



HAL
open science

Etude de la dispersion et du recrutement à différentes échelles spatiales chez *Undaria pinnatifida*, une macro-algue introduite le long des côtes bretonnes

Daphné Grulois

► **To cite this version:**

Daphné Grulois. Etude de la dispersion et du recrutement à différentes échelles spatiales chez *Undaria pinnatifida*, une macro-algue introduite le long des côtes bretonnes. *Ecologie, Environnement*. Paris 6, 2010. Français. NNT : . tel-01111061

HAL Id: tel-01111061

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01111061>

Submitted on 29 Jan 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Diversité du Vivant

Présentée par

Mlle Daphné GRULOIS

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

**Etude de la dispersion et du recrutement à différentes échelles
spatiales chez *Undaria pinnatifida*, une macro-algue introduite le
long des côtes bretonnes**

Soutenue le 13 décembre 2010

Devant le jury composé de :

Mme Pascale Garcia, Professeur, Université de La Rochelle	Rapporteur
Mme Sophie Arnaud-Haond, Chargée de recherche, IFREMER, Brest	Rapporteur
Mme Valérie Stiger-Pouvreau, Maître de Conférences, UBO, Brest	Examineur
Mr Bernard Kloareg, Professeur, Université Paris VI, Roscoff	Examineur
Mme Frédérique Viard, Directrice de recherche, CNRS, Roscoff	Directrice de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Directeur de la station, Bernard Kloareg, de m'avoir accueillie au sein de la station au cours de mon stage de Master 2 et de mon doctorat.

Un grand merci également à François Lallier, directeur de l'UMR « Adaptation et Diversité en Milieu Marin » qui a fait en sorte que cette thèse puisse se dérouler normalement...et bien sûr pour son accueil dans l'UMR.

Je tiens à remercier Myriam Valéro, qui m'a accueillie dans l'ex-équipe « EGPM » dès mon stage de Master 2, puis ensuite au cours de ma thèse.

Un MERCI spécial est destiné à ma directrice de thèse, Frédérique Viard, pour l'attention qu'elle m'a consacrée malgré un emploi du temps très chargé. Ses conseils, son exigence, sa pédagogie, sa rigueur et son aide sont des qualités qui m'ont fait avancer et évoluer au cours de ces trois années de thèse et je lui suis très reconnaissante de tout ce qu'elle m'a appris. Encore Merci !

Lors de mon stage de Master 2, Marie Voisin m'a encadrée et initiée aux joies de la biologie moléculaire. Tous ses conseils et astuces m'ont permis d'avoir des bonnes bases pour réaliser ce travail de thèse.

Au cours de cette thèse, deux comités de thèse ont été réalisés, je tiens à remercier les membres qui les ont constitués : Valérie Stiger, Jean-François Arnaud et Dominique Davoult. Les discussions très constructives et les décisions prises ont été fructueuses au cours de la thèse.

Je tiens également à remercier les cultivateurs : Patrick Podeur (Biocéan), Jean-François Arbonna & Magali Molla (C-Weed compagne), Jean-Yves Moigne (ex-cultivateur de la baie de Lampaul) et Philippe Kervern (ex-cultivateur de l'Aber Wrac'h) pour leur donation au niveau des échantillons et leurs discussions qui ont permis d'avoir des compléments d'information très intéressants...

Bien sûr, je remercie tous les membres de l'équipe DIVCo : Titii, Nicolas, Marion, Jihane, Eric, Thomas, Franck, Charlotte, Fanny, Florentine, Abigail et Kasia pour les conseils avisés lors des répétitions de speech in english et autres.

Sans le service Mer & Observation, cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est. Un grand merci à Laurent Lévêque, responsable du service pour son aide logistique et technique pour les nombreuses missions terrain. Et bien sûr un merci est également destiné à cette bande de joyeux lurons : Yann Fontana, Mathieu Camusat, Wilfried Thomas (« The Finger »), Guillaume De Liège et Noël Guidal. Les missions avec vous ont été un pur plaisir !

Les échantillonnages se sont déroulés en plongée mais aussi à pied dans des conditions assez funs ! Un grand nombre de volontaires sont venus m'assister qu'il vente, qu'il pleuve... merci à eux Florentine, François, Marie, Sab, Danté, Sophie, Anna, Valéria, Fanny, Robin, Claire, Mathilde, Fiona, Virginie, Marion et Mathieu Oriot.

Je voudrais également remercier Claire Daguin et Mr Propre (alias Stéphane Mauger) pour leur conseil en biologie moléculaire, leur disponibilité et leurs discussions !

Je tiens également à remercier le Service de séquençage, Gwen et Morgan pour m'avoir fait confiance lors de la mise au point des marqueurs microsatellites sur ABI et leurs conseils.

Pour la mise au point de marqueurs diagnostiques pour le FISH, j'aimerais remercier Laure Guillou pour m'avoir permis d'utiliser son labo, et Catharina Alves pour m'avoir initiée au FISH. Un merci également à Fabrice Not et Nathalie Simon pour les discussions et l'aide apportée durant ces manips !

Je remercie également Sandrine Boullben, Pi Nyvall et une fois de plus Claire Daguin pour m'avoir conseillée dans les manips de Dot Blot.

Lors de ma thèse, j'ai pu bénéficier d'un coup de main pour les cultures. Même si parfois, les résultats ne sont pas là. Ce furent des expériences très enrichissantes. Merci à Jennifer Langlois & Guillaume Scoazec.

Au cours de ces années à Roscoff, j'ai pu rencontrer des stagiaires et des thésards de pleins d'horizons différents : Daniella, Valéria, pet'te Caro, Vincent, Anne-Laure, Mahdi, Vlad, Maria, Sergio, Eric & Gwen, Marine, Amel, Tania, Alex, Julie, Léna, Jérémy, Angélique, Nathalie K, Matthieu B, Sarah, Yoan F, Azza, Maxime, Stéfania... désolée pour les oublié(e)s ! les virées, les repas improvisés, les baignades à Rockroum, les festivals, etc sont ancrés dans ma mémoire.

Un merci aux trois expatriées : Sophie, Nathalie et Joana même si elles sont parties à des moments différents au cours de ma thèse, la distance ne nous a pas empêchées de garder contact et elles m'ont beaucoup encouragée durant la rédaction de thèse. Merci !

Un très grand Big Merci à Vivi, ma ch'ti biloute du Nord, qui a toujours été présente pour moi. Les randonnées à pied et sur roulettes, les sorties, les virées campings, les plans foireux... Bref, que de bons moments et toujours prête à rendre service! Une pensée me vient pour la petite Sarah, une de plus sur qui on peut compter !

Je dois également remercier Matthieu Bruneaux, Abigail et à nouveau Vivi, pour avoir contribué aux corrections de ce manuscrit de thèse.

Je voudrais remercier tout le personnel du restaurant du Gulf Stream et les personnes du Service technique, en particulier Papy Jack, toujours disponible pour la moindre demande.

Un merci également aux personnes du Roller Club de Roscoff et à mon prof de danse africaine, Luc pour tous les bons moments de détente qu'on a passé ensemble.

UN GRAND MERCI à ma famille qui m'a soutenue et qui a toujours cru en moi en particulier ma maman Anne-Marie, Jean-Louis, mon frère Benjamin, ma marraine, mes grands parents et à mes ami(e)s d'enfance de Belgique : Caroline, Marie & Yannick, Damien & Nancy, Thomas, Juju, Michel, Céline, Damien, Catherine et mon club de plongée ABYSS.

Et enfin un SPECIAL MERCI, à Romaric, mon cœur, pour son énorme soutien et sa présence lors de cette rédaction de thèse. Merci pour tout ... et pour la suite...

SOMMAIRE

Introduction générale	1
1. Les macroalgues, modèles et témoins des invasions biologiques	5
1.1. Quelle place ont les macroalgues parmi les espèces introduites ?.....	5
1.2. Quelles sont les impacts et les conséquences des introductions biologiques?.....	7
1.3. Les profils d'expansion sont-ils similaires chez toutes les macroalgues ?	9
1.4. Existe-t-il des traits d'histoires de vie communs aux macroalgues introduites ?	12
1.5. Caractéristiques de la zone receveuse (<i>i.e.</i> habitat envahi).....	14
2. Vecteurs intervenant dans l'expansion locale et globale des macroalgues introduites	15
2.1. Pression en propagules et dispersion	15
2.2. Vecteurs & facteurs de dispersion naturelle des macroalgues.....	17
2.3. Vecteurs de dispersion anthropique	19
2.4. Facteurs jouant sur le recrutement d'un individu dans une population	23
3. Méthodes d'analyse de la dispersion chez les macroalgues	24
3.1. Etude du transport dans la colonne d'eau	25
3.2. Etude du recrutement	27
3.3. Etude de la connectivité reproductive (<i>i.e.</i> dispersion réalisée).....	27
4. Présentation du modèle d'étude & état de l'art concernant son statut d'espèce introduite	33
4.1. Les processus d'introduction d' <i>U. pinnatifida</i> à grande échelle.....	35
4.2. Cycle de vie et capacité de dispersion d' <i>U. pinnatifida</i>	39
5. Problématique de la thèse	41
Chapitre I : Connectivité & migration entre baies, distribuées le long de la côte bretonne	47
I.1 Synopsis de l'article présenté en I.2.....	49
I.2 "Unexpected limited population connectivity in a widely introduced and invasive kelp: multiple dispersal pathways do not enhance gene flow"	53

Chapitre II : Connectivité & Migration entre populations à l'échelle d'une baie.....	89
II.1. Synopsis de l'article présenté en I.2	91
II.2. "Mosaic genetic structure and sustainable establishment of the invasive kelp <i>Undaria pinnatifida</i> at a bay scale (Bay of St-Malo, Brittany)"	94
Chapitre III : Microstructure spatiale et inférences sur la dispersion efficace au sein d'un site naturel colonisé par <i>Undaria pinnatifida</i>	123
III.1. Introduction : potentiel de dispersion et dispersion réalisée.....	125
III.2. Matériels & Méthodes	129
III.2.1. Sites d'étude, mesures et échantillonnage.....	129
III.2.2. Obtention des données moléculaires.....	132
III.2.3. Analyses des phénotypes et de la distribution spatiale	132
III.2.4. Analyses statistiques des données moléculaires	132
III.3. Résultats.....	137
III.3.1 Distribution, densité et caractéristiques individuelles.....	137
III.3.2.Diversité génétique intra-site et entre zones et adéquation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg.....	139
III.3.3. Structure génétique entre les sites et les zones	140
III.4. Discussion.....	148
III.4.1. Une importante diversité génétique sur une très faible surface	148
III.4.2. Un schéma de dispersion majoritairement à (très) courte distance ponctuée par quelques événements de dispersion à (plus) longue distance	149
III.4.3. Dispersion potentielle vs. dispersion réalisée	152
III.4.4. <i>U. pinnatifida</i> , invasive mais faiblement compétitrice	154
III. 5. Conclusion	155

Chapitre IV : Dynamique de la colonisation d’habitats naturels et artificiels par l’algue invasive <i>Undaria pinnatifida</i>	157
Préambule	159
<i>Partie A-Analyse démo-génétique de l’établissement d’une nouvelle population dans un habitat artificiel</i>	161
IV-A.1. Introduction	161
IV-A.2. Matériel & Méthodes	165
IV-A.2.1. Présentation des sites d’étude	165
IV-A.2.2. Relevés de terrain, échantillonnages et analyses statistiques associées.....	168
IV-A.2.3. Acquisition et analyses des données moléculaires	169
IV-A.3. Résultats & Discussion	173
IV-A.3.1. Une arrivée tardive des premiers fondateurs	173
IV-A.3.2. Dynamique d’établissement de la population.....	176
IV-A.3.3. Une origine multi-source des premiers colonisateurs	178
IV-A.3.4. Hétérogénéité spatiale et évolution des sources au cours de l’expansion	182
IV-A.4. Conclusion: une colonisation efficace et pérenne	193
<i>Partie B- Approche expérimentale de l’étude de la dynamique de recolonisation d’un site naturel suite à une éradication locale</i>	197
IV-B.1. Introduction	197
IV-B.2. Matériels & Méthodes	200
IV-B.2.1. Sites d’études & présentation du dispositif expérimental.....	200
IV-B.2.2. Analyses.....	201
IV-B.3. Résultats	201
IV-B.3.1. Site intertidal du Breac’h Ver	202
IV-B.3.2. Site intertidal du Rocher des Thermes	204
IV-B.3.3. Site subtidal de la Grande Conchée	207
IV-B.4. Discussion	209
IV-B.4.1. Une recolonisation rapide post-éradication.	209
IV-B.4.2. Suivi d’une phase de déclin	211

IV.5. Conclusions	213
Chapitre V : Spores & Gamétophytes : les boîtes noires du cycle de vie d'<i>U. pinnatifida</i>	215
Préambule	217
<i>Partie A- Mise au point de marqueurs diagnostiques sur les spores de Laminariales.....</i>	219
V-A.1. Introduction	219
V-A.2. Matériels & Méthodes	221
V-A.2.1. Choix des espèces cibles	221
V-A.2.2. Recherche d'un gène cible	223
V-A.2.3. Définition des sondes d'hybridation	224
V-A.2.4. Test de spécificité du gène cible par Dot Blot	224
V-A.3. Résultats & Discussion.....	225
V-A.3.1. Choix de la région diagnostique: 18S <i>versus</i> 28S.....	225
V-A.3.2. Spécificité des tests d'hybridation sur membrane	226
V.4. Conclusions & Perspectives	230
<i>Partie B- Etude expérimentale sur la phase gamétophytique, potentiel facteur de succès pour l'établissement de nouvelles populations (dispersion et parthénogénèse)</i>	233
V-B.1. Introduction.....	233
V-B.2. Matériels & méthodes.....	234
V-B.2.1 Site d'étude et échantillonnage	234
V-B.2.2. Mise en culture.....	236
V-B.2.3. Obtention et analyses statistiques des données de sex-ratios.....	236
V-B.2.4. Obtention et analyses des données sur la capacité de fixation après détachement des gamétophytes	238
V-B.3. Résultats	238
V-B.3.1. Estimations des sexes-ratios	238
V-B.3.2. Fixation des gamétophytes	240
V-B.4. Discussion.....	241
V-B.4.1. Biais de sexes-ratios ?.....	241

V-B.4.2. Gamétophytes : agents potentiels de dispersion ?.....	243
V-B.5 Conclusion	243
Conclusions & Perspectives.....	245
A. Synthèse des résultats	247
B. Schémas de dispersion d' <i>U. pinnatifida</i> en Bretagne et implications sur le devenir de cette espèce à une échelle régionale.....	251
C. Perspectives.....	257
C.1. Etude de la possibilité d'évolution d'adaptation locale	257
C.2. Effet de la domestication sur les populations cultivées.....	261
C.3. Dispersion et recrutement en milieu naturel.....	262
BIBLIOGRAPHIE.....	267
ANNEXES.....	281

Introduction générale

Encadré 1 :

Généralités sur les introductions biologiques

Dans sa définition la plus simple, l'expression « introductions biologiques » désigne des apparitions soudaines et imprévisibles dans un écosystème d'espèces transportées de manière volontaire ou involontaire par l'homme et provenant d'une aire géographique lointaine (Carlton 1996). Ce phénomène est souvent caractérisé par une dispersion d'individus « saltatoire », à grande distance, du fait des activités humaines. Il s'oppose alors aux processus de « dispersion marginale » souvent caractéristiques des expansions naturelles s'effectuant graduellement dans le prolongement de l'aire de distribution de l'espèce (Kinlan et al. 2005). Outre la dimension spatiale, les processus d'introduction biologique diffèrent des processus naturels de modification de l'aire de distribution d'une espèce par l'échelle de temps, très courte (quelques mois, quelques années) dans le cas d'introductions biologiques.

Les invasions biologiques sont une des composantes des changements globaux et seraient la deuxième cause de diminution de biodiversité mondiale après la fragmentation des habitats (chiffre du Millenium Ecosystem Assessment cité dans Souveyran 2008). Les changements environnementaux liés aux activités humaines en zone côtière (changement climatique, artificialisation des milieux, modification du trait de côte, eutrophisation) influencent la réussite de ces introductions, qui elles même engendrent des modifications durables sur le fonctionnement et la composition des écosystèmes côtiers (Carlton 1999)

Les espèces introduites peuvent avoir un impact majeur sur les écosystèmes marins côtiers, avec de larges conséquences écologiques, évolutives et économiques (Grosholz 2002). Quand l'introduction biologique se poursuit par une prolifération de l'espèce (*i.e.* processus d' « invasion biologique » *sensu stricto*), le phénomène est généralement irréversible au moins à l'échelle humaine (Myers et al. 2000).

Quelques termes définissant les espèces impliquées dans les introductions biologiques

- Espèce introduite : espèce dont l'apparition soudaine et imprévisible depuis une aire géographique éloignée est liée aux activités humaines (Carlton 1996).
Synonyme : espèce non native, non indigène
- Espèce exotique : espèce avec une ou plusieurs populations établies en dehors de leur aire d'origine naturelle (Vellend et al. 2007).
- Espèce établie : espèce introduite se développant et se reproduisant dans le milieu naturel de façon autonome, c'est-à-dire sans nouvel apport depuis son aire d'origine (Kolar & Lodge 2001).
- Espèce invasive : espèce introduite qui s'est établie en dehors de son aire d'origine naturelle, qui s'étend à partir de son point d'introduction et qui cause ou peut causer des dommages économiques, écologiques et sociaux dans l'écosystème où elle a été introduite (Roman & Darling 2007).

Introduction générale

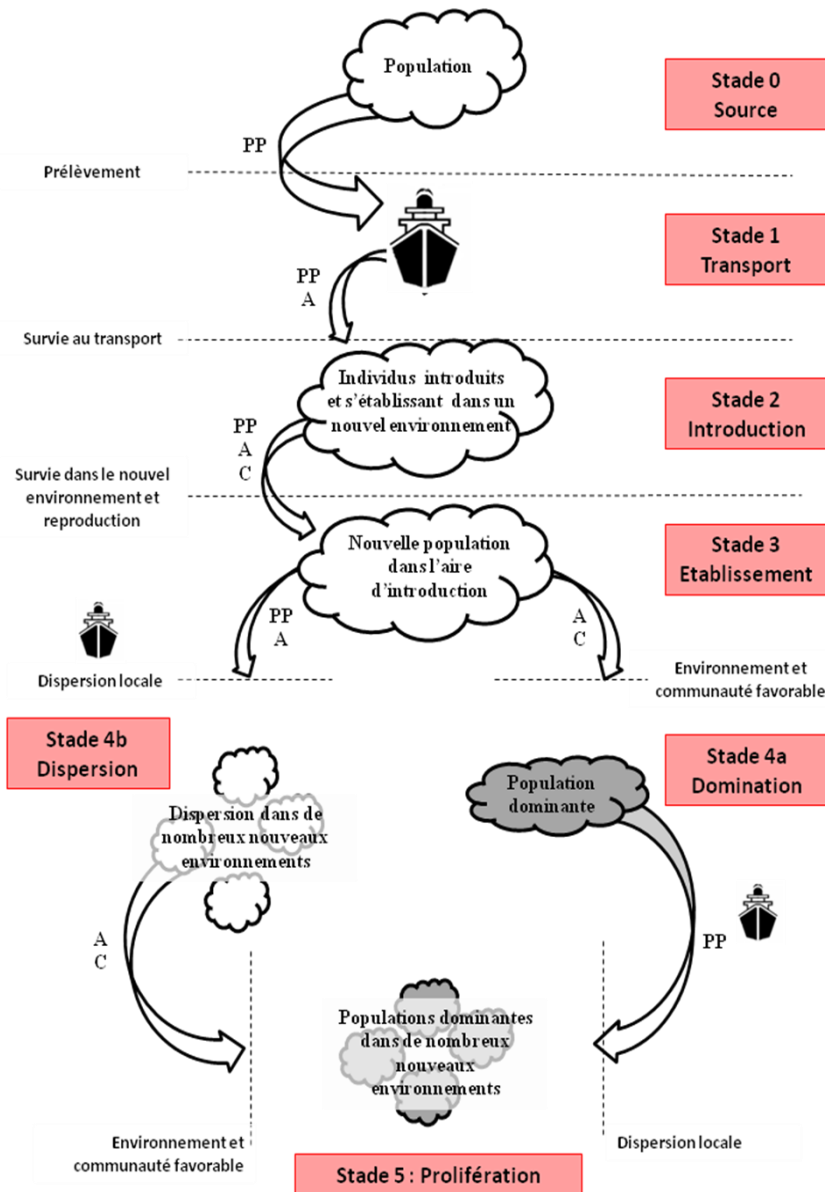
Les espèces introduites et invasives (voir Encadré 1 pour quelques définitions) sont d'excellents modèles d'études en écologie et biologie évolutive car elles offrent l'opportunité d'étudier des processus fondamentaux, par exemple comme témoin des phénomènes d'acclimatation et d'adaptation contemporaines (Sakai et al. 2001). En outre, les espèces introduites et invasives s'imposent comme des facteurs de perturbations majeurs des écosystèmes naturels et à ce titre sont l'objet de recherches appliquées notamment pour la gestion et la conservation des milieux naturels.

Dans le contexte des introductions biologiques, un grand nombre de termes est utilisé : espèces introduites, exotiques, invasives, non natives, non indigènes pour n'en citer que quelques uns. Cette terminologie fait souvent l'objet de débats animés entre autres pour déterminer s'ils recouvrent les mêmes processus. Le succès de l'introduction d'une espèce non indigène dans un nouvel environnement découle en effet d'une cascade de processus, impliquant le franchissement de différentes barrières ou filtres (Encadré 2). Les espèces introduites ne réussissant d'ailleurs pas systématiquement le passage de chacune de ces étapes, Williamson & Fitter (1996) ont suggéré que seul 1% des espèces importées s'établit durablement et devient « nuisible » (*i.e.* la règle des dixièmes).

Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis intéressée à la phase d'établissement de l'algue brune *Undaria pinnatifida* dans une de ses principales zones d'introduction, les côtes du littoral breton. Selon les auteurs, les critères et les zones d'études, cette algue a été qualifiée alternativement d'espèce introduite ou d'espèce invasive, deux termes que j'utiliserai également dans ce document. Au cours de cette introduction générale, je présenterai quelques unes des caractéristiques et connaissances déjà acquises sur les macroalgues introduites en général et sur *Undaria pinnatifida* en particulier avant de présenter les objectifs d'étude de cette thèse.

Encadré 2 : Les différentes étapes du processus d'introduction biologique

Tiré d'Occhipinti-Ambrogi (2007)



Le passage d'une étape à la suivante implique le franchissement de barrières (ou filtres) représentées dans ce schéma par des lignes pointillées. Trois paramètres sont ici considérés pour expliquer le passage d'un stade au suivant : la pression en propagules (PP), les conditions du milieu (A) et les interactions avec la communauté envahie (AC).

Cinq étapes ont été décrites dans ce processus d'introduction biologique :

- le stade 0 correspond à des espèces natives, dans leur aire d'origine ;
- le stade 1 concerne l'étape de transport par l'homme hors de l'aire naturelle de l'espèce ;
- le stade 2 correspond aux individus relargués dans un nouvel environnement, hors de leur aire de répartition naturelle
- le stade 3 correspondant à l'établissement d'une population durable (*i.e.* l'espèce a rencontré des conditions favorables à sa survie et à sa reproduction)
- le stade 4 correspond à l'augmentation démographique de la population initiale (stade 4a) ou à la dispersion d'individus au delà du point initial d'introduction (stade 4b).
- le stade 5 est défini par une espèce exotique se développant largement en dehors de son point d'introduction et en forte densité.

1. Les macroalgues, modèles et témoins des invasions biologiques

1.1. Quelle place ont les macroalgues parmi les espèces introduites ?

Seules *Caulerpa taxifolia* et *Undaria pinnatifida* sont inscrites sur la liste de référence des 100 espèces (tout phylum confondu) les plus invasives (Lowe et al. 2004). Les macroalgues représentent néanmoins une composante significative des espèces introduites à l'échelle mondiale. Williams & Smith (2007) avancent le chiffre de 277 macroalgues introduites à l'échelle mondiale, avec un total de 408 événements spatiaux distincts d'introductions (certaines espèces ayant été introduites dans plusieurs régions). A une échelle mondiale, et en termes de nombre d'espèces, les macro-algues se positionnent au troisième rang derrière les crustacés et les mollusques et représentent 13.98% des espèces introduites (Molnar et al. 2008). Il existe cependant des disparités régionales importantes, les mêmes auteurs soulignent que la Méditerranée apparaît comme la région la plus sujette à ces introductions avec 132 événements d'introduction de macro-algues (Figure 1).

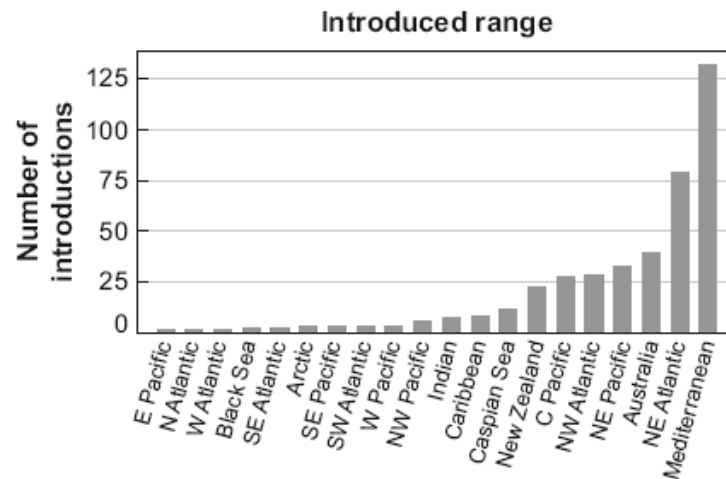


Figure 1 : Nombre d'événements d'introduction dans différentes régions du globe.

Figure issue de Williams & Smith (2007)

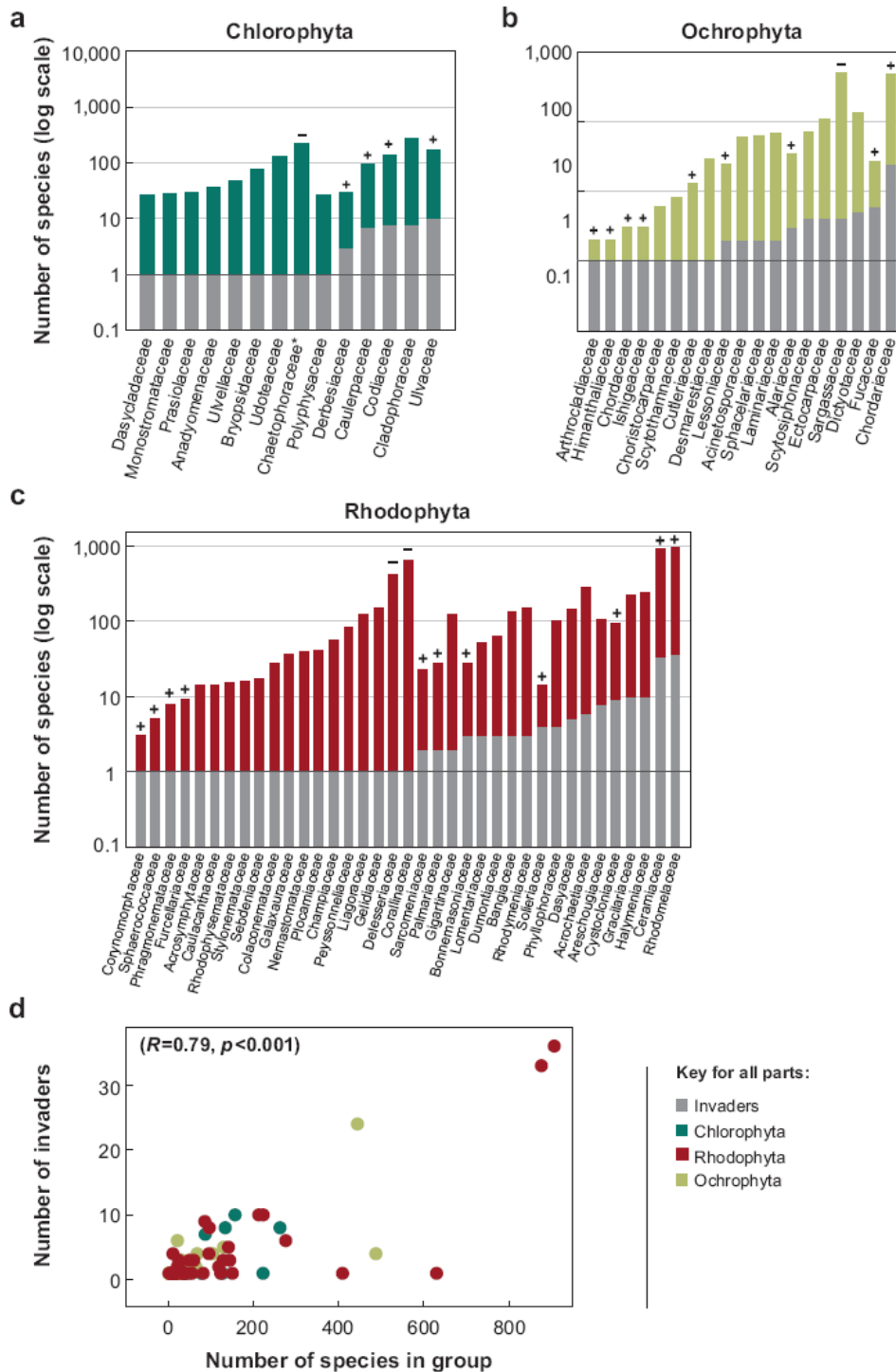


Figure 2 : Nombre d'espèces d'algues dont les algues introduites (en gris) par famille pour (A) les Chlorophytes, (B) les Ochrophytes (actuellement, Heterokontophytes) et (C) pour les Rhodophytes.

Figure issue de Williams & Smith (2007)

Les signes + et – désignent respectivement les familles dans lesquelles il existe plus ou moins d'espèces introduites que ce qui pourrait être attendue sous le seul effet du hasard (test binomial, au seuil de 5%).

Aux côtés des disparités régionales, Williams & Smith (2007) soulignent également des disparités taxonomiques. Sur l'ensemble des 277 espèces répertoriées par ces auteurs, on trouve 165 Rhodophytes (algues rouges), 66 Ochrophytes (algues brunes, ou Heterokontophyta), 45 Chlorophytes (algues vertes) et 1 Charophyte. Les familles contribuent également de façon différentielle, les plus grandes contribuant le plus aux espèces introduites recensées (Figure 2a-c). Outre une augmentation simplement proportionnelle à la taille de la famille ; Figure 2d), il a été suggéré que cette taille de famille soit également indicative d'une plus grande diversité de traits de vie, de capacités adaptatives, de plasticité physiologique qui au final accroitraient le nombre d'espèces réussissant leur introduction. Ainsi ces auteurs suggèrent de prêter une attention particulière sur des familles qui ont une plus grande probabilité de succès d'invasion, succès mesuré par le fait qu'elles contiennent des genres et/ou espèces reconnues comme les plus invasives et/ou menaçantes. Il s'agit des espèces des genres *Asparagopsis*, *Caulerpa*, *Codium*, *Fucus*, *Hypnea* et *Undaria*.

1.2. Quelles sont les impacts et les conséquences des introductions biologiques?

Le précédent paragraphe nous a permis de souligner que les macro-algues représentent une proportion importante des espèces introduites en milieu marin. Selon la règle des dixièmes de Williamson & Fitter 1996, au minimum 1% d'entre elles devraient être des espèces particulièrement « nuisibles ». Il n'est pas facile de confronter ce postulat à la réalité de terrain. En effet, comme Williams & Smith (2007) l'ont souligné, trop peu d'études ont été menées sur les conséquences notamment écologiques de l'introduction des macroalgues. Seules 17 des 277 espèces d'algues introduites ont en effet fait l'objet de telles études.

En termes de nombre d'études, les plus étudiées sont *Sargassum muticum* et *Caulerpa taxifolia*. De façon surprenante compte-tenu de sa position dans la liste des « 100 espèces les plus invasive » (Lowe et al. 2004), *U. pinnatifida* est parmi les moins étudiées.

Plusieurs types d'effets écologiques et évolutifs peuvent être observés suite à l'introduction d'une espèce non-indigène.

(1) des changements affectant l'espèce introduite elle-même, dans l'aire d'introduction. En effet, des changements dans l'expression des gènes, l'allocation aux ressources, les caractères phénotypiques, etc. peuvent être observés suite à des processus d'acclimatation. De tels changements peuvent se produire assez rapidement : les phases de

latence (période où l'espèce est discrète et précédant une période d'augmentation de sa présence/abondance) ont souvent été attribuées à cette étape d'acclimatation. D'autres changements s'établissant sur un plus long terme peuvent également se produire tels que l'évolution d'adaptations au nouvel environnement par sélection ou des hybridations avec une espèce déjà présente dans l'habitat envahi (Strayer et al. 2006, Vellend et al. 2007). Sur ce dernier point, un exemple qui ne concerne pas les macroalgues mais qui a été extrêmement bien documenté est celui de l'introduction de la spartine en France, *Spartina alterniflora*. Celle-ci s'est croisée avec l'espèce native *Spartina maritima*, pour donner un hybride stérile diploïde, *Spartina townsendii* puis un hybride fertile tétraploïde envahissant, *Spartina anglica* (Gouletquer et al. 2002)

(2) des changements de structure, de diversité et de fonction au sein des communautés envahies. Les espèces invasives peuvent changer les caractéristiques générales d'habitat de l'écosystème et induire de profonds changements dans les communautés envahies. Elles peuvent alors être considérées comme des espèces « ingénieures » (Jones et al. 1994). Ces changements peuvent être cumulatifs et lents, se mettant en place sur plusieurs années. Par exemple, des changements significatifs dans la structure de la composition en macroalgues avec l'augmentation en abondance de *Sargassum muticum* ont été montrés au Danemark (Staehr et al. 2000). La prolifération d'une espèce invasive peut représenter une opportunité ou un stress pour les autres membres de la communauté. Elle peut ainsi modifier les interactions espèce-espèce (ex. prédation/herbivorie, relations hôtes-parasites) voire les cycles de vie des espèces natives. C'est par exemple le cas avec le gastéropode herbivore *Elysia viridis* dont la métamorphose des larves est induite par certaines espèces d'algue verte dont le genre *Cladophora*, broutées de façon préférentielle par les adultes. Suite à l'introduction de *Codium fragile* ssp. *tomentosoïdes* un changement d'hôte algal a été observé avec une induction de la métamorphose des larves du gastéropode par cette nouvelle espèce (Trowbridge & Todd 2001). Des interactions plus indirectes peuvent également se mettre en place, par exemple, *Sargassum muticum* a un effet indirect sur les oursins en créant des ombrages. Cette espèce affecte négativement les algues, servant de nourriture aux oursins (références dans Williams & Smith 2007).

Ces conséquences s'expriment sur des échelles de temps variables (de quelques jours à plusieurs années) et des échelles spatiales différentes (un site *versus* une région

d'introduction). Elles sont fonction de la dynamique spatio-temporelle de l'expansion de l'espèce dans la région d'introduction.

1.3. Les profils d'expansion sont-ils similaires chez toutes les macroalgues ?

Les informations sur l'aire occupée par les macroalgues introduites font cependant souvent défaut, excepté dans quelques cas où des prospections en plongée (Meinesz 2007) ou des relevés par télédétection (ex. *Caulerpa taxifolia*) ont été utilisés pour produire des cartes détaillées. Les suivis répétés sur une large échelle spatiale pour déterminer la distribution des macroalgues invasives à travers le temps sont particulièrement rares (Lyons & Scheibling 2009), excluant donc la **dynamique spatio-temporelle de l'invasion**. Or cette dynamique de l'installation d'une nouvelle espèce dans une région est une composante fondamentale dans la compréhension du processus d'invasion biologique (cf. Encadré 2) ainsi que pour son contrôle.

L'étude de Lyons & Scheibling (2009) est à ce titre particulièrement intéressante. Ces auteurs ont en effet utilisé des données disponibles dans la littérature pour étudier la dynamique spatio-temporelle de l'invasion sur 8 espèces de macroalgues. Les taux d'expansion spatiale estimés par Lyons & Scheibling (2009) seraient de l'ordre de 10 à 100 kilomètres par an selon les espèces et les régions. Cependant, ces expansions spatiales ne sont pas linéaires au cours du temps : les auteurs ont noté en général des phases de grandes expansions géographiques mais qui sont rares au cours du temps (expansion par vagues). Ces modalités de l'expansion au sein des régions d'introduction varient fortement entre espèces pour une même région d'introduction ainsi qu'entre régions pour une même espèce. Par exemple, l'expansion de *Sargassum muticum* (Figure 3d), d'*U. pinnatifida* (Figure 3e) et de *Caulerpa taxifolia* (Figure 3b) est plus importante en Méditerranée que dans les autres régions où ces espèces ont été introduites. *Sargassum muticum* (Figure 4c) s'étend plus rapidement qu'*U. pinnatifida* dans l'Atlantique Nord Est alors que l'inverse est observé en Méditerranée (Figure 4a) et dans le Pacifique Nord Est (Figure 4f).

Ces résultats soulignent que suite à leur introduction initiale, les espèces s'étendent de manière variable au sein de l'aire d'introduction par des mécanismes agissant sur de courtes

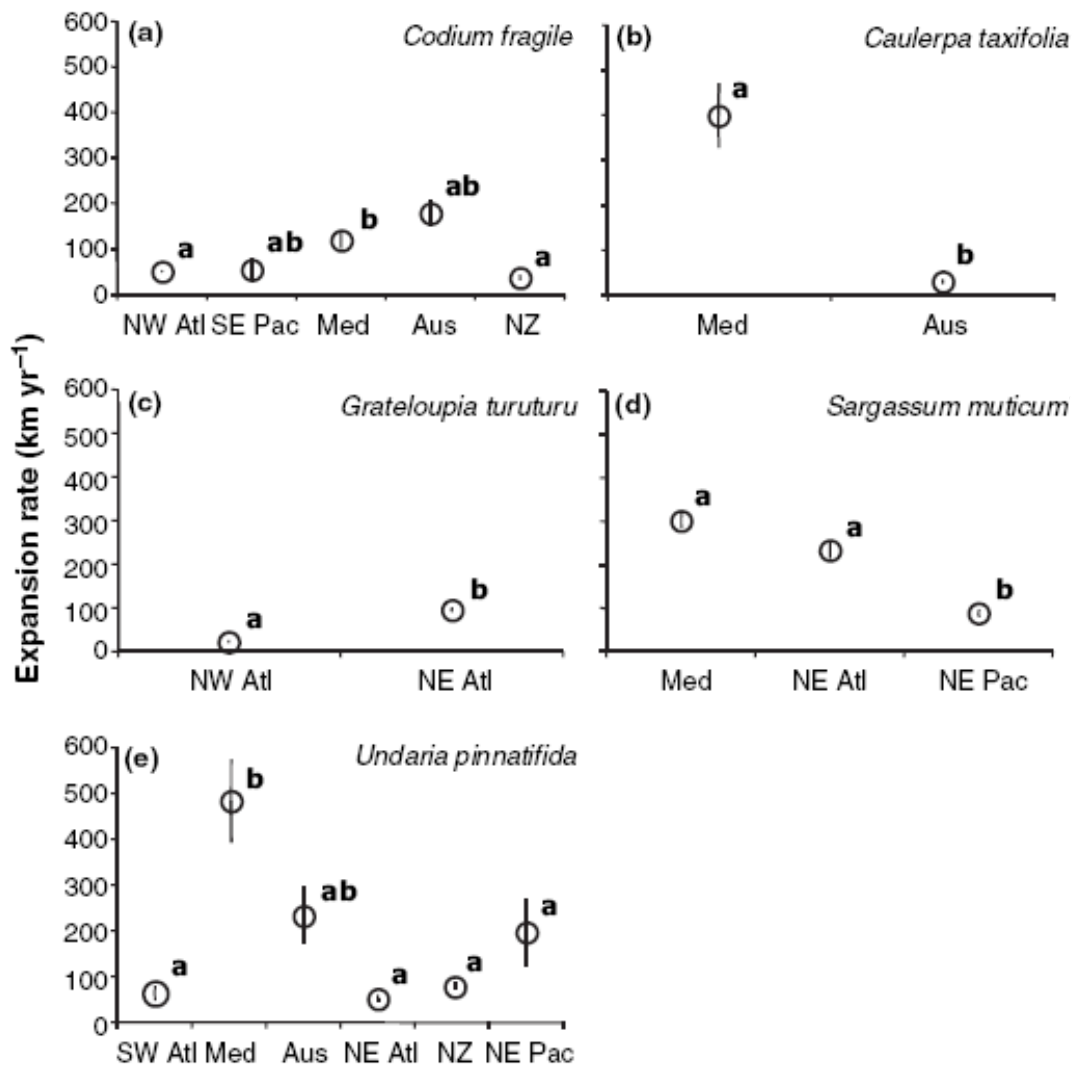


Figure 3 : Comparaison des taux d'expansion de 5 espèces de macroalgues en fonction des régions d'introduction.

Figure issue de Lyons & Scheibling (2009)

Les régions considérées sont : Atlantique Nord Ouest (NW Atl), Pacifique Sud Est (SE Pac), Mer Méditerranée (Med), Australie Est (Aus), Nouvelle Zélande (NZ), Atlantique Nord Est (NE Atl), Pacifique Nord Est (NE Pac) et Atlantique Sud Est (SW Atl).

Les symboles à l'intérieur de chacun des petits cercles représentent l'écart-type.

Test F et Test du Tukey ($P > 0.05$)

Par exemple, pour *U. pinnatifida* dans la figure (e), SW Atl (a) significativement \neq de Med (b) ;

SW Atl (a) n'est pas significativement \neq de NE Atl (a) ;

SW Atl (a) n'est pas significativement \neq d'Aus (ab) ;

Med (b) n'est pas significativement \neq d'Aus(ab) ;

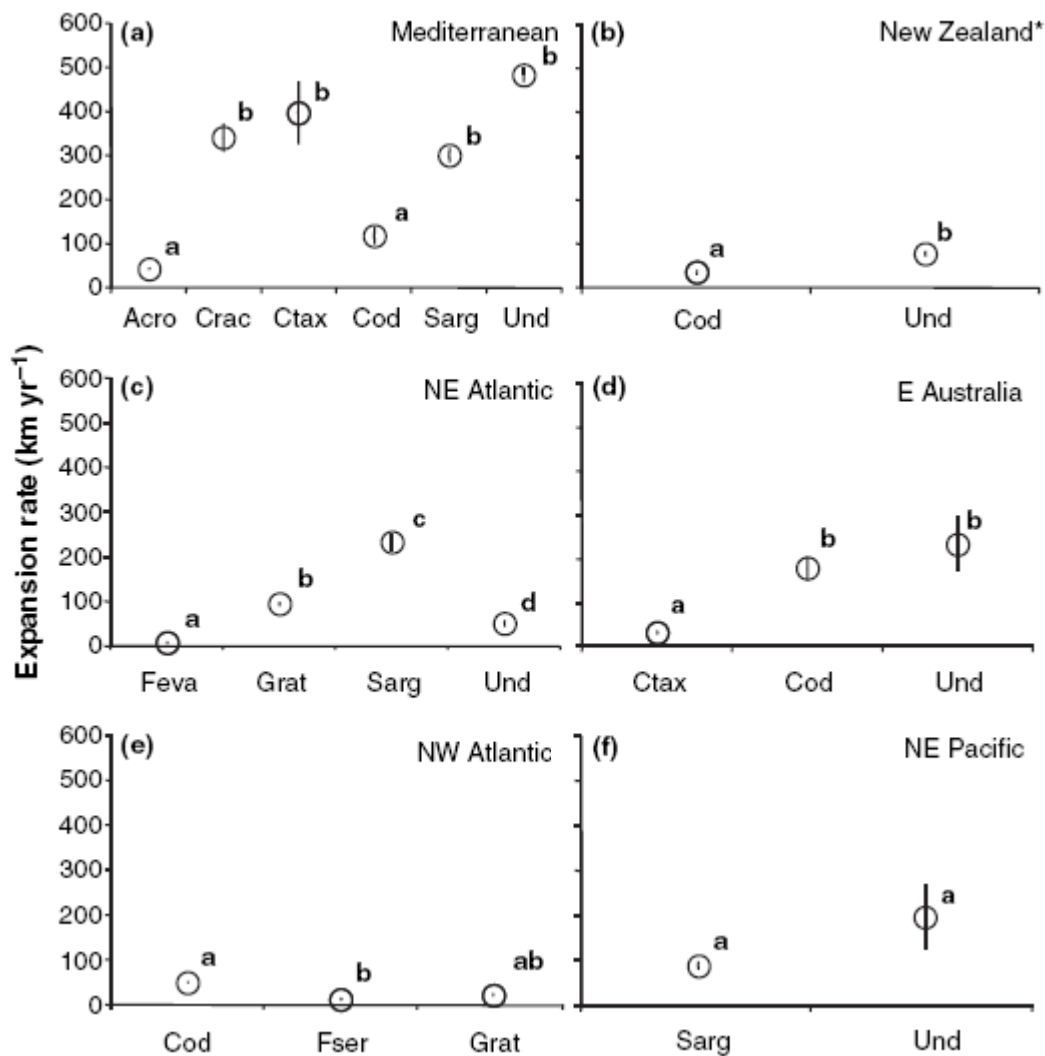


Figure 4 : Comparaison des taux d'expansion entre plusieurs espèces de macroalgues pour une même région d'introduction.

Figure issue de Lyons & Scheibling (2009)

Les espèces sont *Acrothamnion preissii* (Acro), *Undaria pinnatifida* (Und), *Codium fragile* (Cod), *Caulerpa taxifolia* (Ctax), *Caulerpa racemosa* (Crac), *Sargassum muticum* (Sarg), *Fucus evanescens* (Feva), *Grateloupia preissii* (Grat) et *Fucus serratus* (Fser).

Les régions considérées sont : Atlantique Nord Ouest (NW Atl), Mer Méditerranée (Med), Australie Est (Aus), Nouvelle Zélande (NZ) et Pacifique Nord Est (NE Pac).

Pour Légende, voir Figure 3

échelles spatiales et temporelles en fonction des traits d'histoire de vie (cf. Introduction 1.4) et des vecteurs de dispersion (cf. Introduction 2.2 et 2.3). Une phase de latence est généralement observée entre la phase d'introduction initiale et d'expansion. Ce phénomène correspond au temps requis pour une espèce à s'acclimater et/ou s'adapter à son nouvel environnement (ex. évolution des traits d'histoire de vie afin de survivre et de se reproduire). Cette phase est variable selon l'espèce considérée et l'habitat envahi.

Ainsi, bien qu'encore trop peu documentée, il semble exister une grande variabilité dans les schémas spatio-temporels d'expansion des macroalgues introduites.

1.4. Existe-t-il des traits d'histoires de vie communs aux macroalgues introduites ?

Beaucoup d'auteurs se sont posé la question de l'existence de caractéristiques typiques des espèces introduites avec succès (Nyberg & Wallentinus 2005, Sakai et al. 2001, Valentine et al. 2007).

Parmi les caractéristiques des espèces introduites qui pourraient favoriser leur succès, la capacité à pouvoir se disperser par de **multiples vecteurs naturels de dispersion** revient de façon récurrente dans la littérature (cf 2.2). Le succès d'une espèce introduite peut être également fonction des **modalités de la reproduction** (Sakai et al. 2001): par exemple la possibilité de se reproduire par autofécondation ou par reproduction asexuée (parthénogénèse, reproduction clonale) ou encore d'avoir une maturité sexuelle précoce peut conférer un avantage aux espèces introduites. C'est notamment le cas de *Caulerpa taxifolia* qui doit une part de son succès d'invasion à sa capacité de régénération et de multiplication clonale à partir de petits fragments. Une **grande tolérance aux fluctuations environnementales** et une capacité d'**adaptation ou d'acclimatation aux stress environnementaux** est une autre caractéristique retenue (Boudouresque & Verlaque 2002). Par exemple, la tolérance aux polluants pourrait être un avantage pour l'établissement dans des habitats urbanisés tels que les zones portuaires, points d'entrée de nombreuses introductions. Un autre trait important est la capacité à **s'établir sur une grande variété de substrats**, allant du sable jusqu'aux surfaces artificielles.

Un grand nombre de traits d'histoire de vie ont ainsi été proposés comme étant important dans le succès d'introduction des macroalgues. L'ensemble de ces traits d'histoire de vie contribuent à la définition des espèces à stratégie R : grande fécondité, croissance rapide, temps de génération très court. Cependant, l'ensemble des traits cités ne sont pas tous rencontrés chez les macroalgues introduites. Valentine et al. (2007) ont effectué une étude portant sur huit traits d'histoire de vie sur cinq macroalgues, reconnues pour être particulièrement invasives. Ces caractéristiques sont présentées dans le Tableau 1 qui permet de voir une grande variabilité pour ces traits d'histoire de vie.

Tableau 1 : Comparaison de quelques traits d'histoires de vie entre cinq espèces de macroalgues reconnues comme étant parmi les plus invasives.

Traduit et adapté de la Table 1 de Valentine et al. (2007)

	Espèces de macroalgues				
	<i>Caulerpa taxifolia</i>	<i>Fucus serratus</i>	<i>Codium fragile</i> ssp. <i>tomensoïdes</i>	<i>Sargassum muticum</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>
Durée de vie	Pérenne (en lien avec la clonalité)	Pérenne	Pérenne	Longue	Annuelle
Résistance à l'herbivorie	Elevée	Elevée	Modérée	Modérée	Faible
Taux de croissance	Fort	Faible	Fort	Fort	Fort
Episodes de reproduction annuelle	Répétés	Répétés	Répétés	Répétés	Variables
Reproduction végétative	Oui	Non	Oui	Non	(1)
Nombre de propagules	-	Modéré	Elevé	Modéré	Elevé
Taille des propagules	-	Grande	Petite	Grande	Petite

(1) Reproduction parthénogénétique réalisée en laboratoire uniquement

Chez les macroalgues, comme cela a été déjà observé dans de nombreux autres groupes taxonomiques, il est donc difficile de donner un « profil type » d'une espèce invasive à partir de l'analyse de ses seuls traits d'histoire de vie.

1.5. Caractéristiques de la zone receveuse (*i.e.* habitat envahi)

Les propriétés de la zone envahie peuvent être d'une importance majeure dans le succès de l'introduction et de l'expansion d'une espèce introduite (Dunstan & Johnson 2007).

La composition et les caractéristiques de la communauté envahie jouent un rôle primordial : la **présence de niches vides, sous ou non utilisées** par les espèces natives a été montrée comme propice aux invasions. Les zones avec une **faible diversité spécifique** tendent également à être plus rapidement envahies que les zones caractérisées par une forte richesse spécifique. Une diminution de la diversité spécifique peut s'accompagner d'une diminution de la compétition interspécifique et d'une augmentation de la disponibilité en ressources et en espace facilitant l'installation d'une nouvelle espèce (Valentine et al. 2007). Enfin, l'**absence d'« ennemi »** (*i.e.* prédateurs, parasites, etc) dans la zone receveuse est un atout pour l'installation d'une nouvelle espèce. Celle-ci pourra investir ses ressources dans la croissance et la reproduction plutôt que dans la défense contre les espèces natives.

Une autre caractéristique très importante, fréquemment citée pour expliquer la réussite d'une invasion est la **fréquence et l'intensité des perturbations environnementales**. Des expériences d'éradication suivies d'observations de la recolonisation par les espèces natives et introduites ont souvent documenté un avantage à l'installation des espèces introduites qui « occupent » plus rapidement l'espace que les espèces natives (ex. *Sargassum muticum*, Britton-Simmons 2004). Ce facteur a été en particulier très étudié et souligné dans le cas de la Méditerranée, qui apparaît comme la région côtière la plus envahie en macroalgues au niveau mondial selon Williams & Smith (2007). Or, elle est selon ces auteurs également une des régions côtières les plus dégradées. Cette dégradation résulte de la surexploitation des ressources marines, de modifications de l'habitat, de phénomènes d'eutrophisation, se traduisant par des changements globaux à l'échelle des écosystèmes. Ces changements ont été par exemple mis en lien avec le succès de l'invasion de *Caulerpa taxifolia*. De plus, la Méditerranée est en très forte interaction avec de nombreuses activités humaines. Plaque tournante du commerce, avec un haut niveau d'activités maritimes connectant un grand nombre de ports à proximité de la côte, elle présente également une activité aquacole grandissante. Toutes ces activités la rendent particulièrement vulnérable à l'introduction d'espèces et à l'expansion de celles-ci.

Les **habitats dégradés, perturbés ou encore artificiels** semblent ainsi particulièrement favorables à l'installation puis **l'expansion des macroalgues introduites**.

2. Vecteurs intervenant dans l'expansion locale et globale des macroalgues introduites

La définition même du processus d'introduction et des étapes conduisant à définir le processus d'invasion biologique repose sur la compréhension des schémas de dispersion : la dispersion est une étape clé intervenant à chaque étape du processus d'introduction biologique et conduisant à l'installation durable des espèces introduites.

Je consacrerai donc un large chapitre de cette introduction à ce processus qu'on peut schématiquement scinder en trois catégories : (1) la dispersion à très longue distance liée aux activités humaines lors de l'introduction entre l'aire de distribution naturelle et la région nouvellement colonisée (*i.e.* introduction primaire); (2) la dispersion entre différentes régions d'introductions (*i.e.* introductions secondaires) également sous l'effet des activités anthropiques et (3) la dispersion au sein de la région d'introduction sous la dépendance de vecteurs naturels en lien avec le cycle de vie ou de vecteurs anthropiques. Cette dernière catégorie est au cœur de mon travail de thèse.

2.1. Pression en propagules et dispersion

Bien que les traits d'histoire de vie et la qualité de l'habitat receveur jouent un rôle majeur dans la réussite d'une introduction biologique (Colautti et al. 2006), le rôle de la « pression en propagule » a également été reconnu comme un paramètre clé dans le succès de l'introduction car corrélé à la probabilité d'introduction (Lockwood et al. 2005 ; Simberloff 2009). La « **pression en propagules** » est définie comme la fréquence et le nombre d'individus, capables de poursuivre le cycle de vie de l'espèce (ex. individus pouvant se reproduire, fragments d'individus pouvant se régénérer, spores, graines chez les plantes terrestres, larves des invertébrés, etc.) qui sont relâchés en dehors de leur aire d'origine (Wilson et al. 2009). Cette « pression » n'est pas facilement mesurable, excepté lors d'introductions intentionnelles d'espèces (ex. transport de souches commerciales ou à des fins de restauration). Néanmoins, elle peut être corrélée avec des variables estimant l'intensité des possibilités d'introduction, telles que l'estimation de la quantité d'eau de ballast déchargée, le nombre de bateaux ou encore la présence d'épibiontes dans les cultures d'huîtres (Colautti et al. 2006).

L'accroissement du nombre de propagules introduites limite le risque démographique d'extinction, augmente le nombre d'individus pouvant coloniser de nouveaux espaces et accroît la probabilité d'acclimatation ou d'adaptation par introduction d'individus présentant une plus grande variabilité phénotypique et génétique. La récurrence d'introduction, en particulier quand elle provient de sources variées, peut notamment augmenter la diversité génétique, compenser les phénomènes de dépression de consanguinité ou de dérive génétique et augmenter la base sur laquelle peuvent s'exercer les processus sélectifs conduisant à l'adaptation des individus au nouvel environnement (Figure 5; Roman & Darling 2007); (Simberloff 2009).

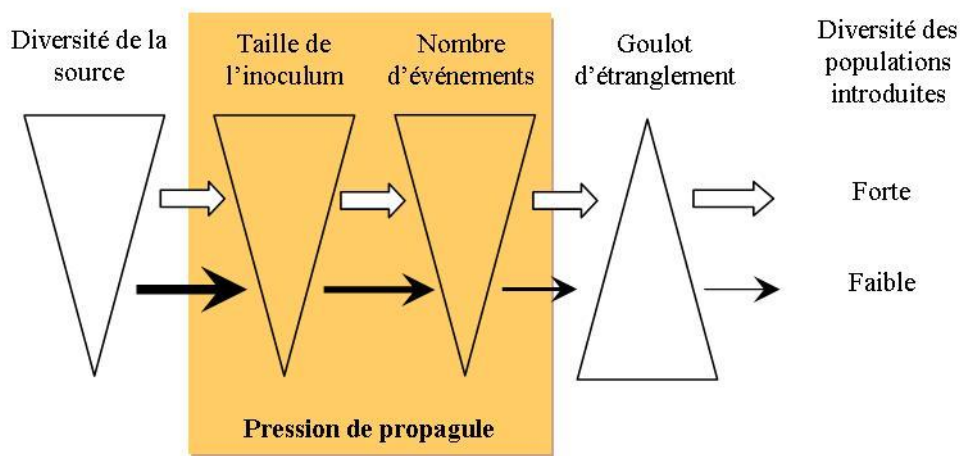


Figure 5 : Rôle de la pression en propagules sur la diversité génétique de populations introduites.

Figure issue de Roman & Darling (2007)

Chaque triangle indique l'importance du facteur considéré (décroissant à partir de la base). L'épaisseur de la flèche indique la diversité génétique conservée par comparaison avec la population source.

La zone encadrée rend compte de la pression en propagules.

Cette figure illustre que les populations invasives diversifiées génétiquement sont probablement dérivées de populations sources diversifiées génétiquement et n'ayant pas subi de forts goulots d'étranglement grâce à une importante pression en propagules.

Au sein de l'aire d'introduction, un grand nombre de vecteurs naturels ou anthropiques (ex. aquaculture) apporte un nombre variable d'individus avec des fréquences différentes, sur des échelles spatiales et temporelles différentes. Ces vecteurs ou sources agissent en parallèle ou de façon séquentielle, créant ainsi une dynamique spatio-temporelle très complexe et multidirectionnelle au sein de la zone envahie (cf. Introduction 2.2).

2.2. Vecteurs & facteurs de dispersion naturelle des macroalgues

Une importante diversité et complexité des cycles de vie et de reproduction est présente chez les algues. Chez de nombreuses macroalgues, et en particulier chez le modèle d'étude de cette thèse (*Undaria pinnatifida*), le cycle de vie comporte une alternance de générations haploïdes et diploïdes appelées respectivement gamétophyte et sporophyte. Ces deux générations peuvent se ressembler (isomorphes) ou non (hétéromorphes). Par exemple dans le cas des Laminaires, on observe un cycle hétéromorphe caractérisé par une alternance entre un stade gamétophytique microscopique (quelques dizaines à quelques centaines de microns) et un stade sporophytique macroscopique (le seul visible en milieu naturel). Avec ce cycle de vie multiphasique, plusieurs vecteurs de dispersion naturelle potentielle existent.

Les **spores** et les **gamètes mâles** sont des vecteurs importants car libres dans la colonne d'eau et émis en très grande quantité. Ils ont en revanche une courte durée de vie (de quelques minutes à quelques jours). Ainsi, les gamètes mâles de nombreuses macroalgues (voir la revue de Maier & Muller 1986), dirigés par des phéromones, ne parcourent que quelques millimètres pour aller féconder l'oogone. Bien que de récentes études suggèrent que le potentiel de dispersion de ces propagules ait été sous-estimé (Gaylord et al. 2002 ; Gaylord et al. 2006), il semble peu probable que seule la dispersion de ce type de propagules puisse expliquer des événements de dispersion à longue distance. En effet, des études d'éradication-recolonisation (ex. *Postelsia palmaeformis*; Dayton 1973) ou tout simplement de colonisation de récifs artificiels (ex. *Macrocystis pyrifera* ; Reed et al. 2004) montrent que les nouvelles recrues s'établissent rapidement et à quelques mètres de leur parent sporophyte (aussi voir revue de Santelices 1990).

Cependant, ces particules microscopiques peuvent être véhiculées sur de plus grandes distances par des **sporophytes adultes matures détachés** (Norton 1992). Hernandez-Carmona et al. (2006) montrent par exemple que les thalles en épave de sporophytes de *Macrocystis pyrifera* pouvaient être à l'origine de spores viables après des transports sur plusieurs centaines de kilomètres. Des événements à de telles distances sont rares, mais pour les espèces qui se reproduisent végétativement (ex. *Codium fragile* ssp. *tomentosoïdes*), qui s'autofécondent comme l'espèce monoïque *Sargassum muticum*, ou qui produisent des spores se différenciant en gamétophytes des deux sexes (ex. *Undaria pinnatifida*), un simple morceau de thalle peut être à l'origine de l'établissement d'une nouvelle population sur des

distances bien plus élevées que celles parcourues par les gamètes ou les spores seules (Norton 1992).

De nombreux facteurs biologiques et/ou physiques sont susceptibles d'influencer l'efficacité de la dispersion par ces vecteurs naturels. Quelques uns de ces facteurs sont listés ci-dessous :

- **la durée de la phase libre dans la colonne d'eau** : plus celle-ci sera courte, moins les propagules auront de chance de parcourir de longues distance. Généralement, chez les macroalgues, cette phase ne dure que quelques heures à quelques jours. Dans des zones à forts courants, cette durée de vie peut néanmoins être suffisante pour parcourir plusieurs dizaines de kilomètres. En revanche, les **vitesse de nage des spores flagellées** est tellement petite (0.0013 à 0.0033cm/sec ; estimé par Suto 1950) qu'elles ne semblent pas interagir avec les paramètres physiques (courants) du milieu. Le **poids** et **l'agrégation** dans des mucilages peuvent en revanche influencer la durée de la phase pélagique. Par exemple, les propagules de *Sargassum muticum* sembleraient couler 5 à 10 fois plus vite que les propagules d'autres espèces (Deysher & Norton 1982).

- Le **nombre de spores émises par sporophyte** : le nombre peut être particulièrement élevé, par exemple il est estimé à $4,3 \cdot 10^8$ par sporophyte et par heure chez *U. pinnatifida* ; cette valeur est similaire voire plus faible que celle observée chez d'autres macroalgues (Hewitt et al. 2005).

- La **position des organes de reproduction** (ex. la hauteur à laquelle les spores sont relâchées) (Norton 1992). Par exemple, le sporophylle (*i.e.* structure de reproduction) de *Macrocystis pyrifera* se trouve à la base de l'algue, pouvant mesurer jusqu'à 60m de long. Les spores auront tendance à se poser près du parent sporophyte. Tandis que pour *Laminaria hyperborea*, par exemple, mesurant jusqu'à 3m, les spores sont relâchées par les sores, situés sur les extrémités des frondes (Fredriksen et al. 1995).

- Le **synchronisme de la reproduction** : les distances de dispersion peuvent être augmentées si le largage de spores se produit au même moment, pour la même espèce (*i.e.* reproduction synchrone ; Reed et al. 1997).

- La **viabilité et la capacité de fixation** des spores : celle-ci diminue avec le temps passé dans la colonne d'eau (Reed 1992).

- Les processus de **prédation** dans la colonne d'eau : les moules, *Mytilus edulis*, sont des filtreurs et se nourrissent de la matière organique présente dans la colonne d'eau, y compris des spores de macroalgues tels que *Postelsia palmaeformis*. Ainsi les filtreurs affectent fortement la densité de spores dans la colonne d'eau réduisant l'efficacité du recrutement global (Dayton 1973).

En parallèle des facteurs naturels biologiques, il existe également une multitude de facteurs naturels physiques influençant la dispersion des macroalgues. La **force et la direction du courant** ont une action prépondérante sur la dispersion des propagules et des sporophytes matures dérivants. Par exemple, Forrest et al. (2000) ont estimé qu'*Undaria pinnatifida* pouvait se disperser sur quelques centaines de mètres à quelques kilomètres par an grâce à la combinaison des sporophytes matures dérivants et des conditions hydrodynamiques de la zone considérée (Forrest et al. 2000). Un second facteur est l'**exposition** des habitats. Une étude menée sur *Postelsia palmaeformis*, espèce installée dans une zone battue, a montré que la force des vagues pouvait déloger le sporophyte ou arracher des frondes fertiles, augmentant ainsi la distance potentielle de dispersion (Dayton 1973). Un autre facteur, l'**existence d'événements épisodiques** tels que les tempêtes, ouragans, tornades ont pour effet d'augmenter la dispersion des macroalgues, en particulier si ces événements coïncident avec la saison de reproduction de l'espèce (Reed et al. 1997).

2.3. Vecteurs de dispersion anthropique

Il existe une très grande diversité de vecteurs d'introduction d'espèces exotiques, et ce quels que soient les phyla (voir par exemple, « Panel » 2 dans la revue de Molnar et al. (2008). Cette diversité de vecteurs se retrouve chez les macroalgues (Figure 6). Williams & Smith (2007) notent néanmoins que le commerce maritime (via les salissures sur les coques des navires ou les eaux de ballast) et l'aquaculture sont responsables de 85% des introductions pour lesquelles les vecteurs ont pu être identifiés. Je détaillerai donc ici ces deux types de vecteurs qui peuvent jouer de façon simultanée pour une même espèce (Tableau 2) et qui sont également impliqués dans les introductions secondaires et au sein de l'aire d'introduction.

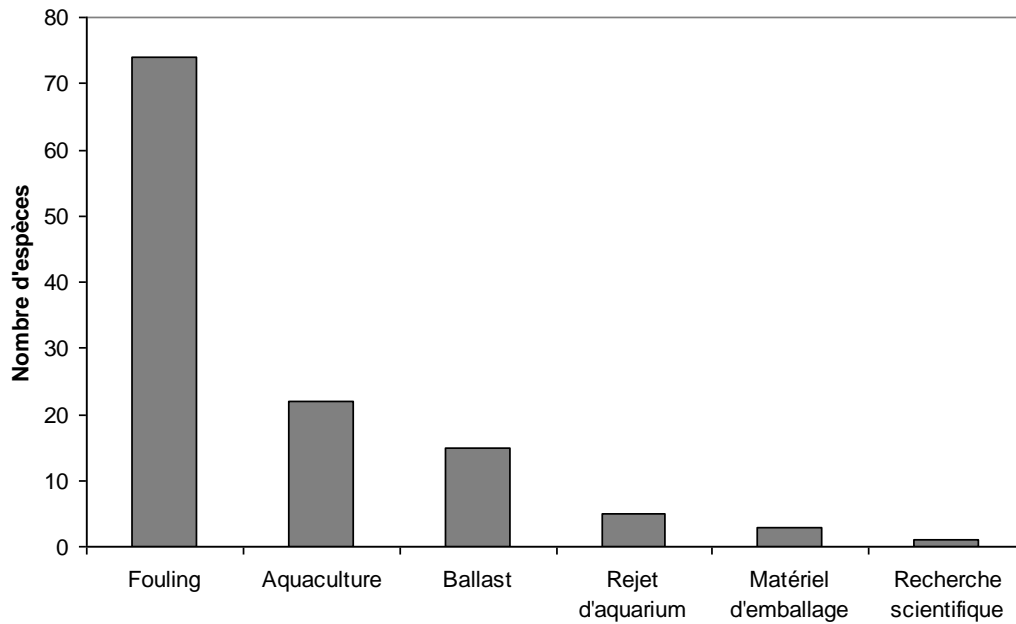


Figure 6 Vecteurs d'introductions de macroalgues et nombre d'espèces associées

Figure issue d'Hewitt et al. (2007)

Note : Une même espèce peut être introduite par plusieurs vecteurs (cf. tableau 2)

Tableau 2 : Exemples de macroalgues introduites pour différents vecteurs d'introduction anthropiques

Vecteurs	Espèces	Références
Fouling	<i>Bonnemaisonia hamifera</i>	Gouletquer et al. (2002)
Aquaculture	<i>Undaria pinnatifida</i>	Pérez et al. (1984)
Ballast	<i>Codium fragile ssp.tomentosoïdes</i>	Provan et al. (2005)
Rejet d'aquarium	<i>Caulerpa taxifolia</i>	Boudouresque & Ribera (1994)
Matériel d'emballage	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Miller et al. (2004)
Recherche scientifique	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Russell (1983)

L'aquaculture représente un vecteur majeur à travers deux voies :

- (i) **l'introduction délibérée de macroalgues pour l'aquaculture** comme c'est le cas d'*Undaria pinnatifida*. A la suite de son introduction primaire dans l'étang de Thau en Méditerranée, elle fut introduite intentionnellement en Bretagne en 1983 (Pérez et al. 1984). Sur la base des travaux d'Akiyama (1965), il avait été établi qu'elle ne pourrait pas se reproduire en mer ouverte, dans les conditions thermiques de la Bretagne. Or, elle s'est échappée des fermes et installée à proximité des concessions (Floc'h et al. 1991). A ceci, on peut ajouter les échanges de semences entre cultivateurs à différents endroits.

- (ii) **l'introduction accidentelle d'algues en épiphytes ou sous formes de spores transportées avec d'autres espèces cultivées** (Wolff & Reise 2002). C'est notamment le cas avec l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* : par exemple, une multitude d'espèces dites « accompagnatrices » ont été introduites avec cette espèce lors de son importation en 1966 en France (Grizel & Héral 1991). A son arrivée en France, le naissain a subi des contrôles sanitaires et a été immergé dans de l'eau douce afin de détruire les organismes fixés. L'efficacité du temps de séjour dans l'eau douce a été sérieusement discutée. Beaucoup d'espèces ont été introduites, par exemple : *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Sargassum muticum*, *Sphaerotrichia divaricata*, *Antithamnion nipponicum*, *Chrysymenai wrightii*, *Grateloupia turuturu*, *Lomentaria hakodatensis* et *Porphyra yesoensis* (Pérez et al. 1981).

Le trafic maritime, en particulier commercial, s'est largement intensifié depuis le 19ème siècle (Figure 7) et représente un autre vecteur majeur avec deux voies d'introduction :

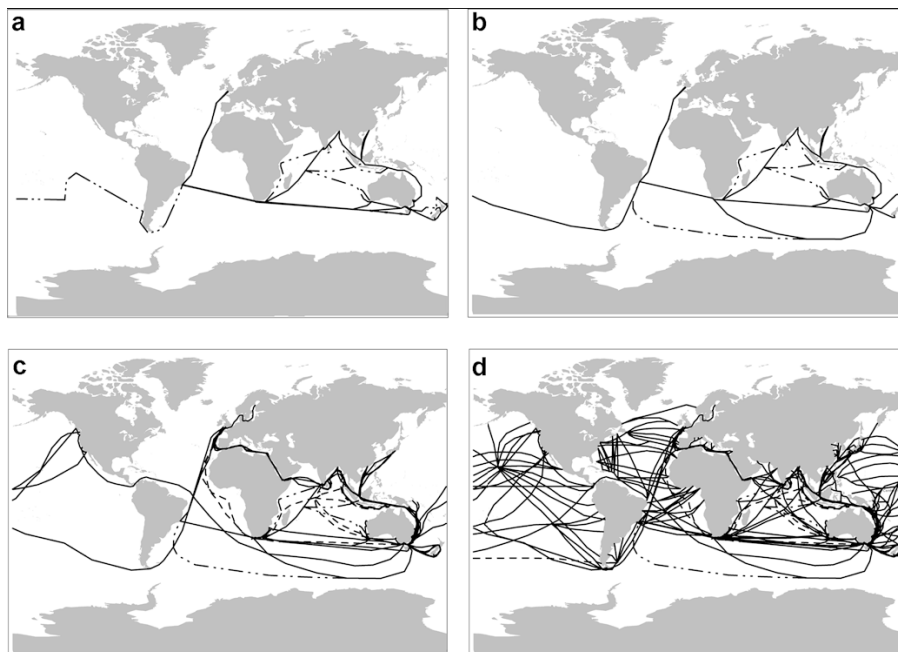


Figure 7 : Carte historique représentant l'évolution des voies commerciales au cours de 4 périodes : (a) exploration/colonisation (< 1839); (b) Immigration (1839-1851) et de la ruée vers l'Or (1852-1860) ; (c) de l'aire moderne jusqu'à la fin de la première guerre mondiale (1861-190) ; (d) avant la seconde guerre mondiale jusqu'à maintenant (1921-aujourd'hui). Les lignes continues représentent les routes communes et les lignes pointillées représentent les itinéraires rares ou routes itinérantes.

Figure issue d'Hewitt et al. (2004)

- (i) Les rejets par les **eaux de ballast** (*i.e.* réservoir permettant de gérer la stabilité des navires) ; les ballasts sont présents sur la majorité des navires, variables en volume selon le type de bateaux : porte-conteneurs, ferrys, bateau de pêche, etc. se déplaçant sur plusieurs échelles géographiques (quelques dizaines à quelques milliers de kilomètres). Ce sont des vecteurs prépondérants pour la dispersion et l'introduction de très nombreux organismes planctoniques marins, en particulier les larves d'invertébrés marins (Carlton & Geller 1993 ; Lavoie et al. 1999). Néanmoins, Williams et Smith (2007) montrent qu'ils seraient responsables de seulement 10% des introductions de macroalgues. Cette situation pourrait évoluer car les améliorations techniques apportées aux navires depuis le début des années 50 ont diminué la durée de transport augmentant ainsi les chances de survie des organismes photosynthétiques transportés, en diminuant les effets dûs au manque de lumière (Williams & Smith 2007). De plus, les courts voyages (ex. ferry inter-îles) pourraient faciliter le transfert d'espèces introduites au sein d'une aire d'introduction (Lavoie et al. 1999). Ce phénomène a été notamment observé chez *Undaria pinnatifida* en Nouvelle-Zélande (Brown & Lamare 1994).
- (ii) Le transport d'espèces fixées sur les **coques des navires**, appelé le « **fouling** » ou vagiles, appelé le « **clinging** » (uniquement dans le cas d'invertébrés, Mineur et al. 2007). Dans le cas des macroalgues, on parlera uniquement de « fouling ». La majorité des introductions de macroalgues serait attribuée à ce vecteur (Boudouresque & Verlaque 2002 ; Hewitt et al. 2004). Historiquement, les introductions liées au fouling ont été les plus anciennes (ex. par les caravelles en bois). Aujourd'hui, cette source d'introduction semblerait ne plus être un vecteur important pour l'introduction des macroalgues notamment à cause du développement de produits « anti-fouling » performants (Mineur et al. 2007). Cependant, les bateaux de plaisance peu entretenus ou encore laissés à l'abandon sont largement colonisés par des organismes natifs et non natifs présents dans les ports. Des gamétophytes fixés sur les coques de ces petits navires pourraient aisément faciliter la dissémination de macroalgues. A noter que d'autres supports peuvent servir au fouling, notamment les corps morts et bouées d'amarrage, le bois, le plastique, le verre, le caoutchouc, en épiphytes sur des organismes végétales ou animales, etc.

Aquaculture et transports maritimes participent ainsi à une longue liste de vecteurs d'introduction. Certains ont fait l'objet de médiatisation importante. On peut citer notamment le cas de l'introduction en Mer Méditerranée de l'algue verte, *Caulerpa taxifolia* issue **de rejets d'aquariums privés ou public** dont celui de Monaco. Des **engins de pêche** pourraient aussi participer à la dissémination d'espèces exotiques. Par exemple, dans le cas des côtes de Bretagne, les goémoniers (*i.e.* récolteur d'algues en milieu naturel) qui récoltent les laminaires par bateau utilisent un outil de récolte particulier, le scoubidou, qui pourrait arracher des thalles matures d'espèces exotiques et ainsi favoriser leur dissémination (Perez 1969).

