

ÉTUDE DE LA STRUCTURE GÉNÉTIQUE DE LA GORGONE
EUNICELLA CAVOLINII EN MÉDITERRANÉE :
CONNECTIVITE ET ADAPTATION LOCALE EN ENVIRONNEMENT HETEROGENE.

Pachka HAMMAMI, Master Biodiversité, Écologie, Évolution (UM2), UE : GMBE210,
n° étudiant : 20115043.

Responsable de stage : Mr Didier AURELLE, Maître de conférence, UMR 7263 IMBE
(Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale), équipe IDEA
(Interactions, Diversité, Évolution, Adaptation).



Sommaire

INTRODUCTION	PAGE 1
MATÉRIEL ET MÉTHODES	PAGE 3
MODÈLE BIOLOGIQUE : LA GORGONE JAUNE DE MÉDITERRANÉE <i>EUNICELLA CAVOLINII</i>	PAGE 3
ÉCHANTILLONNAGE	PAGE 3
ANALYSES GÉNÉTIQUES	PAGE 3
MARQUEURS MICROSATELLITES	PAGE 4
DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS	PAGE 4
STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS	PAGE 5
RÉSULTATS	PAGE 6
MICROSATELLITES : CARACTÉRISTIQUES ET VARIABILITÉ DES LOCUS	PAGE 6
ÉCART À L'ÉQUILIBRE DE HARDY-WEINBERG ET DIVERSITÉ INTRA-POPULATIONS	PAGE 6
ANALYSE DE LA STRUCTURE DES POPULATIONS	PAGE 7
DISCUSSION	PAGE 7
VARIABILITÉ DES MARQUEURS MICROSATELLITES ET DES POPULATIONS D' <i>EUNICELLA CAVOLINII</i>	PAGE 7
CONNECTIVITÉ – FLUX DE GÈNES	PAGE 8
ÉVOLUTION DE L'ADAPTATION LOCALE EN MILIEU MARIN ET PLUS PARTICULIÈREMENT CHEZ LES GORGONAIRES DE MÉDITERRANÉE.	PAGE 10
CONCLUSION	PAGE 10
REMERCIEMENTS	
RÉFÉRENCES	
ANNEXES	
PROTOCOLES	
MISE AU POINT DU MARQUEUR Mic56	
EXPÉRIENCE DE THERMOTOLÉRANCE SUR <i>EUNICELLA CAVOLINII</i>	

Étudiante : Pachka HAMAMI, Responsable : Didier AURELLE

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

INTRODUCTION

Les écosystèmes marins côtiers présentent une grande importance à la fois écologique et socio-économique (Costanza *et al.*, 1997 ; Harley *et al.*, 2006). Aujourd'hui, les activités humaines soumettent, directement et indirectement, ces écosystèmes à de fortes pressions aussi bien locales que globales. Les perturbations d'origine anthropique affectent lourdement de nombreuses espèces et peuvent aboutir à des extinctions locales (Halpern *et al.*, 2008 ; Jackson 2008). De plus, le changement climatique actuel constitue une pression supplémentaire qui agit en interaction avec les modifications d'origine anthropique et ses effets sont déjà perceptibles en milieu marin à différents niveaux d'intégration : écosystèmes, communautés, populations (Hughes *et al.*, 2003 ; Lejeune *et al.*, 2010 ; Harley *et al.*, 2006).

La réponse des organismes à ces variations environnementales doit elle même être envisagée à différents niveaux (Gienapp *et al.*, 2008; Hendry *et al.*, 2008), mais aussi selon différentes dimensions, spatiale et temporelle. Suite à une variation environnementale temporelle, la réponse peut se faire par acclimatation, conduisant éventuellement à l'expression de traits particuliers en réponse aux nouvelles conditions environnementales (plasticité phénotypique ; Hansen *et al.*, 2012). À l'échelle des populations, deux types de réponses peuvent se mettre en place : la dispersion vers un milieu aux conditions favorables et la sélection génétique. Dans ce dernier cas, l'adaptation génétique dépendra de l'interaction entre sélection, migration et dérive génétique. L'impact d'une perturbation dépendra aussi de la variabilité de réponse d'une espèce sur son aire de répartition. Ainsi, la sélection peut tendre vers une adaptation aux conditions environnementales locales et donc induire une variabilité de réponse aux fluctuations environnementales. Mais cette adaptation locale peut être limitée par les flux de gènes suite à l'afflux d'allèles localement « mal-adaptés » (Lenormand, 2002). La migration peut également atténuer les effets de la dérive dans des populations marginales et favoriser leur maintien (Alleaume-Benharira *et al.*, 2006). Par ailleurs, la connectivité entre populations peut aussi nous renseigner sur les capacités de recolonisation en cas d'extinction locale et elle joue par conséquent un rôle essentiel dans le maintien d'une métapopulation (Botsford *et al.*, 2009). La compréhension du fonctionnement d'une métapopulation nécessite donc de pouvoir estimer les échanges entre populations et d'évaluer les pressions de sélection locales.

Notre étude est focalisée sur la gorgone jaune, *Eunicella cavolinii* (Koch, 1887), une

espèce endémique de Méditerranée. Comme d'autres gorgonaires, elle présente un important rôle structurant dans les écosystèmes benthiques méditerranéens (Ballesteros, 2006). Les gorgones présentent aussi un attrait majeur pour le tourisme et la plongée. *E. cavolinii* est présente dans des zones précoraligènes et coralligènes, entre 5 et 150 m de profondeur (Harmelin et Bassemayousse, 2008). Elle est ainsi soumise à des régimes thermiques très contrastés, ceci pose donc la question des modalités d'adaptation de cette espèce à des conditions écologiques variables dans l'espace mais aussi dans le temps. En effet, en 1999, 2003 et 2006, plusieurs espèces de métazoaires sessiles marins, dont la gorgone jaune, ont été affectées par des événements de mortalités massives, liés à des anomalies thermiques positives (Garrabou *et al.*, 2009). De tels événements sont susceptibles de se reproduire plus fréquemment avec le changement climatique en cours et la réponse des populations de gorgones dépendra de leurs capacités d'adaptation à l'échelle des individus (plasticité) et des populations (adaptation génétique). Une importante variabilité de réponse au stress thermique a ainsi été observée entre populations confrontées à différents niveaux de stress, mais aussi au sein même des populations (Crisci *et al.*, 2011). Afin de mieux appréhender le devenir de la gorgone jaune dans le cadre du changement climatique, il est donc important d'étudier d'une part la connectivité entre populations et d'autre part la potentielle adaptation locale de cette espèce à différents régimes thermiques.

Le but principal de cette étude est donc de comprendre les relations entre la distribution géographique et bathymétrique, et la structure génétique des populations de gorgones jaunes. La structure génétique de cette espèce n'a jamais été étudiée, notamment par manque de marqueurs adaptés (Calderón *et al.*, 2006). L'étude est basée sur cinq marqueurs microsatellites (Mol Ecol Res Prim Dev Consortium, 2010 ; D. Aurelle com. Pers) et elle couvre 11 populations échantillonnées dans différents sites de la région marseillaise et 2 échantillons de populations plus éloignées (à Porquerolles et en Corse). Cette étude vient en complément d'une analyse des capacités adaptatives de cette espèce qui va estimer la variabilité de réponse au stress thermique en fonction de la profondeur aux niveaux phénotypique et transcriptomique (thèse d'I. Pivotto, IMBE). Afin de mieux comprendre le rôle de la profondeur dans la structuration génétique neutre, nous allons analyser des échantillons issus de différents sites et profondeurs (avec des comparaisons entre 20 m et 40 m pour trois sites). Les deux principaux objectifs de cette étude sont : (1) d'estimer la

