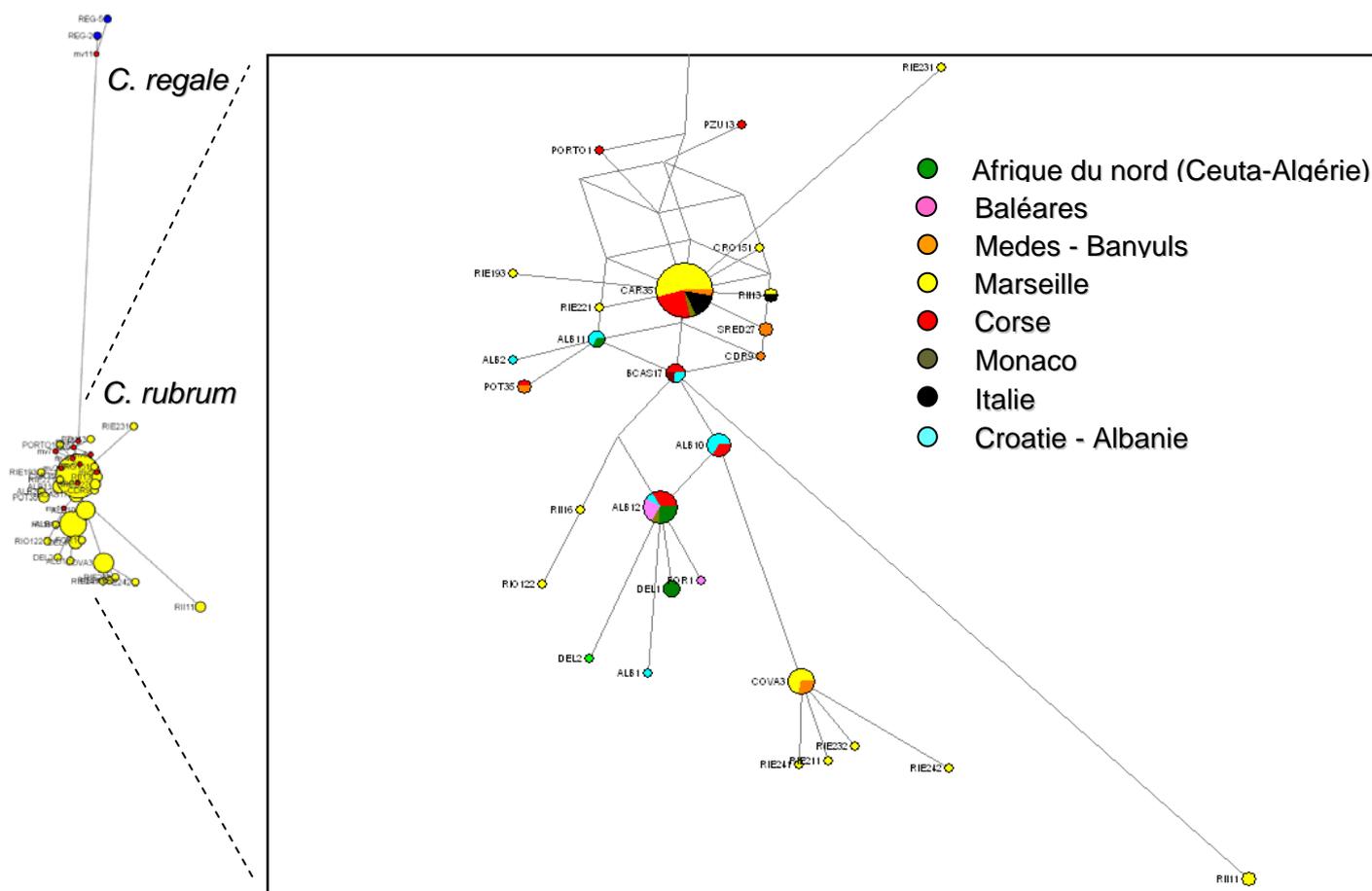


Fig. 4: réseau de séquences d'un intron d'EF1 chez *Corallium rubrum*. Le réseau a été obtenu à l'aide du logiciel Network[®] 4.2.0.1 (Fluxus Technology, 2007) selon la technique de Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999) avec les paramètres par défaut de l'analyse¹². Cette technique part d'un arbre de longueur totale minimale reliant les séquences et crée un réseau en rajoutant progressivement des vecteurs médians qui peuvent correspondre à des haplotypes disparus ou non échantillonnés. Ces vecteurs sont rajoutés selon une gamme de connexions possibles contrôlée par un paramètre ϵ qui permet ainsi d'explorer des réseaux plus ou moins réticulés. La partie gauche de la figure présente l'ensemble du réseau avec les deux séquences de *C. regale*. La partie droite présente un agrandissement sur les relations entre les séquences de *C. rubrum* présentées en fonction de leur origine géographique.

B) De la différenciation à la spéciation: le cas des Téléostéens:

Les Téléostéens représentent le groupe le plus important de Vertébrés en terme de nombre d'espèces (plus de 23 000, soit la moitié des espèces de Vertébrés ; Lecointre et Le Guyader, 2001). Cette diversité se retrouve également au niveau intraspécifique avec divers exemples d'espèces présentant une plus ou moins grande variabilité morphologique ou écologique comme les Salmonidae, ce qui soulève des interrogations au niveau taxonomique. Ils constituent donc un bon modèle d'étude des processus de différenciation, adaptation et spéciation, comme par exemple pour les Cichlidae des grands lacs africains (Turner, 2007).

Au cours de mes recherches, j'ai étudié les processus de diversification et d'évolution à deux échelles différentes: au niveau inter-spécifique chez les picots (poissons marins du genre *Siganus*) et au niveau intra-spécifique chez la truite (*Salmo trutta*).

¹² Le même poids (10) a été donné à tous les caractères. Le paramètre ϵ a été fixé à 0. Les insertions / délétions de plus de 1 pb ont été recodées de façon à ne correspondre qu'à un seul événement de mutation.

1) Phylogénie et évolution des Siganidae:

Cadre des recherches: UMR 6540 DIMAR; collaboration avec

P. Borsa, IRD Nouméa

Etudiants: Sarah Lemer (M2)

Période: 2006

Publications: Lemer *et al.*, 2007; Borsa *et al.*, 2007



Siganus vulpinus

L'étude des phénomènes de spéciation dans le genre *Siganus* (picots) s'inscrit dans le cadre plus général de l'évolution de la biodiversité marine dans la région Indo-Pacifique. Ces poissons font partie de la famille des Siganidae qui ne comprend qu'un seul genre pour 28 espèces décrites dont le nombre décroît depuis la région centrale Indo-Pacifique vers la périphérie. Ce patron de diversité a aussi été observé dans d'autres groupes d'organismes marins. Les picots constituent donc un bon modèle d'étude afin de tester les différentes hypothèses concernant l'origine de la forte diversité de cette zone. Par ailleurs les **différences morphologiques et écologiques** observées dans cette famille posent la question de l'évolution de ces caractères.

L'analyse de la séquence des gènes mitochondriaux du cytochrome b et de l'ARN 16S a permis de reconstituer une **phylogénie à partir de 20 espèces du genre *Siganus***. Les arbres ainsi obtenus montrent notamment que le caractère trapu ou fusiforme du corps (qui semble lié à l'écologie de ces poissons¹³) présente une composante phylogénétique marquée et semble suggérer une séparation ancienne entre ces deux groupes de poissons (Fig. 5 tirée de Borsa *et al.*, 2007). Ce résultat n'était pas forcément attendu dans la mesure où divers exemples de changements morphologiques rapides sont connus chez les Téléostéens et peuvent conduire à des phénomènes de convergence¹⁴. Chez les Siganidae, la séparation n'est cependant pas complète et on observe un regroupement de deux espèces à morphologie intermédiaire (groupe II sur la Fig. 5). Par ailleurs la séparation du genre *Siganus* en deux sous-genres (dont le sous-genre *Lo* qui se caractériserait par un museau allongé) n'est pas validée par la phylogénie obtenue ici.

En ce qui concerne la **biogéographie**, les aires de répartition séparées d'espèces sœurs telles que *S. doliatus* et *S. virgatus* semblent en accord avec l'hypothèse d'une spéciation allopatrique. Dans ce cas la région Indo-Malaise constituerait une zone de contact avec une diversité élevée par superposition d'espèces d'origines différentes. Cependant cette hypothèse n'est pas la seule possible et un cas d'espèces sœurs qui cohabitent dans une même région (*S. argenteus* et *S. woodlandi*) pourrait correspondre à de la spéciation sympatrique ou parapatrique. Ce type de spéciation aurait pu être favorisé par la diversité des habitats de cette zone et la capacité de ces poissons à s'adapter à des environnements différents.

Au niveau spécifique, dans la plupart des cas les différents haplotypes représentant une même espèce supposée se groupent ensemble ce qui valide la taxonomie actuelle. Néanmoins trois groupes d'espèces ne sont pas clairement séparés: *doliatus* / *virgatus*, *unimaculatus* / *vulpinus*, *lineatus* / *guttatus* / *randalli*. Les deux premières paires correspondent à des espèces sœurs comme cela avait été précédemment supposé et une divergence récente pourrait être à l'origine d'une séparation incomplète des lignées mitochondriales. Dans le cas de *virgatus* et *doliatus* qui sont supposées pouvoir s'hybrider, il est possible qu'un contact secondaire puisse être également à l'origine de l'absence de monophylie réciproque. A l'intérieur des différentes espèces, lorsque le nombre de séquences était suffisant, la **différenciation entre populations** a été analysée. Le plus faible niveau de différenciation a été observé pour les espèces *S. argenteus* et *S. spinus* qui sont également celles présentant la plus longue phase larvaire pélagique (Lemer *et al.*, 2007). Chez les

¹³ Les espèces trapues se trouvent plutôt sur les zones de récif corallien et ont un comportement territorial, alors que les espèces fusiformes sont plutôt observées en banc dans des zones peu profondes.

¹⁴ Mais des techniques d'analyses morphométriques plus poussées pourraient peut être révéler une corrélation avec le signal phylogénétique ; Kassam *et al.*, 2006

espèces lessepsiennes *S. luridus* et *S. rivulatus*, l'absence de différenciation entre Mer Rouge et Méditerranée souligne la possibilité de colonisation de nouveaux habitats sans perte notable de diversité génétique chez ces espèces (Hassan *et al.*, 2003).

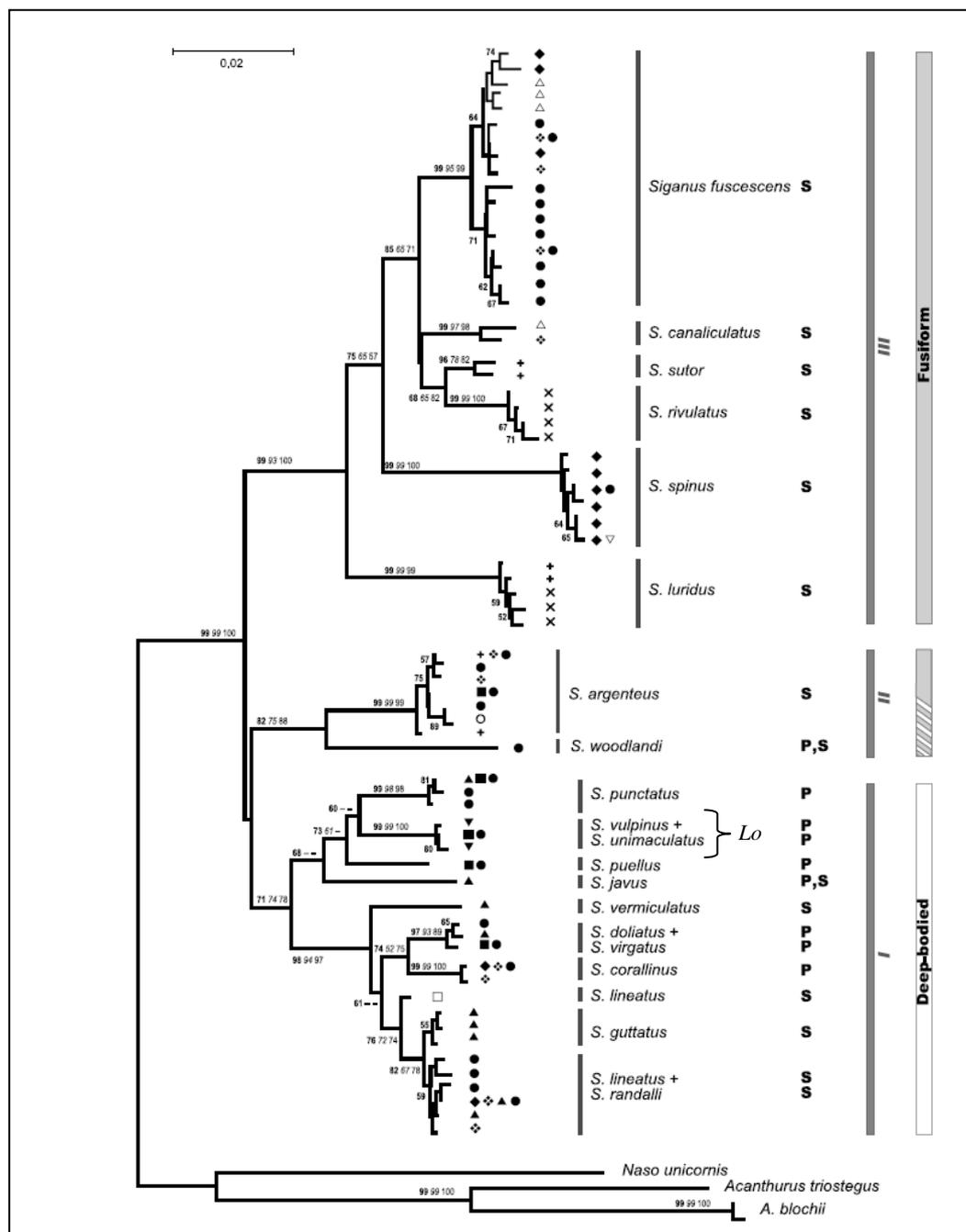


Fig. 5 : arbre phylogénétique des Siganidae obtenu à partir de séquences combinées de cytochrome b et d'ARN 16S selon la méthode du Neighbour-Joining (détails de l'analyse dans Borsa *et al.*, 2007). Le groupe I correspond à des espèces trapues, le III à des espèces fusiformes et le II à des espèces de morphologie intermédiaire pour le rapport longueur / hauteur du corps. S indique les espèces vivant en bancs et P celles vivant en couples. Origine des échantillons : Syrie X, Mascareignes +, Maldives □, Archipel de Riau (Indonésie) △, Mer de Sulu (Philippines) ▼, Makassar (Célèbes) ▲, Iles Carolines ■, archipel Bismarck et Louisiade ◆, Iles Salomon ❖, Nouvelle Calédonie ●, Ouvéa Iles Loyauté ○, Moorea Polynésie Française ▽. "Lo" indique les deux espèces à museau allongées supposées appartenir à un sous-genre différent (*Lo*).