2.4. Facteurs jouant sur le recrutement d'un individu dans une population

Le transport de propagules n'est que la première étape de l'installation d'une nouvelle population, en particulier chez les algues à cycle haplo-diploïde présentant une alternance de générations. De nombreux facteurs biotiques et abiotiques vont influencer la sédentarisation et la germination des spores et gamétophytes puis la croissance et reproduction des individus. Les **caractéristiques physiques et topographiques du substrat** sont particulièrement importantes pour l'installation de ces populations algales. Des petites crevasses de quelques microns, par exemple, sont des sites de protection pour l'installation d'une spore, à l'abri de l'action des vagues (Santelices 1990). Ensuite, la spore se lie au substrat (*i.e.* attachement) par un mucilage fortement visqueux ; les sédiments ne sont donc pas favorables à l'installation de populations algales (Norton 1978). De plus, la salinité ainsi que la température peuvent affecter ce processus d'attachement. Une fois solidement attachée, la spore germe. En conditions de laboratoire, la germination des spores se produit dans les 24h suivant leur attachement au substrat (voir revue de Santelices 1990).

Des **processus de mortalité** probablement importants affectent les spores exposées à des facteurs tels que la température, la lumière, la salinité et la dessiccation, dans leurs limites supérieures ou inférieures de tolérance. Si les conditions environnementales (température, lumière, nutriments, etc) sont défavorables, les gamétophytes des laminaires peuvent également suspendre leur croissance et entrer en **dormance**, formant une banque de gamétophytes (par analogie à la banque de graines chez les plantes) (Santelices et al. 1995). Ce processus est reconnu comme une adaptation de l'algue à survivre à des conditions stressantes pour le sporophyte macroscopique (Santelices 1990 ; Hoffmann & Santelices 1991).

Le **broutage** des propagules algales par des organismes marins présents dans les forêts de macroalgues tels que les oursins, mollusques, poissons, échinodermes etc. affecte également sérieusement le recrutement des macroalgues (Underwood 1998). Par exemple, dans le cas de l'algue invasive *Undaria pinnatifida*, en Tasmanie, il a été montré que son recrutement était limité par le broutage de l'oursin indigène, *Heliocidaris erythrogramma* (Valentine & Johnson 2005). Sur les phases sporophytiques, il existe également de nombreuses contraintes biotiques et abiotiques. A titre d'exemple, on peut citer une **compétition pour l'espace mais également pour la lumière** notamment dans le cas de compétition avec des algues de grande taille qui ont des effets d'ombrage, par exemple *Macrocystis pyrifera*. Un autre facteur limitant le recrutement des macroalgues est la **présence d'algues gazonnantes** (« turf ») qui réduisent l'aire disponible pour l'installation des spores ou entre en compétition pour la lumière avec les juvéniles de macroalgues. Par exemple, dans le centre du Chili, (Ojeda & Santelices 1984) montrèrent que le recrutement de *Lessonia nigrescens* était inhibé par la couverture dense de *Gelidium chilense*.

3. Méthodes d'analyse de la dispersion chez les macroalgues

Selon les auteurs et communautés scientifiques, le concept de dispersion naturelle renvoie à différents processus: (i) le transport physique dans la colonne d'eau des spores et gamètes, (ii) le transport suivi de l'émergence d'individus juvéniles (*i.e.* recrutement), (iii) la connectivité reproductive qui est définie par les étapes précédentes jusqu'à l'établissement d'individus adultes reproducteurs. La très petite taille des spores et gamètes ne permet généralement pas leur suivi direct. Pour palier cette difficulté, différentes méthodes et approches ont été développées pour étudier les capacités de dispersion de ces espèces.

3.1. Etude du transport dans la colonne d'eau

Bien que l'observation et le suivi des propagules dans la colonne d'eau s'avère très difficile (petite taille, quelques dizaines à quelques centaines de microns), différentes études se sont attachées à essayer d'appréhender la répartition temporelle et spatiale des propagules dans la colonne d'eau.

Un premier type de méthode concerne les méthodes s'appuyant sur **la mise en cultures suite à des prélèvements d'eau sur le terrain**. Les techniques de prélèvements sont variées : bouteille Niskin (Fredriksen et al. 1995), pompe à suction (Kendrick & Walker 1991, Kendrick & Walker 1995) ou encore manuellement (Hoffmann & Ugarte 1985 ; Zechman & Mathieson 1985 ; Santelices et al. 1995 ; Hruby & Norton 1979). Ensuite, ces échantillons d'eau sont mis directement ou après filtration en culture dans un milieu enrichi (ex. milieu dit de Provasoli) sous des conditions standards de culture dans des chambres thermostatées pendant quelques semaines (Hoffmann & Ugarte 1985 ; Santelices et al. 1995 ; Bobadilla & Santelices 2005 ; Zechman & Mathieson 1985 ; Kendrick & Walker 1991 ; Kendrick & Walker 1995). Après identification des différents taxons présents, des profils d'abondance relative peuvent ainsi être réalisés ainsi que de présence/absence au cours du temps à un point fixe (à différentes profondeurs), à différents endroits à un moment donné (ex. selon les saisons afin de repérer la saison de largage intense de spores) ou à différents endroits à divers moments de l'année (voir un exemple de résultats en Figure 8).

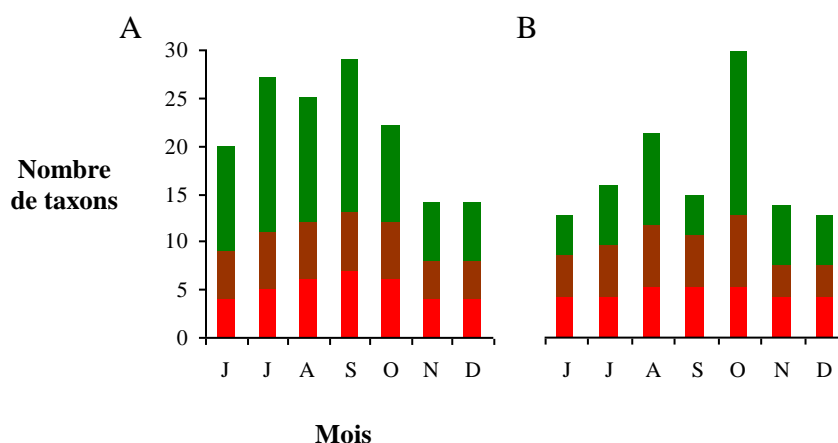


Figure 8 : Exemple de résultats obtenus pour déterminer le nombre de taxons présents sous forme de spores dans des échantillons d'eau de profondeur (A) et d'eau de surface (B) en fonction des mois.

Cette figure est issue de l'article d'Hoffmann & Ugarte (1985) concernant une étude réalisée à Pelancura au centre du Chili de Juin à Décembre 1984.

Un second type de méthode pour l'étude du transport des propagules chez les macroalgues s'appuie sur des **marquages biochimiques**. Il s'agit ici d'utiliser des colorants vitaux. Ils peuvent rentrer dans les tissus et permettent de colorer différents éléments histologiques avec des nuances variées. Une étude menée par Kendrick & Walker (1991) sur la dispersion des propagules de *Sargassum spinuligerum* a fait l'usage du bleu de Toluidine. Ce colorant a été utilisé pour marquer un peu moins d'une centaine de méioisporophytes de cette algue pendant 1-2h dans une population. Lors de la saison de reproduction, les propagules relâchées par les individus adultes sont marquées au bleu de Toluidine. Des échantillonnages ont donc été effectués à différentes distances des pieds parentaux dans plusieurs directions (perpendiculaire et parallèle aux vagues) avec une pompe à suction. Les propagules aspirées et retenues dans un filtre de 164 μ m ont pu être ensuite comptées avec un microscope au laboratoire, grâce au marquage par le bleu de Toluidine.

Enfin un troisième type de méthode très différent concerne la **simulation des trajectoires de dispersion des propagules** en s'appuyant sur **des modèles biologique et physique**. Ces modèles permettent de simuler numériquement la dispersion des propagules de macroalgues, en prenant en compte leurs caractéristiques biologiques (ex. vitesse de nage des spores, vitesse à laquelle les spores coulent, durée de viabilité dans le plancton, hauteur à laquelle les propagules sont relâchées du sporophyte). D'autres paramètres comme la densité de la population ou la fécondité des individus peuvent également être pris en compte afin d'établir la taille (en nombre de propagules) de la source qui influence la distance de dispersion effective (*i.e.* réalisée). Ces modèles intègrent des facteurs physiques et hydrodynamiques tels que la vitesse et la direction du courant, la bathymétrie, la stratification de la colonne d'eau, les interactions de la surface de gravité avec les vagues, la rugosité du substrat, autant de paramètres qui influencent le transport vertical et horizontal des spores de macroalgues (Gaylord et al. 2002 ; Gaylord et al. 2004). Un atout qu'il ne faut pas négliger dans cette méthode est l'apport de données solides sur l'hydrologie de la zone étudiée. Les outils de la modélisation sont des outils puissants pour évaluer de manière quantitative la variabilité spatio-temporelle de la dispersion des propagules et créer ainsi des modèles prédictifs dans le cas des introductions biologiques (Silwa et al. 2006). Dernièrement, Baez et al. (2009) ont montré par l'intégration de plusieurs facteurs environnementaux dans un modèle que l'extension d'*U. pinnatifida* le long des côtes espagnoles était conditionnée notamment par les concentrations en chlorophylle en été et la présence de lumière au printemps.

3.2. Etude du recrutement

Il s'agit ici d'analyser la distribution de nouvelles recrues au cours du temps sur des substrats bien identifiés. Par exemple, Reed et al. (2004) utilisent des récifs artificiels (cubes de 40m de côté en béton) mis en place à différents endroits dans une zone dépourvue de macroalgues, excepté une population qui serait l'unique source. L'analyse des recrues permet de déterminer les capacités de dispersion depuis cette source. De très nombreux substrats ont été utilisés dans ce type d'étude : plaques en plastiques recouvertes de grains de sables, en résine, en plexi-glass, céramique, argile, rochers, cordes, etc. Ils sont mis en place à des distances variables d'une source d'émission (où se trouvent des sporophytes matures) dans le milieu naturel (Reed et al. 1988 ; Reed et al. 2004) ou dans des bassins artificiels (Forrest et al. 2000). Quand les supports sont mobiles et légers, ils sont sortis de l'eau pour être mis en culture pendant quelques semaines afin de pouvoir identifier les organismes présents, jusqu'au genre voire jusqu'à l'espèce. Dans le cas d'une espèce introduite, ces techniques permettent de suivre l'installation et l'expansion de l'espèce à partir du premier point de signalisation de cette espèce. De nombreux travaux ont été effectués dans ce cadre afin de surveiller l'invasion d'une espèce introduite (Castric-Fey et al. 1993, Russell et al. 2008, Sanderson 1990, etc).

3.3. Etude de la connectivité reproductive (*i.e.* dispersion réalisée)

Au cours de cette thèse, j'utiliserai essentiellement des approches génétiques afin de caractériser la connectivité reproductive, terme utilisé par Pineda et al. (2007) pour définir la dispersion réalisée ou effective, c'est-à-dire les flux de gènes. La dispersion réalisée (*i.e.* flux de gènes) et les migrations d'individus vont être déduits de l'étude des variations des fréquences alléliques et génotypiques. De très nombreuses méthodes sont utilisables, méthodes qui s'appuient sur les cadres conceptuels de la génétique des populations et qui permettent d'appréhender plusieurs échelles de temps et d'espace (Figure 9 ; voir pour une revue Broquet & Petit 2009). Je présenterai ci-dessous brièvement les principales méthodes utilisées dans le cadre de ce travail de thèse.

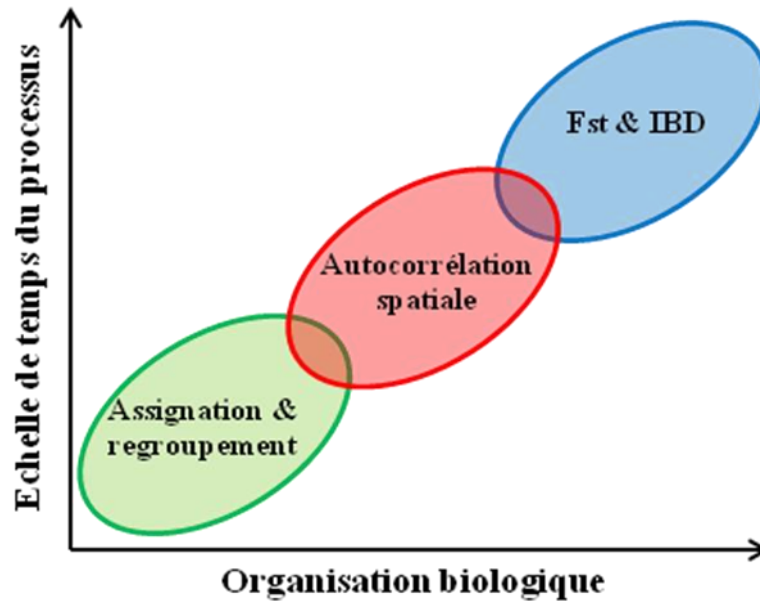


Figure 9 : Application de différentes méthodes génétiques d'étude de la dispersion en fonction des échelles spatiales et temporelles étudiées.

a) Statistiques F de Wright & isolement par la distance

La méthode certainement la plus usitée pour déterminer la structure génétique (et en inférer par conséquent les barrières au flux de gènes) est celle reposant sur l'étude de trois indices statistiques originellement proposés par Wright (1951) et pour lesquels de nombreux estimateurs sont disponibles, les estimateurs de Weir & Cockerham (1984) étant parmi les plus connus (Encadré 3). L'indice F_{st} est celui qui nous intéresse le plus ici puisqu'il permet d'identifier des populations génétiquement différenciées : ces populations n'échangent pas librement des gènes entre elles et il existe une limite à la dispersion.

L'analyse des statistiques F_{st} est souvent associée au test d'un modèle classique en génétique des populations appelé modèle « d'isolement par la distance » (*i.e.* « isolement génétique par la distance géographique »). Ce modèle très simple stipule que, plus les populations sont éloignées géographiquement, plus la distance génétique qui les sépare est grande. Ce modèle développé initialement pour des études de populations a été modifié pour analyser des données individuelles, avec la définition d'une distance génétique entre individus appelée a_r , s'apparentant à un coefficient d'apparentement entre individus (Rousset 2000). Il est basé sur le calcul de deux matrices : une matrice de distance spatiale deux à deux entre individus (ou entre populations) et une matrice de distances génétiques entre paires d'individus (ou entre paires de populations). La corrélation entre les deux matrices de distance

Encadré 3 : Statistiques F et estimateurs de Weir & Cockerham (1984)

D'après Dupont (2004)

Wright (1951) a construit un ensemble d'outils mathématiques, les statistiques F , permettant de décrire la répartition de la variabilité génétique entre et au sein des populations. Pour des marqueurs nucléaires et une espèce diploïde, trois statistiques sont utilisables : F_{st} , F_{is} , F_{it} .

- F_{st} mesure les différences génétiques entre populations. Cet indice varie entre 0 et 1 (0 correspondant à une absence de différence et 1 une différence complète entre populations).
- F_{is} mesure la déviation par rapport aux proportions attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg qui implique notamment une union aléatoire entre gamètes (panmixie) au sein de chacune des populations. Cet indice varie entre -1 et 1 (-1 correspond à une population uniquement composée d'individus hétérozygotes, 0 une population composée d'individus homozygotes et hétérozygotes en proportion conforme aux attendus sous l'équilibre d'Hardy-Weinberg et 1 correspond à une population uniquement composée d'individus homozygotes)
- F_{it} mesure la déviation par rapport aux proportions attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg sur l'ensemble des populations (i.e. en faisant abstraction de la répartition d'individus au sein de populations différentes). Il varie également entre -1 et 1 de la même façon que l'indice F_{st} .

Ces indices sont liés par la relation $(1 - F_{it}) = (1 - F_{is})(1 - F_{st})$

Différentes méthodes d'estimation ont été développées pour estimer ces paramètres. Celle développée par Weir & Cockerham (1984) qui est l'une des plus utilisée est précisée ici. Weir & Cockerham (1984) ont montré la correspondance entre les paramètres F de Wright et les composantes de la variance des fréquences alléliques dans des populations structurées. Trois nouveaux paramètres, correspondant respectivement à F_{st} , F_{is} et F_{it} , peuvent être estimés par le biais d'une analyse de variance-covariance sur les fréquences alléliques :

- θ , la corrélation des allèles de différents individus dans une même sous-population
- f , la corrélation des allèles d'un même individu dans une sous-population donnée
- F , la corrélation des allèles au sein des individus sur l'ensemble des sous-populations

Les composantes de la variance sont :

- a , la composante de la variance entre les sous-populations
- b , la composante de la variance au sein des populations
- c , la composante de la variance au sein des individus

et les estimateurs des paramètres F , θ et f sont alors définis par :

$$1 - \hat{F} = \frac{c}{a + b + c} \qquad \hat{\theta} = \frac{a}{a + b + c} \qquad 1 - \hat{f} = \frac{c}{b + c}$$

(génétique et géographique) est testée par un test de Mantel dont l'hypothèse nulle est l'indépendance entre les deux matrices. Le rejet de ce modèle signifie que la distance géographique peut expliquer la distance génétique entre individus (ou entre populations).

Outre le test du modèle d'isolement par la distance, le calcul de ces différentes matrices permet l'inférence de distances de dispersion en utilisant des données individuelles dans une population continue en deux dimensions. Elles sont obtenues en effectuant une régression des valeurs de l'estimateur a_r en fonction du logarithme de la distance géographique. Rousset (2000) a en effet montré que l'inverse de la pente de la droite de régression est égal à $4 \pi D \sigma^2$, où D est la densité efficace de la population et σ^2 représentent la variance de dispersion des gènes. σ^2 est le moment de second ordre de la distance axiale entre le lieu de naissance d'un individu et celui de ses descendants. A noter que $4 \pi D \sigma^2$ est la « taille de voisinage » définie par Wright (1943) : les limites à la dispersion engendrent des groupes d'individus apparentés de taille $N_b = 4 \pi D \sigma^2$. Afin d'estimer cette distance de dispersion ou taille de voisinage, il est essentiel de disposer de données de densité de la population considérée.

b) Méthodes d'auto-corrélation spatiales

Les analyses d'autocorrélation spatiale permettent d'analyser le patron de répartition spatiale et d'en déduire les barrières aux flux de gènes y compris au sein d'une population continue. Cette méthode s'applique essentiellement au niveau individuel. Des coordonnées spatiales individuelles sont un pré-requis pour effectuer ce type d'analyse. Le principe est de déterminer si la valeur d'une variable (ex. fréquences alléliques) pour une catégorie spatiale (ex. classe de distance) est dépendante des valeurs observées dans les autres catégories. Le degré d'autocorrélation peut être construit sur la base de différents indices (ex. coefficient d'apparentement ou index I de Moran) en fonction de la distance géographique séparant les individus. Un autocorrélogramme est construit pour visualiser l'autocorrélation en fonction de la distance. Bien que cette méthode puisse déterminer l'échelle du patron spatial, elle ne peut pas identifier l'endroit exact de la discontinuité génétique par exemple liée à un changement d'habitat ou de substrat non propice à l'espèce (Manel et al. 2003).

c) Analyses par regroupement individuel & méthodes d'assignation statistiques

De nouvelles méthodes basées sur l'emploi de méthodes bayésiennes et de calculs de vraisemblance ont récemment été proposées (Manel et al. 2003) :

1. afin de rechercher les regroupements d'individus les plus pertinents au sein du jeu de données complet, c'est-à-dire en s'affranchissant d'une classification *a priori* des individus en « populations ». Ces regroupements sont effectués sur la base de la composition allélique multi-locus (*i.e.* recherche de groupes d'individus présentant les plus grandes similitudes génétiques). Par cette méthode, on recherche les groupes au sein desquels les individus constituent des unités panmictiques à l'équilibre d'Hardy-Weinberg et qui sont en équilibre de liaison. La détermination du nombre de groupe expliquant au mieux la diversité génétique globale du jeu de données est basée sur une analyse de vraisemblance (Pritchard et al. 2000).
2. afin de détecter l'origine d'individus dans une population par rapport à un ensemble de populations de référence qui sont des sources potentielles de migrants pour la population considérée (Rannala & Mountain 1997). Pour chaque individu, une probabilité marginale d'appartenance à chaque source est calculée, en fonction des fréquences alléliques de l'individu et de celles de la source considérée. Chaque individu est ensuite assigné à la source pour laquelle il a obtenu la plus haute probabilité marginale. Dans ces analyses, il est implicitement fait l'hypothèse que l'ensemble des sources possibles soient présentes dans le jeu de donnée ce qui suppose un effort d'échantillonnage particulièrement important (Cornuet et al. 1999).

Encadré 4 : Présentation du modèle biologique : *Undaria pinnatifida*

Adapté de Voisin (2007)

Taxonomie :

Division : Chromophyta
Classe : Phaeophyceae
Ordre : Laminariales

Famille : Alariaceae
Espèce : *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar
Nom commun : wakamé

Etymologie : du latin : *unda*, vague et *pinnatifida*, en forme de plume

Cycle de vie : voir Figure 12

Critère d'identification :



U. pinnatifida est une algue brune dont le stade sporophytique est le seul stade visible à l'œil nu. Cette algue peut mesurer jusqu'à 2m. Sa lame est foliacée, terminée par des haptères ou crampons permettant à l'algue de se fixer solidement au substrat. Le stipe est comprimé avec des bords denticulés devenant foliacés et ondulés chez les thalles fertiles. La lame est entière et étroite au stade juvénile devenant triangulaire et lobé transversalement à sa maturité. La nervure médiane est nette, brun-verdâtre et translucide (Cabioch et al. 1992). Lorsque l'algue devient fertile, des sporophylles (*i.e.* structures de reproduction) se développent autour du stipe.

Selon Hay & Sanderson (1999), trois morphotypes sont décrits chez *U. pinnatifida*, en fonction de la forme du sporophylle, du thalle, et de la longueur du stipe. Ces morphotypes n'ont pas de bases génétiques particulières et ne correspondent pas à des sous-espèces ou à des variétés. Ils correspondent à des variations phénotypiques notamment saisonnières.

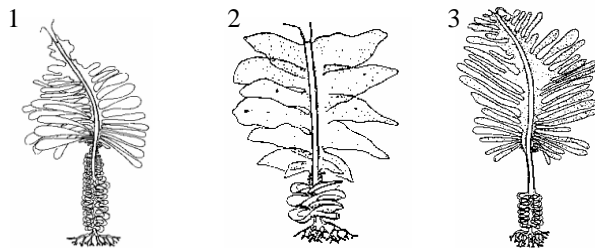


Figure 1- quelques exemples de variants phénotypiques originellement attribués à différents « types » : (1) *Northern* ou *distans* (2) *Naruto* ou *typica* (3) *Nambu*

Biotope :

U. pinnatifida est une algue sessile, se développant en milieu abrité, au niveau de la limite des marées de vives eaux et selon la turbidité du milieu, jusqu'au 18m de profondeur (Castric-Fey et al. 1993). Elle présente une grande tolérance aux pollutions organiques (Silva et al. 2002) et aux variations de salinités (entre 20 et 27ppm ; Hay & Sanderson 1999). Les sporophytes présentent un optimum de croissance entre 10 et 15°C et se dégènerent lorsque la température excède 25°C. Ils sont capables de se développer sur de nombreux substrats incluant des rochers, du bois, des concrétions, du métal, du plastique, du verre, du caoutchouc, sur des organismes vivants variés et des objets flottants (bouées, bouts, coques de bateaux, etc ; Silva et al. 2002).

Intérêt économique et qualités nutritionnelles :

En Asie, le wakamé est l'une des algues à forte valeur commerciale (Yamanaka & Akiyama 1993). Elle entre en effet dans la composition de nombreuses soupes et salades et sa forte teneur en oligoéléments, en protéines et l'absence de graisses assimilables par l'organisme en font un aliment particulièrement apprécié. Cette algue présente également de nombreuses qualités pharmaceutiques. Sa composition en peptides aurait un effet contre l'hypertension (Suetsuna et al. 2004) et certains polysaccharides entrent dans la composition de traitement contre l'herpès (Thompson & Dragar 2004). Ce sont ces qualités alimentaires et pharmaceutiques qui font d'*U. pinnatifida* l'une des premières algues cultivées dans le monde. La production asiatique de wakamé est connue depuis plus de 60 ans et près de 300 000t sont produites chaque année par la Corée (Yamanaka & Akiyama 1993)

4. Présentation du modèle d'étude & état de l'art concernant son statut d'espèce introduite

*Note : Cet état de l'art est en partie élaboré sur la base d'un article de synthèse sur *U. pinnatifida*, espèce témoin des processus d'introduction, que j'ai co-écrit avec Marie Voisin et collaborateurs au début de ma première année de thèse. Cet article, qui est une transition entre nos projets de thèse respectifs est présenté en Annexe 1.*

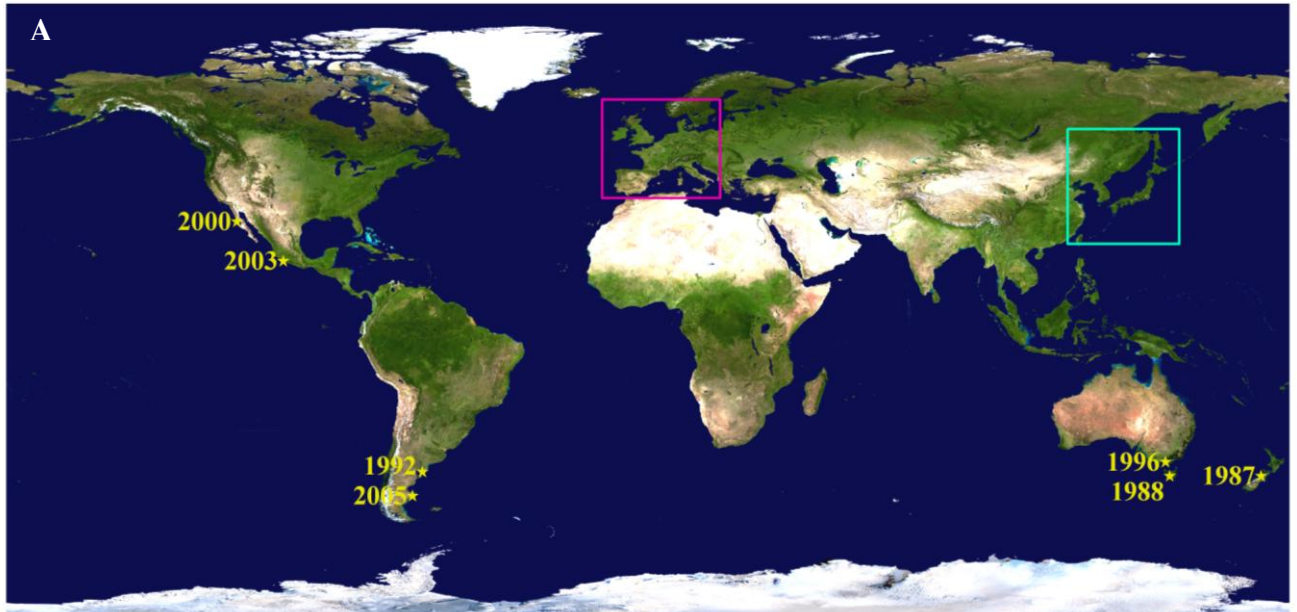
*Référence : Voisin M., Daguin, C., Engel C., Grulois D., Javanaud C. & Viard F., 2007, Processus et dynamique d'installation des espèces introduites en milieu marin : une illustration avec l'algue brune asiatique *U. pinnatifida*, J. de la Société de Biologie, Tome 201, n°3, 259-266*

Ce travail de thèse a été mené sur l'algue brune *Undaria pinnatifida* (fiche signalétique ; Encadré 4). Cette algue, qui fait partie des Laminariales, est originaire du Pacifique Nord-Ouest (Japon, Corée, Chine et Russie), où elle est cultivée de façon intensive pour l'alimentation humaine sous le nom de « wakamé ». Elle est l'une des dernières espèces introduites recensés sur les côtes européennes. Elle a été récemment classée parmi les 5 espèces les plus menaçantes, juste derrière *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* et *Caulerpa taxifolia* (Nyberg & Wallentinus 2005) et fait partie des deux espèces de macroalgues listées dans la liste « 100 of the World's Worst Invasive Alien Species » du « Global Invasive Species Database ».

Différentes propriétés font de cette espèce un modèle d'étude privilégié (Voisin et al. 2007):

- (i) sa distribution quasi mondiale : *U. pinnatifida* a été introduite en moins de 30 ans dans de très nombreuses régions du globe (Encadré 5),
- (ii) la coexistence de populations cultivées et naturelles en Europe, et en particulier le long des côtes bretonnes,
- (iii) sa capacité à coloniser des habitats de nature très variée (substrat rocheux naturel, ports, enrochements, etc.),
- (iv) ses traits d'histoire de vie particuliers et la présence de plusieurs vecteurs de dispersion naturelle.

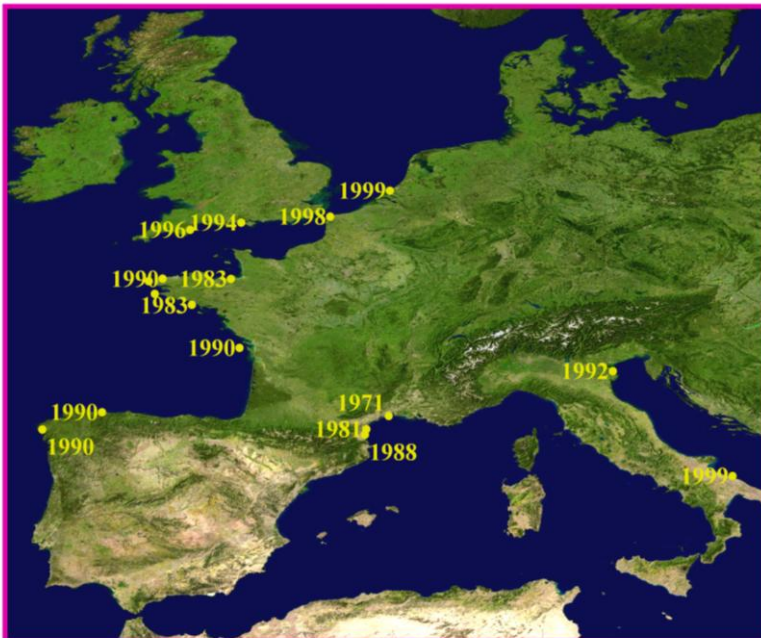
Encadré 5 : Distribution actuelle d'*Undaria pinnatifida*



Situation mondiale :

Originnaire d'Asie (Japon, Corée, Russie ; encadré bleu turquoise de la figure ci-dessous), *U. pinnatifida* a été observée pour la première fois en dehors de son aire de distribution naturelle en 1971, dans l'étang de Thau, en France. Cette introduction accidentelle serait liée à l'importation de naissains d'huîtres (*Crassostrea gigas*) importés depuis l'Asie (Pérez et al. 1981). A l'échelle mondiale *U. pinnatifida* a également été introduite accidentellement dans l'hémisphère sud, d'abord en Nouvelle Zélande (Hay & Luckens 1987) puis en Tasmanie et en Australie (Hay 1990 ; Sanderson 1990). Des individus épiphytes (fouling) sur les coques des bateaux commerciaux seraient responsables de son introduction. Elle a également colonisé le continent américain sur sa façade Atlantique, en Argentine en 1992 (Casas & Piriz 1996, Schiel & Foster 2006), et plus récemment dans le sud en Patagonie (Martin & Cuevas 2006). Des populations se sont installées sur la façade Pacifique, en Californie depuis 2001 (Silva et al. 2002) ainsi qu'au Mexique depuis 2003 (Aguilar-Rosas et al. 2004).

Situation Européenne et française :



Suite à l'introduction initiale en France, des populations ont ensuite été signalées en 1984 à proximité de l'étang de Thau, sur les côtes méditerranéennes (Sète et d'Agde) puis dans le port de Narbonne, la côte rocheuse d'Argelès à Port Vendres (Pérez et al. 1990). En 1983, des individus ont été transférés volontairement pour des tests de mise en culture en Bretagne : baie de Lampaul (Ile de Ouessant), Ile de Groix, Ile de Sein et dans l'estuaire de la Rance (St Suliac) (Pérez et al. 1984). Des populations spontanées ont été ensuite signalées en Manche d'Ouessant jusqu'aux Pays-Bas (Pérez et al. 1981, Stegenga et al. 2007, Vincent 1999, Leliaert et al. 2000) et sur les côtes anglaises (Fletcher & Manfredi 1995). Des populations se sont également installées sur la façade Atlantique, en France, du Guilvinec à la Rochelle et en Espagne en Asturies et en Galice (Caamaño et al. 1990, Salinas et al. 1996). A noter que cette algue a été mise en culture sur les côtes espagnoles et qu'à l'instar de la situation française des populations naturelles ont été rapidement observées à proximité des zones mytilicoles (Caamaño et al. 1990). La plupart de ces observations ont été réalisées dans des zones portuaires (facile d'accès) bien que l'espèce soit présente également dans le milieu naturel.

4.1. Les processus d'introduction d'*U. pinnatifida* à grande échelle

Les espèces introduites à large spectre de distribution et occupant une large gamme d'habitats, comme *Undaria pinnatifida*, sont des modèles d'études privilégiés. Considérées comme les témoins d'un paradoxe écologique et évolutif, ces espèces offrent l'opportunité de comparer entre régions d'introduction ou entre habitats les mécanismes écologiques et évolutifs responsables de leur installation initiale, de leur maintien local, de leur dispersion et de leur installation durable. La thèse de Marie Voisin, précédemment réalisée au laboratoire s'était attachée à étudier les modalités d'introduction à une échelle mondiale (Voisin et al. 2005).

Dans ce cadre, une étude du polymorphisme mitochondrial a été réalisée dans 27 populations réparties sur l'ensemble de l'aire de répartition actuelle d'*U. pinnatifida*. Des processus d'introduction contrastés ont été mis en évidence dans les différentes régions d'introduction : en Australasie, un scénario d'introductions récurrentes (dues au trafic maritime) depuis des sources génétiquement diversifiées s'oppose au schéma européen où l'introduction primaire d'origine aquacole est caractérisée par des populations sources génétiquement proches. Cette étude avait également permis de révéler des processus que les études de terrain n'avait pas pu démontrer, par exemple des introductions cryptiques en Tasmanie (Figure 10) (Voisin et al. 2005 ; Voisin 2007).

La situation Européenne a également été bien explorée. En Europe, *U. pinnatifida* colonise de nombreux habitats : zones portuaires, filières de cultures aquacoles, milieux naturels rocheux de nature variée. Elle est, en outre, cultivée en Bretagne (France) et en Galice (Espagne). Pour analyser cette colonisation dans différents types d'habitats sur un gradient latitudinal important, une étude sur 26 populations réparties sur les côtes européennes (Espagne, France, Angleterre, Belgique et Pays-Bas) a été menée sur 10 locus microsatellites et deux locus mitochondriaux (Voisin 2007). Les résultats ont montré que les populations européennes sont composées d'un type mitochondrial, déjà retrouvé dans l'étude menée à une échelle mondiale (Voisin et al. 2005) confirmant l'origine cultivée du pool européen. Cependant, l'utilisation des locus hypervariables que sont les locus microsatellites a permis d'affiner ce schéma général et de révéler 3 groupes génétiquement différenciés coexistant à l'échelle européenne (Figure 11). Ces groupes ne reflètent pas uniquement des limites

naturelles mais suggère des événements d'introductions différents, depuis un pool génétique apparenté aux cultures, dans 3 régions européennes (*i.e.* L'Espagne et la Méditerranée ; les côtes Atlantiques et de la Manche, les côtes des Pays-Bas).

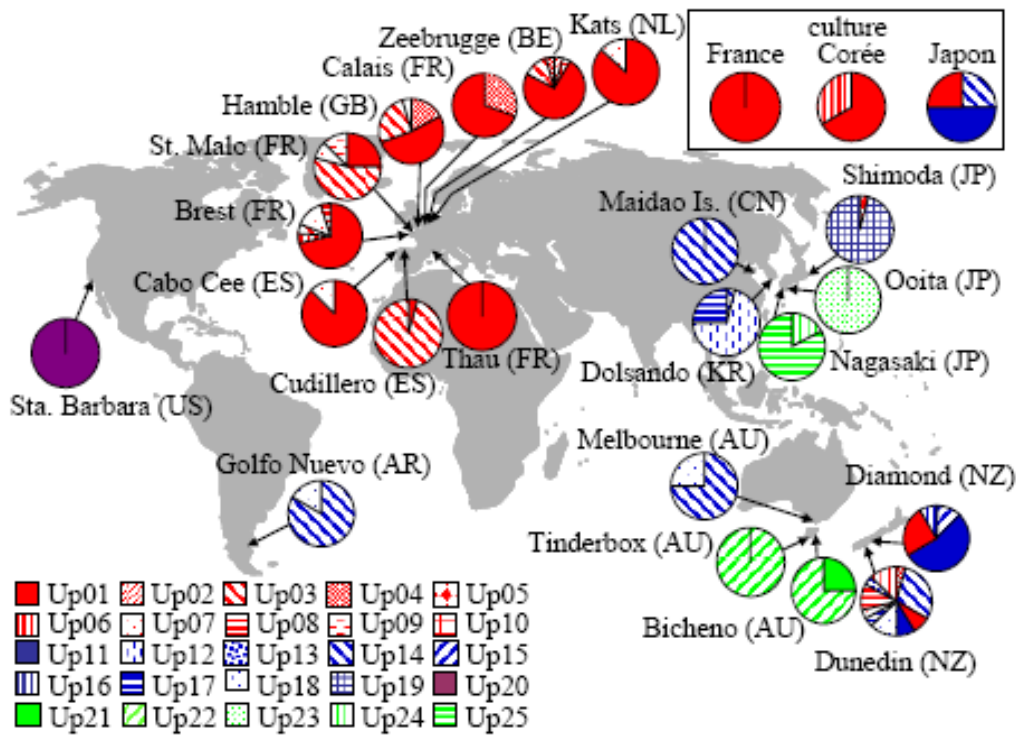


Figure 10 : Distribution géographique des 25 haplotypes mitochondriaux détectés dans 24 populations spontanées et 3 populations cultivées de l'algue brune *Undaria pinnatifida*.

Pour chaque population, un camembert représente l'identité et la fréquence des haplotypes (*i.e.* séquence mitochondriale unique) qui y sont présents. Chaque haplotype est représenté par un figuré différent ; le code couleur utilisé symbolise la proximité génétique des haplotypes (3 groupes A, B1 et B2 ont été identifiés et sont représentés respectivement par les couleurs rouge, bleu, et vert). Les sections de chaque camembert sont proportionnelles à la fréquence des haplotypes dans chaque population. Entre parenthèses est indiqué le code du pays dans lequel les populations ont été échantillonnées.

Figure issue de Voisin et al. (2005)

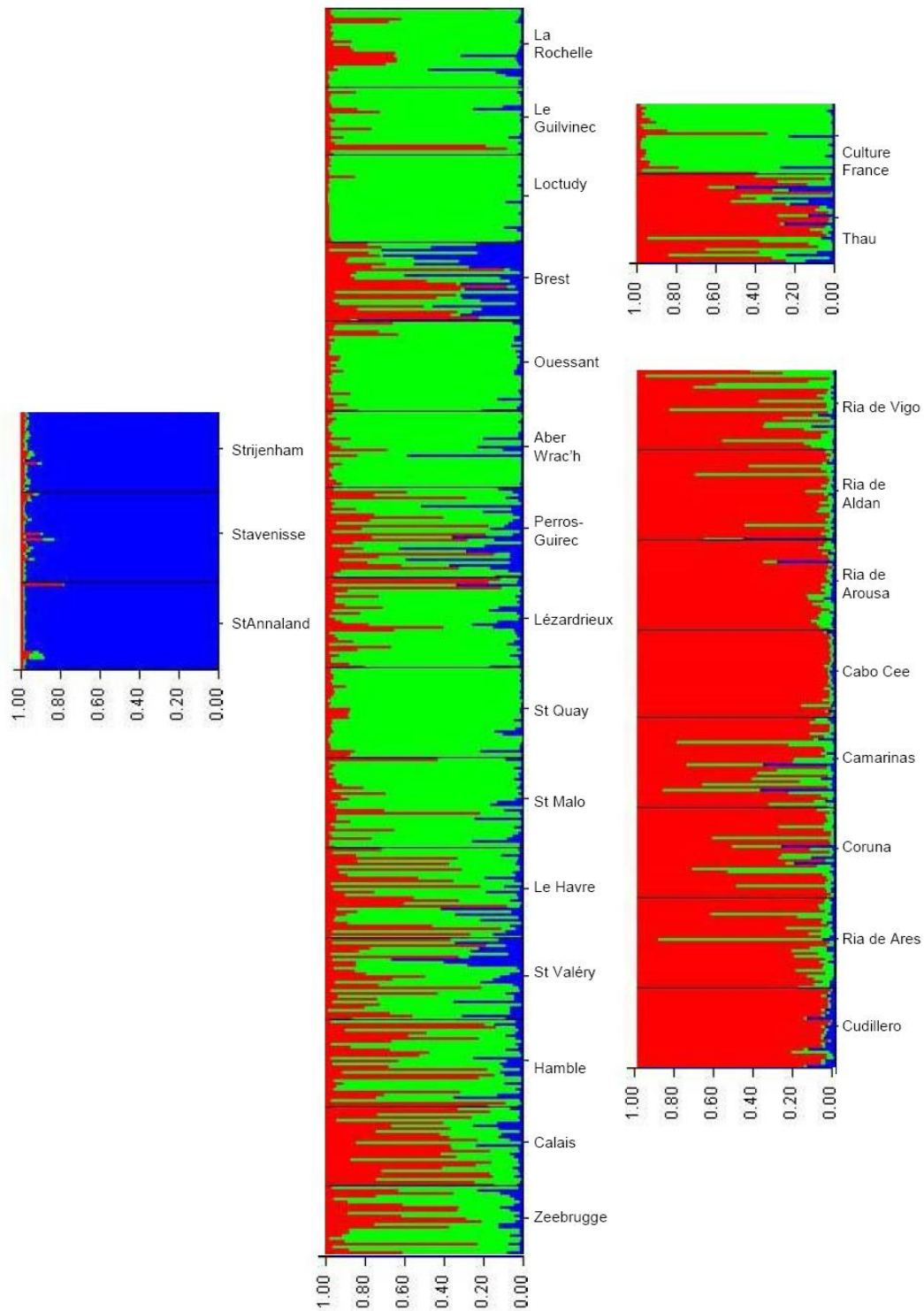


Figure 11 : Probabilités postérieures individuelles d'appartenance aux classes identifiées par le logiciel Structure.

Les couleurs correspondent à chacune des classes identifiées. Pour chaque individu, correspondant à une ligne horizontale, est représentée la partie de son génome associée à chacune des classes. Le nom de chacune des populations échantillonnées est indiqué.

Figure issue de Voisin (2007)

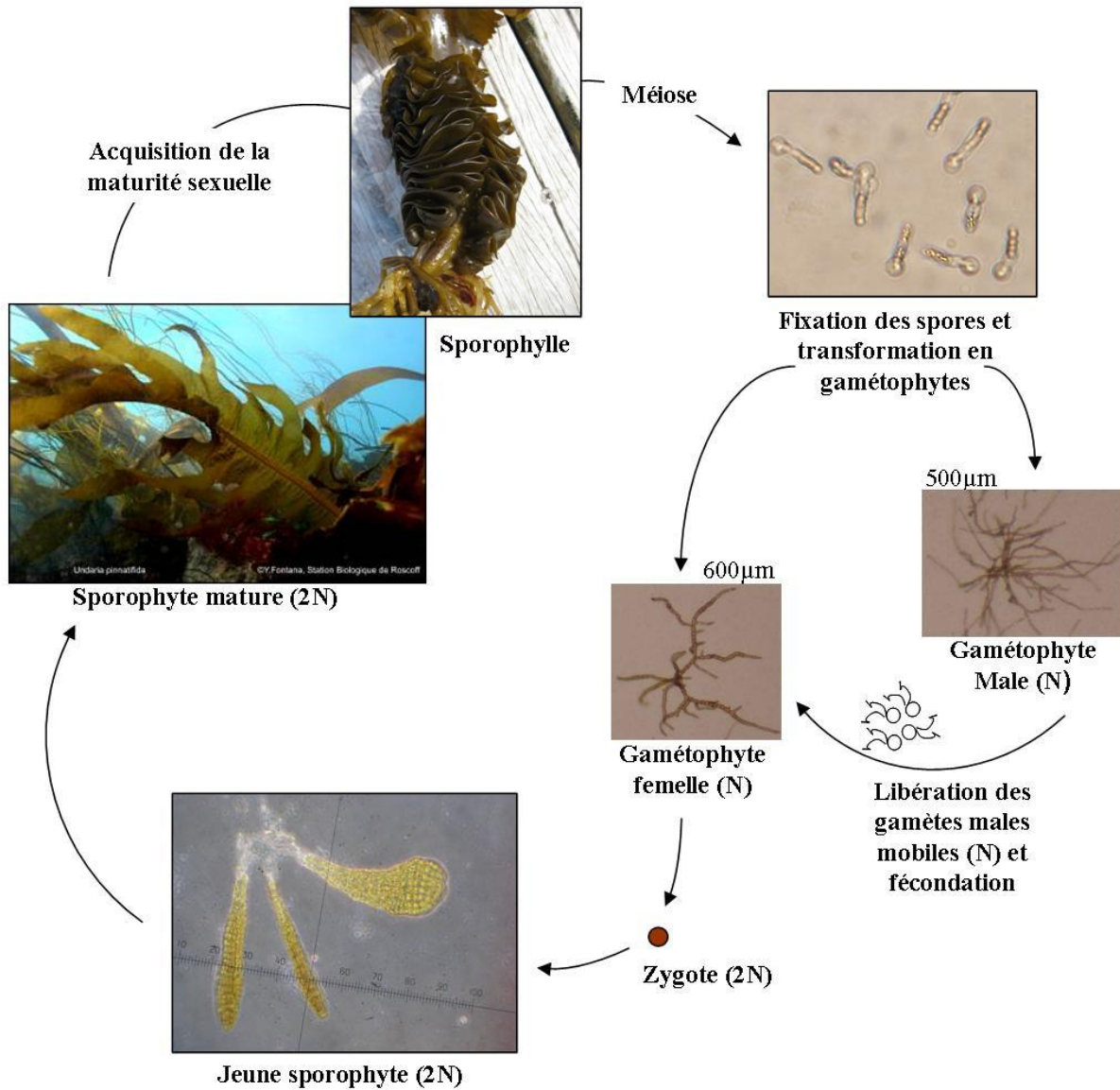


Figure 12 : Cycle de vie haplo-diploïde digénétique hétéromorphe d'*Undaria pinnatifida*.

Lorsque le sporophyte diploïde, stade visible du cycle de vie, parvient à maturité (entre la mi-mars et la fin septembre dans l'hémisphère nord), une aile disposée en falbala, appelée sporophylle, se développe de chaque côté du stipe et libère des spores haploïdes biflagellées de 5 à 6µm de diamètre (Silva et al. 2002). Après libération des spores, l'algue stoppe sa croissance et le sporophyte se désagrège du sommet vers la base avant de disparaître. Ce phénomène est accéléré quand la température atteint 20-25°C (Silva et al. 2002).

Une fois libérées dans le milieu, les spores biflagellées se fixent et germent sous la forme de gamétophytes haploïdes mâles ou femelles. Ces gamétophytes microscopiques se développent dans des eaux comprises entre 10 et 24°C (Castric-Fey et al. 1999a). Les gamètes mâles flagellés, attirés par des phéromones (Maier & Muller 1986) émises par le gamétophyte femelle fécondent les gamètes femelles retenus dans l'oogone (gamétophyte femelle). Le zygote ainsi formé germe en une plantule lancéolée (*i.e.* sporophyte).

Ces résultats montraient à grande échelle (une à plusieurs centaines de kilomètres) le rôle prépondérant d'une série d'activités humaines (trafic maritime, aquaculture). Ils suggéraient que le succès de l'introduction de cette algue est avant tout lié à ses capacités de développement à proximité des zones où sont présents de nombreux vecteurs d'origine anthropique (trafic maritime ou aquaculture) plutôt qu'à ses capacités de dispersion naturelle.

4.2. Cycle de vie et capacité de dispersion d'*U. pinnatifida*

U. pinnatifida est caractérisée par un cycle de vie annuel de type digénétique hétéromorphe (Figure 12) et présente plusieurs vecteurs de dispersion naturelle :

- **les spores** qui sont comme chez les autres laminariales caractérisées par de très courtes durées de vie (quelques heures à quelques jours). Les durées de vie dans la colonne d'eau mentionnées dans la littérature sont cependant très variables d'un auteur à l'autre : de 5-6h (expériences en laboratoire de Silva et al. 2002) à 5-14 jours (expériences en laboratoire de Forrest et al. 2000).
- **les gamètes mâles mobiles** : chez les laminaires, ils ont une très faible durée de vie (quelques heures) et il a été décrit des distances de dispersion de l'ordre de quelques millimètres. Aucune donnée sur leur durée de vie n'est disponible dans la littérature chez *U. pinnatifida*.
- **des sporophytes dérivants** : les sporophytes matures arrachés sont potentiellement des vecteurs de dispersion importants avec des distances de dispersion estimée à plusieurs centaines de mètres (Forrest & Blakemore 2006; Forrest et al. 2000 en Tasmanie). L'émission des spores se poursuit chez *U. pinnatifida* même lorsque l'algue est réduite à son sporophylle (Pérez et al. 1981).

Le potentiel de dispersion d'*U. pinnatifida* semble donc relativement limité si on considère la durée de vie de ses spores et gamètes. Des études dans l'aire d'origine et en conditions de laboratoire (Suto 1950) semblent indiquer que la présence de recrues d'*U. pinnatifida* est supposé être à quelques mètres de leurs parents sporophytes. Forrest et al. (2000) suggèrent également, par une étude menée en laboratoire, que les spores d'*U. pinnatifida* se fixent à une dizaine de mètres de la source d'émission. Cependant, dans ces expériences, les paramètres environnementaux du milieu et saisonniers de l'émission des spores n'ont pas été pris en compte bien qu'ils puissent jouer beaucoup sur la capacité à prolonger la compétence ou la viabilité des spores dans le milieu (Reed 1992).

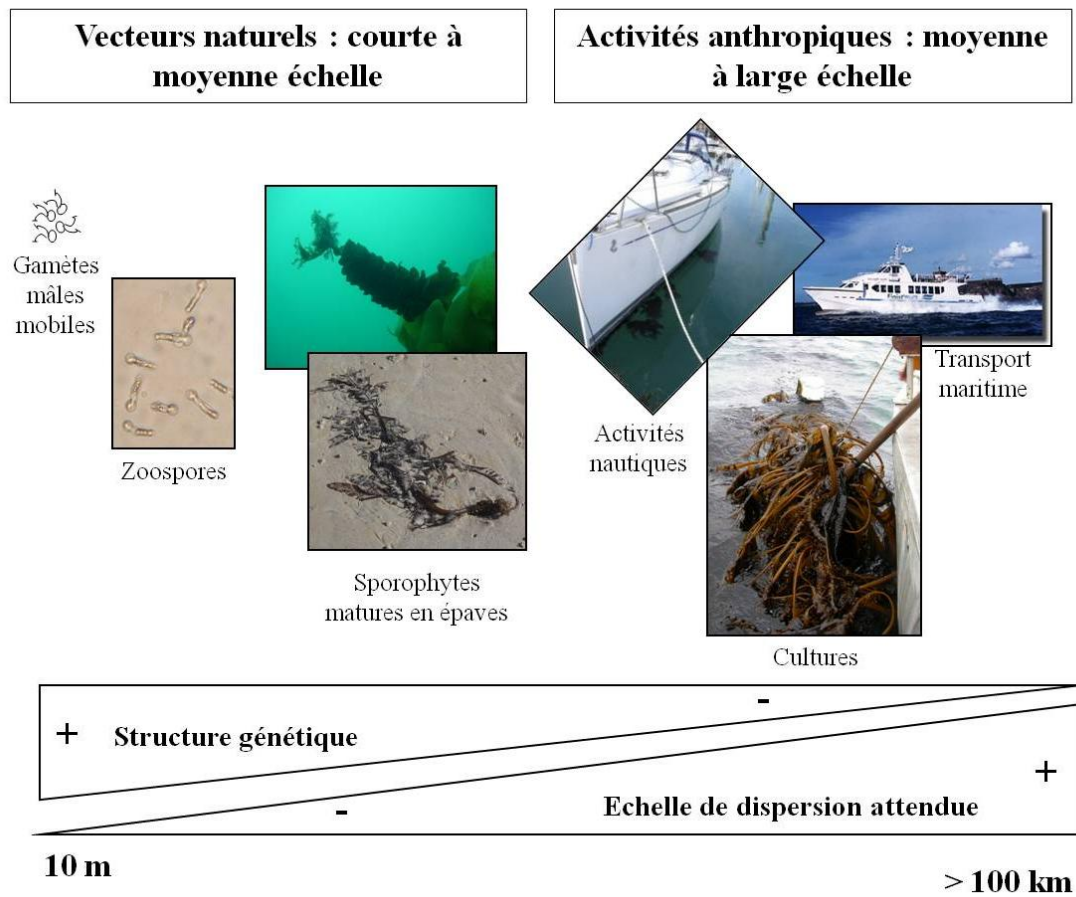


Figure 13 : Les vecteurs de dispersion d'*Undaria pinnatifida* supposée au sein de l'aire d'introduction.

A une échelle régionale, l'expansion d'*U. pinnatifida* est probablement due à plusieurs vecteurs. Dépendant de ces vecteurs de dispersion, elle peut disperser sur des échelles variables : courtes vs. Médium vs. Longue échelle. L'étude de la structure génétique évalue la distance de dispersion effective (*i.e.* dispersion réalisée).

De plus, la présence de cette algue dans des zones à fort hydrodynamisme (Castric-Fey et al. 1993) pourrait permettre leur transport sur plusieurs centaines de mètre. Enfin lorsque les conditions environnementales sont défavorables, il est probable que les gamétophytes puissent rester en stade végétatif plusieurs mois voire des années avant de reprendre leur maturation (Birkett et al. 1998). Ce processus présente un avantage pour une espèce introduite durant les phases de transport (eaux de ballast) et pour l'établissement dans un nouveau milieu.

En parallèle et en synergie avec ces vecteurs de dispersion naturelle peuvent jouer des vecteurs anthropiques : les activités nautiques, les pratiques culturelles ou encore le transport maritime. Les propagules transportées dans les ballasts des bateaux, des sporophytes en épiphytes sur les coques des bateaux (*i.e.* fouling) ou les échanges entre aquaculteurs peuvent favoriser les transports des propagules. La figure 13 présente l'ensemble des vecteurs de dispersion potentiels d'*U. pinnatifida* et les échelles spatiales auxquelles ils sont censés jouer le plus grand rôle.

Au cours de la thèse de Marie Voisin (2007), un suivi de recrutement et d'installation sur des substrats vierges installés dans une zone portuaire déjà colonisée par *U. pinnatifida* a montré l'efficacité de l'installation de nouveaux individus sur ces substrats installés dans deux ports (Brest & Perros-Guirec). Ces suivis ont permis d'obtenir des estimateurs de la croissance des individus (en moyenne 15.72 cm par mois et une acquisition de la maturité sexuelle en \pm 60 jours, données issues du port de Brest) et de mettre en évidence l'existence de deux périodes de recrutement : l'une majeure au printemps et l'autre mineure en automne, des résultats similaires à ceux obtenus en Californie par Thornber et al. (2004). Le potentiel de dispersion semble faible, mais la rapidité de colonisation et le potentiel d'adaptation aux différents substrats de cette espèce font partie des critères qui ont établi *U. pinnatifida* comme une des espèces d'algues introduites les plus menaçantes (Nyberg & Wallentinus 2005).

5. Problématique de la thèse

Si les cultures ont été des vecteurs majeurs d'introduction primaire et secondaire d'*U. pinnatifida* en Europe (Floc'h et al. 1991, Voisin et al. 2005), elles ne permettent pas toujours d'expliquer l'apparition de l'algue sur l'ensemble des côtes européennes (notamment dans des zones exemptes de cultures) ni sa propagation dans le milieu naturel à une échelle régionale

ou locale. L'ensemble des observations et résultats des études génétiques menées à grande échelle soulève ainsi encore de nombreuses questions sur les modalités de la dispersion sur de petites échelles spatiales (*i.e.* au sein d'un site ou d'une baie) et sur le rôle de la dispersion naturelle peut être un facteur de dispersion sur des distances modérées (quelques dizaines de kilomètres). De plus, la plupart des études antérieures menées en particulier en Europe ont eu pour objectif d'étudier des populations occupant des habitats artificiels tels que des ports.

Ce travail de thèse s'est ainsi concentré sur les processus d'introduction secondaire à une échelle régionale, en utilisant comme site privilégié d'étude des populations établies en milieu naturel et en choisissant la Bretagne comme « zone atelier ». Cette région présente en effet des caractéristiques intéressantes pour analyser les processus d'installation et d'établissement d'*U. pinnatifida*. Cette espèce occupe en effet de nombreuses baies ou estuaires du littoral breton depuis plus de 25 ans (ce qui correspond à environ 50 générations), ce qui permet de s'affranchir des effets dûs à l'introduction initiale. De plus, la coexistence de populations cultivées et de populations spontanées (ports et habitats naturels) est encore aujourd'hui une réalité, ce qui permet d'évaluer si le vecteur initial d'introduction joue un rôle durable dans l'installation de cette espèce introduite ou s'il n'a été qu'un « initiateur » d'un processus faisant jouer d'autres processus écologiques et évolutifs.

Au cours de ce travail de doctorat, j'ai donc cherché à affiner notre perception du devenir de cette algue introduite au sein de l'aire d'introduction, en particulier en Bretagne. Dans ce contexte, j'ai étudié les processus locaux de recrutement et de dispersion de cette espèce à plusieurs échelles spatiales : une échelle régionale (*i.e.* Bretagne Nord), une méso-échelle (*i.e.* au sein d'une baie ou d'un estuaire) et une micro-échelle (*i.e.* au sein d'un site). Ces études se sont appuyées en grande majorité sur le génotypage de 10 marqueurs microsatellites précédemment développés dans le laboratoire (Daguin et al. 2005). Ces marqueurs ont fait l'objet d'un développement de nouveaux protocoles de génotypage en multiplex (*i.e.* amplification simultanée de plusieurs locis) sur séquenceur capillaire.

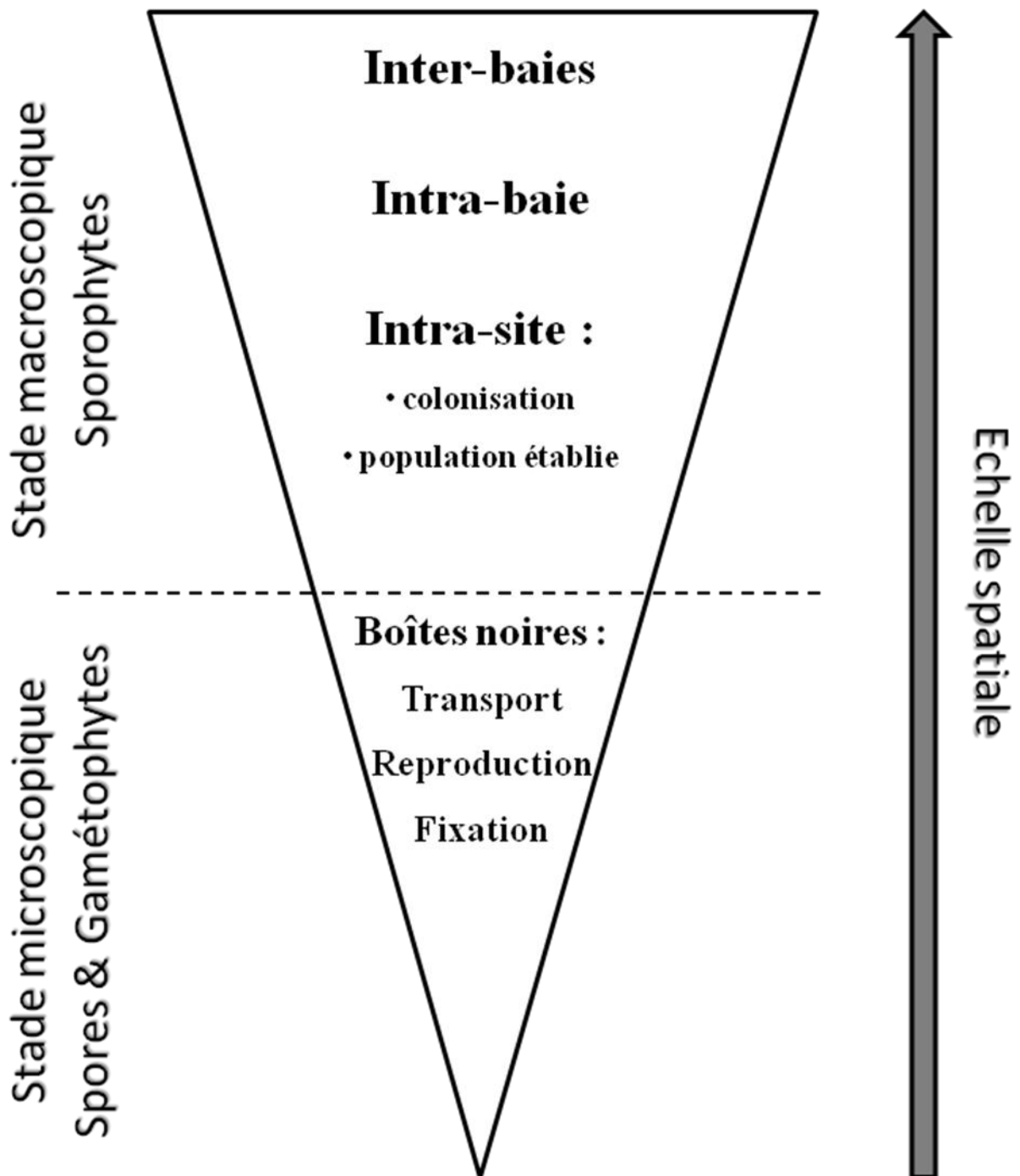


Figure 14 : Présentation schématique de l'articulation du travail de thèse.

Les études menées au cours de cette thèse comprennent différentes échelles spatiales emboîtées les unes dans les autres me permettant d'appréhender différentes échelles de temps et différentes phases du cycle de vie.

Ce travail s'est articulé autour de 5 études représentant ces différentes échelles d'étude, emboîtées les unes dans les autres, et permettant d'appréhender différentes échelles de temps (une année à plusieurs dizaines d'année) et différentes phases du cycle de vie. Les objectifs et le cadrage spatio-temporel de ces études sont présentés schématiquement dans la figure 14.

I. la première étude a été menée sur trois baies distribuées le long du littoral breton. Ces sites ont été choisis parce qu'ils présentent un point commun dans le schéma d'introduction primaire : la mise en place de cultures d'*Undaria pinnatifida*. Comme montré par des analyses génétiques antérieures (Voisin 2007), les populations établies dans ces baies ont un fond génétique commun (celui du pool cultivé introduit en Manche). Depuis l'introduction initiale datée d'une trentaine d'année, ce fond génétique a pu évoluer de façon indépendante dans ces trois baies en fonction de la dynamique d'établissement des populations naturelles et des contraintes environnementales du milieu (facteurs biotiques et abiotiques). Je me suis intéressée à caractériser la composition génétique des populations naturelles établies dans ces trois baies bretonnes, 25-30 ans (*i.e.* 50 générations) après leur apparition, afin d'analyser notamment leur degré de connectivité. Cette étude a été réalisée par des tests d'assignations et des analyses hiérarchiques de la variance génétique.

II. la seconde étude de ce travail de thèse s'est focalisée sur la baie de St-Malo et l'estuaire de la Rance, qui fut l'un des premiers sites pilotes de la mise en culture d'*U. pinnatifida* en Bretagne (Floc'h et al. 1991). A l'heure actuelle, la concession existe toujours. Cette algue s'est propagée et installée dans différents habitats (ports, habitats naturels: enrochements, etc) au sein de l'estuaire de la Rance ainsi que dans la baie de St-Malo. Dans ce contexte, nous avons réalisé une large prospection afin d'avoir une meilleure évaluation de l'installation d'*U. pinnatifida* dans cette baie. Les échantillonnages réalisés dans le cadre de cette prospection m'ont ensuite permis d'étudier les flux de gènes au sein de la baie de St-Malo et de l'estuaire de la Rance. Nous avons cherché à établir les relations entre les différents habitats (cultures, ports et habitats naturels) qui témoignent à des degrés divers de l'importance des activités humaines au sein de cette baie. Des analyses bayésiennes de regroupements ont été effectuées ainsi que des analyses hiérarchiques pour essayer de comprendre les facteurs structurant la diversité génétique au sein de cette baie.

III. au cours de la troisième partie, je me suis plus particulièrement intéressée à l'étude de la microstructure spatiale au sein de deux populations établies en milieu naturel rocheux afin d'analyser les modalités du recrutement sur de très courtes échelles de temps (*i.e.* entre deux générations successives). *U. pinnatifida* est en effet une algue annuelle ; une nouvelle population s'établit donc *de novo* après chaque événement de reproduction saisonnier. Par ailleurs, différentes études menées dans l'aire d'origine (Suto 1950) et en laboratoire (Forrest et al. 2000) ont suggéré une distance de dispersion à très faibles échelles spatiales (quelques dizaines de mètre). Je me suis donc intéressée à déterminer les distances de dispersion à l'échelle d'un site naturel dans la zone d'introduction pour tester cette hypothèse de dispersion limitante. Basée sur l'analyse de la distribution de la diversité génétique, j'ai estimé des distances de dispersion efficace (*i.e.* distance parent-descendants).

IV. la quatrième partie de mon travail de thèse s'est concentrée sur l'étude de la colonisation de nouveaux substrats ou habitats artificiels et naturels par *U. pinnatifida* à deux échelles d'étude différentes. En effet, en Juillet 2007, un port de plaisance a été mis en fonction dans l'Aber Wrac'h (Bretagne Nord). Cet estuaire présentait la particularité de n'abriter que des populations établies dans le milieu naturel. Une concession de wakamé (fermée en 2002) en était certainement à l'origine. Malgré l'arrêt de la culture d'*U. pinnatifida* dans cet estuaire, les populations établies en milieu rocheux n'ont pas disparues. En parallèle de cette expérience, j'ai également examiné la colonisation d'un substrat naturel dans trois sites (l'un dans l'Aber Wrac'h et les deux autres en Baie de St-Malo).

Deux approches ont été menées :

1. un suivi de la dynamique de colonisation spatio-temporelle du port de l'Aber Wrac'h par *U. pinnatifida*, ensuite j'ai déterminé la source des individus fondateurs de cette nouvelle population en prenant comme référence les autres populations établies dans cet estuaire. Cette étude s'est appuyée sur des cartographies des colonisateurs et des analyses génétiques reposant sur des analyses d'assignations statistiques à partir du génotype multilocus.
2. une expérience sur la dynamique de recolonisation suite à une éradication dans un habitat naturel, afin d'analyser la recolonisation post-perturbation.

V. enfin, dans une dernière partie, plus exploratoire, je me suis focalisée sur les spores et les gamétophytes, véritables boîtes noires du cycle de vie et de dispersion d'*Undaria pinnatifida*.

Ces propagules microscopiques sont des éléments déterminants dans la dynamique démographique des populations adultes.

Dans ce contexte, j'ai cherché :

- (i) à développer des marqueurs diagnostiques d'*U. pinnatifida* (et d'autres laminaires indigènes en Europe) qui pourraient être mis en œuvre pour réaliser des marquages de spores *in situ* selon des techniques de type FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), largement utilisées pour compter et identifier les micro-algues planctoniques,
- (ii) à mieux comprendre les modalités de la reproduction et notamment la possibilité de parthénogénèse par l'étude des sex-ratios gamétophytiques chez *U. pinnatifida* en réalisant des mises en culture en laboratoire,
- (iii) à tester expérimentalement les capacités de fixation de gamétophytes à différents stades de leur développement.

NB. Certains de ces chapitres (1 et 2) soumis ou en passe de l'être au moment de cette rédaction sont présentés sous forme d'articles scientifiques en anglais précédés d'un résumé en français.

Chapitre I :
Connectivité & migration entre baies,
distribuées le long de la côte bretonne

Chapitre I : Connectivité & migration entre baies, distribuées le long de la côte bretonne

Note : Les détails de cette étude sont présentés dans le paragraphe I.2 sous forme d'un article scientifique à soumettre pour la revue « Diversity and Distribution ». Un synopsis en français précisant le contexte et les principaux résultats de cette étude est présenté dans le paragraphe I.1.

I.1 Synopsis de l'article présenté en I.2

Undaria pinnatifida fut introduite de manière accidentelle en Méditerranée (Etang de Thau) en 1971 avec des naissains d'huître creuse *Crassostrea gigas* provenant du Japon. En 1983, elle fut transférée de manière volontaire pour être cultivée, en différents points du littoral breton : île de Groix, île de Sein, île d'Ouessant (baie de Lampaul) et dans l'estuaire de la Rance (Baie de St-Malo) (Pérez et al. 1984 ; Floc'h et al. 1991). Les 1ers essais concluants ont conduit à l'installation d'autres concessions en France sur les côtes de la Manche (Aber Wrac'h, Roscoff, Guilvinec, etc) et de l'Atlantique (île d'Oléron) (Castric-Fey et al. 1993). Rapidement, la première année suivant la mise en culture, des individus sont apparus dans le milieu naturel à quelques dizaines voire centaines de mètres des filières d'*U. pinnatifida* suggérant des échappées d'individus cultivés dans le milieu naturel (Floc'h et al. 1991). Par la suite, des analyses moléculaires basées sur le séquençage de deux marqueurs mitochondriaux ont confirmé que les populations françaises sauvages (*i.e.* populations établies en dehors des cultures) partageaient un fond génétique commun entre elles et avec les populations cultivées françaises et de l'aire naturelle (Voisin et al. 2005) : l'introduction primaire en Europe est ainsi essentiellement liée à l'aquaculture.

Plus de 25 ans (*i.e.* 50 générations avec 2 générations par an en Bretagne ; Voisin 2007) se sont écoulés depuis la mise en place de ces cultures et l'installation des premiers individus d'*U. pinnatifida* dans le milieu naturel. Si les populations établies en milieu naturel à partir de ces cultures ont continué à échanger régulièrement des migrants, par des dispersions naturelles ou liées aux activités humaines (ex. contamination de lots aquacoles

« contaminés par des spores d'*U. pinnatifida*), leurs différences génétiques devraient être faibles. En revanche, en l'absence de tels échanges, ces différentes populations naturelles ont évolué de façon autonome (*i.e.* sous la dépendance principale de recrues produites par la population parentale locale) et les populations devraient avoir divergé génétiquement. Ces divergences génétiques devraient être d'autant plus importantes que les effets de dérive génétique sont marqués. Ces processus de dérive génétique locale peuvent avoir des implications importantes sur l'évolution à long terme de la population notamment par l'émergence d'adaptation locale, c'est-à-dire une adaptation en fonction des pressions sélectives locales.

J'ai ainsi testé ces deux hypothèses alternatives concernant la connectivité des populations naturelles d'*U. pinnatifida* établies en Bretagne Nord, en étudiant les flux de gènes entre populations à deux échelles spatiales : entre baies et entre populations au sein d'une baie (Figure I.1).

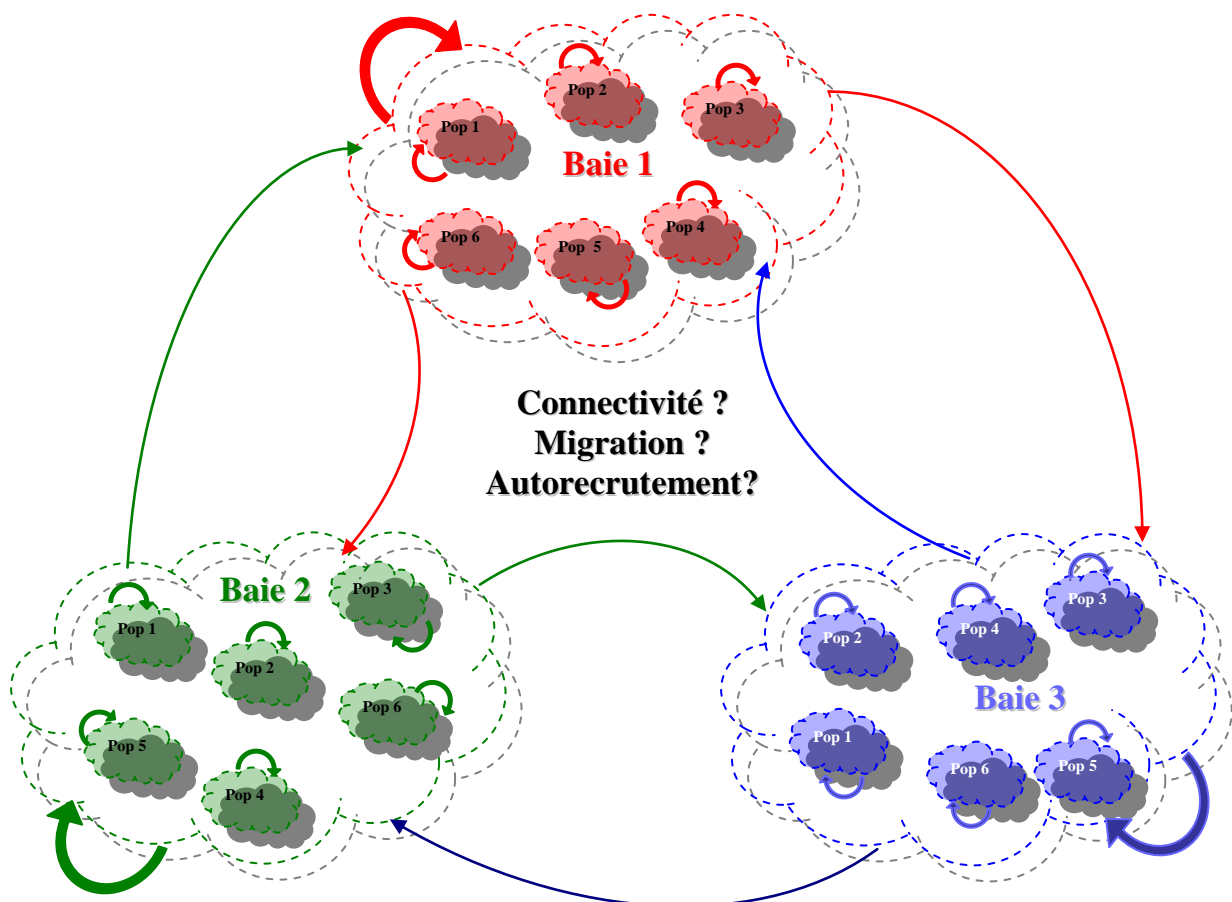


Figure I.1 : Schéma synthétisant les objectifs de cette étude.

Les « nuages » symbolisent les populations et les nuages qui les englobent les baies. Les flèches tournées vers elles-mêmes symbolisent l'autorecrutement des populations ou des baies; les autres symbolisent les échanges migratoires entre les populations au sein d'une baie ou entre les baies.