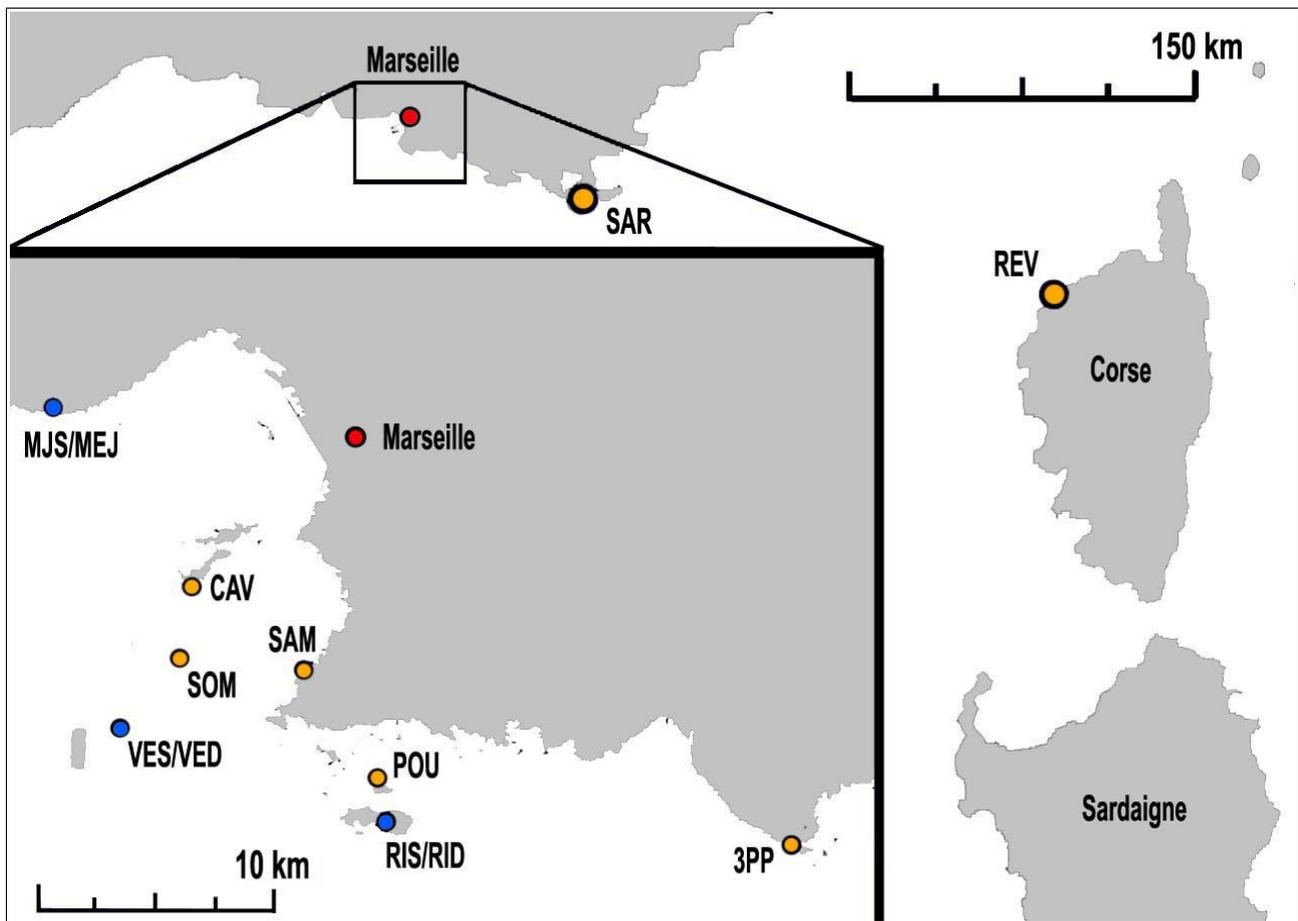


Fig. 1 Carte d'échantillonnage (points jaunes et bleu) de la gorgone jaune *E. cavolinii*. Les sites Méjan, Veyron, et Riou rassemblent deux échantillonnages à des profondeurs différentes (20 m et 40 m ; points en bleu). Les codes d'identification des populations ainsi que leur localisation précise sont détaillées dans le tableau 1.

Tableau 1 Échantillons de *E. cavolinii* : Région – Site échantillonné, Code d'identification, Coordonnées GPS, Profondeur d'échantillonnage, Nombre de colonies échantillonnées sur le site (N), Date d'échantillonnage.

Région – Site échantillonné	Code	Coordonnées GPS	Profondeur	N	Date de prélèvement
Marseille – Saména	SAM	43° 13.780'N 5° 20.880'E	10m	34	16/01/12
Calanques - Pouard sur l'Île Plane	POU	43° 11.340'N 5° 23.130'E	15-25m	30	14/02/12
Calanques – Riou	RIS	43° 10.360'N 5° 23.420'E	20m	32	15/03/12
Calanques – Riou	RID	43° 10.360'N 5° 23.420'E	40m	31	15/03/12
Frioul - Cap Caveau	CAV	43° 15.630'N 5° 17.390'E	25m	29	01/02/12
Veyron	VES	43° 12.414'N 5° 15.176'E	20m	30	24/11/11
Veyron	VED	43° 12.414'N 5° 15.176'E	40m	30	24/11/11
Côte Bleue - Méjean	MJS	43° 19.700'N 5° 13.480'E	18-20m	33	16/03/12
Côte Bleue - Méjean	MEJ	43° 19.700'N 5° 13.480'E	30-40m	31	24/02/12
Somlit	SOM	43° 14.050'N 5° 17.050'E	58m	31	28/11/11
La Ciotat – Grotte 3PP	3PP	43° 9.795'N 5° 36.000'E	15m	30	17/02/12
Porquerolles – Est du Sec de Sarraniers	SAR	42° 59,272'N 6° 17,503'E	40m	32	17/11/11
Corse – Pointe de la Revellatta	REV	42° 35.080'N 8° 43.680'E	15-20m	34	01/09/11

connectivité entre les différentes populations de gorgone jaune en Méditerranée nord-occidentale afin d'évaluer ses capacités de dispersions, (2) d'évaluer le potentiel d'adaptation locale des populations étudiées en lien avec sa structuration génétique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MODÈLE BIOLOGIQUE : LA GORGONE JAUNE DE MÉDITERRANÉE EUNICELLA CAVOLINII

La gorgone jaune, *E. cavolinii*, est un cnidaire octocoralliaire de la famille des Plexauridés (famille qui serait cependant paraphylétique ; McFadden *et al.*, 2006). Sa distribution est très fragmentée. Commune sur les parois verticales de Méditerranée occidentale, elle est absente de certaines régions (sur la côte Vermeille en Catalogne par exemple). Ses colonies se ramifient généralement dans un seul plan, qui fait face au courant dominant pour que les polypes puissent piéger les particules alimentaires vivantes ou inertes. Comme les autres gorgones, elle fournit une grande diversité d'habitats, par exemple pour les épibiontes (Harmelin et Bassemayousse, 2008 ; Carpine et Grasshoff, 1975).

E. cavolinii est une espèce coloniale et gonochorique avec une fécondation interne. La larve lécithotrophe se métamorphose généralement très rapidement après avoir été relâchée ; chez *Eunicella singularis* la phase larvaire libre durerait de quelques heures à quelques jours (Weinberg and Weinberg, 1979). Cependant, ces données ont été obtenues à partir d'observations en aquarium, et les données génétiques de notre étude devraient permettre de préciser les capacités de dispersion de la gorgone jaune dans la nature.

ÉCHANTILLONNAGE

Des échantillons de 4 à 5 cm ont été prélevés par le service plongée de l'Institut Pythéas (F. Zuberer, L. Vanbostal, B. De Ligondes), puis conservés dans de l'éthanol à 95 % au congélateur. Nous avons analysé des colonies provenant de dix sites en Méditerranée occidentale : huit sites se situent dans la baie de Marseille, un à Porquerolles et un au nord de la Corse (Fig. 1 ; Tableau 1). Une colonie sera, ici, considérée comme un individu au sens génétique (voir Ledoux, 2010 pour une démonstration chez le corail rouge, *Corallium rubrum*). Sur chaque site entre 29 et 35 colonies ont été échantillonnées sur les années 2011 et 2012 et pour trois sites, deux profondeurs ont été étudiées (Tableau 1).

ANALYSES GÉNÉTIQUES

Des fragments de colonie de 1 à 2 cm de longueur ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN. Les fragments ont été broyés à l'aide d'un TissueLyser II (Qiagen) ou manuellement.

Tableau 2 Microsatellites : Séquences des amorces (* fluorescente) ; motif et taille du fragment amplifié ; Nombre d'allèles moyen par population (N) ; Température d'hybridation en PCR (T) ; Fluorochrome associé ; origine.

Microsatellite	Amorces (5'-3')	Motif répété	Taille (pb)	N	T	Fluorochrome	Isolé à partir de	Isolé par
S14	TTGAAGGTGTGAACAACACTACGG* CTGGCTGGCTGTTGCTG	(AAC) ₁₇ interrompu	249	8,3	64°C	Rouge / PET	<i>E. singularis</i>	Catanéo <i>et al.</i>
C21	TGGGATGTCAAGTGGTTTTCAAG* CCGGTTTCAGGTTTCATGCC	(AAT) ₁₀	196	5,5	55°C	Bleu / FAM	<i>E. cavolinii</i>	Catanéo <i>et al.</i>
C30	TCAGCCCGAGTTGTTGAGGCA* CGTAGCACCATAGTACCG	(ATGT) ₅	188	3,8	62°C	Jaune / NED	<i>E. cavolinii</i>	Catanéo <i>et al.</i>
C40	AGATGAGAAAGGACGGTCGG* CACCAGCAACAACAACACTGC	(GTT/GCT) ₂₄ interrompu	285	2,3	60°C	Jaune / NED	<i>E. cavolinii</i>	Catanéo <i>et al.</i>
EF1	GCAACATCGAATAAATTGGTTTTCA* CCACAAATAGAGCTTTTTGCTATC	insertion/délétion	258	2,4	45°C	Bleu / FAM	<i>E. cavolinii</i>	Didier Aurelle

L'ADN a été extrait à l'aide de kits QIAamp® DNA Mini Kit (« Tissue Protocol » selon les recommandations du fournisseur, QIAGEN) ou à l'aide d'une extraction aux sels (Protocoles en annexe 1). Cette dernière méthode fournit à moindre coût des résultats satisfaisants pour les analyses microsatellites mais avec des solutions généralement moins « propres ». Dans les deux cas, l'ADN extrait a été conservé à -20°C.