La poursuite des travaux sur ces espèces tirerait profit de l'analyse d'autres locus notamment nucléaires, ceci afin de distinguer les phénomènes de divergence récente ou d'hybridation dans le cas des espèces sœurs. D'autre part au niveau intra-spécifique cela

permettrait de tester diverses hypothèses sur l'évolution de ces espèces. Ainsi dans le cas de *S. fuscescens*, les données de l'ADN mitochondrial suggèrent l'existence de deux groupes d'haplotypes et donc éventuellement d'un événement de séparation historique, ce qui mériterait d'être testé à l'aide d'autres marqueurs indépendants.

2) Phylogéographie de la truite, *Salmo trutta*: analyse des populations du sud-ouest de la France :

Cadre des recherches: Laboratoire Génome et Populations,
UPR 9060

Période: 1996-1999

Publication: Aurelle et Berrebi, 2001



Salmo trutta

En dehors de leur intérêt économique qui a motivé et financé de nombreuses études, les Salmonidae, du fait de leur diversité morphologique et écologique parfois au sein d'une même espèce, constituent un intéressant *modèle d'étude de l'évolution et de l'adaptation* en milieu dulçaquicole. Leurs populations et leurs mouvements sont délimités par les cours d'eau qu'ils habitent (avec éventuellement des possibilités de migration par la mer dans le cas des formes anadromes). Par ailleurs ils sont présents en Europe du nord dans des zones qui ont été fortement affectées par les variations climatiques du Pléistocène, il est donc intéressant d'étudier l'histoire de la recolonisation de ces habitats par ces poissons et plus généralement de leur phylogéographie. Par ailleurs dans le cas de la truite (*Salmo trutta*) plusieurs sous-espèces avaient été décrites sur la base de différences de coloration ou d'écologie, comme la truite de mer ou la truite de lac. Mais diverses études génétiques ont remis en cause ces sous-espèces. Les données obtenues ont par exemple montré que la distinction entre formes anadromes et sédentaires ne correspondait pas à deux taxons différents mais semblait être apparue indépendamment plusieurs fois dans différents bassins (Ferguson, 1989) ce qui souligne les importantes capacités d'adaptation de cette espèce. D'autre part, les résultats obtenus sur l'ADN mitochondrial ont permis de faire une *analyse phylogéographique* à l'échelle de l'aire de répartition de la truite¹⁵ (Bernatchez, 2001). Cette étude a mis en évidence une subdivision génétique basée sur la géographie (et qui ne retrouvait donc pas ces sous-espèces), avec cinq lignées principales nommées d'après le bassin versant où elles ont initialement été identifiées: Atlantique, Méditerranée, Adriatique¹⁶, *marmoratus* (d'après la truite marbrée présente de l'Italie à l'Albanie) et Danube. Ces différents groupes sont probablement le résultat d'une évolution en allopatrie depuis 0,5 à 2 millions d'années, suite aux changements climatiques et aux contraintes de migration imposées par les réseaux hydrographiques. Il faut noter que des données plus récentes ont confirmé ces distinctions à l'aide de marqueurs ITS (et donc nucléaires; Presa *et al.*, 2001). Ces marqueurs se sont avérés apparemment plus performants que chez les Octocoralliaires. Ceci pourrait être le résultat d'une évolution concertée plus poussée chez la truite en lien avec un degré d'isolement plus important des populations à l'échelle historique. Néanmoins dans cette étude le niveau de variabilité intra-individuel n'a pas été étudié plus précisément que par l'observation de quelques sites à l'état hétérozygotes lors du séquençage.

Dans le cadre de ma thèse je me suis intéressé à *l'étude génétique des populations de truite du sud ouest de la France* qui font partie du groupe atlantique. Dans ce groupe, des données de répartition de certains allèles enzymatiques (notamment de la Lactate Déshydrogénase C, LDH C) laissaient supposer un processus de recolonisation en deux temps

¹⁵ Cette aire s'étend du nord au sud de la Norvège jusqu'à l'Atlas, et d'ouest en est de l'Islande jusqu'aux affluents de la mer d'Aral en Afghanistan. Mais il s'agit d'une espèce qui a été introduite dans diverses régions du monde.

¹⁶ La lignée Adriatique a en fait une distribution méditerranéenne plus large.

du nord de l'Europe: d'abord par une lignée dite ancestrale (car partageant un allèle commun de la LDH C avec d'autres espèces de Salmonidae) qui aurait ensuite été supplantée par une lignée dite moderne dans les zones accessibles (Hamilton *et al.*, 1989). Des scénarios plus élaborés mais toujours basés sur les allozymes ont ensuite été proposés (Garcia-Marin *et al.*, 1999). Dans tous les cas ils posaient plusieurs questions. D'une part, il était intéressant de **tester ces hypothèses de recolonisation** à l'aide de marqueurs potentiellement plus informatifs que les allozymes et dans d'autres régions d'Europe. Il faut cependant souligner que le terme ancestral ou moderne peut prêter à confusion car ne relevant en aucun cas d'une logique phylogénétique: il est en effet difficile de concevoir en quoi une population serait plus ancestrale qu'une autre, toutes les populations ayant évolué à des degrés divers. D'autre part si plusieurs formes sont présentes dans un même bassin voire une même rivière, elles peuvent représenter un bon **modèle naturel d'étude des interactions entre génomes différenciés**.

Par rapport à ces problématiques les populations des rivières de l'ouest des Pyrénées (donc dans un bassin versant atlantique) sont intéressantes à étudier car les données de fréquences allozymiques laissaient supposer la présence dans les bassins de la Garonne et des divers fleuves côtiers plus au sud de plusieurs types de populations pouvant correspondre aux critères des groupes ancestraux (à LDH C – 100) et modernes (à LDH C – 90) de Hamilton *et al.* (1989). On y observait en effet ces deux allèles soit en mélange soit de manière plus ou moins majoritaire selon les populations. D'autre part la répartition n'était pas aléatoire, l'allèle 100 étant majoritaire au sud de cette zone et l'allèle 90 au nord. Par ailleurs, l'important niveau de diversité génétique observé à l'aide des allozymes s'accompagne de différences morphologiques marquées allant également dans le sens d'une zone de contact éventuelle entre formes différenciées. Cependant il faut dans tous les cas tenir compte de la présence possible d'individus allochtones introduits par l'homme dans un but de repeuplements pour la pêche de loisir. Au cours de ma thèse j'ai donc dans un premier temps testé si des marqueurs indépendants tels que les microsatellites et l'ADN mitochondrial retrouvaient les mêmes distinctions génétiques que les allozymes. L'ADN mitochondrial était aussi utile pour replacer ces populations dans la phylogéographie de la truite en Europe en permettant une comparaison avec les études précédentes et plus particulièrement celle de Bernatchez (2001). Les marqueurs microsatellites étaient aussi utiles afin de distinguer aux niveaux individuel et populationnel les différentes lignées présentes naturellement ou artificiellement. Ceci nécessitait la mise au point de stratégies d'analyses adaptées à cette problématique (voir § C).

En ce qui concerne la **phylogéographie**, j'ai analysé la diversité de séquence des deux extrémités de la région de contrôle mitochondriale sur environ 560 nucléotides au total. Deux approches complémentaires ont été utilisées. Une analyse de type SSCP¹⁷ a fourni une estimation des fréquences d'haplotypes dans les populations. Les dix haplotypes mitochondriaux détectés ici présentent une répartition non aléatoire (Fig. 6) avec deux groupes principaux d'haplotypes qui semblent corrélés aux deux groupes de populations identifiés à l'aide des allozymes: on retrouve donc la séparation en deux lignées principales et une analyse de variance moléculaire (AMOVA) indique que cette dichotomie est statistiquement significative. Lorsque les séquences des haplotypes identifiés par SSCP sont comparées avec celles trouvées dans le reste de l'Europe et précédemment publiées, l'arbre obtenu indique que ces populations appartiennent bien au groupe Atlantique (Fig. 6). Néanmoins contrairement aux résultats des analyses de fréquences, on n'observe pas sur cet arbre de dichotomie: les séquences des deux groupes de populations ne sont pas séparées. Ceci pourrait être le résultat d'un manque de variabilité de la région de contrôle chez les Salmonidae (alors qu'elle semblait par exemple nettement plus variable chez les Siganidae).

¹⁷ SSCP pour *Single Strand Conformation Polymorphism* ou polymorphisme de conformation simple brin; une technique qui permet de détecter des différences de séquences par électrophorèse sans recourir au séquençage. Le séquençage a été utilisé ensuite pour vérifier les différences observées.

Avec seulement 11 sites polymorphes si on s'en tient aux populations de l'ouest de Pyrénées, il n'y a probablement pas un signal suffisant pour permettre une analyse robuste comme le montrent les faibles valeurs de *bootstrap*. L'absence de distinction claire de séquence entre les populations pyrénéennes est probablement la conséquence d'une divergence trop récente par rapport au taux d'évolution de ce marqueur. Néanmoins l'analyse des données de fréquence d'haplotypes a donc permis de confirmer l'existence d'un contact entre deux lignées différenciées dans cette zone comme cela avait été suggéré dans d'autres populations Atlantique. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de Bernatchez (2001) qui a montré que le bassin Atlantique avait été recolonisé par plusieurs lignées probablement issues de différents refuges. Les cartes de cet article suggèrent d'ailleurs l'existence de plusieurs zones de contacts secondaires en Europe occidentale sans que cela soit étudié plus précisément. L'analyse de la répartition et des interactions entre les différentes formes de truite requiert en effet de recourir à des locus plus variables susceptibles de permettre des assignations individuelles. Des marqueurs nucléaires codominants sont également nécessaires pour l'analyse des phénomènes d'introgession ainsi que pour des tests de panmixie. D'autre part le même type d'étude est aussi nécessaire afin d'estimer l'impact des repeuplements sur une rivière donnée.

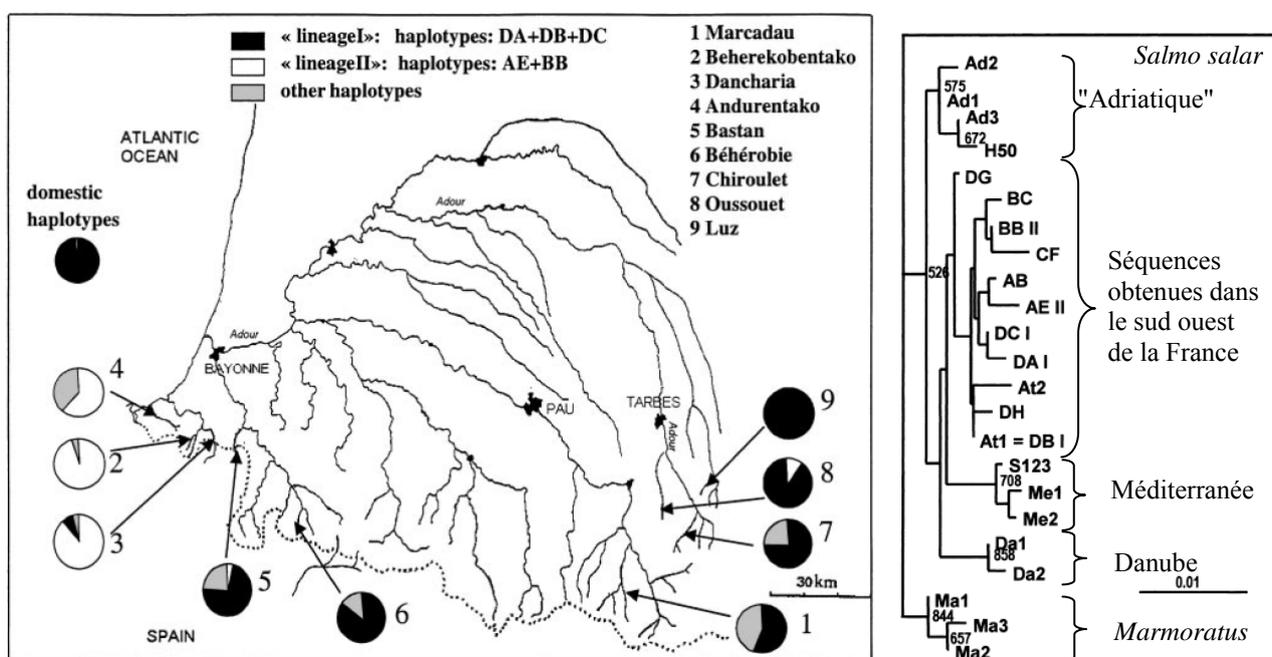


Fig. 6: à gauche: fréquences des principaux haplotypes de la région de contrôle mitochondriale identifiés par SSCP dans le sud ouest de la France. La lignée I correspond aux populations à LDH C-90 et la lignée II à celles à LDH C-100. A droite: arbre de Neighbour-Joining reliant les séquences identifiées dans cette région et les représentants des principales lignées de truite en Europe. *Salmo salar* correspond au groupe externe (le saumon ; la branche a été ici raccourcie). Ad: Adriatique, At: Atlantique, Me: Méditerranée, Da: Danube, Ma: *marmoratus*. Voir détails dans Aurelle et Berrebi (2001).

Conclusion générale: phylogénie et phylogéographie:

L'étude de la diversité de séquences de l'ADN mitochondrial chez les poissons d'eau douce ou marin s'avère donc utile pour tenter de comprendre les processus historiques de différenciation et de migration mais aussi les événements de spéciation. Le cas de la truite illustre bien un *continuum entre différenciation génétique et spéciation*, certaines formes ayant été élevées au rang d'espèce.

Le développement des techniques d'analyses statistiques de polymorphismes de séquences permet maintenant de tirer aussi profit de ce type de données pour tester diverses

hypothèses démographiques ou évolutives (comme par exemple les tests de neutralité sélective). Je n'ai pas appliqué ces méthodes dans le cas de la truite ou des Siganidae, du fait d'un jeu de données trop réduit¹⁸. Cependant ces approches font partie intégrante de mes recherches en cours ou à venir concernant les invertébrés marins. Dans le cas de l'analyse de populations peu différenciées ou pour l'étude des mécanismes génétiques à l'œuvre à l'intérieur des populations il est cependant nécessaire d'utiliser des marqueurs plus variables tels que les microsatellites (voir § C.2).