Pour réaliser cette étude, les sites ont été choisis sur la base de plusieurs critères : (1) un schéma d'introduction primaire identique : la mise en place de cultures d'*U. pinnatifida* ; (2) leur situation dans un espace géographique restreint, la Bretagne Nord, potentiellement connectée par de nombreuses activités d'origine anthropique (pêches à pied, échanges au sein de filières aquacoles, transports maritimes, loisirs nautiques, etc) (3) un même type d'environnement (baies ou estuaires soumis au balancement des marées, milieux non exposés en comparaison de la zone côtière ouverte au large) et (4) la présence de l'algue sur une même gamme de diversité d'habitats et de substrats naturels ou artificiels (ports, corps morts, enrochements, filières). Trois baies répondaient à ces critères : la Baie de St-Malo, l'Aber Wrac'h et la Baie de Lampaul (Ile d'Ouessant).

Dans ces sites, j'ai réalisé des échantillonnages me permettant d'effectuer des analyses moléculaires afin de répondre aux questions suivantes : (1) les populations sauvages actuelles sont-elles génétiquement similaires entre baies ou entre populations au sein d'une baie ? (2) la structure génétique entre les baies reflète-t-elle un effet des activités humaines (*i.e.* schémas attendus non concordant avec la distribution spatiale des populations) ou des schémas de dispersion naturelle ? Sur ce dernier point, détecter des limites aux flux de gènes à l'intérieur des baies plutôt qu'entre baies supporterait l'hypothèse d'un effet mineur des activités humaines qui sont à l'origine de dispersion à longue distance par rapport aux effets de la dispersion naturelle (à courte distance chez notre modèle d'étude) ?

Un échantillonnage hiérarchique a été réalisé au sein de chaque baie en Avril-Mai 2008-2009, en collaboration avec les plongeurs du Service Mer & Observation de la Station Biologique de Roscoff. Dix-neuf populations ont été étudiées: 7 dans la Baie de St-Malo et 6 dans l'Aber Wrac'h et dans la Baie de Lampaul. Les génotypes de 628 individus ont été obtenus sur 9 locus microsatellites en utilisant un séquenceur capillaire ABI.

Les principaux résultats obtenus sont :

- 1) une diversité génétique variable selon les populations ($H_e=0.22-0.44$).

A l'échelle des baies, la diversité génétique moyenne est similaire pour deux des trois baies étudiées (Baie de Lampaul et Aber Wrac'h) mais significativement plus élevée pour la Baie de St-Malo (Wilcoxon test, $p < 10^{-6}$) qui est, par ailleurs, la baie la plus fortement colonisée.

- 2) une structure génétique significative est observée à chaque échelle spatiale.

De façon inattendue, la différence génétique est plus forte entre les populations à l'intérieur d'une baie qu'entre les baies, soulignant d'importants effets de dérive génétique locaux. Les tests d'assignation montrent néanmoins une très bonne signature génétique des baies : la grande majorité des individus (50 à 90%) est préférentiellement assignée à la baie où ils ont été échantillonnés. Concernant les individus assignés à d'autres baies qu'à leur baie d'origine, les assignations croisées entre la Baie de St-Malo et les deux autres baies sont très faibles. Elles sont en revanche importantes et symétriques entre l'Aber Wrac'h et la Baie de Lampaul.

Ces résultats conduisent aux interprétations suivantes :

- 1) la forte structure génétique observée sur de faibles échelles spatiales (à l'intérieur des baies, 1-2km) suggère des dispersions à faibles distances, ce qui est en accord avec les attendus théoriques basés sur l'analyse des traits d'histoire de vie d'*U. pinnatifida* (*i.e.* une espèce annuelle avec des spores de courte durée de vie). De tels traits favorisent la dérive génétique et limitent les flux de gènes. Ils pourraient conduire à plus long terme à l'évolution d'adaptation locale à l'environnement spécifique de ces différentes baies.
- 2) les schémas de distribution de la diversité génétique observés au bout de 50 générations post-introduction ne reflètent que très partiellement l'histoire primaire de l'introduction d'*U. pinnatifida*. La Baie de St-Malo est aujourd'hui nettement individualisée des deux autres baies bien que toutes les fermes et les premières populations aient été établies à partir d'une origine commune. Néanmoins, il est intéressant de constater que la trace des activités humaines est encore visible quand ces activités se sont établies sur la durée : la plus grande similarité entre la Baie de Lampaul et l'Aber Wrac'h s'explique en effet par des échanges réguliers entre les fermes de ces baies avant qu'elles aient stoppé leurs activités, il y a une dizaine d'année.

Ainsi la connectivité entre les populations non cultivées d'*U. pinnatifida* est limitée et ce malgré des voies de dispersion potentiellement nombreuses d'origine naturelle ou anthropique. Ces résultats suggèrent qu'une plus grande maîtrise des échappements depuis les cultures ainsi que des échanges par les activités humaines aurait pu considérablement limiter l'installation aujourd'hui réussie de cette espèce à une échelle régionale ou locale (cf. Chapitre II pour un zoom en Baie de St-Malo).

I.2 “Unexpected limited population connectivity in a widely introduced and invasive kelp: multiple dispersal pathways do not enhance gene flow”

Auteurs : Daphné Grulois & Frédérique Viard – In prep. Diversity & Distribution

“Unexpected limited population connectivity in a widely introduced and invasive kelp: multiple dispersal pathways do not enhance gene flow”

Daphné Grulois & Frédérique Viard - In prep. Diversity & Distribution

UPMC Univ Paris 06, UMR 7144 CNRS UPMC, Div&Co team, Lab. Adaptation & Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, Roscoff 29680, France;

Correspondence: viard@sb-roscoff.fr and grulois@sb-roscoff.fr

Fax: 02 98 29 23 24

Short-title: Population connectivity in the invasive kelp *U. pinnatifida*

Keywords: Anthropogenic transport, aquaculture, biological invasions, coastal areas, dispersal scale, English Channel, gene flow, macro-alga, microsatellites

Abstract

Aim: As exemplified by biological invasions processes population connectivity, a major ecological and evolutionary driver, is increasingly influenced by human-mediated dispersal. We aimed to determine the likely influence of natural and anthropogenic dispersal on population structure and evolution of the invasive kelp, *Undaria pinnatifida*, thirty years after its introduction for cultivation purposes and subsequent escape in the wild.

Location: Invasive populations from natural and anthropogenic habitats in three bays of the English Channel, one of the most heavily colonized region.

Methods: To depict population connectivity in *U. pinnatifida* populations at a meso-scale, we used a hierarchical sampling design (19 populations from three bays). Nine microsatellites were used to examine the amount and distribution of the genetic variation among populations and bays. We computed standard genetic diversity indices and described population genetic structure using F_{st} -estimates, AMOVA and Mantel tests. In addition, we used assignment tests and Bayesian analyses to avoid biases due to *a priori* hypotheses about population definition when analyzing dispersal patterns.

Results: The genetic diversity was high in all substrates and habitats. However, the most densely colonized bay showed the largest mean genetic diversity. The genetic structure was high and significant at both population and regional scales. Bayesian and assignment tests supported the frequency-based analyses showing a high level of self-assignment. Two of the three bays appeared more connected to each other.

Main conclusions: Despite a shared history of introduction and common genetic background due to aquaculture activities, populations of *U. pinnatifida* were found to be genetically diversified and structured over very small spatial scales (*i.e.* few km), suggesting a rapid genetic divergence of populations established in the wild and a limited influence of human-mediated transports. Considering the life history traits of *U. pinnatifida*, an evolution towards local adaptation may occur and make this invasive kelp even more conspicuous and invasive.

INTRODUCTION

Dispersal influences population demography, adaptation to local environmental conditions, population connectivity etc. and thus has major ecological and evolutionary consequences (Clobert et al. 2001 ; Lenormand 2002 ; Broquet & Petit 2009). This is a complex process which relies on a variety of factors from life history traits to landscape effects (Ronce 2007). In the last few centuries, dispersal has been also shaped by non-natural factors, in particular by human-mediated spread as exemplified by biological invasions (Wilson et al. 2009). Long distance and jump dispersal due to accidental or intentional species introductions was shown to contribute to a global biotic homogenization (*e.g.* in marine environments; Molnar et al. 2008).

Population genetics have been increasingly used in the past twenty years to document the introduction history and pathways of successful invaders and depict the underlying mechanisms for the success of introduced species (Estoup & Guillemaud 2010). In aquatic environments, an increased genetic diversity in introduced populations, compared to native populations, has often been documented. This pattern has been explained by a high propagule pressure generally due to recurrent introduction events and multiple dispersal pathways (Voisin et al. 2005; Roman & Darling 2007; Simberloff 2009). Propagule pressure increase the likelihood of introducing novel genotypes, some of them possibly better adapted to local environmental conditions (Roman 2006). It may also favor the emergence of new genotypes from the contact between groups previously isolated in the native range (Simon-Bouhet et al. 2006). Regional spread of introduced species and mechanisms that promote their long-term settlement can also be efficiently investigated with population genetics although such studies are still scarce (Geller et al. 2009).

In the introduction range of an established invader, natural dispersal can become more important than human-mediated transports especially in highly dispersive environment like marine systems. This hypothesis has been tentatively tested in some marine species. For instance, in the invasive gastropod *Crepidula fornicata*, the lack of genetic structure at a bay scale suggested high gene flow associated to natural larval dispersal over large scales, a pattern ascertained with larval dispersal modeling (Viard et al. 2006). However, because many marine species exhibit high effective population size, long-lived dispersal stage (*e.g.* long-lived larvae) and are likely to depart from drift-migration equilibrium (Hedgecock et al.

2007), reconstructing recent dispersal events is challenging. Studying species characterized by limited natural dispersal ability, like macro-algae (Kinlan & Gaines 2003), is likely to be a less complicated way to test for the relative influence of multiple dispersal pathways on the spread of introduced species at a regional scale.

Macro-algae are important invaders at a worldwide scale (Williams & Smith 2007). Here, we investigated regional population connectivity of a major marine invader, the Asian kelp *U. pinnatifida*, recognized as one of the most invasive and hazardous macroalgal species (Nyberg & Wallentinus 2005). Large-scale expansion rate and patterns of this kelp have been documented based on molecular approaches (Voisin et al. 2005 ; Uwai et al. 2006) as well as observational records (Lyons & Scheibling 2009). The first observation of *U. pinnatifida* outside its native range was in 1971 in Europe (France, Pérez et al. 1981). It is now present in the English Channel, the North-East Atlantic from Spain to Netherlands, the Mediterranean Sea, in North-Eastern and Southern Pacific down to Patagonia (Silva et al. 2002 ; Martin & Cuevas 2006 and references therein). This kelp took advantage of a large set of human-mediated transports and anthropogenic activities to spread at a worldwide level. These multiple introduction pathways have been shown to be associated with contrasted genetic features (*i.e.* a worldwide reshuffling of the native genetic diversity, (Voisin et al. 2005), in Europe, conversely to Australia and New-Zealand, a major founding event due to aquaculture was shown, conversely to Australia and New Zealand where (explain what was shown here).

At a regional scale, its recent and well-documented introduction history makes this alga a suitable model to investigate dispersal and sustainable settlement processes in the invasive range. In Northern Europe, *U. pinnatifida*, an edible seaweed, was deliberately introduced in Brittany in the early 1980s to be cultivated (Pérez et al. 1984) but rapidly escaped from farms to establish wild populations over a large set of substrates available in the vicinity, including natural (*i.e.* rocky subtidal and intertidal habitats) and artificial substrates (*e.g.* buoys, ship hulls etc.) (Floc'h et al.1996). The species is currently abundant in many bays and estuaries on the French coast of the English Channel. Two types of possible dispersal pathways co-exist at a regional scale: (1) human-mediated transports through seedlings exchanges among farms or ship hulls, and (2) natural dispersal vectors (spores, gametes and drifting thalli). Estimated dispersal scales are of the order of 10m per year for spores and 10^3 - 10^4 m per year for drifting thalli (Sliwa et al. 2006). In the absence of long-

distance dispersal mediated by human-activities, limited population connectivity is expected in this species which is an annual alga with short-lived spores.

The aim of this study was thus to investigate population connectivity patterns and underlying dispersal pathways among invasive populations of *Undaria pinnatifida* established for ca. 25-30 years in Northern Brittany, a region heavily colonized by this kelp. Using 9 microsatellite loci, we examined the amount and distribution of genetic variation among 19 populations from three different bays. These sites were selected using several criteria: (1) a similar introduction history: the establishment of *U. pinnatifida* farms in the early 1980s with the same source population, (2) their location in tidal bays in which many human activities co-exist (leisure nautical activities and fishing, maritime traffic, aquaculture, etc.) and (3) the occurrence of populations established over a large variety of substrates (intertidal and subtidal rocky shore, pontoons, buoys, ropes, ship hulls). We tested the following hypotheses: (1) the primary founder effect is still visible after 25 years (*i.e.* 50-60 generations in Brittany; (Castric-Fey et al. 1999, Voisin and Viard unpublished data), (2) jump-dispersal mediated by human-activities is prevalent enough to shuffle the genetic diversity at bay and regional scales.

METHODS

Study sites and genetic data

Samples were collected from three bays in Northern Brittany (France; Figure 1): Aber Wrac'h (AW; 48°36'08.72''N, 4°34'15.22''W), Bay of Lampaul (BL; 48°26'51.98''N, 5°06'39.41''W) at Ushant Island and Bay of St-Malo (BM; 48°39'13.92''N, 2°03'06.54''W). The establishment of wild populations of *U. pinnatifida* in these bays share a common history and source: following its accidental introduction in the Thau Lagoon (Mediterranean Sea) in 1971, *U. pinnatifida* was deliberately introduced at three locations around Brittany in 1983: Groix Island, Ushant Island and Rance Estuary in the Bay of St-Malo; (Perez et al. 1984; Floc'h et al. 1991). Some years after, in 1989, it was introduced from the same cultivated source in other localities including in the Aber Wrac'h. Spontaneous populations rapidly developed in natural or artificial habitats (e.g. in Ushant Island; Floc'h et al. 1991). The farms producing *U. pinnatifida* were closed in 1997 in the Bay of Lampaul and in 2002 in the Aber Wrac'h. Farming is still on-going in the Bay of St-Malo.

In order to examine the scale at which dispersal is occurring, a hierarchical sampling design was carried out (Figure 1, Table 1). Adult individuals were collected in 6 populations in the Aber Wrac'h and the Bay of Lampaul, and 7 in the Bay of St-Malo. For Bay of St-Malo, genotypes were obtained from 6 populations selected out of 30 studied by Grulois et al. (submitted); these populations were sampled in spring 2009 and distributed over a similar spatial range as in the two other bays. For all other localities, the individuals were sampled by scuba-diving, in spring 2008 for Aber Wrac'h and spring 2009 for Bay of Lampaul. A small piece of tissue (5 cm²) was dried in silica gel for subsequent DNA analysis. For each site, the geographical coordinates were registered and entered into an ArcGIS layer (ESRI, v.9). Total genomic DNA was extracted from 5-10 mg of dried tissue by using the Nucleospin Multi96 Plant extraction kit (Macherey & Nagel) according to the manufacturer's instructions (except the step temperature at 65°C which was deleted) and diluted to 1:100 prior to PCR. Individuals were genotyped at 9 loci following protocols detailed in Daguin et al. (2005) and Grulois et al. (submitted). Three multiplex PCRs were performed with the following combination of loci and dyes: (1) 4G2 (NED), 1C1 (PET), 1B5 (FAM) & 4C12 (VIC); (2) 1B2 (NED), 1H5 (FAM) & 1G2 (VIC); and (3) 2C1 (FAM) & 2E8 (VIC). Genotypes obtained were scored using GENEMAPPER v4 software (Applied Biosystems).

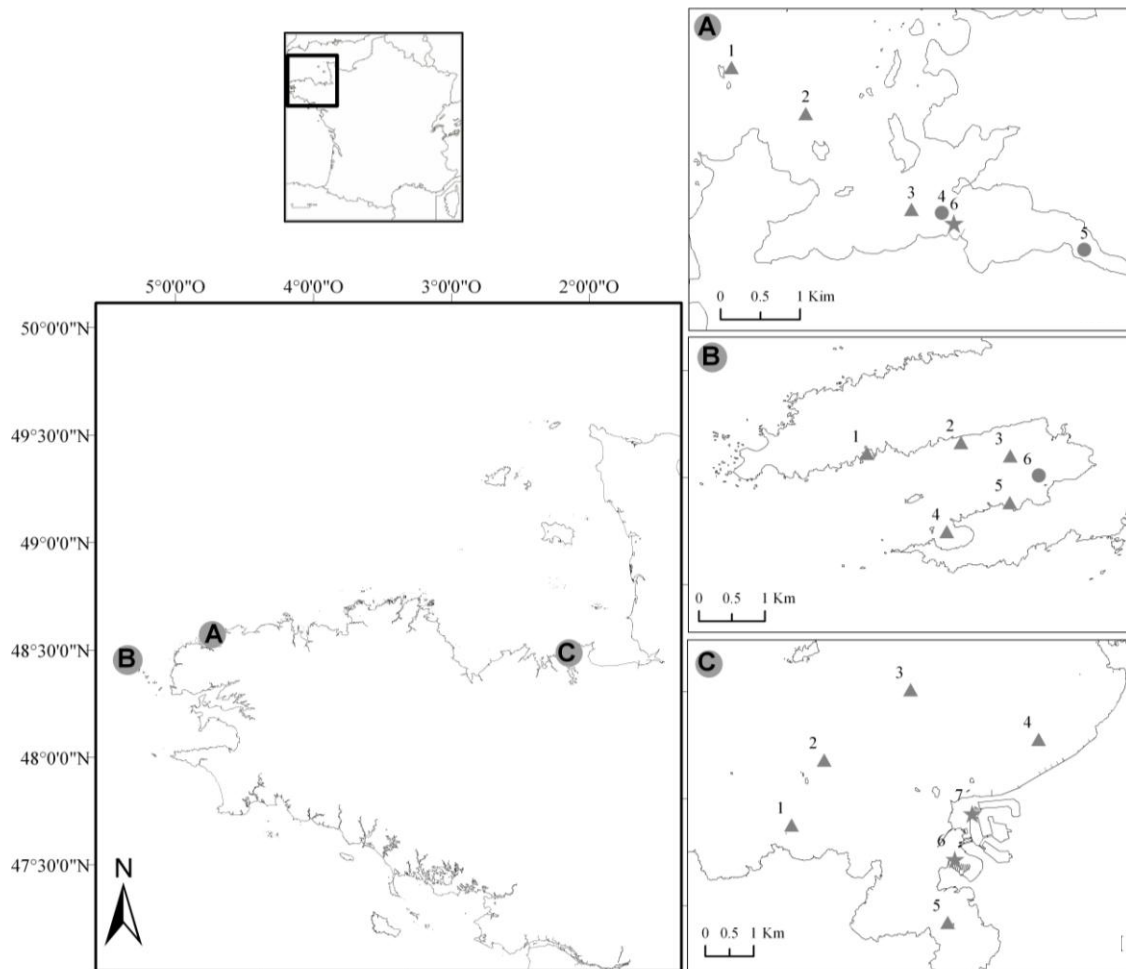


Figure 1: Location of study sites in three bays invaded by *U. pinnatifida* in Northern Brittany, France: (A) Aber Wrac'h (AW), (B) Bay of Lampaul (BL) and (C) Bay of St-Malo (BM).

Population number refers to name indicated in Table 1. The triangles, circles and stars mark populations established in rocky habitats, on buoys and in marinas, respectively.

Table 1: Study sites and genetic diversity estimates per population and bay

For each population, the name, code, type of habitat (Fig. 1) and the number of individuals analyzed with 9 microsatellite loci (N) are given. Genetic diversity indices computed are: the number of alleles (N_{all}), the allelic richness (A_r), the gene diversity (H_e) and the heterozygote deficiency (F_{is}) with its associated probability P (exact test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium; significant values in bold). Values per bay (mean and total) and over the whole dataset (mean and total) are indicated (grey shading).

Bay	Population	Code	Habitat	N	N_{all}	A_r	H_e	F_{is}	P
Aber Wrac'h (AW)	Basse la Croix	A.1	Rocky	32	2.00	1.99	0.285	0.140	0.153
	Breac'h Ver	A.2	Rocky	40	2.00	1.99	0.311	0.162	0.021
	Roches aux Moines	A.3	Rocky	32	2.11	2.10	0.231	0.137	0.033
	Coffre	A.4	Buoys	37	1.89	1.85	0.245	0.095	0.001
	Camaleut	A.5	Buoys	31	1.89	1.89	0.234	0.355	0.000
	Port AW	A.6	Marina	45	2.11	2.10	0.315	0.263	0.170
	Mean AW	-	-	36	2.00	1.99	0.270	0.192	-
	Total AW	-	-	217	2.33	2.33	0.302	0.266	<10⁻⁶
Bay of Lampaul (BL)	Anse Bougezenn	B.1	Rocky	32	2.00	2.00	0.330	0.052	0.914
	Bougeo Toull Lakoun	B.2	Rocky	32	2.11	2.10	0.331	0.182	0.056
	Petit Truc	B.3	Rocky	32	1.89	1.87	0.219	-0.028	0.517
	Porhz Kored	B.4	Rocky	32	2.00	1.99	0.344	0.062	0.552
	Beg Roget	B.5	Rocky	32	2.33	2.30	0.338	0.158	0.220
	Buoys-Lampaul	B.6	Buoys	32	2.67	2.62	0.345	0.038	0.757
	Mean BL	-	-	32	2.17	2.15	0.318	0.077	-
	Total BL	-	-	192	2.89	2.89	0.353	0.269	<10⁻⁶
Bay of St-Malo (SM) ⁽¹⁾	Rochardien (13)	C.1	Rocky	30	2.78	2.78	0.425	0.105	0.252
	Pierre Salée (14)	C.2	Rocky	32	2.78	2.76	0.397	0.011	0.444
	Pierre aux Normands (21)	C.3	Rocky	32	2.67	2.61	0.373	0.008	0.491
	Thermes (23)	C.4	Rocky	32	2.89	2.86	0.410	0.117	0.011
	Bizeux (17)	C.5	Rocky	32	2.78	2.75	0.355	0.160	0.093
	Bas Sablons (18)	C.6	Marina	29	3.00	2.99	0.414	0.094	0.513
	Vauban (19)	C.7	Marina (lock)	32	2.44	2.42	0.307	0.478	<10⁻⁶
	Mean SM	-	-	31	2.76	2.74	0.383	0.139	-
	Total SM	-	-	219	3.33	3.33	0.398	0.136	<10⁻⁶
	3 bays	Mean 3 bays	-	-	33	2.33	2.31	0.327	0.136
Total 3 bays		-	-	628	3.78	3.78	0.370	0.238	<10⁻⁶

(1) For the Bay of St-Malo, numbers in parentheses after the population name refer to the label used in Grulois et al (submitted)

Genetic analyses

Genetic diversity and departure from random mating

Statistical independence across the 9 loci was verified using exact test computed for all locus pairs over the whole data set and for each population using GENEPOP v4.0.7 (Rousset 2008). Genetic diversity at population and bay scales was analyzed using the software GENEPOP v4.0.7 by computing the mean number of alleles per locus (A), the mean observed (H_o) and Nei's unbiased expected (H_e) heterozygosities. To take into account differences in sampling size, allelic richness (A_R) (allele number corrected for sample size using a rarefaction method; El-Mousadik & Petit 1996) was computed with the software FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001). Genetic diversity indices were compared among bays using a permutation procedure implemented in the same software. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was tested within each population by locus and over all loci using exact tests as implemented in GENEPOP v4.0.7. The inbreeding coefficient (F_{is}) was estimated for each population and group (bay) with the same software. To adjust for multiple comparisons in the above mentioned tests, the false discovery rate (FDR) was controlled: q-values were computed using the QVALUE routine in the R package (Storey 2002).

Genetic structure, AMOVA and isolation by distance model

The distribution of the genetic diversity among populations within the bays or across all populations was first analyzed using Weir & Cockerham's F statistics (Weir & Cockerham 1984) using FSTAT. The significance of the deviation of each estimator from zero was tested using a permutation procedure (10 000 permutations) and Bonferroni correction was carried out to adjust for multiple comparisons, both included in FSTAT. Pairwise F_{st} values, computed with FSTAT, were pictured using a multidimensional scaling (MDS) plot with the software Xlstat.

The independence between genetic distance and geographic distance between populations was investigated by testing for the isolation by distance (IBD) model (Rousset 1997). Using a Mantel test (10 000 permutations) implemented in the GENEPOP V. 4.0.7 software (Rousset 2008), we tested for this model by computing and testing for the independence of two pairwise matrices: one with an estimate of the genetic distance ($F_{st}/(1-F_{st})$) and one with the natural log of geographic distance (the shortest route between populations along the coastline).

To test for the relative effects of the clustering within populations and bays over the overall genetic structure, a hierarchical multilocus Analysis of Molecular Variance (AMOVA; (Excoffier et al. 1992) was conducted using Arlequin V.3.5 (Excoffier & Lischer 2010). The total genetic variance was partitioned into variance components distributed among populations and bays. Two fixation indexes were estimated: F_{pb} and F_{bt} indicating the genetic differentiation between populations within the bays and between bays, respectively. Significance levels of F_{pb} and F_{bt} were assessed by non-parametric permutation procedures of genotypes (10 000 permutations) among populations within the bays and among populations between bays, respectively.

Genetic clustering and assignment methods

Because F-statistics and AMOVA analyses operate at the population level and thus make strong assumptions about *a priori* grouping (Manel et al. 2005), we used an individual-based clustering approach implemented in the software STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000). The model attempts to find the number of clusters (K) that best explains the genetic data, assuming Hardy-Weinberg and linkage equilibrium within clusters and then estimates admixture proportions for each individual (*i.e.* the genetic membership of each individual to each cluster). We performed the simulations using an admixture model with correlated allele frequencies and the use of sampling location as prior location. This model is relevant for structure to be detected with limited genetic variance in the dataset (Falush et al. 2003; Hubisz et al. 2009). Ten independent runs were carried for each prior value of the number of clusters (K), set between 1 and 19 (*i.e.* the maximum number of populations in the dataset). Each run was carried out each with Markov chain Monte Carlo (MCMC) of $5 \cdot 10^4$ iterations following a burn-in of 10^5 iterations. The highest mean posterior probability over the runs was used to estimate the estimated number of clusters (K) as recommended by the software authors (Pritchard & Wen 2003).

A second approach, based on assignment tests (Davies et al. 1999) was used for examining the proportion of individuals likely to originate from reproduction of immigrant individuals rather than from reproduction of individuals from the site where they have been sampled. Assignment was done by following Rannala and Mountain's (1997) method as implemented in the software GENECLASS 2.0 (Cornuet et al. 1999). For each individual multilocus genotype, a marginal probability of belonging to each of the possible source population is calculated, based on the allele frequencies of the samples. Each individual is then assigned to the source for which it obtained the highest marginal probability. All the

sampled sites were used as a possible source except the population A.6 in the Aber Wrac'h. The population A.6 is made of the first generation of individuals established in a new marina (pers. obs.). To compare outputs from assignment tests and frequency-based statistics (F_{st}), we computed the mean individual assignment likelihood of each population i to each possible source populations (L_{i-s}) following Pascual et al. (2007). The most likely source population was identified as the one with both the highest L_{i-s} value and the lowest F_{st} value.

RESULTS

Genetic diversity at population and bay scales

We analyzed a data set of multilocus genotypes obtained for 628 individuals of *Undaria pinnatifida*, with very little missing data (0.72%). Over the whole dataset, the number of alleles varied from 2 for the 4C12 locus to 6 for 1B2 and 2E8 loci, with an average of 3.78 ± 1.39 alleles per locus. Of the 36 tests for linkage disequilibrium performed over all populations for each locus pair, 5 were significant after FDR correction. When the tests were performed in each population separately and for each locus pair (470 tests with polymorphic loci), 47 were significant but only 3 after FDR corrections (1C1 and 2E8 loci in population A.4, 4G2 and 2E8 and 4C12 and 2E8 in population C.7). The limited number of linkage disequilibria observed and the fact that disequilibria in different populations did not involved the same pairs of loci suggested that the 9 study loci could be used as independent variables.

All the study populations were polymorphic with a mean number of alleles across loci ranging from to 1.89 for B.3, B.4 and A.5 populations to 3.00 for C.6 population (Table 1). The average was 2.33 ± 0.39 per population. The genetic diversity at the population level was not explained by substrate or type of habitat (*i.e.* marinas, rocky habitats, buoys; Kruskal-Wallis test, $p > 0.20$ for N_{all} , A_r , H_e). Conversely, significant differences for the allelic richness (F_{stat} permutation tests for group comparisons, $p < 10^{-3}$) and the expected heterozygosity ($p = 0.002$) were observed when comparing populations from the three bays. Populations from the Bay of St-Malo were the most genetically diverse (Table 1).

Genetic structure within and among samples: HWE, F-statistics, AMOVA and IBD

At the population level, heterozygote deficiencies were mostly found in one bay, the Aber Wrac'h. Thirteen out of 19 populations (70%) did not show departures from Hardy-Weinberg equilibrium suggesting panmictic reproduction at the population scale. Conversely, significant departures were found when pooling populations from each bay together, indicating population structure (Walhund effect, *i.e.* co-existence of genetically differentiated sub-groups). A significant genetic structure was indeed observed among the 19 study sites ($F_{st} = 0.129$, $p < 10^{-6}$).

When considering each bay separately, the genetic structure was found to be of the same order of magnitude as the whole dataset in the Aber Wrac'h ($F_{st} = 0.128$; $p < 10^{-6}$) and the Bay of Lampaul ($F_{st} = 0.114$; $p < 10^{-6}$) but lower in the Bay of St-Malo ($F_{st} = 0.046$; $p < 10^{-6}$).

⁶). These results are in agreement with the results of the hierarchical analyses of the genetic variance (AMOVA) which showed that both grouping levels (*i.e.* populations and bays) have a significant effect. However, a larger differentiation was observed among populations within each bay ($F_{pb}=0.091$; $p < 10^{-4}$) than between bays ($F_{bt}=0.058$; $p < 10^{-4}$). This overall pattern of genetic structure is shown with more details when analyzing pairwise comparisons (Supporting information; Table S1): among 171 tests comparing pairs of populations, only ten were not significant after Bonferroni correction and half of those involved populations from Bay of St-Malo (Table S1, Supporting Information). Clustering of the populations per bays and in particular, the genetic isolation of the populations from Bay of St-Malo is pictured in the MDS plot in Figure 2.

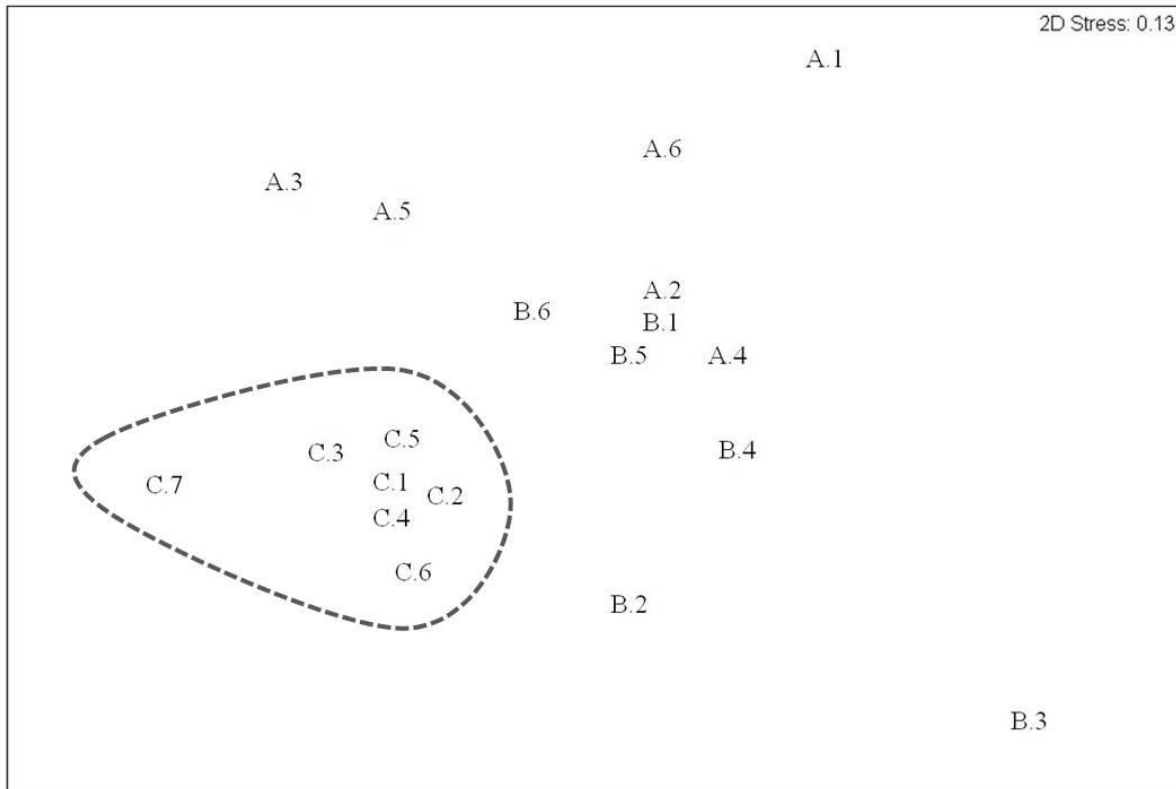


Figure 2: MDS performed using the matrix of genetic distance (F_{st} -estimates) among the 19 samples.

Populations from St-Malo are grouped within the dashed line. Names of the sampling locations are given as in Table 1.

A significant genetic isolation by distance among populations was observed when considering the 19 populations (Mantel test, $p=0.002$; Supporting information Figure S1). However, this relationship did not hold when populations from Bay of St-Malo were removed ($p=0.423$) or when considering each bay separately ($p=0.121$).

Clustering analyses

Results of the frequency-based analyses described above were supported by the outputs of the Bayesian clustering analysis: the most likely number of “true populations” explaining the overall genetic variance in the data set was found to be 12, a large number highlighting the high genetic variance in the dataset. All individuals were admixed (α value is 0.983; Figure 3). The value of r , which characterizes the amount of information carried by the locations, was 0.395. This matches the presence of genetic structure among localities in the dataset. Individuals from St-Malo, with the exception of the individuals from C.7 (one of the two study marina of this bay), showed a distinct signature with a large proportion of membership to in one cluster (pictured in orange in Figure 3), which was not present or poorly present in the other bays.

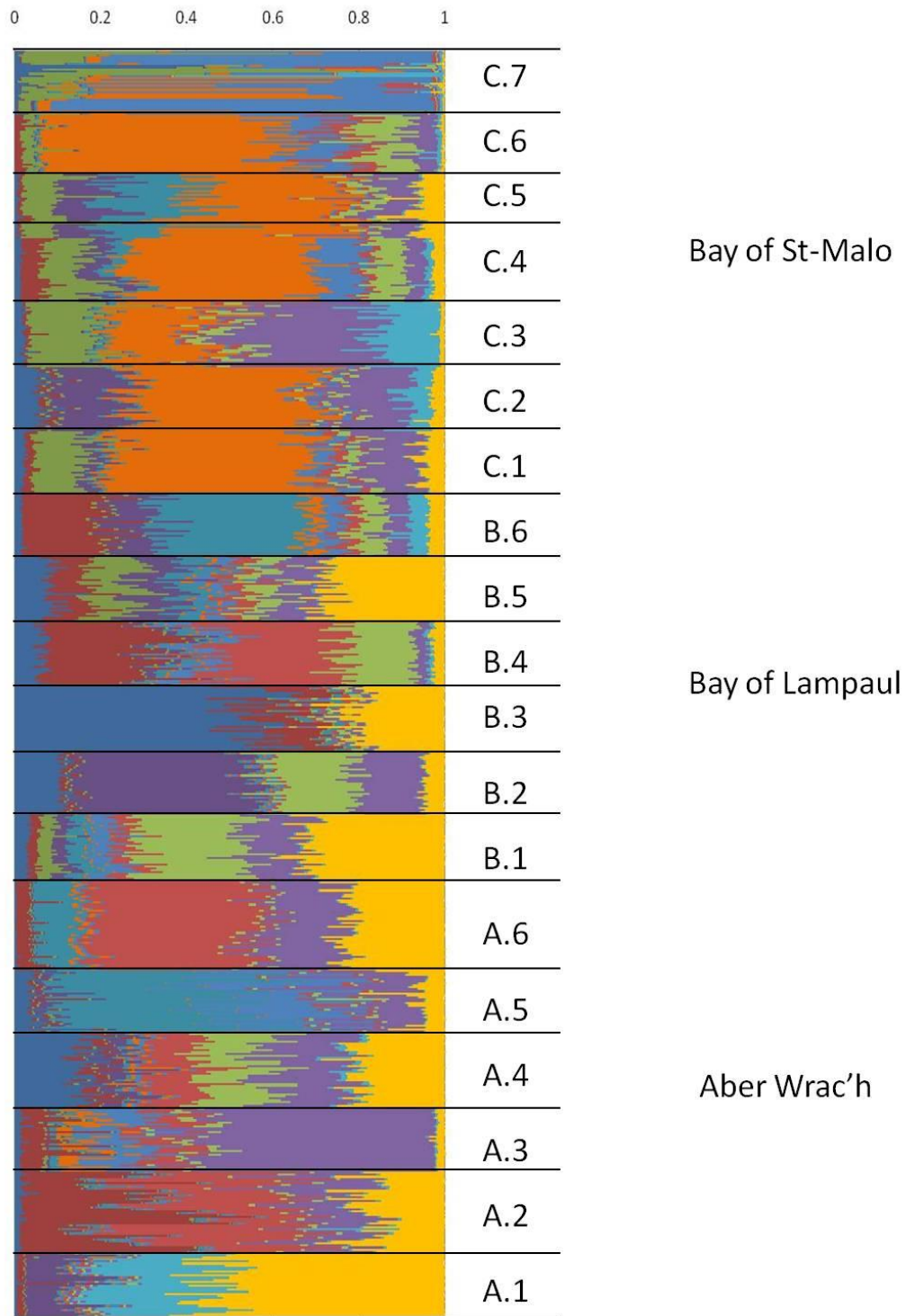


Figure 3: Output of the clustering analysis (STRUCTURE software) over the whole dataset (N=628 individuals)

Twelve clustered were identified, each of them represented by a different colour. Each individual is represented by a horizontal line divided into coloured bars that represent the individual's estimated membership to each of the 12 identified clusters. Black lines separate individuals sampled in different localities.

Assignment analyses

Results of the assignment tests (Figure 4) revealed a high proportion of individuals assigned to a single population located in the bay where they were sampled (including their own sampling locality), with a mean value of 77.4% (79, 73 and 80% for Aber Wrac'h, Lampaul and St-Malo respectively). Self-assignment (*i.e.* proportion of individuals assigned to their own locality) was variable, ranging from 12.5% (B.5) to 81.25% (B.3), with a mean value of 49%. A small percentage of individuals from the bays of Lampaul (1.6%) and Aber Wrac'h (5.1%) was assigned to the Bay of St-Malo. A larger and similar number of individuals were reciprocally assigned between Aber Wrac'h and Bay of Lampaul (23.7% and 18.5% respectively). Comparisons of the genetic similarities observed between populations were usually congruent between the two methods used, namely pairwise F_{st} values and mean individual assignment likelihood, L_{i-j} (Supporting Information, Table S2). The two methods showed similar results when considering the bay level in every population (except for A.3) and this was also true in most cases at the population level. These analyses confirmed the high genetic similarity among populations located in the Bay of St-Malo as no matter the method used; the closest population was always a population from this same bay. The same holds for most populations from the Bay of Lampaul with only one (B.4) found to be genetically closer to one population from the Aber Wrac'h with the two methods. However, results were how for the Aber Wrac'h for which 4 out of 6 populations were genetically closer to one population from the Bay of Lampaul.

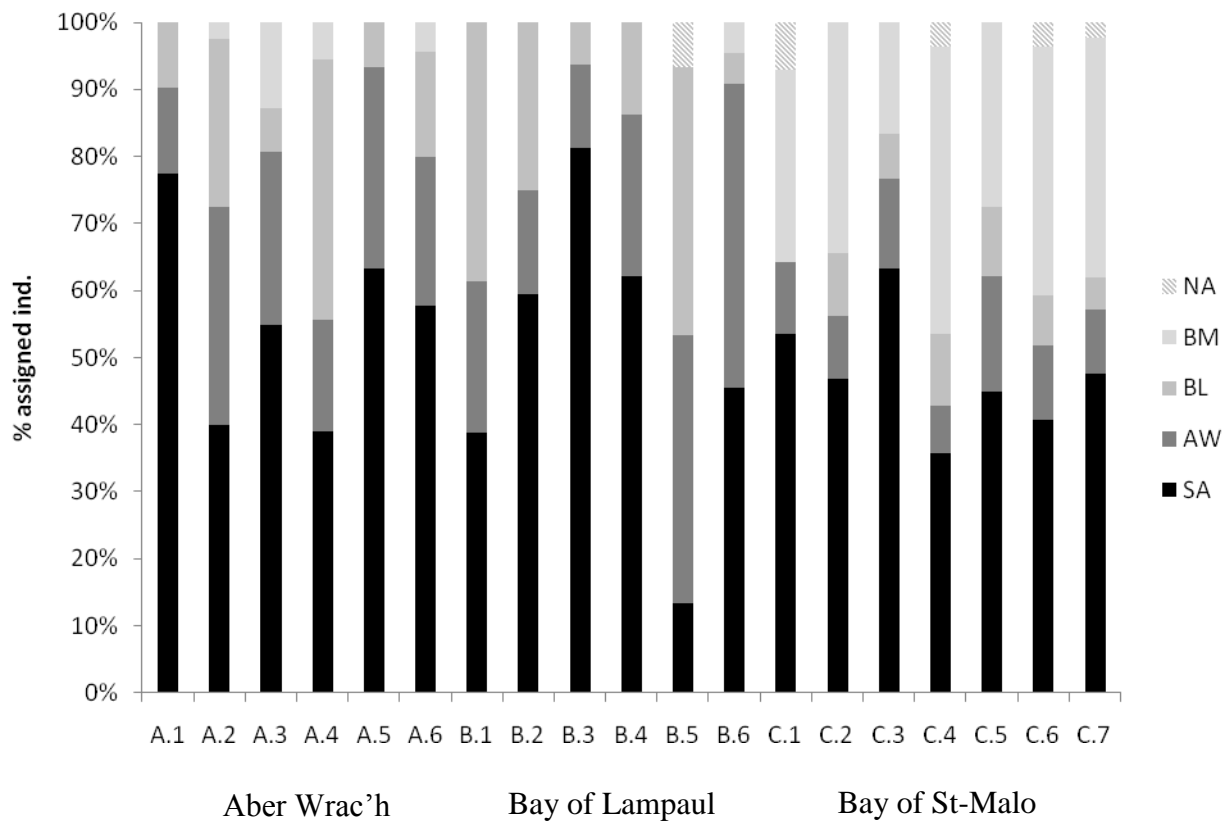


Figure 4: Proportions of individuals from each locality assigned to its own site and to the 3 bays

NA stands for the individuals that could not be assigned ($p < 0.05$).

SA means “self assigned” and correspond to individuals that obtained the highest assignment probability to the locality where they were sampled. AW (Aber Wrac’h), BL (Bay of Lampaul) and BM (Bay of St-Malo) refer to individuals not assigned to their own sampling site but assigned to one locality in one of these bays.

DISCUSSION

Different dispersal pathways and thus expansion mechanisms can work on different spatial scales, in particular according to the influence of human-mediated transports (Wilson et al. 2009). When considering cultivated plants or animals, the influence of human transports is particularly significant. At the European level, and especially along the Brittany coasts, the introduction of the kelp *Undaria pinnatifida* was primarily determined by the establishment of farms cultivating this edible seaweed (Floc'h et al. 1996; Voisin et al. 2005). These farming activities were found to be responsible for (1) a rapid spatial spread regardless of distance separating sites and bays and (2) a genetic homogeneity at a regional level along the French coasts. This latter result was explained by a common source and a founder effect (*i.e.* farms establishment). Such founder events have been scarcely documented in marine invaders (Roman & Darling 2007) as compared to terrestrial invaders (*e.g.* Dlugosch & Parker 2008). However, this primary common genetic background was documented using mitochondrial DNA (Voisin et al. 2005), which is known to be sensitive to genetic drift effect (Diaz-Almela et al. 2004). We here examined nuclear polymorphic markers to depict population connectivity and gene flow in introduced population's ca. 50-60 generations after their establishment.

As observed in other invasive seaweeds (Booth et al. 2007), we first showed that the populations are genetically polymorphic in the three study bays. In all populations, we observed a large genetic diversity with gene diversity values ranging from 0.219 to 0.425, with a mean of 0.327 over the 19 study sites. These values were close to the values reported in one population from the native range of *U. pinnatifida* ($H_e = 0.251$, on 24 individuals from Nagasaki, Japan, using 8 microsatellite loci (Daguin et al. 2005). There is no data available on a larger set of populations from the native range to determine if the values observed in Nagasaki fall within the range of values commonly found in the native range of *U. pinnatifida*. Conversely to the common genetic background revealed with mitochondrial analyses (Voisin et al. 2005), nuclear markers used here showed that the founding populations were genetically diverse. In addition, we cannot exclude that cryptic invasions from the native range may have occurred besides the recognized introduction of cultivated strains of *U. pinnatifida*. Such cryptic invasions at the intra-species level introductions have been regularly reported thanks to the use of molecular markers in marine species (Simon-Bouhet et al. 2006; Geller et al. 2009). Analyzing nucleo-cytoplasmic disequilibria in populations

established at the European level is needed to better ascertain the strength of the primary bottleneck as well as to test for the emergence of new genetic combinations following the primary introduction. The polymorphism observed in the introduced population of *U. pinnatifida* is nevertheless lower than the values reported for a common native kelp (*Laminaria digitata*) in the same distribution range and with similar life cycle, ($0.475 < H_e < 0.696$, with a mean of 0.587 ± 0.052 computed over 18 study sites and using 7 loci microsatellite ; Billot et al. 2003).

Over the whole dataset, we did not observe significant effects of habitat (e.g. marina vs. rocky shore) or substrates (e.g. rocks vs. buoys) on genetic diversity. However, although all the populations were found to be polymorphic, some were slightly less diverse, e.g. the populations A.3, A.4 and A.5 in the Aber Wrac'h, B.3 in the Bay of Lampaul and C.7 in the Bay of St-Malo. This may be explained by some of the characteristics of the sites. In particular, the population C.7 is an enclosed marina in which *U. pinnatifida* is less abundant as compared to other sites and which seems to be more genetically isolated within the bay (Figures 2 and 3). In this population, local genetic drift might thus be more important with subsequent loss of genetic diversity. The same explanation may hold for the population B.3 was also genetically isolated (Figure 2) and showed the highest proportion (82%) of self-assignment. This scenario of enhanced local genetic drift is unlikely, however for the populations of the Bay of Lampaul which showed moderate self-assignment values (38%, 53%, 61% for A.4, A.3 and A.5 respectively). One hypothesis would be more recent founding events in these sites although the lack of historical records makes this hypothesis highly speculative. Thirty years after its introduction for cultivation purposes, *Undaria pinnatifida* is indeed well-established in various natural and artificial habitats (marinas, intertidal and subtidal rocky shores, buoys off-shore and along-shore, etc.) in Brittany. We showed that the populations established in the Bay of St-Malo displayed the highest genetic diversity. *U. pinnatifida* is particularly well-represented in this large bay which was also one of the first site where farming activities took place (Floc'h et al. 1991). In this bay, a recent survey carried out at the whole bay scale (ca. 65 km², excluding the Rance Estuary) showed the presence of the species in 29 out of 33 sites (88%; Grulois et al. submitted). This long-term presence and large spatial distribution contribute a large census size at the bay level. In addition, this bay showed a lower genetic structure as compared to the two other study bays suggesting more important connectivity between populations established in this bay. A large

census size and the possibility of some gene exchange between populations may enhance the overall effective size within this bay, and thus the genetic diversity.

A large and significant genetic structure was observed at the two study scales (*i.e.* region and bay). Both the frequency-based and Bayesian-based analyses showed limits to gene flow even at a very short spatial scale (*i.e.* a few km). The assignment tests also revealed that most of the individuals were preferentially assigned to the bay where they were sampled (50% to 90%). These results were unexpected considering the multiple dispersal pathways of *U. pinnatifida*, in particular numerous dispersal vectors involving human activities (Forrest et al. 2000), such as transport of microscopic spores and gametophytes with shipping and nautical leisure activities (Hay 1990) and farming seedlings exchange (Floc'h et al. 1991). Conversely, these results are in agreement with genetic expectations based on the life-history traits of *U. pinnatifida*. This kelp is an annual species with a heteromorphic life-cycle during which short-lived zoospores are produced. The spores swim downwards in the water (3-8 sec/mm⁻¹, Suto 1950) and have or no slightly negative phototaxy (Suto 1950). Their life duration in the water column is unknown but based on laboratory experiments, they are expected to survive from a few hours to several days (up to 5h, Saito 1975; up to 2 days, Suto 1950; up to 5-14 days, Forrest et al. 2000) as in many other Laminariales (Reed 1992). Concerning the scale of dispersal, using field experiments, Forrest et al (2000) used field experiments to estimate dispersal of close to 10 m from the spore source with an important dilution effect. These estimates are close to values of effective dispersal (± 3 m) observed for the annual kelp, *Postelsia palmaeformis* (Dayton 1973). In the Alariaceae family, the position of the sporophylls (*i.e.* the structure from which spores are released) located at the basis of the stipe was suggested to decrease their dispersal potential (Neushul 1972). Drifting mature sporophytes or fertile fragments have also been suggested to be potential vectors for the spread of *U. pinnatifida* along New Zealand coasts (with estimated dispersal distance of 10²-10⁴ m per year (Forrest et al. 2000; Sliwa et al. 2006 and references therein). A limited natural dispersal and the fact that the species is annual may both promote genetic drift and genetic differentiation among populations including over small scale (*i.e.* within bays). In addition, local small-scale oceanographic conditions by enhancing stochastic migration could explain the lack of isolation by distance pattern observed at the bay level (Kinlan et al. 2005).

Effects of natural dispersal appeared to be more influential than jump dispersal due to human-mediated transport in shaping the genetic structure of *U. pinnatifida* populations in the

study area. However, these human-mediated effects are still perceptible in some cases. Exchanges of seedlings between farms in the Bay of Lampaul and Aber Wrac'h occurred when these farms were still opened (P. Kervern; personal communication). Interestingly, we did not find significant genetic differences among some populations located in the Bay of Lampaul with others located in the Aber Wrac'h (*e.g.* A.2 & B.1; A.2 & B.4). The populations from these two bays also showed a non-negligible amount of cross-assignment, ten years (10-20 generations). After the end of farming activities in these two bays, the genetic signature of exchanges is still detected in natural populations that were adjacent to crops.

Conclusion

Investigating population connectivity among introduced populations and the role of human-mediated expansion within the introduction range is essential for predicting the long-term establishment and evolution of a species.

Asian brown alga *Undaria pinnatifida* is one of the last species deliberately introduced in Europe. In Brittany (France), spontaneous populations rapidly appeared in the vicinity of farms where it was primarily introduced for cultivation purposes. Thirty years after its introduction (*i.e.* 30-60 generations), we showed that the invasive populations of *U. pinnatifida* were differentiated at bay and regional level and were not genetically impoverished. These two characteristics can be explained by limited effective migration between populations established into the wild, whatever the habitat and substrate. This was an unexpected pattern as *U. pinnatifida* can potentially take advantage of various dispersal pathways, either natural or human-mediated

The long-term establishment and sustainable settlement of *U. pinnatifida* is thus apparently no longer influenced by long-distance spread. In addition, genetic admixture due to human-assisted dispersal (between farms and/or marinas) is unlikely. Such characteristics may have important consequences for the long-term evolution of the populations established in this introduction range (Sax et al. 2007). Local adaptation to local environmental conditions is indeed largely influenced by the amount of gene flow and migration with populations established in different environments (Lenormand 2002). Limited gene flow among bays may drive local adaptation of *U. pinnatifida* to its local environment (*i.e.* bay scale). Temporal surveys of functional traits and genetic characteristics are needed to ascertain the evolution of this invasive kelp in the wild.

Acknowledgements

The authors are grateful to the divers from the Station Biologique of Roscoff for their help in organizing the field work and sampling: Laurent Lévêque, Yann Fontana, Wilfried Thomas, Noël Guidal, Mathieu Camusat and Mathieu Oriot. The authors are also thankful to Thierry Comtet and Thomas Broquet for stimulating discussions and comments about this work. The genotyping was carried out on the Biogenouest platform in the Station Biologique of Roscoff. This work was supported by the ANR project “ECOKEP” and the AXA Research Funds (project MAAC). DG benefitted from a grant for her doctoral research from the Region Bretagne (ARED program, project WAKLIFE).

References

- Billot C., Engel C. R., Rousvoal S., Kloareg B. & Valero M. 2003. Current patterns, habitat discontinuities and population genetic structure: the case of the kelp *Laminaria digitata* in the English Channel. *Marine Ecology-Progress Series*, 253: 111-121.
- Booth D., Provan J. & Maggs C. A. 2007. Molecular approaches to the study of invasive seaweeds. *Botanica Marina*, 50(5-6): 385-396.
- Broquet T. & Petit E. J. 2009. Molecular Estimation of Dispersal for Ecology and Population Genetics. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 40: 193-216.
- Castric-Fey A., Beaupoil C., Bouchain J., Pradier E. & L'Hardy-Halos M. T. 1999. The introduced alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Alariaceae) in the rocky shore ecosystem of the St-Malo area: growth rate and longevity of the sporophyte. *Botanica Marina*, 42: 83-96.
- Clobert J., Danchin E., Dhondt A. A. & Nichols J. D., Eds. 2001. Dispersal. Oxford, Oxford University Press.
- Cornuet J.-M., Piry S., Luikart G., Estoup A. & Solignac M. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153(4): 1989-2000.
- Daguin C., Voisin M., Engel C. & Viard F. 2005. Microsatellites isolation and polymorphism in introduced populations of the cultivated seaweed *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales). *Conservation Genetics*, 6: 647–650.

- Davies N., Villablanca F. X. & Roderick G. K. 1999. Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(1): 17-21.
- Dayton P. K. 1973. Dispersion, dispersal and persistence of the annual intertidal alga, *Postelsia palmaeformis* Ruprecht. *Ecology*, 54(2): 433-438.
- Diaz-Almela E., Boudry P., Launey S., Bonhomme F. & Lapègue S. 2004. Reduced female gene flow in the European Flat Oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Heredity*, 95(6): 510-516.
- Dlugosch K. M. & Parker I. M. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, 17(1): 431-449.
- El-Mousadik A. & Petit R. J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 832-839.
- Estoup A. & Guillemaud T. 2010. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *19*: 4113-4130.
- Excoffier L. & Lischer H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3): 564-567.
- Excoffier L., Smouse P. & Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- Floc'h J.-Y., Pajot R. & Wallentinus I. 1991. The Japanese brown alga *Undaria pinnatifida* on the coast of France and its possible establishment in European Waters *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 47: 379-390.
- Floc'h J. Y., Pajot R. & Mouret V. 1996. *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) 12 years after its introduction into the Atlantic ocean. *Hydrobiologia*, 326/327: 217-222.
- Forrest B. M., Brown S. N., Taylor M. D., Hurd C. L. & Hay C. H. 2000. The role natural dispersal mechanisms in the spread of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae). *Phycologia*, 39(6): 547-553.

- Geller J. B., Darling J. A. & Carlton J. T. 2009. Genetic perspectives on marine biological invasions. *Annual Review in Marine Sciences*, 2: 401-427.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Hay C. H. 1990. The dispersal of sporophytes of *Undaria pinnatifida* by coastal shipping in New Zealand, and implications for further dispersal of *Undaria* in France. *British Phycological Journal*, 25: 301-313.
- Hedgecock D., Barber P. H. & Edmands S. 2007. Genetic approaches to measuring connectivity. *Oceanography*, 20(3): 70-79.
- Hubisz M. J., Falush D., Stephens M. & Pritchard J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322-1332.
- Kinlan B. P. & Gaines S. D. 2003. Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology*, 84(8): 2007-2020.
- Kinlan B. P., Gaines S. D. & Lester S. E. 2005. Propagule dispersal and the scales of marine community process. *Diversity and Distributions*, 11: 139-148.
- Lenormand T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(4): 183-189.
- Lyons D. A. & Scheibling R. E. 2009. Range expansion by invasive marine algae: rates and patterns of spread at a regional scale. *Diversity and Distributions*, 15(5): 762-775.
- Manel S., Gaggiotti O. E. & Waples R. S. 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(3): 136-142.
- Martin J. & Cuevas J. 2006. First record of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Southern Patagonia, Argentina. *Biological Invasions*, 8(6): 1399-1402.
- Molnar J. L., Gamboa R. L., Revenga C. & Spalding M. D. 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6(9): 485-492.
- Nyberg C. D. & Wallentinus I. 2005. Can species traits be used to predict marine macroalgal introductions? *Biological Invasions*, 7: 265-279.
- Neushul M., 1972. Functional interpreting of benthic marine algal morphology. In: *Contributions to the Systematics of Benthic Marine Algae of the Northern Pacific*,

- edited by Abott I. A. & Kurogi M., Japanese Society of Phycologists, Kobe, Japan, pp. 47-74.
- Pascual M., Chapuis M. P., Mestres F., Balanyà J., Huey R. B., Gilchrist G. W., Serra L. & Estoup A. 2007. Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods, Blackwell Publishing Ltd. 16: 3069-3083.
- Pérez R., Kaas R. & Barbaroux O. 1984. Culture expérimentale de l'algue *Undaria pinnatifida* sur les côtes de France. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, 343.
- Pérez R., Yongchui Lee J. & Juge C. 1981. Observations sur la biologie de l'algue japonaise *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar introduite accidentellement dans l'étang de Thau. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, 315: 1-12.
- Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Pritchard J. K. & Wen W. 2003. Documentation for STRUCTURE software: Version 2. Available from <http://www.pritch.bsd.uchicago.edu>.
- Rannala B. & Mountain J. L. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94: 9197-9201.
- Reed D. C. 1992. Dispersal in kelps: factors affecting spore swimming and competency. *Ecology*, 73: 1577-1585.
- Roman J. 2006. Diluting the founder effect: cryptic invasions expand a marine invader's range. *Proceedings of the Royal Society B*, 273(1600): 2453-2459.
- Roman J. & Darling J. A. 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(9): 454-464.
- Ronce O. 2007. How does it feel to be like a rolling stone? ten questions about dispersal evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 38: 231-53.
- 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(1): 103-106.
- Saito Y. 1975. *Undaria*, Dr. W.Junk, The Hague.
- Sax D. F., Stachowicz J. J. et al. 2007. Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(9): 465-471.

- Silva P. C., Woodfield R. A., Cohen A. N., Harris L. H. & Goddard J. H. R. 2002. First report of the Asian kelp *Undaria pinnatifida* in the northeastern Pacific Ocean. *Biological Invasions*, 4: 333-338.
- Simberloff D. 2009. The role of propagule pressure in biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1).
- Simon-Bouhet B., Garcia-Meunier P. & Viard F. 2006. Multiple introductions promote range expansion of the mollusc *Cyclope neritea* (Nassariidae) in France: evidence from mitochondrial sequence data. *Molecular Ecology*, 15: 1699-1711.
- Sliwa C., Johnson C. R. & Hewitt C. L. 2006. Mesoscale dispersal of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* attached to unstable substrata. *Botanica Marina*, 49: 396-405.
- Storey J. 2002. A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 64: 479-498.
- Suto S. 1950. Studies on shedding, swimming, and fixing of the spores of seaweeds. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 16: 1-9.
- Uwai S. Y., Nelson W., Neill K., Wang W. D., Aguilar-Rosas L. E., Boo S. M., Kitayama T. & Kawa H. 2006. Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) deduced from mitochondria genes origins and succession of introduced populations. *Phycologia*, 45(6): 687-695.
- Viard F., Ellien C. & Dupont L. 2006. Dispersal ability and invasion success of *Crepidula fornicata* in a single gulf: insights from genetic markers and larval-dispersal models. *Helgoland Marine Research*, 60(2): 144-152.
- Voisin M., Engel C. & Viard F. 2005. Differential shuffling of native genetic diversity across introduced region in a brown alga: aquaculture vs. maritime traffic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15): 5432-5437.
- Weir B. S. & Cockerham C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Williams S. L. & Smith J. E. 2007. A global review of the distribution, taxonomy, and impacts of introduced seaweeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 38(1): 327-359.
- Wilson J. R. U., Dormontt E. E., Prentis P. J., Lowe A. J. & Richardson D. M. 2009. Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(3): 136-144.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1: Pairwise F_{st} -estimates values among the 19 populations of *Undaria pinnatifida* sampled in three bays of Northern Brittany.

Table S2: Population connectivity in *Undaria pinnatifida* assessed by two methods (Fst-based and assignment-based).

Figure S1: Isolation by distance model over the whole dataset (19 populations) and for each study bay.

Table S1: Pairwise F_{st} -estimates values between the 19 populations of *Undaria pinnatifida* sampled in three bays of Northern Brittany.

All values are significant at the 5% level, except those in bold. After Bonferroni correction (adjusted nominal level was 0.0003), ten values were not significant and are underlined. Grey cells highlight within-bay comparisons.

		Aber Wrac'h						Bay of Lampaul						Bay of St-Malo					
		A.1	A.2	A.3	A.4	A.5	A.6	B.1	B.2	B.3	B.4	B.5	B.6	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6
Aber Wrac'h	A.2	0.089	-																
	A.3	0.258	0.123	-															
	A.4	0.137	<u>0.038</u>	0.127	-														
	A.5	0.202	0.131	0.128	0.150	-													
	A.6	0.123	0.047	0.183	0.063	0.123	-												
		B.1	0.103	<u>0.032</u>	0.146	<u>0.022</u>	0.125	0.064	-										
Bay of Lampaul	B.2	0.204	0.108	0.152	0.068	0.198	0.157	0.072	-										
	B.3	0.299	0.197	0.331	0.156	0.299	0.297	0.219	0.257	-									
	B.4	0.179	<u>0.039</u>	0.195	0.058	0.177	0.108	0.060	0.121	0.182	-								
	B.5	0.087	0.021	0.120	<u>0.029</u>	0.091	0.070	0.013	0.066	0.148	0.074	-							
	B.6	0.123	0.065	0.166	0.093	0.048	0.101	0.044	0.138	0.212	0.065	0.044	-						
		C.1	0.218	0.113	0.093	0.118	0.103	0.161	0.119	0.100	0.235	0.112	0.087	0.087	-				
Bay of St-Malo	C.2	0.208	0.120	0.110	0.124	0.111	0.178	0.116	0.066	0.239	0.125	0.082	0.086	0.010	-				
	C.3	0.235	0.167	0.100	0.133	0.088	0.201	0.129	0.118	0.258	0.169	0.111	0.096	0.043	0.037	-			
	C.4	0.228	0.118	0.135	0.148	0.112	0.182	0.123	0.113	0.258	0.094	0.101	0.067	0.009	<u>0.009</u>	0.061	-		
	C.5	0.202	0.130	0.142	0.149	0.070	0.144	0.101	0.106	0.309	0.147	0.087	0.060	0.035	0.025	0.051	0.030	-	
	C.6	0.253	0.136	0.153	0.154	0.133	0.189	0.150	0.123	0.256	0.101	0.125	0.096	<u>0.013</u>	<u>0.019</u>	0.069	0.002	0.067	0.067
	C.7	0.286	0.189	0.164	0.233	0.098	0.224	0.230	0.243	0.321	0.195	0.170	0.135	0.058	0.098	0.119	0.067	0.106	0.067

Table S2: Population connectivity in *Undaria pinnatifida*.

For each population i , the genetically closest population j ($j \neq i$) is indicated based on two methods: (1) mean individual assignment likelihood of individuals collected in population i and assigned into population j ($L_{i,j}$; left column) and (2) pairwise estimate of F_{st} (right column). The likelihood values are expressed in $-\log$ scale. Non significant pairwise differentiation values are underlined (after Bonferroni correction). The highest likelihood value and the minimum F_{st} value are indicated in bold (in grey cell) for each sample. All samples are used as putative populations except A.6 (located in a new marina in the Aber Wrac'h).

		Sample names																							
		Aber Wrac'h										Bay of Lampaul													
		A.1	A.2	A.3	A.4	A.5	A.6	B.1	B.2	B.3	B.4	B.5	B.6	B.1	B.2	B.3	B.4	B.5	B.6						
Potential source population	A.1	-	-	4.395	0.089	5.812	0.258	5.584	0.137	4.459	0.202	3.624	0.123	4.866	0.103	6.305	0.204	5.891	0.299	5.363	0.179	5.056	0.087	4.877	0.123
	A.2	3.958	0.089	-	-	3.527	0.123	3.743	<u>0.038</u>	3.744	0.131	2.786	0.047	3.695	<u>0.032</u>	5.091	0.108	3.583	0.197	3.681	0.039	4.159	0.021	4.388	0.065
	A.3	5.828	0.258	4.275	0.123	-	-	4.318	<u>0.127</u>	3.562	0.128	3.627	0.183	4.614	0.146	5.473	0.152	4.730	0.331	4.979	0.195	4.978	0.120	5.191	0.166
	A.4	4.145	0.137	3.662	<u>0.038</u>	3.394	0.127	-	-	3.848	0.150	3.000	0.063	3.501	<u>0.022</u>	4.045	0.068	3.255	0.156	3.813	0.058	4.000	<u>0.029</u>	4.515	0.093
	A.5	5.041	0.202	4.396	0.131	3.374	0.128	4.488	0.150	2.545	-	3.247	0.123	4.448	0.125	5.200	0.198	4.191	0.299	4.926	0.177	4.505	0.091	4.349	0.048
	B.1	4.396	0.103	3.638	<u>0.032</u>	3.627	0.146	3.527	0.022	3.611	0.125	2.959	0.064	3.107	-	4.104	0.072	3.873	0.219	3.815	0.060	3.724	0.013	4.260	0.044
	B.2	5.252	0.204	4.425	0.108	3.971	0.152	3.860	0.068	4.558	0.198	3.954	0.157	3.918	0.072	-	-	4.091	0.257	4.580	0.121	4.329	0.066	5.232	0.138
	B.3	6.019	0.299	4.793	0.197	4.887	0.331	4.495	0.156	5.025	0.299	4.647	0.297	5.181	0.219	6.081	0.257	-	-	5.261	0.182	4.986	0.148	5.998	0.212
	B.4	4.891	0.179	3.502	<u>0.039</u>	3.966	0.195	3.759	0.058	3.835	0.177	3.129	0.108	3.712	0.60	4.444	0.121	3.539	0.182	-	-	4.256	0.074	4.189	0.065
	B.5	4.366	0.087	3.546	0.021	3.509	0.120	3.605	<u>0.029</u>	3.451	0.091	3.070	0.070	3.388	0.013	4.059	0.066	3.334	0.148	3.949	0.074	3.458	-	4.168	0.044
	B.6	3.938	0.123	3.770	0.065	3.945	0.166	4.179	0.093	3.183	0.048	3.272	0.101	3.845	0.044	4.763	0.138	3.998	0.212	3.878	0.065	4.158	0.044	-	-
	C.1	6.179	0.218	5.020	0.113	3.745	0.093	4.841	0.118	4.113	0.103	4.293	0.161	4.906	0.119	5.074	0.100	4.996	0.235	4.951	0.112	4.920	0.087	5.045	0.087
	C.2	5.115	0.208	4.961	0.120	3.850	0.110	4.723	0.124	3.973	0.111	4.292	0.178	4.879	0.116	4.537	0.066	4.795	0.239	5.019	0.125	4.960	0.082	4.792	0.086
	C.3	6.224	0.235	5.788	0.167	3.641	0.100	5.130	0.133	4.027	0.088	4.712	0.210	5.364	0.129	6.200	0.118	5.502	0.258	5.731	0.169	5.737	0.111	5.397	0.096
C.4	5.630	0.228	4.867	0.118	4.047	0.135	4.924	0.148	3.987	0.112	4.268	0.182	4.713	0.123	4.974	0.113	5.007	0.258	4.600	0.094	4.813	0.101	4.589	0.067	
C.5	5.735	0.202	5.024	0.130	4.140	0.142	5.053	0.149	3.743	0.070	3.976	0.144	4.560	0.101	5.215	0.106	5.528	0.309	5.193	0.147	4.799	0.087	4.639	0.060	
C.6	5.826	0.253	5.015	0.136	4.032	0.153	4.949	0.154	4.093	0.133	4.304	0.189	5.020	0.150	5.160	0.123	4.988	0.256	4.678	0.101	5.171	0.125	4.868	0.096	
C.7	7.014	0.286	6.326	0.189	4.216	0.164	6.299	0.233	3.890	0.098	5.061	0.224	6.669	0.230	7.024	0.243	6.283	0.321	6.259	0.195	6.361	0.170	5.876	0.135	
Most likely source population	B.6	B.5	B.4	B.5	A.5	C.1	B.1	B.6	A.2	B.5	A.4	B.5	B.5	B.5	A.2	B.1	B.5								

		Sample names													
		Bay of St-Malo													
		C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7							
Potential source population	A.1	9.161	0.218	8.035	0.208	8.006	0.235	8.228	0.228	6.849	0.202	8.470	0.253	7.013	0.286
	A.2	7.885	0.113	7.062	0.120	6.474	0.167	7.211	0.118	6.166	0.130	7.249	0.136	6.514	0.189
	A.3	6.595	0.093	6.162	0.110	5.254	0.100	6.517	0.135	5.594	0.142	6.512	0.153	5.543	0.164
	A.4	7.186	0.118	6.116	0.124	5.681	0.133	6.788	0.148	6.025	0.149	7.029	0.154	6.553	0.233
	A.5	7.435	0.103	6.633	0.111	5.923	0.088	6.917	0.112	5.743	0.070	7.015	0.133	5.248	0.098
	B.1	7.524	0.119	6.791	0.116	6.169	0.129	6.893	0.123	5.801	0.101	7.264	0.150	6.440	0.230
	B.2	7.902	0.100	6.605	0.066	6.587	0.118	7.407	0.113	6.475	0.106	7.576	0.123	7.495	0.243
	B.3	8.972	0.235	8.128	0.239	7.384	0.258	8.774	0.258	7.937	0.309	8.604	0.256	7.962	0.321
	B.4	7.491	0.112	6.748	0.125	6.667	0.169	6.636	0.094	6.190	0.147	6.719	0.101	6.199	0.195
	B.5	6.806	0.087	6.111	0.082	5.671	0.111	6.310	0.101	5.470	0.087	6.814	0.125	5.618	0.170
	B.6	6.653	0.087	5.768	0.086	5.375	0.096	5.890	0.067	5.165	0.060	6.141	0.096	5.300	0.135
	C.1	-	-	5.041	0.010	4.896	0.043	4.855	0.009	4.892	0.035	5.139	0.013	4.641	0.058
	C.2	5.695	0.010	-	-	4.810	0.037	5.076	0.009	4.764	0.025	4.959	0.019	5.170	0.098
	C.3	5.781	0.043	5.694	0.037	-	-	5.675	0.061	5.158	0.051	5.720	0.069	5.076	0.119
	C.4	5.038	0.009	4.761	0.009	4.810	0.061	-	-	4.750	0.030	4.899	0.002	4.575	0.067
	C.5	5.529	0.035	5.310	0.025	4.952	0.051	5.432	0.030	-	-	5.444	0.046	5.127	0.106
C.6	5.264	0.013	4.779	0.019	4.849	0.069	4.840	0.002	4.667	0.046	-	-	4.629	0.067	
C.7	6.375	0.058	6.379	0.098	5.292	0.119	6.148	0.067	6.041	0.106	5.985	0.067	-	-	
Most likely source population		C.6	C.4	C.2/C.4	C.2	C.6	C.6	C.2	C.1	C.4	C.6				

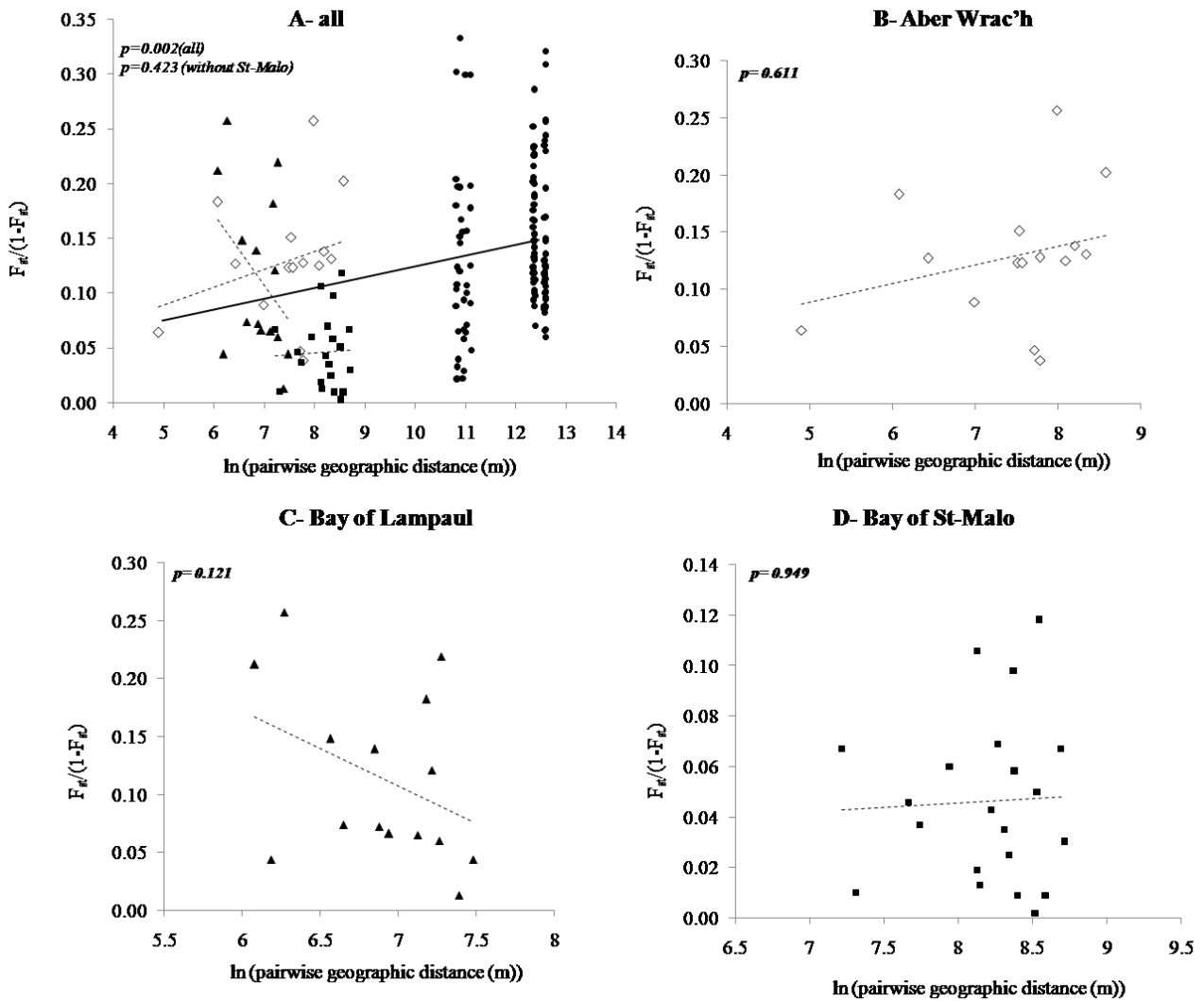


Figure S1: Isolation by distance model over the whole dataset (19 populations) and for each study bay.