MARQUEURS MICROSATELLITES

Les microsatellites sont des séquences d'ADN caractérisées par la répétition d'un motif de un à cinq nucléotides. Leur niveau de polymorphisme et leur hérédité mendélienne en font des marqueurs bien adaptés à des études de génétique des populations (Jarne et Lagoda, 1996). Cinq locus microsatellites ont été utilisés ici. Les locus S14, C21, C30 et C40 ont été développés pour l'étude de la gorgone *E. singularis* mais à partir de séquences d'*E. cavolinii* pour les locus notés C (Mol Ecol Res Prim Dev Consortium, 2010). Le dernier locus, EF1, correspond à un intron du gène codant pour le facteur d'élongation 1 pour lequel un polymorphisme de longueur a été observé (D. Aurelle, com. pers.). Ce polymorphisme de longueur est lié à la présence d'insertions – délétions (indels) de plus ou moins grande taille et de répétitions d'un seul nucléotide. Un autre microsatellite situé dans un intron (Mic56 ; issu du locus 56 de Chenuil *et al.*, 2010) a été testé lors de ce stage, mais il n'a pas pu être utilisé en routine. Les caractéristiques des locus utilisés sont présentées dans le tableau 2. Les amplifications PCR ont été réalisées à l'aide d'un Thermocycleur Eppendorf avec 1 µL d'ADN total dans un volume final de 10 µL (voir protocole en annexe 1).

Les produits de PCR ont été analysés par migration sur un « Genetic Analyser ABI3130 » (Applied Biosystems). Les génotypes sont déterminés en utilisant le programme GeneMapper® Software Version 4.0.

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS

Le logiciel GENETIX version 4.03 (Belkhir *et al.*, 2004) a été utilisé pour calculer le nombre d'allèles total et par populations, les hétérozygoties observées (H_o) et attendues non biaisées ($H_{e,n.b.}$, Nei, 1978). Les problèmes potentiels de lecture liés à la perte d'allèles de grande taille, aux pics surnuméraires ou à la présence d'allèles nuls ont été évalués à l'aide du logiciel MicroChecker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Les fréquences d'allèles nuls ont été estimées pour chaque échantillon et chaque locus par l'algorithme espérance-maximisation (EM, Dempster *et al.*, 1977) à l'aide du logiciel FreeNA (Chapuis et Estoup, 2007). GENETIX

Tableau 3 Paramètres de polymorphisme : Ho : hétérozygotie observée ; He_{n.b.} : Hexp attendue sous l'hypothèse d'équilibre de Hardy-Weinberg corrigée pour le biais d'échantillonnage (Nei, 1967) ; f : estimateur du F_{IS} (Weir & Cockerham 1984) ; N : nombre moyen d'allèles par locus.
 * valeurs significatives sans correction FDR ; *** valeurs significatives après correction FDR au seuil de 5% ; gras : valeurs d'hétérozygotie minimale et maximale par locus.

		ECHANTILLON (POPULATION)													GLOBAL (METAPOPOPULATION)		
LOCUS		3PP	CAV	MEJ	MJS	POU	REV	RID	RIS	SAM	SAR	SOM	VED	VES	Moyenne	Valeur min	Valeur max
C21	Hen,b,	0,73	0,63	0,68	0,67	0,70	0,54	0,66	0,62	0,55	0,67	0,57	0,66	0,64	0,64	0,54	0,73
	Ho	0,70	0,48	0,65	0,82	0,71	0,46	0,65	0,69	0,58	0,70	0,53	0,63	0,67	0,63	0,46	0,82
	f	0,04	0,24*	0,05	-0,23	-0,01	0,16	0,03	-0,10	-0,05	-0,04	0,07	0,03	-0,05	0,01	-0,23	0,16
S14	Hen,b,	0,72	0,83	0,86	0,85	0,86	0,86	0,80	0,87	0,63	0,82	0,77	0,87	0,85	0,81	0,63	0,87
	Ho	0,16	0,54	0,72	0,69	0,38	0,54	0,76	0,59	0,55	0,56	0,52	0,70	0,69	0,57	0,16	0,76
	f	0,78***	0,36***	0,16	0,19*	0,57***	0,37***	0,06	0,32***	0,13	0,32***	0,33*	0,20***	0,19*	0,29***	0,06	0,16
EF1	Hen,b,	0,12	0,32	0,06	0,15	0,31	0,28	0,10	0,06	0,20	0,00	0,11	0,04	0,07	0,14	0,00	0,32
	Ho	0,13	0,24	0,06	0,12	0,18	0,32	0,10	0,06	0,22	0,00	0,11	0,04	0,07	0,13	0,00	0,32
	f	-0,05	0,25	-0,02	0,17	0,43	-0,18	-0,02	-0,02	-0,11	---	-0,03	---	-0,02	0,04	-0,18	0,43
C40	Hen,b,	0,66	0,53	0,60	0,57	0,66	0,50	0,69	0,65	0,63	0,41	0,51	0,57	0,52	0,58	0,41	0,69
	Ho	0,50	0,66	0,55	0,58	0,44	0,54	0,81	0,56	0,55	0,33	0,68	0,66	0,62	0,57	0,33	0,81
	f	0,24*	-0,24	0,09	-0,01	0,34*	-0,08	-0,18	0,14	0,14	0,19	-0,33	-0,15	-0,20	-0,01	-0,33	0,19
C30	Hen,b,	0,13	0,19	0,06	0,06	0,04	0,54	0,18	0,15	0,17	0,12	0,30	0,31	0,19	0,19	0,04	0,54
	Ho	0,13	0,21	0,06	0,06	0,04	0,46	0,19	0,16	0,12	0,13	0,35	0,17	0,14	0,17	0,04	0,46
	f	-0,05	-0,08	-0,02	-0,02	---	0,16	-0,09	-0,07	0,28	-0,04	-0,20	0,45***	0,27	0,09	-0,20	0,28
Multilocus	Hen,b,	0,47	0,50	0,45	0,46	0,51	0,55	0,49	0,47	0,43	0,41	0,45	0,49	0,45	0,47	0,41	0,55
	Ho	0,32	0,42	0,41	0,45	0,35	0,46	0,50	0,41	0,40	0,34	0,44	0,44	0,44	0,42	0,32	0,50
	f	0,31***	0,15***	0,01*	0,01	0,32***	0,15***	-0,03	0,12***	0,08	0,15***	0,03	0,10***	0,04	0,02	-0,03	0,08
	N	4,20	5,00	4,80	5,40	4,00	4,60	5,20	4,20	3,60	4,40	4,20	4,60	4,00	4,48	3,60	5,40

a été utilisé pour tester l'hypothèse nulle d'équilibre de liaison pour chaque paire de locus par permutations (n=1000).

STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS

L'écart à la panmixie a été testé pour chaque échantillon en utilisant une procédure de test exact (Raymond et Rousset, 1995) implémentée dans GENEPOP 4.1.4 (Rousset, 2008) avec les paramètres par défaut. L'écart à la panmixie a été estimé à partir de l'estimateur f du F_{IS} (Weir et Cockerham, 1984 ; Wright, 1965) calculé pour chaque échantillon en utilisant GENEPOP. La différenciation globale et par paire entre les échantillons a été quantifiée avec l'estimateur θ du F_{ST} (Weir et Cockerham, 1984 ; Wright, 1965) dans GENEPOP. Les différenciations géniques entre les échantillons ont été testées avec un test exact de Fisher tel que décrit dans Raymond et Rousset (1995) avec les paramètres par défaut de GENEPOP. La différenciation entre populations a également été testée par permutations dans GENETIX (n=1000). Le logiciel FreeNA a été utilisé pour estimer le F_{ST} non biaisé pour les allèles nuls (n=1000) et l'intervalle de confiance a été estimé à partir de 1 000 bootstraps.

Le modèle d'isolement par la distance (IBD) a été analysé en suivant la méthode de Rousset (1997). Les distances géographiques ont été mesurées sur GOOGLE EARTH 6.2.2.6613 (<http://www.google.fr/intl/fr/earth/index.html>) en prenant le plus court trajet par la mer entre deux populations.

Le paramètre $[F_{ST} / (1-F_{ST})]$ a été comparé avec le logarithme de la distance géographique $\ln(d)$ (Rousset 1997) en utilisant le programme en ligne IBDWebService 3.16 (Jensen *et al.*, 2005). L'intervalle de confiance à 95% (CI) de la droite de régression a été obtenu en utilisant la procédure de 'bootstrap' non paramétrique (n=1000 ; DiCiccio et Efron 1996; Leblois *et al.*, 2003). La significativité de la corrélation entre les deux matrices de distance (géographique et génétique) a été testée en utilisant un test de Mantel (1967) (n = 1000). Une analyse préliminaire de regroupements génétiques a été réalisée avec le logiciel STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000) en utilisant un modèle avec ou sans admixture. La période de « burnin » a été fixée à 10 000 itérations et la durée de l'analyse à 100 000 itérations. Le nombre de groupe considéré variait de 1 à 14 (nombre d'échantillons +1).

Dans le cas de tests multiples, la significativité a été corrigée par la procédure de Benjamini and Hochberg au seuil de 5% (« false discovery rate », FDR ; 1995).