C) Structure génétique des populations et flux de gènes en milieu aquatique:

Le développement des marqueurs microsatellites de l'ADN a permis de fournir une alternative aux allozymes pour l'étude de la différenciation entre populations et l'estimation des flux de gènes. Leur principal intérêt réside dans leur grande variabilité qui permet de comparer des populations ou des individus relativement proches et peut donc mettre en évidence de faibles niveaux de différenciation. D'un point de vue pratique, étant basés sur l'étude de l'ADN ils ne nécessitent pas forcément un échantillonnage destructeur ce qui est un atout en biologie de la conservation. Leur principal défaut réside dans leur développement et leur coût d'analyse. Dans le cadre de mes recherches j'ai appliqué ce type de marqueurs à trois espèces différentes qui correspondent à des histoires évolutives très contrastées comme l'indiquent les données issues de ces locus.

1) Des flux de gènes à grande distance : le cas de la girelle, *Coris julis* :

Cadre des recherches: CCMAR, Universidade do Algarve

Période: 2000

Publication: Aurelle et al., 2003



Coris julis

Le sujet de mon travail post-doctoral a principalement concerné l'étude génétique des populations d'un poisson marin côtier, la girelle (*Coris julis*, Labridae) et plus particulièrement l'estimation des flux de gènes entre populations continentales et insulaires (archipel des Açores). D'autre part, comme des différences morphologiques sont observées notamment entre Atlantique et Méditerranée, un autre objectif était de comprendre les relations entre génétique et morphologie. L'analyse a donc été faite à différentes échelles:

i) différenciation entre formes morphologiquement distinctes: comparaison entre populations méditerranéennes, nord atlantique et sud atlantique (îles du Cap Vert, où les populations de girelles ont été initialement décrites comme correspondant à une autre espèce, *Coris atlantica*, Günther, 1862).

ii) différenciation entre populations d'une même région, et notamment entre populations insulaires et continentales : comment se font les flux de gènes au sein de l'océan Atlantique ?

iii) étude de la différenciation locale à l'intérieur de l'archipel des Açores et entre populations continentales de la péninsule ibérique.

En ce qui concerne la population du Cap Vert, bien que nous ne disposions que de 4 individus les données de séquence du gène mitochondrial codant pour l'ARN ribosomique 12S (Guillemaud et al., 2000) avaient déjà suggéré qu'il s'agissait effectivement d'une espèce différente, *C. atlantica*. Les microsatellites ont montré un faible nombre d'allèles partagés

¹⁸ Bernatchez (2001) a cependant pu le faire dans le cas de la truite et a ainsi pu proposer des dates d'expansion pour les différentes lignées.

avec les autres populations, ce qui va aussi dans le sens d'une distinction à l'échelle de l'espèce.

Au niveau de la séparation Atlantique / Méditerranée, seuls deux haplotypes mitochondriaux de Crète avaient été comparés aux échantillons atlantiques et semblaient indiquer une différenciation entre ces deux régions. L'analyse des microsatellites basée sur un plus grand nombre de populations indique aussi une importante différence entre populations méditerranéennes et atlantiques qui apparaît très nettement sur le phénogramme reliant les différentes populations et réalisé à partir des fréquences alléliques (Fig. 7). Les populations atlantiques (à l'exception de Madère) y forment un groupe bien séparé des populations méditerranéennes. Cette distinction est confirmée par une AMOVA (Analysis of Molecular Variance) qui, à partir des mêmes données, indique une différenciation significative entre ces deux groupes de populations (Fst moyen entre populations : 0,21). Une nette différenciation génétique de part et d'autre du détroit de Gibraltar a déjà été observée pour d'autres espèces d'organismes marins (voir Borsa *et al.*, 1997 ; Patarnello *et al.*, 2007) et les valeurs de Fst obtenues pour la Girelle sont parmi les plus élevées de celles citées par ces auteurs.

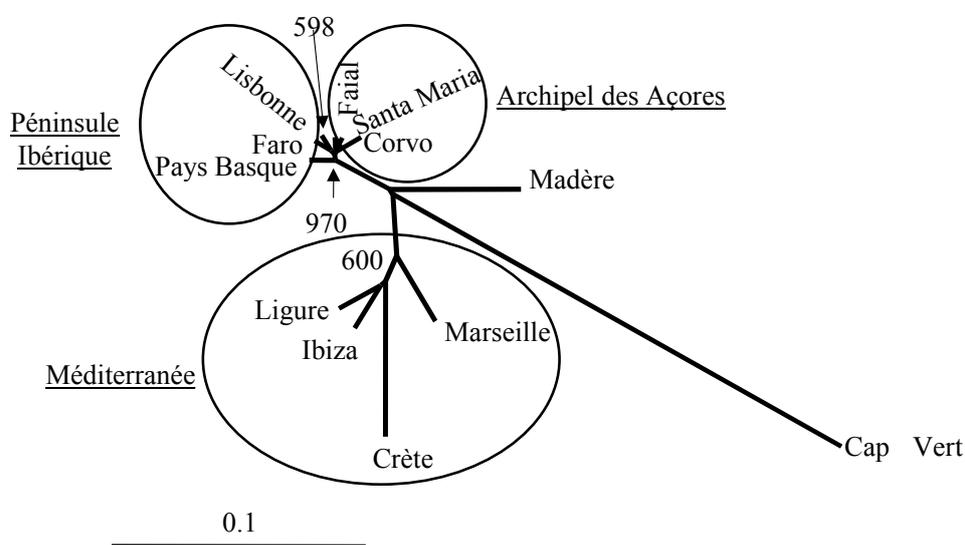


Fig. 7: phénogramme reliant les populations de *Coris julis* et *C. atlantica* (Cap Vert) et réalisé à partir des distances de Cavalli-Sforza et de l'algorithme Neighbor-Joining. La robustesse de l'arbre a été testée sur 1000 bootstraps et seules les valeurs supérieures à 500 ont été indiquées. La valeur 598 correspond au groupement de Lisbonne et Faro.

Par ailleurs, cette différenciation marquée contraste avec ce qui est observé dans le cas des échantillons de l'Océan atlantique où nous avons étudié trois populations issues de trois îles de l'archipel des Açores, ainsi que trois populations continentales (péninsule ibérique). Les résultats ont montré une absence de différenciation génétique significative entre toutes ces populations, à l'exception de l'échantillon du Pays Basque qui se démarque par rapport aux Açores. Or avec 8 locus et un nombre moyen d'allèles par locus variant de 5,6 à 8,5 pour les populations considérées il est probable que les tests de différenciation ont déjà une puissance élevée et notamment le test exact utilisé ici (Ryman *et al.*, 2006¹⁹). L'absence de test significatif est donc plus probablement le résultat d'une différenciation nulle ou réduite que d'un artéfact statistique. Ceci indique que malgré plus de 1800 km de distance entre l'archipel et le continent, il y aurait des flux de gènes (et probablement des transports

¹⁹ Mais ceci mériterait d'être étudié plus en détail par des simulations adaptées aux niveaux de variabilité observés.

laravaires) suffisants pour compenser les effets de la dérive génétique²⁰. Seul l'échantillon du Pays Basque semblerait se démarquer partiellement de cet ensemble panmictique. Ces résultats soulignent aussi le lien qui peut exister entre les populations des Açores et les côtes est de l'Atlantique, ce qui a aussi été noté pour d'autres espèces.

En Méditerranée, les populations de girelle semblent par contre montrer un niveau de différenciation plus élevé qu'en Atlantique, mais ceci resterait à confirmer à l'aide d'échantillons plus importants et mieux répartis. Il faut cependant noter que l'analyse de marqueurs aussi variables peut mettre en évidence de la structuration même pour des espèces à grandes tailles de populations ou à fortes capacités de dispersion comme par exemple certains poissons pélagiques (Ruzzante *et al.*, 2006). Du fait de la puissance obtenue avec ces marqueurs, la question de la signification biologique des différenciations ainsi mises en évidence peut se poser (Hedrick, 1999), mais elle peut aussi être mise en relation avec des différences biologiques (ce qui était le cas pour les données de Ruzzante *et al.*, 2006). Il reste donc à explorer plus précisément si des facteurs biologiques ou physiques contribuent à une plus forte structuration des populations de girelle en Méditerranée.

2) Isolement et contacts secondaires chez la truite, *Salmo trutta* :

Cadre des recherches: Laboratoire Génome et Populations, UPR 9060

Période: 1996-1999

Publications: Aurelle et Berrebi 1998, Aurelle *et al.*, 1999 et 2002

Dans le cas de la truite, du fait des possibilités de migration limitées par le réseau hydrographique et compte tenu de la tendance à la philopatrie observée chez les Salmonidae, la structuration observée est évidemment nettement plus marquée que chez la girelle. Les allozymes fournissent déjà une image de différenciation significative entre populations (Aurelle *et al.*, 2002). Cependant leur niveau de variabilité s'est avéré insuffisant pour distinguer efficacement les poissons sauvages et de pisciculture au sein de la lignée Atlantique²¹ notamment pour les populations à LDH C - 90. L'utilisation des marqueurs microsatellites dans le cadre de ma thèse avait deux objectifs principaux : i) distinguer les poissons d'élevage de ceux présents naturellement dans les rivières étudiées et ii) tester si la distinction entre deux lignées sauvages suggérée dans cette zone par les allozymes se retrouve indépendamment à l'aide des microsatellites. Pour cela je disposais de plusieurs populations échantillonnées dans les Pyrénées occidentales françaises ainsi que d'échantillons de piscicultures ayant participé plus ou moins directement aux repeuplements dans cette région et qui ont servi de référence pour les poissons "domestiques".

Certains locus microsatellites étaient déjà au point, mon travail a donc essentiellement concerné du génotypage et des recherches sur le meilleur moyen d'analyser les données obtenues. Il est en effet rapidement apparu que bien que ces marqueurs indiquent une différenciation significative entre la plupart des populations, il n'y avait pas de locus diagnostique permettant de facilement distinguer les différentes formes supposées et d'attribuer les individus à chaque forme. La présence d'allèles partagés dans des lignées probablement bien séparées depuis plusieurs milliers d'années (du fait des limites imposées par leur habitat) peut avoir plusieurs origines non exclusives:

- la rétention d'un polymorphisme ancestral mais la dérive n'est probablement pas négligeable dans ces populations

²⁰ Il faut cependant noter que les tailles de populations de cette espèce sont probablement élevées (Harmelin-Vivien, comm. pers.) ce qui peut limiter la dérive.

²¹ Dans le bassin méditerranéen par contre, comme les truites de piscicultures sont majoritairement de la lignée atlantique, elles peuvent être distinguées des populations sauvages méditerranéennes par certains locus allozymiques diagnostiques : Lactate Déshydrogénase C et Transferrine.

- l'homoplasie dans le cas où on a deux gènes identiques par état mais pas par descendance, ce qui est fréquent étant donné le fort de taux de mutation des microsatellites
- les flux de gènes naturels ou d'origine anthropique, ces derniers étant plus récents mais aussi probablement plus intense

Il fallait donc trouver une procédure d'analyse permettant d'affecter un individu à un groupe sans *a priori*, c'est-à-dire sans tenir compte de l'endroit où il a été échantillonné. D'autre part comme l'information portée par chaque locus pris isolément semblait insuffisante nous avons décidé d'explorer des méthodes d'analyse prenant en compte l'information apportée par tous les locus (les génotypes multi-locus). Dans cette optique deux approches se sont révélées performantes au cours de ma thèse: les analyses multivariées de type Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) et les Réseaux de Neurones Artificiels (ANN pour *Artificial Neural Networks*). Enfin lors de la rédaction de ce mémoire d'HDR j'ai aussi appliqué le logiciel Structure à ces données.

L'analyse factorielle des correspondances:

L'AFC avait déjà été utilisée pour des analyses de données génétiques et était installée dans le logiciel GENETIX. Le principe de cette méthode consiste à exprimer l'information contenue dans des données multivariées sous la forme de différents axes, chacun de ces axes étant une combinaison linéaire des variables initiales (ici les allèles codés en présence / absence). La principale réflexion concernant son application aux données microsatellites a d'abord été la présence d'allèles rares qui déforment l'image obtenue en étirant les axes pour un nombre réduit d'individus, ce qui masque l'information de structuration globale des populations. Un résultat plus informatif a été obtenu en ne tenant compte que des allèles rencontrés plus de 3 fois dans le jeu de données. Ceci a notamment permis de retrouver à l'aide des microsatellites, la distinction entre les deux groupes de populations initialement identifiés à partir des fréquences allozymiques de la LDH C (allèles 90 et 100; Fig 8).

Comme attendu également d'après les allozymes, les échantillons de pisciculture se groupent avec les populations à LDH C – 90. Ceci confirme donc le caractère sauvage des populations à LDH C – 100, mais laisse la question ouverte pour les autres échantillons de rivière (l'allèle 90 étant présent en pisciculture mais aussi en rivière). Cependant la part de variabilité expliquée par les premiers axes de l'AFC apparaît faible (4,67% pour le premier axe), ce qui est probablement lié aux forts taux d'allèles partagés entre populations. D'autre part, contrairement aux réseaux de neurones artificiels, cette méthode ne fournit pas directement d'estimation chiffrée du degré de mélange des populations voire des individus dans le cas de poissons issus du croisement de plusieurs lignées.

Les réseaux de neurones artificiels (Aurelle et al., 1999):

Le détail des méthodes d'analyses basées sur les réseaux de neurones artificiels est présenté dans l'encadré 3. Le principe général des ANN tels qu'ils ont été utilisés ici est celui d'un algorithme d'apprentissage (supervisé ou non) avec modification du réseau au fur et à mesure de l'apprentissage en fonction du taux d'erreur observé. A la fin de l'apprentissage, réalisé sur un jeu de données de référence (pour le réseau supervisé), l'algorithme peut être appliqué à un jeu de données inconnu afin de classer ces individus; ceci se fait donc par rapport à la classification des données de référence. Les avantages des réseaux de neurones résident principalement dans leur grande efficacité, leur capacité à s'adapter à tous types de données (sans contraintes statistique a priori et sans modèle sous-jacent) et dans la possibilité de fonctionner selon un mode de réflexion de type logique floue: ceci signifie que l'assignation d'un individu à une classe ne se fait pas selon une logique de type tout ou rien, mais qu'on peut envisager une appartenance à plusieurs catégories, chaque appartenance étant mesurée par un score correspondant. Dans le cas de données génétiques cela permet

notamment d'intégrer la possibilité d'avoir des individus d'origine hybride. La mise au point et la programmation des réseaux de neurones artificiels utilisés ici ont été réalisées par le **professeur Sovan Lek de l'Université Paul Sabatier de Toulouse**.