Linear regression and p-values for Mantel tests analyzing the correlation between genetic and geographic distance are shown. In figure A, the white diamond, black triangles and black squares stand for within the bay comparisons, *i.e.* between populations located within the Aber Wrac'h, Bay of Lampaul and Bay of St-Malo respectively. Black dots indicate comparisons between populations located in different bays. The dashed lines are regression lines for each bay separately which are pictured in parts B, C and D.

Chapitre II :
Connectivité & Migration entre
populations à l'échelle d'une baie

Chapitre II : Connectivité & Migration entre populations à l'échelle d'une baie

Note : les détails de cette étude sont présentés dans le paragraphe II.2 sous forme d'un article scientifique soumis au « Cahier de Biologie Marine ». Un synopsis en français précisant le contexte et les principaux résultats de cette étude est présenté dans le paragraphe II.1.

II.1. Synopsis de l'article présenté en I.2

En 1983, *Undaria pinnatifida* fut introduite de manière volontaire pour la culture en Bretagne (Pérez et al. 1984 ; Floch et al. 1996). L'estuaire de la Rance (près de St Suliac), fut un des premiers sites pilotes de la mise en culture de cette algue. Par la suite, *U. pinnatifida* s'est propagée et installée dans différents habitats (enrochements, ports, corps morts, etc) au sein de l'estuaire de la Rance mais également dans toute la Baie de St-Malo. A l'heure actuelle, la concession existe toujours et est gérée par la société C-Weed Aquaculture (<http://www.c-weed-aquaculture.com/>).

Dans les années 1980-1990, des relevés ont été réalisés par l'Association de Découverte des Milieux Sous-marins (ADMS, travaux menés sous la direction d'Annie Castric ; Girard-Descatoire et al. 1997) dans la Baie de St-Malo et l'Estuaire de la Rance. Ces observations en plongée et dans la zone intertidale ont permis de signaler et de suivre l'apparition d'*U. pinnatifida* (en 1986), puis l'expansion vers le large à partir de 1992. La figure II.1 représente la distribution des algues le long d'un tombant rocheux et la place qu'occupe *U. pinnatifida* au sein d'un des sites colonisés (site de Bizeux), qui a été bien étudié lors de ces inventaires et ces suivis.

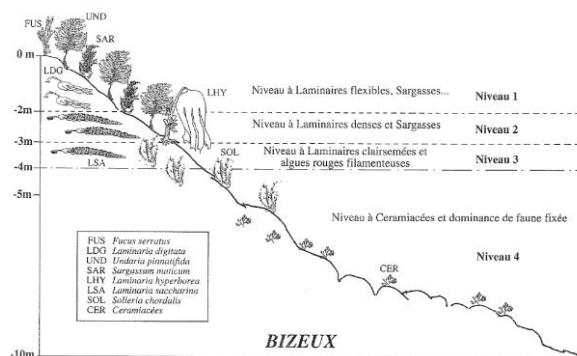


Figure II.1 : Etagement des algues sur les roches sublittorales en mode très abrité au site de Bizeux
Figure issue de Girard-Descatoire et al. (1997)

Dans ce contexte d'une baie fortement colonisée depuis l'arrivée de cette algue en Bretagne, mon objectif était d'étudier la présence de cette espèce à l'échelle de l'ensemble de la baie, environ 25 ans après son apparition dans cette zone géographique ainsi que d'analyser si la diversité des habitats colonisés pouvait être mis en relation avec les schémas de diversité et structure génétique observés dans les populations d'*U. pinnatifida*. Les questions auxquelles je cherchais à répondre étaient : (1) les cultures sont-elles toujours responsable de l'émergence et du maintien des populations naturelles établies dans la baie? (2) d'autres vecteurs ont-ils pu contribuer à l'expansion de cette espèce dans la Baie de St-Malo ou dans l'estuaire de la Rance ? (3) quel est le degré d'interactions entre les populations en fonction du type d'habitat qu'elles occupent (cultures, ports, habitats naturels) et de leur répartition spatiale ?

Pour cela, nous avons mis en place un protocole de prospection en plongée basée sur le choix de sites *a priori* favorables et régulièrement espacés sur une grille avec une maille de 1-2 miles nautiques à l'échelle de la baie et de l'estuaire de la Rance. En parallèle de la vaste campagne de prospection, réalisée en plongée au Printemps 2009, et pour les sites occupés par *U. pinnatifida*, nous avons réalisé un échantillonnage. Les individus ont ensuite été génotypés à l'aide de 9 locus microsatellites.

Les résultats obtenus au cours de ce travail sont les suivants :

1. Trente-sept sites ont été prospectés dont 31 se sont avérés colonisés par *U. pinnatifida*. Néanmoins dans deux de ces sites, seuls quelques rares individus ont été observés. L'abondance en algues dans les autres sites nous a permis d'échantillonner un total de 1183 individus,
2. Les analyses génétiques réalisées sur les 2 lots cultivés (C-Weed Aquaculture et BiOcean Roscoff), les 2 populations portuaires et les 26 populations établies en milieu naturel (total de 955 individus) nous ont permis de mettre en évidence un niveau de diversité génétique du même ordre de grandeur pour chacune des populations ($H_e = 0.35$ à 0.44), excepté pour 7 d'entre elles (notamment les 2 lots cultivés) ainsi qu'une structure génétique globale significative (0.10 ; $P < 10^{-6}$). Il n'y a pas de correspondance nette entre la distance génétique et la distance géographique séparant les paires de populations, ni d'effets de regroupements génétiques selon le type de populations (cultivées, portuaires, estuariennes, etc.). Les populations de l'Ouest de la baie sont

cependant légèrement différenciées des autres populations. De même, une différence génétique significative est observée entre les populations de la côte et du large de la Baie de St-Malo,

3. un regroupement attendu des deux lots cultivés et une forte individualisation de la population occupant le « Bassin Vauban » (*i.e.* port) ont été notés,
4. une grande variabilité dans le pourcentage d'auto-assignation (*i.e.* autorecrutement) des individus des populations naturelles, allant de 3 à 81%, est observée. Les individus non assignés à leur population d'échantillonnage ne sont pas assignés préférentiellement à des populations voisines.

Les résultats de cette étude soulignent une remarquable stabilité de présence d'*U. pinnatifida* à l'échelle de la baie ainsi qu'à un niveau local (*i.e.* site), certaines populations ont en effet été déjà répertoriées par l'Association de Découverte des Milieux Sous-marins (ADMS, travaux menés sous la direction d'Annie Castric) dans les années 1980-1990. Cette occupation locale et globale n'est pas sous la dépendance d'un apport cultivé : les lots cultivés sont en effet très différents de chacune des populations naturelles étudiées. En revanche, il existe des convergences entre un des ports (« Bas Sablons ») et certaines des populations naturelles ; la zone portuaire où les densités sont extrêmement élevées (c'est l'algue certainement la plus dominante de ce port) pourrait agir comme une source de migrants pour certaines populations environnantes ou avoir une origine commune avec les populations naturelles. Dans la majorité des cas, les populations des habitats naturels semble néanmoins fonctionner comme des entités autonomes et stables, caractérisées par une reproduction panmictique. Globalement, la structure génétique dans la Baie de St-Malo apparaît comme une mosaïque suggérant une indépendance de cette structure génétique vis-à-vis des distances spatiales et des types d'habitats. Ceci suggère que l'expansion d'*U. pinnatifida* dans la Baie de St-Malo est le résultat d'une dispersion saltatoire et stochastique, résultant de la combinaison de multiples vecteurs d'origine anthropique, tels que les activités nautiques, et naturels tels que des thalles matures dérivants, suivie d'une installation pérenne grâce à un autorecrutement local important.

II.2. “Mosaic genetic structure and sustainable establishment of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* at a bay scale (Bay of St-Malo, Brittany)”

Auteurs: Daphné Grulois, Laurent Lévêque et Frédérique Viard

“Mosaic genetic structure and sustainable establishment of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* at a bay scale (Bay of St-Malo, Brittany)”

Daphné Grulois⁽¹⁾, Laurent Lévêque⁽²⁾ & Frédérique Viard⁽¹⁾

¹UPMC Univ Paris 06, UMR 7144 CNRS UPMC, Div&Co team, Lab. Adaptation & Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, Roscoff 29680, France;

²UPMC Univ. Paris 06, CNRS FR 2424, Service Mer & Observation, Station Biologique de Roscoff, 29680, France

Correspondence: viard@sb-roscoff.fr and grulois@sb-roscoff.fr

Fax: 02 98 29 23 24

Short title: *Undaria* settlement in the Bay of St-Malo

Abstract

Macroalgae represent a significant component of biological introductions in coastal areas and participate to a global biotic homogenization, as exemplified by the Asian kelp *Undaria pinnatifida* introduced worldwide. In the English Channel, the Bay of St-Malo is an interesting area for examining long-term establishment of *U. pinnatifida*. This kelp was deliberately introduced for cultivation purposes in 1983 and individuals rapidly escaped from farms to establish wild populations. We carried out diving surveys and microsatellite analyses to examine the present-day distribution and genetic structure of *U. pinnatifida* at the bay scale. Populations were found over the whole area and range of habitats (78 km²; 84% of 37 sites examined). When compared to historical records, populations appear to be sustainably established even at a local scale. Genetic diversity of 30 samples (955 individuals including crop samples) was then investigated with 9 microsatellites to examine population connectivity. Wild populations were genetically different from individuals farmed locally. A mosaic genetic structure was observed which was not explained by distance between populations or habitats. Altogether, the long-term establishment of *U. pinnatifida* in this bay, 35 years after its primary introduction, is likely due to multiple interacting factors, among which human activities played a critical role.

Keywords: biological invasions, diving survey, genetic diversity, *Undaria pinnatifida*, anthropogenic pressure

Résumé

Parmi les espèces introduites, les macro-algues sont un groupe important qui participe à une homogénéisation biotique globale en zone côtière. L'algue asiatique *Undaria pinnatifida*, introduite à une échelle mondiale, en est un exemple caractéristique. La Baie de St-Malo est une zone particulièrement intéressante pour étudier l'établissement de cette algue. Elle y a été introduite en 1983 pour y être cultivée et, rapidement, des populations se sont établies en milieu naturel. Une étude sur le terrain en 2009 nous a permis de noter la présence de cette algue dans différents habitats sur l'ensemble de l'aire d'étude (78 km²; 84% des 37 sites prospectés). Par comparaison avec des observations antérieures, l'espèce semble installée durablement même à une échelle locale. Par ailleurs, une étude génétique a été menée sur 30 échantillons dont deux lots cultivés (955 individus) avec 9 microsatellites. Les populations de la baie se différencient génétiquement des lots cultivés. Par ailleurs, une structure génétique en mosaïque, indépendante de la localisation géographique ou de l'habitat, a été mise en évidence à l'échelle de la baie. Cette étude suggère que de multiples facteurs, en premier lieu les transports d'origine anthropique, ont interagi pour façonner les schémas actuels d'installation d'*U. pinnatifida* au cours des 35 ans écoulés depuis son introduction initiale.

Mots clés : invasions biologiques, prospection en plongée, diversité génétique, *Undaria pinnatifida*, pressions anthropiques

Introduction

Biological introductions are one of the main components of global change affecting the long-term stability and natural evolution of ecosystems (see Molnar et al. 2008 for a review in marine ecosystems). Seaweeds represent a significant part of these introductions in marine systems (277 introduced species, Williams & Smith 2007). The number of records for introduced seaweeds varies among regions which are partly explained by lack of species inventories and the loss of expertise in algae taxonomy (Williams & Smith 2007; Lyons & Scheibling 2009). In the North-East Atlantic, 79 seaweed introductions have been recorded. Among them is an emblematic marine invader, the Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar.

Together with the well-known invasive alga, *Caulerpa taxifolia*, *U. pinnatifida* is the only seaweed to be listed in the “100 of the World's Worst Invasive Alien Species” list of the GISP (Global Invasive Species Program). Such a ranking is partly explained by the extent and rapidity of its worldwide introduction: this kelp established populations over a wide range of habitats, coastal areas and biogeographic provinces taking advantage of various introduction vectors, from shipping to farming (Voisin et al. 2005; Voisin 2007). *U. pinnatifida* has also been recorded in the top 5 of the most hazardous seaweeds by Nyberg & Wallentinus (2005).

The first record of *U. pinnatifida* outside its native range was in 1971, in Europe, and more specifically in the Thau lagoon (Mediterranean Sea) where it has been introduced accidentally, possibly with deliberate introduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Following this accidental introduction, the kelp which is edible seaweed was then deliberately introduced in Brittany (France), in the 1980s, for cultivation purposes. Soon after the farms were settled, individuals escaped into the wild and established populations in neighboring habitats (Castric-Fey et al. 1993, Floc'h et al. 1996). In Brittany, the Bay of St-Malo has been particularly well studied in the 1990s demonstrating the establishment of wild populations in different part of the bay ca. 10 years after its primary introduction (reviewed in Girard-Descatoire et al. 1997). Besides the existence of such historical records, several features make this area particularly interesting to monitor and to study dispersal and long-term establishment of *U. pinnatifida*: (1) this is one of the first place where *U. pinnatifida* farming was established in France (since 1983; Perez et al. 1984; Castric-Fey et al. 1993; Floc'h et al. 1996), (2) this is a large megatidal bay with a mean tidal range of 12m, the highest in Europe, which generates important currents that may facilitate natural spread of *Undaria pinnatifida*,

(3) a variety of suitable habitats co-exist at the bay level (natural or artificial habitats like marinas; marine to brackish waters).

We first aimed at documenting the present-day distribution of the invasive kelp *U. pinnatifida* in the Bay of St-Malo, using *in situ* surveys. Then we investigated population connectivity and dispersal at a bay scale using genetic markers. We especially investigated whether farms still contribute to the populations established in the wild, and whether the genetic structure was influenced by the distance between populations, given that *U. pinnatifida* have limited natural dispersal ability with spores and gametes living only a few hours (Forrest et al. 2000). Genetic studies are particularly helpful to understand the pattern of dispersal of invading species, in particular in the marine environment where direct approaches are difficult to implement (Geller et al. 2009). In introduced populations of *U. pinnatifida*, genetic studies were used to document introduction history (see for example, Voisin et al. (2005) for the worldwide introductions and Uwai et al. (2006) for the Pacific introductions). However, population genetics is also useful to depict the dispersal processes occurring at micro- and meso-scales which are particularly relevant in seaweeds that naturally disperse over short distances (Kinlan & Gaines 2003). This study is the first to provide a picture of the joint distribution of populations and genetic diversity in *U. pinnatifida* at a bay scale, in its European introduction range.

Table 1- Sampling and genetic diversity characteristics of *Undaria pinnatifida* for 38 localities surveyed in 2009 in Bay of St-Malo

For each site, its name (with previous records indicated, see (1)) is given with its geographic location and the type of habitat (M, C and W stand for marinas, crops and wild populations respectively). The presence and number of individuals genotyped (N_{genot}) is provided together with genetic diversity indices: the number of alleles (N_{all}), the gene diversity (H_e) and the heterozygote deficiency (\hat{f}) with its associated probability (exact tests of deviation from Hardy-Weinberg proportions).

ID	Sample location ⁽¹⁾	Latitude N	Longitude W	Habitat	N_{genot} ⁽²⁾	N_{all}	H_e	\hat{f}	P
1	Les Perronnias	48.62814	2.15783	W	32	2.44	0.419	0.265	0.003
2	Ile Agot	48.64175	2.15783	W	32	2.78	0.419	0.056	0.167
3	Plage Longchamp	48.63903	2.13177	W	32	2.11	0.204	0.148	0.050
4	Pointe de la Garde Guérin	48.64099	2.13357	W	A	-	-	-	-
5	Platier des Lardières	48.64725	2.13351	W	R	-	-	-	-
6	Balise Nerput (nearby site: 1989, A)	48.65187	2.13540	W	R	-	-	-	-
7	Moulin St Lunaire (nearby site: 1994, P)	48.65075	2.11309	W	32	2.56	0.253	0.232	10 ⁻⁶
8	Balise Buarats Ouest n°2	48.67046	2.12470	W	32	2.33	0.276	0.095	0.315
9	Balise Buarats	48.67072	2.12004	W	A	-	-	-	-
10	Pointe Bellefard	48.63498	2.09555	W	32	2.67	0.387	0.069	0.253
11	Les Cheminées	48.66089	2.10038	W	32	2.67	0.381	-0.028	0.763
12	Pierre des Portes (1993-1994, P)	48.67244	2.10003	W	32	2.89	0.430	0.088	0.432
13	Le Rochardien (1992-1994, P)	48.64472	2.07301	W	30	2.78	0.425	0.105	0.258
14	La Pierre Salée (nearby site: 1994, P)	48.64620	2.06675	W	32	2.78	0.396	0.011	0.463
15	Le Grand Murier (1993-1994, P)	48.67498	2.07695	W	32	2.78	0.396	0.027	0.687
16	Tonne (site nearby : 1990 P)	48.63609	2.04082	W	32	2.89	0.360	0.178	0.029
17	Bizeux (nearby site: 1993-1994, P)	48.62830	2.02791	W	32	2.78	0.355	0.160	0.091
18	Bas Sablons (1992-1994, P)	48.57413	1.98270	M	29	3.00	0.414	0.094	0.522
19	Bassin Vauban	48.64862	2.02267	M	32	2.44	0.306	0.479	10 ⁻⁶
20	Fort National (1991-1993, P)	48.65281	2.02450	W	32	2.89	0.374	0.179	0.001
21	Les Pierres Aux Normands	48.67101	2.04186	W	32	2.67	0.372	0.008	0.484

22	La Grande Conchée (1994, P)	48.68371	2.04375	W	32	2.78	0.372	0.030	0.505
23	Rocher Des Thermes (nearby site: 1994, P)	48.66314	2.00537	W	32	2.89	0.410	0.117	0.021
24	Rocher de l'Aiguille (nearby site: 1994, P)	48.66498	2.00628	W	NS	-	-	-	-
25	Le Grand Dauvier	48.67585	1.99503	W	32	2.89	0.418	0.005	0.409
26	Les Petits Pointus (1990 A)	48.68892	2.01320	W	32	2.56	0.362	0.027	0.869
27	Bouée Saint Servantine	48.69864	2.01485	W	32	2.67	0.414	0.171	0.077
28	Saint Servantine	48.69883	2.01798	W	A	-	-	-	-
29	Les Grands Pointus	48.69846	1.99550	W	32	2.78	0.326	0.027	0.994
30	Plage du Val (nearby site : 1986-1994, P)	48.68463	1.97585	W	32	2.78	0.396	0.017	0.932
31	Balise Rochefort	48.71452	1.97127	W	A	-	-	-	-
32	Pointe de Cancavale (1990 P)	48.60387	2.01879	W	32	2.78	0.423	0.131	0.663
33	Ile Aux Moines	48.58726	1.99499	W	32	2.56	0.417	0.123	0.181
34	Cweed (established in 1983)	48.57952	1.98621	C	32	1.67	0.240	-0.158	10 ⁻⁶
35	Pointe Garot	48.55609	1.97794	W	32	3.00	0.434	0.145	0.085
36	Pont St Jean	48.53563	1.97007	W	32	3.00	0.412	0.031	0.781
37	Port de Plouer	48.52469	1.98450	M	A	-	-	-	-
38	Port de Lyvet	48.48944	2.00203	M	A	-	-	-	-
39 ⁽³⁾	BioCéan-Roscoff	-	-	C	32	1.67	0.234	-0.069	0.921

(1) Previous records in the same site or in a nearby site as indicated in Girard-Descatoire et al. (1997) are mentioned in parenthesis (year(s) of the record and presence (P) vs. absence (A) of *U. pinnatifida*).

(2) When no (A) or only few (R) individuals were observed, the population was not sampled. In site 24, *U. pinnatifida* was abundant but not sampled (NS)

(3) In 2009, seedlings used in the Biocéan farm came from St-Malo (See Material & Methods)

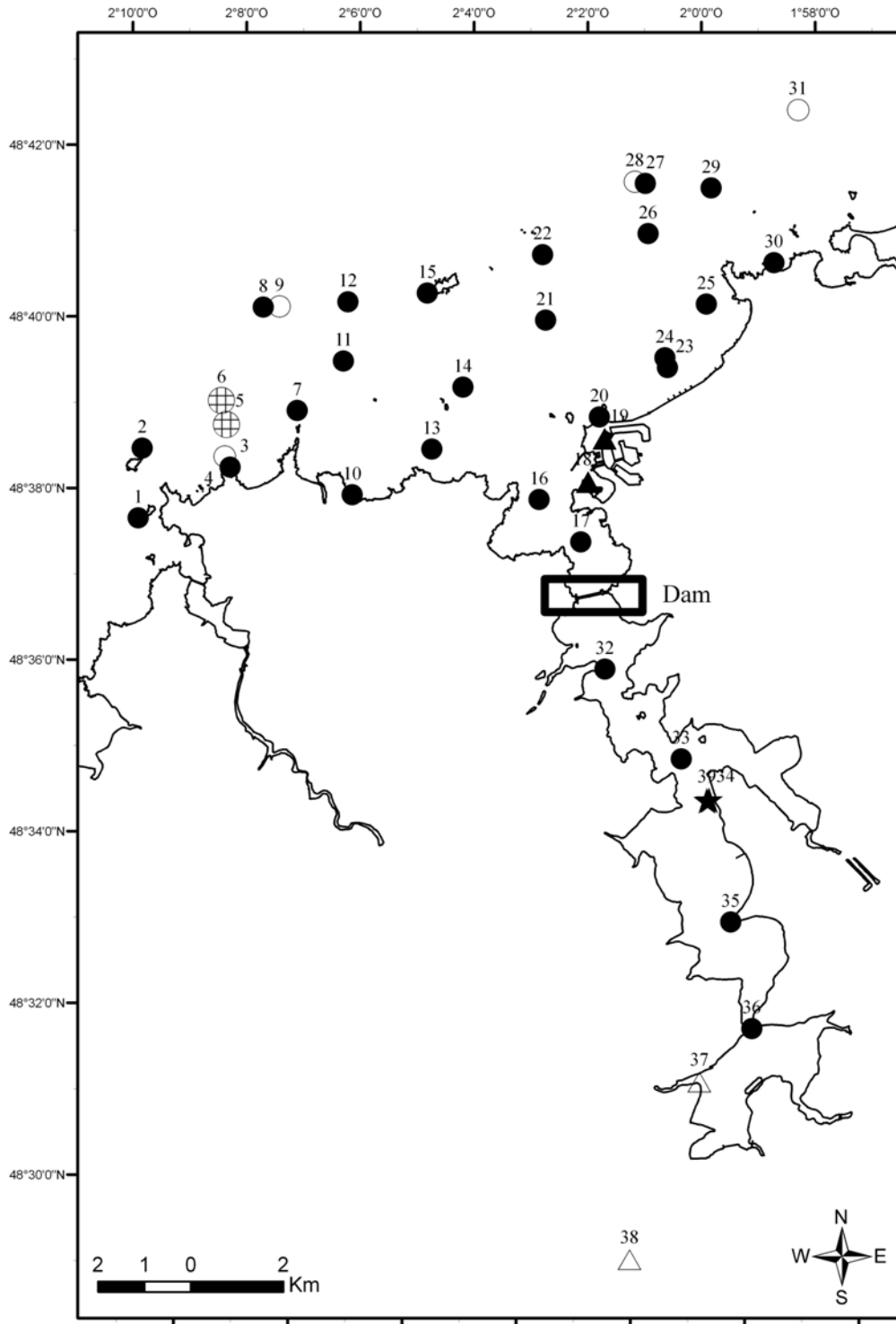


Figure 1: Location of 38 sites surveyed in the Bay of St-Malo and the Rance estuary (Spring 2009).

Triangles stand for marinas, stars for crops and circles for populations in natural environments. The presence of *U. pinnatifida* is recorded as follows: black when the species was abundant, hatched when rare and empty when absent.

Materials & Methods

Survey and population sampling

To examine the present-day distribution of *U. pinnatifida* in the Bay of St-Malo, we selected 37 sites (Figure 1) representative of various natural and anthropogenic habitats. These sites were chosen based on a grid approach, using a mesh size of ca. 1-2 squared nautical miles. They are all in natural environments (mostly shallow subtidal or intertidal rocky habitats) with depth from +1.5 to -10 m, except the sites N°18 and 19 which are the two marinas of the St-Malo city. Note that the site N°20 is an ancient abandoned fish pool. They are all likely to be suitable for the establishment of populations of this kelp (Castric-Fey et al. 1993; Girard-Descatoire et al. 1997).

The dam built in 1963-1966 in the Rance estuary modified the environment in the upstream portion, in particular the tides (Bonnot-Courtois et al. 2002). This could influence the connectivity between populations located in the upstream and downstream sectors of the dam. We thus examined and sampled populations in both areas. Within the upstream part (ca. 13 km²; sites N°32, 33 and N°35-38 in Figure 1), the sites are in areas characterized by different salinity levels (ca. 30-34⁰/₀₀ for sites 32-36, 20-30⁰/₀₀ for site 37 and below 20⁰/₀₀ for site 38; Bonnot-Courtois et al. 2002). The 31 sites downstream of the dam were selected over a large area covering ca. 65 km². All the sites were visited in May 2009 except sites 18-20 and 23 in mid-march 2009. Except for these 4 sites, the two marinas and the crop, all observations and sampling were done by scuba diving, each site being visited by 2 divers during ca. 10 minutes. For each site, the geographical coordinates was recorded and entered into an ArcGIS layer (ESRI, v.9).

For sites with an established population, a small piece of tissue (5 cm²) was collected over a minimum number of 30 individuals. Tissue was dried in silica gel for DNA analysis. In addition, we included a crop sample (site N°34 in Table 1 and Figure 1) coming from the farm (C-Weed company) where *Undaria* is cultivated in the Bay of St-Malo. For this sample, the sporophytes were sampled on ropes by the farmer. We also included 32 individuals from the "BiOcéan" farm located in the Bay of Morlaix (North Brittany). The seedlings used in this farm in 2009 came from the farm located in the Rance estuary (P. Podeur, pers. com.). This second crop sample however came from a different batch than the one sampled in St-Malo, thus being a replicate of the cultures in the St-Malo area.

DNA extraction and microsatellite genotyping

For each population, 29-32 individuals were analyzed. For each individual, total genomic DNA was extracted from 5-10 mg of dried tissue by using the Nucleospin Multi96 Plant extraction kit (Macherey & Nagel) according to the manufacturer's instructions (excluding the recommended temperature step at 65°C) and diluted to 1:100 prior to PCR. Amplifications of 10 microsatellite loci were made according to the protocols described in Daguin et al. (2005) except that forward primers labeled with ABI dyes and a multiplex procedure (*i.e.* the use of several pairs of primers within the same PCR) were used. Three multiplex PCRs were performed with the following combination of loci and dyes: (1) 4G2 (NED), 1C1 (PET), 1B5 (FAM) & 4C12 (VIC); (2) 1B2 (NED), 1H5 (FAM), 1G2 (VIC) & 4E9 (PET); and (3) 2C1 (FAM) & 2E8 (VIC). Multiplex PCR products were diluted before being processed on an ABI 3130xl DNA sequencer: (1) 1: 16; (2) 1:25 and (3) 1:100. In addition, taking advantage of different allele size, the multiplexes 2 and 3 were pooled in equal proportion before being processed on the sequencer. Two microlitres of each multiplex (1) and (2+3) mixture was added to 5µl of a loading buffer containing 0.07µl of size standard (GeneScan-500 LIZ) and 4.93µl of Hi-Di formamide (Applied Biosystems). The loading mix was denatured at 92°C for 3min and run in an ABI prism 3130XL DNA sequencer (Applied Biosystem) with POP7 polymer and 50cm capillaries.

Genotypes obtained were scored using GENEMAPPER v4 software (Applied Biosystems). Preliminary analyses showed important and consistent heterozygote deficiencies at the 4E9 locus when compared to all the other loci, suggesting null alleles: this locus was thus discarded for subsequent genetic analyses.

Statistical analyses of the microsatellite dataset

Genetic diversity and departure from random mating

Statistical independence across the 9 study loci was verified using Fisher's exact test computed for all locus pairs overall populations and for each population separately in GENEPOP v4.0.7 (Rousset 2008). Genetic diversity for each population and over the whole bay was analyzed using the same software by computing the mean number of alleles per locus (A), the mean observed (H_o) and Nei's unbiased expected (H_e) heterozygosities. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was tested within each population using exact test as implemented in GENEPOP. The inbreeding coefficient (f) was estimated for each population and groups with the same software. To adjust for multiple comparisons in the above-

mentioned tests, the false discovery rate (FDR) was controlled: q-values were computed using the QVALUE routine in the R package (Storey 2002).

Overall genetic structure and isolation by distance model

The distribution of the genetic diversity, over all populations and for each pair of populations, was first analyzed by calculating Weir & Cockerham's F statistics using the software FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 1999). Deviation from zero was tested using a G-test (10 000 randomizations) and Bonferroni correction was carried to adjust for multiple comparisons. To picture the genetic relationship between all the study populations, a Principal Component Analysis (PCA) on genetic data was carried out using the software PCA-GEN (<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm/>).

A null model in population genetics when dispersal is spatially limited in the isolation by distance (IBD) model. IBD predicts a correlation between the geographical and the genetic distance between each pair of populations. Using a Mantel test (10 000 permutations) implemented in the GENEPOP software, we tested for this model by computing and testing for the independence of two pairwise matrices (Rousset 1997): one with an estimate of the genetic distance ($F_{st}/(1-F_{st})$) and one with the natural log of geographic distance (the shortest way by coastline).

Clustering of the genetic diversity

To test for the significance of particular groupings, e.g. according to spatial location or habitats, an Analysis of MOlecular VAriance (AMOVA) was conducted using Arlequin V.3.5 (Excoffier & Lischer 2010). The total genetic variance is partitioned into several variance components and 2 fixation indexes are estimated: F_{sc} and F_{ct} indicating the genetic differentiation among populations within groups and among groups, respectively. Significance levels of F_{sc} and F_{ct} were assessed by non-parametric permutation procedures of genotypes (10 000 permutations). We tested if the overall genetic structure could be explained by the following effects (see Table 2 for a detailed groups' definition): (1) the location of the populations in the upstream *versus* downstream portion of the dam, (2) the location of the populations near-shore and off-shore, (3) the location of the populations along a western-eastern gradient (4) habitat type (*i.e.* natural habitats, marinas or crops). For all these analyses, when an unbalanced number of populations per group was observed, we first used the whole data set and then repeated the analysis on a random subset of populations for the groups over-represented. The same qualitative results were obtained.

Because *F*-statistics and AMOVA analyses operate at the population level and thus make strong assumptions about *a priori* grouping (Manel et al. 2005), we used an individual-based clustering approach implemented in the software STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000). The model attempts to find the number of clusters (*K*) that best explains the genetic data, assuming Hardy-Weinberg and linkage equilibrium within clusters and then estimates admixture proportions for each individual (*i.e.* the genetic membership of each individual to each cluster). We performed simulations using an admixture model with correlated allele frequencies. The number of clusters (*K*) is a fixed parameter of this model. Using the CBSU server (available at <http://cbsuapps.tc.cornell.edu/index.aspx>), 5 independent runs (each with $5 \cdot 10^4$ iterations following a burn-in of 10^5 iterations) were carried out for each prior value of the number (*K*) clusters, set between 1 and 30 (the maximum number of samples in the data set).

Finally, for detecting the proportion of individuals likely to originate from recent migrant individuals, we used assignment tests based on the Rannala and Mountain's method implemented in the software GeneClass 2.0 (Cornuet et al. 1999). For each individual, a marginal probability of belonging to each of the putative source populations is computed, based on their allele frequencies. Each individual is then assigned to the source for which it obtained the highest probability. All sampled sites were considered as a putative source.

Results

Presence of *Undaria pinnatifida* at the bay scale

U. pinnatifida was present in 31 out of the 37 sites (84%; farm excluded) prospected in the Bay of St-Malo (Table 1, Figure 1). In two of these sites (5 and 6), only a few individuals (less than five) were observed.

Populations were found to be established over a large range of habitats: marinas (N°18 & 19), natural ecosystems close to (e.g. N°20) or far from the shore (e.g. N°22), sites located in the downstream (e.g. N°17) and upstream (e.g. N°36) portion of the dam in the estuary. However, not a single individual was found in the sites N°37 and 38 which were characterized by low salinity level.

Genetic diversity at population level

We obtained multilocus genotypes for 955 *Undaria pinnatifida* corresponding to 30 sites. We indeed analyzed 28 sites where *U. pinnatifida* was abundant enough to be sampled and 2 crop samples (see column N_{genot} in Table 1). Of the 36 tests for linkage disequilibrium performed for each locus pair overall populations, 11 pairs of loci were significant at the 5% level. After FDR correction, 10 values remain significant. When considering the tests at the population level (1080 tests with 240 not done because of a lack of polymorphism), 26 were significant after FDR correction (15 populations with 1 to 5 pairs of loci showing disequilibrium). None pairs of loci was however found to be in linkage disequilibrium in every population.

Over the total dataset, the number of alleles varied across loci (from 2 for the locus 4C12 to 6 for the loci 1B2 and 2C1), with an average of 3.78 ± 1.39 alleles per locus. All the populations were found to be polymorphic regardless of their location or habitat. The mean number of alleles across loci per population had an average value of 2.65 ± 0.33 across populations. The mean number of alleles per population was nevertheless variable with the lowest value (1.67) in the two batch cultures and the largest (3.00) in 2 populations nearby the farm (N°35, 36) and one of the two study marina (N°18). The expected heterozygosity (*i.e.* gene diversity) was similar across the populations (0.35 to 0.44; Table 1).

Seven out of 30 populations showed a significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium suggesting that reproduction is generally panmictic. For 6 of the 7 populations with deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, the observed heterozygote deficiencies only occurred for one to three loci (out of the 9 analyzed).

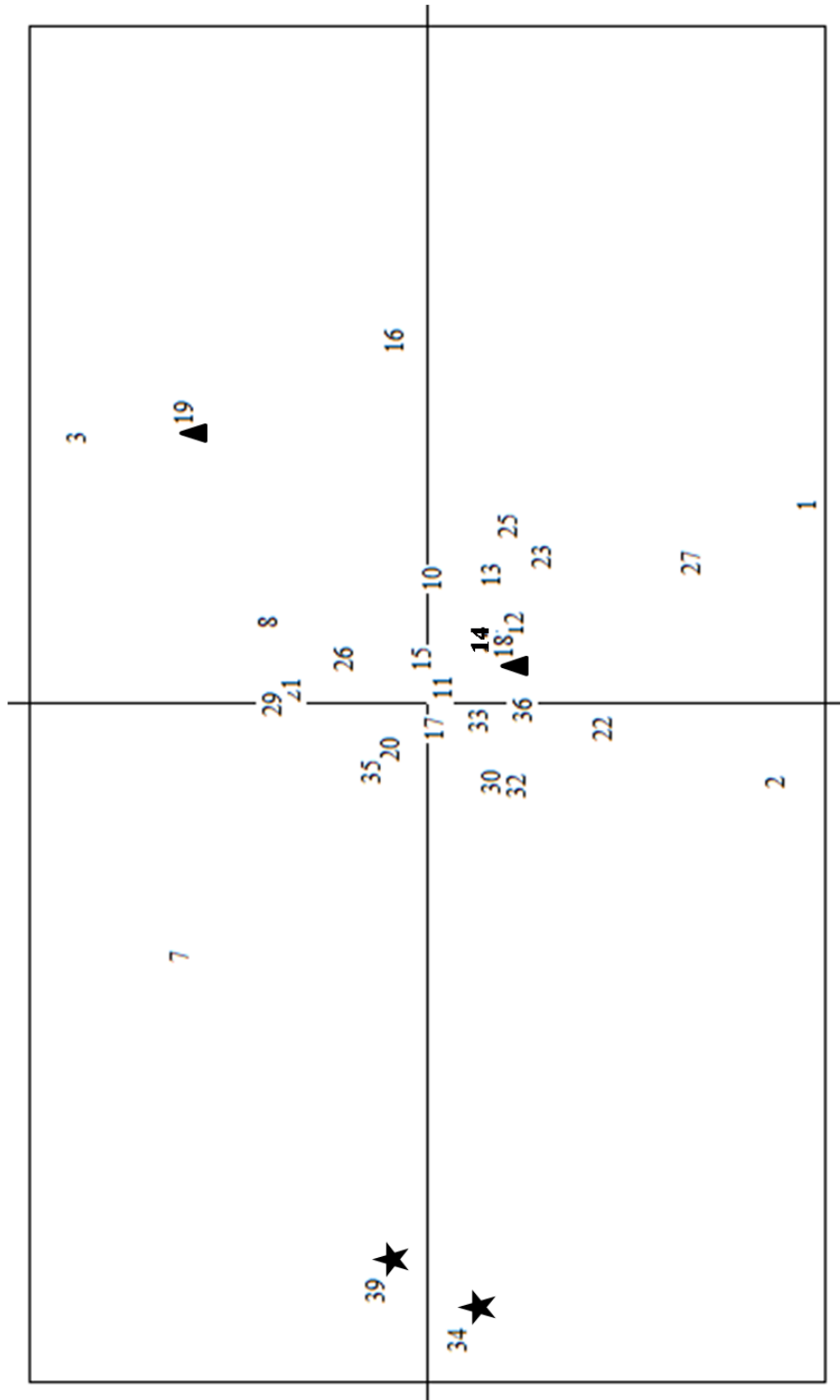


Figure 2: Output of a PCA analysis on genetic data illustrating the genetic distances between populations in the St-Malo area.

Axis 1 represents 42.85% of the genetic variance ($P < 10^{-4}$) and axis 2 13.03% of genetic variance ($P = 0.992$). The populations are numbered as indicated in Table 1 and Figure 1. The two marinas (N°18 and 19) and the two crop samples (N°34 and 39) analyzed are indicated by triangles and stars respectively.

A Wahlund effect (*i.e.* co-existence of genetically differentiated sub-groups in the sampled population) was thus the most likely explanation. Conversely, in one population (the marina "Bassin Vauban", N°19), a very high heterozygote deficiency was observed ($F_{is} = 0.479$; $P < 10^{-6}$). This was supported by 7 of the 9 loci suggesting the existence of inbreeding effects.

Genetic structure at the bay scale according to *a priori* population definition

A significant genetic structure was observed among the 30 study sites ($F_{st} = 0.099$; $P < 10^{-6}$). Among 435 pairwise comparisons (between populations; Table in Annexe 3), only 33 did not show a significant genetic differentiation. In figure 2, the two-dimensional Principal Component Analysis is picturing the relative genetic distance among the study populations highlighting the genetic isolation of the two crop samples (N°34 and N°39). Interestingly, the two marinas appeared genetically different from each other. One of them (N°18) was found to be close to many natural populations whereas the other one (N°19) was isolated from almost all other samples

When analyzing a north-south transect along the estuary (sites 14, 15, 16, 17, 32, 33, 35, 36), no isolation by distance pattern was observed (Mantel test, $P=0.500$). The same hold when considering the 20 sites located downstream from the dam (the bay; Mantel test, $P=0.112$). The genetic distance between populations was therefore not explained by their geographic distance.

Main results of the AMOVA are provided in Table 2. Distance to the shore as well as location in the western vs. eastern part of the bay did not explain the overall genetic structure. Conversely, we detected a slight "crop effect". For instance, a significant structure was observed when comparing populations located in the downstream and upstream portions of the dam including crops. However, this structure was no longer observed when crops were excluded from the analysis (compare rows 3 and 4 in Table 2). The same was observed when testing directly for an "habitat effect". First, a significant structure among groups was observed ($F_{ct}=0.105$; $P=0.001$). However, this "habitat" effect was no longer significant when comparing only marinas and populations established in natural habitats ($P=0.166$) either over the whole study or when considering only the upstream ($P=0.206$) or the downstream ($P=0.070$) areas. Conversely, crops and populations established in natural habitats were genetically different. When splitting the wild populations into two sub-sets according to their location in the downstream and upstream portions of the dam, we observed an interesting

result: although the F_{ct} value is high, crops were not significantly different from populations established in the upstream portion of the Rance estuary ($F_{ct}=0.137$, $P=0.062$) whereas crops were found to be different from populations established in the bay. This result is supported by pairwise comparisons: the mean F_{st} value computed was 0.280 (with a mean and maximum value equal to 0.168 and 0.469) when comparing the crop in the Rance estuary with any of the wild populations from the bay, whereas it dropped down to 0.187 (with a mean and maximum value of 0.159 and 0.215) when comparing the crop and the natural populations established in the upstream part of the Rance estuary.

Table 2: Output of AMOVA testing for the effects of population location or habitat on the genetic structure.

F_{sc} and F_{ct} (and associated P-value) indicate the genetic differences among populations within groups and among groups, respectively. Significant values for group effects are underlined. Populations within each group ({populations in group i } vs. {populations in group j }) are indicated by population number as provided in Table 1 and Figure 1.

Effects	Group definition	F_{sc}	P	F_{ct}	P
“Location” effect					
Near shore vs. Off shore	{1, 3, 10, 13, 16, 17, 20, 23, 25, 30} vs. {11, 12, 15, 21, 22, 26, 27, 29}	0.055	$<10^{-4}$	-0.001	0.603
Western vs. Eastern location	{1-3, 7, 8, 10-12} vs. {23, 25-27, 29, 30}	0.079	$<10^{-4}$	-0.006	0.915
Downstream vs. Upstream areas - with crops ⁽¹⁾	{1-3, 14, 16, 21, 27, 29-30} vs. {32-36}	0.097	$<10^{-4}$	<u>0.041</u>	<u>0.009</u>
Downstream vs. Upstream areas without crops ⁽¹⁾	{1-3, 14, 16, 21, 27, 29, 30} vs. {32-33, 35-36}	0.067	$<10^{-4}$	0.001	0.405
Wild Downstream vs. Wild upstream ⁽¹⁾	{1-17, 20-31} vs. {32-33, 35-36}	0.060	$<10^{-4}$	0.001	0.394
“Habitat” effect					
Marina vs. crop vs. wild ⁽¹⁾	{18, 19} vs. {34, 39} vs. {all other samples}	0.063	$<10^{-4}$	<u>0.105</u>	<u>0.001</u>
Marina vs. wild ⁽¹⁾	{18, 19} vs. {all other samples}	0.061	$<10^{-4}$	0.012	0.166
Marina vs. wild-downstream ⁽¹⁾	{18, 19} vs. {1-17, 20-31}	0.067	$<10^{-4}$	0.010	0.206
Marina vs. wild-upstream	{18, 19} vs. {32-33, 35-36}	0.026	$<10^{-4}$	0.026	0.070
Crop vs. wild ⁽¹⁾	{34, 39} vs. {1-17, 20-31}	0.062	$<10^{-4}$	<u>0.169</u>	<u>0.003</u>
Crop vs. wild-downstream ⁽¹⁾	{18, 19} vs. {1-17, 20-31}	0.069	$<10^{-4}$	<u>0.178</u>	<u>0.003</u>
Crop vs. wild-upstream	{18, 19} vs. {32-33, 35-36}	0.036	$<10^{-4}$	0.137	0.062

⁽¹⁾ Same qualitative results were obtained with other subsets of populations located in the bay

Individual clustering and assignment methods

Bayesian clustering analysis indicated that the most likely number of “true populations” (*i.e.* panmictic units) over the whole study sites is 4. Most individuals were admixed with variable proportions of ancestry to each of the four clusters (Figure 3). The two crops showed a very different pattern from all other samples with a high probability for every individual to belong to one cluster (blue color in Figure3). Population N°7 also showed a particular pattern as compared to the other natural populations: 59.4% of individuals showed a very high proportion of their genome typical of the cluster which the one characteristic of the crop samples (individuals with blue color). The population N°2 and N°3 showed a specific pattern: N°2 displayed a high genetic membership to one given cluster (in red) and N°3 with another cluster (featured by the green color). Assignment tests showed that the proportion of individuals assigned to their sampling locality (*i.e.* self-assignment) was variable, ranging from 3.13% for the populations N°23 and N°30 to 81.25% in the population N°3 (Figure 4). In most of the populations, a large range of putative sources was found and this pattern was particularly strong for the populations located in the eastern part of the bay (N°23-30) and the upstream portion of the dam (32-36, excluding the farm N°34). Again, the crop (N°34) showed a distinctive feature as all individuals were self-assigned (*i.e.* the highest membership probability was with the crop). Interestingly, the individuals not assigned to the site where they have been sampled were not preferentially assigned to a neighboring population, showing that there is little effect of the spatial distance on the genetic similarity between populations.

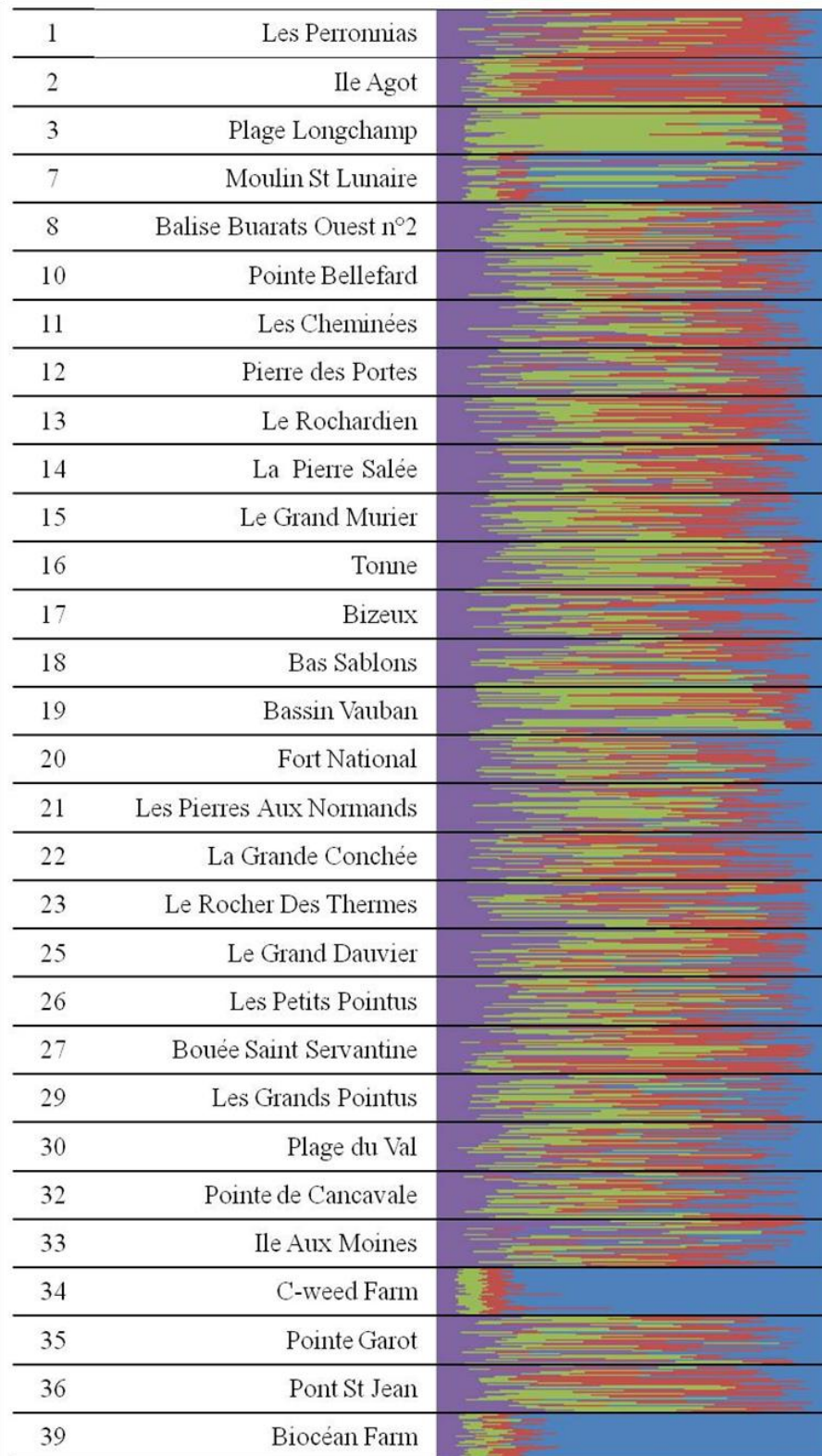


Figure 3: Results of the clustering analysis made with the software Structure.

Four clusters were identified. Each cluster is pictured by a different color. Individuals are ranked according to the location where they have been sampled (population number and name on the left). Each population is separated by a black line. Each individual is represented by a thin horizontal line divided into k (1 to 4) different coloured segments which feature the individual membership to each of the 4 identified clusters.

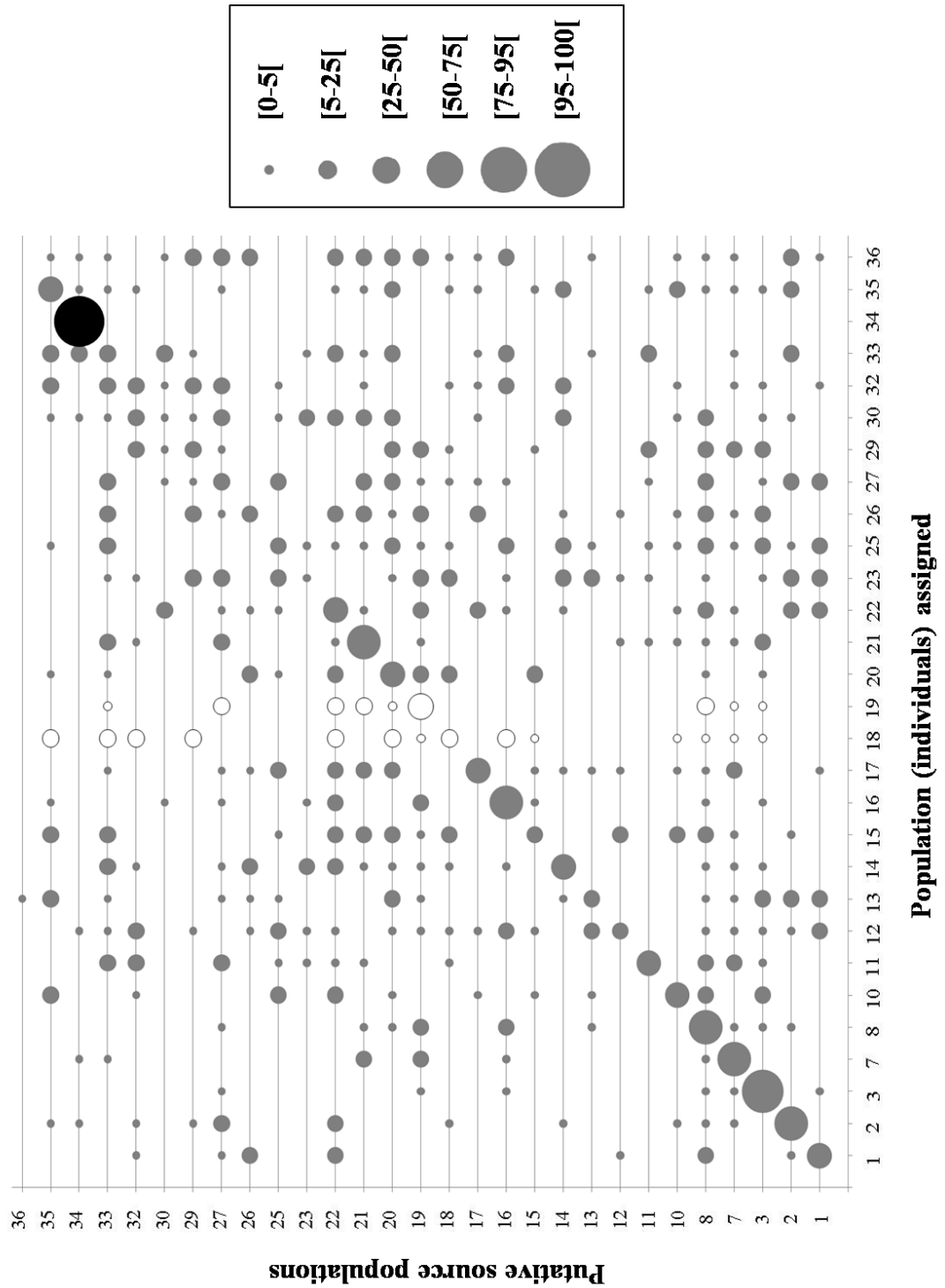


Figure 4: Assignment test for individuals sampled in 29 sites in the St-Malo area.

For each population (x-axis), the percentage of individuals assigned to one of the putative source (y-axis) is indicated with bubbles featuring different frequency category as indicated in the right panel. Putative sources used were all the same 29 samples. The populations are numbered as indicated in Table 1 and Figure 1. Samples from marinas, crop and populations established in the wild are pictured by white, black and grey bubbles respectively.

Discussion

The primary introduction of *U. pinnatifida* in Europe and, in particular, along the Atlantic and Channel coasts was mainly explained by farming activities (Castric-Fey et al. 1993; Fletcher & Farrell 1999). This origin was later confirmed by molecular analyses (Voisin et al. 2005). Through surveys and field experiments, farming of *U. pinnatifida* was also shown to be the main source of the initial establishment of wild populations at a small spatial scale, within one bay in Ushant Island (Floc'h et al. 1996). The Bay of St-Malo is one of the first areas where colonization has been documented by *U. pinnatifida* soon after its introduction for cultivation purposes (e.g. Castric-Fey et al. 1993). Here, by using field surveys and population genetics analyses, we documented the large present-day distribution and sustainability of *U. pinnatifida* populations, a pattern associated with a patchy distribution of the genetic diversity, at the bay scale.

Almost every site where we looked for the presence of *U. pinnatifida* was found to be colonized by this kelp. Populations were present over a large range of environments: intertidal, shallow subtidal, more or less exposed sites, fully marine to brackish waters, human-made structures (marinas, buoys, etc.). The establishment of *U. pinnatifida* over a large range of habitats has been observed in other regions where this kelp had been introduced (for example in New-Zealand, Russell et al. 2008). This ability to colonize various habitats and to be tolerant to a large set of environmental conditions (e.g. salinity, Silva et al. 2002) has been pointed out as a reason for the success of the introduction of *U. pinnatifida* at a worldwide level (Wallentinus 2007 and references herein).

Our records confirmed the large set of observations made 15-20 years ago (in 1986-1989 and 1990-1994) by "L'Association pour la Découverte du Monde Sous-marin" (ADMS) and reported by Girard-Descatoire et al. (1997). Conversely to what has been reported in the native range of *U. pinnatifida*, two reproductive events and subsequent recruitments are occurring each year in the populations established in natural habitats in Brittany (see for example, Castric-Fey et al. (1999) for a study in the St-Malo area) as well as in human-made habitats (see Voisin 2007 for a study in two marinas in Brittany). Thus ca. 30 generations succeeded one another in the Bay of St-Malo since the surveys carried out in the 1990s reported in Girard-Descatoire et al. (1997), highlighting the sustainable establishment of *U. pinnatifida* at the bay level.

Our experimental design was based on a grid approach in order to describe the overall pattern of *U. pinnatifida* presence as well as to get a sampling representative of the genetic diversity over the whole bay. We thus did not monitor specifically each sites reported in Girard-Descatoire et al. (1997). A site by site comparison with records established in 1990s would be of interest in future surveys, particularly for sites where the species was absent in the 1990s. For instance, one site (N°26) where we observed the kelp was recorded as a site without *U. pinnatifida* in 1990 showing that colonization of new sites occurred after the initial spread of the species in the bay in the 1990s.

Several populations observed during our survey, in 2009, were already reported in the early 1990s by Girard-Descatoire et al. (1997), in the exact same site or in nearby sites (Table 1). The long-term establishment of *U. pinnatifida* is thus not only noticeable at the bay scale but also at the site level. The hypothesis of stability of local populations was also supported by the genetic data. A large and similar genetic diversity was indeed observed in every site sampled and allelic diversity was low only in crops. We also did not get evidences for founding events in the study populations (tested with the Bottleneck software, data not shown). In addition, many populations did not show any departure from the Hardy-Weinberg equilibrium suggesting that local individuals originated from a panmictic reproductive event. Only the population from the marina Vauban (N°19) showed a large heterozygote deficiency. Combined with a high percentage (34%) of individuals homozygous over all loci, this pattern suggested the existence of a parthenogenetic reproduction in this population. Asexual reproduction had been previously reported in *U. pinnatifida* based on laboratory experiments (Wallentinus 2007 and references herein). Finally, assignment tests showed a high rate of self-assignment, particularly in the western part of the bay. Altogether, all these analyses suggested that populations are at migration-drift equilibrium, mostly self-seeded and stable over time. Additional studies, in particular temporal analyses of the genetic composition of the population, are nevertheless needed to ascertain this hypothesis.

Thirty-five years after its escape into the wild, *U. pinnatifida* is sustainably established at both local and global scales. Reasons for the successful establishment of *U. pinnatifida* at meso- and macro-scale are still little understood. Field experiments and observations suggested that this alga, although being tolerant to a large set of environmental variable, has a preference for artificial substrates (like pontoons in marinas or buoys in natural habitats), disturbed habitats and substrates that are not densely covered by other algal species (Floc'h et

al. 1996; Valentine & Johnson 2003). *U. pinnatifida* is considered as an opportunistic and pioneering species able to colonize marginal habitats (Silwa et al. 2006). For such species and like in many other successful invaders, the propagule pressure (Simberloff 2009) is likely to have been a critical factor for the founding of new populations into the wild. The farming activities was certainly a main source of propagules because *U. pinnatifida* individuals are removed from the cultivation ropes when they have already reached sexual maturity (and thus after massive spores releases; Fletcher & Farrell (1999)). A scenario similar to the one described by Floc'h et al.(1996) in the Ushant island is likely to have occurred in the Bay of St-Malo: the farming activities certainly played an important role for the establishment of the first populations. Castric-Fey et al. (1993) noted that the presence of *U. pinnatifida* in 1992 was concomitant to a '*population explosion in the Rance estuary*'.

If crops have initiated the spread, it is unlikely that they contributed alone to the rapid spread documented at the bay level, *i.e.* over several tens of kilometers in 1992. Populations far from the farming areas and the Rance estuary were among the first to be recorded in natural habitats: in 1986 at Pointe de la Varde (Castric-Fey et al. 1993) which is near population N°30 in Figure 1 and in 1992 in offshore locations (Huppée, Découverte, Courtis in Figure 1 in Girard-Descatoire et al. (1997) near population N°12 in Figure 1. The same hold for the present-day situation: our genetic data also suggest that farming activities are unlikely to continue to play a major role in the annual renewal of the populations established in the wild. Indeed, the crops were genetically distinct from most of the natural populations. Although being based on different theoretical assumptions and statistical methods, the genetic analyses (Assignment tests, Bayesian clustering, AMOVA and PCA based on *F*-statistics) all pointed out a significant genetic difference of the crop samples as compared to the other populations. Only populations established very closely to the farm, *i.e.* in the upstream portion of the dam, and which are the most likely to receive migrants from the farm, did not show such a difference with the AMOVA computation. The "historical fingerprint" of the introduction process (*i.e.* introduction due to farming activities) is not visible anymore in the populations established in the downstream area, the bay *stricto sensu* and it is only slightly traceable in the populations located in the estuary. For these later populations, in addition to the historical fingerprint, the spores released each year by cultivated individuals during spring are likely to exert enough propagules pressure to promote successful recruitment of some of them in the neighboring rocky habitats despite competition with spores released by local individuals (e.g. results of assignment test of populations 32 in Figure 4). In addition, the

reproductive season of crops and wild populations is not fully overlapping and a strong genetic drift is occurring in crops (*i.e.* due to a limited number of reproductive individuals used for seedlings production). These two effects could be important drivers for enhancing a rapid divergence between cultivated and wild populations of *U. pinnatifida*.

Besides showing the genetic isolation of the crop as compared to populations established in natural environments, we got evidences for a patchy and significant genetic structure ($F_{st} = 0.10$, $P < 10^{-4}$) at the bay level. The genetic structure did not reflect any habitat or population location effects. Computations of pairwise F_{st} estimates revealed that even very close populations were significantly differentiated. Assignment tests also showed that the individuals not assigned to the site where they have been sampled were not preferentially assigned to a neighboring population (Figure 4). Spore dispersal alone is unlikely to be responsible of these patchy and mosaic genetic patterns. In brown algae, including *U. pinnatifida*, the life duration of spores generally does not exceed a few hours to a day and lead to annual dispersal distance of the order of 10m (Forrest et al. 2000, Sliwa et al. 2006, Grulois et al. unpublished). Such limited spore dispersal is likely to generate a step-by step colonization pattern and thus a correlation between genetic distance and spatial distance between populations. We did not observe any isolation by distance pattern to support this scenario. Some rare long-distance dispersal events are more likely to explain the observed genetic structure at the bay scale.

Rare and long-distance dispersal events may be due to two non-exclusive and interacting factors. First, detached mature thalli or transport of mature individuals attached to small rocks, cobbles or mollusk shells may be an important source of founding individuals. This mode of transport was proposed to be efficient to disperse *U. pinnatifida* in Tasmania and New Zealand over distance of 10^3 - 10^4 meters per year (Sliwa et al. 2006). In the Bay of St-Malo, current velocity is particularly important because of strong tide effects and may facilitate the spread of such mature individuals over long distance. Then we cannot neglect the role of nautical leisure activities (*e.g.* recreational fishing and diving) which are particularly important in the Bay of St-Malo. Small crafts and diving are more and more recognized as important drivers of non-indigenous species spread (for a review, see Minchin et al. (2006)). Divers and anchors can for instance easily and accidentally detached mature individuals. Besides marinas and harbors could be direct sources of migrants at meso-scale (*e.g.* spores and gametophytes attached to the hull, ropes of small crafts or within seachest, ballast water

for ferries and large boats). In this context, the genetic signature of the Marina Bas Sablons (N°18) is noteworthy as this site was found clustered with many wild populations in the PCA picture (Figure 2). Nautical activities and maritime traffic are highly developed in the marina N°18 in relation with fishing, sailing, diving and with ferries and shuttle to England and the Islands of Jersey and Guernsey. This population, one of the mostly genetically diverse one, may be a reservoir of genetic diversity for populations established around. All the above mentioned vectors favor jump dispersal and stochastic spread of individuals over tens of kilometers. Once the founder individuals are established, the high fecundity, fast growth rate and annual life-cycle of *U. pinnatifida* is likely to facilitate the establishment of large populations within a few years.

Conclusions

Biological invasions are dynamic processes deserving repeated spatial surveys to determine the long-term effects of the invaders and stability of their populations (Strayer et al. 2006). In marine environment where direct surveys are often difficult to implement, population genetics can elucidate some of the patterns and mechanisms which drive the sustainable settlement of non-native species. Genetic studies are however scarce in introduced algae as compared to the many studies carried out in aquatic and particularly marine animals (Roman & Darling 2007), especially when considering micro- and meso-scale.

Here by coupling surveys and population genetics analyses, we showed the sustainable settlement of *U. pinnatifida* at both local and bay scale. Populations established in natural habitats appeared to be stable entities that are largely self-seeded. Our results also showed that while cultivated populations were certainly largely responsible for the primary introduction of *U. pinnatifida* in the St-Malo area, they are not a main reservoir of migrants for natural populations.

Thirty-five years after its escape into the wild, *U. pinnatifida* is conspicuous in the Bay of St-Malo. Several examples are known with other seaweeds (for instance in Brittany: *Sargassum muticum*, also well-established in the Bay of St-Malo). As already documented for *U. pinnatifida* and other marine algae over larger spatial scale (*i.e.* region or biogeographical province; Lyons & Scheibling (2009)), the expansion and sustainable settlement of *U. pinnatifida* at a meso-scale relied on multiple interacting factors, among which human activities played a major role balancing the limited spore dispersal of *U. pinnatifida*.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the divers and sailors from the Station Biologique of Roscoff for their help for the survey and sampling: Yann Fontana, Wilfried Thomas, Noël Guidal, Mathieu Camusat and Mathieu Oriot. The authors are also grateful to Jean-François Arbonna and Magali Molla from the C-Weed Aquaculture Company and Patrick Podeur from the BiOcéan Company for crop sampling and fruitful discussions. The authors are also thankful to Thierry Comtet and Thomas Broquet for comments and editing of the manuscript. The genotyping was carried out on the Biogenouest platform in the Station Biologique of Roscoff. This work was supported by the ANR project "ECOKELP" and the INTERREG project MARINEXUS. DG benefitted from a grant for her doctoral research from the Region Bretagne (ARED program, project WAKLIFE).

References

- Castric-Fey A., Beupoil C., Bouchain J., Pradier E. & L'Hardy-Halos M. T. 1999. The introduced alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Alariaceae) in the rocky shore ecosystem of the St-Malo area: growth rate and longevity of the sporophyte. *Botanica Marina*, **42**: 83-96.
- Castric-Fey A., Girard A. & L'Hardy-Halos M. T. 1993. The distribution of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) on the coast of St-Malo (Brittany, France). *Botanica Marina*, **36**: 351-358.
- Cornuet J.-M., Piry S., Luikart G., Estoup A. & Solignac M. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, **153**(4): 1989-2000.
- Bonnot-Courtois C., Caline B., L'Homer B. & Le Vot M., Eds. 2002. La Baie du mont-St-Michel et l'estuaire de la Rance. Environnements sédimentaires, aménagements et évolution récente. Bulletin des Centres de recherches exploration-production Elf-Aquitaine. 26. Paris, CNRS, EPHE; Totalfina Elf.
- Daguin C., Voisin M., Engel C. & Viard F. 2005. Microsatellites isolation and polymorphism in introduced populations of the cultivated seaweed *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales). *Conservation Genetics*, **6**: 647-650.
- Excoffier L. & Lischer H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**(3): 564-567.
- Fletcher R. L. & Farrell P. 1999. Introduced brown algae in the North East Atlantic, with particular respect to *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, **52**: 259-275.
- Floc'h J. Y., Pajot R. & Mouret V. 1996. *Undaria pinnatifida* (Laminariales, phaeophyta) 12 years after its introduction into the Atlantic ocean. *Hydrobiologia*, **326/327**: 217-222.
- Forrest B. M., Brown S. N., Taylor M. D., Hurd C. L. & Hay C. H. 2000. The role of natural dispersal mechanisms in the spread of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae). *Phycologia*, **39**(6): 547-553.
- Geller J. B., Darling J. A. & Carlton J. T. 2009. Genetic perspectives on marine biological invasions. *Annual Review in Marine Sciences*, **2**: 401-427.

- Girard-Descatoire A., Castric-Fey A. & L'Hardy-Halos M. T. 1997. *Inventaire de la faune et de la flore sur les fonds rocheux de Saint-Malo et de Dinard*. Juin 97, Rennes, Direction Régionale de l'Environnement Bretagne, Conseil Régional de Bretagne.
- Goudet J. 1999. FSTAT vers. 2.8, updated from Goudet (1995). Fstat: a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86: 485-486.
- Kinlan B. P. & Gaines S. D. 2003. Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology*, **84**(8): 2007-2020.
- Lyons D. A. & Scheibling R. E. 2009. Range expansion by invasive marine algae: rates and patterns of spread at a regional scale. *Diversity and Distributions*, **15**(5): 762-775.
- Manel S., Gaggiotti O. E. & Waples R. S. 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**(3): 136-142.
- Minchin D., Floerl O., Savini D. & Occhipinti-Ambrogi A. 2006. Small craft and the spread of exotic species. *The ecology of transportation: managing mobility for the environment*. J. Davenport & J. L. Davenport. The Netherlands, Springer: 99-108.
- Molnar J. L., Gamboa R. L., Revenga C. & Spalding M. D. 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **6**(9): 485-492.
- Nyberg C. D. & Wallentinus I. 2005. Can species traits be used to predict marine macroalgal introductions? *Biological Invasions*, **7**: 265-279.
- Perez R., Kaas R. & Barbaroux O. 1984. Culture expérimentale de l'algue *Undaria pinnatifida* sur les côtes de France. *Science et Pêche*, **343**.
- Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**: 945-959.
- Roman J. & Darling J. A. 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**(9): 454-464.
- 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**(1): 103-106.
- Russell L. K., Hepburn C. D., Hurd C. L. & Stuart M. D. 2008. The expanding range of *Undaria pinnatifida* in southern New Zealand: distribution, dispersal mechanisms and the invasion of wave-exposed environments. *Biological Invasions*, **10**: 103-115.

- Silva P. C., Woodfield R. A., Cohen A. N., Harris L. H. & Goddard J. H. R. 2002. First report of the Asian kelp *Undaria pinnatifida* in the northeastern Pacific Ocean. *Biological Invasions*, **4**: 333-338.
- Simberloff D. 2009. The role of propagule pressure in biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**(1).
- Sliwa C., Johnson C. R. & Hewitt C. L. 2006. Mesoscale dispersal of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* attached to unstable substrata. *Botanica Marina*, **49**: 396-405.
- Storey J. 2002. A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* **64**: 479-498.
- Strayer D. L., Eviner V. T., Jeschke J. M. & Pace M. L. 2006. Understanding the long-term effects of species invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, **21**(11): 646-651.
- Uwai S. Y., Nelson W., Neill K., Wang W. D., Aguilar-Rosas L. E., Boo S. M., Kitayama T. & Kawa H. 2006. Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) deduced from mitochondria genes origins and succession of introduced populations. *Phycologia*, **45**(6): 687-695.
- Valentine J. P. & Johnson C. R. 2003. Establishment of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* in Tasmania depends on disturbance to native algal assemblages. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **295**: 63-90.
- Voisin M. 2007. Les processus d'invasions biologiques en milieu côtier marin: le cas de l'algue brune *Undaria pinnatifida*, cultivée et introduite à l'échelle mondiale. Paris, Thèse de l'Université Pierre & Marie Curie (Paris 6): 231.
- Voisin M., Engel C. & Viard F. 2005. Differential shuffling of native genetic diversity across introduced region in a brown alga: aquaculture vs. maritime traffic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(15): 5432-5437.
- Wallentinus I. 2007. Alien Species Alert: *Undaria pinnatifida* (wakame or Japanese kelp), ICES Cooperative Research Report No. 283. 36 pp.
- Williams S. L. & Smith J. E. 2007. A global review of the distribution, taxonomy, and impacts of introduced seaweeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **38**(1): 327-359.

Chapitre III :
Microstructure spatiale et inférences
sur la dispersion efficace au sein d'un
site naturel colonisé
par *Undaria pinnatifida*

Tableau III.1 : Distances de dispersion estimées chez 44 espèces marines à partir (1) d'observations directes des propagules, (2) d'approches expérimentales, (3) de progression annuelle d'espèces introduites, (4) de résultats de marquage (marqueurs génétiques, mesures chimiques sur des otolithes, taille de recrues etc.). Ces 4 catégories sont indiquées dans le tableau ci-dessous (à la suite du nom de l'espèce) respectivement par les lettres O, E, I et T.

Tableau issu de Shanks (2009).

Table 1

Estimates of propagule duration and dispersal distance

Organism (data source)	Dispersing stage	Propagule duration	Dispersal distance	References
Algae				
<i>Sargassum</i> spp. (E)	spores	25 days	1 m	Deysher and Norton (1982); Kendrick and Walker (1995)
<i>Grateloupia doryphora</i> (I)	spores		10 km	Villalard-Bohnsack and Harlin (2001)
<i>Sarcothalia crispata</i> (E)	spores		900 m	Opazo and Otaiza (2007)
Crustose corallines (E)	spores		900 m	Opazo and Otaiza (2007)
<i>Fucus serratus</i> (I)	spores		4 m	Arrontes (2002)
<i>Macrocystis pyrifera</i> (E)	spores	32 h	200 m	Reed <i>et al.</i> (2006)
Cnidaria				
<i>Allopora californica</i> (E)	demersal planulae	minutes	0.5 m	Fritchman (1974); Ostarello (1976)
<i>Athenaria actinia</i> (O)	egg	minutes	1 m	Nyholm (1940)
<i>Alcyonium siderium</i> (E)	demersal planulae	4.5 days	3 m	Sebens (1983)
<i>Favia fragum</i> (E)	planulae	4 min	3 m	Carlson and Olson (1993)
<i>Heliopora coerulea</i> (E)	planulae	6 h	350 m	Harii <i>et al.</i> (2002); Harii and Kayanne (2003)
<i>Tubularia larynx</i> (O)	actinula	<5 min pelagic, crawling 1 day	centimeters to meters	Pyefinch and Downing (1949)
Sponges				
<i>Scopalinia lophyropoda</i> (E)	larvae	5–10 min	0.5–2 m	Uriz <i>et al.</i> (1998)
<i>Halichondria moorei</i> (O)	larvae	60 h	2 m	Bergquist and Sinclair (1968)
<i>Stylopsus</i> spp. (O)	crawling larvae	1–4 days	meters	Ayling (1980)
<i>Chondropsis</i> spp. (O)	crawling larvae	1–4 days	meters	Ayling (1980)
Tunicates				
<i>Molgula pacifica</i> (O)	adhesive benthic egg	36 h	<1 m	Young <i>et al.</i> (1988)
<i>Trididemnum solidum</i> (O)	tadpole larvae	15 min	<200 m ¹	van Duyl <i>et al.</i> (1981)
<i>Ecteinascidia turbinata</i> (O)	tadpole larvae	81.5 s	6.87 m	Bingham and Young (1991)
Bryozoans				
<i>Crisia denticulate</i> (T)	larvae	<2 h ²	10–20 m	Pemberton <i>et al.</i> (2007)
<i>Tubulipora tuba</i> (E)	larvae	<2 h ²	1 m	Knowlton and Jackson (1993)
Molluscs				
<i>Crepidula fornicata</i> (I)	larvae	2–3 weeks	28.5 km	Coe (1949); Dommasnes and Scham (1973)
<i>Rapana venos</i> (I)	larvae	14–17 days	100 km	Zolotarev (1996); Harding and Roger (1999)
<i>Philina</i> spp. (I)	larvae	30–40 days	260 km	Hansen and Ockelmann (1991); Cadien and Ranasinghe (2003)
<i>Dendropoma corallinaceum</i> (O)	crawling larvae	1–5 days	<1 m	Hughes (1978)
<i>Venerupis philippinarum</i> (I)	larvae	3–4 weeks	20 km	Bourne (1982); Quayle (1964); Strathmann (1987)
<i>Musculista senhousia</i> (I)	larvae	16 days	116 km	Willan (1987); Semenikhina <i>et al.</i> (2008)
<i>Perna viridis</i> (I)	larvae	2–3 weeks	33 km	Benson <i>et al.</i> (2001); Fajans and Baker (2005)
<i>Mya arenaria</i> (I)	larvae	10–35 days	35 km	Strathmann (1987); Zolotarev (1996)
<i>Drupella cornus</i> (T)	larvae	3 weeks	<100 m	Johnson <i>et al.</i> (1993)
<i>Adalaria proxima</i> (E)	larvae	1–3 days	100 m	Lambert <i>et al.</i> (2003)
Polychaetes				
<i>Spirorbis spirillum</i> (E)	larvae	15 min	<500 m	Dimberger (1993)
<i>Terebrasabella heterouncinata</i> (I)	crawling larvae	12 h	15 m	Kuris and Culver (1999); Culver and Kuris (2000)
<i>Marenzelleria viridis</i> (I)	larvae	8 weeks	55–64 km	Boudouresque (1994); Bochert (1997)
Crustaceans				
<i>Paralithodes camtschaticus</i> (I)	larvae	90 days	32 km	Kuzmin <i>et al.</i> (1996); Epelbaum <i>et al.</i> (2006)
<i>Balanus glandula</i> (I)	larvae	2–4 weeks	85 km	Schwindt (2007)
<i>Cancer magister</i> (T)	larvae	3–4 months	500 km	Shanks (unpubl. data)
Echinoderms				
<i>Asterias amurensis</i> (I)	larvae	40–50 days	22.5 km	Buttermore <i>et al.</i> (1994); Nozais <i>et al.</i> (1997)
<i>Acanthaster planci</i> (I)	larvae	14 days	49–81 km	Moran <i>et al.</i> (1992)
Fishes				
<i>Pterois volitans</i> (I)	larvae	25–40 days	48.5 km	Ruiz-Carus <i>et al.</i> (2006)
<i>Sebastes melanops</i> (T)	larvae	83–174 days	<120 km	Miller and Shanks (2004)
<i>Amphiprion percula</i> (T)	larvae	10–13 days	100–500 m	Almany <i>et al.</i> (2007)
<i>Chaetodon vagabundus</i> (T)	larvae	29–48 days	100–500 m	Almany <i>et al.</i> (2007)
<i>Pomacentrus amboinensis</i> (T)	larvae	9–12 days	100–200 m	Jones <i>et al.</i> (1999)

The data presented in this table are new. The data analysis and figures presented in this paper were based on these new data and the data presented in Shanks *et al.* (2003a). Dispersal distances are from experimental data (E), the spread of invasive species (I), observations of dispersing larvae (O), and the displacement of "tagged" larvae (T). Propagule duration values are from either laboratory rearing experiments or field observations of dispersing larvae.