Tableau 4 Estimation des fréquences d'allèles nuls par l'algorithme EM (Dempster, Laird and Rubin, 1977) ; en gras : locus par population pour lesquels MicroChecker a détecté la présence d'allèles nuls

Locus	Populations													Moyenne
	3PP	CAV	MEJ	MJS	POU	REV	RID	RIS	SAM	SAR	SOM	VED	VES	
C21	0,00	0,09	0,01	0,00	0,04	0,06	0,04	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02
S14	0,32	0,15	0,06	0,07	0,25	0,17	0,00	0,15	0,05	0,14	0,13	0,09	0,08	0,13
EF1	0,00	0,07	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
C40	0,09	0,00	0,04	0,00	0,11	0,01	0,00	0,06	0,04	0,05	0,00	0,00	0,00	0,03
C30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,13	0,07	0,02
Moyenne	0,08	0,06	0,02	0,01	0,10	0,05	0,01	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04

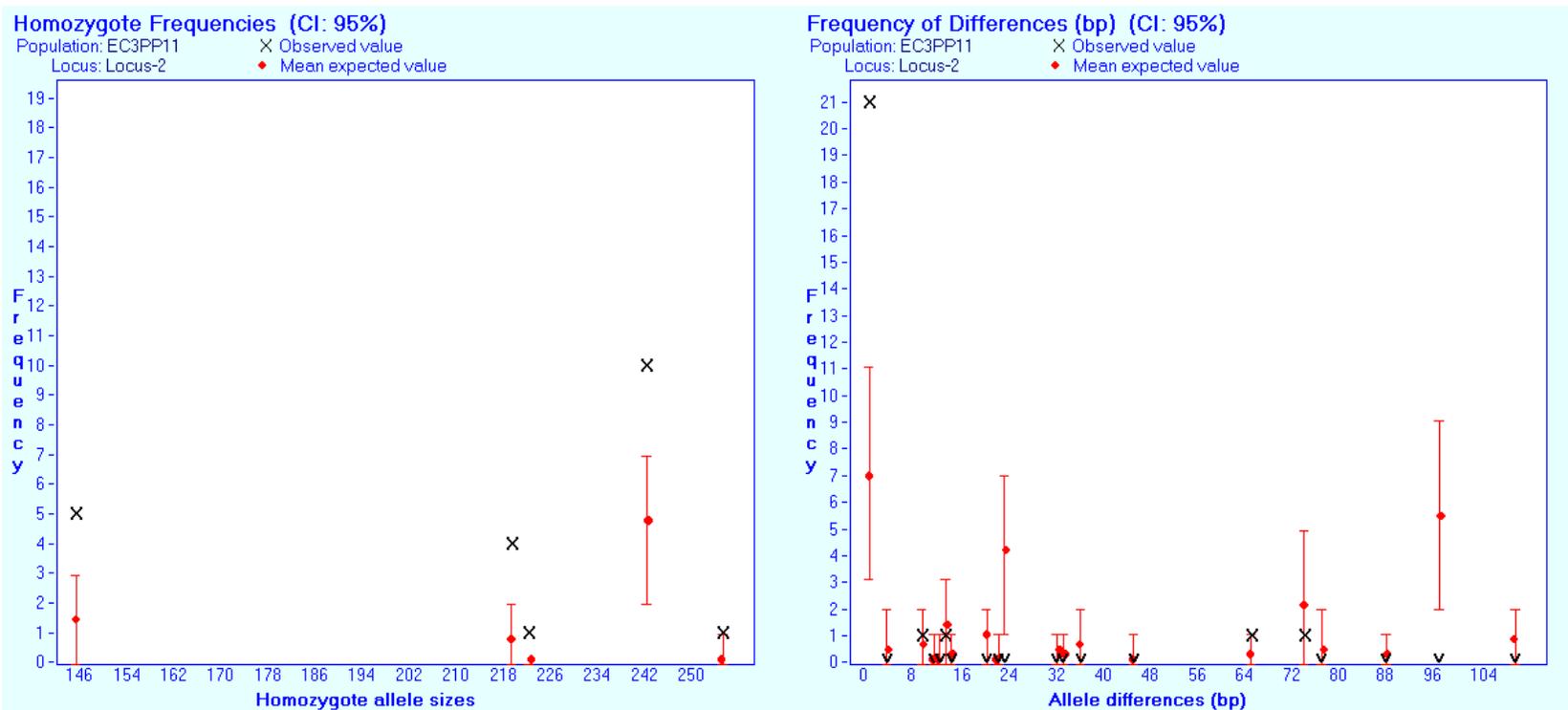


Fig. 2 Sorties MicroChecker. Gauche : Graphique des fréquences homozygotes du locus S14 dans la population 3PP (révèle la présence d'allèles nuls ou d'allèle(s) de taille(s) particulière(s)); **Droite :** Graphique des écarts de longueur entre allèles à l'état hétérozygote dans les génotypes de S14 dans la population 3PP (révèle la présence d'allèles nuls ou de pics surnuméraires).

RÉSULTATS

MICROSATELLITES : CARACTÉRISTIQUES ET VARIABILITÉ DES LOCUS

Hormis le locus EF1 dans l'échantillon de Porquerolle (SAR), tous les locus sont polymorphes dans tous les échantillons. Le nombre total d'allèles par locus varie de 5 pour le locus C30 à 13 pour le locus S14, avec en moyenne 4,5 allèles par locus et par population (Tableau 2 et 3). L'hétérozygotie observée va de 0 pour le locus EF1 dans l'échantillon SAR à 0,82 pour le locus C21 dans l'échantillon MJS. L'hétérozygotie attendue non biaisée va de 0 pour EF1 dans l'échantillon SAR à 0,87 pour S14 dans l'échantillon RIS (Tableau 3). Après évaluation à l'aide du logiciel MicroChecker, seul le locus S14 présente des fréquences significatives d'allèles nuls dans 9 populations avec une valeur de moyenne de 0,16. (Tableau 4 ; Fig. 2). Aucun locus ne présente de marques de problèmes de lecture liés à la perte de grands allèles ou à des pics surnuméraires. En considérant la totalité des échantillons, on détecte un déséquilibre de liaison entre les locus S14 et C21, ainsi qu'entre C21 et C30 (Tableau 5). À l'échelle des populations, huit déséquilibres de liaison significatifs ont été identifiés entre différents locus et dans différents échantillons ; après correction FDR six d'entre eux se sont avérés ne pas être significatifs. Les seuls déséquilibres significatifs par population concernaient alors les locus C21 et S14 dans les échantillons RID et VES (données non présentées).

ÉCART À L'ÉQUILIBRE DE HARDY-WEINBERG ET DIVERSITÉ INTRA-POPULATIONS

En considérant chaque locus séparément, f s'étend de -0,34 pour le locus C40 dans l'échantillon SOM à 0,78 pour le locus S14 dans l'échantillon 3PP, avec un f moyen de 0,08. L'écart à la panmixie varie entre les locus et les échantillons (Tableau 3). Après correction FDR, on observe un déficit en hétérozygotes significatif pour le locus S14 dans 7 échantillons, et pour le locus C30 dans l'échantillon VED. Pour le locus EF1, on ne rejette l'hypothèse de panmixie dans aucune population mais on observe un léger déficit en hétérozygotes significatif à l'échelle de la métapopulation. L'analyse des locus C21 et C40 a détecté un déficit en hétérozygote dans une population chacun (CAV et POU respectivement), mais celui-ci s'est avéré non significatif après correction FDR. Certains locus présentaient une valeur négative de f mais sans excès significatif en hétérozygotes. Pour les analyses multilocus, les valeurs de l'estimateur (f) du F_{IS} vont de -0,03 pour RID à 0,32 pour POU, avec f moyen à 0,03. Les tests de panmixie multilocus par population sont significatifs pour 7 populations sur

Tableau 5 Résultats des tests de déséquilibre de liaison pour chaque paire de locus sur l'ensemble des échantillons (méthode de Fisher), GENEPOP

	C21	S14	EF1	C40
S14	Highly sign.			
EF1	0,26	0,45		
C40	0,95	0,69	0,05	
C30	0,01	0,89	0,95	0,83