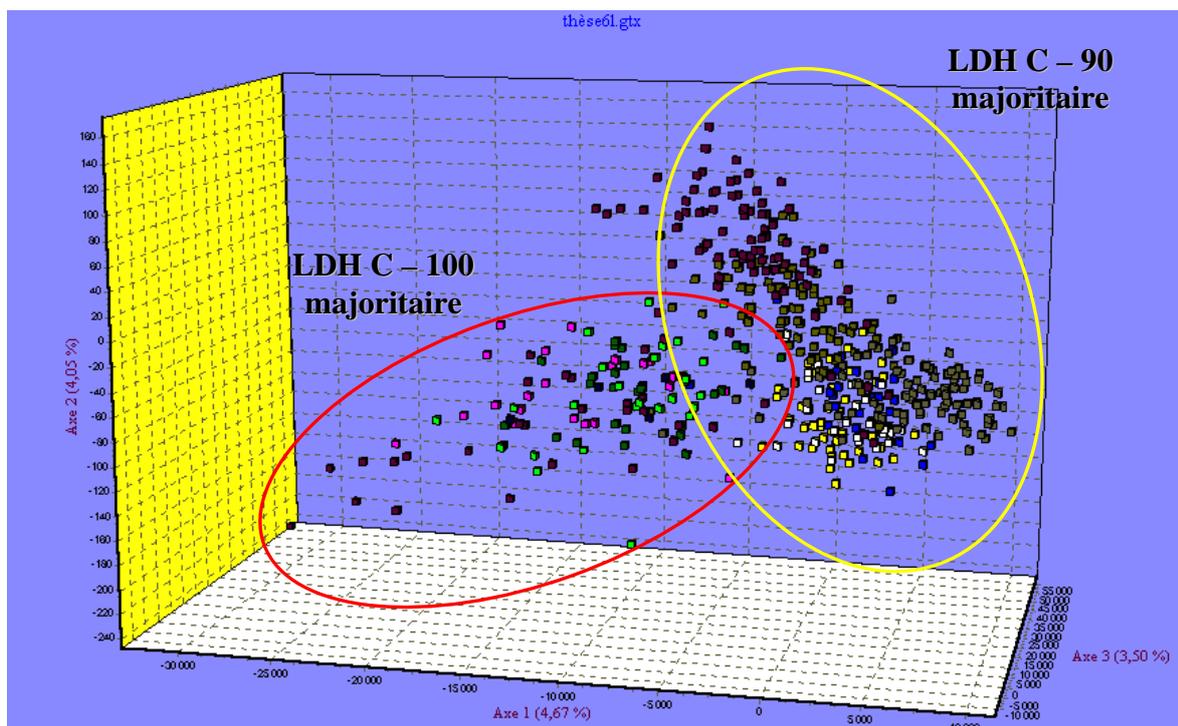


Fig. 8 : Analyse Factorielle des Correspondances réalisée à partir de 6 locus microsatellites sur les populations de truite du sud-ouest de la France. Axe 1 – horizontal: inertie 4,67%, Axe 2 – vertical: 4,05% et Axe 3 – profondeur: 3,50%. Chaque point correspond à un individu et les couleurs à des populations différentes. Les ellipses ont été ensuite rajoutées manuellement pour souligner la répartition des différentes populations. Ellipse de gauche: populations à LDH C – 100 majoritaire. Ellipse de droite: LDH C – 90 majoritaire.

-3- Le réseau de neurones artificiels utilisé pour l'assignation individuelle à partir de données génétiques:

Le réseau est constitué de trois couches de neurones virtuels (Fig. 9). Chaque "neurone" figuré ici correspond en fait à une étape de calcul qui prend en compte les informations venant de la couche précédente, les intègre et envoie ensuite un signal vers la couche suivante. La couche d'entrée (I) est celle correspondant aux variables utilisées pour le classement. Ici il y a autant de variables que d'allèles dans le jeu de données initial. Les analyses ont été réalisées avec 4 locus microsatellites qui comportaient 71 allèles en tout; il y avait donc 71 neurones en entrée. Pour chaque individu, les allèles étaient codés sous la forme 0/1/2: 0 si l'individu ne possède pas cet allèle, 1 si il est hétérozygote, et 2 si il est homozygote pour cet allèle. Chaque neurone est connecté avec les neurones de la ou des couches voisines; un poids est affecté aux différentes connexions. Ce poids sera modifié au cours de l'apprentissage afin d'optimiser le réseau. Le neurone intègre les informations numériques pondérées issues des neurones précédents et délivre en sortie un signal qui est fonction de ces informations (voir Cornuet *et al.*, 1996; Mastrorillo *et al.*, 1997). Si w_i et x_i correspondent respectivement au poids de la connexion et au signal venant du neurone i de la couche n , le signal d'entrée d'un neurone de la couche $n+1$ vaudra: $z = \sum w_i * x_i$ (c'est donc la somme pondérée des signaux venant de la couche précédente). Le signal de sortie délivré par ce même neurone de la couche $n+1$ vaudra: $f(z) = [1 + \exp(-z)]^{-1}$. Comme déjà indiqué, le signal arrivant aux neurones de la couche d'entrée correspond aux variables utilisées pour la classification (ici les différents allèles). Le signal délivré par la couche de sortie (O) désigne la catégorie dans laquelle doit être classé l'individu analysé, avec un score pour chaque catégorie. Il y a autant de neurones de sortie que de classes et l'individu est assigné à la catégorie dans laquelle il présente le score le plus élevé. Le classement se fait selon un principe de logique floue: l'appartenance ne répond pas à une logique binaire de type tout ou rien, mais on a au contraire un score qui permet de définir divers degrés d'appartenance à chaque classe. Ainsi un poisson pour lequel on obtient un score de 1 dans la classe A et de 0 dans la classe B sera affecté à la classe A. Mais si les scores de sortie sont plus ambigus (proches de 0.5 par exemple), l'affectation est moins sûre et peut refléter soit un signal insuffisant soit une origine multiple de l'individu (hybridation). C'est pourquoi il est aussi intéressant d'étudier la distribution des scores des individus dans les différentes catégories pour juger de la qualité du classement. Enfin, notre réseau comprenait une couche intermédiaire (ou "couche cachée", H) avec seulement deux neurones afin d'éviter

une "sur-paramétrisation". La couche cachée correspond aux caractéristiques du système de "décision"; c'est elle qui permet au réseau de répondre aux particularités qui pourraient apparaître dans la couche d'entrée.

Pour que le réseau apprenne à classer correctement les individus, on lui présente un jeu de données de référence pour lequel les appartenances sont supposées connues. Au cours des différentes présentations, les poids des connexions sont ajustés afin de maximiser le pourcentage d'individus bien classés. Cette modification se fait selon l'algorithme de rétro-propagation en fonction des différences entre signaux de sortie observés et attendus. Il faut un nombre d'itérations plus ou moins important pour aboutir à un classement correct.

L'apprentissage peut se faire de plusieurs façons. La technique dite de "hold-out" (Kohavi, 1995) consiste à séparer en deux parties un jeu de données fait d'individus d'appartenance connue (par exemple pisciculture / rivière). La première partie est utilisée pour l'apprentissage, tandis que la seconde partie est utilisée pour évaluer la qualité de cet apprentissage (étape de test). Le réseau entraîné peut ensuite être appliqué à des individus d'appartenance non connue. L'autre approche, appelée "leave-one-out", est utilisée lorsque les jeux de données sont trop petits pour être divisés en deux ou lorsque la composition de ce jeu de données n'est pas bien connue ou hétérogène (c'est le cas par exemple des populations de rivière à LDH C - 90 qui peuvent éventuellement contenir des individus de pisciculture). Dans ce cas, si on dispose de N individus au départ, l'apprentissage est réalisé avec N-1 individus, et le réseau est appliqué au Nième, qui est alors classé dans une des catégories. Cette opération est répétée pour les N individus (ce qui peut nécessiter de limiter le nombre d'itérations de chaque apprentissage).

Un autre type de réseau de neurones artificiels a également été testé: il s'agit d'un réseau non supervisé dont le but est de représenter un jeu de données multivarié dans un espace de dimensions réduites (ici 2) afin de visualiser de manière simplifiée les proximités entre individus; c'est le principe de la carte de Kohonen (*Self Organizing Map*, Kohonen, 1995). Pour cela le réseau de neurones s'auto-organise afin d'améliorer progressivement la qualité de la représentation. Ce réseau est dit non supervisé car il n'a besoin d'aucun jeu de données de référence pour fonctionner. Les principaux résultats obtenus pour les populations de truites sont présentés dans Giraudel *et al.* (2000).

Références: Aurelle *et al.* (1999); Giraudel *et al.* (2000)

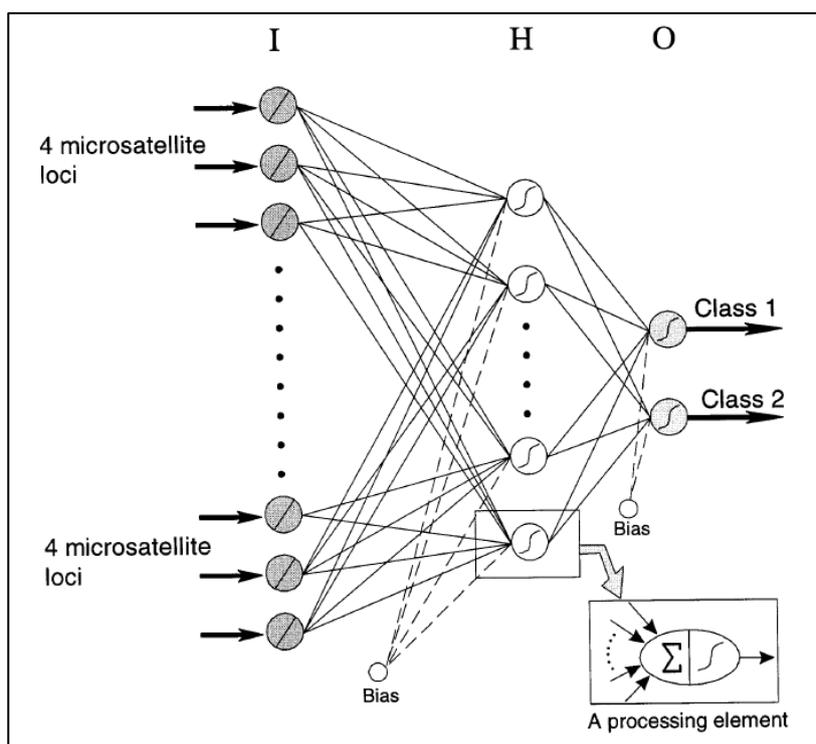


Fig. 9: structure du réseau de neurones artificiels utilisé pour l'assignation individuelle. I couche d'entrée (Input), H couche intermédiaire (Hidden), O couche de sortie (Output). (Aurelle *et al.*, 1999)

Plusieurs comparaisons ont été faites à l'aide des réseaux de neurones artificiels:

- populations à LDH C – 90 majoritaire par rapport à celles à LDH C – 100 afin de vérifier la distinction entre ces deux groupes
- trois échantillons de différentes piscicultures comparés entre eux
- comparaison des populations de rivière à LDH C – 90 avec les piscicultures

A partir de 4 locus microsatellites les réseaux de neurones artificiels ont tout d'abord confirmé la différenciation entre les lignées à LDH C – 90 et 100. Le pourcentage d'individus mal classés entre ces deux classes apparaissait faible lors de la phase de test (5%) et les scores d'appartenance étaient généralement élevés. Puis lorsque le réseau était appliqué à des populations non utilisées pour l'apprentissage, les pourcentages d'individus assignés à chaque lignée variaient dans le même sens que les fréquences des allèles de la LDH C.

En ce qui concerne la comparaison des 3 échantillons de pisciculture, on observe une relative proximité génétique de ces souches. Or ces piscicultures ont effectivement contribué aux repeuplements dans cette région et leur faible différenciation justifie leur choix comme échantillons représentatifs des souches "domestiques".

L'apprentissage à partir des échantillons de rivière et de pisciculture à LDH C – 90 majoritaire, a montré que plusieurs des populations de rivière n'étaient que peu influencées par les repeuplements. Seules quelques populations ont présenté une influence plus marquée des repeuplements, le plus souvent en accord avec la morphologie des individus.

D'un point de vue méthodologique, cette approche n'a été que peu utilisée dans le domaine de la génétique des populations (Cornuet *et al.*, 1996). Nos données montrent l'efficacité de cette technique de classification pour des populations peu différenciées et partageant encore un grand nombre d'allèles.

L'approche bayésienne: le logiciel STRUCTURE:

Des techniques alternatives sont actuellement disponibles pour analyser la structure des populations et assigner des individus à partir de données génétiques. Une des plus utilisées est l'approche bayésienne du logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Cette analyse part d'un modèle où on suppose l'existence de K groupes génétiques panmixtiques chacun étant caractérisé par ses fréquences alléliques. Puis les individus sont assignés à un ou plusieurs groupes selon leur génotype et plusieurs valeurs de K peuvent être testées. Il s'agit d'une méthode permettant d'intégrer des informations sur divers paramètres (origine de certains individus, degré de mélange...) mais dont la robustesse et l'interprétation des résultats nécessitent d'être évaluées (Evanno *et al.*, 2005). Dans le cadre de la rédaction de ce mémoire, j'ai ré-analysé mes données de microsatellites de truite avec le logiciel STRUCTURE afin de tester si les principales conclusions issues de l'analyse des réseaux de neurones étaient retrouvées par cette méthode (mais avec 2 locus supplémentaires). D'autre part la possibilité de faire varier le paramètre K fournit un bon moyen d'évaluer le nombre de groupes génétiques dans les échantillons analysés.