¹Distance estimated assuming 15 min in the plankton and a current of 20 cm/s.

²Estimated from Keough and Chernoff (1987).

Chapitre III :

Microstructure spatiale et inférences sur la dispersion efficace au sein d'un site naturel colonisé par *Undaria pinnatifida*

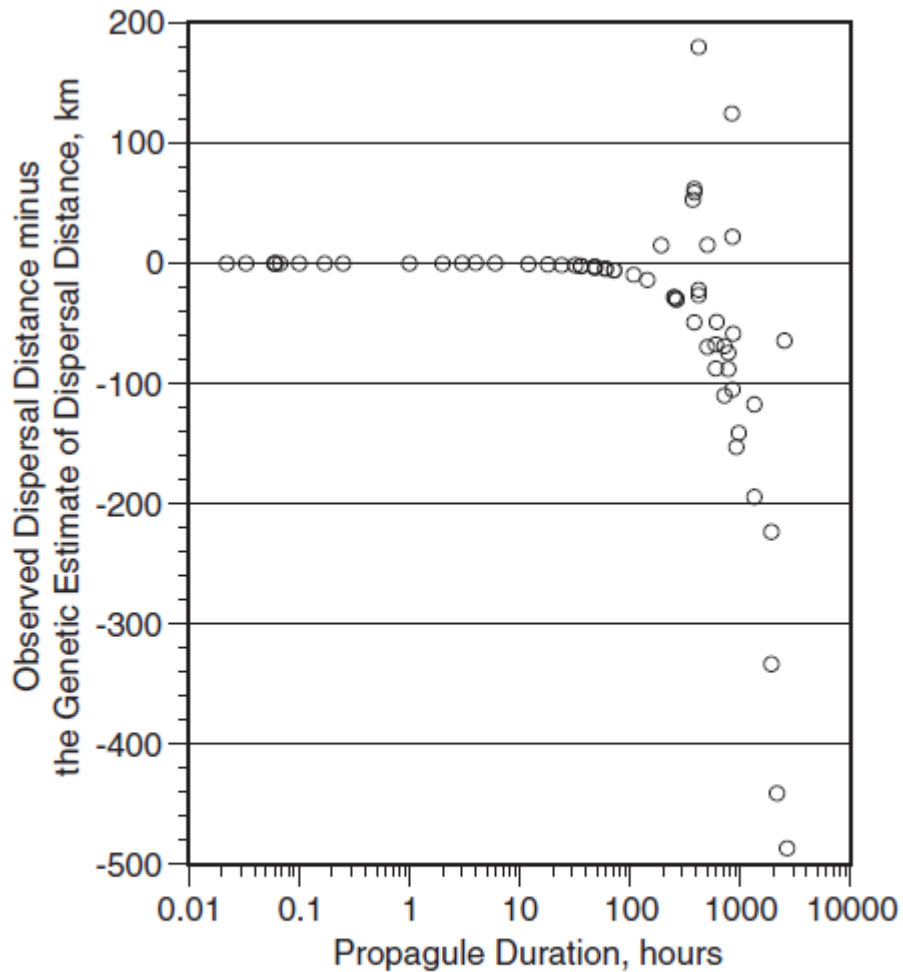
III. 1. Introduction : potentiel de dispersion et dispersion réalisée

Les études menées dans les deux chapitres précédents ont montré l'existence de limites aux flux de gènes et une migration importante à l'échelle d'une région (la Bretagne, Chapitre I) voire d'une baie (la Baie de St-Malo, Chapitre II) chez l'espèce *U. pinnatifida* introduite en Bretagne, il y a une trentaine d'années. Considérant l'histoire de son introduction initiale (caractérisée par une source commune : les populations cultivées en Asie) et les fortes interactions qu'*U. pinnatifida* continue à avoir avec les activités humaines (notamment par la culture et la colonisation de sites anthropisés), ces limites aux flux de gènes étaient inattendues. En revanche, les schémas observés de mosaïque locale peuvent être mis en relation avec les traits d'histoire de vie de cette espèce, notamment par le caractère annuel et la faible durée de vie des spores dispersantes.

Au cours des chapitres précédents, nous avons rappelé que la dispersion est un processus critique en écologie et en évolution, déterminant les processus démographiques autant que les interactions inter-spécifiques (Roughgarden et al. 1988; Ronce 2007). Chez les organismes marins sessiles adultes, cette dispersion est le plus souvent réalisée par des phases dispersives microscopiques (les « propagules ») telles que les larves des invertébrés marins ou les spores des macro-algues. Les durées de vie de ces phases dispersives sont très variables entre les organismes (de quelques minutes à plusieurs mois, Tableau III.1). Des corrélations entre la durée de vie de ces phases libres dans la colonne d'eau et les distances de dispersion ont été proposées en utilisant des estimateurs de distances de dispersion très variables, certaines basées sur l'observation, l'expérimentation ou les données génétiques (voir par exemple la revue de Shanks (2009) pour laquelle les estimateurs sont donnés dans le Tableau III.1 (mais voir également Shanks et al. 2003 ; Siegel et al. 2003 ; Kinlan & Gaines 2003). A noter que la plupart de ces travaux ont été conduits sur des invertébrés marins et seulement de façon marginale chez les macro-algues (voir tableau III.1 assez représentatif de ce fait). Dans

l'étude de ces corrélations, les estimateurs de distances de dispersion utilisés ne prennent pas toujours en compte la phase d'établissement des propagules conduisant au recrutement et à leur participation à la reproduction de la nouvelle génération (*i.e.* la connectivité reproductive selon la définition de Pineda et al. (2007)). La notion de connectivité reproductive se rattache au concept de distances de dispersion efficace telle qu'elle est estimée par les outils de la génétique des populations qui, en mesurant les flux de gènes entre des populations d'individus adultes, intègrent ces différentes étapes de transport, de recrutement et de reproduction locale. Les données de génétique des populations utilisées pour l'analyse des distances de dispersion ont longtemps été basées sur des études populationnelles et l'utilisation de modèles dérivés du test d'isolement génétique par la distance géographique (Palumbi 2003; Kinlan & Gaines 2003). Cependant l'utilisation de ces données et de ces modèles pour estimer les corrélations entre les distances de dispersion et la durée de vie pélagique a été largement critiquée (voir notamment Weersing & Toonen 2009).

Malgré le fait que la variabilité intra-spécifique de la durée de vie pélagique est insuffisamment prise en compte dans ces études, une critique majeure est que les estimateurs génétiques utilisés ont été obtenus dans le cadre d'étude populationnelle avec des effets historiques interagissant et brouillant les effets dus aux processus de transports et de démographies jouant sur l'échelle d'une génération. Dans sa revue, Shanks (2009) montre néanmoins que les estimations des distances de dispersion inférées avec des approches génétiques sont globalement similaires à celles obtenues avec des données d'observations directes pour des espèces ayant des phases de dispersion à courte durée de vie (de l'ordre d'une dizaine d'heure ; Figure III.1). Dans ces conditions, les distances de dispersion estimées sont courtes quelque soit la méthode choisie (de l'ordre du mètre ou du kilomètre). De plus, grâce à l'émergence de récents développements théoriques, des inférences génétiques de la dispersion efficace à petite échelle spatio-temporelle (*i.e.* comparaisons entre parents et descendants ou entre cohortes) sont à présent réalisables par le biais de différentes méthodes (pour revue voir Broquet & Petit 2009) permettant de s'affranchir des effets historiques et d'analyser les flux de gènes « contemporains ».



Propagule duration (PD) plotted with the difference between the observed dispersal distances minus dispersal distances calculated using the observed PDs and a regression equation relating PDs to dispersal distances calculated from genetic data (Siegel *et al.*, 2003).

Figure III.1 : Représentation du différentiel entre les distances de dispersion observées et estimées avec des données génétiques en fonction de la durée de vie des propagules.

Cette figure suggère une adéquation relativement bonne dans le cas des espèces dont les durées de vie de la phase dispersive (ex. spores des macroalgues) est courte. En revanche les estimateurs génétiques semblent de piètre qualité pour les espèces avec des phases de dispersion à longue durée de vie (ex. larves vivant plusieurs semaines chez les invertébrés marins).

Figure issue de Shanks (2009)

Ces nouvelles méthodes sont notamment celles de la « génétique du paysage » qui s'appuie sur des statistiques bayésiennes (Manel et al. 2005) ou des modèles d'isolement par la distance développés au niveau individuel (Rousset 2000). Ce dernier modèle permet en particulier d'estimer des distances de dispersion « parent-descendance » sur la base de génotypes multilocus, de la position géographique et de la densité *in situ* de la population établie. Rousset (2000) a montré que le produit du taux de dispersion et de la densité efficace, la taille de voisinage au sens de Wright (1943) peut être estimé avec des méthodes génétiques utilisées à l'échelle individuelle. Ces méthodes ont été largement utilisées dans le milieu terrestre notamment chez les plantes mais restent encore marginales en milieu marin (voir cependant Ledoux et al. (2010) pour une étude récente sur le corail rouge). Les avantages de l'approche individuelle comme unité opérationnelle sont ainsi de pouvoir mener des études à une échelle plus fine ainsi que d'éviter les biais potentiels dans l'identification des populations (Manel et al. 2003).

Dans le cadre de l'étude des espèces introduites, quantifier les distances de dispersion efficaces (*i.e.* dispersion réalisée telle qu'on peut la mesurer par les flux de gènes) est un élément fondamental pour comprendre les éléments déterminants du maintien local et de l'expansion progressive d'une espèce introduite. De plus, les méthodes indirectes par les outils et les méthodes génétiques mentionnées plus haut s'avèrent particulièrement pertinentes pour les organismes à cycle benthopélagique et en particulier les macroalgues. L'étude directe de la phase pélagique (spores) s'avère en effet difficile voire impossible du fait de leur petite taille ($< 100\mu\text{m}$) et de l'absence de critères phénotypiques diagnostiques de reconnaissance spécifique. Par ailleurs, les estimations de la durée de vie des spores menées jusqu'alors, y compris concernant notre modèle d'étude, reposent essentiellement sur des approches en laboratoire qui rendent très peu compte des stress et des perturbations environnementales pouvant influencer la survie, la fixation et la germination des spores. Chez *U. pinnatifida*, les études expérimentales ont également montré une grande variabilité de la survie des spores (quelques minutes à quelques heures ; Suto 1950 ; Forrest et al. 2000). Enfin, à l'instar de ce qui a été observé chez d'autres macro-algues (ex. *Macrocystis pyrifera*, Macaya et al. 2005), d'autres vecteurs de dispersion, en particulier des thalles matures dérivants, pourraient interférer sur les distances de dispersion réalisées dans le milieu. Chez *U. pinnatifida*, Forrest et al. (2000) montrèrent sur les côtes de Tasmanie que les sporophytes étaient ainsi capables de se disperser à quelques centaines de mètres voire quelques kilomètres de la population source. De tels événements seraient susceptibles de créer des événements plus ou moins fréquents de dispersion à longue distance dans un schéma général de dispersion

à courte distance, et donc une bi-modalité des courbes de distribution des distances de dispersion depuis une population source.

Je me suis ici intéressée à la microstructure spatiale de la distribution de la diversité génétique au sein de deux populations établies en milieu naturel rocheux. *U. pinnatifida* étant une espèce annuelle, nous avons pu réaliser, dans le cadre de cette thèse, l'étude sur deux années successives et donc deux générations différentes. Afin de déterminer les distances de dispersion réalisées à l'échelle d'un site, j'ai mené une étude à l'échelle individuelle grâce à des cartographies des individus obtenues sur le terrain par GPS différentiel et l'obtention de leur génotype multilocus qui ont ensuite été utilisés pour estimer des tailles de voisinage et décrypter des structures locales d'apparentement génétiques.

III. 2. Matériels & Méthodes

III.2.1. Sites d'étude, mesures et échantillonnage

Cette étude a été effectuée dans deux sites de Bretagne Nord (France), séparé de 250 km : le site du Breac'h Ver à l'Aber Wrac'h (BV; 48°39'45.66''N, 2°00'17.25''W ; Figure III.2-A) et le site du Rocher des Thermes dans la Baie de St-Malo (RT; 48°36'37.78''N, 4°35'22.70''W ; Figure III.2-B). Dans les deux sites, *U. pinnatifida* est établie depuis 20-30 ans. Son établissement dans les milieux naturels fait suite à l'implantation de fermes de wakamé en 1989 et 1983, respectivement dans l'Aber Wrac'h et la Baie de St-Malo (Estuaire de la Rance). Dans les deux sites d'étude, la distribution actuelle d'*U. pinnatifida* est importante (Chapitre 1, I.2, Figure 1 pour l'Aber Wrac'h et Chapitre 2, II.2, Figure 1 pour la Baie de St-Malo). De nombreuses populations spontanées sont établies dans les habitats rocheux. L'expansion de cette algue dans le milieu naturel est certainement due originellement à des échappées des fermes. Depuis 2002, la ferme de l'Aber Wrac'h a stoppée son activité. Par contre, la concession de la Baie de St-Malo est toujours en activité et gérée par la compagnie C-Weed Aquaculture.

U. pinnatifida est une espèce annuelle, caractérisée par un à deux événements de reproduction par an en Bretagne Nord. Le plus important ayant lieu au Printemps (Mars-Mai), le second, marginal, en Automne (Septembre-Octobre).

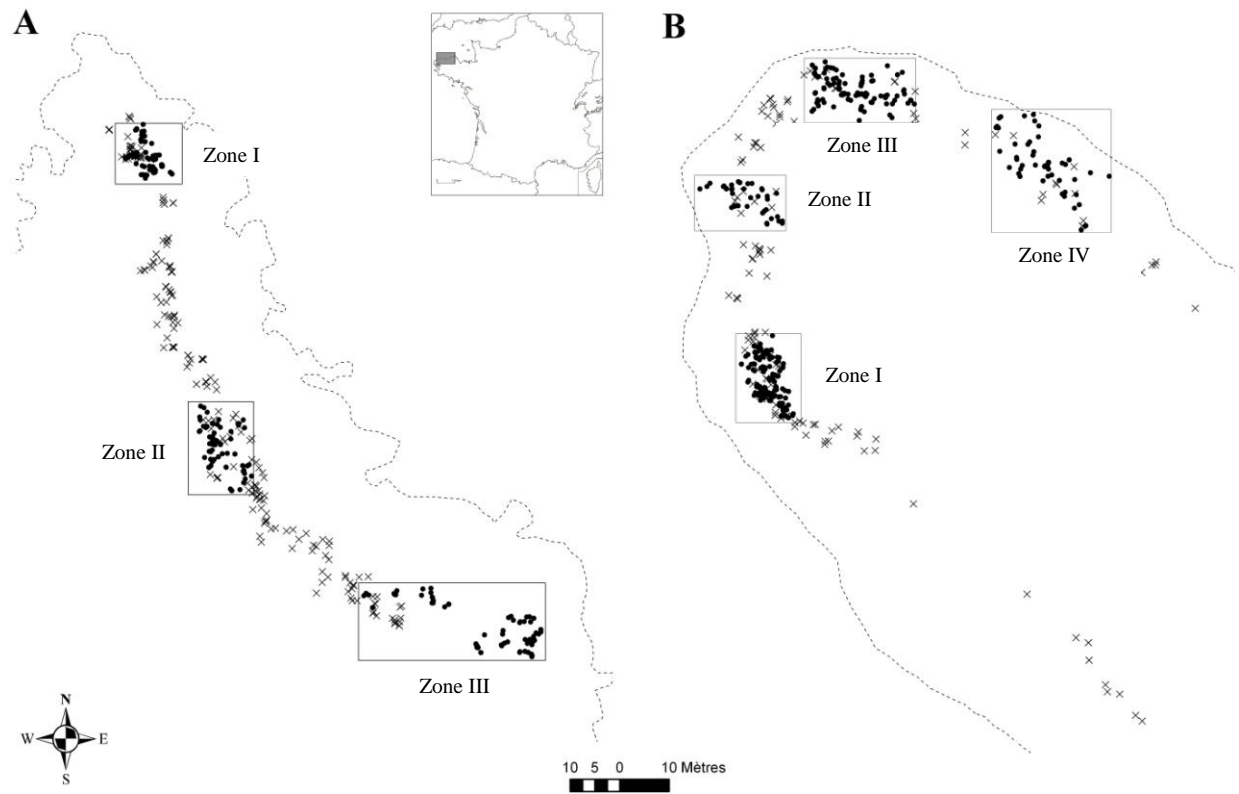


Figure III.2: Distribution des individus échantillonnés sur les deux sites étudiés : (A) Breac'h Ver et (B) Rocher des Thermes.

Les positions spatiales des individus échantillonnés en 2007 sont indiquées par des ronds noirs et ceux de 2008 par des croix. La ligne pointillée représente le zéro marin. Les détails concernant le nombre d'individus échantillonnés par année sont indiqués dans le tableau III.2

Le développement des sporophytes est très rapide puisqu'ils atteignent la maturité sexuelle en l'espace de deux mois (M. Voisin & F. Viard., données non publiées). Les relevés et les échantillonnages ont été réalisés sur deux années consécutives en Mars-Avril 2007 et 2008. Compte-tenu de la faible distance de dispersion de l'espèce étudiée (*i.e.* 10m pour les spores ; Forrest et al. 2000 ; Suto 1950), l'échantillonnage a été conduit sur une échelle spatiale d'environ 100m.

La distribution d'*U. pinnatifida* sur l'estran est comprise entre + 2.5m et -0.7m. Vu le niveau bathymétrique, seuls quelques jours dans l'année, lors des grandes marées de vives eaux (*i.e.* coefficients > 110), permettent d'effectuer un travail sur site à pied. Lors de ces sessions de terrain (une par site et par an), nous avons mesuré la longueur de stipe et la longueur totale des individus d'*U. pinnatifida* supérieurs à 5cm et leur degré de développement a été noté. Ce dernier était classé selon trois catégories : 0 = pas de sporophylle (individus non matures appelés « jeunes » dans la suite du texte), 1 = apparition du sporophylle et 2 = sporophylle largement développé; (1 et 2 sont des individus sexuellement matures). La position spatiale de chaque individu a été enregistrée en utilisant un GPS différentiel (Trimble® GeoXH™ portable, GeoExplorer® série 2007), équipé d'une antenne externe Zephyr™ Trimble (L1/L2) nous permettant d'obtenir une haute précision dans la cartographie des individus sur le terrain (ex. un centimètre de précision par session d'enregistrement) afin d'effectuer ultérieurement des analyses spatiales précises. Finalement, un petit bout de tissu a été coupé et mis dans un sac de silicagel pour des analyses génétiques ultérieures. Différentes stratégies d'échantillonnage ont été utilisées en 2007 et 2008. En 2007, avec l'aide de nombreux volontaires, nous avons réalisé un échantillonnage de type systématique hiérarchisé pour être représentatif de la diversité génétique globale et de la distribution de l'espèce sur les deux sites. Un échantillonnage exhaustif des individus a été mené dans des zones délimitées sur le terrain : trois au Breac'h Ver (BV) (Figure III.2-A) et quatre au Rocher des Thermes (RT) (Figure III.2-B). Une estimation très précise de la densité a pu être réalisée du fait de cet échantillonnage exhaustif et d'une estimation de la superficie couverte grâce aux relevés des limites de la zone effectuée par GPS différentiel (précision de l'ordre du centimètre). Cependant, ce choix de modalités d'échantillonnage ne nous a pas permis de couvrir l'intégralité du site ce qui pourrait nous avoir conduit à sur-estimer ou sous-estimer la densité moyenne sur le site. Par ailleurs, en scindant notre site d'étude en zones, nous avons créé des discontinuités dans l'échantillonnage génétique. Aussi afin de pallier ce défaut, nous avons choisi pour la seconde année d'utiliser une stratégie d'échantillonnage différente en utilisant des cadrats (0.25*0.25m) positionnés tous les 4m au sein de la ceinture

bathymétrie caractéristique d'*U. pinnatifida*. Il est à noter que les zones échantillonnées en 2007 ont été observées et échantillonnées à nouveau en 2008, avec toutefois un plus faible nombre d'individus.

III.2.2. Obtention des données moléculaires

L'ADN de tous les individus échantillonnés a été extrait et amplifié à l'aide de 10 loci microsatellites comme décrits dans les chapitres précédents, selon le protocole de Daguin et al. (2005). A noter que la visualisation des génotypes a été réalisée avec le séquenceur à plaque de type LiCor 4200 pour les échantillons de 2007 et avec le séquenceur ABI pour ceux de 2008.

III.2.3. Analyses des phénotypes et de la distribution spatiale

Des analyses de régression linéaire ont été réalisées pour tester la corrélation entre la longueur du stipe et la longueur totale pour chaque site et zone. Les différences de longueur (du stipe et totale) entre les deux sites (BV et RT) ainsi qu'entre les classes d'âge (« jeunes » versus individus de maturité sexuelle 1 et 2) ont été analysées avec un test de Mann Withney grâce au logiciel MINITAB 13.

Afin de déterminer le type de distribution (agrégée, régulière ou aléatoire) des individus au sein des zones étudiées en 2007 sur les deux sites, une analyse statistique de voisinage de « second ordre » a été réalisée. Cette méthode est détaillée dans l'encadré III.1. A partir des données récoltées avec les cadrats, des indices de dispersion ont été calculés pour l'année 2008 sur les deux sites selon la méthode décrite dans l'encadré III.2.

III.2.4. Analyses statistiques des données moléculaires

a) Analyse de la diversité génétique et structure intra-population

Afin d'éviter des biais dus à des mélanges entre des individus issus de différentes générations, seulement les individus non reproducteurs ont été choisis pour les analyses génétiques (N=771, sur les deux sites et les deux années). L'indépendance des 10 loci a été vérifiée par un test de déséquilibre de liaison statistique calculé entre chaque paire de loci sur l'ensemble des sites et puis sur chacun des sites à l'aide du logiciel GENEPOP v4.0.7 (Raymond & Rousset 1995).

Encadré III.1 :

Analyses de voisinage de second ordre (cas à deux dimensions)

Tiré et modifié de Rosenberg (2009)

Les analyses de voisinage de second ordre sont parmi les analyses les plus communément utilisés pour étudier la distribution spatiale de points, en particulier avec l'utilisation de la fonction K de Ripley (Ripley 1976). Cette fonction est une mesure du nombre moyen de points, trouvés à l'intérieur de cercles de rayon croissant d , centré sur chaque point, divisé par l'intensité moyenne de distribution. L'intensité moyenne λ est le nombre de points total rapporté à l'aire d'étude, $\lambda = n/A$. Le nombre moyen de points trouvés à l'intérieur des cercles divisé par λ est la valeur de $K(d)$.

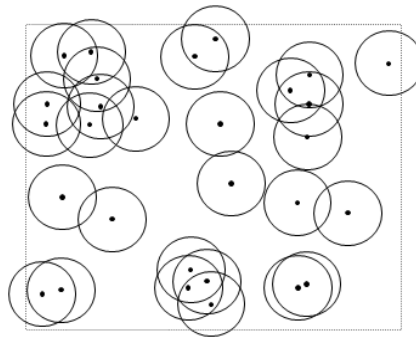


Schéma du modèle de comptage pour l'analyse de second ordre. Dans le carré qui représente le périmètre de l'étude (ex. un cadrat), chaque point est au centre d'un cercle de rayon défini ; le nombre de points dans chaque cercle est moyenné pour déterminer la valeur de K pour cette distance (i.e. rayon).

$K(d)$ est ainsi estimé par
$$\hat{K}(d) = \frac{A}{n^2} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n w_{ij} k_{ij}$$

Où A est la surface de la zone d'étude, n est le nombre total de points, w_{ij} est le poids des effets de bord, k_{ij} prend la valeur de 1 si la distance entre i et j est inférieure à la distance d ou moins, et 0 dans le cas contraire.

Si les points sont distribués aléatoirement sur la zone d'étude, le nombre attendu de points dans un cercle de rayon d est $\pi d^2 \lambda$. Par conséquent, la valeur attendue de $\hat{K}(d)$ est πd^2 .

Il existe différentes méthodes permettant de comparer la valeur observée et attendue de $K(d)$. La première consiste à les tracer sur le même graphe. Une autre méthode est de calculer la différence entre ces deux valeurs, par la fonction \hat{L} de Ripley, définie par:

$$\hat{L}(d) = d - \sqrt{\frac{\hat{K}(d)}{\pi}}$$

Les valeurs de $\hat{L}(d)$ sont égales à zéro quand les points sont distribués de manière « aléatoire », négatives pour une distribution « agrégée » et positives pour une distribution « régulière » (Dale 1999). Pour « tester » l'hypothèse H_0 d'une distribution de Poisson (aléatoire), l'intervalle de confiance à 95% est calculé.

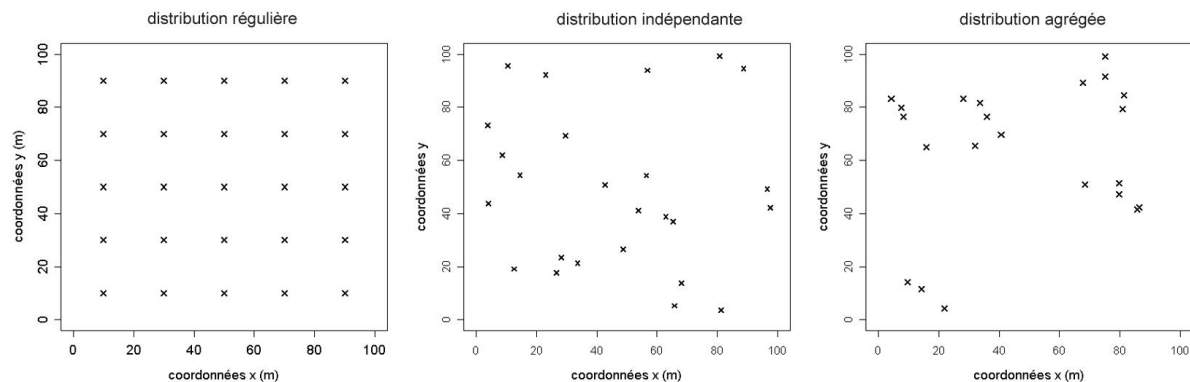
Encadré III.2 :

Distribution spatiale des individus et indices de dispersion

Tiré de Frontier et al. (1990)

En écologie, un des problèmes-clés est de comprendre comment les individus sont distribués dans un espace donné (transect, espace à deux dimensions, à trois dimensions, etc)

Les individus peuvent être distribués dans l'espace de plusieurs façons représentées graphiquement dans les trois petites figures ci-dessous.



Une structure (ou distribution) régulière est caractérisée par des individus distribués avec le même écartement, les uns par rapport aux autres.

Une structure aléatoire correspond à une situation sans structure spatiale où la position des individus peut être à n'importe quelle distance de son voisin le plus proche. Le nombre des individus dans l'espace ne dépendra que de la superficie (selon un processus de Poisson). La distribution est uniforme : chaque individu aura la même probabilité d'être placé dans n'importe quel point de l'espace considéré.

Enfin, les individus peuvent aussi avoir une structure spatiale agrégée dans l'espace.

Il est important de noter que le type de structure dépend en partie de l'échelle à laquelle on travaille.

Afin de déterminer le type de distribution spatiale des individus, le calcul de l'indice de dispersion (ou indice de variance relative de Fisher et al. (1922) est souvent utilisé: l'espace est alors partagé en une série de n cadrats de taille constante caractérisé par le nombre d'individus présents dans chacun de ces cadrats.

Soit X la moyenne observée du nombre d'individus par cadrat et S^2 sa variance observée, l'indice est calculé par :

- Si $I_{dispersion} > 1$, la structure spatiale est agrégée,
- Si $I_{dispersion} \cong 1$, la structure spatiale est aléatoire
- Si $I_{dispersion} < 1$, la structure spatiale est régulière.

$$I_{dispersion} = \frac{S^2}{X}$$

On peut tester cette valeur, afin de savoir si la distribution des individus est aléatoire ou non. La valeur $I_{dispersion} (n - 1)$ suit approximativement une loi de χ^2 à $n - 1$ degrés de liberté.

On rejettera l'hypothèse nulle (H_0 : pas de structure spatiale, définie par une structure spatiale complètement aléatoire), avec un risque $\alpha = 0.05$ dans les deux cas suivants :

- Cas 1 : $I_{dispersion}(n-1) < q_{(n-1ddl ; 0.025)}$, la structure spatiale sera considérée comme plutôt régulière.
- Cas 2 : $I_{dispersion}(n-1) < q_{(n-1ddl ; 0.975)}$, la structure spatiale sera considérée comme plutôt agrégée.

Les indices de diversité génétique (N_{all} , H_o , H_e et R_{all}) et de structure intra-population (F_{is}) ont été estimés, comme décrit dans les articles présentés dans le chapitre I et II, pour chaque site et chaque zone.

b) Analyses de la structure génétique

Des analyses de structure génétique entre sites ont été effectuées à l'aide du calcul des estimateurs de l'indice F_{ST} et de tests exacts comme décrit dans le chapitre I et II.

Compte tenu du schéma de l'échantillonnage hiérarchique réalisé en 2007, des analyses similaires ont également été réalisées entre zones en 2007. De plus, une analyse hiérarchique de la variance moléculaire (AMOVA) a été réalisée afin d'étudier comment la variance génétique se distribue entre les zones au sein des sites (F_{sc}) et entre les zones (F_{ct}), à l'aide du logiciel Arlequin V.3.1 (Schneider et al. 2000). Enfin, des tests d'assignations individuelles ont été réalisés en utilisant le logiciel GENECLASS v.2.0 (Piry et al. 2004) en utilisant les zones comme « populations » de référence. La méthode utilisée est une approche bayésienne basée sur la méthode de Rannala & Mountain (1997). Cette méthode permet ici d'estimer la proportion d'individus assignés à une zone externe à celle où ils ont été échantillonnés. Si la dispersion est limitée à une échelle locale, et inférieure à la surface d'une zone (environ 20m), les proportions des individus correctement assignés à leur zone d'origine devraient être élevées.

Les méthodes présentées plus haut utilisent toutes un *a priori* sur la distribution de la structure génétique spatiale en unité spatiale (« population »). En utilisant la position spatiale de chaque individu, obtenue par la cartographie construite à partir des relevés par GPS différentiel, une analyse de génétique du paysage a été effectuée, sur les données obtenues en 2007 et en 2008, afin de détecter la structure génétique spatiale au sein des deux sites sans *a priori* de regroupement en unités populationnelles, à l'aide de la méthode utilisée dans le logiciel GENELAND (Guillot et al. 2005a, Guillot et al. 2005b). Les proximités génétiques des individus peuvent être analysées même avec un faible niveau de différenciation génétique (Guillot et al. 2008). Comme dans le cas des analyses réalisées avec le logiciel STRUCTURE présentées dans les chapitres précédents, la première étape de l'analyse conduite ici est d'inférer le nombre de populations (K) qui explique le mieux la variance génétique globale du jeu de données. Pour réaliser cette inférence, des simulations ont été réalisées en faisant varier le nombre de sous-populations de 1 à 10 (50 000 itérations MCMC) sous un modèle de fréquences corrélées. K est déterminé sur la base de la plus forte probabilité de vraisemblance obtenue parmi l'ensemble des simulations effectuées. Ensuite, la probabilité postérieure

d'appartenance de chaque individu assigné à chacun des groupes détectés est calculée pour chaque pixel du domaine spatial étudié, ici les sites (pour le BV (60*100 pixels) et pour le RT (105*125 pixels)). Cette analyse a été effectuée séparément pour les deux années afin de comparer la répartition des groupes entre les années au sein de chaque site.

Enfin, la distribution spatiale des allèles dans les populations BV et RT pour chaque année a été évaluée par l'indice de Moran sur l'ensemble des locus (Moran 1950 ; Sokal & Oden 1978). Cet indice est calculé avec le logiciel "Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity" (Spagedi 1.1; Hardy & Vekemans 2002). L'indice de Moran décrit la corrélation génétique pour chaque allèle séparément entre toutes les paires d'individus à une distance géographique précise (à l'intérieur d'un intervalle de distance géographique particulier ou un intervalle de classe). Les classes de distances ont été définies en prenant un nombre égal de paires d'individus (Peakall et al. 2003) pour les deux sites et pour chaque année. L'indice statistique est représenté sous forme d'un auto-corrélogramme. Il varie de -1 (autocorrélation spatiale négative: les voisins ont des valeurs opposées) et + 1 (autocorrélation spatiale positive: les voisins ont des valeurs similaires) (Sokal & Oden 1978). A cet indice, on associe un test exact, dont l'hypothèse nulle est que la valeur de l'indice de Moran calculé sur chaque classe de distances est identique à celles des autres classes de distances (procédure par permutations) (Manly 1997).

c) Taille de voisinage et estimation des distances de dispersion efficaces

Un isolement par la distance (IBD) se produit lorsque la différenciation génétique entre les individus augmente avec la distance géographique (Wright 1951). En accord avec ce modèle, la taille de voisinage (Nb) peut être estimée à partir de la densité de la population et le taux moyen de dispersion axiale (par génération) entre parents et descendants (σ^2 ; la distance axiale entre le lieu de naissance d'un individu et celui de ces descendants au carré, Rousset 1997). Rousset (2000) et Watts et al. (2007) ont montré par les statistiques " a_r " et " e_r ", qui sont des estimateurs multilocus de la distance génétique entre paires d'individus et sont linéairement corrélés au logarithme de la distance géographique dans un espace à deux dimensions. Les droites de régression entre les distances génétiques et géographiques ont été obtenues et les intervalles de confiance à 95% calculés en utilisant une procédure non paramétrique (ABC bootstrap) de DiCiccio & Efron (1996) avec le logiciel GENEPOP v4.0.7 (Rousset 2008b).

L'inverse de la droite de régression a été ensuite utilisée pour estimer la taille du voisinage (nombre d'individus liés par de fortes interactions) et la déviation standard de la

distance de dispersion (σ) selon l'équation suivante ($Nb = 4\pi D_{NR}\sigma^2$; Rousset 1997). Pour calculer les distances de dispersion et la taille de voisinage, il est nécessaire d'avoir un estimateur de la densité effective (D_{NR}). J'ai utilisé les estimations de la densité de la population obtenue sur le terrain pour chaque site et pour chaque année (et chaque zone en 2007). L'estimateur " a_r " a été calculé quand la dispersion était restreinte ($\sigma \pm 2$) et la taille de voisinage inférieure à 50 (dans un domaine à deux dimensions) afin d'obtenir une meilleure estimation (Watts et al. 2007). L'estimateur " a_r " a donc été utilisé dans 9 cas sur 11. Suivant les recommandations de Leblois et al. (2000) et Watts et al. (2007), l'estimateur " e_r " a été calculé dans les autres cas.

III.3. Résultats

III.3.1 Distribution, densité et caractéristiques individuelles

Un total de 1021 individus a été échantillonné sur les deux années et les deux sites (Tableau III.2). En 2007, au Breac'h Ver (BV), 285 individus ont été collectés sur 3 zones, totalisant une superficie de 416.07m² et au Rocher des Thermes (RT), 384 individus ont été collectés sur 4 zones représentant une surface de 725.65m². Les densités obtenues sont de 1.6, 0.83 et 0.41 ind.m⁻² respectivement pour les zones I, II & III au BV et 1.11, 0.37, 0.57 et 0.22 ind.m⁻², respectivement pour les zones I, II, III & IV au RT. La répartition des individus est pour toutes les zones agrégées. En 2008, 218 et 134 individus ont été collectés sur une aire de 798.23 m² et 1464.1 m² pour BV et RT. La densité a été évaluée par cadrats : avec 37 individus observés sur 24 cadrats (de 0.25m²), la densité de population d'*U. pinnatifida* est de 6.167 ind.m⁻² pour le BV. Sur le site RT, seulement 3 individus ont été comptabilisés sur 52 cadrats (0.25m²). Ainsi, la densité est estimée à 0.231 ind.m⁻². La distribution des individus a été caractérisée d'aléatoire dans les deux sites d'étude pour 2008.

Tableau III.2 : Effectifs échantillonnés, estimateurs de densité et statut de maturité sexuelle

N: Nombre d'individus échantillonnés; Surf.: surfaces d'échantillonnage en mètre carré ; D_{NR}: densité en individus non reproducteurs (nombre par mètre carré); D_R: densité en individus reproducteurs; % Ind_{NR}: pourcentage d'individus non reproducteurs; % Ind_R: pourcentage d'individus reproducteurs.

Site	Année	Zone/Site	N	Surf (m ²)	D _{NR}	D _R	% Ind _{NR}	% Ind _R
Rocher des Thermes	2007	Zone I	165	148.60	0.666	0.444	60.00%	40.00%
		Zone II	47	127.28	0.236	0.134	63.83%	36.17%
		Zone III	112	186.86	0.428	0.171	71.43%	28.57%
		Zone IV	60	262.91	0.141	0.087	61.67%	38.33%
		Site	384	725.65	0.339	0.190	64.06%	35.94%
	2008	Site	134	1464.1	0.087	0.006	94.03%	5.97%
Breach Ver	2007	Zone I	90	56.34	1.402	0.195	87.78%	12.22%
		Zone II	93	111.42	0.754	0.081	90.32%	9.68%
		Zone III	102	248.31	0.375	0.036	91.18%	8.82%
		Site	285	416.07	0.615	0.070	89.82%	10.18%
		2008	Site	218	798.23	0.179	0.094	68.42%
Deux sites	Deux ans	Total	1021	3386.05				

Le pourcentage d'individus non reproducteurs varie de 64.06% à 94.03% selon les sites et les années (Tableau III.2). En 2007, un nombre d'individus non reproducteurs plus important est observé, ce qui est vraisemblablement dû à une différence d'un mois de la période d'échantillonnage entre les deux années. Le pourcentage d'individus non reproducteurs est en revanche très similaire entre les zones pour un site donné (Tableau III.2). La longueur du stipe et la longueur totale sont significativement corrélées, quelque soit le site et l'année. Les longueurs sont plus élevées au site BV qu'au site RT bien que la différence ne soit pas significative (longueur totale : en 2007, P=0.665; en 2008, P=0.885). Les tests de Mann-Whitney montrent comme attendu que la longueur du stipe (P=0.0013) et la longueur totale (P=0.0002) sont significativement plus grande chez les individus reproducteurs (stade 1 et 2) que chez les individus non reproducteurs (stade 0). De même, une relation significative est montrée entre le stade de développement (0, 1 ou 2) et la longueur totale (test Kruskal-Wallis, $P < 10^{-4}$ pour chaque site et année).

III.3.2 Diversité génétique intra-site et entre zones et adéquation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg

Un total de 771 individus non reproducteurs a été génotypé sur les deux sites et les deux années d'échantillonnage. Après une correction de Bonferroni pour des tests multiples, il n'y a pas d'évidence de déséquilibre de liaison au sein des sites et sur les deux années. Le nombre d'allèles par locus varie de 2 pour le locus 4C12 et 1H5 à 7 pour le locus 2E8. La richesse allélique et l'hétérozygotie attendue étaient d'un niveau similaire quelque soit le site ou l'année, variant respectivement de 2.4 à 3.5 et de 0.31 à 0.39, (Tableau III.3).

Tableau III.3: Diversité génétique obtenue avec 10 loci microsatellites pour chacun des sites et des années étudiées

N: Nombre d'individus analysés; N_{all} : Nombre moyen d'allèles par locus; R_{all} : richesse allélique; H_o : hétérozygotie observée; H_e : hétérozygotie attendue; F_{IS} : coefficient de consanguinité. Les écarts significatifs aux proportions attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg sont notes de la façon suivante: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; *; $P < 0.05$.

Site	Année	N	N_{all}	R_{all}	H_o	H_e	F_{is}
Rocher des Thermes	2007	246	3.60	3.42	0.339	0.387	0.124***
	2008	126	3.50	3.50	0.368	0.386	0.050
Breac'h Ver	2007	256	2.50	2.44	0.266	0.310	0.141***
	2008	143	2.50	2.49	0.287	0.346	0.172***
Deux sites	2 ans	771	3.90	3.90	0.310	0.375	0.175***

Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas de diminution marquée des estimateurs de la diversité génétique quand ils sont calculés au sein des zones (Tableau III.4) par rapport aux valeurs observées au niveau du site en 2007, en particulier au site BV. Considérant chaque site séparément, les estimations de diversité génétique sont très stables sur les deux années d'observation (correspondant à des générations différentes), et ce malgré une plus grande couverture spatiale d'échantillonnage en 2008. Par exemple, l'hétérozygotie attendue est similaire (0.39) au site RT et très proche au site BV (0.31 en 2007 et 0.35 en 2008). Excepté au site RT en 2008, un déficit en hétérozygotes significatif a été détecté au niveau du site. Il est à noter que lorsqu'on examine de plus petites surfaces (zones), ce déficit en hétérozygotes n'est plus présent au site BV ainsi que dans la zone II du RT. Cela suggère qu'une partie des écarts aux proportions génotypiques attendues sous l'équilibre d'Hardy-Weinberg peut être

expliquée par des effets Wahlund (*i.e.* mélange entre sous-groupes génétiquement différenciés).

Tableau III.4: Diversité génétique et structure intra-zone dans la population du Rocher des Thermes et du Breac'h Ver en 2007

N: Nombre d'individus analysés; N_{all} : Nombre moyen d'allèles par locus; R_{all} : richesse allélique; H_o : hétérozygotie observée; H_e : hétérozygotie attendue; F_{IS} : coefficient de consanguinité. Les écarts significatifs aux proportions attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg sont notés de la façon suivante: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; *; $P < 0.05$.

Site	Zone	N	N_{all}	R_{all}	H_o	H_e	F_{IS}
Rocher des Thermes	I	99	2.90	2.74	0.355	0.386	0.084*
	II	30	2.80	2.78	0.359	0.387	0.088
	III	80	3.10	2.97	0.311	0.370	0.166***
	IV	37	3.00	2.94	0.342	0.382	0.123**
Breac'h Ver	I	79	2.40	2.10	0.259	0.281	0.077
	II	84	2.20	2.12	0.280	0.318	0.129
	III	93	2.20	2.08	0.260	0.286	0.098

III.3.3 Structure génétique entre les sites et les zones

Des différences génétiques significatives ont été observées entre les deux sites en 2007 ($F_{ST} = 0.119$, $P < 10^{-6}$) et 2008 ($F_{ST} = 0.078$, $P < 10^{-6}$), indiquant qu'il y a un flux de gènes limité à cette large échelle spatiale (*i.e.* 250km).

En 2007, la comparaison entre les zones montrent des valeurs de F_{ST} plus faibles mais significatives : $F_{ST} = 0.062$ ($P < 10^{-4}$) et 0.013 ($P = 0.002$) respectivement entre les 3 zones du site BV et les 4 zones du site RT, montrant que le flux de gènes est limité même à une très faible échelle spatiale (*i.e.* distance moyenne entre les zones égale à 15-20m). Ce patron est confirmé par les résultats de l'AMOVA montrant qu'il existe un effet significatif des sites ($F_{ct} = 0.111$, $P = 0.018$) mais également des zones au sein des sites ($F_{SC} = 0.035$; $P < 10^{-4}$) sur la structure génétique globale.

La variation spatiale entre les zones s'avère être du même ordre que la variation temporelle au sein des sites: des valeurs de F_{ST} significatives sont observées entre les échantillons des deux années au site BV ($F_{ST} = 0.012$, $P < 10^{-6}$) et au site RT ($F_{ST} = 0.013$, $P < 10^{-6}$).

a) Assignment individuelle et regroupement génétique

Les tests d'assignation ont confirmé les résultats issus des estimations de F_{ST} . Considérant la structure entre les sites, un total de 256 individus (100%) and 239 individus (97.15%) sont assignés à leur site d'échantillonnage pour BV et RT respectivement. Au niveau du site, les analyses d'assignation aux différentes zones au sein de ces sites montrent que 66.4% des individus sont correctement assignés à leur zone d'échantillonnage et aucun des individus n'est rejeté (seuil à 1%; Tableau III.5). En revanche, au site RT, seulement 41.46% des individus sont assignés sans ambiguïté aux zones où ils ont été échantillonnés et 7 individus (2.84%) sont rejetés (seuil à 1%).

Tableau III.5 : Résultat des tests d'assignation par zone (année 2007) pour chacun des sites.

La proportion d'individus classés dans chacune des zones (dont la zone d'échantillonnage de l'individu) est indiquée dans le tableau suivant. La colonne « exclu » indique la proportion d'individu qui est rejeté de chacune des zones testées.

Provenant de	Assigné à		
	BV-Zone I	BV-Zone II	BV-Zone III
BV-Zone I	0.709	0.127	0.165
BV-Zone II	0.083	0.750	0.167
BV-Zone III	0.140	0.312	0.548

Provenant de	Exclu	Assigné à			
		RT - Zone I	RT - Zone II	RT - Zone III	RT - Zone IV
RT-Zone I	0.030	0.354	0.343	0.091	0.182
RT- Zone II	0.033	0.133	0.433	0.200	0.200
RT- Zone III	0.025	0.125	0.225	0.525	0.100
RT- Zone IV	0.027	0.135	0.270	0.243	0.324

Les résultats des analyses de regroupement effectuées avec le logiciel GENELAND pour les deux sites et années sont présentés en Figures III.3 à 5 sous forme de cartes montrant la localisation des individus et leur appartenance à chacun des groupes (« clusters » identifiés). Concernant le site BV en 2007, 5 groupes différents sont identifiés (Figure III.3). La plupart des groupes (quatre sur cinq) sont composés d'individus très proches spatialement sur le terrain (rayon moyen de 5 mètres).

Par exemple les individus de la zone II sont séparés en trois groupes génétiquement différents, l'un est situé dans la partie Nord (12 ind.), un autre groupe est situé dans la partie Sud (65 ind.) et enfin le dernier groupe correspond à la partie extrême Sud de la zone (7 ind.). Le cinquième groupe possède un diamètre de 30m, c'est le seul groupe composé d'individus éloignés : 7 individus échantillonnés dans la zone II sont regroupés à la plupart des individus échantillonnés dans la zone III.

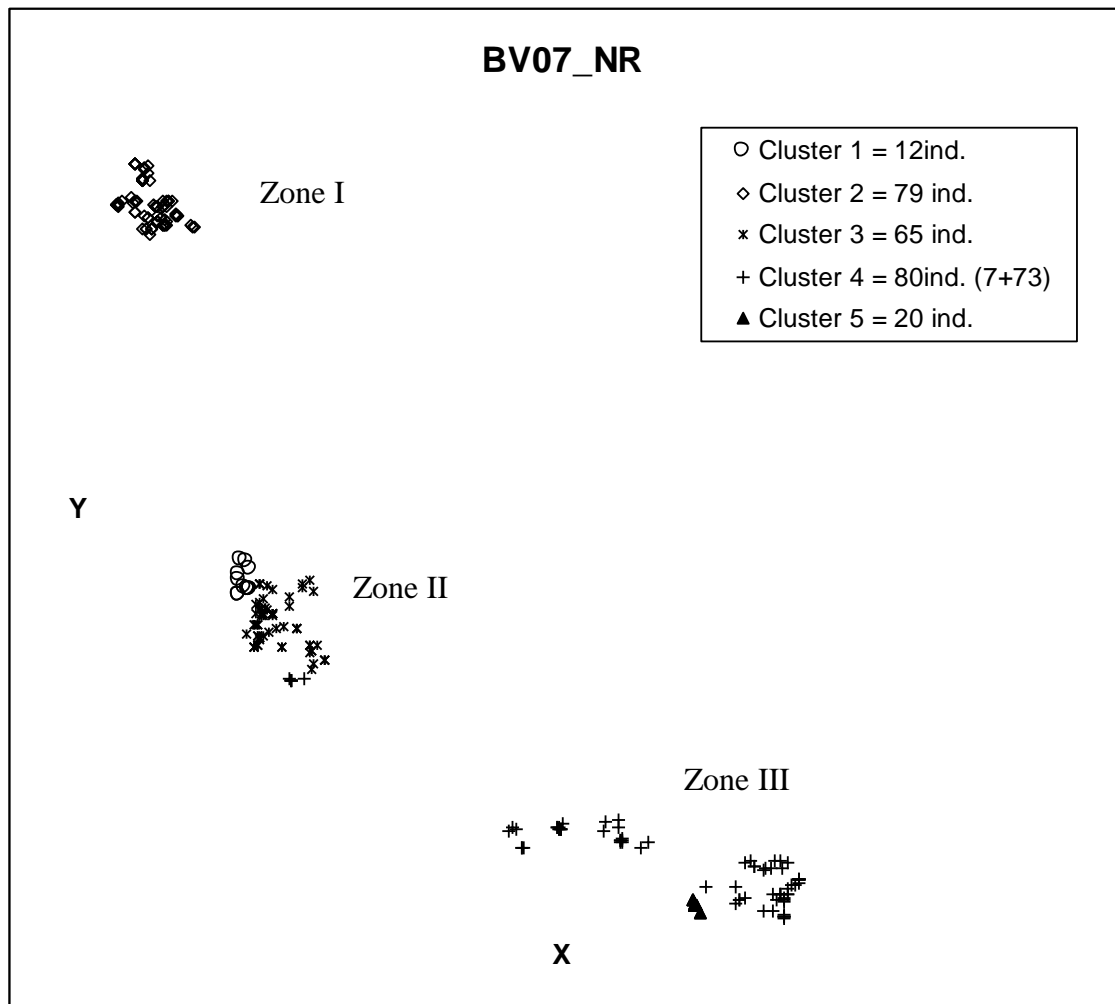


Figure III.3: Carte issue de l'analyse avec le logiciel Geneland pour le site du Breac'h Ver en 2007

Cinq groupes (clusters) ont été identifiés. Les individus se rattachant à chacun de ces groupes sont figurés par des symboles différents.

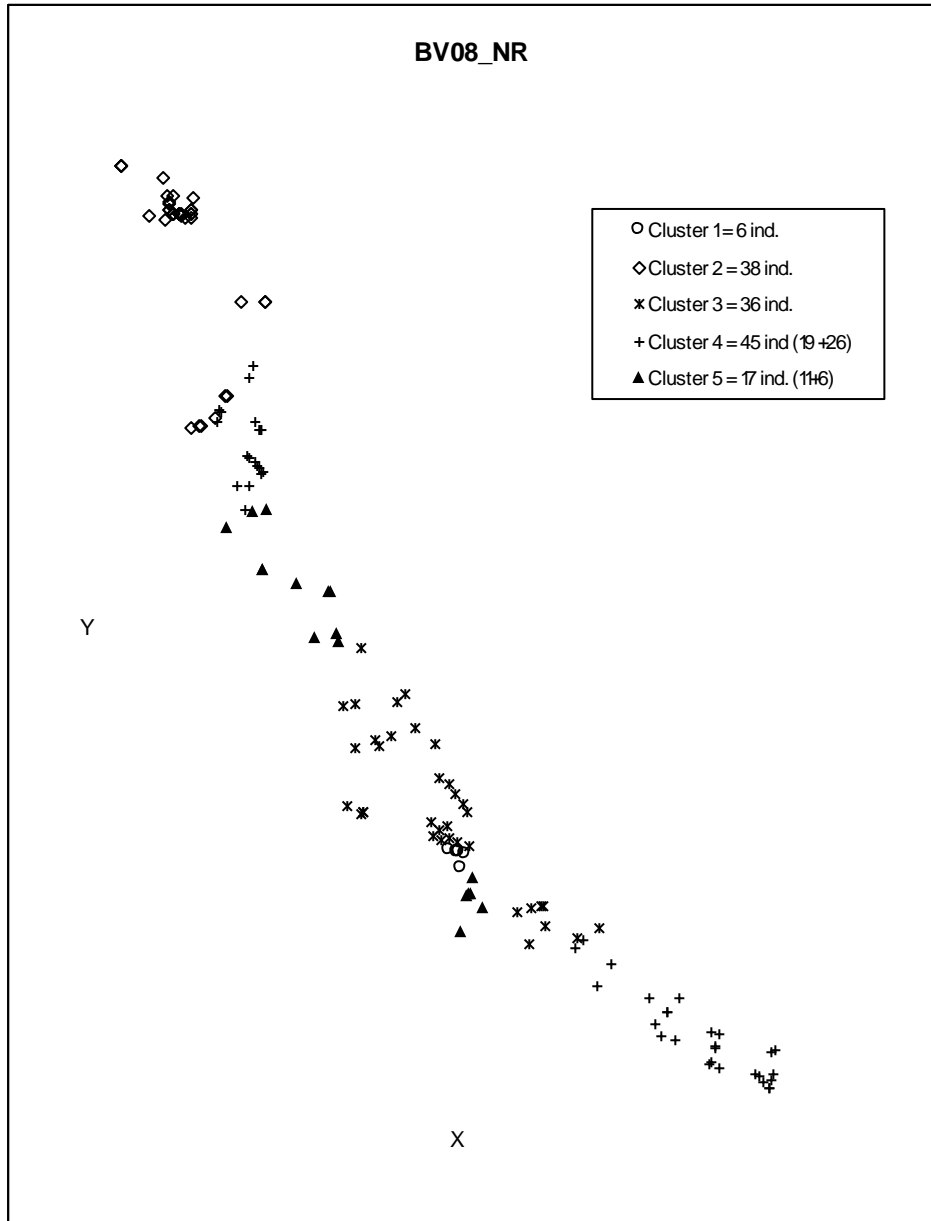


Figure III.4: Carte issue de l'analyse avec le logiciel Geneland pour le site du Breac'h Ver en 2008

Cinq groupes (clusters) ont été identifiés. Les individus se rattachant à chacun de ces groupes sont figurés par des symboles différents.

Concernant toujours le site du BV mais en 2008, on retrouve 5 groupes génétiquement différents (Figure III.4). Parmi eux, trois groupes (correspondant respectivement à 38, 36 et 6 individus) sont restreint dans l'espace (10 à 30m en diamètre). Les deux autres groupes sont chacun divisés en deux sous-groupes d'individus. Un premier groupe est composé de deux sous-groupes de 19 et 26 individus, séparés par une distance de 100 à 120m et le second est composé de deux sous-groupes de 11 et 6 individus, séparés de 25 à 40m. Cette analyse donne un résultat partiellement différent pour le site RT. En 2007, on observe comme pour le site du BV des groupes génétiques différenciés mais ils correspondent à des individus largement distribués sur le site d'étude. Par exemple, le cinquième groupe est distribué dans la zone I (53 ind.), zone II (25 ind.), zone III (72 ind.) et zone IV (4 ind.). Juste un groupe sur les cinq détectés, (correspondant à 25 ind.) a été trouvé avec des individus proches les uns des autres (rayon moyen de 10m) dans la zone IV (Figure III.5). Quant à la série de 2008, un seul groupe a été identifié suggérant une distribution totalement aléatoire de la variance génétique et sans grandes différences génétiques entre les individus.

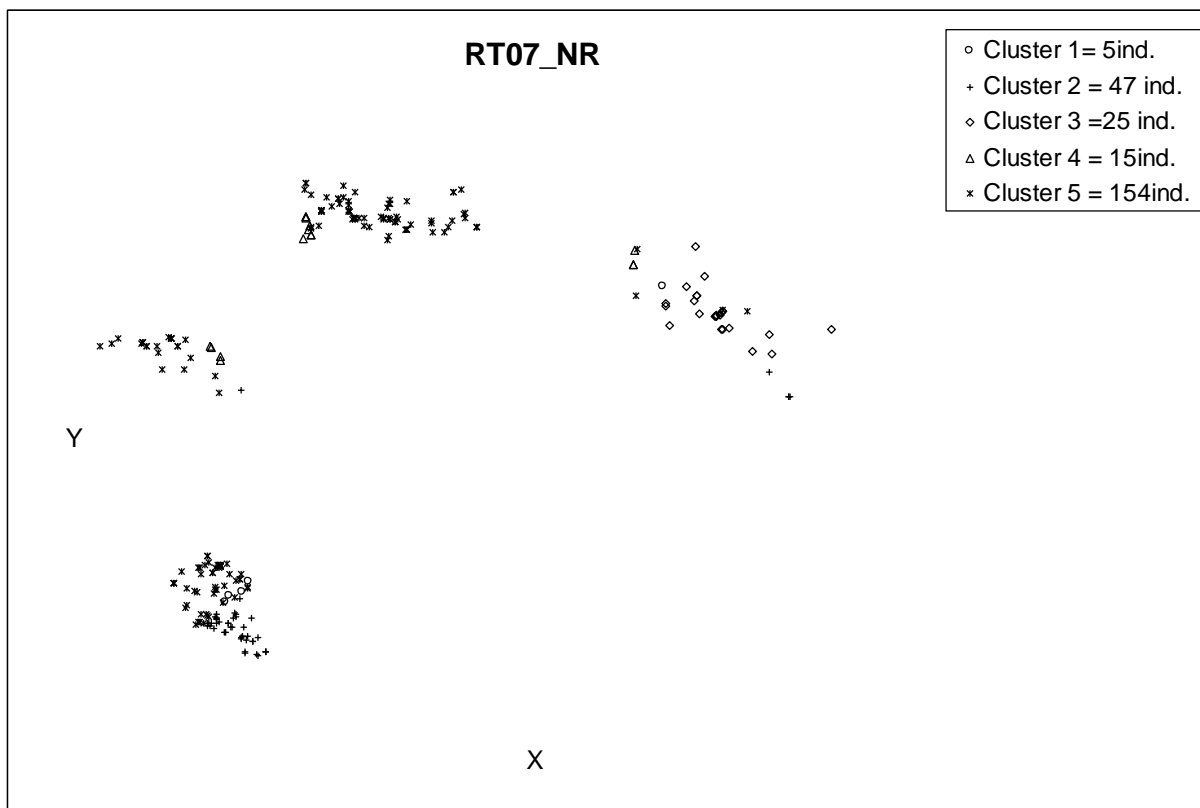


Figure III.5: Carte issue de l'analyse avec le logiciel Geneland pour le site du Rocher des Thermes en 2007

Cinq groupes (clusters) ont été identifiés. Les individus se rattachant à chacun de ces groupes sont figurés par des symboles différents.

b) Autocorrélation spatiale

Les estimations multilocus du coefficient de Moran ont été effectuées pour les deux sites et les deux années. Pour le site BV en 2007 (Figure III.6-A), des corrélations positives significatives sont obtenues pour les 4 premières classes de distance (0-3.5m; 3.5-6.5m; 6.5-12.5m; 12.5-44m) ; elles deviennent ensuite négatives mais significatives pour les 7 classes suivantes. La plus haute valeur est obtenue pour la première classe de distance (0.13). Des résultats similaires sont obtenus pour le site BV en 2008 (Figure III.6-B). Cependant, une légère différence est observée pour les classes de distances suivantes (0-5.1m; 5.1-11.1m; 11.1-19.1m; 19.1-25.5m) et la valeur de la première classe est très élevée (0.22). Pour le site RT, les résultats sont différents.

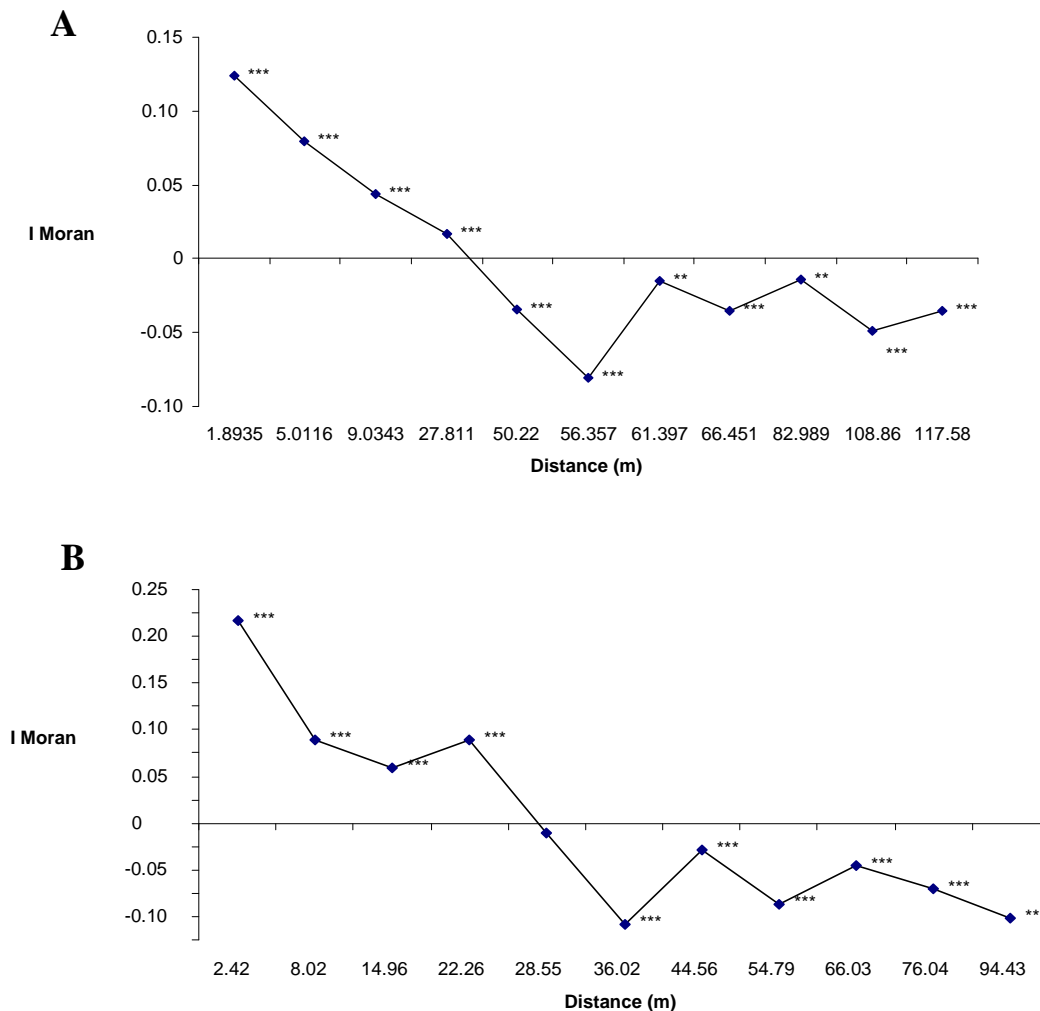


Figure III.6: Auto-corrélogrammes basés sur l'indice I de Moran pour le site du Breac'h Ver (A) en 2007 et (B) en 2008

Les classes de distance, au nombre de 11, ont été choisies afin de respecter une distribution à peu près identique des effectifs dans chacune des classes. Les résultats des tests associés sont représentés de la façon suivante: *** : $P < 0.001$; ** : $P < 0.01$; * : $P < 0.05$.

En 2007 (Figure III.7-A), seules les valeurs des deux premières classes de distances (0-4.10m; 4.10-7.35m) sont positives et associées à des indices significativement différents de zéro. La valeur de la première classe de distance est en outre très faible (0.05). En 2008 (Figure III.7-B), toutes les valeurs, quelque soit la classe de distance, sont non significatives.

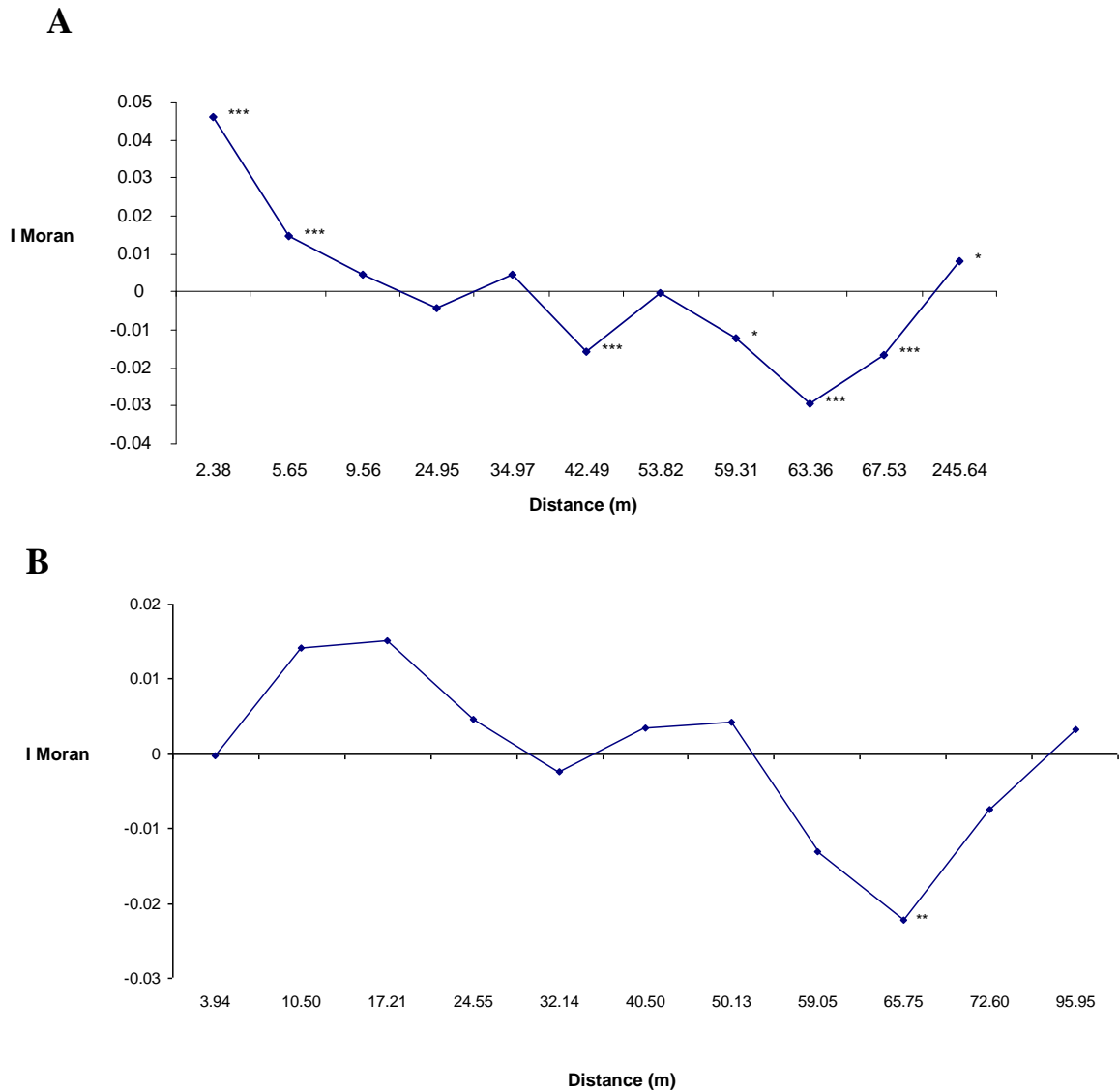


Figure III.7: Auto-corrélogrammes basés sur l'indice I de Moran pour le site du Rocher des Thermes (A) en 2007 et (B) en 2008

Les classes de distance, au nombre de 11, ont été choisies afin de respecter une distribution à peu près identique des effectifs dans chacune des classes. Les résultats des tests associés sont représentés de la façon suivante: *** : $P < 0.001$; ** : $P < 0.01$; * : $P < 0.05$.

c) Estimation de la distance de dispersion efficace « parent-descendance »

Les tests de Mantel indiquent une corrélation significative entre la distance géographique et la distance génétique au niveau individuel au sein de chaque site (Tableau III.6). Au niveau des zones, des corrélations significatives sont obtenues, excepté pour la zone I (test de Mantel, $P=0.076$) et la zone II (test de Mantel, $P=0.118$) du site BV en 2007.

Tableau III.6: Estimation des tailles de voisinage et distance de dispersion efficace.

b: pente de la régression (modèle d'isolement par la distance); Nb : Taille de voisinage (en nombre d'individus); IC: intervalle de confiance; σ : Distance axiale de dispersion; P_{Mantel} : probabilité associée au test de Mantel.

Site	Année	Zone/site	Estimateur	b	Nb	95% IC sur Nb	σ (m)	P_{Mantel}
Rocher des Thermes	2007	I	e	0.006	156.25	[44.79;2 913.96]	4.320	0.002
		II	a_r	0.045	22.06	[11.30;57.15]	2.729	0.013
		III	a_r	0.031	32.19	[25.12;50.72]	2.446	0.046.
		IV	a_r	0.042	24.05	[12.01;70.51]	3.688	0.005
		Site	e	0.008	128.91	[42.04;240.34]	5.501	10^{-4}
	2008	Site	e	0.004	232.56	[28.37;1 547.84]	13.00	0.023
Breac'h Ver	2007	I	a_r	0.023	43.65	[29.56;88.01]	1.574	0.076
		II	a_r	0.024	41.91	[28.52;55.76]	2.103	0.118
		III	a_r	0.025	40.41	[25.68;68.35]	2.930	0.003
		Site	a_r	0.024	42.47	[24.44;78.16]	2.344	10^{-4}
	2008	Site	a_r	0.037	27.40	[8.50;41.41]	3.489	0.000

La taille du voisinage et les estimations de la distance axiale de dispersion (σ) pour chaque site et année sont indiqués dans le tableau III.6. En 2007, la taille de voisinage (Nb) est très similaire entre zones que ce soit au site du BV et au site RT (avec une exception, zone I). Au niveau sites, Nb est variable entre les années mais toujours plus élevée au site RT (estimation ponctuelle de 128 et 232, en 2007 et 2008) qu'au site BV (estimation ponctuelle de 43 et 28, en 2007 et 2008). Les distances axiales de dispersion à l'échelle du site sont au maximum de 13m (RT 2008). Les valeurs plus faibles observées à l'échelle des sites entre les deux années reflètent les différences des estimateurs de densité, et certainement des méthodes d'échantillonnage.

III.4. Discussion

III.4.1. Une importante diversité génétique sur une très faible surface

Une perte de diversité est souvent observée chez les espèces invasives due à l'introduction accidentelle d'un nombre limité d'individus, générant des effets de fondation, c'est-à-dire des goulots d'étranglements par rapport à la population source située dans l'aire native (Sakai et al. 2001). Ces effets de fondation peuvent potentiellement s'accroître lors de la colonisation de nouveaux sites depuis les points d'introduction primaires. Depuis l'introduction d'*U. pinnatifida* dans les deux baies étudiées dans les années 1980, et l'installation de nouvelles populations dans le milieu naturel quelques années plus tard, on peut ainsi se demander quel est le niveau de diversité génétique qui a été maintenu dans ces populations.

Au cours de précédentes études (voir notamment chapitre I), nous avons pu observer un polymorphisme modéré dans différentes populations spontanées d'*U. pinnatifida* établies en Bretagne, polymorphisme toutefois comparable à celui observé dans une population de l'aire native (Nagasaki, Japon ; voir Daguin et al. 2005 pour plus de détails). Ici, nous avons analysé dans le détail deux populations situées dans des baies distantes où la présence d'*U. pinnatifida* est différente (plus importante dans la Baie de St-Malo). La diversité génétique observée (H_e et R_{all}) est similaire entre ces sites et stable sur les deux années d'observation (Tableau III.3-4). Malgré un effort d'échantillonnage beaucoup plus important à l'échelle intra-population, ces valeurs de diversité génétique sont proches de celles estimées avec des échantillonnages plus réduits dans les études précédemment présentées (Chapitre I et II). Un point remarquable est que cette diversité génétique n'est pas réduite quand on restreint l'échantillonnage à une petite zone d'une dizaine de mètres linéaires.

Cette diversité génétique élevée n'est cependant pas distribuée aléatoirement dans l'espace, et ce même à une petite échelle spatiale (exemple : 56m² pour la Zone I du site RT en 2007; 250m² pour la Zone III du site BV en 2007). En effet, au sein d'un site, cette distribution non aléatoire de la diversité génétique a pu être mise en évidence par toutes les analyses réalisées, qu'elles soient basées sur des méthodes utilisant le calcul d'indice (ex. F_{st}) ou des statistiques bayésiennes (ex. Geneland). On note ainsi en particulier : (1) des écarts aux proportions génotypiques attendues sous l'équilibre d'Hardy-Weinberg (sauf au site RT en 2008), (2) un isolement génétique par la distance significatif, (3) de bons taux d'auto-assignation aux sites voire aux zones et (4) des regroupements génétiques spatiaux clairs (sauf

au site RT en 2008). La déviation à l'équilibre de Hardy-Weinberg pourrait être attribuée à d'autres causes qu'une sous-structure spatiale de la diversité génétique (effet Wahlund), notamment la présence d'allèles nuls ou de la consanguinité. La possibilité d'allèles nuls peut être rejetée car la déviation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg n'est pas observée sur les mêmes loci dans les différents sites et aucun problème d'amplification n'a été détecté durant le génotypage. Bien que la consanguinité puisse exister dans cette espèce, elle ne peut pas à elle seule expliquer les déficits en hétérozygotes obtenus, en particulier parce que tous les loci ne sont pas affectés. La stratégie d'échantillonnage (différents niveaux hiérarchiques : sites, zones et individus) effectuée en 2007 nous autorise à valider l'hypothèse de l'effet Wahlund. En effet, le déficit disparaît dans la plupart des zones (Tableau III.4). Donc, il semble que les individus des zones forment des ensembles génétiquement homogènes (au sens de la panmixie).

III.4.2. Un schéma de dispersion majoritairement à (très) courte distance ponctuée par quelques événements de dispersion à (plus) longue distance

Les tests d'isolement génétique par la distance géographique sont significatifs sur les deux sites (excepté au site RT en 2008) et sur toutes les zones (excepté pour les zones I et II du site BV en 2007) corroborant les effets discutés dans le précédent paragraphe (*i.e.* effet Wahlund au sein des sites et de certaines zones). L'isolement par la distance résulte d'un flux de gène limité et conduit à un assemblage de sous-unités génétiquement différentes résultant de ces barrières à la dispersion. L'ensemble des analyses de la distribution de la diversité génétique (regroupement spatial, estimation des tailles de voisinage et analyses d'autocorrélation spatiales) conduisent à des interprétations similaires notamment au travers de la détection de sous-unités génétiques restreintes dans l'espace ayant un diamètre inférieur à environ 20-30m. Ainsi, les tailles de voisinage sont petites de l'ordre de quelques dizaines d'individus et les déviations standards des distances de dispersion généralement de l'ordre de quelques mètres sont toujours inférieures à 13m (Tableau III.6). Les événements de dispersion à courte distance semblent ainsi modeler le paysage génétique caractérisant *U. pinnatifida* dans les deux sites étudiés.