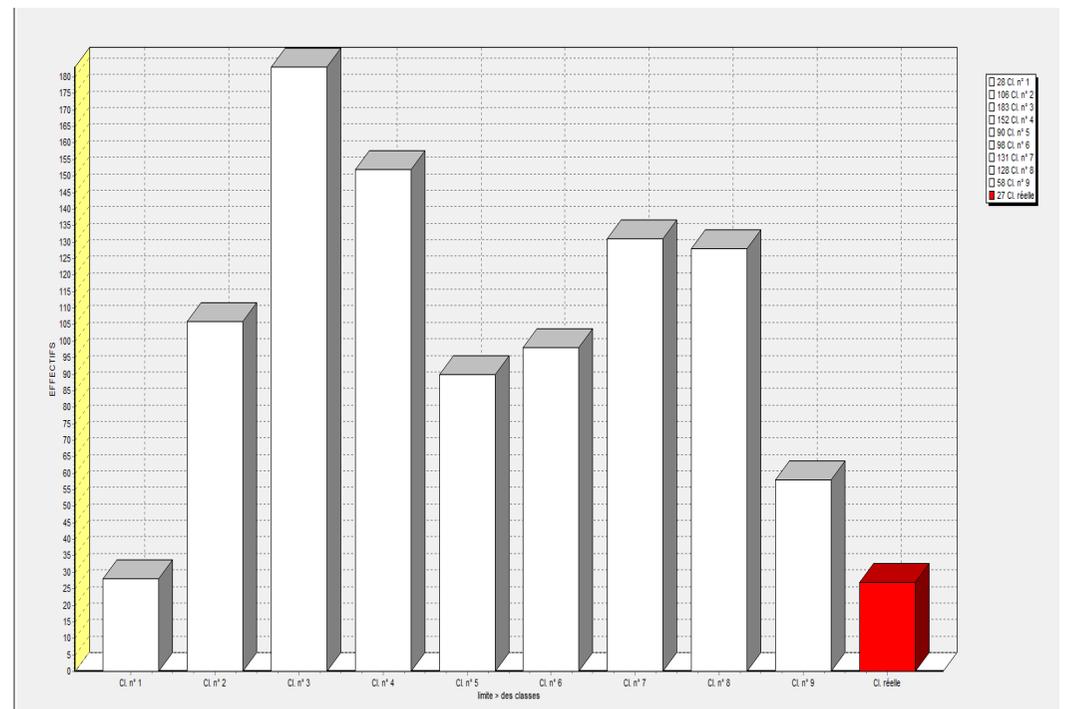
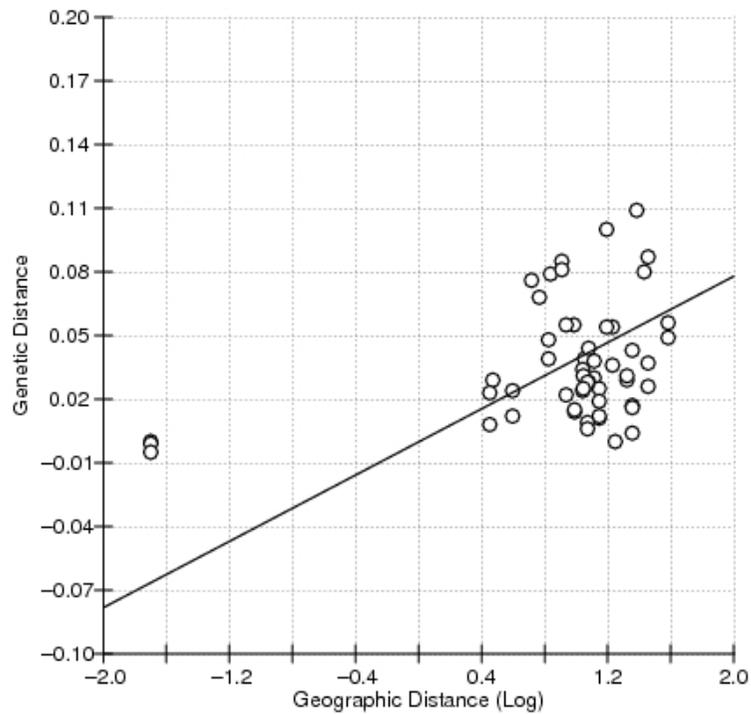


Fig. 3 Gauche : Graphique de la distance génétique [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] en fonction du logarithme de la distance géographique, IBDWebservice ; **Droite :** Histogramme représentant la distribution des différentes classes de valeurs de Z obtenues sur 1000 permutations, et positionnant la valeur réelle parmi celles-ci (classe rouge), GENETIX. Résultats sur données réelles : $Z = 25,31$; $E(Z) = 21,86$; Ecart type = 1,48 ; Coef. de Pearson $r = 0,49$

13 après correction FDR, ils correspondent à des déficits en hétérozygotes (Tableau 3).

ANALYSE DE LA STRUCTURE DES POPULATIONS

Le F_{ST} global est de 0,04 avec un intervalle de confiance à 95 % de 0,03 à 0,06. Les F_{ST} par paire d'échantillons prennent des valeurs allant de -0,01, entre VES et VED, jusqu'à 0,12 entre 3PP et REV. Les tests de bootstrap ont montré que l'intervalle de confiance du $F_{ST_{n.b.}}$ (0,043 [0,028 ; 0,063]) estimé avec la méthode ENA chevauche celui du F_{ST} calculé sans la correction pour allèles nuls (0,043 [0,029 ; 0,060]), il n'y a donc pas de différence entre les deux estimations. Après correction par permutations et correction FDR sur les tests exacts de différenciation génique, 73 tests sur 78 comparaisons sont significatifs (Tableau 6), suggérant une différenciation générale entre les échantillons. Par ailleurs, aucune différenciation significative n'a été observée entre les échantillons provenant d'un même site mais à des profondeurs différentes, 20 m et 40 m (RIS et RID ; VES et VED ; MJS et MEJ). De manière générale, les populations hors de la baie de Marseille, REV et SAR, présentent des valeurs de F_{ST} plus élevées que les autres populations. L'analyse de regroupements génétiques avec le logiciel STRUCTURE n'a pas révélé de groupes distincts.

Le test de corrélation entre la matrice des distances génétiques [$F_{ST} / (1-F_{ST})$] et celle des distances géographiques [$\ln(d)$] est significatif au risque α de 5 % (Paramètre d'association $Z = 25.31$; $P = 0.003$; Fig. 3). Ceci indique un patron de structure génétique suivant le modèle d'isolement par la distance.

DISCUSSION

*VARIABILITÉ DES MARQUEURS MICROSATELLITES ET DES POPULATIONS D'*EUNICELLA CAVOLINII**

Jusqu'à présent aucune étude génétique n'avait permis de préciser la structure génétique d'*E. cavolinii*. L'ADN mitochondrial est en effet peu variable chez les octocoralliaires, et ne montrait pas de différences entre *E. cavolinii*, *E. singularis* et *Eunicella verrucosa* (Caldéron *et al.*, 2006). La plupart des microsatellites utilisés ici avaient été développés à partir de séquences d'*E. Cavolinii* mais dans le but d'étudier l'espèce symbiotique *E. singularis* (Catanéo, 2011). Notre étude a permis d'une part de montrer que ces locus sont également polymorphes et informatifs chez *E. cavolinii*. La variabilité des marqueurs utilisés lors de ce stage sur la gorgone jaune est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour les mêmes marqueurs chez *E. Singularis* (donc en dehors de EF1 ; l'hétérozygotie attendue est de 0,47 en moyenne sur les populations et les locus pour ces deux *Eunicella* ; Catanéo, 2011). La

diversité génétique de ces deux gorgones est cependant bien plus faible que celle observée avec des microsatellites pour d'autres octocoralliaires de Méditerranée, *C. rubrum* (Ledoux *et al.* 2010b ; Costantini *et al.*, 2007) ou la gorgone rouge, *Paramuricea clavata* (Mokhtar-jamaï *et al.*, 2011). L'hétérozygotie attendue non biaisée moyenne par échantillon était en effet de 0,77 pour *C. rubrum* et 0,74 pour *P. clavata*. Cette différence pourrait être liée aux marqueurs utilisés, ceux développés par Catanéo (2011) semblant moins variables que pour les deux autres octocoralliaires. Deux hypothèses alternatives peuvent être évoquées pour expliquer la relativement faible diversité génétique de la gorgone jaune de Méditerranée. Un effet sélectif peut entraîner une baisse de diversité mais cette hypothèse semble peu probable car, d'une part, la sélection devrait alors avoir affecté tous les marqueurs, et d'autre part il s'agit ici de locus microsatellites donc supposés neutres. Une deuxième hypothèse expliquant cette faible diversité génétique serait celle d'un goulot d'étranglement suite au processus de recolonisation post-glaciaire (Hewitt, 2000). Cette recolonisation suite à la remontée du niveau de la mer aurait alors affecté différenciellement les différentes espèces de gorgonaires. Cette hypothèse sera testée par l'analyse d'un plus grand nombre de marqueurs microsatellites dont le locus Mic56 en cours de mise au point dans le cadre de ce stage (voir Mise au point du marqueur Mic 56 en annexe 2) et par l'étude de séquences d'introns (thèse d'I. Pivotto).

CONNECTIVITÉ – FLUX DE GÈNES

Les études génétiques de connectivité au niveau des populations marines ont mis en évidence l'importance insoupçonnée de la dispersion à courte distance (Swearer *et al.*, 2002; Taylor et Hellberg, 2003; Jones *et al.*, 2005; Cowen *et al.*, 2007; Almany *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009). Pour une métapopulation, la dispersion peut permettre de coloniser de nouveaux habitats ou favoriser la recolonisation d'habitats ayant été affectés par un épisode de mortalités massives. Par ailleurs, la migration peut limiter les effets de la dérive génétique en augmentant la taille de la population (par l'apport de nouveaux individus) et la variance génétique (par l'afflux de gènes différents) (Alleaume-Benharira *et al.*, 2006). Chez *E. cavolinii*, les flux de gènes reposent sur la dispersion des larves. La dispersion larvaire est communément décrite comme la probabilité qu'une larve disperse et s'établisse avec succès dans un site spatialement distinct de son site d'origine (Largier, 2003). Les méthodes d'analyse de la dispersion des larves sont multiples : génétique des populations (avec des approches directes, comme les analyses de parenté, ou indirectes ; voir Broquet et Petit, 2009), modèles de circulation

biophysique, marqueurs biochimiques et observations (difficile en milieu marin). Ainsi, il semblerait que globalement la métapopulation d'*E. Cavolinii* ait des populations différenciées les unes des autres donc avec peu de flux de gènes entre elles. Cette observation indiquerait donc une dispersion larvaire relativement courte, qui pourrait être en accord avec les observations faites en aquarium sur *E. singularis* (Weinberg, 1979). La dispersion larvaire semble cependant suffisante pour maintenir une homogénéité génétique entre les profondeurs d'un même site, contrairement à *E. singularis* et *P. clavata* qui présentent une différenciation significative entre profondeur pour certains sites ou à *C. rubrum* qui présente une différenciation généralisée entre profondeurs (Costantini *et al.*, 2011). Par contre, l'absence de (ou la faible) différenciation entre les sites de Méjean et Riou ainsi qu'entre les Calanques de Pouard sur l'Île Plane et la grotte 3PP de la Ciotat sont plus difficiles à expliquer. Ces résultats pourraient refléter des échanges plus marqués entre ces populations en dépit des distances géographiques qui les séparent ou un manque de puissance des tests de différenciation compte tenu du nombre de marqueurs utilisés et de leur faible variabilité (Ryman *et al.*, 2006). La recherche de migrants via des méthodes d'assignation à l'aide du logiciel GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004) serait utile pour tenter de préciser la connectivité entre populations.