L'application aux données de truite de la méthode d'analyse proposée par Evanno *et al.* (2005) indique que le nombre K de groupes pour lequel on observe un changement important dans la pente de la distribution des valeurs de vraisemblance est de 4. L'assignation des individus à ces quatre groupes donnée sur la Fig.10 indique qu'ils correspondent respectivement aux échantillons de pisciculture (jaune), ceux à LDH C – 100 majoritaire (bleu) et deux groupes parmi les échantillons de rivière à LDH C – 90 (vert et rouge). Par rapport aux précédents résultats la principale différence vient donc de l'existence possible de plusieurs groupes au sein des populations de rivière à LDH C – 90 du sud-ouest de la France. Cette éventualité n'avait pas été envisagée dans le cas des réseaux de neurones artificiels où l'analyse était basée sur trois classes d'appartenance et comportait deux locus microsatellites en moins. Deux hypothèses peuvent être envisagées. D'une part la distinction observée entre les groupes vert et rouge peut correspondre à une vraie différence génétique, ce qui serait en accord avec la position des populations sur le réseau hydrographique. D'autre part il faut aussi tenir compte de la possibilité d'une surestimation du nombre de groupes lorsqu'on s'écarte des hypothèses de départ comme indiqué dans la documentation de STRUCTURE. L'analyse d'autres échantillons dans cette région pourrait permettre de tester ces hypothèses.

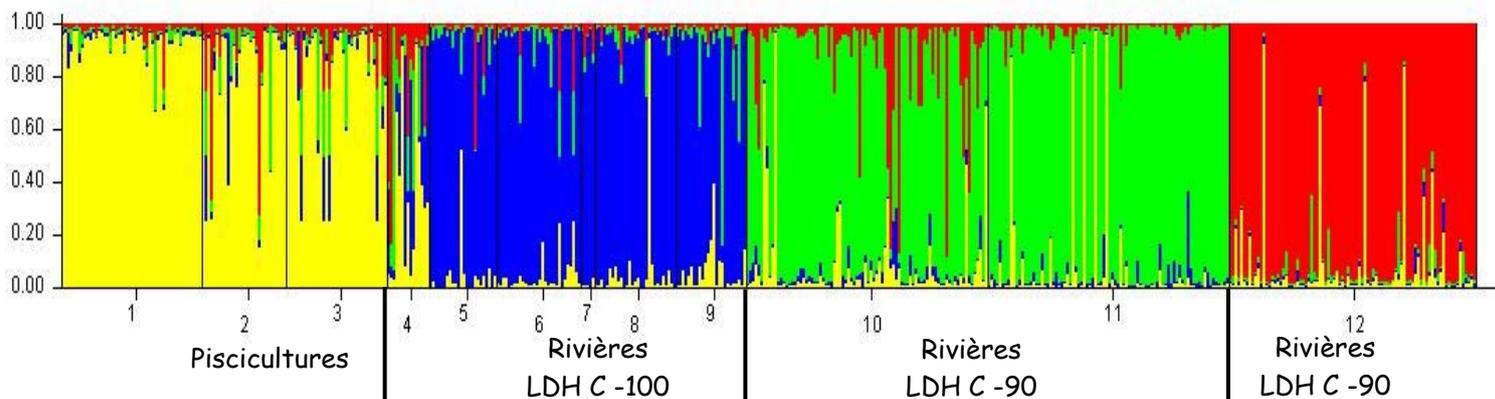


Fig. 10 : résultat de l'analyse des populations de truite avec le logiciel STRUCTURE appliqué à 6 locus microsatellites. Le graphe présente pour chaque individu une barre verticale correspondant à ses probabilités d'assignation dans les différents groupes, chaque groupe étant représenté par une couleur. L'analyse correspond à $K=4$ groupes, une période d'initiation de 10 000 pas et un calcul sur 100 000 pas. Les fréquences alléliques étaient supposées indépendantes et le modèle pouvait évaluer un mélange des populations. Des résultats similaires ont été obtenus pour un modèle à fréquences alléliques corrélées.

Bilan des différentes analyses:

Les différentes méthodes appliquées aux données microsatellites vont dans le sens de la présence dans la région étudiée de plusieurs groupes génétiques bien différenciés. La comparaison avec les souches de pisciculture indique que les échantillons de rivière correspondent en majorité à des poissons présents naturellement. Ces populations sauvages se répartissent en deux groupes « sauvages » (voire trois selon les résultats de STRUCTURE). Ces analyses indiquent aussi, par la détection d'individus potentiellement mal assignés, que des échanges ont eu lieu entre groupes. Cependant ces échanges ont été suffisamment réduits pour conserver la différenciation initiale. Ces contacts secondaires naturels, ajoutés à l'impact variable des repeuplements, pourraient contribuer aux déficits en hétérozygotes observés. Pour les microsatellites, des allèles nuls interviennent aussi probablement dans ces déficits.

La compréhension plus précise des interactions génétiques entre ces populations différenciées nécessiterait une étude plus poussée des processus d'hybridation et de leurs conséquences en milieu naturel. Un tel projet expérimental a depuis été mis en oeuvre par Patrick Berrebi dans le cas de l'étude de la truite marbrée (*Salmo trutta marmoratus*) qui est menacée par les repeuplements à partir d'autres lignées de truites. Les premiers résultats suggèrent notamment un effet hétérosis possible pour la génération F1 issue du croisements entre ces deux variétés de truites, mais il sera intéressant de suivre ceci au cours des générations suivantes (notamment F2 et *backcross*) où d'autres mécanismes génétiques pourraient intervenir (Madsen, 2000).

3) Différenciation à courte distance sans isolement à long terme chez les Octocoralliaires méditerranéens ?

Cadre des recherches: UMR 6540 DIMAR (ACI jeunes chercheurs – ANR Medchange)

Doctorants: Kenza Mokhtar-Jamäi; Jean-Baptiste Ledoux

Période: 2004-en cours

Comme cela a été précédemment mentionné, l'utilisation de marqueurs très variables de type microsatellites dans le cadre du projet Medchange a pour objectifs principaux de:

- **délimiter les populations et estimer les flux de gènes entre sites** afin de préciser les capacités de dispersion et les possibilités de recolonisation après perturbation
- **tester l'hypothèse d'une adaptation locale** en fonction du régime thermique à partir de la comparaison des niveaux de thermotolérance et de flux de gènes entre sites / profondeurs

- évaluer le **niveau de diversité génétique** des populations et tester si cette diversité peut être reliée à certains paramètres environnementaux ou démographiques.

Ce travail est pratiquement terminé pour le corail rouge (*Corallium rubrum*; thèse de Jean-Baptiste Ledoux). Les articles et la thèse sont en cours de rédaction. Pour la gorgone rouge (*Paramuricea clavata*;) Kenza Mokhtar-Jamaï a déjà bien avancé l'étude génétique des populations au cours de sa première année de thèse.

Dans les deux cas la première étape a consisté à rechercher des microsatellites pour chaque espèce. J'en ai d'abord identifié chez le corail rouge²² mais qui ne se sont pas révélés satisfaisants lors des tests d'amplification. Par la suite, lors de la thèse de J.-B. Ledoux, le développement de ces locus a été confié à deux sociétés: Bioprofiles Ltd (Université de Newcastle) et Ecogenics. Pour le corail rouge, nous avons aussi utilisé des marqueurs déjà publiés dans la littérature (Costantini et Abbiati, 2006). Au total, 12 marqueurs sont maintenant disponibles pour le corail rouge et 5 pour la gorgone rouge²³ pour laquelle l'étude ne fait que commencer. Pour *P. clavata*, une collaboration avec l'Université de Barcelone, qui travaille sur le même sujet, permet aussi de disposer d'échantillons et de marqueurs supplémentaires.

L'application de 10 locus microsatellites aux échantillons de *C. rubrum* présentés précédemment (§ III A 1; Fig. 2) a mis en évidence un niveau de variabilité élevé à l'intérieur des populations, avec une hétérozygotie moyenne non biaisée variant de 0,57 à 0,83, comme attendu pour ce type de marqueurs. Cette grande diversité s'accompagne de déficits en hétérozygotes élevés et généralisés sur l'ensemble des populations mais avec une intensité variable selon les locus. Ces déficits sont très probablement liés à la présence d'allèles nuls, déjà suggérée chez cette espèce (Costantini *et al.* 2007a). Ce type d'allèles peut être particulièrement fréquent dans le cas d'organismes à grande taille efficace (ce qui reste à évaluer ici) ou pour des populations qui divergent nettement de celles choisies pour rechercher les microsatellites (Chapuis et Estoup, 2007). Mais le rôle de la taille efficace est délicat à appréhender d'autant plus que les données génétiques semblent indiquer que les populations (au sens d'un ensemble de gènes en interactions) pourraient être peu étendues.

En ce qui concerne les divergences entre populations, les tests de différenciation²⁴ par paires indiquent que des différences significatives sont observées pour la plupart des échantillons comparés même lorsqu'ils sont issus de sites très proches comme l'intérieur et l'extérieur d'une grotte (Riou par exemple) ou deux profondeurs d'un même site (Riou 40 m et Riou 20 m à l'extérieur de la grotte). Seules quelques comparaisons ne sont pas significatives (intérieur et extérieur d'une autre grotte de l'archipel de Riou). Ceci suggère que les échanges entre populations se font généralement à courte distance. En ce qui concerne les gamètes, du fait de la fécondation interne, seuls les spermatozoïdes sont échangés et leur probabilité de fécondation est probablement plus importante dans le voisinage immédiat de la colonie qui les a émis, mais ceci resterait à préciser. En ce qui concerne les larves, une fois émises elles restent libres 4 à 12 jours avant de se fixer (Vighi, 1972). Malgré des capacités de nage réduites, cette durée de phase larvaire libre semblerait a priori suffisante pour permettre des échanges à plus longue distance que ce qui est déduit des données génétiques. Les conditions de courant peuvent dans certains cas freiner la dispersion mais il semble difficile de généraliser ce phénomène à toutes les régions étudiées. Une autre explication possible, de portée plus générale, pourrait être une plus grande mortalité des larves entraînées à distance de leur population d'origine du fait d'un manque d'habitat favorable ou disponible. Ce type de situation est d'ailleurs susceptible de favoriser l'évolution vers une réduction de la dispersion

²² A l'aide du protocole d'Anne Chenuil adapté de Zane et al (2002).

²³ Kenza Mokhtar-Jamaï a récemment développé une banque enrichie pour cette espèce et devrait analyser prochainement les séquences des clones ainsi obtenus.

²⁴ Réalisés à partir de tests exacts à l'aide du logiciel Genepop 4.0 (Rousset, 2008).

(voir une discussion dans Colas *et al.*, 1997). Un autre phénomène susceptible de réduire les échanges entre sites serait l'adaptation locale mais ceci n'affecterait probablement pas tous les locus de la même façon, d'autant plus que les marqueurs utilisés ici sont considérés comme neutres. Par ailleurs, cela n'expliquerait pas les échanges restreints entre habitats comparables. Inversement, cette situation de flux de gènes réduits est potentiellement favorable à l'apparition de l'adaptation locale (Lenormand, 2002). Ces résultats seront donc comparés aux résultats des expériences de thermotolérance afin de mieux comprendre les interactions migration / sélection susceptibles de se mettre en place chez ces espèces (voir perspectives, § D).

Les fréquences alléliques des microsatellites sont aussi utiles pour étudier les proximités génétiques et les niveaux relatifs de flux de gènes entre populations. La Fig. 11 présente le phénogramme des relations entre populations obtenu à partir de 10 locus. La plupart des nœuds apparaissent peu robustes ce qui pourrait être lié à la forte variabilité de ces marqueurs susceptible d'être une source d'homoplasie. On observe néanmoins une image de différenciation marquée entre populations (avec des branches longues menant aux divers échantillons). Cependant les branches internes relativement courtes ne montrent pas de forte divergence entre régions, même si il y a une tendance au regroupement des populations selon leur origine géographique. L'image obtenue à grande distance géographique semble donc se rapprocher de ce qui a été observé à partir des introns avec une absence de rupture phylogéographique.

L'ensemble de ces résultats pose la question d'un ***scénario évolutif permettant de concilier des flux de gènes réduits à courte distance avec une absence de divergence plus marquée entre les sites les plus éloignés***. Un premier élément de réponse consiste à prendre en compte le fait que les microsatellites et les données de séquences d'introns donnent des informations à des échelles de temps différentes. Les microsatellites pourraient ainsi indiquer des flux de gènes réduits sur une période récente, alors que les introns suggèreraient une absence d'isolement à plus long terme. D'autre part il faut rappeler que les données de séquence pourraient être affectées par une expansion récente de cette espèce (qui serait donc suivie par un isolement des populations) ou par un effet sélectif sur le seul marqueur analysé jusqu'à présent (éventuellement par l'intermédiaire d'un effet d'auto-stop). Le séquençage d'autres locus nucléaires devrait apporter des informations supplémentaires sur ces points.

Dans tous les cas la ***compréhension de l'évolution actuelle des populations*** devra tenir compte de leur faible connectivité qui est susceptible d'avoir des impacts génétiques (érosion de la diversité intra-populations) et démographiques (faibles potentiels de recolonisation). La question du ***fonctionnement actuel des populations et de l'importance des apports extérieurs lors du recrutement*** est en cours d'étude par J.-B. Ledoux pour sa thèse grâce à deux échantillonnages adaptés. D'une part, nous avons réalisé un échantillonnage à courte distance (un carré d'environ 1m de côté) d'un maximum de colonies de corail rouge cartographiées individuellement dans un site de la région de Marseille. Une fois que leur génotype sera déterminé, les données seront utilisées pour une étude de la structure génétique spatiale à courte distance et pour des analyses de parenté. D'autre part, des comparaisons seront réalisées dans un autre site entre colonies de petite et de grande taille supposées appartenir à des cohortes ou groupes de cohortes nettement séparés. Ceci permettra de tenter d'évaluer la taille efficace des populations ainsi que la proportions d'individus qui ne sont pas issus d'un recrutement local (voir Oddou-Muratorio et Klein, 2008, pour un exemple chez les plantes).