Si la majorité des événements de dispersion efficaces semble se produire à courte distance, les mêmes analyses montrent tout de même, de façon mineure, des événements de dispersion à plus longue distance. Les tests d'assignation ont par exemple permis d'identifier

un faible pourcentage d'individus assignés à une zone où ils n'avaient pas été échantillonnés. De même avec les résultats des analyses par regroupement : un groupe d'individus est divisé en deux sous-groupes, séparés par une distance d'environ 30 m.

Ce schéma global de dispersion correspond assez bien aux courbes de dispersion de type II proposées par Bobadilla & Santelices (2005). Ces auteurs ont effectué des estimations de l'abondance des spores de différentes algues en trois sites et ont construit 258 courbes de distribution de ces abondances en fonction de la distance à leur point d'émission. Ces courbes ont été ensuite comparées à un attendu théorique (un modèle nul, présenté dans la figure III.8-A). Dans 43,8% des cas, les courbes observées correspondent à celles prédites par le modèle nul, caractérisé par une large concentration de spores à proximité des « sources ». Ce schéma est interprété comme un effet de dilution des propagules en fonction de la distance au point d'émission. Néanmoins, un grand nombre de courbes (56,2%) sont significativement différentes de la courbe prédite par le modèle nul. Les auteurs les ont regroupées en trois types. Le type II (Figure III.8-B) est caractérisé par des propagules en densité importante près du point d'émission mais également un autre pic de densité à plus grande distance. Ce modèle correspond assez bien à ce que nous observons chez *U. pinnatifida* à partir de nos données génétiques, dans les deux sites étudiés ici.

Les données dont nous disposons ne nous permettent pas de déterminer les vecteurs à l'origine de ces événements de dispersion à plus longue distance. En effet, plusieurs mécanismes pourraient être impliqués:

- (1) l'installation réussie de quelques spores transportées sur de plus grandes distances et qui auraient gardé tout leur pouvoir germinatif
- (2) des disséminations de spores à nouveau à des échelles très locales mais produites par des sporophytes matures en épave. Comme nous avons eu l'occasion d'en discuter dans les précédents chapitres, les thalles matures dérivants sont en effet des vecteurs de la dispersion influents chez de nombreuses macro-algues brunes. Macaya et al. (2005) ont par exemple montré que les sporophytes matures de *Macrocystis pyrifera* étaient impliqués dans de tels événements de dispersion sur de longues distances.

Figure III.8-A : Modèle nul

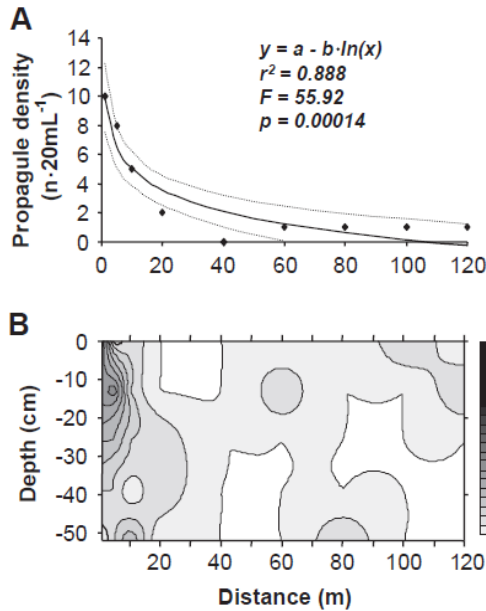


Figure III.8-B : Exemples de courbes de type II

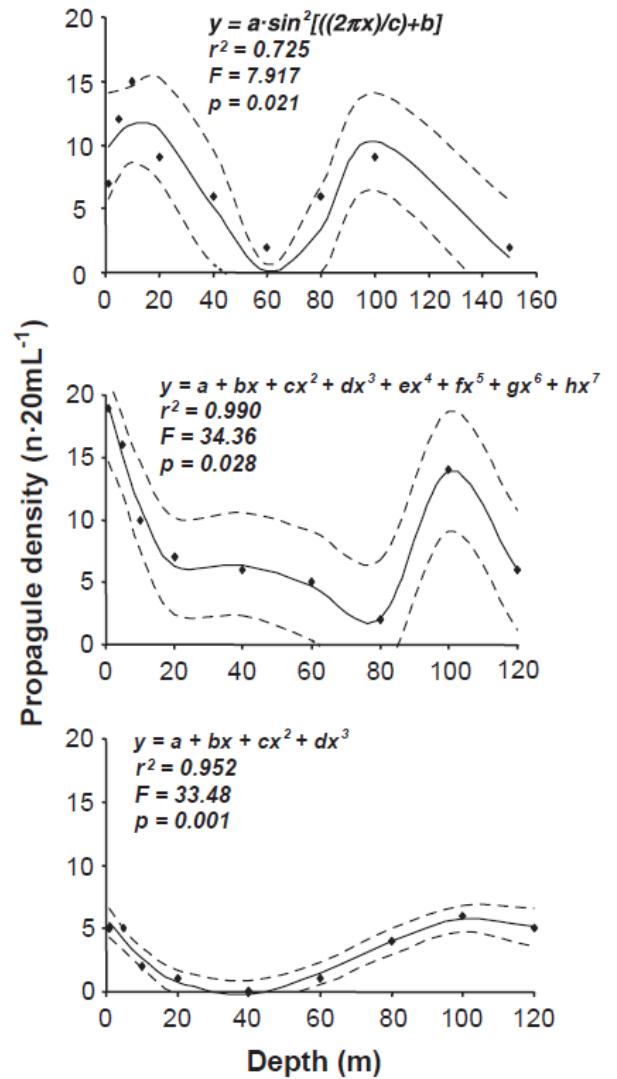


Fig. 1. Example of seed shadows type of dispersal curve, which is expected dispersal model. (A) Propagule abundance at different distances from the source site at Las Salinas, during low tide of fall 2002. The solid line shows the linear fit of the equation $y = a - b \ln(x)$; the dotted lines show the 95% confidence intervals. (B) Kriging maps of propagule distribution in the water column at different distances from the source site.

Figure III.8 : En A, la figure montre le modèle nul utilisé dans cette étude. Il s'agit d'une courbe de dispersion, représentant une décroissance de la densité en propagules (spores) en fonction de la distance au point d'émission des spores selon la formule : $y = a - b \cdot \ln(x)$ où y est la densité en propagules et x la distance au point d'émission.

En B, la figure montre différents exemples de courbes de dispersion de type II, un des types parmi les 3 catégories de courbes observées sur la base des données de terrain.

Figure issue de Bobadilla et Santelices (2005)

Des résultats de même nature ont été observés sur les côtes de Tasmanie par Forrest et al. (2000) et Silwa et al. (2006) chez *U. pinnatifida*. Ce dernier mécanisme est ici possible du fait de conditions environnementales défavorables (tempêtes, turbulences intenses, fréquentes sur les côtes de Bretagne Nord) qui peuvent faciliter le détachement des sporophytes. Par ailleurs, le transport de thalles peut être aussi facilité lorsque les individus se trouvent en épiphytes sur les extrémités d'autres algues ; c'est ce que nous avons observé dans les deux sites avec de nombreux individus en épiphytes sur *Dictyota dichotoma* faiblement attachés au substrat. Des individus matures étaient d'ailleurs présents dans les lasses de mer dans les deux sites d'étude.

- (3) une dormance des gamétophytes pourrait également contribuer à générer en apparence des flux de gènes à longue distance par des effets de décalage temporel (inter-annuels) entre l'émission des spores et le développement de sporophytes. Les stades microscopiques des Laminariales (gamétophytes) ont en effet la capacité de rentrer en dormance suite à des perturbations environnementales (température, lumière, nutriments ; Reed 1992). Se comportant comme des particules passives, ces stades microscopiques « dormants » peuvent être remis en suspension par la turbulence de l'eau associée aux perturbations, être transporté sur de plus grandes distances et se fixer. Des épisodes de recrutement massif ont été documentés après de telles périodes de perturbations (Reed et al. 1988). Si le temps de dormance est supérieur à une génération, la « levée de dormance » de ces gamétophytes pourrait entraîner le mélange de plusieurs générations de sporophytes aux caractéristiques génétiques différentes.

III.4.3. Dispersion potentielle vs. dispersion réalisée

Les résultats que nous avons obtenus sont congruents avec les manipulations expérimentales réalisées sur *U. pinnatifida*, pour estimer les taux de survie et les capacités de dispersion des spores de cette algue (Suto 1950 ; Arakawa & Morinaga 1994). Par exemple, Forrest et al. (2000) montrèrent, avec un canal à courant, que la majorité des spores se fixent à environ 10m du point d'émission. Ainsi, notre étude conduit à des résultats similaires alors qu'au contraire des précédentes, elle se place dans une situation réelle, au sein d'une population d'*Undaria pinnatifida* établie dans une communauté typique de ce type de substrat rocheux du haut infra-littoral (ex. communauté dominée par des Hymanthales, des Laminariales natives et des Fucales au site du Breac'h Ver ; voir Chapitre IV-Partie B et annexe 5E pour un inventaire grossier des communautés établies dans ces sites). Il s'agit ainsi

d'un des rares exemples documentant l'adéquation entre des distances prédites expérimentalement et validées *in situ*, en d'autres termes, montrant une très bonne corrélation entre dispersion potentielle et dispersion réalisée (voir pour d'autres exemples, le tableau III.1 issu de Shanks 2009).

Or, les paramètres susceptibles d'influencer la dispersion réalisée par rapport à la dispersion potentielle sont nombreux. En premier lieu, le temps passé par les spores dans la colonne d'eau avant leur fixation. Les travaux menés par différents auteurs montrent en effet une grande variabilité dans l'estimation de la durée de la phase pélagique chez *U. pinnatifida* (quelques minutes chez Suto (1950) ; 5-6h chez Kanda (1936); 5 à 14 jours chez Forrest *et al.* (2000)). Cependant, même si la durée de vie pélagique est longue, l'efficacité de la dispersion peut être altérée si la viabilité et la capacité de fixation diminuent au cours du temps (Santelices 1990), ce qui semble être le cas chez *U. pinnatifida* (Forrest *et al.* 2000). Quelque soit la durée de la phase pélagique, Suto 1950 a montré que les spores d'*U. pinnatifida* pouvaient se déplacer à une vitesse de 3-8mm.s⁻¹ en conditions *ex situ* mais ces vitesses de déplacement sont fortement dépendantes des conditions hydrodynamiques et climatiques locales. En Bretagne, le régime de marée de forte amplitude pourrait permettre des dispersions sur de longues distances même avec de courtes durées de vie, au moins à l'échelle d'un site voire d'une partie d'un Aber. Cette influence de la marée a par exemple été montrée dans le cas des larves de l'espèce invasive *Crepidula fornicata* (Rigal *et al.* 2010). Un autre effet qui peut moduler la dispersion efficace est un effet de dilution des spores en fonction du temps écoulé dans la colonne d'eau, qui *in fine* peut conduire à la fixation de spores en faible densité locale (Norton 1992 ; Chapman 1986). Ce phénomène a été très bien mis en évidence par Bobadilla & Santelices (2005) chez les macro-algues. Un facteur pouvant expliquer les courtes distances de dispersion observée chez *U. pinnatifida* est la position des organes reproducteurs (*i.e.* sporophylles) (Norton 1992). Chez les Alariaceae, et en particulier chez *U. pinnatifida*, le sporophylle se situe à proximité du substrat, ce qui faciliterait la fixation des spores à courtes distances. Sur ce point, il est intéressant de noter que des distances de dispersion similaires ont été obtenues chez *Alaria marginata* (Kusumo & Druehl 2000). Des facteurs chimiques influencent également la dispersion des gamètes, par exemple les phéromones sexuelles chez l'algue brune *Laminaria digitata* (Maier & Muller 1986).

III.4.4. *U. pinnatifida*, invasive mais faiblement compétitrice

L'installation et la persistance d'une espèce annuelle introduite telle *U. pinnatifida* est expliquée par la production massive de spores, une croissance végétative rapide, une maturation rapide des sporophytes, un cycle de vie multiphasique, etc (Schiel & Foster 2006). L'ensemble de ces traits sont caractéristiques d'espèces pionnières et opportunistes. Nous avons montré que, dans un site naturel, *U. pinnatifida* ne semble pas montrer une capacité au recrutement à longue distance des populations parentales ni d'ailleurs un recrutement important. En effet, en dépit d'une grande quantité de spores larguées dans la colonne d'eau (Suto (1950); 10^5 à 10^6 par gramme de fronde; Hewitt et al. (2005); $4.3 \cdot 10^8$ spores par sporophyte et par heure; Schaffelke et al. (2005): 30 à $60 \cdot 10^3$ par centimètre carré de thalle et par heure), un nombre limité de sporophytes d'*U. pinnatifida* est visible dans les sites étudiés. Les densités sont relativement faibles dans les deux sites naturels étudiés, surtout en comparaison de ce qui peut être observé dans des zones portuaires (voir Chapitre IV-A). Et ces observations sont sensiblement identiques dans tous les habitats naturels que nous avons pu visiter (notamment dans le cadre des échantillonnages réalisés pour les études présentées dans les deux chapitres précédents). Cette observation peut paraître à première vue paradoxale compte tenu du caractère d'espèce invasive reconnue (Nyberg & Wallentinus 2005) et documentée dans de nombreuses régions (ex. Nouvelle-Zélande où elle forme des tapis mono-spécifiques; Stuart 2004) ainsi que sa capacité à coloniser de nouveaux habitats au moins à l'échelle d'une baie à partir de sources situées à plusieurs centaines de mètres au minimum (cf Chapitre IV-A).

Cet apparent paradoxe trouve cependant une explication possible en rappelant que la dispersion étudiée ici (« connectivité reproductive », Pineda et al. 2007) est la résultante de deux processus: le transport et le recrutement. Or le succès du recrutement, une phase critique dans l'installation des populations, est dépendant de nombreux facteurs chez les macro-algues. La dynamique des populations de macro-algues est en effet complexe, par leur histoire de vie multiphasique, mais également leur présence dans des écosystèmes côtiers soumis à de nombreuses sources de variabilité et d'hétérogénéité environnementales (cycle d'immersion-émersion en milieu intertidal, effets des vagues et de la houle, communautés diversifiées avec de nombreux brouteurs et d'autres perturbations d'origine anthropique) (Gaylord et al. 2002 ; Schiel & Foster 2006). Ainsi, l'hypothèse la plus probable pour expliquer les résultats observés dans les deux sites étudiés est une forte « résistance biotique », terme défini par

Elton (1958) pour définir la capacité des espèces résidentes (locales) à inhiber le recrutement, la croissance voire la reproduction d'espèces invasives. Cette situation pourrait être spécifique des communautés naturelles établies en Bretagne Nord. Par exemple, les espèces annuelles natives *Himantalia elongata* et *Sacchoriza polyschides*, apparaissent très compétitives pour l'espace par rapport à notre espèce. Des manipulations expérimentales des communautés pourraient apporter des éléments de réponse sur ce point. De même que des comparaisons plus fines des communautés d'espèces établies dans les habitats naturels et anthropogéniques (ports). Dans ce contexte, il est d'ailleurs intéressant de noter que Farrell & Fletcher (2006) avaient suggéré qu'*U. pinnatifida* était plus compétitive dans les ports grâce à des capacités de tolérance supérieures à celles des espèces natives aux pollutions et aux conditions environnementales particulières rencontrées dans ce type d'environnement. Une plus faible diversité spécifique dans ces habitats artificiels pourrait aussi diminuer les capacités de résistance biotique dans ces milieux (Wahl 2009). Les perturbations survenant dans les habitats naturels pourraient également faciliter l'installation et le recrutement à plus grande distance des sources parentales d'*U. pinnatifida*. Il n'est pas exclu que les schémas de dispersion observés dans le site du Rocher des Thermes en 2008 correspondent à une telle situation. Les distances de dispersion estimées y sont en effet plus grandes et nous avons observé l'absence de groupes génétiques spatialement restreint. Or le site du Rocher des Thermes est un lieu fortement fréquenté du fait de sa position en bord de plage et de son accessibilité. Nous avons noté entre 2007 et 2008 des modifications physiques du site (ensablement), signes de piétinement important et couverture par une algue gazonnante, appelée *Chondrocanthus acicularis*. Les activités anthropiques dans des sites naturels pourraient modifier les capacités de résistance biotique des communautés en place.

III. 5. Conclusion

La combinaison des données génétiques et démographiques nous a permis d'estimer la distance de dispersion « parent-descendance », intégrant de manière globale les différentes étapes (transport, recrutement et croissance) conduisant à l'installation d'une nouvelle génération d'*U. pinnatifida* dans un site naturel. Les résultats indiquent que cette dispersion efficace est réalisée sur de courtes distances spatiales (quelques dizaines de mètres), et suggèrent que le transport est essentiellement dû à la courte durée de vie des spores. Cette distance de dispersion est dépendante à la fois des facteurs environnementaux (dont la

composition de la communauté) et des pressions anthropiques. Ces résultats soulignent l'importance des effets de transport par l'homme dans la dissémination initiale de l'espèce à une échelle locale comme globale.

Chapitre IV :
Dynamique de la colonisation
d'habitats naturels et artificiels par
l'algue invasive *Undaria pinnatifida*

Chapitre IV :

Dynamique de la colonisation d'habitats naturels et artificiels par l'algue invasive *Undaria pinnatifida*

Préambule

Dans les schémas d'introduction (cf Introduction, Encadré 2), la première étape dans l'installation durable d'une espèce introduite est la colonisation d'un nouveau milieu. La réussite de l'installation de populations d'*U. pinnatifida*, à l'échelle mondiale et dans de nombreuses situations écologiques, a été souvent expliquée par ses caractéristiques d'espèce « pionnière ». *U. pinnatifida* présente en effet un cycle de vie très court, une croissance rapide, une forte fécondité et une aptitude à coloniser une très large gamme de substrats (Castric-Fey et al. 1993 ; Fletcher & Farrell 1999 ; Nyberg & Wallentinus 2005 ; Wallentinus 2007). Elle semble aussi particulièrement adaptée à coloniser des habitats perturbés (Valentine et al. 2007).

Dans les chapitres précédents, je me suis focalisée sur l'étude de la propagation et de la dispersion d'*U. pinnatifida* à différentes échelles (régionales et locales au sein d'une baie ou d'un estuaire). Dans chacun de ces cas, les schémas de distribution de la diversité génétique m'ont permis de faire l'hypothèse d'importantes limites à la dispersion naturelle chez cette espèce. En outre, de façon plus inattendue compte-tenu des nombreuses interactions de cette espèce avec les activités humaines, on observe un effet assez mineur des transports par l'homme comme source de migrants dans les populations déjà installées en Bretagne, et ce à des échelles régionales comme locales.

Ces résultats pourraient être considérés en première instance comme paradoxaux, *U. pinnatifida* ayant été qualifiée d'espèce à fort potentiel d'invasion (Nyberg & Wallentinus 2005). Cependant, les situations examinées dans les chapitres précédents étaient à des situations post-introduction avec des populations établies.

Au cours de ce chapitre, je me suis penchée sur l'étude de la colonisation de nouveaux substrats ou habitats par *U. pinnatifida* en Bretagne avec deux échelles d'étude différentes :

(1) à méso-échelle, en menant une étude couplant une approche démographique (suivi du recrutement) et une approche génétique de la colonisation d'un nouvel habitat (artificiel)

(2) à micro-échelle en réalisant une étude expérimentale, sur le terrain, de la dynamique de recolonisation suite à une éradication locale dans un habitat naturel, afin d'analyser la vitesse de recolonisation post-perturbation. Ces deux études sont présentées dans les deux parties structurant ce chapitre.

Partie A-Analyse démo-génétique de l'établissement d'une nouvelle population dans un habitat artificiel

Note : Ce travail a été réalisé en collaboration avec Dante Torio et Laurent Lévêque pour les suivis de terrain, l'acquisition et le traitement des données par GPS différentiel

IV-A.1. Introduction

En parallèle de la pollution et de l'exploitation des ressources naturelles, la destruction des habitats et l'introduction d'espèces sont à l'origine d'une banalisation des écosystèmes côtiers et d'une importante perte de biodiversité en zone côtière (Jackson 2008). Les effets rapides et importants observés sont, au moins en partie, expliqués par de fortes synergies et interactions entre ces différentes menaces. Ces synergies sont particulièrement notables concernant l'artificialisation des zones côtières et l'introduction d'espèces exotiques (Gray 1997 ; Jackson 2008). En effet, les baies et les estuaires, de plus en plus urbanisés, sont au cœur de nombreuses activités économiques, telles que les transports maritimes, les pêcheries ou l'aquaculture qui sont connus pour être des vecteurs majeurs d'introductions d'espèces exotiques en milieu marin (voir Introduction ; Ruiz et al. 1997). Les structures artificielles telles que les pontons, les piliers, les murs brise-lames offrent des substrats privilégiés à l'installation de faune et flore sessiles (Connell 2000; 2001) parmi lesquelles les espèces invasives ou introduites sont une composante importante. En prenant comme zone d'étude le port de Sydney, en Australie, Glasby et al. (2007) ont ainsi récemment montré que la richesse spécifique des espèces exotiques était significativement plus grande sur la plupart des substrats artificiels que sur les substrats rocheux naturels environnants (voir aussi Wahl 2009). Bulleri et al. (2006) soulignent d'ailleurs que, dans des zones dépourvues de substrats durs, ces structures artificielles offrent un nouveau type d'habitat et, à ce titre, sont susceptibles d'influencer fortement la composition des communautés environnantes. Ils pourraient

notamment jouer un rôle de relais dans l'établissement des schémas de migration entre populations ainsi que dans l'expansion d'une espèce à une échelle régionale.

Les ports et marinas ont un rôle particulier en tant que points d'entrée privilégiés de nombreuses espèces exotiques marines (Casas & Piriz 1996 ; Hewitt et al. 2004). Ces structures portuaires forment des « têtes de pont » pour la phase de dispersion des espèces exotiques à une échelle régionale, suite à leur introduction primaire. Cet effet a été particulièrement bien documenté dans certains cas, par exemple dans le cas de l'introduction d'*U. pinnatifida* en Nouvelle-Zélande : les premiers points de colonisation observés ont été des zones portuaires et Russell et al. (2008) ont montré que plusieurs ports où des populations fondatrices s'étaient établies, à la fin des années 1980 et au début des années 1990, avaient été les points de départ d'une expansion locale et régionale au sein d'habitats naturels, et ce très rapidement (en moins de 10 ans dans le cas du port d'Otago, longueur de 21km).

Concernant les côtes Atlantiques françaises et de la Manche, le rôle joué par les zones portuaires sur la dynamique d'expansion d'*U. pinnatifida* est plus complexe à appréhender. En effet, l'installation initiale de cette espèce dans ces régions a été due à son introduction délibérée à des fins de culture pour la consommation humaine (Floc'h et al. 1996 ; Voisin et al. 2005). Néanmoins, *U. pinnatifida* est actuellement présente dans de très nombreux ports des côtes françaises (Voisin 2007). Dans une des études précédentes (Chapitre II), nous avons montré qu'à l'échelle d'une large baie, telle que la baie de St-Malo, les populations établies dans les ports montraient des profils génétiques très proches de ceux des populations établies dans la baie en comparaison des cultures. Elles pourraient même être à présent des « sources » de migrants pour des populations proches. Nos résultats suggèrent que ces structures artificielles sont aujourd'hui des acteurs importants pour l'établissement durable et l'évolution future des populations d'*U. pinnatifida* le long des côtes françaises. Il est probable que les structures portuaires n'ont pas joué un rôle initiateur à l'installation d'*U. pinnatifida*, mais qu'elles ont été colonisées *a posteriori* à partir de l'échappement d'individus depuis des cultures ou de la migration d'individus depuis des populations naturelles déjà établies dans le milieu. Au cours de cette étude, nous avons eu l'opportunité de tester ce scénario en suivant en temps réel la colonisation et l'installation d'une nouvelle population dans un nouveau port construit au sein d'une baie déjà colonisée par *U. pinnatifida*. Il est important de noter que le suivi de la colonisation d'un nouvel habitat est extrêmement rare dans l'étude des espèces exotiques en milieu marin, la plupart des études étant menées sur des populations déjà en place, souvent depuis de longues années.

Cette étude s'est déroulée dans l'Aber Wrac'h où *U. pinnatifida* fut introduite en 1989 pour y être mise en culture (com. pers. Philippe Kervern, cultivateur de wakamé). En parallèle de la mise en place de ces cultures, plusieurs populations se sont établies dans le milieu naturel, et ce en l'absence de zones portuaires, suggérant que cette concession de wakamé en était à l'origine (Voisin 2007). La culture de l'algue a pris fin dans cet estuaire en 2002. Les observations réalisées notamment au cours de la thèse de Marie Voisin (2007) ont montré que les populations établies dans le milieu naturel s'étaient maintenues malgré l'arrêt des cultures. La mise en place en Juillet 2007 d'un port à pontons flottants (> 300 places) nous a permis de décrire la dynamique de colonisation, sur des substrats artificiels vierges (pontons et piliers), de ce nouvel habitat par *U. pinnatifida*. En outre, bénéficiant d'une prospection réalisée en Février-Mars 2008 dans cet aber (voir Chapitre I), nous avons pu également tester des hypothèses quant à l'origine des individus fondateurs en utilisant des approches de génétique des populations.

Les questions posées ici (et schématisées dans la figure IV-A.1) peuvent être résumées ainsi :

- (i) Quel est le temps de latence entre la mise en place de nouveaux substrats et leur colonisation par *U. pinnatifida* ? Quelle est la dynamique spatio-temporelle de colonisation de l'habitat disponible au cours de la première année (*i.e.* une saison de reproduction)?

Il m'intéressait ici de décrire la rapidité (ou lenteur) de l'installation d'une population fondatrice et de déterminer si les nouvelles recrues étaient distribuées de manière aléatoire ou non (ex. distribution agrégée en « patchs ») dans l'espace.

- (ii) De quelle(s) source(s) proviennent les différentes recrues au cours du temps ? Bénéficiant d'une bonne connaissance des populations naturelles établies dans la baie (voir chapitre I et figure III.2), j'ai cherché à déterminer l'origine des recrues colonisant le port de l'Aber Wrac'h.

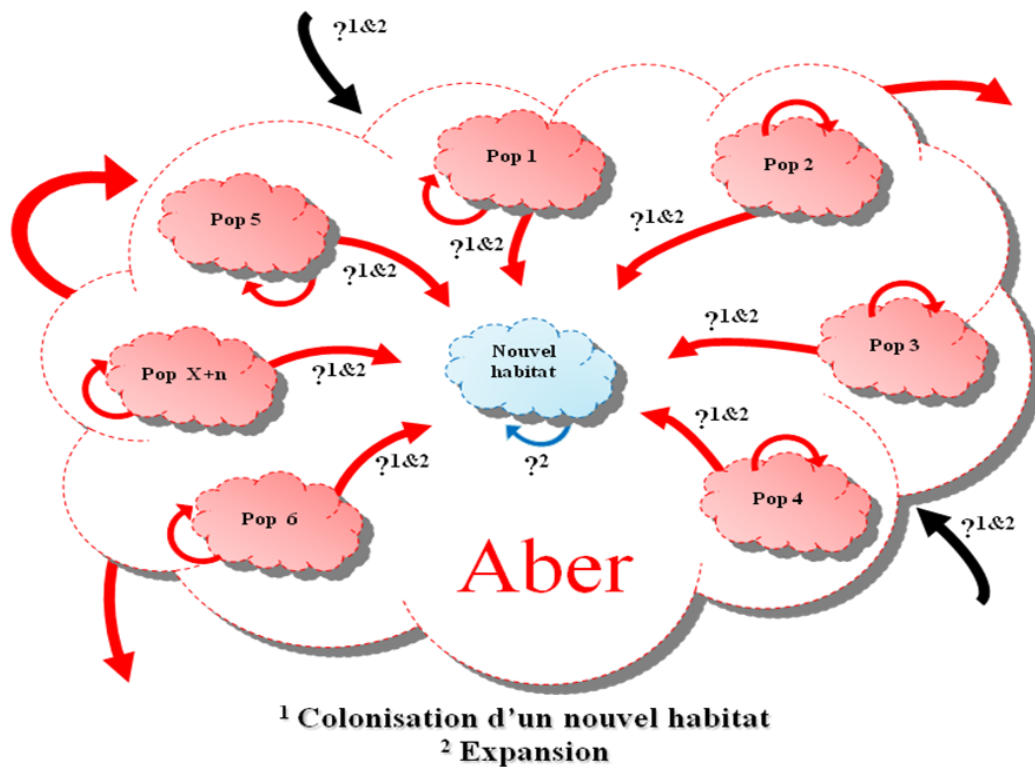


Figure IV-A.1 : Schéma global représentant l'objectif de cette étude.

Les « nuages » symbolisent les populations. Les populations en rouge représentent les populations environnantes naturelles et la population en bleu symbolise les substrats artificiels vierges disponibles dans le port de l'Aber Wrac'h. Les flèches tournées vers elle-même symbolisent l'autorecrutement et les autres des événements d'immigration. Dans ce chapitre, l'objectif est de décrire la colonisation d'un nouvel habitat puis de suivre l'évolution de la population en place (*i.e.* modification de l'origine des recrues).

Compte tenu des faibles capacités de dispersion naturelle d'*U. pinnatifida*, mon hypothèse était que la colonisation serait lente, de type agrégée (effet du hasard dans l'installation de spores) et liée à une migration depuis des populations proches dans la baie. Par ailleurs comme le cycle de vie est très rapide chez cette espèce (*i.e.* atteinte de la maturité sexuelle en deux mois ; Castric-Fey et al. 1999b ; Voisin 2007), j'ai fait l'hypothèse qu'il pourrait y avoir au cours du temps une variation dans l'origine des recrues. On peut en effet supposer que les premières recrues de l'année sont issues de la reproduction d'individus établis dans des populations naturelles environnantes mais que les dernières recrues apparues plusieurs mois plus tard sont issues de la reproduction des premiers individus établis dans le port (*i.e.* individus fondateurs).

Pour répondre à ces questions, un suivi mensuel sur le terrain a été mis en place pour suivre l'apparition de nouveaux individus d'*U. pinnatifida* dans le port de l'Aber Wrac'h de décembre 2007 à Juillet 2008, chacune des nouvelles recrues étant échantillonnée. Ces relevés

de terrain m'ont permis de décrire la dynamique de colonisation de ce nouvel habitat. Les échantillons prélevés m'ont ensuite permis de tester des hypothèses concernant l'origine des recrues par des approches de génétique des populations basées sur la comparaison des génotypes de ces nouvelles recrues avec les génotypes observés dans les populations établies dans l'Aber Wrac'h en Février-Mars 2008 (cf. Chapitre I, pour l'acquisition des données moléculaires de ces populations).

IV-A.2. Matériel & Méthodes

IV-A.2.1. Présentation des sites d'étude

L'Aber Wrac'h est un vaste estuaire, d'environ une trentaine de kilomètre de long, caractérisé par un important marnage (de l'ordre de 9 m en vives-eaux). Une prospection réalisée en Février-Mars 2008, en collaboration avec les plongeurs scientifiques du Service « Mer et Observation » de la Station Biologique de Roscoff, nous a permis de vérifier qu'*U. pinnatifida* était largement présente dans cet Aber, en différents habitats et sites de la baie (Figure IV-A.2), validant des observations antérieures notamment concernant les points de présence (Voisin 2007 ; Yann Fontana, Laurent Lévêque et Frédérique Viard, observations personnelles). Dans chaque population, trente à quarante individus avaient été échantillonnés pour des analyses génétiques (cf. Chapitre I).

Au début de Juillet 2007, l'ensemble des pontons flottants d'un nouveau port de plaisance a été mis en fonction. La configuration de ces pontons est présentée dans la figure IV-A.3. Ce port de 320 places est muni de trois pontons flottants centraux (A, B et C) et d'un ponton « passerelle » entre les pontons A et B. Ces pontons servent à l'amarrage de voiliers ou de petits bateaux de plaisance. Les pontons Nord et Sud sont des pontons flottants qui « ferment » le port. Le côté face à la mer (*i.e.* côté extérieur au port) est davantage battu que le côté interne au port. Ainsi le ponton Nord (N2 à N5) est souvent dépourvu de bateau, excepté pour de petites escales de quelques jours (ex. voilier, le plus souvent). En ce qui concerne le ponton N1, aucun bateau n'a été observé durant le suivi.

Code_pop	Nom des sites	Présence <i>Up</i>	Acronyme ⁽¹⁾
1	Basse la Croix	Oui	BLC
2	Balise Tribord	Non	
3	Cage aux Saumons	Rare (1 individu)	
4	Breac'h Ver	Oui	BV
5	Roche aux Moines	Oui	RAM
6	Balise rouge	Rare (3 individus)	
7	Coffre	Oui	COF
8	Port Aber Wrac'h	Oui	
9	Balise rouge face port	Non	
10	Port Lillia	Non	
11	Bouées d'amarrage	Non	
12	Bouées d'amarrage	Non	
13	Camaleut	Oui	CAM



Figure IV-A.2: Localisation des sites prospectés en Février-Mars 2008 dans l'Aber Wrac'h et présence/absence d'*U. pinnatifida*.

Le fond de carte représente l'Aber Wrac'h lors des marées de vives eaux. Un symbole représente chacun des sites prospectés, un triangle pour des bouées/pontons dans l'estuaire, un rond pour des populations établies en milieu rocheux et une étoile pour le port. La couleur du symbole précise l'absence (en vert) ou la présence (en rouge) d'*U. pinnatifida*. Le tableau à gauche de la carte précise pour chaque numéro de la carte, le nom des populations, la présence d'*U. pinnatifida* et l'acronyme utilisé dans le texte (pour les populations ayant un effectif suffisant pour être analysées avec des marqueurs microsatellites). Les zones entourées en jaune sont des parcs ostréicoles et la zone entourée en bleu est un site d'élevage d'ormeaux. A noter que l'ancienne zone de culture d'*U. pinnatifida* (arrêtée en 2002) se situait à proximité du site 3.

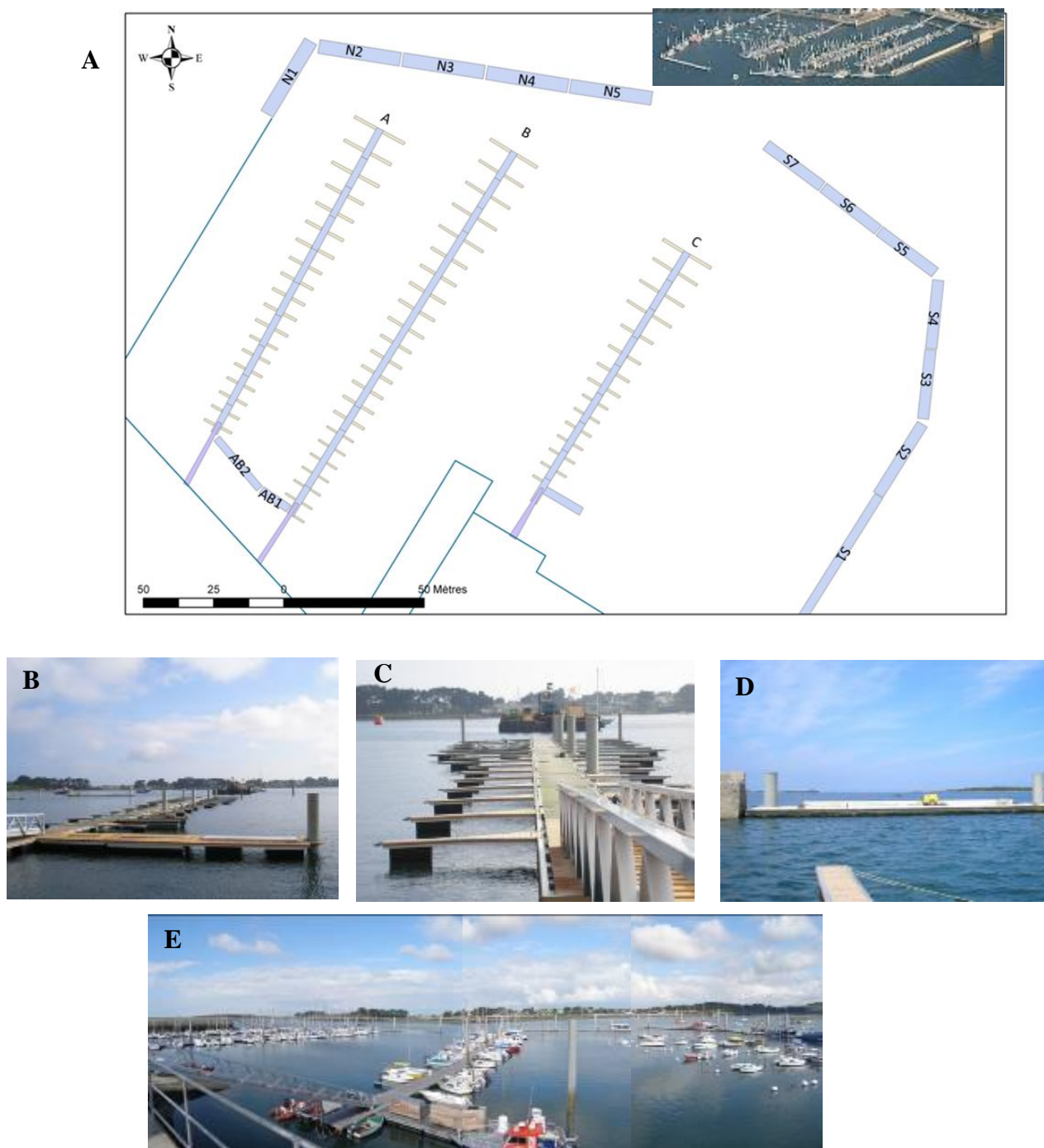


Figure IV-A.3: Configuration du site d'étude principal : le port de l'Aber Wrac'h.

A: Configuration du port avec les noms de chaque ponton ou partie de pontons

B & C: Photographies du ponton C lors de sa mise en place le 17 juin 2007

D: Photographie du ponton N1, le 7 juin 2007

E: Vue d'ensemble du port en Mai 2007

Le long du ponton Sud, on trouve un grand nombre de bateaux de pêche (S1 à S3 voire S4, intérieur comme extérieur ; Figure IV-A.3). Le long du ponton S4 extérieur se trouve le quai d'embarquement pour les navettes des abers (Ile Vierge et Aber Benoît) et le bateau de la SNSM.

IV-A.2.2. Relevés de terrain, échantillonnages et analyses statistiques associées

Une première prospection du port a débuté en Septembre 2007, date à laquelle aucun individu d'*U. pinnatifida* n'a été observé. Un suivi a été ensuite mis en place mensuellement de décembre 2007 à Juillet 2008. La position de chaque nouvelle recrue (ici, nous appellerons « recrues » tous les nouveaux individus observés entre deux séries mensuelles d'observation) a été enregistrée avec un GPS différentiel (précision $\pm 5\text{cm}$) ou avec un décamètre par rapport à des points fixes de référence. Les relevés ont été effectués le plus souvent avec un observateur à l'eau (équipé de palmes-masque-tuba) afin de repérer avec précision chaque nouvelle recrue. En plus de leur position, chaque recrue a été mesurée (longueur du stipe, longueur totale et degré de maturité (0= pas de sporophylle ; 1= début du début sporophylle et 2= sporophylle bien développé). Quelques cm^2 de thalle ont été prélevés à la base de la lame, de manière non destructive, et mis dans du gel de silice pour des analyses génétiques ultérieures. Compte-tenu des très forts effectifs observés en avril et mai, et afin de poursuivre un effort de recensement le plus exhaustif possible, seule une moitié du port a été observée sur ces deux mois : les pontons A, AB, B et S en avril et les pontons N et C en mai. Quand les densités étaient trop importantes (en mai, ponton Nord-Nord & Sud et ponton Ouest), le nombre d'individus a été estimé par segment d'un mètre et un sous-échantillonnage d'individus a été réalisé en vue des analyses génétiques (1 à 3 individus tous les mètres).

La position de tous les nouveaux individus observés au cours des 7 mois d'étude a été reportée sur une carte à l'aide du logiciel ESRI d'Arc Map. Afin de suivre l'évolution de la colonisation du port de l'Aber Wrac'h à plus long terme, une prospection a été réalisée un an après ce suivi, le 27 Mai 2009. Une carte de comparaisons (490 points d'observations) entre ces deux années a été réalisée avec le logiciel d'ESRI d'Arc Map.

Pour analyser la distribution spatiale des individus apparus au cours de ce suivi, une approche de type « transect » a été choisie. En effet, l'ensemble de la zone portuaire ne constitue pas un habitat colonisable. Seuls les pontons, assimilables à des transects, sont susceptibles d'être

colonisés par *U. pinnatifida*. Un « zéro » (point de référence) a été défini pour chaque ponton et la position de chaque recrue a été déterminée par rapport à ce point de référence. Quand les effectifs le permettaient, les deux côtés de chaque ponton ont été analysés séparément afin de prendre en compte des effets environnementaux liés à l'exposition. Compte-tenu des effectifs observés, 10 transects ont ainsi été définis.

Ils correspondent aux côtés Nord et Sud des pontons N et S, aux côtés Ouest et Est des pontons B et C, au ponton A dans son ensemble (Ouest & Est compilés) et au côté Nord du ponton AB (Figure IV-A.3). Ces analyses spatiales ont été effectuées au moment du pic de recrutement (*i.e.* couverture et abondance maximale dans le port), sur les données acquises en une session d'observation soit au mois d'avril (pour les transects des pontons A, AB, B et S) soit au mois de mai (pour les pontons N et C). Il faut noter que ces analyses ont également été effectuées sur la somme cumulée des effectifs en recrues observées pour chaque ponton sur l'ensemble de la période d'observation (de Janvier à Juillet 2008). Les mêmes résultats qualitatifs ont été obtenus et seules les recrues d'Avril-Mai seront présentées ici. Afin de quantifier l'hétérogénéité de la distribution des recrues, deux approches ont été utilisées : (1) la méthode dite de « lacunarité », expliquée dans l'encadré IV.1, et (2) le calcul de l'indice de dispersion *ID* (voir Encadré III.2). Ces méthodes m'ont permis de déterminer si la distribution était aléatoire, agrégée ou régulière. Pour l'estimation de l'indice de dispersion *ID*, une fenêtre de taille d'un mètre a été choisie. Ces analyses ont été faites avec le logiciel Passage Version 2 Beta (Rosenberg 2009).

IV-A.2.3. Acquisition et analyses des données moléculaires

Au total, les génotypes de 385 individus collectés dans le port au cours du suivi (Tableau IV-A.1) ont été obtenus sur 9 locus microsatellites : 1B2, 1C1, 4C12, 1B5, 1G2, 4G2, 2E8, 1H5 et 2C1 (Daguin et al. 2005) comme décrit dans les chapitres 1 et 2 ainsi que dans l'annexe 2. A ces données nouvellement acquises ont été ajoutées les données obtenues sur les mêmes locus pour 172 individus échantillonnés dans 5 populations occupant l'estuaire de l'Aber Wrac'h (Chapitre I ; Figure I.2).

Encadré IV.1 : Principe des analyses de lacunarité

Les analyses de lacunarité permettent d'étudier des schémas de distribution d'unités d'échantillonnage dans l'espace. A l'origine, le concept de lacunarité a été développé pour décrire les propriétés d'objets à caractère fractal. Cependant Plotnick et al. (1996) soulignent que cette méthode peut être généralisée et appliquée à des données de n'importe quelle dimension, quelles soient de type binaires (ex. présence-absence) ou en densité et que la structure observée soit fractale ou non.

Ces analyses sont basées sur une méthode de calcul de variance par carré d'échantillonnage qui permet de quantifier l'hétérogénéité de la distribution en prenant en compte la localisation spatiale des unités d'échantillonnage. Les données doivent être collectées de façon exhaustive le long de chaînes ou de carrés d'échantillonnage contigus. Les données peuvent correspondre à des comptages d'individus ou à des densités. L'utilisation de mesures ou données obtenues le long d'un transect correspond au cas de chaînes à une dimension. C'est une représentation sans dimension du quotient moyenne sur variance (pour plus de détails voir Plotnick et al. 1993 & 1996). Le principe consiste à utiliser des fenêtres englobant r unités d'échantillonnage, r variant de 1 au nombre total d'unités d'échantillonnage (n). La fenêtre est placée au début de la chaîne et un comptage ou la somme de densités est réalisée à l'intérieur de cette fenêtre. On fait ensuite glisser la fenêtre d'une unité d'échantillonnage et le calcul est répété jusqu'à ce que la fenêtre atteigne la dernière unité d'échantillonnage de la chaîne. Une estimation de la lacunarité dans cette chaîne d'unités d'échantillonnage, en fonction de l'échelle d'observation r , est alors donnée par la formule :

$$\Lambda(r) = \frac{m_2(r)}{(m_1(r))^2}$$

avec m_1 , la moyenne (moment d'ordre 1) et m_2 définis par

$$m_1(r) = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n}$$

$$m_2(r) = \sum_{i=1}^n \frac{x_i^2}{n}$$

Les figures ci-dessous, issues de Plotnick et al. (1996), montre la relation entre l'estimation de la lacunarité représentée sous forme de courbes (à droite) et différents types de distributions (agrégées, aléatoires ou régulières, à gauche). L'exemple donné ici concerne des données de présence-absence en une dimension. D'une façon générale, plus la structure est agrégée et plus la lacunarité est forte. Les ruptures de pente observées pour la courbe de la fonction $\Lambda(r)$ peuvent être interprétées comme indicatrices des échelles auxquelles se produisent des changements de distribution (et donc possiblement des processus sous-jacents).

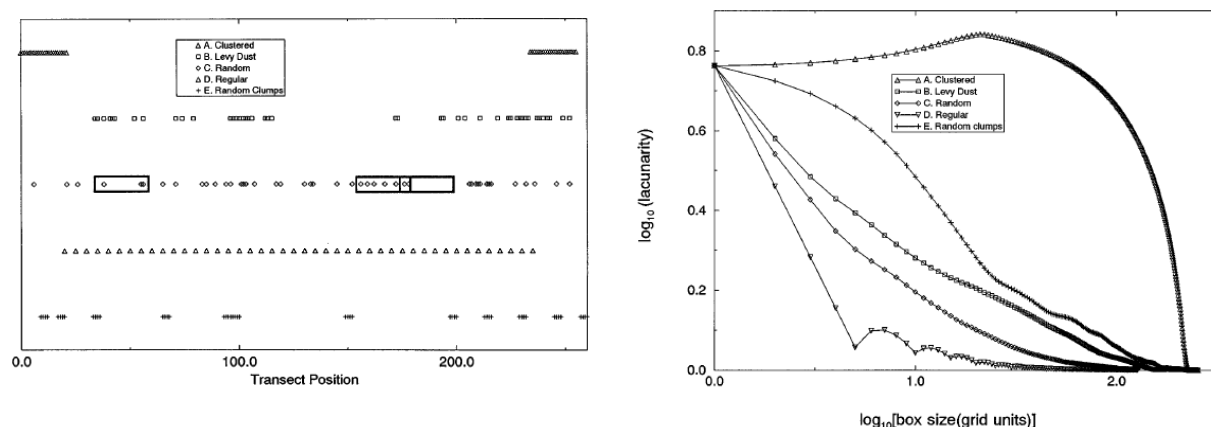


Figure ci-dessus: estimation de la lacunarité de distributions uni-dimensionnelles. A gauche est représenté cinq exemples de distributions unidimensionnelles contenant le même nombre de points mais différent par leur distribution; les unités en abscisse sont arbitraires; les carrés représenté sur le troisième type de distribution symbolisent trois positions d'une fenêtre glissante de 9 unités. A droite sont représentées, les analyses de lacunarité correspondantes à chacune des distributions observées; la lacunarité est une grandeur sans dimensions. Les abscisses pour lesquelles on observe une rupture de pente dans la fonction de la lacunarité correspondent à des échelles spatiales où les structures spatiales changent. Redessiné de Plotnick et al. (1996).

Tableau IV-A.1 : Nombre de nouveaux individus d'*U. pinnatifida* apparus et génotypés lors du suivi de la colonisation du port de l'Aber Wrac'h.

Le ponton AB n'était pas présent en début de suivi (hachures). Certains pontons n'ont pas pu être observés à la date indiquée (NO). Les deux côtés de chaque ponton ont été prospectés et les effectifs sont donnés avec le séparateur « / ». Pour les pontons A, B et C, les chiffres sont classés en Ouest/Est. Pour les pontons N, AB et S, les chiffres sont classés en Sud/Nord. Les astérisques indiquent les mois et pontons pour lesquels des patches locaux (une vingtaine de centimètre) à très forte densité n'ont pas été comptabilisés et ont été sous-échantillonnés. L'ensemble de ces individus ont été analysés avec 9 locus microsatellites sauf pour les individus du mois de Juillet où aucun individu n'a été génotypé.

Ponton		A	AB	B	C	N	S	Total
Année	Mois							
2007	Septembre	0/0	/ / / / / / / / / /	0/0	0/0	0/0	0/0	0
	Décembre	NO	/ / / / / / / / / /	NO	NO	0/0	0/0	0
2008	Janvier	NO	/ / / / / / / / / /	0/0	1/1	0/0	0/1	3
	Février	0/0	0/0	1/0	12/7	63/3	0/3	89
	Mars	NO	0/3	0/0	4/10	6/0	5/1	29
	Avril	1/3	0/17	5/3	NO	NO	44/14	87
	Mai	NO	NO	NO	47*/26	48*/11*	NO	132*
	Juin	0/0	0/0	1/1	0/2	9/2	30/8	53
	Juillet	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	5/0	5
Total	Janvier-Juillet	1/3	0/20	7/4	64/46	126*/16*	84/27	398*
		4	20	11	110*	142*	111	

a) Analyse de la diversité génétique

La diversité génétique de l'ensemble des individus du port, de la population fondatrice observée en février puis des différentes « vagues » mensuelles de recrues a été estimée à l'aide de différents indices obtenus avec le logiciel FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 1995) : le nombre d'allèles (N_{all}), la richesse allèlique (R_{all}) et l'hétérozygotie attendue sous l'équilibre de Hardy-Weinberg (H_e). L'adéquation à la composition génotypique attendue sous l'équilibre de Hardy-Weinberg a été analysée en calculant un estimateur de l'indice F_{is} et en réalisant un test exact de conformité à l'aide du logiciel GENEPOP V.4.0 (Rousset 2008a). Ces données ont été comparées aux données précédemment obtenues pour les populations spontanées de l'Aber Wrac'h.

b) Structure génétique et assignation statistique : origine des fondateurs et évolution temporelle

Afin de déterminer l'origine des individus fondateurs (premiers individus apparus dès le début du suivi, Janvier-Février, N=92), des tests d'assignations individuelles ont été effectués avec le logiciel GeneClass (Piry et al. 2004). La méthode utilisée est basée sur l'approche bayésienne développée par Rannala & Mountain (1997) qui détermine la probabilité d'appartenance d'un individu à une population source putative, en fonction de son génotype multilocus et des fréquences alléliques de la population source, sous l'hypothèse d'indépendance des locus et de l'équilibre aux proportions attendues sous l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Chaque individu est assigné à la plus probable des populations, parmi les populations putatives, ici les 5 populations établies dans l'Aber Wrac'h.

Afin de déterminer si la composition génétique varie au cours du temps au sein du port, l'indice F_{st} a été calculé entre les groupes d'individus nouvellement apparus entre mois successifs (en regroupant toutefois les mois d'avril et mai pour lesquels seule la moitié des pontons avait été prospectés) avec le logiciel GENEPOP V.4.0 (Rousset 2008a). Un test exact a été réalisé pour tester l'hypothèse nulle d'identité des fréquences alléliques entre ces groupes avec le même logiciel.

Par ailleurs, pour tester l'hypothèse que les individus apparus plus tard lors du suivi (*i.e.* de Mars à Juin) sont issus de la reproduction des groupes fondateurs dans le port plutôt qu'issus de la reproduction d'individus localisés dans l'estuaire, des tests d'assignation individuelles ont également été effectués selon la méthode décrite dans le paragraphe précédent, avec le logiciel GeneClass, en utilisant comme source putative les 5 populations de la baie ainsi que les deux groupes fondateurs apparus en Février.

c) Structure génétique de la population établie dans le port

La structure génétique au sein du port a été tout d'abord analysée par le calcul de l'estimateur de Weir & Cockerham (1984) de l'indice F_{st} et des tests exacts associés avec le logiciel GENEPOP V.4.0. Ces analyses ont été réalisées : (1) entre les deux groupes fondateurs apparus en Février 2008 et (2) entre les groupes occupant les 3 pontons où de forts effectifs (minimum 44 individus ; pontons C, N et S) ont été observés au pic de présence de l'algue (Avril-Mai 2008).

Les individus établis en Avril-Mai 2008 ont également fait l'objet de 3 types d'analyses : (1) un test du modèle d'isolement par la distance géographique individuelle (Rousset 1997) réalisé avec l'ensemble des individus du port ainsi qu'avec les groupes d'individus colonisant chacun des 3 pontons à forts effectifs (C, N et S). Le test de Mantel a été réalisé afin de tester l'indépendance entre les matrices de distances génétiques et spatiales entre paires d'individus avec le logiciel GENEPOP v.4.0. (2) Une analyse d'auto-corrélation spatiale a été effectuée sur les pontons les plus densément colonisés (C, N et S). L'analyse a été basée sur l'indice de Moran (Moran 1948) et le coefficient d'apparentement (Queller & Goodnight 1989) et effectuée avec le logiciel Spagedi 1.1 (Hardy & Vekemans 1999 ; Hardy & Vekemans 2002). Un test a été réalisé pour chaque indice. L'hypothèse nulle est que la valeur de l'indice calculée sur chaque classe de distances est identique à celles des autres classes de distances. (3) Enfin, afin d'analyser la distribution de la diversité génétique globale, à l'échelle du port, sans *a priori* sur leur regroupement en « populations » ou « groupes » en fonction de leur position le long des pontons, la totalité des individus présents en Avril-Mai (pic de densité ; $N_{ind.}=219$) ont été utilisés pour conduire une analyse « par regroupement » à l'aide du logiciel Structure 2.3.3 (Pritchard & Wen 2003). Sur la base des géotypes multi-locus de chaque individu, cette analyse permet de regrouper les individus en K groupes, chacun des groupes étant construit sur l'hypothèse d'un équilibre de liaison et d'Hardy-Weinberg, avec toutefois un modèle de fréquences alléliques corrélées. Les individus sont ensuite affectés à chacun de ces groupes en fonction de leur géotype multi-locus. Des simulations ont été réalisées avec des valeurs de K variant de 1 à 20 avec 5 itérations (burn-in de 150 000 et un pas de calcul de 50 000) pour chaque valeur de K .

IV-A.3. Résultats & Discussion

IV-A.3.1. Une arrivée tardive des premiers fondateurs

En septembre 2007, comme en décembre 2007, *U. pinnatifida* est absente sur les pontons du port de plaisance de l'Aber Wrac'h suite à leur mise en fonction en juin-juillet 2007. Nous n'avons pas réalisé au cours de ce suivi un inventaire précis et exhaustif des espèces colonisant les structures portuaires. Cependant, en septembre, nous avons noté la présence d'une importante couverture en algues vertes filamenteuses du type Ectocarpales sur l'ensemble des pontons. De même, en Décembre 2007, un cortège d'espèces est déjà présent sur les pontons, en particulier sur les côtés exposés au Nord des pontons N & S. Cet assemblage est composé notamment d'ascidies comme *Ciona intestinalis* (présente en densité

élevée), *Phallusia mamillata* ou *Styela clava* (espèce introduite) ainsi que de laminaires natives telles que *Saccorhiza polyschides* ou *Saccharina latissima* (Figure IV-A.4).

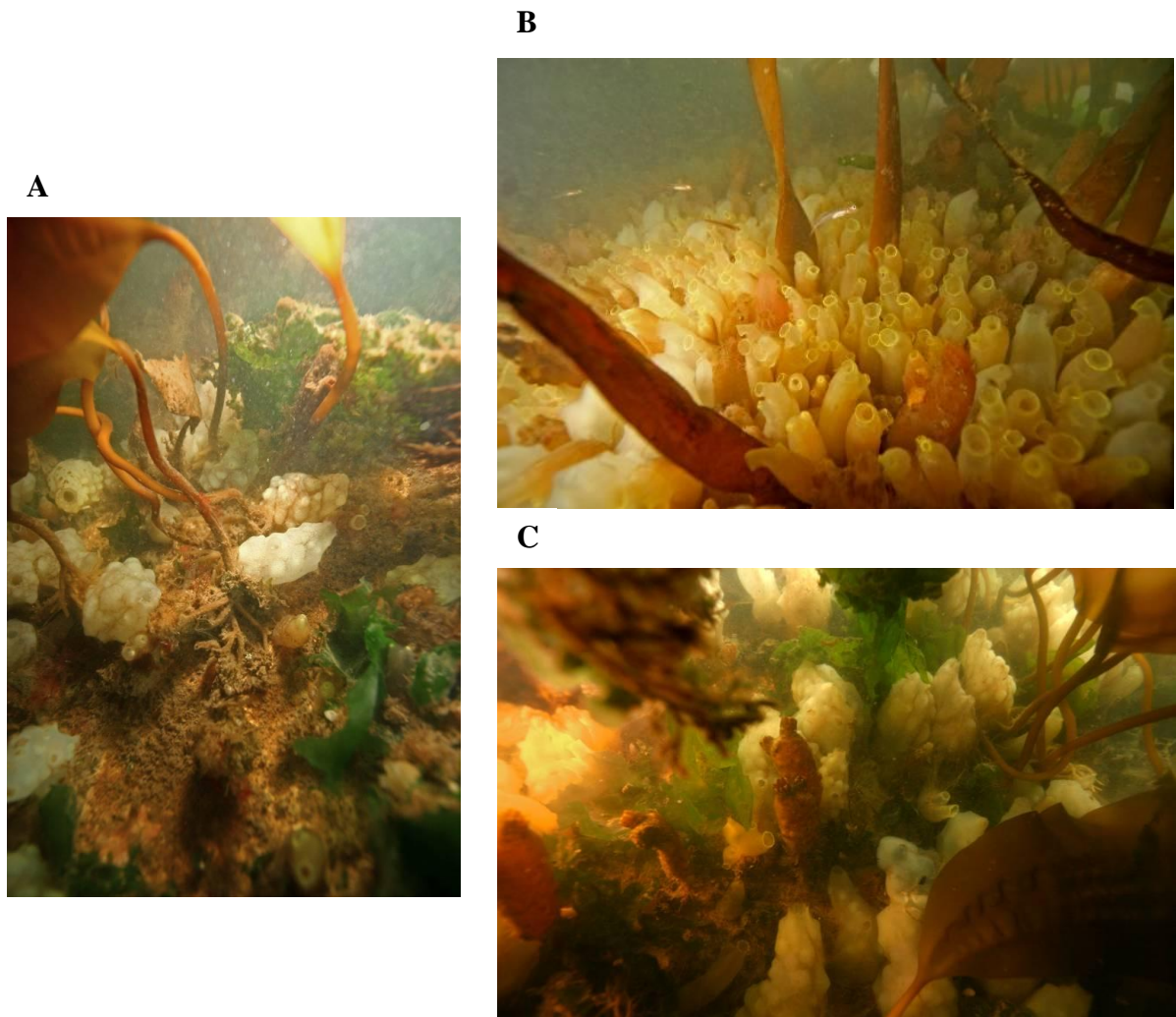


Figure IV-A.4 : Photographies réalisées le 6 décembre 2007 dans le port de l'Aber Wrac'h illustrant certaines des espèces en place parmi les plus abondantes.

On note en particulier des ascidies bosselées (*Phallusia mamillata*, en A), des bouquets de ciones (*Ciona intestinalis* en B) et l'espèce introduite *Styela clava* (ascidie plissée au centre de la photo C). Sur les différentes photos sont également visibles des laminaires (*Saccorhiza polyschides* en B) et *Saccharina latissima* (thalle visible en C).

Photographies réalisées par Yann Fontana (Station Biologique de Roscoff).

Les premières *U. pinnatifida* sont observées en Janvier 2008 : 3 individus sont notés au niveau des pontons Sud (une recrue ; S5-Sud) et C (un individu sur chacun des côtés Ouest & Est du ponton C) (voir Annexe 4A pour leur localisation précise), soit 7 mois après l'installation du port. Il est intéressant de noter que les premiers pontons colonisés sont en béton tandis que l'algue est absente des pontons A, AB, B et C en plastiques (flotteurs). Différentes études ont montré que les schémas de colonisation (abondance, composition, richesse spécifique) des structures artificielles sont fonction de nombreux paramètres environnementaux, par exemple des effets liés à l'ombrage (Glasby 1999), à la composition physico-chimique (Dafforn et al. 2009) ou à la nature des substrats (Beaumont et al. 2007). Aucune étude n'a été réalisée spécifiquement pour tester l'influence de ces facteurs sur *U. pinnatifida* mais il est possible qu'ils jouent un rôle dans la probabilité d'établissement de cette espèce, qui a des exigences écologiques importantes notamment en termes de lumière et d'exposition (Kim & Nam 1997 ; Liu et al. 2004).

Il existe un « temps de latence » dans la colonisation du port de l'Aber Wrac'h, par rapport à d'autres espèces. Ce délai avant l'apparition d'*U. pinnatifida* peut être expliqué par plusieurs facteurs. Dans le cas d'*U. pinnatifida*, la fixation et la germination des spores ne nécessite pas *a priori* de conditions particulières en terme de biofilms (Pérez et al. 1984). En revanche, le moment de présence de spores dans la colonne d'eau pourrait être un paramètre important. La phase de reproduction optimale d'*U. pinnatifida* en Bretagne Nord, et en particulier dans l'Aber Wrac'h, est centrée autour des mois de Mars à Juin (observation personnelle). Au moment de la mise en place des pontons en Juin-Juillet 2007, les populations naturelles voisines présentent néanmoins encore des individus matures. S'il n'existe pas de barrières à la dispersion (ex. durée de vie des spores trop courte pour atteindre le port), des spores sont donc potentiellement présentes dans la colonne d'eau. Cependant, les conditions environnementales en période estivale ne sont pas optimales pour la germination des spores et des gamétophytes d'*U. pinnatifida* : selon Thornber et al. (2004) la température pourrait jouer un rôle critique. Dans leur étude, réalisée dans une population d'*U. pinnatifida* établie dans un port de Californie, ces auteurs ont montré que la majorité des nouvelles recrues sont observées 2 mois après que les températures soient descendues sous un seuil de 15°C. Cet effet pourrait également expliquer le temps de latence assez long (8 à 12 mois) dans l'installation d'*U. pinnatifida* sur de nouveaux substrats (placés au cœur de populations déjà établies) dans des populations portuaires de Bretagne (Voisin 2007). Durant l'été, les températures dans le port de l'Aber Wrac'h étaient supérieures à cette valeur de 15°C et aurait ainsi pu limiter le

développement de nouveaux individus à un moment où les pontons n'étaient colonisés que par quelques algues filamenteuses. Ensuite, pendant la période automnale, des effets de compétition avec les espèces déjà en place ont pu limiter le succès du développement des jeunes sporophytes. Différentes études expérimentales *in situ* et des suivis de terrain (ex. expérience de recolonisation post-éradication). Valentine & Johnson (2003) et Valentine & Johnson (2005) ont suggéré que cette espèce est faiblement compétitrice et que son installation est d'autant plus efficace que les substrats sont faiblement colonisés. Nos résultats vont également dans ce sens.

Ainsi malgré un statut reconnu d'espèce pionnière (Castric-Fey et al. 1993), *U. pinnatifida* n'est pas parmi les premières espèces ayant colonisé les pontons du nouveau port de plaisance. Le moment où ces pontons ont été mis à l'eau pourrait être un élément important pour expliquer ce résultat. Il serait particulièrement intéressant de pouvoir suivre le recrutement sur des substrats vierges mis en place mensuellement afin d'explorer la validité de cette hypothèse.

IV-A.3.2. Dynamique d'établissement de la population

A partir de Février 2008, la colonisation du port de l'Aber Wrac'h par *U. pinnatifida* s'est amorcée et au cours des 5 mois qui ont suivis, nous avons assisté à une augmentation significative du nombre total de nouveaux individus observés ainsi qu'à une augmentation de la surface colonisée (Figure IV-A.5). Les résultats des comptages de nouveaux individus observés par date et par pontons sont résumés dans le Tableau IV-A.1. La localisation de chaque nouvel individu noté au sein du port est détaillée dans les cartes en Annexe 4A.

L'hétérogénéité observée initialement avec les tous premiers colonisateurs se maintient : la colonisation des différents pontons du port est hétérogène spatialement (Figure IV-A.6). Sur l'ensemble du suivi, les pontons C, N et S sont les plus fortement colonisés totalisant plusieurs centaines d'individus sur l'ensemble du suivi alors que le ponton A l'est très faiblement avec 4 individus observés au cours du suivi (Tableau IV-A.1).

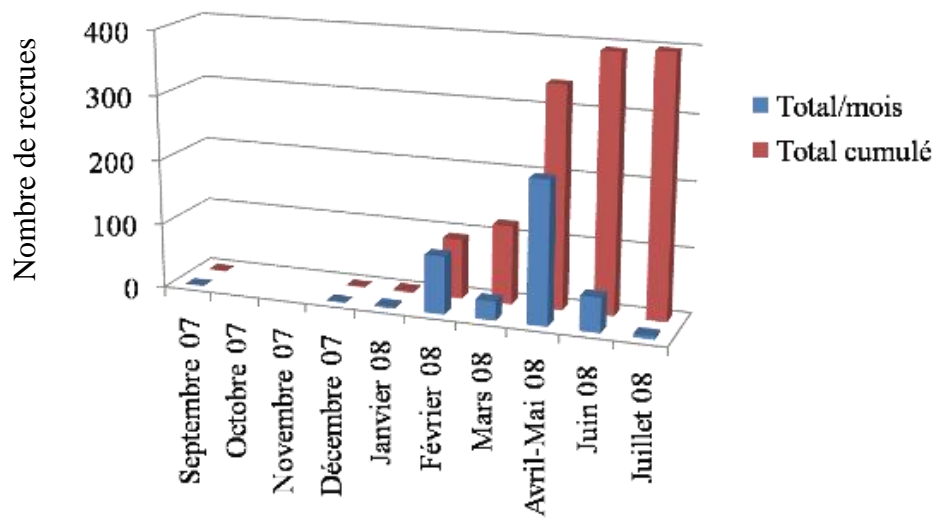


Figure IV-A.5 : Evolution temporelle des effectifs observés sur l'ensemble du port au cours du suivi.

L'histogramme bleu indique les effectifs observés chaque mois mettant en évidence deux périodes majeures d'apparition de nouveaux individus. L'histogramme rouge indique les effectifs cumulés mois après mois. Les données des mois d'Avril et Mai 2008 ont été sommées car, compte-tenu des densités, tous les pontons n'avaient pas pu être observés en une fois.

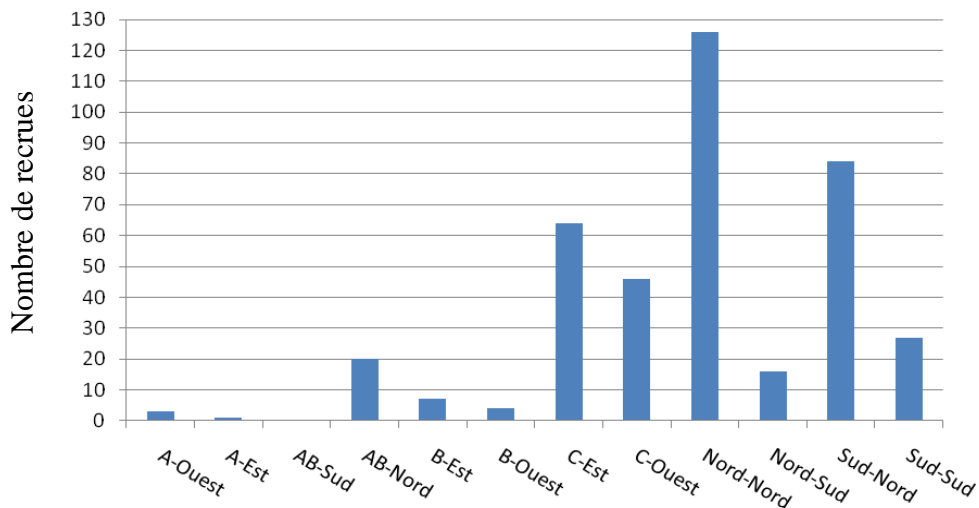


Figure IV-A.6 : Répartition dans l'espace des individus d'*U. pinnatifida* apparus en 2008 dans le port de plaisance

Les chiffres correspondent à une somme cumulée des observations jusqu'en juillet 2008 inclus. A noter que certaines zones à très forte densité ne sont pas présentées ici.

Deux épisodes majeurs d'installation sont notés (Figure IV-A.5). Tout d'abord, en Février 2008, une « population » relativement dense d'*U. pinnatifida* apparaît en un point du port : le côté nord du ponton N (Tableau IV-A.1 ; Annexe 4A). L'espèce reste en revanche rare dans les autres zones du port de plaisance. Les côtés exposés au Nord sont davantage soumis aux courants de marée ainsi qu'à la houle. Ils sont ainsi à la fois plus propices à recevoir de nouveaux individus depuis des populations établies dans le milieu naturel mais également des environnements plus battus. Or *U. pinnatifida* a longtemps été considérée comme une espèce plutôt caractéristique des zones abritées (mais à forts hydrodynamisme ; Castric-Fey et al. 1993). Des études récentes Russell et al. (2008) ont montré qu'elle pouvait néanmoins coloniser un large spectre d'habitats y compris des zones relativement exposées. Nos observations supportent ces dernières observations. Ensuite, un second pic d'apparition de nouveaux individus est observé pendant les mois d'Avril et Mai 2008 (Figure IV-A.5 ; Tableau IV-A.1). Cette période de forte présence de l'algue correspond au cœur de la période de présence d'*U. pinnatifida* dans les autres populations de la baie.

Ainsi, après une assez longue période de latence dans l'apparition d'*U. pinnatifida*, une augmentation importante du nombre de colonisateurs mimant un effet « boule de neige » a été observé avant une disparition des individus vers le mois de Juillet, à l'instar des observations réalisées dans les autres populations portuaires ou naturelles d'*U. pinnatifida* des côtes de Bretagne Nord (Voisin 2007).

IV-A.3.3. Une origine multi-source des premiers colonisateurs

L'apparition d'un premier groupe de 63 individus en un point du port (« groupe 1 » situé côté Nord du ponton N) en Février 2008, nous a conduit à tester l'hypothèse que ces individus puissent être issus d'une source quasi-unique de propagules. Cet événement de colonisation spatialement restreint pouvait en effet résulter de l'interaction entre un événement de dispersion d'une pluie de propagules émises de façon synchrone par des individus établis dans une population avoisinante et des conditions environnementales favorables. L'hypothèse complémentaire était que cette origine serait différente de celle(s) à l'origine des autres individus présents en Février 2008 dispersés sur plusieurs pontons dans le port (N=26 ; « groupe 2 »). Les analyses de diversité et de structure génétique réalisées sur ces deux groupes n'ont en fait validé que partiellement ces hypothèses.

Tableau IV-A.2 : Diversité génétique (A) des 2 groupes d'individus fondateurs (Février) puis des groupes répertoriés chaque mois dans le port de l'Aber Wrac'h, (B) des groupes d'individus présents sur les 3 pontons les plus colonisés du port en avril-mai, et (C) comparaison aux 5 populations établies dans l'estuaire (Figure III.2, chapitre I)

Pour chacun des groupes d'individus, les indices de diversité suivant ont été estimés : nombre d'allèle moyen par locus (N_{all}), richesse allélique (R_{all}), hétérozygotie attendue (H_e). La composition génotypique relative aux proportions attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg est analysée avec l'indice F_{is} et un test exact de conformité (valeur de la probabilité, P).

Groupes	N	N_{all}	R_{all}	H_e	F_{is}	P
(A) Port-temporel						
Février -Groupe 1 (N_Nord)	63	2.22	2.15	0.316	0.396	10^{-6}
Février - Groupe 2 (Tout sauf N-nord)	26	2.33	2.33	0.321	0.248	0.011
Mars	29	2.44	2.42	0.302	0.292	10^{-6}
Avril+Mai	219	2.89	2.44	0.309	0.181	10^{-6}
Juin	45	2.22	2.16	0.300	0.167	10^{-6}
(B) Port-Spatial (Avril-Mai)						
Ponton C	73	2.55	1.84	0.307	0.131	$<10^{-6}$
Ponton N	59	2.66	1.92	0.316	0.299	$<10^{-6}$
Ponton S	58	2.44	1.76	0.273	0.084	0.148
Total port	385	2.89	2.41	0.315	0.241	10^{-6}
(C) Estuaire						
Basse la Croix (BLC)	32	2.00	1.71	0.282	0.140	0.146
Breac'h Ver (BV)	40	2.00	1.78	0.312	0.162	0.022
Roches aux Moines (RAM)	32	2.11	1.67	0.229	0.137	0.032
Coffre (COF)	37	2.11	1.79	0.315	0.263	0.001
Camaleut (CAM)	31	1.88	1.62	0.233	0.355	0.001
Moyenne estuaire	34.4	2.02	1.71	0.274	0.211	-

En effet, les deux groupes fondateurs présentent des diversités génétiques supérieures à celles des populations spontanées présentes dans l'estuaire (Tableau IV-A.2), que ce soit en termes de richesse allélique (2.15, 2.30 et 1.71 dans les groupes 1, 2 et en moyenne dans les populations estuariennes) ou d'hétérozygotie attendue (0.32, 0.32 et 0.27). Cette forte diversité génétique et de forts déficits en hétérozygotes, en particulier dans le groupe 1, suggèrent l'absence d'effets de fondation depuis une source unique et l'existence d'un effet Walhund local (*i.e.* mélange entre groupes d'individus génétiquement différenciés) dans les groupes fondateurs de la population portuaire.

Les résultats des analyses d'assignation (Figure IV-A.7-A) tendent également à supporter cette interprétation. En effet, les individus du groupe 1 sont assignés à quatre populations de la baie (BLC, BV, RAM et COF ; Figure IV-A.2) avec cependant une majorité d'individus assignés à la population « Coffre » (57.14%). Ces populations établies dans l'estuaire sont génétiquement différenciées (Chapitre I). Cette hétérogénéité génétique des sources est en accord avec les déficits en hétérozygotes importants observés dans le groupe 1 (Tableau IV-A.2). Cette hétérogénéité de sources est également observée pour le groupe 2, et ce quelle que soit leur localisation dans le port. La population « Coffre » apparaît encore comme une source importante à l'origine de ces individus (51.72%).

Les taux d'assignation importants sur la population « Coffre » semblent cohérents en regard des capacités de dispersion naturelle d'*U. pinnatifida*. En effet, la dispersion des spores est certainement limitée par leur courte durée de vie (Suto 1950 ; Forrest et al. 2000 ; Silwa et al. 2006) or la population « Coffre » est la plus proche du port (environ 200m) et fait « face » au côté Nord du ponton Nord (groupe 1). Néanmoins, des pourcentages d'assignation non négligeables ont été également observés pour d'autres populations situées loin du port. Les populations RAM et BLC apparaissent comme des sources potentielles importantes bien qu'éloignées (ex. BLC est à plus de deux kilomètres). Ce résultat suggère des événements « rares » de dispersion à longue distance qui peuvent impliquer soit le transport de spores du fait des importants courants présents dans le chenal, soit de thalles matures dérivants. Les nombreuses activités nautiques et aquacoles dans l'Aber Wrac'h (ex. présence de parcs ostréicoles, d'élevages d'ormeaux et de saumons, navettes touristiques, centre de voile et de plongée) sont autant de facteurs qui pourraient accentuer l'arrachage d'individus matures dans les populations avoisinantes et favoriser ainsi des événements de dispersion à plus grande distance (Silwa et al. 2006).