La métapopulation d'*E. cavolinii* est néanmoins beaucoup moins structurée que celle de *C. rubrum* (Ledoux *et al.*, 2010b). Chez ce dernier, une structure très nette a été mise en évidence avec l'existence de quatre grands groupes génétiques en Méditerranée nord-occidentale et une différenciation à courte distance (une dizaine de mètres, y compris entre profondeurs d'un même site ; Costantini *et al.*, 2007 ; Ledoux *et al.*, 2010a,b ; Costantini *et al.*, 2011). Des résultats similaires ont été obtenus pour *P. clavata* (Mokhtar-jamaï *et al.*, 2011). Nos résultats sont cependant en accord avec ceux obtenus chez *E. singularis*, pour laquelle Catanéo (2011) n'a pas pu mettre en évidence de groupes génétiques marqués et où les niveaux de différenciation (F_{ST} de -0,02 à 0,37) sont comparables à ceux d'*E. cavolinii*. Il est donc probable qu'*E. cavolinii* disperse en moyenne à plus longue distance que *C. rubrum* ou *P. clavata* créant ainsi des flux de gènes importants qui atténuent la différenciation. Cette différenciation se met malgré tout en place à relativement courte distance (2,83 km) pour une espèce marine à dispersion larvaire (Kinlan et Gaines, 2003 ; Botsford *et al.*, 2009). Il resterait à étudier les facteurs sélectifs qui auraient pu façonner ces stratégies de dispersion localisée.

ÉVOLUTION DE L'ADAPTATION LOCALE EN MILIEU MARIN ET PLUS PARTICULIÈREMENT CHEZ LES GORGONAIRES DE MÉDITERRANÉE.

Le milieu marin est supposé très dispersif, donc peu favorable à l'adaptation locale en raison de l'importance des flux d'allèles localement inadaptés (Lenormand, 2002). Cependant, il présente des gradients et une hétérogénéité environnementale marqués. Des études antérieures ont par ailleurs mis en évidence divers exemples d'adaptation locale en mer (Sanford et Kelly, 2011 ; Sotka, 2005) et notamment en fonction de la profondeur et donc du régime thermique chez le corail rouge (Ledoux 2010 ; Haguenaer *et al.*, 2011) ou chez l'espèce symbiotique *E. singularis* (Catanéo, 2011). Dans le cas de la gorgone jaune si l'absence de différenciation entre profondeurs se confirme, deux alternatives peuvent être envisagées : soit, une stratégie de plasticité phénotypique permet le maintien de l'espèce sur un environnement hétérogène en présence de flux de gènes (Chevin et Lande, 2011), soit, malgré les flux de gènes, il y a quand même de l'adaptation locale dont les effets sont visibles uniquement sur certains locus. La recherche de tels locus peut se faire par exemple via des approches de génomique des populations (ex. Gagnaire *et al.*, 2012, où on voit des effets sélectifs dans une même population chez l'anguille). Les résultats de l'expérimentation en cours sur cette espèce permettront de préciser ceci au niveau phénotypique (voir le protocole de l'expérience de thermotolérance en annexe 3).

CONCLUSION

La gorgone jaune, *E. cavolinii*, subit les effets combinés du changement climatique et des activités de plongée sous marine. Notre étude a permis de mettre en évidence des flux de gènes restreints à courte distance, bien que la structure génétique de cette espèce soit moins marquée que celle d'autres octocoralliaires de Méditerranée. Ceci pourrait indiquer des capacités de recolonisation relativement réduites suite à une perturbation. La question de sa présence dans des environnements contrastés (notamment vis-à-vis de la profondeur et de la température) exige des analyses complémentaires afin de préciser l'interaction entre flux de gène et adaptation locale. Ceci pourra être réalisé en étudiant un plus grand nombre de microsatellites et si possible plus variables. Le séquençage en cours du transcriptome de cette espèce, dans le cadre du projet Popphyl, permettra également d'avoir une idée plus large de la diversité génétique de cette espèce mais aussi d'identifier d'autres marqueurs (SNPs ou microsatellites) utiles pour une étude plus précise de l'histoire évolutive de cette espèce.

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je souhaite remercier Didier Aurelle, pour m'avoir accueillie dans son équipe et son bureau, de m'avoir fait confiance, mais aussi de son aide et sa patience.

Je remercie aussi sincèrement mes camarades de table, de café et taxis à leurs heures, qui m'ont permis de me sentir à l'aise au labo comme à Marseille, qui m'ont fait rire, qui m'ont conseillée et impressionnée. Merci Isa (pour les pizzas et les gâteaux en plus), merci Quentin ! Bien sûr, un merci à tous ceux qui ont été là, à table, en soirée, en barbecue, Kamel, Marine du haut, Marine du bas, Alex, Debany, César, Joëlle...

Je voudrais aussi remercier Caroline, Cécile et Marjo d'une part de m'avoir accepté dans votre labo mais aussi pour vos conseils, votre attention, votre aide, votre bonne humeur mais surtout votre constructivité. Un grand merci à F. Zuberer, L. Vanbostal, B. De Ligondes et A. Haguenaer, sans qui mon stage n'aurait pas été possible, d'être allé vous geler au fond de l'eau pour nous ramener nos précieux échantillons et pour la balade en bateau, bien entendu.

De manière générale, merci à tous les membres de la station océanographique de Marseille et à ses occupants pour ce stage passionnant, vivant, dépaysant et mémorable. Et enfin merci Kad Merad et Thomas de Plus belle la Life, de nous avoir occupé pendant nos séances paparazzi.

Étudiante : Pachka HAMAMI, Responsable : Didier AURELLE

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

RÉFÉRENCES

- Alleaume-Benharira M, Pen IR, Ronce O (2006) Geographical patterns of adaptation within a species' range: interactions between drift and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 203–215.
- Almany GR, Berumen ML, Thorrold SR, Planes S, Jones GP (2007) Local replenishment of coral reef fish populations in a marine reserve. *Science*, **316**, 742–744.
- Ballesteros E (2006) Mediterranean coralligenous assemblages: A synthesis of present knowledge. In: (eds Gibson R, Atkinson R, Gordon J), p. 123–+. Crc Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*, **57**, 289–300.
- Botsford LW, White JW, Coffroth M-A, Paris C-B, Planes S, Shearer T-L, *et al.* (2009) Connectivity and resilience of coral reef metapopulations in marine protected areas: matching empirical efforts to predictive needs RID E-9306-2010. *Coral Reefs*, **28**, 327–337.
- Broquet T, Petit EJ (2009) Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics. In: *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* , pp. 193–216. Annual Reviews, Palo Alto.
- 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.
- Carpine C, Grasshoff M (1975) Les Gorgonaires de la Méditerranée. *Bulletin de l'Institut océanographique* Fondation Albert Ier, Prince de Monaco, **71**, 1430, 72-87.
- Catanéo, J (2011) Adaptation d'*Eunicella singularis* en milieu perturbé: symbiose et structuration génétique. Thèse de l'Université de Nice Sophia Antipolis.
- Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 621–631.
- Chenuil A, Hoareau TB, Egea E, Penant G, Rocher C, Aurelle D, *et al.* (2010) An efficient method to find potentially universal population genetic markers, applied to metazoans. *Bmc Evolutionary Biology*, **10**.
- Chevin L-M, Lande R (2011) Adaptation to marginal habitats by evolution of increased phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**, 1462–1476.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007) 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.
- Costantini F, Rossi S, Pintus E, Cerrano C, Gili J-M, Abbiati M (2011) Low connectivity and declining genetic variability along a depth gradient in *Corallium rubrum* populations. *Coral Reefs*, **30**, 991–1003.