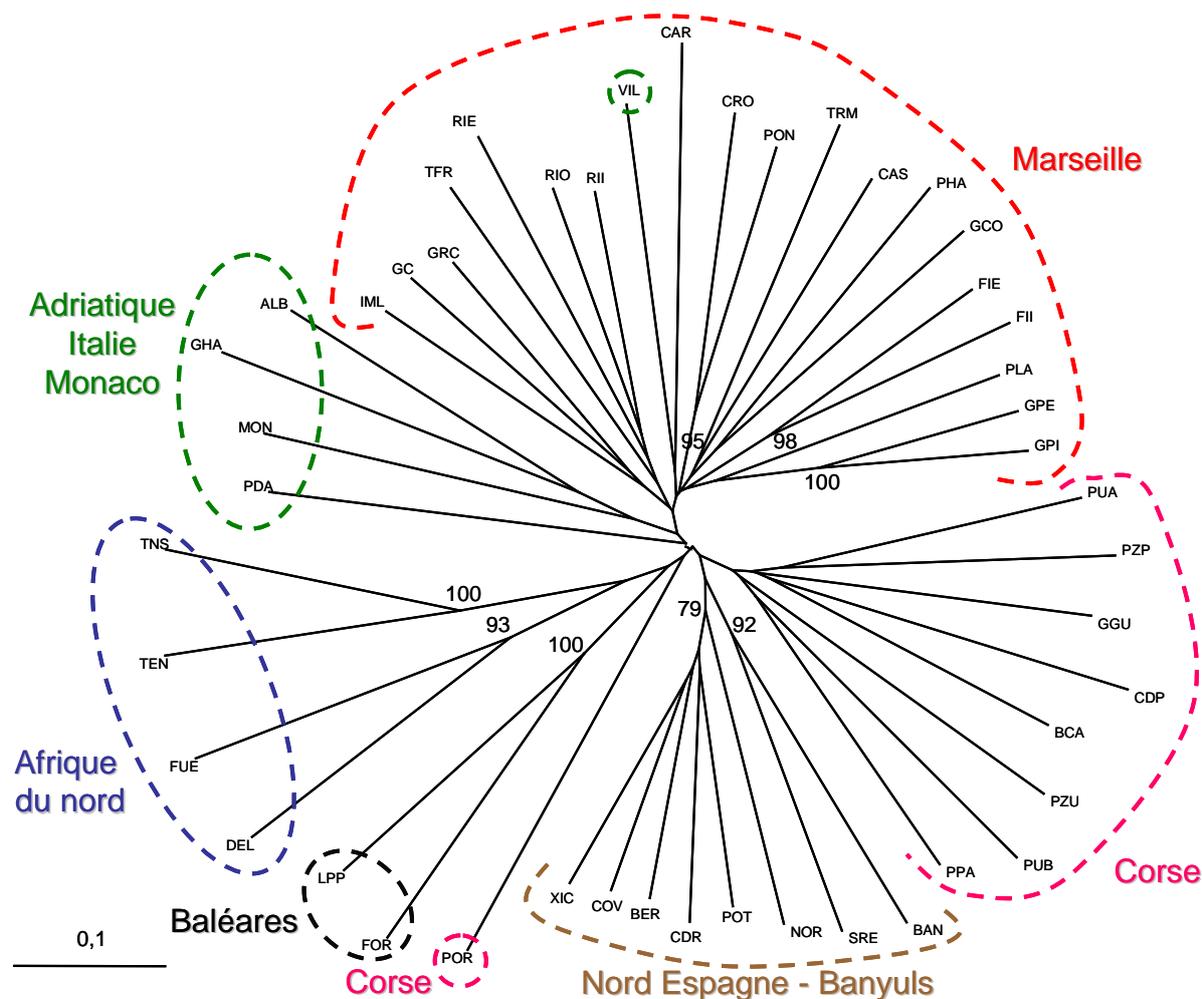


Fig. 11 : phénogramme présentant les proximités génétiques entre populations de corail rouge. L'arbre a été élaboré à partir de l'analyse de 10 locus microsatellites et a été construit selon l'algorithme de "neighbor-joining" (Saitou et Nei, 1987) à partir de la distance de corde de Cavalli-Sforza et Erwards (1967). La robustesse a été testée à partir de 1000 bootstraps sur les locus et seules les valeurs supérieures à 75% sont indiquées. Les analyses ont été faites à l'aide du logiciel Populations 1.2.30 (Langella, 1999).

L'intérêt de cette approche génétique est qu'elle permet d'intégrer les effets cumulés de plusieurs épisodes successifs de reproduction, ce qui est important pour ce type d'organisme où le recrutement peut fortement varier dans le temps, le maintien des populations reposant alors surtout sur le taux de survie des adultes (Linares *et al.*, 2007). Les résultats obtenus de cette façon seront aussi comparés avec les données de dynamique des populations de corail rouge encore rares pour cette espèce. Les travaux déjà publiés portent soit sur des populations d'un type particulier (avec une proportion élevée de jeunes colonies pour l'article de Santangelo *et al.*, 2007) soit concernent le développement d'un nouveau modèle (de type continu; Jabin *et al.*, 2008) qui mériterait d'être appliqué à un jeu de données dédié à cette étude. Un modèle discret de dynamique est en cours d'étude par Cristina Linares dans le cadre du projet Medchange; il fournira des compléments importants concernant la conservation des populations de cette espèce.

Cependant *une limitation importante de ces approches génétiques et démographiques pour l'étude des capacités de maintien des populations est la non prise en compte des différences individuelles de réponse aux modifications environnementales et donc du rôle de la sélection naturelle.* Ceci constitue une partie de mes perspectives de recherches.

D) Perspectives de recherches: sélection et adaptation en milieu marin:

Face à des modifications environnementales on fait généralement référence aux **capacités d'adaptation** des organismes ou des populations. Or ce terme d'adaptation peut correspondre à deux phénomènes distincts. D'une part au niveau individuel la **plasticité phénotypique** désigne la capacité pour un génotype donné de produire différents phénotypes en fonction de l'environnement. Ceci permet par exemple à un individu d'ajuster son métabolisme face à des conditions environnementales fluctuantes. La thermotolérance individuelle peut ainsi être considérée comme une forme de plasticité. Lambert et Rezsöhazy (2004) soulignent d'ailleurs que la plasticité peut être vue comme une tension entre rigidité et malléabilité et en tant que telle, elle constitue une caractéristique essentielle du monde vivant. D'autre part au niveau des populations et de l'espèce, **l'adaptation génétique** fait référence aux changements de fréquences alléliques sous l'action de la sélection naturelle. Pour que ce processus ait lieu, il doit y avoir des différences individuelles de survie ou de fécondité (donc de valeur sélective) et ces différences doivent être héréditaires. Ainsi la composition génétique de la population va changer (au moins pour les gènes concernés par la réponse à la variable considérée) et permettre une **évolution** dont le résultat est une **adaptation** à un nouvel environnement. Ces deux phénomènes ne sont pas indépendants; la sélection naturelle peut agir sur la gamme de plasticité des individus si celle-ci a une composante héréditable (ce qui est souvent le cas). Les rôles respectifs de la plasticité et de la sélection naturelle sont donc importants à prendre en compte et à distinguer dans le contexte du changement climatique (Gienapp *et al.*, 2008). Ceci est particulièrement important pour les Octocoralliaires de Méditerranée nord occidentale dont la répartition géographique et les capacités de dispersion apparemment limitées imposent une évolution *in situ* face à l'augmentation de température²⁵.

1) Plasticité et réponse des Octocoralliaires au changement climatique:

Au cours du projet Medchange, des expériences de thermotolérance comparée chez le corail rouge ont déjà été réalisées (Torrents *et al.*, 2008; Ledoux *et al.*; données non analysées). Torrents *et al.* (2008) ont notamment comparé les réponses (nécrose, activité des polypes, calcification) de colonies issues de deux profondeurs: 11 m et 40 m dans la région marseillaise, mais pour des sites différents. Les résultats ont montré une plus grande thermotolérance des colonies situées à faible profondeur par rapport à celles prélevées à 40 m. Etant donné les faibles flux de gènes observés ceci pourrait donc confirmer l'existence d'une adaptation locale. Lors de la thèse de J.-B. Ledoux, des expériences de transplantations croisées entre colonies de différentes profondeurs ont été réalisées *in situ* en Corse et dans la région marseillaise. Les premiers résultats suggèrent apparemment des réponses différentes selon la région considérée, mais iraient également dans le sens d'une adaptation locale selon la profondeur et donc le régime thermique. Bien que la possibilité d'une acclimatation des colonies en fonction des variations de température dans les semaines précédant les expériences puisse influencer les résultats, il semble bien que les populations pourraient réagir différemment au réchauffement climatique selon leur origine. L'étendue des modifications du régime thermique en fonction de la profondeur sera donc un paramètre clé pour le maintien de ces espèces.

Par ailleurs afin de mieux comprendre l'origine de ces différents degrés de thermotolérance, nous étudierons l'expression des gènes de ces organismes en situation de stress thermique comparée à une situation contrôle. La première approche consistera à étudier le niveau d'expression des ARNm de gènes potentiellement impliqués dans la réponse à ce type de stress tels que ceux codant pour les protéines de choc thermique. Ceci est maintenant

²⁵ En tenant aussi compte, si possible, de l'inconnue que représentent les populations situées plus en profondeur.

faisable à l'UMR DIMAR suite à l'achat récent d'un appareil de **PCR en temps réel** et grâce à la formation que j'ai suivie à Lyon sur cette technique en 2008. L'utilisation des nouveaux aquariums d'études de DIMAR sera également très utile. Cependant cette approche est limitée d'une part par l'absence de connaissance sur les gènes effectivement susceptibles d'intervenir dans la réponse et d'autre part par le peu de séquences disponibles chez ces espèces pour définir des amorces de PCR en temps réel.

Une approche plus générale consisterait à analyser de manière simultanée l'expression d'un grand nombre de gènes afin d'identifier ceux qui sont sur ou sous-exprimés face au stress grâce à l'utilisation de puces à ADN. Cette technique nécessiterait la collaboration d'un laboratoire équipé pour ces analyses²⁶. D'autre part il faut une bonne connaissance des gènes exprimés chez les organismes considérés, ce qui n'est donc pas le cas pour les Octocoralliaires méditerranéens. Pour tenter d'y remédier, j'ai déposé un **projet de séquençage de banques d'ADN complémentaire au Génomscope** pour les gorgones *Paramuricea clavata* et *Eunicella cavolinii*. Ce projet a été élaboré en collaboration avec Jean-Michel Claverie (laboratoire Information Génomique et Structurale, Marseille) et Paola Furla (laboratoire Ecomers, Nice). Il permettrait de plus d'avoir une première approche génomique de ces organismes ce qui serait utile à la fois pour la recherche de nouveaux marqueurs en phylogénie ou phylogéographie, mais aussi d'apporter des informations sur l'évolution des génomes (ce qui constitue un des sujets d'étude de J.M. Claverie). Les données de séquences obtenues pourraient aussi être utilisées pour réaliser des **tests de sélection** et rechercher ainsi des gènes ayant pu avoir un rôle adaptatif récent. Le génomscope vient de donner une réponse positive à ce projet en nous accordant un run de séquençage de type 454.

2) Diversité génétique et résistance aux perturbations:

L'évolution génétique des populations face à un changement environnemental suppose l'existence de différences individuelles de valeur sélective face à ces modifications. Il est ainsi couramment noté qu'une perte de diversité génétique peut diminuer le potentiel évolutif des espèces face aux modifications de leur environnement (Frankham, 2005). La diversité génétique peut également intervenir au niveau individuel comme dans les cas de corrélations entre hétérozygotie et valeur sélective. Une telle association peut être le signe que l'hétérozygotie mesurée reflète le degré de consanguinité d'un individu (effet général) ou au contraire correspond à une association avec certains locus sélectionnés (effet local; voir Lieutenant-Gosselin et Bernatchez, 2006, pour un exemple). Enfin quelques études récentes ont suggéré un lien possible entre la diversité génétique des populations et la résistance aux perturbations (Hughes *et al.*, 2008).

Il sera donc intéressant d'étudier le **rôle de la diversité génétique intra-spécifique dans le cas des mortalités d'Octocoralliaires suite aux anomalies thermiques**. Ce travail fera notamment partie de la thèse de Kenza Mokhtar-Jamaï avec pour espèce modèle la gorgone rouge, *Paramuricea clavata*. En effet chez cette espèce des expériences de thermotolérance ont déjà été réalisées et des données démographiques sont disponibles y compris des taux de mortalité suite aux dernières anomalies thermiques. Par ailleurs le rôle possible d'un pathogène thermo-dépendant a été mis en évidence (Bally et Garrabou, 2007).

Plusieurs approches seront explorées. D'un point de vue expérimental nous tenterons d'évaluer la diversité des niveaux de thermotolérance individuels entre populations issues de divers sites et profondeurs. Ceci pourrait indiquer s'il existe une diversité de réponse importante susceptible de servir de base à des processus sélectifs.

Au niveau des populations, des mesures de diversité génétique (hétérozygotie par exemple) seront obtenues à partir des microsatellites et de données de séquences d'introns. Elles permettront dans un premier temps de rechercher si certaines régions / populations sont

²⁶ Des contacts ont déjà été pris dans ce sens avec le laboratoire TAGC de Luminy.

génétiqnement appauvries. Par ailleurs ces niveaux de diversité génétique seront comparés à divers paramètres démographiques ou écologiques tels que les taux de nécrose, la profondeur, etc. En fonction des résultats obtenus nous tenterons de voir quels facteurs semblent agir sur cette variabilité et quelle est son implication dans l'impact des perturbations.

Le rôle de la connectivité entre populations sera exploré plus précisément afin de voir son influence sur la diversité génétique observée ou sur la relation entre thermotolérance et adaptation locale. Pour cela en dehors des approches indirectes d'estimation de flux de gènes, nous utiliserons des techniques d'assignations probabilistes à partir des microsatellites afin de rechercher la population d'origine d'un individu. Si possible cette recherche sera effectuée sur de jeunes colonies afin d'avoir une image des échanges actuels.

Au niveau individuel la diversité génétique sera étudiée par le biais de l'hétérozygotie multilocus (HML) mesurée sur des locus microsatellites. Nous testerons si l'HML varie de manière significative entre colonies plus ou moins nécrosées lors des événements de mortalité. Une autre approche consistera à comparer expérimentalement le degré de thermotolérance entre colonies présentant différents niveaux d'HML. L'interprétation des résultats tiendra compte des diverses théories susceptibles de relier l'hétérozygotie à la valeur sélective en supposant que la thermotolérance est un bon reflet de la valeur sélective dans ce contexte. Par ailleurs, bien que les microsatellites soient généralement considérés comme neutres, divers cas de sélection sur ces marqueurs ont été publiés (il y aurait dans ce cas un effet direct; revue dans Kashi et King, 2006) et cette possibilité devra être envisagée. Ces données devraient contribuer non seulement à la gestion des populations d'invertébrés marins sessiles mais aussi, de manière plus générale, à la réflexion sur l'apport et l'interprétation des données génétiques en biologie de la conservation.