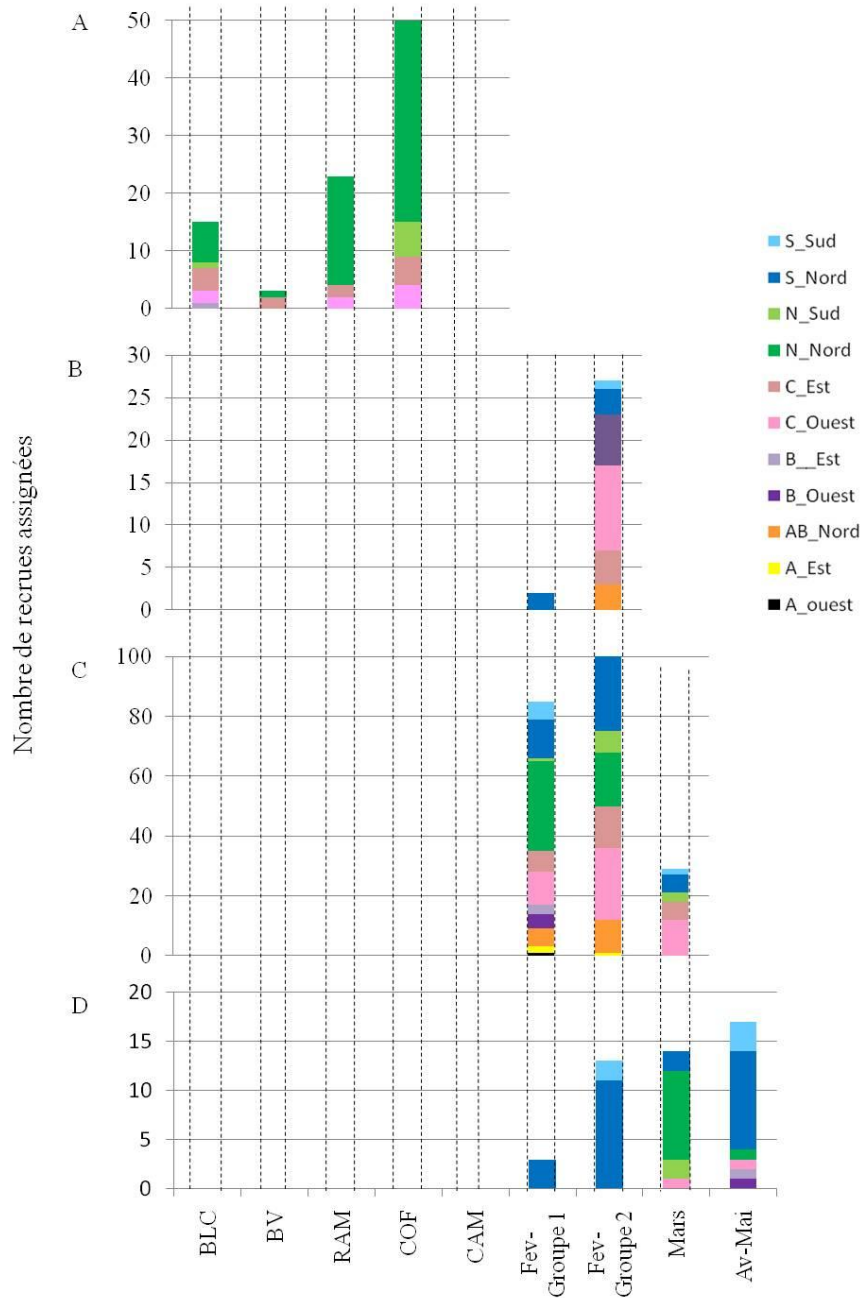


Figure IV-A.7 : Résultats des tests d'assignation des individus apparus au cours de l'année 2008 dans le port de l'Aber Wrac'h

Les couleurs à l'intérieur de chaque barre font référence à la localisation des individus assignés. Les ordonnées sont des effectifs. La légende de l'axe des abscisses du graphe indique les populations sources potentielles.

A : Assignation des individus des « groupes fondateurs » apparus en Février 2008. Les populations sources utilisées sont les populations établies dans l'estuaire

B : Assignation des individus apparus en mars 2008. Les populations sources sont les populations établies dans l'Aber Wrac'h ainsi que les deux groupes d'individus fondateurs.

C : Assignation des individus apparus en Avril-Mai. Les populations sources utilisées sont les même qu'en B, plus les individus apparus en Mars

D : Assignation des individus apparus en Juin. Les populations sources utilisées sont les même qu'en C, plus les individus apparus en Avril-Mai.

Enfin, ces analyses montrent que les deux groupes de fondateurs ne montrent pas tout à fait le même profil d'assignation. Notamment, les individus provenant du ponton N-Nord montrent une plus forte assignation à la population RAM que les individus du groupe 2 (30.16% contre 13.79%), et inversement avec la population BLC (11.1% contre 27.59%). Ceci est congruent avec le fait que le groupe 1 soit génétiquement différencié du groupe 2 ($F_{st}=0.024$; $P<10^{-4}$).

Ainsi, il apparaît que notre hypothèse d'une origine différenciée entre les deux groupes de fondateurs semble relativement soutenue mais que chacun de ces groupes résulte d'événements multiples d'arrivées de propagules depuis des sources génétiquement diversifiées. On retrouve ainsi à une échelle locale un schéma largement documenté à une échelle globale chez de nombreuses espèces introduites (Roman & Darling 2007) qui met en avant la pression de propagules (Simberloff 2009) comme un élément clé dans l'installation de nouvelles espèces.

IV-A.3.4. Hétérogénéité spatiale et évolution des sources au cours de l'expansion

Nous avons souligné plus haut qu'une importante progression spatiale de la colonisation du port avait été observée au cours du suivi avec toutefois certains pontons plus fortement colonisés que d'autres. Nous avons cherché à décrire plus finement ces schémas de colonisation notamment en termes d'agrégation des individus à l'échelle de chacun des pontons, en travaillant avec une approche de type « transect ». En effet, sur le terrain, les individus d'*U. pinnatifida* semblent souvent être distribués de façon non aléatoire et par « patchs »; cette distribution pourrait résulter de micro-variations environnementales, certaines plus favorables à l'installation de cette espèce.

Les analyses de la distribution spatiale des individus le long de 10 transects ont révélé des schémas variables selon les pontons mais similaires pour les deux côtés d'un même ponton (Tableau IV-A.3).

Tableau IV-A.3 : Analyse par transect (ponton-exposition) de la distribution des individus établis aux mois d'Avril et Mai 2008.

N : nombre d'individus ; *ID* : indice de dispersion ; *P* : valeur de la probabilité associée au test de dispersion ; Distribution : interprétation du schéma de distribution telle que révélé par l'analyse de dispersion ; lacunarité : interprétation du schéma de distribution telle que révélé par de l'analyse de lacunarité (cf. graphiques présentés en Annexe 4B).

Transect	N	ID	P	Distribution	Lacunarité
A-Est+Ouest	4	0.976	0.560	Aléatoire	Aléatoire
AB-Nord	17	2.617	0.000	Agrégée	Agrégée
B-Ouest	5	0.973	0.577	Aléatoire	Aléatoire
B-Est	3	0.986	0.530	Aléatoire	Aléatoire
C-Ouest	47	2.065	0.000	Agrégée	Agrégée
C-Est	26	2.315	0.000	Agrégée	Agrégée
N-Nord	48	1.074	0.249	<u>Aléatoire</u>	<u>Agrégée</u>
N-Sud	11	0.939	0.689	Aléatoire	Aléatoire
S-Nord	44	2.494	0.000	Agrégée	Agrégée
S-Sud	14	1.204	0.041	Agrégée	Agrégée

A l'exception du transect N-Nord, les résultats sont identiques avec les deux types d'analyses menées (indice de dispersion et analyse de lacunarité). Si on considère l'indice de dispersion, la distribution d'*U. pinnatifida* s'avère « agrégée » dans 5 cas sur 10 et « aléatoire » dans les autres cas. Une grande part de ces résultats s'explique par la combinaison de deux facteurs : (1) les très faibles effectifs qui ont pu être pris en compte dans ces analyses et (2) la dynamique de colonisation au sein de chacun de ces transects, avec une interaction entre ces deux facteurs. En effet, sur la période totale du suivi, certains transects comptent moins de 10 individus, répartis en différents points et leur distribution est aléatoire (ex. B-Est, B-Ouest et A-Ouest+Est). A l'opposé, certains transects sont fortement colonisés et leur distribution est majoritairement de type agrégée (ex. C-Est, C-Ouest, S-Nord). Il semble que les premiers stades de colonisation soient plutôt aléatoires mais que la poursuite de l'établissement de nouveaux individus se fasse de façon agrégée autour de ces « premiers noyaux » (Figure IV-A.8).

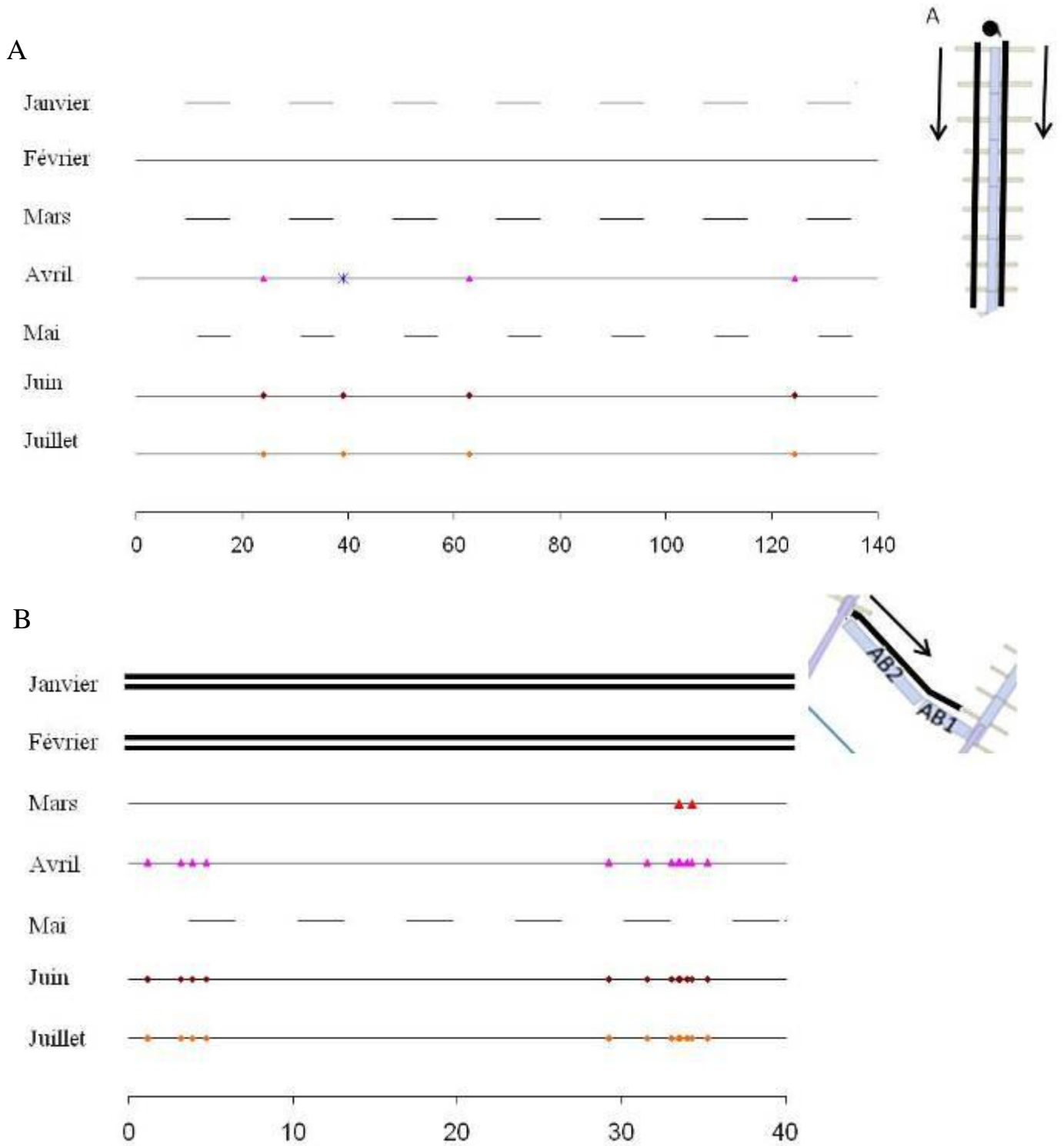


Figure IV-A.8: Evolution de la colonisation par *U. pinnatifida* le long des pontons (A) A-Est & Ouest et (B) AB-Nord.

Les lignes pointillées représentent les mois sans observation et les lignes doubles en gras indiquent l'absence de pontons à cette date. Le petit dessin en haut à droite de chaque graphique indique l'orientation du transect. En A, la petite croix bleue du mois d'avril représente l'individu unique du ponton A, exposé à l'Ouest.

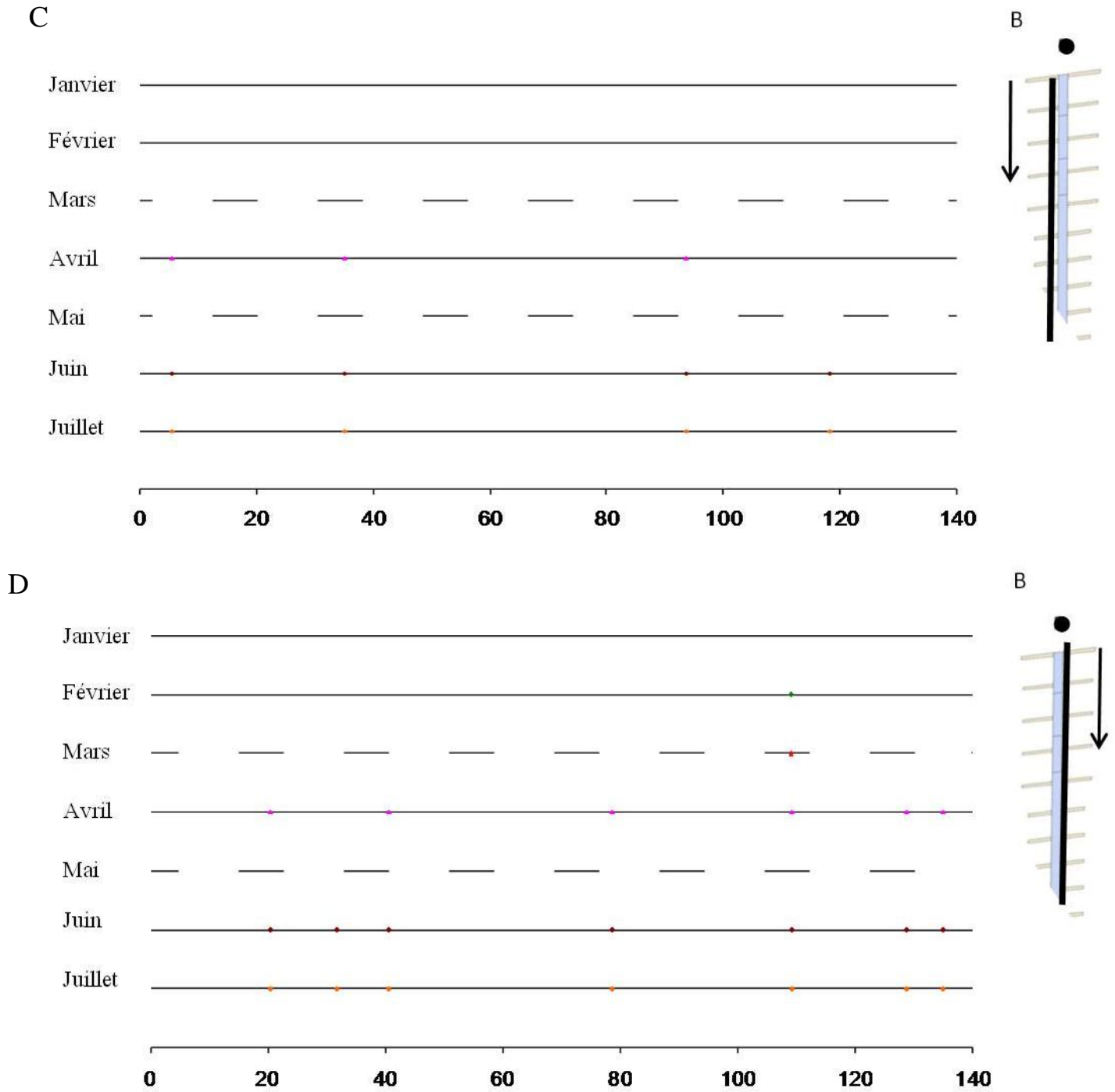


Figure IV-A.8 (suite): Evolution de la colonisation par *U. pinnatifida* le long des pontons (C) B-Ouest et (D) B-Est.

Les lignes pointillées représentent les mois sans observation. Le petit dessin en haut à droite de chaque graphique indique l'orientation du transect.

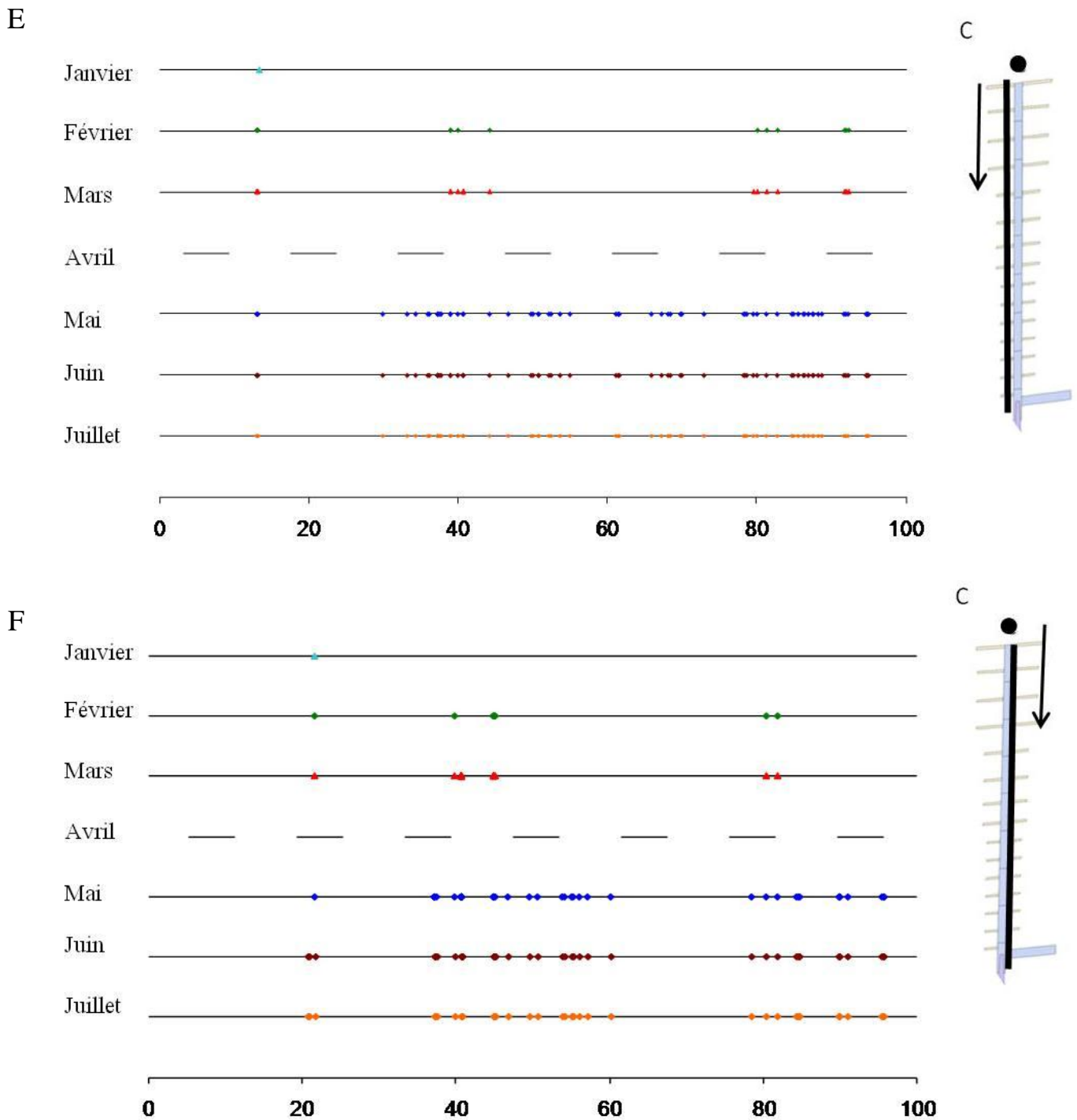


Figure IV-A.8 (suite): Evolution de la colonisation par *U. pinnatifida* le long des pontons (E) C-Ouest et (F) C-Est.

Les lignes pointillées représentent les mois sans observation. Le petit dessin en haut à droite de chaque graphique indique l'orientation du transect.

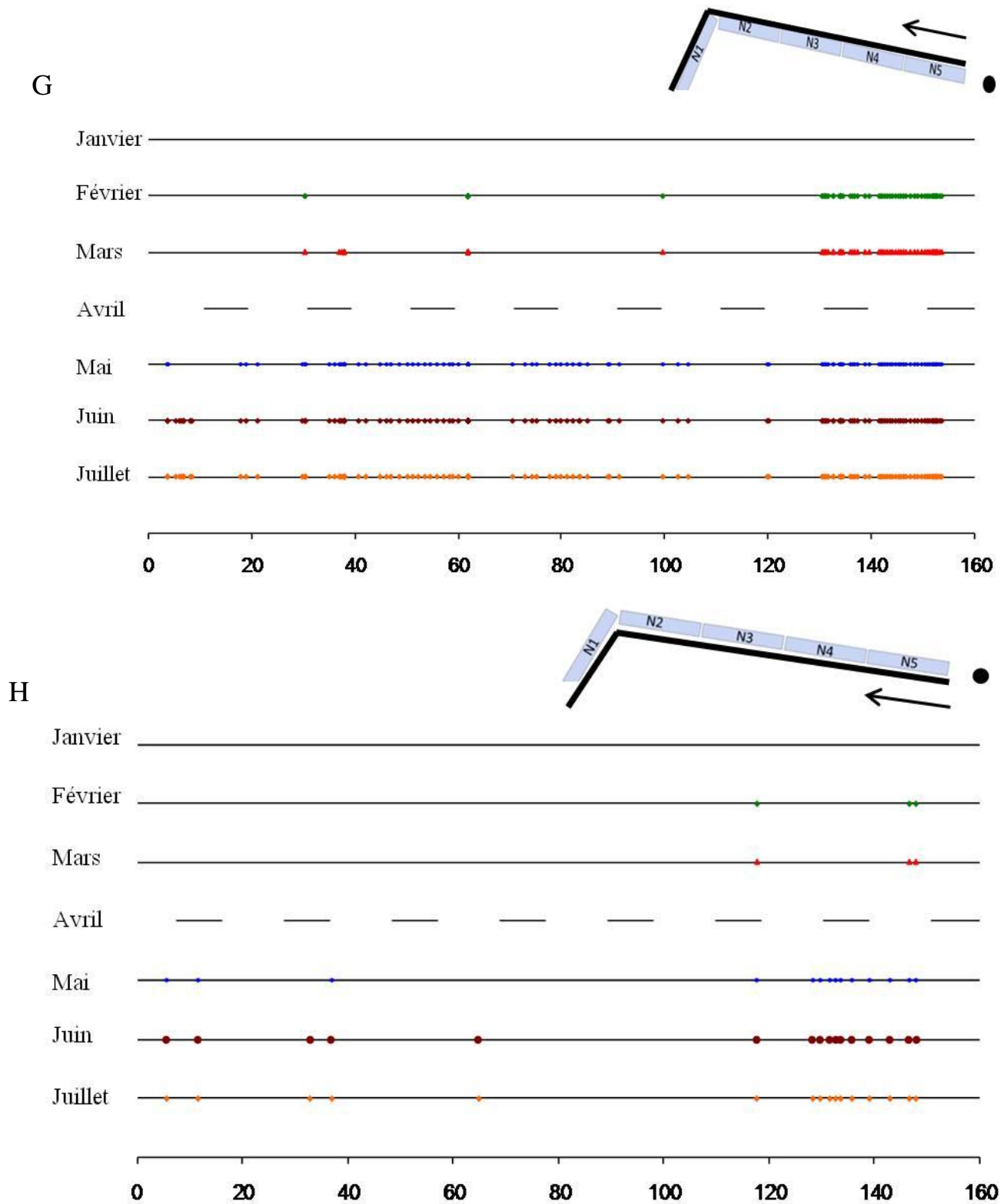


Figure IV-A.8 (suite): Evolution de la colonisation par *U. pinnatifida* le long des pontons (G) N-Nord et (H) N-Sud.

Les lignes pointillées représentent les mois sans observation. Le petit dessin en haut à droite de chaque graphique indique l'orientation du transect.

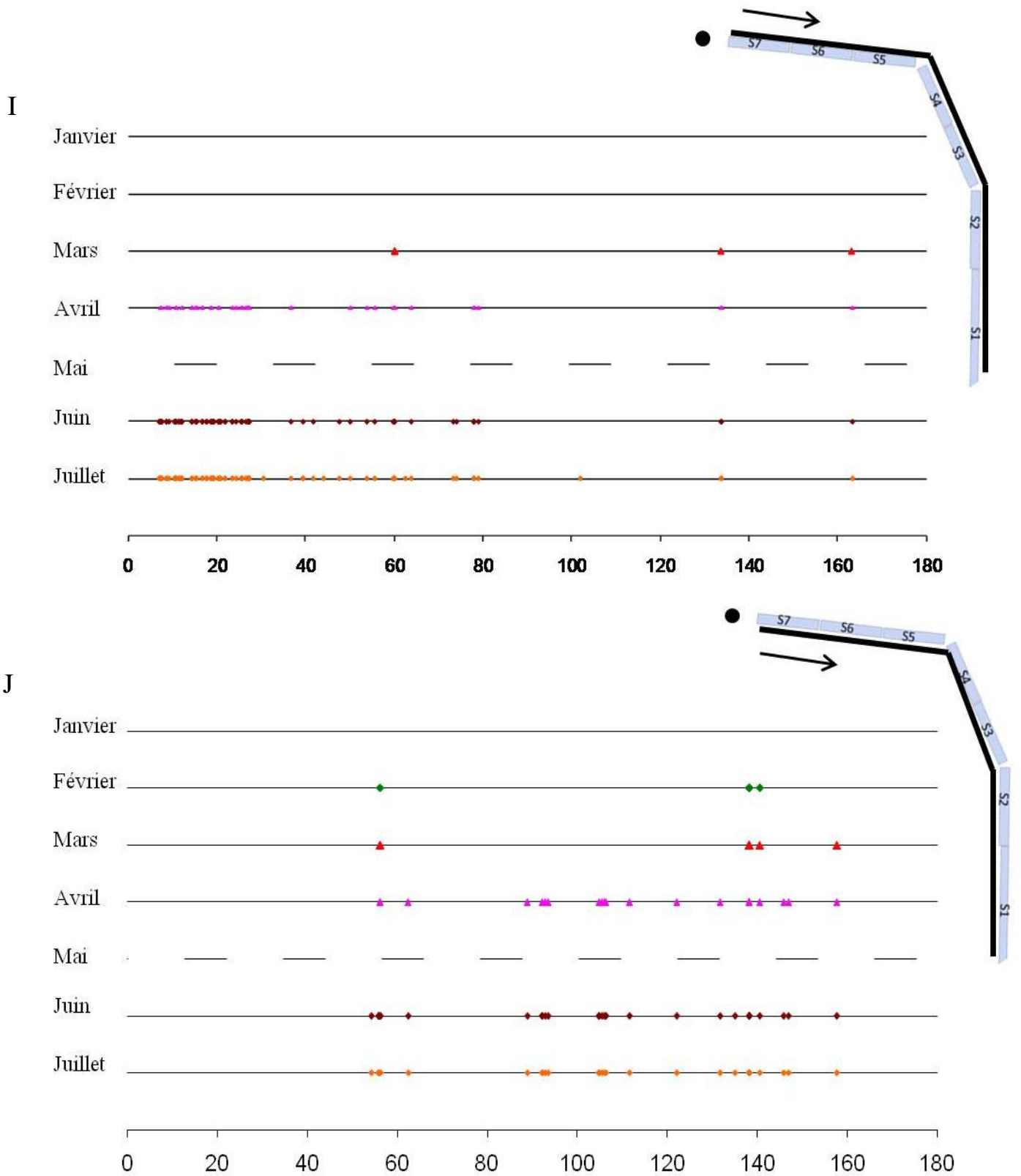


Figure IV-A.8 (suite): Evolution de la colonisation par *U. pinnatifida* le long des pontons (I) S-Nord et (J) S-Sud.

Les lignes pointillées représentent les mois sans observation. Le petit dessin en haut à droite de chaque graphique indique l'orientation du transect.

Les mesures de taille et d'état de maturité réalisées au cours du suivi (Tableau IV-A.4) montrent que les individus ont en moyenne la même taille et que dès le mois de Mars, une part significative d'individus est sexuellement mature (*i.e.* développement de sporophylles).

Tableau IV-A.4 : Taille moyenne et maturité sexuelle des individus établis à chaque mois du suivi

Pour chaque mois d'observation sont indiqués la moyenne et l'écart-type (σ) de la longueur du stipe (en cm) ainsi que le pourcentage d'individus matures. (1) calcul effectué sur 3 individus.

Mois	Moyenne (cm)	Ecart-type	% d'ind. matures
Janvier ¹	8.67	9.86	33.33%
Février	4.29	2.48	6.74%
Mars	7.40	4.99	20.69%
Avril	10.20	4.24	57.83%
Mai	13.49	5.13	76.52%
Juin	12.61	6.89	73.81%
Juillet	11.00	1.41	100.00%

Ceci est tout à fait cohérent en regard des données de la littérature (ex. Castric-Fey et al. 1999a) et de précédents suivis réalisés au cours de la thèse de Marie Voisin dans 2 ports bretons. Dans cette dernière étude, un suivi individuel de croissance et d'état reproducteur avait mis en évidence des taux de croissance très importants (*i.e.* valeurs de croissance mensuelles maximales comprises entre 45cm et 60.50cm) et l'acquisition d'un état reproducteur en moins d'un mois. Dans notre cas, il n'est pas possible d'établir un taux de croissance compte-tenu du pas de temps de notre étude et du fait que nous n'avons pas suivi les individus en place mais observé les nouveaux individus (*i.e.* colonisation). Néanmoins, l'observation d'un pic de maturité sexuelle au mois de Mai, avec plus de 76.52% d'individus matures, suggère des caractéristiques analogues. Ainsi, il est possible que les premiers individus fondateurs aient pu se reproduire et laisser des descendants aux environs, de même pour les individus des mois suivants. La reproduction des individus en place au cours d'un mois donné associée à des dispersions à courte distance serait susceptible de créer des distributions de type agrégée le mois (ou les mois) suivant(s).

Les analyses génétiques nous permettent d'obtenir des éléments de réponse complémentaire concernant cette hypothèse et plus généralement le mode de colonisation. Si

l'hypothèse de noyaux fondateurs et localement reproducteurs est vraie, alors nous devrions d'une part pouvoir montrer que l'expansion observée après Février résulte d'événements de reproduction locale (*i.e.* intra-zone portuaire) et qu'il existe une plus grande similarité génétique (*i.e.* apparemment) entre des individus spatialement proches.

Ce scénario semble soutenu par les résultats des analyses d'assignation des individus apparus au cours des mois de Mars, Avril-Mai et Juin. En effet, les recrues de Mars sont en très grande majorité (93%) assignées aux individus du « groupe fondateur 2 ». Les deux autres individus (7%), présents sur S-Nord, sont assignés au « groupe fondateur 1 » (Figure IV-A.7-B). Ce schéma se répète pour les individus apparus en Avril-Mai (Figure IV-A.7-C) : presque 50% sont assignés au « groupe 2 », et 39% au « groupe 1 » (dont 15% échantillonnés au sein de ce groupe suggérant de l'autorecrutement local ; Figure IV-A.7-C). Quelques individus (12,8%) échantillonnés en Avril-Mai sont même assignés aux individus échantillonnés en Mars malgré les faibles taux de maturité sexuelle enregistrés alors (20.69% ; Tableau IV-A.4). Enfin pour les individus arrivés en Juin, les assignations montrent des pourcentages partagés entre les différentes vagues d'arrivée observées au cours des mois précédents (Figure IV-A.7-D). On note que les nouveaux individus échantillonnés aux mois d'Avril-Mai sont déjà des sources potentielles (36.17% des individus de Juin sont assignées à l'échantillonnage d'Avril-Mai). Par ailleurs, on note une forte diminution de la contribution des individus apparus en Février notamment sur le ponton N-Nord. Ces derniers résultats pourraient s'expliquer par la mortalité des sporophytes d'*U. pinnatifida* arrivés tôt dans la saison, cette espèce étant très peu longévive (2-3 mois; Voisin 2007). Ces résultats d'analyse d'assignation temporelle permettent ainsi de contraster deux ensembles d'individus : (1) les groupes fondateurs dont l'origine semble être multi-source depuis des populations situées dans l'Aber et (2) les groupes de colonisateurs apparus par la suite qui ne sont jamais assignés à ces populations de l'estuaire mais toujours à des groupes d'individus préalablement établis au sein du port.

Afin d'affiner nos scénarios et tester l'hypothèse d'une colonisation de proche en proche, j'ai dans un dernier temps étudié les relations entre la distance génétique et la distance géographique au sein du port et au sein des pontons.

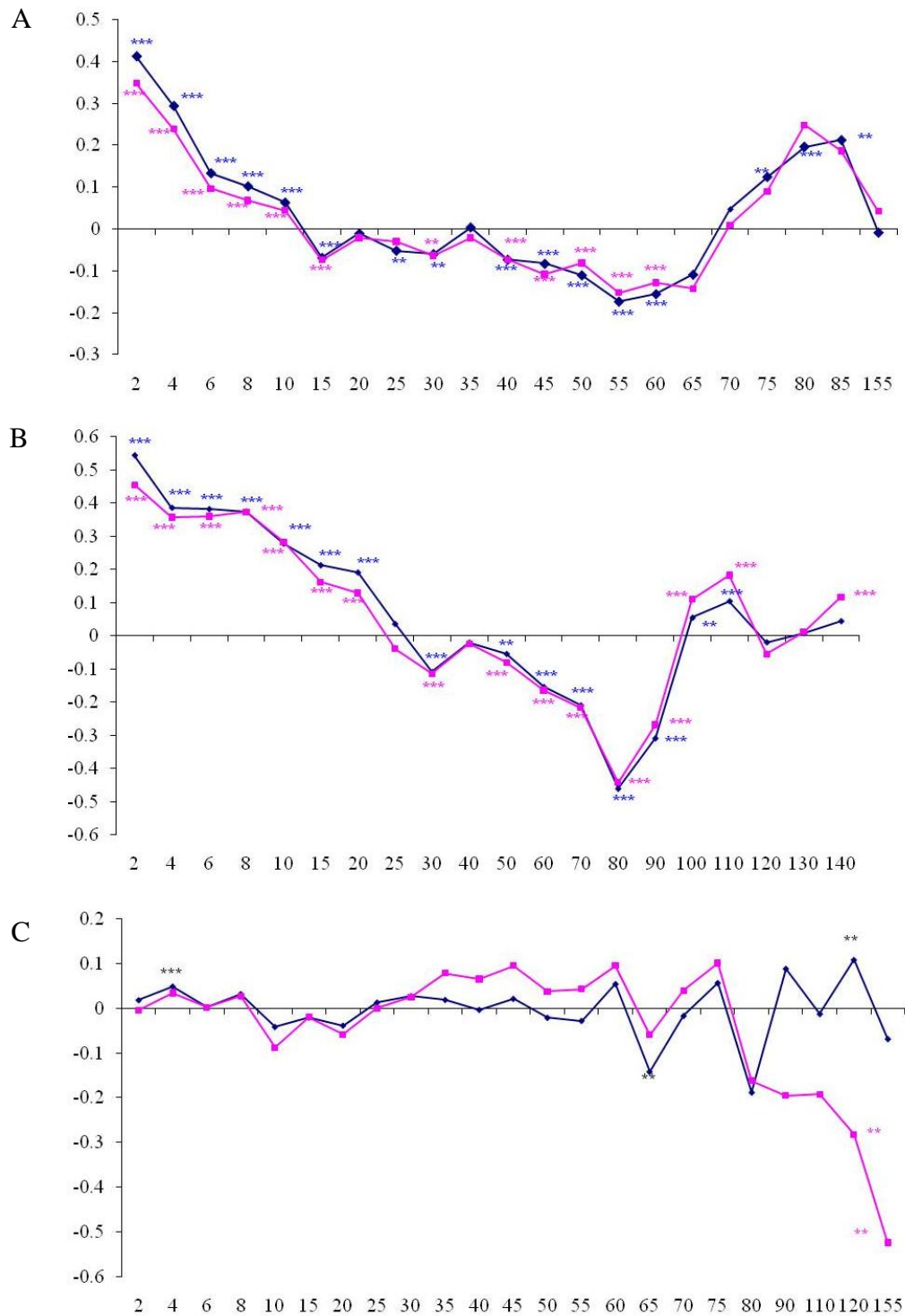


Figure IV-A.9: Autocorrélogramme analysant la proximité génétique des individus présents sur les pontons caractérisés par les plus fortes abondances en *U. pinnatifida*.

En bleu est représenté l'indice de Moran et en rose le coefficient d'apparentement. En A figure le ponton C-Est+Ouest, en B, le ponton Nord-Nord et en C, le ponton Sud-Nord.

Les tests d'adéquation au modèle d'isolement par la distance suggèrent une telle relation : les tests de Mantel sont en effet significatifs pour les pontons C ($P < 10^{-4}$) et N ($P = 0.023$). En revanche il n'est pas significatif pour le ponton S ($P = 0.182$) (voir Annexe 4C). Les analyses d'auto-corrélation spatiale basées sur l'étude de l'indice de Moran et du coefficient d'apparement (Figure IV-A.9) montrent de fortes corrélations positives significatives pour les premières classes de distances pour les pontons C (5 classes de 0 à 10m; Figure IV-A.9a) et Nord (7 classes de 0 à 20m; Figure IV-A.9b). Les auto-corrélogrammes indiquent donc un fort effet d'apparement entre individus au sein des classes de distances. De plus, la méthode par regroupement individuel (logiciel Structure) détecte des regroupements d'individus très proches sur ces deux pontons (Figure IV-A.10).

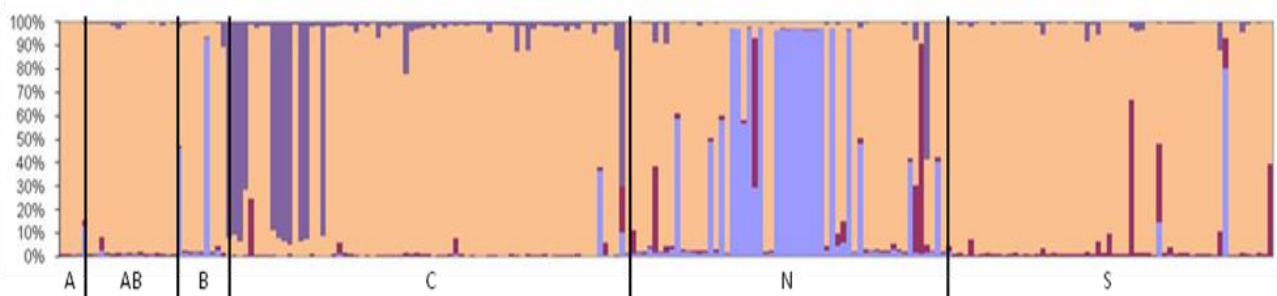


Figure IV-A.10 : Assignation individuelle aux 4 groupes identifiés par l'analyse de regroupement (logiciel STRUCTURE).

Pour chaque individu (représenté par une mince ligne verticale) est indiqué la probabilité postérieure d'appartenance à chacun des 4 groupes (*i.e.* clusters) identifiés lors de l'analyse de regroupement. Chaque groupe est identifié par une couleur et les individus sont classés par pontons.

Par exemple, les individus qui composent le « groupe 1 » (représentant 9.13% du total des individus) sont, à l'exception d'un seul (échantillonné sur le ponton S-Sud), tous des individus observés sur le ponton N-Nord et situés entre 40m et 120 m sur le transect. De même le « groupe 4 », qui contient 5.48% des individus analysés, regroupe pour la plupart des individus s'étalant sur 10m le long des transects C-Ouest et C-Est. Ces différentes analyses suggèrent donc une très forte structure de la population établie en lien avec la reproduction des individus locaux. Ces résultats ne sont toutefois pas généralisables à l'ensemble de la zone portuaire. Par exemple, pour le ponton S-Nord, aucune corrélation positive significative n'est observée, excepté pour la deuxième classe de distance à 4m pour l'indice de Moran (Figure IV-A.9-C). Par ailleurs, les analyses d'auto-corrélation spatiales ont également mis en évidence des pics d'apparement significatifs pour des classes de distances éloignées. Par exemple, au sein du ponton C-Ouest+Est, deux pics sont observés dans les classes 75 à 85m (0.12 à 0.2, indice de Moran). De même avec la méthode de regroupement qui associe au sein

du « groupe 3 » des individus largement distribués dans l'espace (pontons S, A et B ; Figure IV-A.10).

L'ensemble de ces résultats semblent donc généralement soutenir notre hypothèse d'une reproduction des individus déjà en place associée à des dispersions majoritairement à courte distance, ce qui est en accord avec les observations déjà réalisées dans les précédents chapitres ainsi qu'avec les données de la littérature (Suto 1950; Forrest et al. 2000). Néanmoins, la reproduction des individus en place est également associée à des événements de dispersion à plus longue distance, qui sont également perceptibles sur le ponton S. Le mécanisme pourrait être la dispersion des sporophytes matures (Russell et al. 2008) en dehors d'« opérations anti-fouling » réalisées pour nettoyer les pontons des nombreuses espèces qui s'y développent et qui gênent les activités portuaires (observations personnelles, Mars 2010).

IV-A.4. Conclusion: une colonisation efficace et pérenne

Cette étude a permis de mettre en évidence qu'*U. pinnatifida* était capable de coloniser en l'espace de quelques mois un substrat artificiel vierge par le biais des populations établies en milieu naturel dans l'Aber Wrac'h. L'expansion rapide de la population semble être due à la reproduction des individus déjà en place les mois précédents, et notamment des groupes d'individus fondateurs.

Nous retrouvons ici des schémas que nous avons mis en évidence en milieu naturel (Chapitre III) ainsi qu'à une échelle régionale et locale (Chapitre I et II) : une dispersion efficace à courte distance et largement déterminée par la reproduction des individus locaux.

La densité initiale et la répartition des individus fondateurs semblent jouer un rôle important dans la distribution des individus au moment du pic de présence de l'algue. Cette propagation apparente autour de noyaux fondateurs reproducteurs suggère que ce ne sont pas des variations environnementales qui sont responsables de la colonisation initiale hétérogène des individus mais l'effet du hasard dans l'installation des propagules. Des modèles hydrodynamiques fins décrivant la courantologie dans le port pourraient permettre de renforcer cette hypothèse. On ne peut toutefois pas exclure des influences environnementales, et notamment l'influence d'effets d'ombrage liées à la présence de bateaux (Glasby 1999). Par exemple, concernant le transect S-Sud, la distribution temporelle des recrues présente un espace vide même en fin de suivi (entre 95 et 105m ; voir figure IV-A.8-H) qui correspond à l'emplacement pérenne d'un bateau de pêche. De même pour le transect S-nord où plusieurs

espaces vides séparent des individus uniques (entre les positions 100 et 170 m sur le transect, Figure IV-A.8-G) qui correspondent à l'emplacement du bateau de la SNSM (en section S3) et de la navette inter-îles des Abers (en section S4). De manière générale, les bateaux à quai créent des effets d'ombrage voire de friction qui perturbent la couverture algale. L'hétérogénéité spatiale et l'évolution temporelle observée est ainsi le résultat des conditions environnementales hétérogènes (différences d'exposition), des activités anthropiques au sein du port (ex. nettoyage des pontons) et des caractéristiques biologiques de l'espèce (notamment un cycle de vie court avec une reproduction efficace).

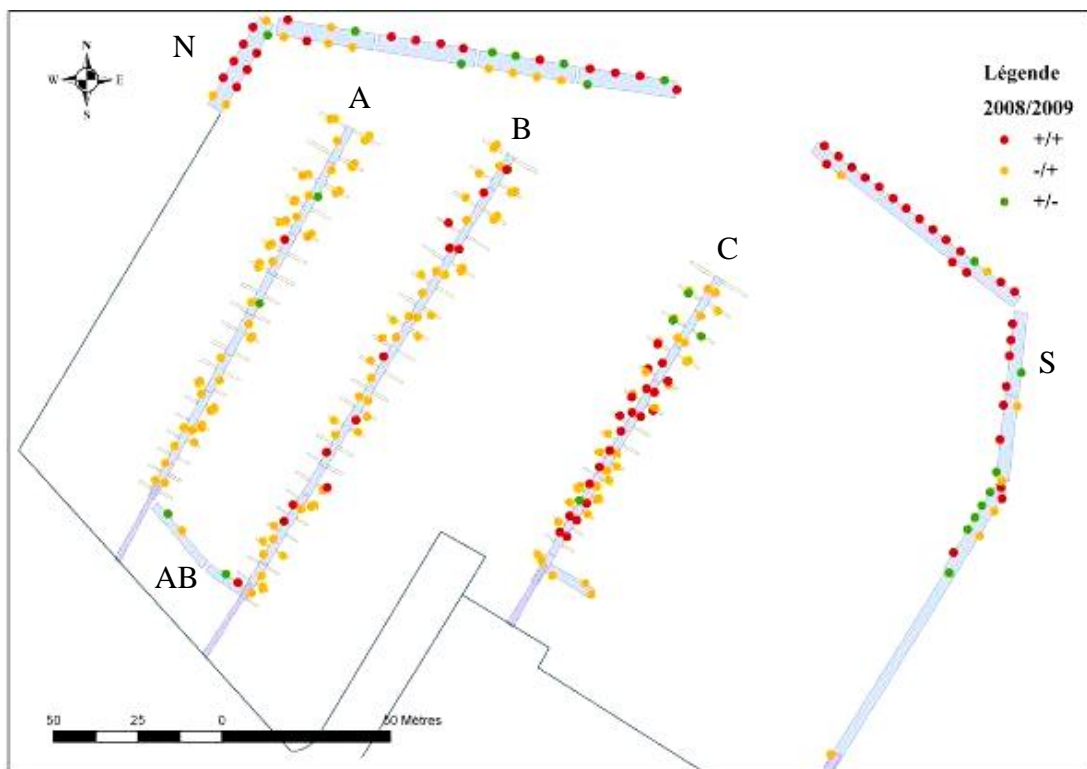


Figure IV-A.11 : Comparaison de la distribution d'*U. pinnatifida* dans le port de l'Aber Wrac'h entre 2008 et 2009.

Les couleurs des ronds (point de présence de l'algue) symbolisent la présence ou absence sur les deux années d'observation :

- (1) rouge : individus présents en 2008 et 2009 (*i.e.* situation stable)
- (2) orange : non observé en 2008 mais présent en 2009 (*i.e.* situation d'expansion)
- (3) vert : observé en 2008 et absent en 2009 (*i.e.* situation de régression)

Tableau IV-A.5 : Comparaison de la couverture spatiale (pourcentage) pour les années 2008 et 2009 par ponton/exposition et sur l'ensemble du port de l'Aber Wrac'h.

Ponton	Exposition	2008	2009
A	Ouest	1.75%	45.61%
	Est	3.51%	35.09%
AB	Nord	42.86%	28.57%
	Sud	0.00%	0.00%
B	Ouest	11.29%	46.77%
	Est	6.15%	40.00%
C	Ouest	36.36%	63.64%
	Est	14.89%	55.32%
N	Nord	67.86%	60.71%
	Sud	26.92%	46.15%
S	Nord	37.50%	39.58%
	Sud	34.88%	27.91%
Total		20.20%	44.29%

Passée la phase d'installation initiale, le devenir d'une espèce introduite réside dans sa capacité à s'établir de façon pérenne (Schiel & Foster 2006). La population du port de l'Aber Wrac'h semble également sur la bonne voie pour réussir cette nouvelle étape du processus d'invasion locale. En effet, nous avons réalisé une nouvelle prospection de ce site en Mai 2009. La distribution spatiale a évolué (Figure IV-A.11 et Tableau IV-A.5) : nous avons observé un doublement des surfaces colonisées par *U. pinnatifida* (20.2% en 2008 et 44.3% en 2009). Les zones qui ont le plus évolué sont les pontons A et B. Par exemple, le ponton A-Ouest est passé de 1.8% à 45.6% de surface occupée. Les points sont répartis de manière aléatoire sur les pontons. Il est intéressant de noter que le côté Sud du ponton AB est toujours dépourvu de cette algue. De manière générale, *U. pinnatifida* continue à poursuivre sa colonisation et s'étend à partir des points signalés en 2008. Cette marina va certainement pouvoir jouer un rôle de relais dans l'établissement des schémas de connectivité entre les populations d'*U. pinnatifida* établies dans la baie (Bulleri & Airoidi 2005).

Partie B- Approche expérimentale de l'étude de la dynamique de recolonisation d'un site naturel suite à une éradication locale

IV-B.1. Introduction

L'existence de perturbations semble être un mécanisme clé dans la réussite de l'invasion par des organismes terrestres, marins ou d'eaux douces, notamment en favorisant l'établissement de ces espèces dans de nouveaux milieux (Logde 1993). Ce mécanisme est considéré comme pouvant s'opposer à la « résistance » des communautés naturelles à l'installation d'espèces introduites. Ceci a été montré par exemple dans le cas de l'introduction de *Sargassum muticum* (Deysher & Norton 1982). Le terme « perturbations » est utilisé dans des contextes variés. Il est souvent mis en relation avec les dégradations et artificialisations des habitats et milieux (ex. les ports en milieu marin) ou avec la présence de substrats non naturels (ex. les corps morts et bouées). Dans le milieu naturel, d'autres types d'événements sont souvent considérés tels que des tempêtes, des proliférations d'herbivores ou encore l'émergence de nouveaux pathogènes qui peuvent également faciliter l'installation de nouvelles espèces exotiques. Par exemple, des événements climatiques exceptionnels tels qu'El Nino favorisent la colonisation des milieux par de nouvelles espèces suite au déclin des espèces jusqu'alors présentes (Reed et al. 2000).

Dans le cas d'*U. pinnatifida*, Valentine & Johnson (2003) ont effectué des études expérimentales sur la colonisation de la côte Est de la Tasmanie dans des milieux naturels. Par une expérience d'éradication-recolonisation, ils ont mis en évidence que la communauté native inhibe la progression d'*U. pinnatifida*. A l'inverse, quand la communauté native est localement éradiquée, *U. pinnatifida* tend à coloniser le nouvel espace disponible. Quelques années plus tard, Valentine & Johnson (2005) ont également montré que le broutage de la

flore locale par l'oursin *Heliocidaris erythrogramma* provoquait des perturbations à l'origine d'une diminution de la densité des espèces locales mais qu'*U. pinnatifida* persistait dans ce milieu. Cet effet semble de plus durable puisque la suppression de la pression de broutage ne permet pas la réinstallation des espèces natives.

Sur les côtés de l'Atlantique Nord, Floch et al. (1996) ont mis en évidence, par des études expérimentales en milieu naturel, que les espèces de laminaires natives se montrent très résistantes face à l'invasion par *U. pinnatifida*. Pourtant, la réussite de l'installation d'*U. pinnatifida* dans de nombreux habitats a été largement documentée (Wallentinus 2007). Sa présence dans de nombreux milieux artificiels a suggéré une préférence de cette espèce pour des habitats perturbés. Les perturbations auraient ainsi un rôle significatif dans son établissement. De plus, ses caractéristiques telles qu'une courte durée de vie, un cycle de vie annuel, une croissance rapide, un grand nombre de propagules relâchées sur une période étendue (Pérez et al. 1981) font d'elle une espèce opportuniste. Ces espèces sont souvent associées aux habitats perturbés (Clayton 1990).

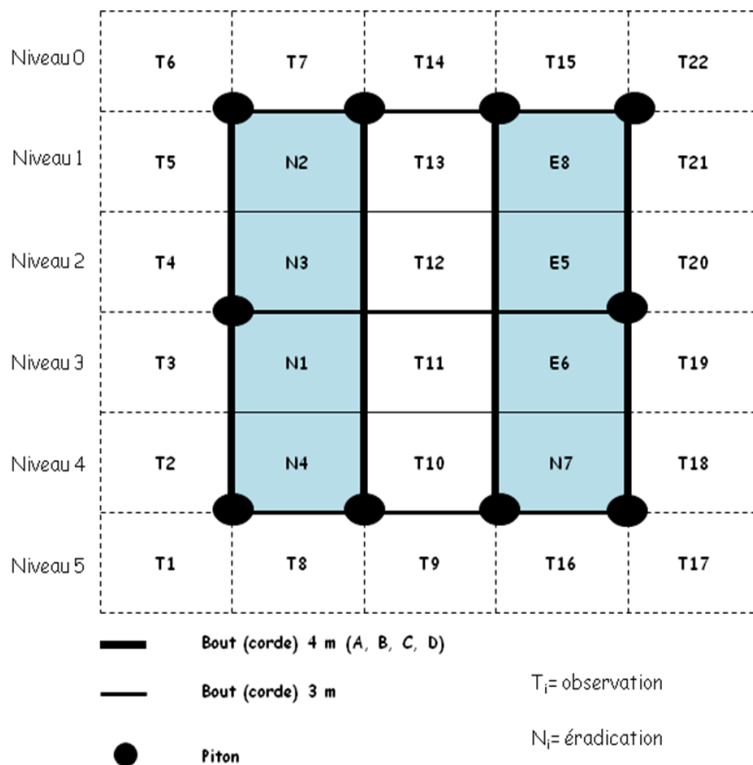
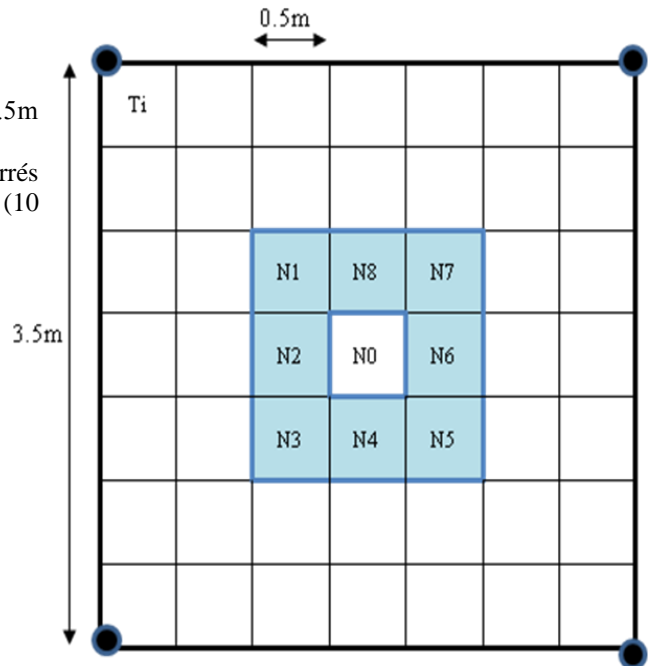
C'est dans ce contexte que nous avons mis en place une expérience d'éradication de la faune et la flore sur un substrat naturel rocheux, dans trois sites déjà étudiés par des approches de génétique des populations au cours de ce travail et dans lesquels les populations établies dans le milieu naturel semblent se maintenir de façon durable et « autonome » (en référence aux chapitres précédents). L'objectif de cette étude expérimentale était de suivre la dynamique de recolonisation par les laminaires natives et *U. pinnatifida*. Compte-tenu des très faibles capacités de dispersion de ces espèces, et afin de pouvoir réaliser une éradication « soignée », nous avons choisi d'effectuer cette éradication à micro-échelle (quelques mètres carrés) avec un substrat mis quasiment à nu. L'éradication a eu lieu lors du pic de recrutement dans les trois sites (Mars à Mai 2007). Ensuite, des observations ont été réalisées pour effectuer des relevés de la dynamique de colonisation d'*U. pinnatifida* et d'autres espèces de macro-algues particulièrement abondantes sur les sites étudiés.

Les faibles capacités de dispersion naturelle d'*U. pinnatifida* dans des milieux naturels (cf. Chapitre III) et ses capacités de croissance rapide (Castric-Fey et al. 1999b) m'ont conduit à proposer deux attendus : (1) la recolonisation de la zone nettoyée se fera de proche en proche, de la périphérie vers le centre, et (2) l'étendue et la proportion entre des individus d'*U. pinnatifida* comparée à d'autres espèces de macro-algues natives notamment des laminaires sera plus grande après qu'avant l'éradication.

Figure IV-B.1. Présentation du dispositif expérimental dans les sites étudiés pendant les basses mers (BV et RT) et dans le site étudié en plongée (GC).

Sites BV et RT

Chaque petit carré mesure 50cm de côté.
 L'aire totale de la zone expérimentale est de 3.5x3.5m (12.25 m²).
 La zone jaune est la surface nettoyée (2.25m², carrés Di).
 La zone rose est la zone dite « témoin » (10 m²carrés Ti).



Site GC

Chaque carré mesure 1m de côté
 L'aire totale de l'expérience est de 5mx6m (30m²)
 Deux couloirs de 4mx1m sont nettoyés (éradication sur 8m²; zone jaune)
 Les carrés en périphérie sont des zones « témoins » totalisant une surface de 22m²
 La zone d'étude est vertical (zone de plus grande profondeur en bas, zone émergée à basse mer de vive eau en haut), correspondant à 7 niveaux (N0 à N6)
 D'ailleurs, le N6 a été observé avant l'éradication (voir Annexe 5E)

IV-B.2. Matériels & Méthodes

IV-B.2.1. Sites d'études & présentation du dispositif expérimental

L'expérience d'éradication et de suivi de colonisation a été menée dans trois sites : un site à l'Aber Wrac'h, le rocher du Breac'h Ver (BV) et deux sites dans la Baie de St-Malo, le Rocher des Thermes (RT) et la Grande Conchée (GC) où la couverture d'*U. pinnatifida* était importante au départ de l'expérience. Il est à noter que ces expériences ont été effectuées au BV et RT dans les zones nommées I de l'étude présentées au Chapitre 3 de ce manuscrit de thèse.

Cette expérience a été mise en place lors des grandes marées entre Mars et Mai 2007 suivant les sites. Cette période est au cœur de la période de reproduction et de présence d'*U. pinnatifida*. Les dispositifs mis en place diffèrent entre BV et RT d'une part et GC d'autre part, car le travail a été effectué à pied à basse mer pour BV & RT et en plongée pour GC. L'expérience sur GC, en plongée, nous permettait d'intégrer une variable « profondeur » et de travailler sur des surfaces plus grandes, n'étant plus limités par les durées des marées.

Brièvement (Figure IV-B.1 ; pour plus de détails en Annexe 5B), pour chaque site intertidal (BV et RT), une aire carrée de 3.5m de côté, scindée en cadrats de 50cm de côté, a été positionnée avec des marques permanentes (permettant de réajuster les cadrats au cours du suivi). Une zone centrale de 2.25m² a été nettoyée à la main et à la brosse. Pour le site GC (pour plus de détails voir Annexe 5C), la zone d'étude est de 30m², également repérée avec des marques permanentes et deux couloirs représentant un total de 8m² a été nettoyé à la brosse. Autour des zones nettoyées, des surfaces laissées intactes, appelées zones « témoin », ont été observées au moment de l'éradication des zones centrales et des couloirs. Un inventaire qualitatif global de la faune et la flore a été réalisée sur les trois sites au cours de l'éradication. Ensuite, ces dispositifs ont fait l'objet de plusieurs observations, lors des périodes les plus importantes de recrutements de l'algue, en Mars-Avril et en Septembre-Octobre (second événement, mineur, de recrutement en Bretagne Nord, (Castric-Fey et al. 1999a ; Voisin 2007, observations personnelles).

Une première série d'observations a eu lieu en Septembre 2007, une deuxième en Mars-Avril 2008, une troisième en Septembre 2008, une quatrième en Mars-Avril 2009 et enfin la cinquième en Septembre 2009 au Rocher des Thermes (RT). La même série à

l'exception de la 5^{ème} observation n'a pas été menée au Breac'h Ver (BV). En revanche, seules, deux séries d'observations (Septembre 2007 & Mars-Avril 2008) ont été effectuées sur le site de la Grande Conchée (GC), vues les contraintes techniques (météo notamment) et logistiques sur ce site.

IV-B.2.2. Analyses

Au cours du suivi, le nombre d'individus pour chaque espèce de laminaires et macro-algues particulièrement abondantes dans les sites d'étude (*i.e.* *Laminaria digitata* (Ld), *Laminaria hyperborea* (Lh), *Laminaria ochroleuca* (Lo), *Saccorhiza polyschides* (Sp), *Himanthalia elongata* (He), *Saccharina latissima* (Sl), *Laminariales* < à 5cm non identifiées (Lam)) ainsi que *U. pinnatifida* (Up) a été comptabilisé de façon à estimer les densités par mètre carré dans les cadrats « Nettoyés » et « Témoins ». Au Breac'h Ver, toutes les observations ont été effectuées selon ce protocole, excepté lors de la 3^{ème} observation. Seuls les individus d'*U. pinnatifida* ont été comptabilisés car le niveau de l'eau n'est pas descendu suffisamment pour permettre le relevé des autres espèces. A noter que pour le Rocher des Thermes, aucune macroalgue n'était présente, excepté *Codium fragile* ssp. *tomentosoïdes* lors de la 3^{ème} et 5^{ème} série d'observations.

Afin d'estimer la distribution des individus d'*U. pinnatifida*, des indices de dispersion ont été calculés comme décrit dans la partie précédente (cf. Encadré III.2) dans les cadrats nettoyés et témoins sur chaque site avant éradication et lors de chaque observation. Pour le site de la Grande Conchée, 6 niveaux composent le dispositif (N0 à N6), correspondant à 7 profondeurs différentes. L'indice de dispersion a été calculé pour chaque niveau (cadrats nettoyés et témoins séparément).

IV-B.3. Résultats

Un inventaire global de type présence-absence de la macro-faune et macro-flore (avec une attention particulière portée sur les macro-algues) a été réalisé à partir des récoltes faites lors de l'expérience d'éradication en 2007 (Annexe 5A). Un nombre d'espèces plus important a été observé sur le site BV. Au site RT, d'autres espèces introduites ont été observées en nombre important notamment l'algue introduite *Codium fragile* ssp. *tomentosoïdes*, le mollusque *Crepidula fornicata* et bien d'autres voir Annexe 5D.

Les tableaux IV.B-1, IV-B-3 et IV-B-4 indiquent les densités en individus des différentes espèces ciblées et en particulier *U. pinnatifida* pour chaque site et pour les deux catégories de cadrats observés (*i.e.* nettoyés vs. témoins).

Suite à l'éradication et sur l'ensemble de la période du suivi, une recolonisation par *U. pinnatifida* a été observée au sein des cadrats nettoyés dans chacun des sites mais avec un nombre d'individus très variable : 61 individus d'*U. pinnatifida* ont été observés au Breac'h Ver (cumul sur 4 séries d'observations), 4 au Rocher des Thermes (cumul sur 5 séries d'observations) et 55 à la Grande Conchée (cumul sur 2 séries d'observations). La recolonisation au Breac'h Ver et à la Grande Conchée est ainsi nettement supérieure à celle du Rocher des Thermes. Les résultats sont détaillés site par site dans les paragraphes suivants.

IV-B.3.1. Site intertidal du Breac'h Ver

Le dispositif du Breac'h Ver (BV) a été mis en place à côté de la balise du Breac'h Ver et en bordure du chenal de l'Aber (voir Chapitre 3, Figure III.1, zone D). Avant l'éradication, on note une densité de 13.77 *U. pinnatifida* par m² (Tableau IV-B.1), caractérisée par une distribution agrégée des individus au sein du dispositif (Tableau IV-B.2).

Tableau IV-B.1: Synthèse des observations réalisées sur le site du Breac'h Ver : densité des différentes espèces d'algues suivies avant et après l'expérience d'éradication locale

Les densités (nombre d'individus par mètre carré) sont indiquées pour chaque espèce.

Les lettres N et T correspondent respectivement aux cadrats « Nettoyés » et « Témoins ».

Ld désigne *Laminaria digitata* ; *Lh* : *Laminaria hyperborea* ; *Lo* : *Laminaria ochroleuca* ; *Sl* : *Saccharina latissima* ; *Lam*: les espèces de Laminariales non identifiées et inférieures à 5cm ; *He* : *Himanthalia elongata* ; *Sp* : *Saccorhiza polyschides* ; NR : non réalisé ; *Up*: *U. pinnatifida*.

L'éradication a été effectuée en Mars-Avril 2007 : 1ère observation (Septembre 2007) ; 2ème observation (Mars 2008) ; 3^{ème} observation (Septembre 2008) et enfin 4^{ème} observation (Mars 2009).

	Avant Eradication		1ère Obs.		2ème Obs.		3ème Obs.		4ème Obs.	
	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T
Surface	2.25	8	2.25	8	2.25	10	2.25	10	2.25	10
Cadrat	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T
<i>Ld</i>	2.22	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	NR	NR	4.00	2.80
<i>Lh</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NR	NR	0.00	0.00
<i>Lo</i>	2.67	5.75	0.44	0.25	4.88	1.90	NR	NR	0.00	0.00
<i>Sl</i>	0.00	1.75	7.56	3.13	4.00	0.10	NR	NR	0.00	1.60
<i>Lam</i>	4.44	0.00	6.67	3.13	0.00	0.00	NR	NR	0.00	0.30
<i>He</i>	0.00	18.63	268.44	50.88	0.00	0.00	NR	NR	119.11	55.9
<i>Sp</i>	2.22	0.50	4.00	3.10	4.00	1.30	NR	NR	1.33	0.5
<i>Up</i>	13.77	1.13	15.11	2.88	12.00	1.80	0.00	0.00	0.00	0.50

Tableau IV-B.2 : Distribution spatiale des individus d'*U. pinnatifida* pour chaque série d'observation réalisées au site du Breac'h Ver et du Rocher des Thermes.

L'indice de dispersion a été calculé dans les zones nettoyées et témoins avant l'éradication et pour chaque série d'observation : 1^{ère} observation (Septembre 2007); 2^{ème} observation (Mars 2008); 3^{ème} observation (Septembre 2008); 4^{ème} observation (Mars 2009) et enfin 5^{ème} observation (Septembre 2009). *ID* est la valeur de l'indice de dispersion, la colonne *D* désignant le type de distribution.

NO: Non observé.

Les valeurs sur l'ensemble de la zone d'étude sont indiquées dans la dernière ligne (séparée du corps du tableau).

Site	Breac'h Ver				Rocher des Thermes			
	Nettoyé		Témoin		Nettoyé		Témoin	
	<i>ID</i>	<i>D</i>	<i>ID</i>	<i>D</i>	<i>ID</i>	<i>D</i>	<i>ID</i>	<i>D</i>
Avt Erad.	3.93 (0.001)	Agrégée	0.97 (0.512)	Aléatoire	0.71 (0.682)	Aléatoire	1.53 (0.017)	Agrégée
1 ^{ère}	2.31 (0.018)	Agrégée	1.18 (0.217)	Aléatoire	0.75 (0.647)	Aléatoire	0.97 (0.515)	Aléatoire
2 ^{ème}	3.31 (0.001)	Agrégée	1.41 (0.049)	Agrégée	1.00 (0.434)	Aléatoire	1.89 (0.001)	Agrégée
3 ^{ème}	-	-	-	-	-	-	-	-
4 ^{ème}	-	-	2.52 (0.000)	Agrégée	-	-	-	-
5 ^{ème}	NO	NO	NO	NO	-	-	1.72 (0.003)	Agrégée
Avt Erad (total).	ID=4.79 (0.000) ; Agrégée				ID= 1.34 (0.058) ; Aléatoire			

Au sein de ces mêmes cadrats, on observe une faible densité en laminaires natives : *Laminaria digitata* (*Ld*), *Laminaria ochroleuca* (*Lo*), *Saccorhiza polyschides* (*Sp*) et des laminaires non identifiées (*Lam*). Par contre au niveau des cadrats dits « témoins », une configuration différente se présente. Il y a très peu d'*U. pinnatifida* (1.13 ind./m²) et la distribution des individus est aléatoire. On a une importante densité de l'algue annuelle, *Himanthalia elongata* (*He*) (18.63 ind./m²) et quelques *Lo*, *Sl* et *Sp* (Tableau IV-B.1).

Lors de la première observation, la densité en *U. pinnatifida* est plus élevée qu'avant l'éradication quelque soit l'état du cadrat : cadrat nettoyé (15.11 ind./m²) et cadrat témoin (2.88 ind./m²). La distribution est également identique à la situation avant éradication (*i.e.* distribution agrégée dans les cadrats nettoyés et aléatoire pour les cadrats témoins). On observe un changement important dans les cadrats nettoyés avec une densité très importante d'*He* (268.44 ind./m²) et toujours seulement quelques laminaires (*Lo*, *Sl*, *Lam*, *Sp* ; Tableau

IV-B.1). Pour les cadrats témoins, les observations révèlent des densités quasi identiques à celles observées avant l'éradication.

A la 2^{ème} observation, la situation a évolué avec des densités légèrement inférieures par rapport à la 1^{ère} observation (12 ind./m²) pour le cadrat « Nettoyé » et pour les cadrats « Témoins » (1.8 ind./m²) et des distributions agrégées dans les deux cas. Contrairement à la première observation, aucune *He* n'est observée, seules quelques espèces de laminaires (*Lo*, *Sp* et *Sl*) sont observées mais en faible densité.

Au cours de la 3^{ème} et la 4^{ème} observation, aucune *U. pinnatifida* n'a été observée sur l'ensemble du dispositif, excepté pour les cadrats « Témoins » avec une faible densité (0.5 ind./m²) et une distribution agrégée. Lors de la 3^{ème} observation, les autres macroalgues n'ont pas pu être comptées. Lors de la 4^{ème} observation, la densité d'*He* est encore importante (119.11 ind./m² ; Figure IV-B.2).

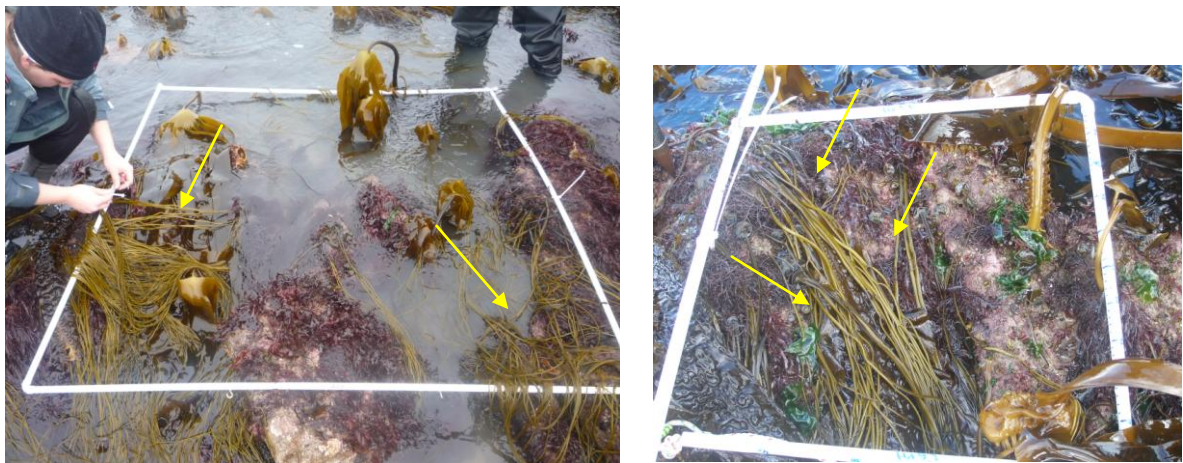


Figure IV-B.2 : Photographie illustrant la colonisation par *Himanthalia elongata* au site du Breac'h Ver en Mars 2009 (4^{ème} observation).

IV-B.3.2. Site intertidal du Rocher des Thermes

Pour le dispositif du Rocher des Thermes, situé dans la zone I de l'étude du Chapitre 3 (Figure III.1), des résultats différents de ceux observés au BV ont été notés : il existe une décroissance en densité en *Up* au cours du suivi. Avant l'éradication, on a une densité de 4.5 *Up*./m² au niveau des cadrats nettoyés et une distribution agrégée. Les cadrats témoins ont une densité légèrement plus faible de 3.50 *Up*./m², caractérisée par une distribution aléatoire. Aucune autre macroalgue n'est observée (Tableau IV-B.2 & 3).

Tableau IV-B.3 : Synthèse des observations réalisées sur le site du Rocher des Thermes : densité des différentes espèces d'algues suivies avant et après l'expérience d'éradication locale

Les densités (nombre d'individus par mètre carré) sont indiquées pour chaque espèce.

Cf désigne *Codium fragile* ssp. *tomentosoïdes* et *Up*, *U. pinnatifida*.

Les lettres N et T correspondent respectivement aux cadrats « Nettoyés » et « Témoins ».

L'éradication a été effectuée en Mars-Avril 2007 sur ce site, 1^{ère} observation (Septembre 2007) ; 2^{ème} observation (Mars 2008) ; 3^{ème} observation (Septembre 2008) ; 4^{ème} observation (Mars 2009) et enfin 5^{ème} observation (Septembre 2009)

	Avt Erad		1ère Obs.		2ème Obs.		3ème Obs.		4ème Obs.		5ème Obs.	
Surface	2.25	8	2.25	8	2.25	10	2.25	8	2.25	10	2.25	10
<i>Etat</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>T</i>
<i>Cf</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.00	11.55	0.00	0.00	3.44	2.72
<i>Up</i>	4.50	3.50	1.34	0.20	0.44	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50

Lors de la 1^{ère} observation, une densité moindre est observée sur l'ensemble du dispositif et la distribution des individus est aléatoire pour les deux types de cadrats. Puis lors de la seconde série d'observation, des densités encore inférieures, excepté pour les cadrats témoins sont encore notées avec des individus répartis de manière aléatoire pour les cadrats nettoyés et agrégée pour les cadrats témoins.

Au cours des séries suivantes (3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} observation), aucune *U. pinnatifida* n'a été observée sur l'ensemble du dispositif, excepté encore pour les cadrats « Témoins » lors de la 5^{ème} observation mais toujours avec une très faible densité (0.5 *Up*./m²). Une macroalgue introduite, nommée *Codium fragile* ssp. *tomentosoïdes* est en revanche très abondante avec une densité importante lors de la 3^{ème} observation en Septembre 2008 (12 ind./m² ; Figure IV-B.3) et une densité plus faible (3.44 ind./m²) lors de la 5^{ème} observation en Septembre 2009.