Étudiante : Pachka HAMAMI, Responsable : Didier AURELLE

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

- Costanza R, d'Arge R, deGroot R, Farber S, Grasso M, Hannon B, *et al.* (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital RID A-4912-2008. *Nature*, **387**, 253–260.
- Cowen RK, Gawarkiewicz G, Pineda J, Thorrold SR, Werner FE (2007) Population Connectivity in Marine Systems An Overview. *Oceanography*, **20**, 14–21.
- Crisci C, Bensoussan N, Romano J-C, Garrabou J (2011) Temperature Anomalies and Mortality Events in Marine Communities: Insights on Factors behind Differential Mortality Impacts in the NW Mediterranean. *Plos One*, **6**.
- Dempster A, Laird N, Rubin D (1977) Maximum Likelihood from Incomplete Data Via Em Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*, **39**, 1–38.
- DiCiccio TJ, Efron B (1996) Bootstrap confidence intervals. *Statistical Science*, **11**, 189–212.
- Gagnaire P-A, Normandeau E, Cote C, Hansen MM, Bernatchez L (2012) The Genetic Consequences of Spatially Varying Selection in the Panmictic American Eel (*Anguilla rostrata*). *Genetics*, **190**, 725–U703.
- Garrabou J, Coma R, Bensoussan N, Bally M, Chevaldonné P, Cigliano M, *et al.* (2009) Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. RID B-4470-2009. *Global Change Biology*, **15**, 1090–1103.
- Gienapp P, Teplitsky C, Alho JS, Mills JA, Merila J (2008) Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology*, **17**, 167–178.
- Haguenaer A, Zuberer F, Aurelle D (2011) Mediterranean red coral facing climate change: focus on heat shock molecular response, plasticity and local adaptation. Short oral and poster at the 15th. *Evolutionary biology meeting*, Marseille, France, 27-30 septembre 2011.
- Halpern BS, Walbridge S, Selkoe KA, Kappel CV, Micheli F, d'Agrosa C, *et al.* (2008) A global map of human impact on marine ecosystems. RID B-9534-2009 RID C-3543-2009. *Science*, **319**, 948–952.
- Hansen MM, Olivieri I, Waller DM, Nielsen E E, (2012) Monitoring adaptive genetic responses to environmental change. *Molecular ecology*, **21**, 1311–1329.
- Harley C, Hughes A, Hultgren K, Miner B G, Sorte C J-B, Thornber C S, *et al.* (2006) The impacts of climate change in coastal marine systems. RID F-6862-2011. *Ecology Letters*, **9**, 228–241.
- Harmelin J-G & Bassemayousse F (2008) Méditerranée – À la découverte des paysages sous-marins *Chasse-Marée* | ed. Glénat.
- Hendry AP, Farrugia TJ, Kinnison MT (2008) Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Molecular Ecology*, **17**, 20–29.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hughes T, Baird A, Bellwood D, Card M, Connolly SR, Folke C, *et al.* (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs RID C-8449-2009 RID E-7773-2011. *Science*, **301**, 929–933.
- Jackson JBC (2008) Ecological extinction and evolution in the brave new ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 11458–11465.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 424–429.
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *Bmc Genetics*, **6**.
- Jones GP, Planes S, Thorrold SR (2005) Coral reef fish larvae settle close to home. *Current*

Étudiante : Pachka HAMAMI, Responsable : Didier AURELLE

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

- Biology*, **15**, 1314–1318.
- Jones GP, Almany GR, Russ GR, Sale PF, Steneck RS, Van Oppen MJH, *et al.* (2009) Larval retention and connectivity among populations of corals and reef fishes: history, advances and challenges. *Coral Reefs*, **28**, 307–325.
- Kinlan BP, Gaines SD (2003) Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: A community perspective. *Ecology*, **84**, 2007–2020.
- Largier JL (2003) Considerations in estimating larval dispersal distances from oceanographic data. *Ecological Applications*, **13**, S71–S89.
- Leblois R, Estoup A, Rousset F (2003) Influence of mutational and sampling factors on the estimation of demographic parameters in a “Continuous” population under isolation by distance. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 491–502.
- Ledoux J-B (2010) Biologie de la conservation du corail rouge, *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758): Impact du changement global sur l'évolution des populations infralittorales en Méditerranée Nord-Occidentale. Thèse de doctorat de l'*Université de la Méditerranée*.
- Ledoux J-B, Garrabou J, Bianchimani O, Drap P, Féral JP, Aurelle D (2010a) Fine-scale genetic structure and inferences on population biology in the threatened Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*. *Molecular Ecology*, **19**, 4204–4216.
- Ledoux J-B, Mokhtar-Jamai K, Roby C, Féral JP, Garrabou J, Aurelle D (2010b) Genetic survey of shallow populations of the Mediterranean red coral [*Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758)]: new insights into evolutionary processes shaping nuclear diversity and implications for conservation. *Molecular Ecology*, **19**, 675–690.
- Lejeusne C, Chevaldonné P, Pergent-Martini C, Boudouresque CF, Pérez T (2010) Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 250–260.
- Lenormand T (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 183–189.
- McFadden CS, France SC, Sanchez JA, Alderslade P (2006) A molecular phylogenetic analysis of the Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on mitochondrial protein-coding sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 513–527.
- Mokhtar-Jamai K, Pascual M, Ledoux J-B, Coma R, Réral JP, Garrabou J, *et al.* (2011) From global to local genetic structuring in the red gorgonian *Paramuricea clavata*: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Molecular Ecology*, **20**, 3291–3305.
- Molecular Ecology Resources Prime Development Consortium (2010) Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2009-30 September 2009JO – Molecular Ecology Resources. *Molecular Ecology Resources*, **10** (1), 232-236.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, **95**, 536–539.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using

Étudiante : Pachka HAMAMI, Responsable : Didier AURELLE

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

- multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Raymond M, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**, 1280–1283.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219–1228.
- Rousset F (2008) GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103–106.
- Ryman N, Palm S, Andre C, Carvalho GR, Dalhgren TG, Jorde PE, *et al.* (2006) Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Molecular Ecology*, **15**, 2031–2045.
- Sanford E, Kelly MW (2011) Local Adaptation in Marine Invertebrates. In: *Annual Review of Marine Science, Vol 3* (eds Carlson CA, Giovannoni SJ), pp. 509–535. Annual Reviews, Palo Alto.
- Sotka EE (2005) Local adaptation in host use among marine invertebrates. *Ecology Letters*, **8**, 448–459.
- Swearer SE, Shima JS, Hellberg ME, Thorrold SR, Jones GP, Robertson DR, *et al.* (2002) Evidence of self-recruitment in demersal marine populations. *Bulletin of Marine Science*, **70**, 251–271.
- Taylor MS, Hellberg ME (2003) Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science*, **299**, 107–109.
- Weinberg S, Weinberg F (1979) Life-Cycle of a Gorgonian – *Eunicella Singularis* (esper, 1794). *Bijdragen Tot De Dierkunde*, **48**, 127–140.
- Weir B, Cockerham C (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Wright S (1965) The Interpretation of Population-Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution*, **19**, 395–420.

ANNEXE 1

PROTOCOLES

QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook

DNA Purification from Tissues (QIAamp DNA Mini Kit) p.33

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from tissues using the QIAamp DNA Mini Kit.

Digestion

- Prélever un fragment de 1 à 2 cm et le placer dans un microtube 2 mL « safe-lock ».
- Ajouter une bille de broyage et 180 µL de tampon ATL (tampon de lyse).
- Broyer au Tissulyser pendant 2 min.
- Centrifuger pour faire retomber la mousse.
- Ajouter 20 µL de Protéinase K, vortexer.
- Incuber à 56°C dans le Thermomixeur pour une durée de 2h à toute la nuit.

Une fois la digestion effectuée

- Centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttes de condensation.
- Transvaser le liquide dans un nouveau tube (retirer la bille).
- Ajouter 200 µL de tampon AL, vortexer 15s et incuber 10 min à 70°C.
- Centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttes de condensation.
- Ajouter 200 µL d'éthanol absolu froid, vortexer 15s.
- Centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttes.

Passage sur colonne

- Transférer le mélange dans la colonne sans toucher les bords.
- Centrifuger 1 min à 6 000g.
- Remplacer le tube de récolte contenant le filtrat par un tube propre.
- Ajouter 500 µL de tampon AW1 dans la colonne sans toucher les bords.
- Centrifuger 1 min à 6 000g.
- Remplacer le tube de récolte contenant le filtrat par un tube propre.
- Ajouter 500 µL de tampon AW2 dans la colonne sans toucher les bords.
- Centrifuger 3 min à 20 000g.
- Remplacer le tube de récolte contenant le filtrat par un tube propre.

Étudiante : Pachka HAMAMI, Responsable : Didier AURELLE

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

- Centrifuger 1 min à pleine puissance.
- Placer un eppendorf 2mL sous la colonne.
- Ajouter 200µL de tampon AE dans la colonne. Incuber 10 min.
- Centrifuger 1 min à 6 000g.
- Répéter les deux dernières étapes.