3) Plasticité écologique chez l'oursin *Paracentrotus lividus*:

L'oursin comestible *Paracentrotus lividus* constitue un modèle biologique différent des Octocoralliaires. Il présente en effet une phase larvaire planctonique suffisamment longue (20-40 jours) pour permettre une dispersion à longue distance (revue dans Duran *et al.*, 2004). Or la présence de cette espèce dans des environnements variés (et notamment plus ou moins anthropisés) ainsi que l'observation de différences morphologiques suggèrent un niveau de plasticité élevé chez cette espèce. Par ailleurs sa facilité de récolte et les données génétiques déjà disponibles en font donc un bon modèle d'étude de la génétique des populations en milieu marin avec des caractéristiques éloignées de celles des Octocoralliaires.

En ce qui concerne cette espèce, je collabore avec Anne Chenuil et Jean-Pierre Féral pour co-diriger la thèse de Gwilherm Penant. Le but de cette thèse est d'utiliser l'oursin *P. lividus* comme espèce modèle afin de comprendre comment une espèce à large répartition géographique *s'adapte*²⁷ aux différentes hétérogénéités du milieu marin.

Dans un premier temps l'histoire évolutive de cette espèce sera analysée par une étude de phylogéographie qui devrait préciser les premiers résultats déjà publiés par d'autres équipes Calderón *et al.*, 2008). Dans ce but, un échantillonnage plus poussé a été réalisé et l'analyse du polymorphisme de séquences de nouveaux marqueurs de type EPIC est en cours. Cette approche multilocus sera essentielle pour tester les différentes hypothèses concurrentes susceptibles d'expliquer la diversité observée. Plusieurs locus intéressants ont déjà été identifiés et séquencés par Gwilherm Penant.

D'autre part l'étude de la réponse de cette espèce aux différentes conditions environnementales rencontrées sur son aire de répartition pourrait se faire par une comparaison du taux d'expression de gènes candidats par PCR en temps réel entre environnements contrastés. Plus précisément, nous pourrions utiliser les diverses séquences

²⁷ "s'adapte" au sens large du terme, ceci pouvant recouvrir la plasticité ou l'adaptation / sélection locale

d'ESTs déjà disponibles dans Genbank pour cet Echinoderme afin de définir des amorces pour des gènes déjà identifiés comme potentiellement réactifs chez d'autres espèces. En ce qui concerne les conditions expérimentales, l'attention serait plus particulièrement portée sur l'impact de l'anthropisation, avec une comparaison en milieu naturel de l'expression de gènes candidats dans des zones soumises à une pression humaine importante (pollution notamment) par rapport à des zones peu affectées. Si possible ces résultats seraient complétés par des expérimentations en aquarium permettant de mieux contrôler les facteurs de stress responsables des variations observées. Les différences observées seraient comparées avec l'intensité des flux de gènes entre sites.

En dehors de fournir des éléments sur l'importante écologique et les bases physiologiques de la plasticité en milieu marin, ces résultats pourraient servir de base pour le développement de bio-indicateurs.

Conclusion:

Alors que mes premiers travaux de recherche en DEA puis en thèse ont principalement concerné l'étude de des flux de gènes et de la différenciation entre populations, le développement des possibilités d'analyses moléculaires m'a permis de progressivement réorienter le cadre de mes recherches. Une plus grande part concerne maintenant l'étude de l'histoire évolutive des espèces grâce à l'analyse du polymorphisme de séquence de marqueurs nucléaires. La prochaine étape sera l'intégration de données génomiques (banques d'ESTs). Je me suis également formé à de nouvelles techniques telles que la PCR en temps réel qui devraient me permettre d'aborder un aspect plus fonctionnel de l'écologie des espèces étudiées. Par ailleurs, la problématique du changement climatique s'est imposée comme une composante incontournable de l'évolution actuelle de ces espèces et se devait donc d'être étudiée en tant que telle.

Ces évolutions thématiques se sont accompagnées de changements de modèles d'étude en fonction de leur intérêt pour répondre à une question donnée. Mes thèmes de recherche concernent maintenant les organismes marins avec leurs spécificités. Néanmoins j'ai gardé une continuité thématique dans les questionnements abordés qu'il s'agisse d'espèces d'eau douce ou marines. Les développements que j'ai récemment initiés devraient donc pouvoir s'intégrer parfaitement dans les diverses options possibles concernant l'évolution en cours de l'UMR DIMAR et notamment dans un possible futur institut d'écologie méditerranéenne regroupant les travaux sur les écosystèmes marins et terrestres dont les problématiques sont similaires.

Littérature citée:

- Aurelle D., Berrebi P. (1998) Microsatellite markers and management of brown trout *Salmo trutta fario* populations in southwestern France. *Génétique, Sélection, Evolution*, **30** (suppl. 1), S75-S90
- Aurelle D., Lek S., Giraudel J.L., Berrebi P. (1999) Microsatellites and artificial neural networks : tools to discriminate natural and hatcheries brown trout (*Salmo trutta fario*, L.) in Atlantic populations. *Ecological Modeling*, **120**, 313-324.
- Aurelle D., Berrebi P. (2001) Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta*, L.) populations from south western France: data from mitochondrial control region variability. *Molecular Ecology*, **10**, 1551-1561.
- Aurelle D., Cattaneo-Berrebi G., Berrebi P. (2002) . Natural and artificial secondary contact in brown trout (*Salmo trutta*, L.) of the French western Pyrenees assessed by allozymes and microsatellites. *Heredity*, **89**, 171-183.
- Aurelle D., Guillemaud T., Afonso P., Morato T., Wirtz P., Serrão Santos R., Cancela M.L. (2003) Genetic study of *Coris julis* (Osteichthyes, Perciformes, Labridae) evolutionary history and dispersal abilities. *Comptes Rendus Biologie*, **326**, 771-785. doi:10.1016/j.crv.2003.08.001
- Avise J.C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvards University Press, Cambridge.
- Ballard J.W.O., Whitlock M.C. (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, **13** (4), 729-744. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x
- Ballesteros E. (2006) Mediterranean coralligenous assemblages: a synthesis of present knowledge. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **44**, 123-195
- Bally M., Garrabou J. (2007) Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: a new case of emerging disease linked to climate change. *Global Change Biology*, **13**, 2078-2088. doi: 10.1111/j.1365-2486.2007.01423.x
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Bensch S., Åkesson M. (2005) Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology*, **14**, 2899-2914.
- Borsa P., Naciri M., Bahri L., Chikhi L., Garcia de Leon F.J., Kotoulas G., Bonhomme F. (1997) Zoogéographie infra-spécifique de la mer méditerranée: analyse des données génétiques populationnelles sur seize espèces atlanto-méditerranéennes (Poissons et Invertébrés). *Vie Milieu*, **47**, 295-305.
- Borsa P., Lemer S., Aurelle D. (2007) Patterns of lineage diversification in rabbitfishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, 427-435. doi:10.1016/j.ympev.2007.01.015.
- Calderón I., Garrabou J., Aurelle D. (2006) Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **336**, 184-197. doi:10.1016/j.jembe.2006.05.006
- Calderón I., Ortega N., Duran S., Becerro M., Pascual M., Turon X. (2007) Finding the relevant scale: clonality and genetic structure in a marine invertebrate (*Crambe crambe*, Porifera). *Molecular Ecology*, **16**, 1799-1810. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03276.x
- Calderón I., Giribet G., Turon X. (2008) Two markers and one history: phylogeography of the edible common sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Lusitanian region. *Marine Biology*, **154**, 137-151.
- Carpine C., Grasshof M. (1975) Les Octocoralliaires de la Méditerranée. *Bulletin de l'Institut Océanographique*, **71**, 1-140.
- Cavalli-Sforza L. L., Edwards A.W. (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.*, **19**, 233-257.
- Chapuis M.-P., Estoup A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, **24**(3), 621-631.
- Chenuil A., Féral J.-P., (2003) Sequences of mitochondrial DNA suggest that *Echinocardium cordatum* is a complex of several sympatric or hybridizing species. A pilot study. In J-P Féral et B. David [eds] *Echinoderm Research 2001, Proc. 6th Eur. Conf. Echinoderm*, Banyuls-sur-mer, France, Swets et Zeitlinger Publishers: Lisse, NL
- Colas B., Olivieri I., Riba M. (1997) *Centaurea corymbosa*, a cliff-dwelling species tottering on the brink of extinction: A demographic and genetic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**, 3471-3476.
- Cornuet J.M., Aulagnier S., Lek S., Franck P., Solignac M. (1996) Classifying individuals among infra-specific taxa using microsatellites data and neural networks. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Life sciences*, **319**, 1167-1177.
- Costantini F., Abbiati M. (2006) Development of microsatellite markers for the Mediterranean gorgonian coral *Corallium rubrum*. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 521-523.
- Costantini F., Fauvelot C., Abbiati M. (2007 a) Fine-scale genetic structuring in *Corallium rubrum*: evidence of inbreeding and limited effective larval dispersal. *Marine Ecology Progress Series*, **340**, 109-119.

- Costantini F., Fauvelot C., Abbiati M. (2007 b) Genetic structuring of the temperate gorgonian coral (*Corallium rubrum*) across the western Mediterranean Sea revealed by microsatellites and nuclear sequences. *Molecular Ecology*, **16**, 5168–5182
- Darwin C. (1859) *The origin of species*. Editions Wordsworth, Ware, UK. (texte de la première édition avec quelques ajouts)
- Dehollain C. (2004) Différenciation génétique entre espèces et populations du genre *Aplysina* (Démospone) en Méditerranée et proche Atlantique. Rapport de DEA de l'Université Pierre et Marie Curie.
- del Gaudio D., Fortunato G., Borriello M., Gili J.M., Buono P., Calcagno G., Salvatore F., Sacchetti L. (2005) Genetic Typing of *Corallium rubrum*. *Marine Biotechnology*, **6**, 511-515.
- Duran S., Palacín C., Becerro M.A., Turon X., Giribet G. (2004) Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology*, **13**, 3317-3328.
- Estoup A., Jarne P., Cornuet J.-M. (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, **11**, 1591–1604
- Evanno G., Regnault S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611-2620.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Féral J.-P. (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **268**, 121– 145
- Ferguson A. (1989) Genetic differences among brown trout, *Salmo trutta*, stocks and their importance for the conservation and management of the species. *Freshwater Biology*, **21**, 35-46.
- Fluxus Technology (2007) Network 4.2.0.1. www.fluxus-engineering.com
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294-299
- France S.C., Hoover L.L. (2002) DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiologia*, **471**, 149-155.
- Frankham R. (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation*, **126**, 131-140.
- Garcia-Marin J.L., Utter F.M., Pla C. (1999). Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity*, **82**, 46-56.
- Garrabou J., Perez T., Sartoretto S., Harmelin J.G. (2001) Mass mortality event in red coral *Corallium rubrum* populations in the Provence region (France, NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*, **217**, 263-272.
- Gienapp P., Teplitsky C., Alho J.S., Mills J.A., Merilä J. (2008) Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology*, **17**, 167-178.
- Giraudel J.L., Aurelle D., Lek S., Berrebi P. (2000) Application of the Self-Organizing Mapping and Fuzzy Clustering to microsatellite data: how to detect genetic structure in brown trout (*Salmo trutta*) populations. In: *Artificial Neuronal Networks*, Lek S. and Guégan J.F. eds. 187-202, Springer-Verlag Berlin.
- Gouyon P.H., Henry J.-P., Arnould J. (1997) *Les avatars du gène*. Editions Belin, Paris.
- Guillemaud T., Cancela M.L., Afonso P., Morato T., Santos R.S., Wirtz P. (2000) Molecular insights into the taxonomic status of *Coris atlantica* (Pisces: Labridae), *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **80**, 929–933.
- Hamilton K.E., Ferguson A., Taggart J.B., Tomasson T., Walker A., Fahy E. (1989) Post-glacial colonisation of brown trout, *Salmo trutta* L.: Ldh-5 as a phylogeographic marker locus. *Journal of Fish Biology*, **35**, 651-664.
- Hassan M., Harmelin-Vivien M., Bonhomme F. (2003) Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **291**, 219-232.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London Series B Biological Sciences*, **270**, 313–321
- Hedrick P.W. (1999) Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, **53** (2), 313-318
- Hemmer-Hansen J., Nielsen E.E., Grønkvær, Loeschke V. (2007) Evolutionary mechanisms shaping the genetic population structure of marine fishes; lessons from the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Molecular Ecology*, **16**, 3104-3118. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03367.x
- Hughes A.R., Inouye B.D., Johnson M.T., Underwood N., Vellend M. (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, **11**, 1-15.
- Hughes L. (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already. *Trends in Ecology and Evolution*, **15** (2), 56-61.