Extraction ADN précipitation par les sels

- Prélever un fragment de 1 à 2 cm de colonie d'*E. cavolinii*.
- Laisser évaporer l'alcool en incubant quelques minutes à 56°C.
- Ajouter 600 µL de tampon TNES.
- Ajouter 20 µL de protéinase K (20mg/mL).
- Laisser incuber à 56°C 2h à toute la nuit.
- Ajouter 166.7 µL de NaCl (6M).
- Centrifuger 15 min à 10 000 g (étape de précipitation des protéines).
- Récupérer le surnageant et le transférer dans de nouveaux tubes.
- Ajouter 780 µL d'alcool absolu à froid (Ethanol 100%).
- Ajouter 78 µL d'Acétate de Sodium (3M pH 7).
- Centrifuger 15 min à 13 000 g (étape de précipitation de l'ADN).
- Éliminer l'alcool en prélevant avec la pipette.
- Ajouter 780 µL d'Ethanol 70% (étape de lavage).
- Centrifuger 15 min à 13 000 g.
- Éliminer l'alcool en prélevant avec la pipette.
- Laisser sécher à l'air libre en recouvrant de papier aluminium.
- Si besoin incuber quelques minutes à 56°C.
- Ajouter 200 µL d'H₂O milliQ.
- Vortexer.
- Centrifuger rapidement.
- Incuber quelques instants à 56°C.

Étudiante : Pachka HAMAMI, Responsable : Didier AURELLE

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

PCR

Préparation du mélange réactionnel (Mix)

- Tampon 5X : 2µL*
- dNTP (5mM) : 1µL*
- MgCl₂ (25mM) : 1 µL*
- Amorce « sens » (10µM) : 0,05 µL*
- Amorce « anti-sens » (10µM) : 0,05 µL*
- Eau : 3,95 µL*
- Taq Polymerase (5U/µL) : 0,05 µL*

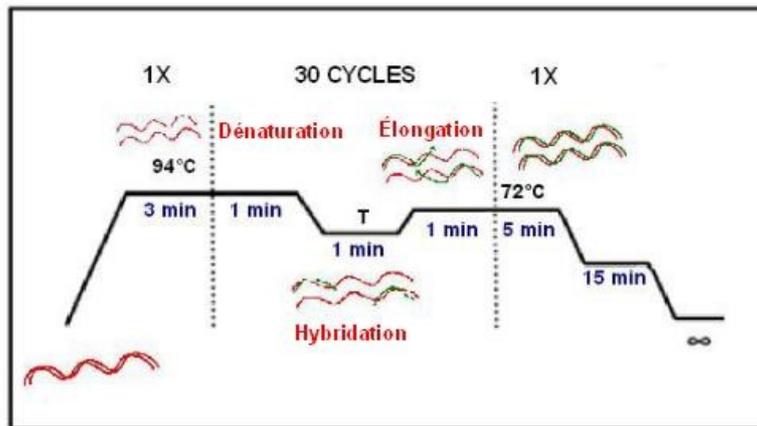
*Quantités multipliées par le nombre de puits + 10 %

Dans chaque puits

→ 1µL d'ADN

→ 9µL de Mix

Cycle type et températures optimales d'hybridation (T) pour chaque microsatellite



Microsatellite	S14	C21	C30	C40	EF1
T	64°C	55°C	62°C	60°C	45°C

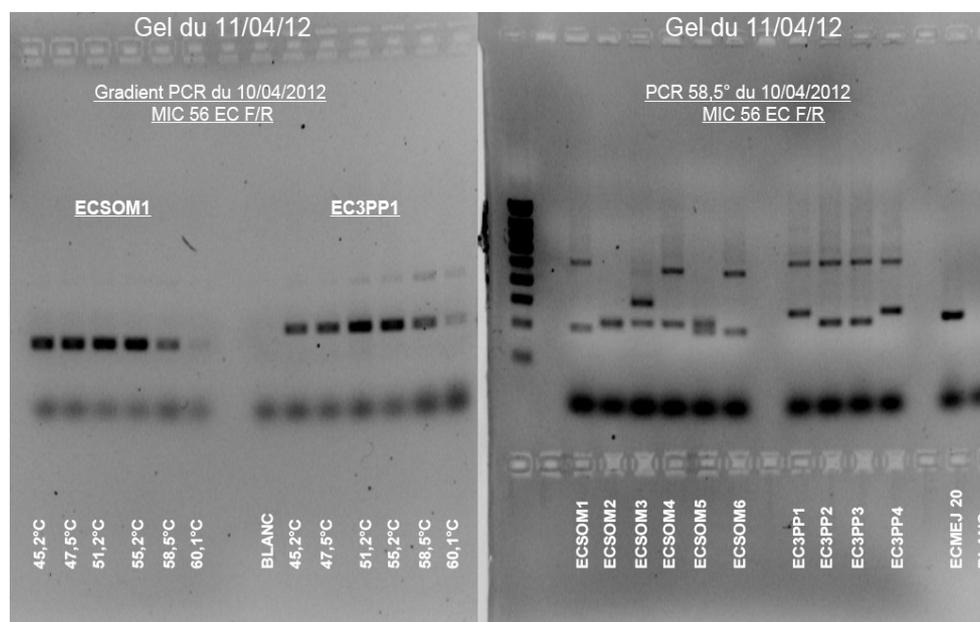
Étudiante : Pachka HAMAMI, Responsable : Didier AURELLE

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

ANNEXE 2

MISE AU POINT DU MARQUEUR Mic56

La PCR avec un gradient de température a permis de déterminer la température optimale d'hybridation des amorces non fluorescentes pour le locus Mic56 (gel de gauche). Le gel effectué après PCR à 58,5°C sur 11 individus provenant de trois populations distinctes a mis en évidence le polymorphisme de ce locus (gel de droite). La mise au points des paramètres de PCR avec l'amorce fluorescente est en cours, dans le but de pouvoir génotyper les individus par migration sur un « Genetic Analyser ABI3130 » (Applied Biosystems).



Étudiante : Pachka HAMAMI, Responsable : Didier AURELLE

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

ANNEXE 3

EXPÉRIENCE DE THERMOTOLÉRANCE SUR EUNICELLA CAVOLINII

Vingt colonies ont été prélevées à 20 m et 40 m de profondeur sur le site de Riou. Elles ont été fragmentées en plusieurs réplicats soumis à deux conditions expérimentales :

1. Condition « témoin » à 17°C

2. Condition « stress thermique » avec les phases suivantes :

- Phase d'acclimation de 3 semaines à 17°C,
- Augmentation en 6h de la température de 17 à 23°C,
- Maintien à 23°C durant 72h
- Augmentation en 6h de la température de 23 à 28°C
- Maintien à 28°C

Des fragments ont été prélevés dans chaque condition avant la date d'application du stress, à 23°C puis à 28°C (après 24h et 48h). Ces fragments seront utilisés pour une étude de l'expression de gènes candidats. Des fragments des mêmes colonies ont aussi été gardés afin de suivre l'évolution du taux de nécrose à 28°C. Cette expérience permettra d'évaluer la variabilité de réponse au stress thermique pour une même profondeur et entre différentes profondeurs.

Étudiante : Pachka HAMAMI, Responsable : Didier AURELLE

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

Étude de la structure génétique de la gorgone *Eunicella cavolinii* en Méditerranée : connectivité et adaptation locale en environnement hétérogène.

Résumé :

Les canicules des étés de 1999 et 2003 se sont accompagnées d'événements de mortalités massives qui ont affectés divers métazoaires marins. L'étude de l'impact de ces perturbations sur ces populations nécessite d'étudier leurs capacités d'adaptation et de recolonisation. L'objectif principal de cette étude est d'analyser le polymorphisme et la structure génétique de la gorgone jaune de Méditerranée, *Eunicella cavolinii*, dans le but de déterminer ses capacités de dispersion. Par ailleurs, les résultats obtenus seront utiles pour comprendre l'évolution, ou non, de l'adaptation locale en fonction du régime thermique. Cinq marqueurs microsatellites ont été étudiés sur des échantillons de 13 populations de la Méditerranée nord-occidentale pris à différentes profondeurs. Nos principaux résultats indiquent (1) une différenciation par paire d'échantillons à relativement courte distance, (2) une structure et une diversité génétique relativement faibles par rapport à d'autres octocoralliaires, (3) une absence de différenciation selon la profondeur dans un même site. Les conséquences évolutives de ces résultats sont discutées dans le cadre de l'étude des processus adaptatifs. Cette analyse s'inscrit dans une étude plus large des capacités adaptatives de cette espèce à l'aide de la variabilité de réponse au stress thermique aux niveaux du phénotype et de l'expression de gènes candidats.

Mots clés : *Eunicella cavolinii*, connectivité, adaptation locale, microsatellites, différenciation génétique

Genetic survey of the Mediterranean gorgonian *Eunicella cavolinii*: connectivity and local adaptation in heterogeneous environments.

Abstract:

The heat waves of summers 1999 and 2003 have led to mass mortality events for various marine metazoans. In order to estimate the impact of such disturbances on these populations it is necessary to study their adaptive and recolonization abilities. The main objective of this study was to analyze the genetic structure of the Mediterranean yellow gorgonian, *Eunicella cavolinii*, in order to determine its dispersal abilities. Five microsatellite markers were studied on samples of 13 populations of the North Western Mediterranean, including different depths. Our main results indicate (1) a generalized pair-wise differentiation at relatively short distance, (2) relatively weak genetic structure and diversity when compared with other octocorals, (3) no differentiation according to depth in the same site. The evolutionary consequences of these results are discussed in the context of evolution of adaptive abilities. This analysis is part of a study on the adaptive processes in this species including the phenotypic variability in response to thermal stress and the levels of expression of candidate genes.

Keywords: *Eunicella cavolinii*, connectivity, local adaptation, microsatellites, genetic differentiation