- Hughes T.P., Baird A.H., Bellwood D.R., Card M., Connolly S.R., Folke C., Grosberg, Hoegh-Guldberg O., Jackson R.J.B.C., Kleypas J., Lough J.M., Marshall P., Nyström M., Palumbi S.R., Pandolfi J.M., Rosen B., Roughgarden J. (2003) Climate Change, Human Impacts, and the Resilience of Coral Reefs. *Science*, **301**, 929-933.
- Jabin P.E., Lemesle V., Aurelle D. (2008) A continuous size-structured red coral growth model. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*, **18(11)**, 1927-1944.
- Jarne P., Lagoda P.J.L. (1996) Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11 (10)**, 424-429
- Kashi et King (2006) Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics*, **22 (5)**, 253-259. doi:10.1016/j.tig.2006.03.005
- Kassam D., Seki S., Horic M., Yamaoka K. (2006) Nuclear markers reveal that inter-lake cichlids' similar morphologies do not reflect similar genealogy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **40**, 383-388.
- Knowlton N. (1993) Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **24**, 189-216.
- Knowlton N. (2000) Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia*, **420**, 73-90.
- Kohavi R. (1995) A study of cross-validation and bootstrap for estimation and model selection. *Proceedings of the Fourteenth International Joint Conference on Artificial Intelligence*. Morgan Kaufmann Publishers Inc., 1137-1143.
- Kohonen T. (1995) *Self-Organizing Maps*. Springer-Verlag, Series in Information Sciences, **30**, Heidelberg.
- Lambert D., Rezsóhazy (2004) Comment les pattes viennent au serpent. Essai sur l'étonnante plasticité du vivant. Editions Flammarion (Nouvelle Bibliothèque Scientifique).
- Langella O. (2002) Populations, 1.2.28, CNRS UPR9034; <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- Lecointre G., Le Guyader H. (2001) *Classification phylogénétique du vivant*. Belin, Paris.
- Lenormand T. (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution*, **17(4)**, 183-189.
- Lemer S., Aurelle D., Vigliola L., Durand J.-D., Borsa P. (2007) Cytochrome *b* barcoding, molecular systematics, and geographic differentiation in rabbitfishes (Siganidae). *Comptes Rendus Biologie*, **330**, 86-94. doi:10.1016/j.crv.2006.09.002
- Lieutenant-Gosselin M., Bernatchez L. (2006) Local heterozygosity-fitness correlations with global positive effects on fitness in threespine stickleback. *Evolution*, **60(8)**, 1658-1668.
- Linares C., Doak D.F., Coma R., Diaz D., Zabala M. (2007) Life history and viability of a long-lived marine invertebrate: the octocoral *Paramuricea clavata*. *Ecology*, **88(4)**, 918-928.
- Madsen T.M. (2000) Réhabilitation de la truite marbrée (*Salmo marmoratus*) en Slovénie: analyse des caractéristiques génétiques et écologiques du mécanisme d'hybridation en situation de compétition. Thèse de l'Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc: 192 pp.
- Marschal C., Garrabou J., Harmelin J.-G., Pichon M. (2004) A new method for measuring growth and age in the precious red coral *Corallium rubrum* (L.). *Coral Reefs*, **23**, 423-432.
- Mastrorillo S., Lek S., Dauba F., Belaud, A. (1997) The use of artificial neural networks to predict the presence of small-bodied fish in river. *Freshwater Biology*, **38**, 237-246.
- McFadden C.S., France S.C., Sánchez J.A., Alderslade P. (2006) A molecular phylogenetic analysis of the Octocorallia (Cnidaria, Anthozoa) based on mitochondrial poterin-coding sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 513-527.
- Meyer C.P., Paulay G. (2005) DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, **3 (12)**, 2229-2238.
- Mileikovsky (1971) Types of larval development in marine bottom invertebrates, their distribution and ecological significance: a re-evaluation. *Marine Biology*, **10**, 193-213.
- Nei M. (2007) The new mutation theory of phenotypic evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **104 (30)**, 12235-12242.
- Nordborg M., Hu T.T., Ishino Y., Jhaveri J., Toomajian C., *et al.* (2005) The Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology*, **3 (7)** e196, 1289-1299. doi:10.1371/journal.pbio.0030196.
- Oddou-Muratorio S., Klein E.K. (2008) Comparing direct vs. indirect estimates of gene flow within a population of a scattered tree species. *Molecular Ecology*, **17**, 2743-2754.
- Patarnello T., Volckaert F.A.M.J, Castilho R. (2007) Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, **16**, 4426-4444.
- Perez T., Garrabou J., Sartoretto S., Harmelin J.G., Francour P., Vacelet J. (2000) Mortalité massive d'invertébrés marins : un événement sans précédent en Méditerranée nord-occidentale. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Sciences de la Vie*, **323**, 853-865.
- Pont-Kingdon G.A., Okada N.A., Macfarlane J.L., Beagley C.T., Wolstenholme D.R., Cavalier-Smith T., Clark-Walker G.D. (1995) A coral mitochondrial mutS gene. *Nature*, **375**, 109-111.
- Presa P., Pardo B.G., Martinez P., Bernatchez L. (2002) Phylogeographic Congruence Between mtDNA and rDNA ITS Markers in Brown Trout. *Molecular Biology and Evolution*, **19(12)**, 2161-2175.

- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Ramos-Onsins S.E., Rozas J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, **19(12)**, 2092-2100.
- Romano J.C., Bensoussan N., Younes W.A.N., Arlhac D., (2000) Anomalie thermique dans les eaux du golfe de Marseille durant l'été 1999. Une explication partielle de la mortalité d'invertébrés fixés? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Sciences de la Vie*, **323**, 415-427.
- Rousset, F. (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Ressources*, **8**, 103-106.
- Ruzzante D.E., Taggart C.T., Cook D. (1999) A review of the evidence for genetic structure of cod (*Gadus morhua*) populations in the NW Atlantic and population affinities of larval cod off Newfoundland and the Gulf of St. Lawrence. *Fisheries Research*, **43**, 79-97.
- Ruzzante D.E., Mariani S., Bekkevold D., André C., Mosegaard H., Clausen L.A.W., Dahlgren T.G., Hutchinson W.F., Hatfield E.M.C., Torstensen E., Brigham J., Simmonds E.J., Laikre L., Larsson L.C., Stet R.J.M., Ryman N., Carvalho G.R. (2006) Biocomplexity in a highly migratory pelagic marine fish, Atlantic herring. *Proceedings of the Royal Society London Series B Biological Sciences*, **273**, 1459-1464.
- Ryman N., Palm S., André C., Carvalho G.R., Dahlgren T.G., Jorde P.E., Laikre L., Larsson L.C., Palmé A., Ruzzante D.E. (2006) Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Molecular Ecology*, **15 (8)**, 2031-2045.
- Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Santangelo G, Bramanti L, Iannelli M (2007) Population dynamics and conservation biology of the over-exploited Mediterranean red coral. *Journal of Theoretical Biology*, **244(3)**, 416-423.
- Stephens M., Smith N.J., Donnelly P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, **68**, 978-989.
- Templeton A.R. (2007) Genetics and recent human evolution. *Evolution* **61 (7)**, 1507-1519. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00164.x
- Torrents O., Tambutté E., Caminiti N., Garrabou J. (2008) Upper thermal thresholds of shallow vs. deep populations of the precious Mediterranean red coral *Corallium rubrum* (L.): Assessing the potential effects of warming in the NW Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **357**, 7-19. doi:10.1016/j.jembe.2007.12.006
- Torrents O., Garrabou J., Marschal C., Harmelin J.G. (2005) Age and size at first reproduction in the commercially exploited red coral *Corallium rubrum* (L.) in the Marseilles area (France, NW Mediterranean). *Biological Conservation*, **121**, 391-397.
- Turner G.F. (2007) Adaptive radiation of cichlid fish. *Current Biology*, **17**, R827-R831
- Vollmer S.V., Palumbi S.R. (2004) Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics. *Molecular Ecology*, **13 (9)**, 2763-2772.
- Vighi M (1972) Etude sur la reproduction du *Corallium rubrum* (L). *Vie Milieu*, **23**, 21-32.
- Weinberg S., Weinberg F. (1979) The life cycle of a gorgonian : *Eunicella singularis* (Esper, 1794). *Bijdragen tot de Dierkunde*, **48 (2)**, 127-141.
- Zane L, Bargelloni L, Partanello L. (2002) Strategies for microsatellites isolation: a review. *Molecular Ecology*, **11**, 1-16.
- Zibrowius H., Monteiro Marques V., Grasshoff M. (1984) La répartition du *Corallium rubrum* dans l'Atlantique (Cnidaria : Anthozoa : Gorgonaria). *Téthys*, **11(2)**, 163-170.

Publications dans des revues à comité de lecture

(I.F. : Facteurs d'Impact arrondis des revues correspondantes)

- Aurelle D., Berrebi P. (1998)** Microsatellite markers and management of brown trout *Salmo trutta fario* populations in southwestern France. *Génétique, Sélection, Evolution*. **30 (suppl. 1)**, S75-S90.
I.F.: 1,8
- Aurelle D., Lek S., Giraudel J.L., Berrebi P. (1999)** Microsatellites and artificial neural networks : tools to discriminate natural and hatcheries brown trout (*Salmo trutta fario*, L.) in Atlantic populations. *Ecological Modelling*, **120**, 313-324.
I.F.: 1,9
- Aurelle D., Berrebi P. (2001)** Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta*, L.) populations from southwestern France: data from mitochondrial control region variability. *Molecular Ecology*, **10**, 1551-1561.
I.F.: 4,8
- Aurelle D., Cattaneo-Berrebi G., Berrebi P. (2002)** . Natural and artificial secondary contact in brown trout (*Salmo trutta*, L.) of the French western Pyrenees assessed by allozymes and microsatellites. *Heredity*, **89**, 171-183.
I.F.: 2,9
- Aurelle D., Guillemaud T., Afonso P., Morato T., Wirtz P., Serrão Santos R., Cancela M.L. (2003)** Genetic study of *Coris julis* (Osteichthyes, Perciformes, Labridae) evolutionary history and dispersal abilities. *Comptes Rendus Biologie*, **326**, 771-785. doi:10.1016/j.crvi.2003.08.001 **I.F.: 1,5**
- Calderón I., Garrabou J., Aurelle D. (2006)** Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **336**, 184-197. doi:10.1016/j.jembe.2006.05.006. **I.F.: 1,9**
- Lemer S., Aurelle D., Vigliola L., Durand J.-D., Borsa P. (2007)** Cytochrome *b* barcoding, molecular systematics, and geographic differentiation in rabbitfishes (Siganidae). *Comptes Rendus Biologie*, **330**, 86-94. doi:10.1016/j.crvi.2006.09.002 **I.F.: 1,5**
- Borsa P., Lemer S., Aurelle D. (2007)** Patterns of lineage diversification in rabbitfishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **44**, 427-435. doi:10.1016/j.ympev.2007.01.015. **I.F.: 3,5**
- Aurelle D., Barthelemy R., Quignard J.-P., Trabelsi M., Faure E. (2008)** Molecular phylogeny of Mugilidae (Teleostei: Perciformes). *The Open Marine Biology Journal*, **2**, 29-37. **(nouvelle revue)**
- Jabin P.E., Lemesle V., Aurelle D. (sous presse, 2008)** A continuous size-structured red coral growth model. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*. **I.F.: 1,8**
- Trabelsi M., Aurelle D., Bouriga N., Quignard J.-P., Casanova J.-P. Faure E. (2008)** Identification of juvenile of grey mullet species (Teleostei: Perciformes) from Kuriat Islands (Tunisia) and evidence of gene flow between Atlantic and Mediterranean *Liza aurata*. *Cahiers de Biologie Marine*, **49**, 269-276.
I.F.: 0,5

Actes de congrès ou chapitres d'ouvrages

- Aurelle D., Giraudel J.L., Lek S., Berrebi P. (1998)** Utilisation des réseaux de neurones multicouches pour classifier des populations de truites à partir des données génétiques. In: *6èmes rencontres de la Société Francophone de Classification* (ENSA Montpellier, ed.), Montpellier, pp. 11-14.
- Giraudel J.L., Aurelle D., Lek S., Berrebi P. (2000)** Application of the Self-Organizing Mapping and Fuzzy Clustering to microsatellite data: how to detect genetic structure in brown trout (*Salmo trutta*) populations. In: *Artificial Neuronal Networks*, Lek S. and Guégan J.F. eds. 187-202, Springer-Verlag Berlin.

Communications scientifiques

- Aurelle D., Berrebi P. (1997)** Genetic differentiation of Atlantic brown trout (*Salmo trutta*) in south western France : microsatellites data. *Oral communication at the 9th International Congress of European Ichthyologists (CEI-9) "Fish biodiversity", Trieste 24-30 august.*
- Aurelle D., Berrebi P. (1997)** Apport des marqueurs biochimiques dans la gestion de la truite commune (*Salmo trutta fario* L.). *Oral communication at the BRG meeting "Méthodologies de gestion et de conservation des ressources génétiques", Lille, 8-10 october.*
- Aurelle D., Giraudel J.L., Lek S., Berrebi P. (1998)** Utilisation des réseaux de neurones multicouches pour classifier des populations de truites à partir des données génétiques. *Oral communication at the 6th meeting of the Société Francophone de Classification, Montpellier, 21-23 september.*
- Giraudel J.L., Aurelle D., Lek S., Berrebi P. (1998)** Application of the Self-organizing map method to microsatellite data : how to detect genetic structure in brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Poster at the International workshop on applications of artificial neural networks to ecological modeling, Toulouse, 14-17 december.*
- Aurelle D., Lek S., Berrebi P., Giraudel J.L. (1998)** Microsatellites and artificial neural networks : tools to discriminate natural and hatcheries brown trout (*Salmo trutta*) in atlantic populations. *Oral communication at the International workshop on applications of artificial neural networks to ecological modeling, Toulouse, 14-17 december.*
- Chevaldonné P., Lejeusne C., Pillon Y., Dehollain C., Lecroisey C., Rocher C. Aurelle D., Chenuil A., Pérez T., Boury-Esnault N., Vacelet J. (2006)** Molecular phylogeography of Mediterranean and Eastern Atlantic sponges of the genus *Aplysina*. *Poster at the 7th International Sponge Symposium, Buzios, Rio de Janeiro, Brazil, 7-13 May 2006.*
- Garrabou J., Aurelle D., Bally M., Bensoussan N., Bianchimani O., Drap P., Graille R., Harmelin J.-G., Marschal C., Ledoux J.-B., Torrents O., Vacelet J. (2006)** Conservation and management needs of populations of a long-lived temperate coral under the effects of harvesting and climate change. *Poster at the 20th annual meeting of the Society for Conservation Biology, San José, USA, 24-28 june 2006.*
- Ledoux J.-B., Aurelle D., Garrabou J., Marschal C., Féral J.-P. (2006)** Experimental approach of the potential response of a long-lived invertebrate species facing the climate change: the case of the Mediterranean red coral *Corallium rubrum* (L., 1758). *Poster at the 41st European Marine Biology Symposium, Cork, Ireland, 4-8 september 2006.*

Séminaires

- Séminaire au laboratoire Génome et Populations sur les réseaux de neurones artificiels et leur utilisation en génétique des populations
- Séminaire au laboratoire Génome et Populations sur la diversité génétique de l'ADN mitochondrial des populations de truites (*Salmo trutta*) dans le sud-est de la France
- Séminaire au laboratoire DIMAR sur l'étude génétique des populations de girelle (*Coris julis*)
- Séminaire au laboratoire DIMAR sur la truite (*Salmo trutta*) comme modèle d'étude de la différenciation et l'adaptation au niveau intra-spécifique
- Présentation dans le cadre du programme Medchange sur l'étude génétique des populations de corail rouge (*Corallium rubrum*)
- Séminaires au laboratoire DIMAR de compte rendu de formation : utilisation de l'analyseur génétique ABI 3130
- Séminaires au laboratoire DIMAR de compte rendu de formation : la PCR en temps réel
- Séminaire du groupe MAGMA (mathématiques appliquées à la génomique : modèles et algorithmes ; Marseille) : introduction à la génétique des populations