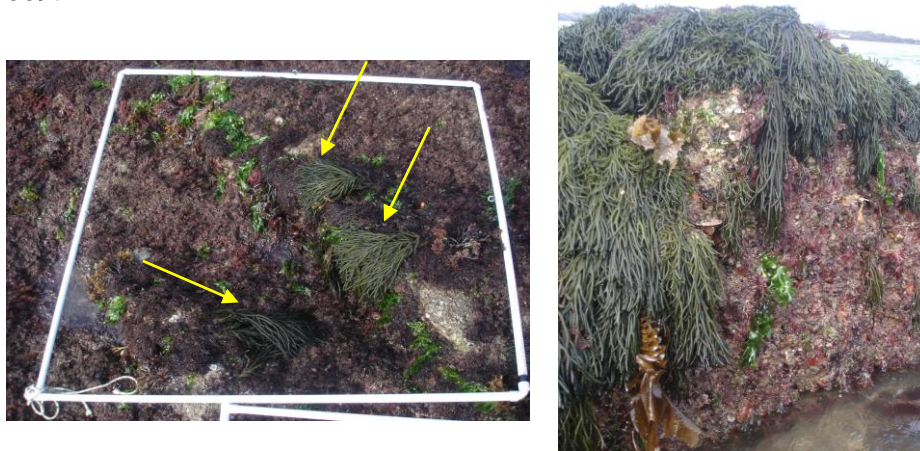


Figure IV-B.3 : Photographie illustration la colonisation par *Codium fragile* ssp. *tomentosoïdes* au site du Rocher des Thermes en Septembre 2008 (3^{ème} observation).

Tableau IV-B.4: Synthèse des observations réalisées sur le site de la Grande Conchée : densité des différentes espèces d'algues suivies avant et après l'expérience d'éradication locale en fonction de la profondeur.

Les densités (nombre d'individus par mètre carré) sont indiquées pour chaque espèce.

Les lettres N et T correspondent respectivement aux cadrats « Nettoyés » et « Témoins ».

N0 à N6 correspondent à différents niveaux de profondeur (N0: le plus haut niveau; N6: le plus bas niveau).

Selon les niveaux, la surface d'observation de la zone témoin est variable (3, 5 ou 7 m²).

Ld désigne *Laminaria digitata* ; *Lh* : *Laminaria hyperborea* ; *Sp* : *Saccorhiza polyschides* *Lam* : les espèces de Laminariales non identifiées et inférieures à 5cm et *Up* : *U. pinnatifida*.

L'éradication a été effectuée en Mai 2007, 1ère observation (Septembre 2007) et la 2ème observation (Mars 2008).

Niveau	Surface	Avt Erad		1ère Obs.		2ème Obs.	
		Etat	2	3-5-7	2	3-5-7	2
		N	T	N	T	N	T
N0	<i>Ld</i>	-	0.00	-	0.00	-	0.00
	<i>Lh</i>	-	0.00	-	0.00	-	0.00
	<i>Sp</i>	-	0.00	-	0.00	-	0.00
	<i>Lam</i>	-	0.00	-	0.00	-	0.00
	<i>Up</i>	-	0.00	-	0.20	-	0.00
N1	<i>Ld</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Lh</i>	13.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Sp</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Lam</i>	0.50	5.60	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Up</i>	17.50	4.40	1.00	0.00	0.00	0.00
N2	<i>Ld</i>	1.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Lh</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Sp</i>	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Lam</i>	0.00	0.20	0.00	0.67	0.50	1.00
	<i>Up</i>	17.50	5.20	4.50	0.66	3.00	1.67
N3	<i>Ld</i>	8.50	2.80	0.00	1.67	0.00	2.33
	<i>Lh</i>	5.00	1.20	0.50	5.67	0.00	3.33
	<i>Sp</i>	0.00	1.20	0.50	1.67	0.00	0.00
	<i>Lam</i>	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	5.00
	<i>Up</i>	1.50	3.00	9.50	3.00	0.50	0.33
N4	<i>Ld</i>	39.00	17.20	0.00	2.33	0.00	10.00
	<i>Lh</i>	3.50	4.00	0.00	13.30	0.00	11.30
	<i>Sp</i>	2.00	7.00	6.00	3.33	2.50	1.67
	<i>Lam</i>	0.50	3.00	9.50	2.67	4.50	7.66
	<i>Up</i>	3.00	3.80	8.50	3.66	0.50	0.00
N5	<i>Ld</i>	-	40.00	-	0.00	-	0.20
	<i>Lh</i>	-	0.86	-	6.00	-	7.60
	<i>Sp</i>	-	0.43	-	17.60	-	9.00
	<i>Lam</i>	-	0.28	-	0.00	-	17.00
	<i>Up</i>	-	1.00	-	4.60	-	0.00
N6	<i>Ld</i>	-	14.71	-	NO	-	NO
	<i>Lh</i>	-	1.28	-	NO	-	NO
	<i>Sp</i>	-	4.43	-	NO	-	NO
	<i>Lam</i>	-	0.00	-	NO	-	NO
	<i>Up</i>	-	7.28	-	NO	-	NO

IV-B.3.3. Site subtidal de la Grande Conchée

Le dispositif de la Grande Conchée a été mis en place sur une paroi rocheuse, permettant d'affiner notre suivi avec l'observation de 6 différents niveaux de profondeur. Avant l'éradication, *U. pinnatifida* est présente en majorité aux niveaux N1 et N2 dans les couloirs éradiqués (17.5 ind./m²; Tableau IV-B.4) et caractérisés par une distribution agrégée (Tableau IV-B.5). Les densités sont plus constantes dans les couloirs témoins avec cependant, de façon inattendue une surcroissance de densité au niveau 6. Une densité importante en *Laminaria digitata* (*Ld*) est observée au niveau 4 (39 ind./m²), au niveau 5 (40 ind./m²) et au niveau 6 (14.71 ind./m²). Le différentiel entre cadrats nettoyés et témoins est similaire mais des densités plus faibles sont observées pour les cadrats témoins dès le départ.

Lors de la première observation, au niveau des cadrats nettoyés, il s'avère que les niveaux les plus bas sont les plus colonisés par *U. pinnatifida* : niveau 3 (9.5 ind./m², distribution aléatoire) et niveau 4 (8.5 ind./m² ; distribution aléatoire). Une faible densité en certaines laminaires natives (*Ld*, *Lh*, *Sp*) est observée, excepté pour *Saccorhiza polyschides* (*Sp* ; 6 ind./m²) et des laminaires non identifiées (*lam* ; 9.5 ind./m²) au niveau 4. Des densités plus faibles sont notées dans les cadrats initialement denses en *U. pinnatifida* (1 ind./m² pour le N1 et 4.5 ind./m² pour le N2, caractérisé tous les deux par une distribution aléatoire). Néanmoins, pour les cadrats témoins, on retrouve un différentiel similaire mais avec des densités beaucoup plus faibles voire nulles selon le niveau considéré pour la plupart des espèces. De plus, *U. pinnatifida* est quasi absente du niveau 0 au niveau 2 des cadrats témoins. On a à nouveau une densité moindre par rapport au cadrat nettoyé.

Par contre à la deuxième observation, les densités des cadrats nettoyés sont plus faibles par rapport à l'observation précédente. Les niveaux 0 et 1 sont dépourvus de macroalgues y compris *U. pinnatifida*. Par contre, aux autres niveaux, on retrouve la configuration de départ (avant l'éradication) : une densité plus importante au sein du niveau 2 (3 ind./m² ; distribution aléatoire), puis de manière décroissante en profondeur avec le niveau 3 (0.5 ind./m² ; aléatoire) puis 4 (0.5 ind./m² ; aléatoire). Concernant les cadrats témoins, aucune macroalgue n'est présente au niveau 0 et 1, quelques unes au niveau 2 (*Up* : 1.67 ind./m²; *Lam* : 1 ind./m²). Aux niveaux 3 et 4, *U. pinnatifida* n'est quasiment plus présente (densité inférieure à 0.50 ind./m² ; distribution aléatoire). Les autres macroalgues (*Ld*, *Lh* et *Lam*) ont des densités quasi-identiques, bien plus élevées qu'*U. pinnatifida*. *Sp* a quasiment totalement disparue à des niveaux.

Tableau IV-B.5 : Distribution des individus d'*U. pinnatifida* au cours du suivi pour chaque niveau au site de la Grande Conchée.

L'indice de dispersion a été calculé dans les zones nettoyées et témoins pour chacun des niveaux (N0 à N6) avant l'éradication et pour les deux séries d'observation qui ont été suivi (en Septembre 2007 puis en Mars-Avril 2008).

ID est la valeur de l'indice de dispersion, la colonne *D* désignant le type de distribution.

Les valeurs sur l'ensemble de la zone d'étude sont indiquées dans le petit tableau en bas du tableau principal.

Etat	Avt Erad.		1ère Obs.		2ème Obs.	
	<i>ID</i>	<i>D.</i>	<i>ID</i>	<i>D.</i>	<i>ID</i>	<i>D.</i>
T N0	-	-	1.00 (0.406)	Aléatoire	-	-
N N1	3.46 (0.063)	Aléatoire	2.00 (0.157)	Aléatoire	-	-
T N1	17.45 (0.000)	Agrégée	-	-	-	-
N N2	0.26 (0.612)	Agrégée	2.77 (0.095)	Aléatoire	0.66 (0.414)	Aléatoire
T N2	9.37 (0.000)	Agrégée	0.50 (0.606)	Aléatoire	0.20 (0.818)	Aléatoire
N N3	0.33 (0.563)	Aléatoire	1.32 (0.251)	Aléatoire	1.00 (0.317)	Aléatoire
T N3	2.00 (0.092)	Aléatoire	3.00 (0.049)	Agrégée	1.00 (0.367)	Aléatoire
N N4	0.00 (1.000)	Aléatoire	0.53 (0.466)	Aléatoire	1.00 (0.371)	Aléatoire
T N4	7.16 (0.001)	Agrégée	2.82 (0.059)	Aléatoire	-	-
T N5	16.88 (0.000)	Agrégée	3.65 (0.026)	Agrégée	-	-
T N6	-	-	-	-	-	-

<i>Avt Erad (Total)</i>	<i>ID.</i>	<i>D.</i>
T N0	0	-
N N1	12.544 (0.000)	Agrégée
T N1		
N N2	7.945 (0.000)	Agrégée
T N2		
N N3	1.796 (0.095)	Aléatoire
T N3		
N N4	5.120 (0.000)	Agrégée
T N4		
T N5	16.885 (0.000)	Agrégée
T N6	-	-

IV-B.4. Discussion

Les espèces annuelles avec une démographie rapide, et en particulier *U. pinnatifida*, sont considérées comme des espèces colonisatrices ayant la capacité de coloniser rapidement des endroits perturbés ou des substrats vierges. Nous avons mis en évidence un tel processus dans le cas de l'étude de la colonisation de substrats artificiels vierges dans le port de l'Aber Wrac'h dans la partie A de ce chapitre. Ici, je me suis intéressée à un substrat naturel, nettoyé, au sein d'une population établie dans un milieu naturel. La mise à nu de ces substrats offre de nouveaux supports disponibles à la colonisation. Les observations ont été réalisées dans deux sites intertidaux (BV & RT) et dans un site subtidal (GC).

IV-B.4.1. Une recolonisation rapide post-éradication...

La recolonisation par *U. pinnatifida* est très rapide et revient à un niveau quasiment identique à celui de la période « avant éradication ». Nous ne pouvons pas comparer rigoureusement les densités en algues avant et après éradication en regard des zones dites « témoin ». En effet, le nombre d'*U. pinnatifida* dans les zones dites « témoin » était au départ inférieur au nombre d'*U. pinnatifida* dans les zones « nettoyées ». Cette limite du dispositif est due à la configuration des sites qui ne nous avait pas permis de choisir d'autres zones. Néanmoins, les observations post-éradication montrent qu'en quelques mois *U. pinnatifida* s'est à nouveau développé dans les zones nettoyées.

Ces observations peuvent être expliquées par deux processus : (1) l'installation et la germination de spores émises par les individus environnants ; cette hypothèse est en accord avec les résultats du chapitre III dans lequel nous avons montré que la dispersion efficace d'*U. pinnatifida* se réalise sur de très courtes distances (< 13m) ; les stades microscopiques répondraient de manière opportuniste, dû à la perturbation et par rapport à l'espace disponible ; (2) une limite du protocole de nettoyage de la zone qui aurait pu laisser en place des spores et/ou gamétophytes microscopiques préalablement produits par les individus retirés (*i.e.* banque de graines, par analogie aux plantes terrestres). Bien que l'arrachage de toutes les macroalgues, accompagné d'un nettoyage à la brosse de fer ait été effectué, cette seconde hypothèse ne peut être exclue. Tous les individus arrachés et les individus présents dans la zone d'étude et aux alentours ont été échantillonnés pour des analyses génétiques ultérieures que je n'ai pas eu le temps de réaliser au cours de ma thèse. Cependant, j'avais réalisé ces prélèvements dans l'objectif d'assigner des parents aux nouveaux individus apparus dans les

zones éradiquées. Ces expériences pourraient permettre de trancher entre les deux hypothèses évoquées plus haut.

La rapidité de l'installation de nouveaux individus peut également être expliquée par la période de l'éradication. En effet, lors de leur étude expérimentale d'éradication de la faune/flore en place en Tasmanie, Valentine & Johnson (2003) ont montré des différences de densité d'*U. pinnatifida* entre les cadrats éradiqués juste avant la période de recrutement majeur des espèces natives et 6 mois avant la période de largage des spores de celles-ci. Les densités les plus importantes ont été observées pour les cadrats éradiqués quelques mois avant la pluie de propagules des espèces natives. Dans notre cas, tous les cadrats ont été enlevés environ 4 mois avant la saison de reproduction des espèces natives (ex. *Laminaria digitata* ; acquisition de la maturité en Juin-Juillet ; Arzel 1989,). De plus, les laminaires natives ont présenté des densités faibles par rapport à l'état initial (avant l'éradication) et ainsi elles n'ont pu exercer cet effet « inhibiteur » (compétition), caractéristique des espèces pérennes natives par rapport aux espèces introduites (Deysher & Norton 1982). Il est ainsi possible qu'*U. pinnatifida* ait profité de l'absence de recrutement des espèces natives pour coloniser l'espace disponible, du fait de sa capacité à croître rapidement (Castric-Fey et al. 1999b ; Voisin 2007).

L'étude menée à la Grande Conchée nous a également permis d'analyser l'effet de la profondeur sur l'installation post-éradication d'*U. pinnatifida*. Avant l'éradication, on note une densité plus importante aux niveaux 1 et 2 par rapport aux niveaux 3 et 4. Lors de la première observation, ce schéma s'inverse : les niveaux les plus bas sont les plus colonisés par *U. pinnatifida*. Or initialement les niveaux 3 et 4 étaient caractérisés par une importante densité de *Laminaria digitata* (*Ld*) qui ne recolonisent pas immédiatement le site suite à l'éradication. Ces observations suggèrent qu'*U. pinnatifida* a profité de l'espace rendu disponible par l'enlèvement de *L. digitata* à des niveaux plus bas pour s'installer rapidement. A l'époque de l'éradication, les individus d'*U. pinnatifida* sont matures alors que *Ld* n'est reproductrice qu'à partir de Juin à Juillet (Arzel 1989). *U. pinnatifida* est généralement restreinte à une ceinture assez haute (zone haute de l'infralittoral) mais peut atteindre dans certains sites jusqu'à 18m de profondeur (Castric-Fey et al. 1993; Floc'h et al. 1991; Baie de St-Malo). Ces limites en profondeur pourraient résulter d'un double effet : ses exigences de lumière et la compétition avec les laminaires.

Au cours de cette expérience, d'autres espèces natives, ont pu bénéficier de cet espace ouvert par le nettoyage que nous avons effectué. Castric-Fey et al. (1993) avaient par exemple

proposé qu'une compétition pour la colonisation puisse exister avec une autre espèce annuelle, *Sacchorhiza polyschides*. Cette algue est assez peu présente dans nos sites d'étude et nous n'avons pas observé d'augmentation de densité significative dans les sites nettoyés. En revanche, une autre espèce native a montré une réponse positive à l'expérience menée : l'espèce annuelle *Himantalia elongata*, présente sur le site du Breac'h Ver. Cette espèce n'était pas présente dans les cadrats d'éradication et en faible densité dans les cadrats « témoins » (en faible densité, 18.63 ind.m²). Au moment de la 1^{ère} observation (Septembre 2007), cette espèce présente en revanche une très forte densité dans les cadrats nettoyés (268.44 ind.m², recrues & adultes, Figure IV-B.2) alors qu'elle reste assez stable dans les zones témoins. Après une phase de disparition en Mars-Avril 2008, elle atteint à nouveau de fortes densités (119.11 ind./m²) lors de la 4^{ème} observation mais pas dans la zone nettoyée. Ceci suggère une compétition possible entre *U. pinnatifida* et *H. elongata* pour la colonisation de nouveaux sites. Les espèces annuelles sont opportunistes qu'elles soient natives ou introduites.

IV-B.4.2. Suivi d'une phase de déclin

L'effet d'ouverture d'un espace non encore colonisé par des espèces natives n'a présenté un avantage pour *U. pinnatifida* que sur une durée très courte. En effet, les densités d'*U. pinnatifida* diminuent dès la deuxième série d'observation (Mars-Avril 2008). A cette date, les espèces natives et notamment des espèces pérennes ont commencé à reconquérir l'espace. *U. pinnatifida* est sous sa forme sporophytique macroscopique jusqu'en Juin laissant place aux autres espèces par la suite. Lors de la troisième série d'observations, on note l'absence quasi totale d'*U. pinnatifida* dans la zone nettoyée comme dans la zone témoin dans les trois sites. Différentes hypothèses peuvent être formulées afin d'expliquer l'absence d'*U. pinnatifida* à ces dates :

(1) une moindre densité d'adultes reproducteurs en Mars-Avril-Mai 2008, diminuant ainsi fortement le nombre de descendants,

(2) des conditions défavorables à la reproduction : en effet au mois de Janvier 2009, sur le site RT, on note des températures inférieures à 6°C alors qu'à la même période un an auparavant (2008), elles ne descendent pas en dessous de 8°C (Figure IV-B.4). Le même schéma est visible sur le site du BV.

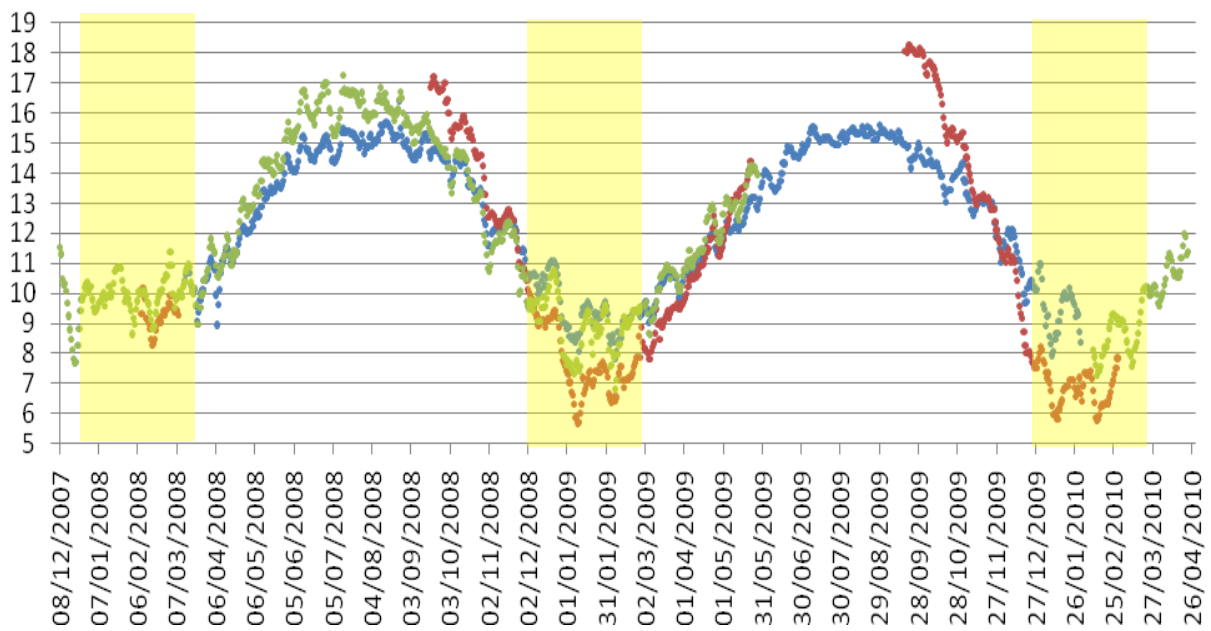


Figure IV-B.4 : Relevés de températures moyennes journalières dans les trois sites étudiés.

Les points verts représentent les températures prises au port de l'Aber Wrac'h en immersion permanente, les points bleus et rouges représentent les températures prises au niveau du cadrat d'éradication au Breac'h Ver et au Rocher des Thermes respectivement de mi décembre 2007 à fin avril 2010. Les zones jaunes montrent les périodes de l'année où les températures sont les plus basses.

(3) des perturbations anthropiques (le piétinement de la pêche de loisir, retournement de blocs, etc) croissantes, que nous avons pu observer sur les deux sites BV et RT.

(4) une compétition pour l'espace avec les autres espèces natives et/ou invasives. Nous n'avons pas pu réaliser d'observations en septembre 2008 au site BV du fait de conditions de marée et météorologiques défavorables. Néanmoins, au site RT, nous avons constaté la progression d'une nouvelle espèce à partir de la troisième série d'observation : l'espèce introduite et annuelle, *Codium fragile* ssp. *tomentosoïdes* (Figure IV-B-3). Cette espèce occupe le même niveau sur l'estran qu'*U. pinnatifida* et a été trouvée en Septembre 2009 dans plus de 70% des cadrats nettoyés et témoins, avec une densité respectivement de 3.44 ind./m² et 2.72 ind./m². La période de recrutement de cette algue s'étale d'août à octobre, créant probablement des perturbations du recrutement d'*U. pinnatifida*. Les études réalisées par Chapman et al. (2002), sur les côtes américaines de l'Atlantique, ont montré que des perturbations locales (destruction par des oursins ou infestation par un épiphyte) facilitaient l'établissement de *Codium fragile* ssp. *tomentosoïdes*. Une fois installée, elle avait la capacité d'inhiber le recrutement d'espèces de la communauté native, même en absence de perturbations. Il est probable que cette espèce perturbe également l'installation d'*U.*

pinnatifida et ce d'autant plus qu'elle semble plus résistante au piétinement, conséquence directe de la pêche à pied importante dans nos sites d'étude, et particulièrement au site RT.

IV-B.5. Conclusions

Cette étude expérimentale a permis de mettre en évidence que la mise à nu d'un substrat naturel dans un milieu naturel pouvait faciliter de façon transitoire l'établissement d'*U. pinnatifida*. Ces résultats sont en accord avec les résultats des expériences menées dans d'autres régions d'introduction d'*U. pinnatifida*, en particulier la Tasmanie (Valentine & Johnson 2003). Cette réponse positive à une perturbation, ici l'ouverture d'un nouveau milieu, complète la liste des propriétés qui font d'*U. pinnatifida*, une espèce opportuniste (croissance rapide, investissement important dans la reproduction, colonisatrice de nouveaux milieux, faiblement compétitrice etc.) (Clayton 1990). En considérant de concert les résultats des parties A et B présentées dans ce chapitre, nos résultats semblent en accord avec les conclusions de Fletcher & Manfredi (1995) qui considèrent qu'*U. pinnatifida* est faiblement compétitive dans les habitats naturels en comparaison des habitats portuaires.

Chapitre V :
Spores & Gamétophytes : les boîtes
noires du cycle de vie d'*U. pinnatifida*

Chapitre V :

Spores & Gamétophytes : les boîtes noires du cycle de vie d'*U. pinnatifida*

Préambule

La plupart des travaux publiés en écologie et génétique des populations d'*U. pinnatifida* dans ses aires d'introduction ne concernent que le stade sporophytique, c'est-à-dire le stade visible, macroscopique, du cycle de vie de cette algue brune. Pourtant cette espèce, comme toutes les laminariales, présente un cycle digénétique avec une alternance de stades microscopiques et macroscopiques (cf. Introduction, Figure 12). Comme dans le cas des larves dans les cycles benthopélagiques des invertébrés marins, les spores sont des éléments déterminants de la dynamique démographique des populations benthiques adultes (Kinlan, 2005). Or contrairement aux invertébrés marins chez lesquels la phase larvaire est largement étudiée notamment en ce qui concerne son rôle dans la dispersion (ex. pour revue Jones et al. 2009 ; Levin 2006), l'étude des spores des algues en milieu naturel est limitée. Dans le cas d'une espèce introduite, leur étude apparaît d'autant plus importante que ces spores microscopiques sont des agents de dispersion particulièrement efficaces, par exemple par les eaux de ballast. Elles participent à la pression en propagules (Simberloff 2009) qui est un facteur particulièrement important dans les processus d'introduction. Des données sur la quantité de spores présentes sur une surface donnée du sporophylle montrent que les quantités de spores émises par un sporophyte d'*U. pinnatifida* sont très importantes, de l'ordre de 4.10^8 spores par sporophyte et par heure, valeur similaire à celles observées chez d'autres macroalgues (Hewitt et al. 2005). Une étude expérimentale en laboratoire a montré que 90% des spores d'*U. pinnatifida* étaient capables de rester viables dans l'eau de mer pendant 5 jours bien qu'elles perdent leur capacité de fixation au cours du temps (Forrest et al. 2000). Il est naturellement extrêmement difficile de prévoir le pourcentage de survie en milieu naturel en raison de l'effet important des paramètres environnementaux du milieu sur la viabilité des spores (Reed 1992). Outre les spores, les gamétophytes représentent également une phase microscopique du cycle de vie d'*U. pinnatifida* et ont reçu encore moins d'attention, excepté

dans l'aire native dans le cadre d'approches expérimentales visant à optimiser les conditions de production de cette algue en culture. Les objectifs de ces études sont en effet essentiellement liés à l'optimisation de la production en grande quantité de sporophytes (Liu et al. 2004 ; Shan & Pang 2009). En revanche, aucune étude n'a été menée pour étudier *in situ* ces gamétophytes et leur rôle éventuel comme vecteur de dispersion.

Ainsi, dans le cadre de ce travail de thèse, j'ai initié des études visant à étudier le rôle de ces éléments microscopiques sur la dispersion d'*U. pinnatifida*. J'ai d'une part recherché des marqueurs spécifiques d'*U. pinnatifida* (et d'autres laminaires indigènes en Europe) qui pourraient être mis en œuvre pour réaliser des marquages de spores *in situ* selon des techniques de type FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization), largement utilisées pour compter et identifier les micro-algues planctoniques (Not et al. 2002). J'ai par ailleurs conduit des tests expérimentaux visant à déterminer les capacités de fixation de gamétophytes à différents stades de leur développement suite à une perturbation. Sur ce dernier point, les études mises en place m'ont en outre permis d'analyser le sex-ratio du pool gamétophytique, un caractère permettant de tester l'existence de reproduction par parthénogénèse chez *U. pinnatifida*.

Partie A- Mise au point de marqueurs diagnostiques sur les spores de Laminariales

V-A.1. Introduction

Les analyses de la dispersion des organismes reposent dans un premier temps sur l'identification des vecteurs permettant cette dispersion. Dans le cas de nombreuses macroalgues, dont les laminariales et *U. pinnatifida* en particulier, les vecteurs potentiels sont les spores, les gamètes et les sporophytes en épaves. Comme rappelé précédemment, les spores pourraient jouer un rôle déterminant par leur quantité, leur viabilité et leur petite taille leur permettant de bénéficier de nombreuses voies de dispersion (naturelles par les courants ou artificielles dans les eaux de ballast). Cependant, leur taille (quelques microns à dizaines de microns) et l'absence de critères morphologiques rendent impossible la reconnaissance des spores au niveau spécifique en milieu naturel. Des approches indirectes telles que la mise en culture ont été utilisées afin d'évaluer la dispersion de manière qualitative et ce par groupes taxonomiques relativement larges (voir Introduction 3.1).

Une méthode alternative qui semble prometteuse est l'utilisation de techniques de marquage moléculaire à partir de prélèvements effectués en milieu naturel, des approches dérivées des techniques de codes-barres génétiques. Ce type d'approche a été largement développé pour identifier de manière spécifique des larves mais aussi des bactéries et du phytoplancton (Simon et al. 2000 ; DeLong, 1999). Chez les organismes les plus gros de cette catégorie, notamment les larves d'invertébrés, des tris d'échantillons prélevés dans le milieu naturel suivi de séquençage avec des marqueurs universels ont fait leurs preuves (Le Goff-Vitry et al. 2007). Pour les organismes plus petits, tels que picoplancton, les bactéries et les spores d'algues, les isolements individuels sont plus délicats à mettre en œuvre et des techniques de marquage moléculaire permettant une reconnaissance globale (*i.e.* sur l'ensemble des « particules » contenues dans un échantillon) ont été proposées. Une des méthodes les plus utilisées est l'emploi de la technique de « FISH » (Fluorescence *In Situ* Hybridization ; Glöckner et al. 1996).

Encadré V-A.1 :

Principe de la méthode FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization)

Cette méthode est basée sur l'emploi de sondes moléculaires, constituées de séquences d'ADN (< 20 nucléotides) spécifiques des espèces cibles et marquées d'un fluorochrome. Après avoir traversé la membrane cellulaire, la sonde s'hybride de manière spécifique à la séquence cible complémentaire à l'intérieur de la cellule intacte. En fonction de la sonde choisie, le niveau taxonomique visé peut être celui du phylum, du règne, du groupe ou de l'espèce. Plusieurs fluorochromes possédant des caractéristiques d'excitation et d'émission différentes peuvent être fixés sur les sondes pour amplifier le signal de fluorescence. Les cellules hybridées (fluorescentes) peuvent être détectées et comptées par microscopie à épifluorescence ou par cytométrie en flux pour une analyse plus automatique.

Cette technique offre des avantages considérables : elle permet de s'affranchir des étapes d'extraction d'ADN, de PCR et de séquençage généralement utilisées lors de barcoding classiques et qui sont destructives. Elle permet aussi d'éviter une étape de mise en culture. Cette méthode permet une identification individuelle d'une haute sensibilité et permet d'obtenir des informations quantitatives (nombre de cellules correspondant à la cible et l'abondance d'une espèce donnée). L'ADN ribosomal est généralement choisi pour définir les sondes moléculaires. Il est en effet polymorphe (*i.e.* variabilité inter-espèces) et l'abondance des ribosomes dans la cellule facilite la visualisation de la fluorescence.

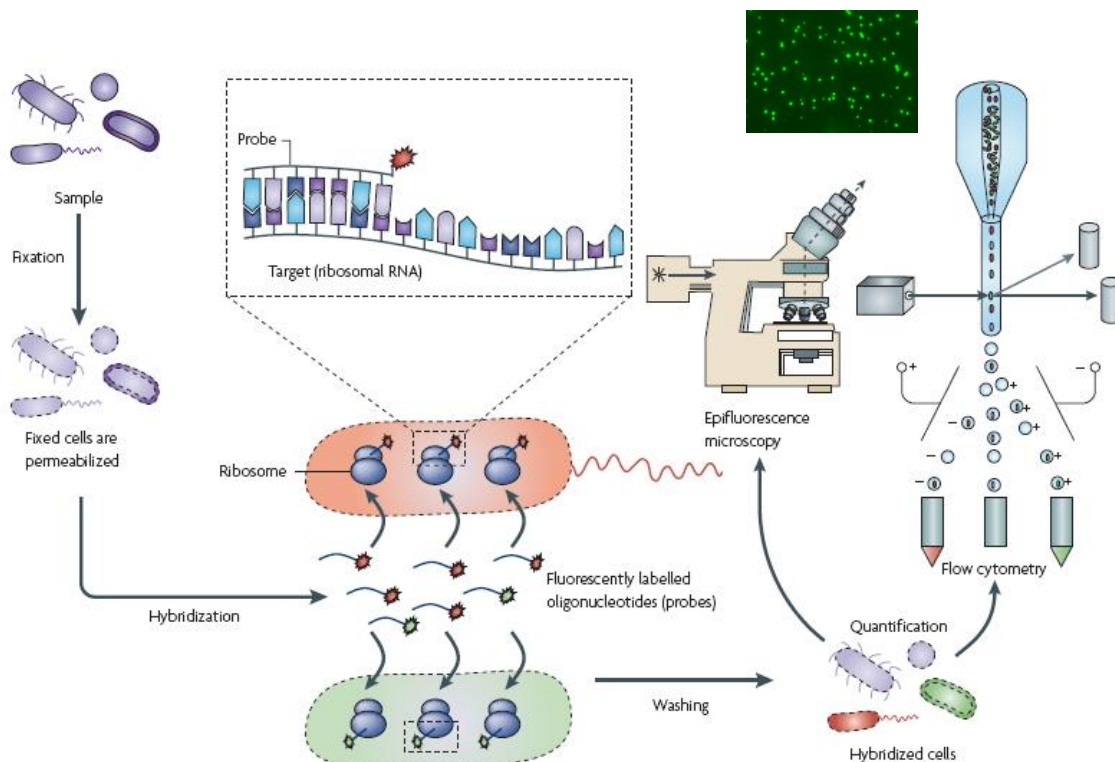


Figure 1 : les principales étapes du FISH Tiré de la revue d'Amann & Fuchs (2008)

Cette méthode est de plus non destructive et préserve la morphologie de la cellule ; elle permet donc en parallèle de l'identification moléculaire d'avoir accès à des informations sur la taille et la forme des particules. Le principe de cette technique est présenté dans l'encadré V-A.1.

Concernant *U. pinnatifida*, des essais préliminaires de l'utilisation de cette technique avaient été réalisés lors de la thèse de Marie Voisin, un travail effectué en collaboration avec Fabrice Not. Ces essais avaient eu pour objectif de tester la perméabilité des spores d'*U. pinnatifida* et la possibilité de les marquer. Ces essais réussis avaient toutefois été réalisés avec des sondes universelles eucaryotes. Mon travail au cours de cette thèse sur ce sujet a consisté à rechercher et tester la spécificité de sondes permettant la reconnaissance d'*U. pinnatifida* et ayant les qualités requises pour des applications de type FISH.

V-A.2. Matériels & Méthodes

V-A.2.1. Choix des espèces cibles

Afin d'évaluer la spécificité des sondes testées, et dans l'objectif à terme de pouvoir appliquer cette technique à des échantillons d'eau collectés dans le milieu naturel, nous avons travaillé sur notre espèce cible, *U. pinnatifida*, mais également sur d'autres espèces de macroalgues présentes dans les mêmes habitats ou dans des habitats voisins. Huit espèces dont *U. pinnatifida* ont ainsi été sélectionnées (Tableau V-A.1).

Tableau V-A.1 : Liste des espèces sélectionnées pour la recherche de sondes d'hybridation spécifiques d'*U. pinnatifida*

Famille	Espèce	Statut
Alariaceae	<i>Undaria pinnatifida</i> (<i>Up</i>)	Introduite
	<i>Alaria esculenta</i> (<i>Ae</i>)	Native
Laminariaceae	<i>Laminaria digitata</i> (<i>Ld</i>)	Native
	<i>Laminaria ochroleuca</i> (<i>Lo</i>)	Native
	<i>Laminaria hyperborea</i> (<i>Lh</i>)	Native
	<i>Saccharina latissima</i> (<i>Sl</i>)	Native
Phyllariaceae	<i>Saccorhiza polyschides</i> (<i>Sp</i>)	Native
Sargassaceae	<i>Sargassum muticum</i> (<i>Sm</i>)	Introduite

A l'exception d'*Alaria esculenta* et de *Sargassum muticum*, ces espèces sont des laminariales natives qui sont fréquemment (ex. *Saccorhiza polyschides*, *Saccharina latissima*)

ou quelquefois (ex. *L. ochroleuca*, *L. digitata*, *L. hyperborea*) trouvées dans les mêmes habitats qu'*U. pinnatifida*. *Alaria esculenta*, une espèce de la même famille qu'*U. pinnatifida* (Alariaceae) a été incluse car il s'agit de l'espèce native présente dans l'Atlantique Nord-Est et la Manche qui est la plus proche phylogénétiquement d'*U. pinnatifida*. Il faut cependant noter que ces deux espèces ne sont jamais trouvées dans les mêmes milieux, *A. esculenta* étant une espèce typique des modes battus dans lesquels ne se trouve pratiquement jamais ou de façon anecdotique *U. pinnatifida*. *Sargassum muticum* est utilisée ici pour son caractère d'espèce introduite et parce qu'on peut la trouver en sympatrie avec *U. pinnatifida*, mais il est important de rappeler que le cycle de vie de cette espèce est très différent. La sargasse a un cycle de vie mono-génétique, c'est-à-dire qu'un individu est capable de produire les deux types de gamètes : mâles et femelles. Les gamètes mâles sont dispersés dans le milieu tandis que les gamètes femelles restent fixés au niveau des réceptacles où a lieu la fécondation. Le zygote reste d'abord attaché au réceptacle, puis la plantule, une fois formée, se décroche avant de se fixer sur un nouveau support. Il n'existe donc pas de spores dispersantes comme celles des Laminariales. Selon la sensibilité de la technique FISH, on pourrait tenter de reconnaître des gamètes mâles de cette espèce introduite.

Des tissus conservés dans du gel de silice des 8 espèces cibles étaient disponibles dans les collections des équipes BEDIM et DIVCO de la Station Biologique de Roscoff. L'extraction d'ADN des individus a été réalisée à l'aide du kit d'extraction individuel « Nucleospin® 96 Plant » selon les recommandations du fabricant. L'ADN de 4 individus de chaque espèce a été extrait. Un réplicat d'extraction a été réalisé afin de disposer d'une quantité d'ADN suffisante. La qualité et la quantité des ADN extraits ont ensuite été vérifiées sur un gel d'agarose à 2%. Afin d'être sûr des labels d'espèces indiqués dans la collection, (*i.e.* à l'état jeune, des erreurs d'identification peuvent se produire entre certaines espèces en particulier *Laminaria digitata* (*Ld*), *Laminaria ochroleuca* (*Lo*) et *Laminaria hyperborea* (*Lh*)), une amplification du marqueur mitochondrial nommé « TrnP/rnL » (Engel et al. 2008) a été réalisée (cf. protocole détaillé en Annexe 6A). En effet, la taille des bandes issues de l'amplification de ce locus est diagnostique de plusieurs des espèces ciblées. Le marqueur mitochondrial TrnP/rnL est un outil simple pour distinguer par PCR certaines espèces de laminaires

V-A.2.2. Recherche d'un gène cible

Les sondes oligo-nucléotidiques ciblant l'ADN ribosomique sont souvent utilisées comme outil d'identification taxonomique en microbiologie marine (Amann *et al.* 1995). Nous avons sélectionné la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal (ADNr 18S ; Figure V-A.1) qui *a priori* présentait le meilleur compromis en termes (1) de taille de fragment sur lequel faire le choix de la sonde (± 1900 pb) et dont la séquence complète peut être obtenue grâce à trois amorces et (2) de variabilité de séquences afin de discriminer les organismes à différents niveaux taxonomiques (Not *et al.* 2002).

Cependant, concernant les espèces ciblées, très peu de séquences étaient disponibles dans les bases de données (GenBank). J'ai donc tout d'abord constitué une base de référence des espèces ciblées à partir des échantillons disponibles dans le laboratoire en procédant au séquençage de ce gène (fragment de ± 1100 pb; Figure V-A.1) avec des amorces universelles d'eucaryotes, utilisées en routine pour étudier le phytoplancton. Les séquences ont été obtenues sur deux individus de *L. digitata*, *L. hyperborea*, *L. ochroleuca*, *Saccharina latissima*, *Saccorhiza polyschides*, et 12 individus d'*U. pinnatifida* selon le protocole de l'annexe 6C.

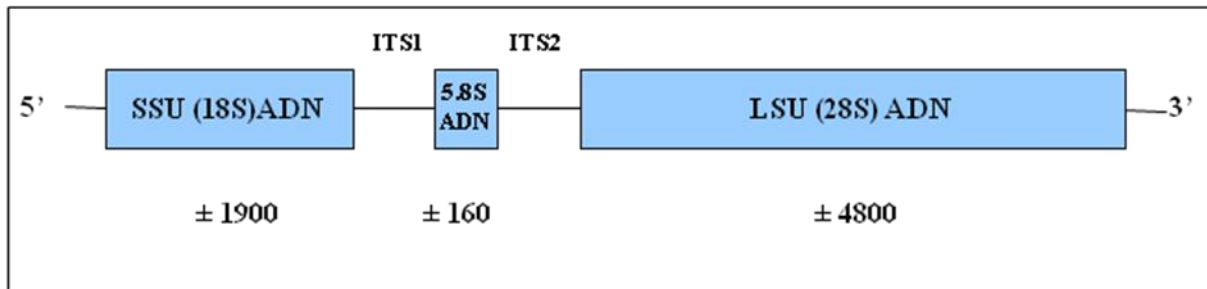


Figure V-A.1 Organisation et taille (en nombre de nucléotides) des séquences ribosomiques chez les eucaryotes

Au vu des résultats obtenus avec le gène 18S, j'ai décidé de me tourner vers un autre gène, toujours situé sur l'ADN ribosomique : le gène 28S (fragment de ± 4800 pb; Figure V-A.1), également beaucoup utilisé pour étudier la phylogénie du phytoplancton. Pour ce gène, des séquences étaient disponibles dans les bases de données, et notamment pour l'ensemble des espèces ciblées. J'ai réalisé l'alignement des séquences avec le logiciel Bioedit et défini des amorces me permettant d'amplifier une zone *a priori* polymorphe entre les 8 espèces cibles. Les taux d'erreur dans les bases de données de type GenBank n'étant pas nuls, j'ai

procédé à un séquençage de cette zone sur 4 individus de chacune des espèces suivantes : *Ld*, *Lh*, *Lo*, *Sl*, *Sp*, *Sm*, *Ae* et *Up* selon le protocole de l'annexe 6C.

V-A.2.3. Définition des sondes d'hybridation

Après alignement des séquences obtenues et disponibles sur Genbank avec le logiciel Bioedit, j'ai dessiné des sondes spécifiques d'*U. pinnatifida* et des autres espèces cibles. Les critères pour l'élaboration de telles sondes sont les suivants : (1) la taille de la sonde doit être d'environ 20 paires de base; (2) elle doit contenir entre 50% et 70% de GC (plus stable que les motifs riches en AT) et (3) la signature spécifique doit être si possible en position centrale (plus stabilisante). A partir de ces critères, j'ai créé un premier lot de sondes spécifiques des 8 espèces. Ensuite j'ai confronté mes sondes à la base de données SILVA (Pruesse et al. 2007), comprenant des séquences de la grande sous-unité ribosomique (LSU) du 28S. Cela m'a permis d'affiner le dessin des sondes et éliminer les sondes avec un pourcentage de similitude élevé (ex. sondes ne comprenant qu'une paire de base de différence).

V-A.2.4. Test de spécificité du gène cible par Dot Blot

Afin de vérifier la spécificité des sondes réalisées, c'est-à-dire si elles s'hybrident de façon spécifique sur le gène 28S amplifié de chacune des espèces ciblées, j'ai effectué des Dot Blot sur des produits de PCR provenant de sporophytes. Ceci est une procédure commune dans le développement de sondes utilisées pour réaliser des FISH (Simon et al. 2000).

Le principe du DOT BLOT est le suivant. La zone comprenant les sondes des espèces ciblées est amplifiée par PCR avec les amorces 28S dessinées selon le protocole détaillé de l'Annexe 6B), puis le produit est fixé avec l'appareil Bio Dot sur une membrane en nylon, chargée positivement (Roche) afin de réaliser un « dot-blot ». Différentes étapes sont nécessaires: (1) la fixation des produits PCR à la membrane dans un four à UV, (2) la pré-hybridation et hybridation avec des sondes marquées à la digoxygénine (DIG), (3) des lavages afin d'éliminer les sondes non fixées, (4) la détection par une réaction enzymatique et enfin (5) la visualisation de la chimioluminescence. L'ensemble de ces différentes étapes a été réalisé avec le kit « DIG Luminescent Detection Kit ». Le protocole détaillé se trouve en annexe 6F.

Deux sondes ont été testées par espèce ou par groupe, excepté *Fucus vesiculosus* utilisé comme témoin négatif. Chaque membrane contient 72 amplifiants issus de 9 espèces

différentes, excepté pour la sonde LAM_TYL_1 (64 amplifiants, 8 espèces). Chaque espèce est représentée par 4 individus différents (en répliqués car extraits 2 fois).

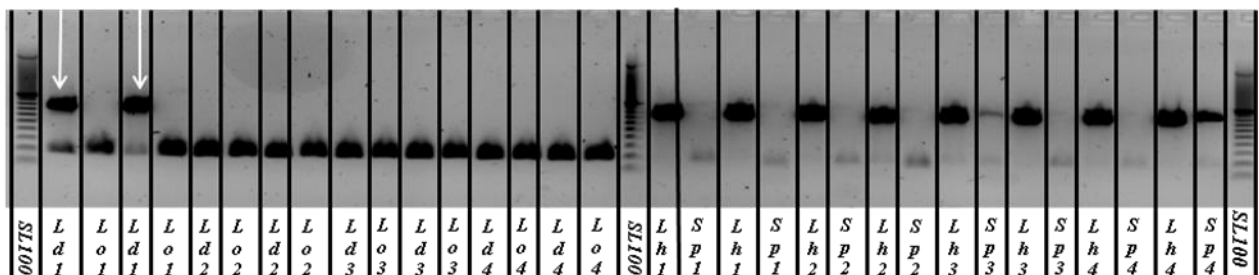
V-A.3. Résultats & Discussion

V-A.3.1. Choix de la région diagnostique: 18S *versus* 28S

Après une étape de validation des échantillons en utilisant le marqueur TrnP/rnL, en particulier dans le but de distinguer *L. digitata* et *L. ochroleuca* qui lorsqu'elles sont jeunes peuvent être confondues¹ (Figure IV-A.2), j'ai dans un premier temps constitué une base de données de séquence sur le gène 18S. La longueur des fragments amplifiés et séquencés obtenus avec ce gène pour chaque individu était d'environ 1080 paires de base. L'alignement des séquences obtenues pour les différentes espèces cibles a montré que ce gène était très conservé entre ces espèces (Annexe 6D). Ce manque de polymorphisme rendait impossible la réalisation de sondes d'hybridations spécifiques. Nous avons toutefois noté une exception avec *Saccorhiza polyschides* qui présentait une séquence divergente de celles obtenues sur les autres espèces cibles. Ce résultat est en accord avec les phylogénies récentes des algues brunes montrant une rapide radiation au sein des Laminariales *sensu lato* et une forte divergence des Phyllariaceae en particulier (Draisma et al. 2001; Lane & Mayes 2006; Rousseau et al. 2001).

Figure V-A.2 : Résultats de l'amplification du locus TrnP/rnL pour discriminer certaines laminariales

Ld : *L. digitata* ; *Lo* : *L. ochroleuca* ; *Lh* : *L. hyperborea* ; *Sp* : *Saccorhiza polyschides* et SL100 : marqueur de taille. Les flèches indiquent les individus pour lesquels le marqueur a répondu négativement



¹ A noter que nous avons effectivement repéré une erreur dans la labellisation des échantillons lors de ce test. Une seconde information intéressante est qu'une faible amplification a été obtenue avec l'espèce *Sacchoriza polyschides* dont l'ADN n'avait pas pu être amplifié par Engel et al. (2008) avec ce locus.

Le choix initial du gène 18S a été guidé par le fait que ce gène est largement employé pour l'étude des communautés bactériennes et phytoplanctoniques notamment parce qu'il est variable entre taxons et très abondant dans les cellules (De Long et al. 1999 ; Not et al. 2002 ; Not et al. 2002 ; Simon et al. 2000). De plus, une importante variation inter-spécifique entre taxons couplée avec une absence de variation intra-spécifique a été reportée pour ce gène chez de nombreux métazoaires (Abouheif et al. 1998). Par ailleurs, un des avantages de l'ADNr 18S est la disponibilité d'importantes bases de données de séquences sur ce gène (bien que ce ne fût pas le cas sur les espèces ciblées dans cette étude). A l'issue des résultats obtenus avec ce gène et pour palier le manque de polymorphisme, je me suis tournée vers un autre gène, le gène 28S de la grande sous-unité ribosomique (*i.e.* LSU). Il a été utilisé récemment avec d'autres gènes (ex. ITS) pour étudier la phylogénie dans l'ordre des Laminariales (Lane & Mayes 2006). Ce travail de Lane et al. (2006) a été notamment à l'origine de la mise en évidence d'une divergence importante au sein du genre *Laminaria* avec la position divergente de l'espèce alors nommée *L. saccharina* : ces études ont conduit à la « résurrection » du genre *Saccharina* (pour reprendre le terme employé par les auteurs) et à une nouvelle nomenclature pour *L. saccharina*, appelée depuis *Saccharina latissima*.

Après séquençage du gène 28S chez 36 individus, j'ai obtenu des fragments ayant une taille variant de 630 à 690 paires de bases selon les individus. Le résultat de l'alignement des séquences obtenues est présenté en annexe 6E. Ce séquençage m'a permis de mettre en évidence des erreurs dans les séquences disponibles sur Genbank. La première était une erreur dans l'entrée d'une séquence de *Sargassum muticum*, la même séquence ayant été entrée par erreur deux fois pour deux espèces différentes (com. pers. Florence Rousseau). La deuxième portait sur des séquences de *Saccharina latissima*. Il est possible que ces zones correspondent à des zones de variabilité intra-spécifiques. Cependant, aucune variation n'a été détectée dans nos 4 individus après une nouvelle vérification des séquences.

V-A.3.2. Spécificité des tests d'hybridation sur membrane

Sur la base des critères présentés dans la section « Matériels et Méthodes », 2 sondes potentiellement spécifiques de chaque espèce ou groupes d'espèces ont été sélectionnées. Les espèces et groupes ciblés sont présentés dans le tableau V-A.2.

Ces sondes *a priori* spécifiques cibleraient chacune des espèces suivantes : *Undaria pinnatifida*, *Alaria esculenta*, *Saccorhiza polyschides*, *Saccharina latissima*, *Sargassum muticum*. J'ai également dessiné une sonde regroupant les trois espèces locales du genre

Laminaria (*L. digitata*, *L. ochroleuca* et *L. hyperborea*). Enfin une sixième sonde a été créée afin d'hybrider l'ensemble des espèces. En annexe 6E, les localisations des différentes sondes dessinées sur la base des séquences obtenues avec le gène 28S sont indiquées avec des surlignages de couleurs différentes.

Les résultats de différentes expériences d'hybridation sur membrane (Dot-Blot) sont présentés dans les figures V-A.3 & V-A.4. Les caractéristiques des sondes ayant donné des résultats positifs à l'issue de ces tests sont indiqués dans le tableau V-A.2.

Tableau V-A.2 : Présentation des sondes définies pour être spécifiques de certaines espèces ou groupes d'espèces parmi les 8 espèces ciblées

Pour chaque espèce ou groupe d'espèces, les caractéristiques de la sonde définie sont indiquées : son code, sa séquence, sa taille (en nombre de paires de base). La température d'hybridation (T_H) et la température des bains de lavages (T_L) utilisées pour les expériences d'hybridation sur membrane sont également indiquées.

Espèce(s)	Code	Séquence (5' -> 3')	Taille	T_H	T_L
<i>Undaria pinnatifida</i>	Up_1	CCACGGCAGCGCGCGTA	17	62	58
<i>Alaria esculenta</i>	Ae_7	CAGGGCGGCGTGCGTAC	17	62	60
<i>Laminaria digitata</i> <i>L. ochroleuca</i> <i>L. hyperborea</i>	Ld_Lo_Lh_2	CCACGCCGCGCGCGTAC	17	62	56
<i>Saccharina latissima</i>	Sl_4	CGCCTCGGAAGGTAACCTC	19	62	58
<i>Saccorhiza polyschides</i>	Sp_1	AAATCAGGCGTTCGCGC	17	62	58
<i>Sargassum muticum</i>	Sm_5	GCCGGGGTGCTCTCCGTC	18	62	56
Toutes (8 espèces)	LAM_TYL_1	GATTGCAGCTCAAAGCGGGT	20	49	46

La figure IV-A.3 correspond à un test d'hybridation des produits de PCR du gène 28S obtenus sur les 8 espèces cibles (*Undaria pinnatifida*, *Laminaria digitata*, *Laminaria ochroleuca*, *Laminaria hyperborea*, *Saccorhiza polyschides*, *Alaria esculenta*, *Saccharina latissima* et *Sargassum muticum*) avec une sonde définie devant s'hybrider en théorie avec l'ensemble des espèces cibles.

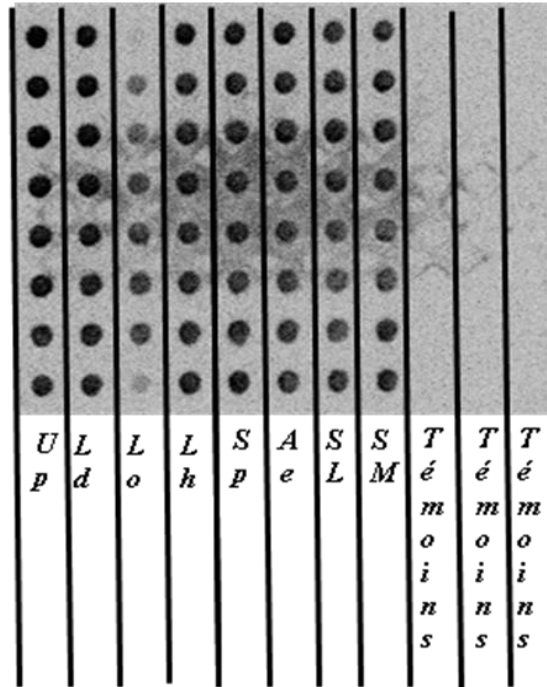


Figure V-A.3 : Exemple de résultats des hybridations des produits de PCR (locus 28S) avec la sonde LAM_TYL_1 (5pmol/mL)

Cette sonde a été dessinée afin d'être compatible avec les séquences des 8 espèces ciblées. Les résultats sont donc cohérents par rapport à cet attendu. Les témoins contiennent de l'eau et du Na OH.

A l'issue du premier blot, il s'avère que la sonde s'est bien hybridée sur toutes les espèces et l'expérience semble concluante vu l'absence de tout signal dans les zones où se trouve un témoin négatif. La figure IV-A.4 représente le résultat de 6 expériences d'hybridations réalisées avec 5 sondes spécifiques (*Up*, *Sp*, *Sm*, *Ae* et *Sl*) et une sonde spécifique à un groupe (*Laminaria* sp., *Ld*, *Lo* et *Lh*). Une espèce servant de témoin négatif a été ajoutée au dispositif : *Fucus vesiculosus*. L'obtention de ces résultats a nécessité de nombreux essais et mises au point pour ajuster notamment les conditions de lavages (la température des solutions de lavage apparaît comme un point critique). Les résultats sont assez encourageants : les sondes se sont bien hybridées sur l'espèce (ou le groupe d'espèces) pour laquelle (lequel), elles ont été dessinées. Il existe toutefois une exception dans le cas de *Saccharina latissima* où on note encore la présence d'un léger bruit de fond dans les puits contenant de l'ADN de *Sargassum muticum*.

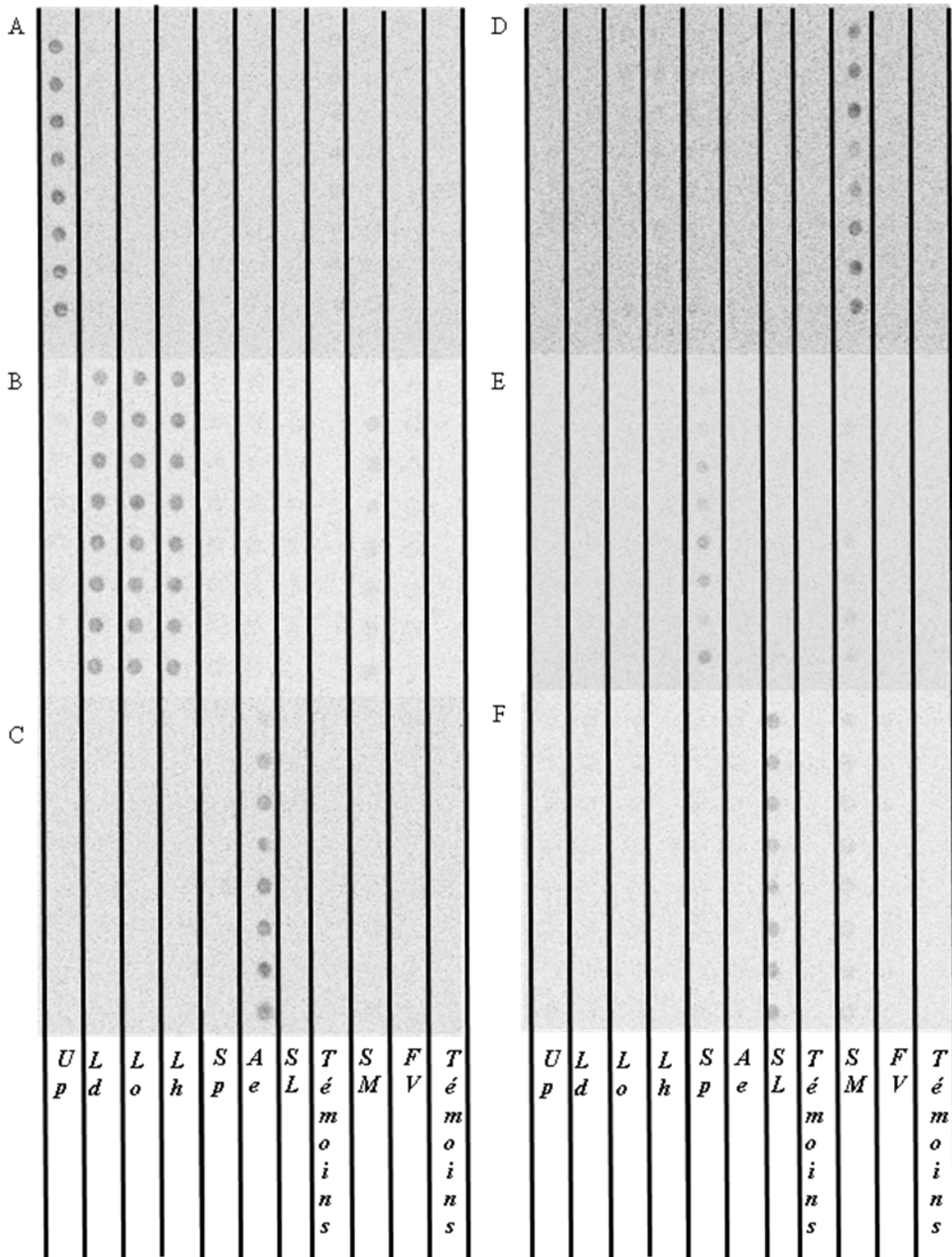


Figure V-A.4 : Exemple de résultats des hybridations des produits de PCR (locus 28S) avec différentes sondes (7 μ mol/mL).

A : sonde *Up*_1 ; B : sonde *Ld_Lo_Lh*_2 ; C : sonde *Ae*_7 ; D : sonde *Sm*_5 ; E, sonde *Sp*_1 ; F : sonde *Sl*_4. Les caractéristiques de ces sondes sont indiquées dans le tableau V-A.2.

V-A.4. Conclusions & Perspectives

Les tests de spécificité effectués avec les sondes développées ici ont donné des résultats concluants permettant de passer à l'étape suivante : tester nos sondes sur des spores de Laminariales. Dans cet optique, des sporulations ont été réalisées en utilisant des individus sexuellement matures de chaque espèce cible. Les spores obtenues ont été fixées sur des filtres selon un protocole classiquement utilisé avant la réalisation de FISH (voir annexe 6G-I à II). Dans le cadre de ces travaux de thèse, j'ai choisi de travailler en priorité sur *U. pinnatifida*. Cependant par manque de temps, seuls quelques tests d'hybridation par FISH ont pu être effectués (protocole en Annexe 6G-III) et ces tests n'ont pas été concluants, suggérant des problèmes de perméabilité des membranes cellulaires. Ces résultats étaient inattendus compte tenu des très bons résultats obtenus par Marie Voisin qui avait testé la méthode FISH avec des sondes universelles eucaryotes. Les points de blocage pour mettre en œuvre la technique FISH étaient alors l'identification de sondes spécifiques, ce qui a été l'objet de mes recherches. Aussi, la prochaine étape à l'issue de ce travail sera de déterminer les facteurs qui limitent l'utilisation de la technique FISH avec les nouvelles sondes dessinées et selon les protocoles utilisés.

Lever ces points de blocage technique m'apparaît comme essentiel car cette méthode, si elle s'avérait réalisable, nous ouvrirait la voie d'un large champ d'investigation concernant la dispersion des spores des Laminaires et en particulier d'*U. pinnatifida*, en milieu naturel. A partir de prélèvements d'eau effectués dans le milieu à différentes saisons, périodes de la journée ou de la marée, nous pourrions analyser les moments de présence des spores d'*U. pinnatifida* ainsi qu'étudier leur variation (quantité, concentration) en fonction des habitats ou des environnements dans lesquels se trouve l'algue. Cette approche permettrait également de déterminer l'importance du pool de propagules d'*U. pinnatifida* en comparaison d'autres algues brunes notamment des Laminariales et de décrire les courbes de dispersion des propagules en fonction de la distance des individus sexuellement reproducteurs. Toutes ces approches pourront être effectuées une fois la mise au point technique terminée.

Encadré V-B.1

Types de reproduction chez *U. pinnatifida*

Deux types de reproduction sont possibles chez *Undaria pinnatifida* :

Sexuée : les gamétophytes mâles libèrent des gamètes flagellés mobiles alors que les gamétophytes femelles produisent des oosphères sur le gamétophyte femelle ; le gamète mâle vient féconder l'oosphère et le zygote germe en une plantule sur le gamétophyte femelle.

Deux types de fécondations sont possibles :

- (1) l'allofécondation est issue du croisement de gamètes mâles et femelles provenant de gamétophytes mâles et femelles de deux sporophytes différents,
- (2) l'autofécondation est issue du croisement de gamètes mâles et femelles provenant des gamétophytes mâles et femelles d'un même sporophyte.

Asexuée (parthénogénèse) : le gamète femelle produit un individu sans fécondation ; chez *U. pinnatifida*, ce type de reproduction implique un doublement chromosomique chez les spores. Le sporophyte obtenu est morphologiquement identique à celui obtenu suite à une reproduction sexuée. Les descendants gamétophytiques qui en sont issus sont en revanche uniquement des gamétophytes femelles.

Partie B- Etude expérimentale sur la phase gamétophytique, potentiel facteur de succès pour l'établissement de nouvelles populations (dispersion et parthénogénèse)

Note : cette étude a fait l'objet du stage de Master 1 de Jennifer Langlois que j'ai encadrée au printemps 2009.

V-B.1. Introduction

Le succès d'une espèce introduite dépend de nombreux facteurs (Sakai et al. 2001 ; Facon et al. 2006) dont le cycle de vie. En particulier, la reproduction asexuée pourrait conférer un avantage à l'installation des espèces introduites, comme par exemple celui d'éviter le coût de la reproduction sexuée ou de présenter des taux de recolonisation plus rapides si les clones sont bien adaptés à leur milieu et aux interactions biotiques. Ces propriétés sont particulièrement intéressantes dans le cas d'espèces introduites. Dans le cas d'*U. pinnatifida*, la possibilité de reproduction par parthénogénèse a été décrite en conditions de laboratoire avec l'observation du développement de sporophytes à partir de gamétophytes isolés (Fang et al. 1982; Encadré V-B.1). La parthénogénèse chez *U. pinnatifida* se traduirait par un doublement chromosomique au stade haploïde chez le gamétophyte femelle conduisant à des sporophytes homozygotes. Fang (1983) et Fang et al. (1982) ont observé que la descendance gamétophytique des « parthéno-sporophytes » (*i.e.* sporophytes produits par parthénogénèse) était exclusivement composée d'individus femelles. De plus, on utilise chez cette espèce dans son aire native des clones gamétophytiques fragmentés pour produire des jeunes sporophytes pour la culture depuis 1990 Liu et al. 2004.

Le stade gamétophytique et cette reproduction parthénogénétique pourraient être un des facteurs participant à la réussite de l'introduction d'*U. pinnatifida*. Cependant les observations réalisées par Fang et al. (1982) ne concernaient que des populations de l'aire native et ce potentiel de reproduction par parthénogénèse n'a pas été décrit dans les

populations introduites européennes. Nous ne disposons dans les populations européennes que de données indirectes basées sur l'analyse de la composition génotypique des populations qui suggèrent la présence de parthénogénèse dans certaines de ces populations. En particulier, dans le cadre de l'étude des populations de la Baie de St-Malo (Chapitre I et II), nous avons mis en évidence l'existence d'individus homozygotes sur tous les locus chez 48% des individus d'une population, la population du Bassin Vauban.

Afin de tester la présence de cette forme de reproduction dans les populations naturelles d'*U. pinnatifida*, nous avons échantillonné 82 sporophytes dans 4 populations se développant dans des zones portuaires, lieu privilégié d'introduction de cette algue. Les sporophytes matures ont été prélevés et des observations de leur descendance gamétophytique ont été réalisées au microscope inversé pour estimer la fréquence des gamétophytes mâles et femelles. La reproduction de parthéno-sporophytes devrait se traduire par une descendance uniquement composée de gamétophytes femelles.

Par ailleurs, ces gamétophytes pourraient participer à la dispersion de l'algue s'ils ont la capacité de s'attacher à nouveau après leur détachement du fait de perturbations (la fixation étant indispensable au développement de sporophytes). En principe, les spores libres des Laminariales se fixent puis se développent en gamétophytes mâles ou femelles. Cependant, des observations sporadiques menées dans l'équipe BEDIM sur des Laminariales suggèrent que, détachés de leur substrat, les gamétophytes pourraient à nouveau se fixer. Si de telles observations étaient réalisées chez *U. pinnatifida*, les gamétophytes pourraient alors être considérés comme de nouveaux agents de dispersion naturelle s'ajoutant aux spores, gamètes mâles et sporophytes matures arrachés. Les taux de fixation des gamétophytes après leur détachement par deux méthodes ont donc été mesurés afin de vérifier ces observations.

V-B.2. Matériels & méthodes

V-B.2.1 Site d'étude et échantillonnage

4 populations d'*U. pinnatifida* ont été échantillonnées le 21 et 23 avril 2009, dans 4 ports de la Bretagne Nord (ports de Vauban et des Bas Sablons à St-Malo, port du Moulin Blanc à Brest et port de l'Aber Wrac'h). Dans chaque population, 17 à 27 sporophytes matures ont été prélevés, soit un total de 82 sporophytes.



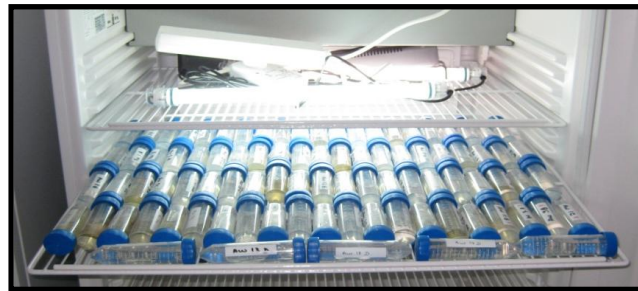
1) Récolte des sporophylles matures

A gauche, un individu fraîchement sorti de l'eau
A droite, découpage et nettoyage du sporophylle de l'individu



2) Sporulation

A gauche : dépôt des lames quadrillées au feutre dans le bécher contenant le sporophylle
A droite, les béchers sous agitation et lumière



3) Mise en culture :

Eau de mer enrichie, photopériode 12:12, intensité lumineuse 20-25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, température 16°C

4) Observation au microscope inversé (20X)

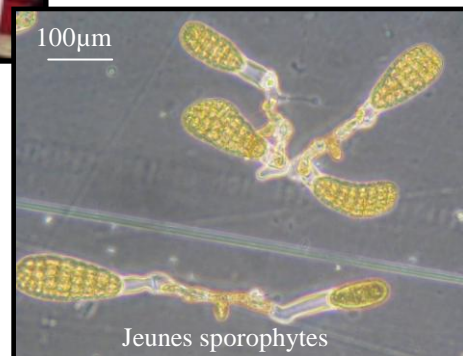
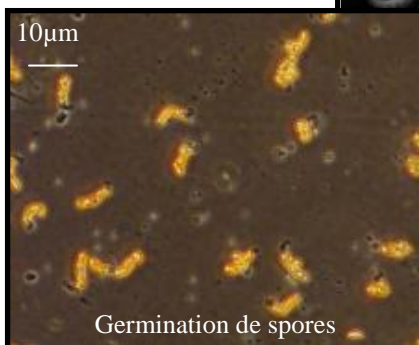


Figure V-B.1: Diagramme synthétique du protocole de mise en culture

Lors de chaque prélèvement, une photo de l'individu a été prise. La longueur du stipe (zone comprenant la zone de reproduction, appelée sporophylle) a été mesurée pour chaque individu ainsi que la longueur totale. Un morceau de tissu a été prélevé et placé dans un sac de silicagel en vue d'analyses génétiques ultérieures. Le sporophylle a ensuite été coupé et nettoyé avec de l'eau du milieu afin d'éliminer grossièrement les épiphytes. Ensuite, les sporophylles ont été placés individuellement dans des sachets mis dans une glacière jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Au retour, l'ensemble des sporophylles a été placé à 20°C à l'obscurité pour la nuit, dans une chambre thermostatée (salle de culture).

V-B.2.2. Mise en culture

Les différentes étapes de mise en culture sont synthétisées dans la figure V-B.1. Le jour suivant le prélèvement sur le terrain, la sporulation a été réalisée en plaçant les sporophylles individuellement dans un bécher contenant de l'eau de mer (EDM) filtrée à 0.2µm. Chaque bécher contient 5 lames en verre (5 réplicats) sur lesquels les spores se fixent. La sporulation est réalisée sous agitation, pendant des temps variables (entre 10 et 60 minutes) selon l'état de maturité des sporophytes. Après sporulation, les lames sont placées dans des tubes « Falcons » remplis d'EDM filtrée à 0.2 µm et enrichie avec du milieu de culture « Provasoli » (Provasoli & Carlucci 1974). L'ensemble, tube falcon de 50 mL et lame, est placé à l'horizontal en chambre thermostatée sous des conditions standards de culture: température 16°C, photopériode 12 :12 et intensité lumineuse de 20-25 µmol. m⁻².s⁻¹ pendant toute la durée de l'étude. Le milieu de culture est changé une fois par semaine. A chaque changement d'eau, l'eau est stockée dans des bidons de 20L pour être javellisée puis autoclavée afin de tuer tous les spores et les gamétophytes. L'eau javellisée était ensuite équilibrée à pH neutre avant d'être éliminée.

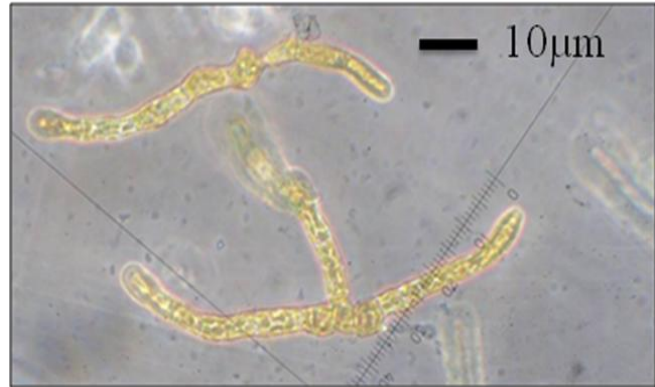
Au cours de cette expérience, 82 sporophytes d'*U. pinnatifida* ont été mis en culture et un total de 410 lames ont été utilisées.

V-B.2.3. Obtention et analyses statistiques des données de sex-ratios

Une fois le développement des gamétophytes suffisamment important pour différencier sans ambiguïté les gamétophytes mâles et femelles par leur morphologie (généralement au bout de 15 jours ; Figure IV-B.2), la fréquence des gamétophytes femelles a été estimée pour chacune des 74 descendances gamétophytiques par des observations au microscope inversé Olympus CKX41 à l'objectif 20X en comptant le nombre de chaque type

de gamétophytes (mâles et femelles) par champ visuel jusqu'à comptabiliser un total de 100 gamétophytes par individu. Ces mesures ont été réalisées au jour 20 (J20) de culture et répétées au jour 35 (J35) afin de vérifier la stabilité des sex-ratios au cours du temps.

Gamétophyte femelle



Gamétophyte mâle

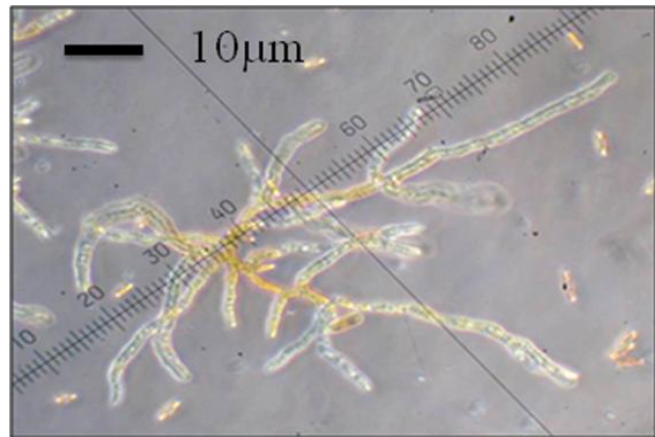


Figure IV-B.2 : Identification des stades gamétophytiques femelles et mâles à J20 de culture pour un individu de la population du port du Bas Sablons.

Les gamétophytes mâles sont plus fins, présentent un grand nombre de cellules de petite taille et sont plus ramifiés en comparaison des gamétophytes femelles.

Les taux de gamétophytes femelles ont été comparés entre populations par des tests non-paramétriques (Kruskal-Wallis et Mann-Whitney). Les taux de gamétophytes mâles et femelles ont été comparés à un sex-ratio théorique équilibré de 50% de gamétophytes mâles et 50% de gamétophytes femelles ainsi qu'à un sex-ratio déséquilibré de 90% de gamétophytes femelles à l'aide d'un test binomial (Hardy 2002). Des tests t pour données appariées ont été utilisés pour tester l'hypothèse d'homogénéité des résultats obtenus à J20 et J35. Enfin, une analyse de corrélation a été effectuée entre la fréquence des gamétophytes femelles et la hauteur du sporophylle ou le nombre d'ailettes (estimé à partir des photos de terrain). L'ensemble des tests et analyses ont été réalisés avec le logiciel d'analyse JMP 5.0.1a.

V-B.2.4. Obtention et analyses des données sur la capacité de fixation après détachement des gamétophytes

Cette étude nous a également permis de tester la capacité des gamétophytes à se fixer à nouveau sur un substrat après leur détachement. Des tests préliminaires ont permis d'identifier deux méthodes pour détacher efficacement les gamétophytes des lames de verre : une immersion du tube Falcon pendant 10 min dans un bain à ultrasons et un fort jet d'eau de mer avec une pissette sur la lame. Pour ces deux méthodes, 10 individus ont été choisis au hasard dans les 4 populations et le détachement des gamétophytes a été réalisé à 2 stades de développement : stade « jeune » (J7 de culture) et stade « âgé » (J25).

- Suite au détachement par ultrasons, la lame de verre où étaient préalablement fixés les gamétophytes a été remplacée par une lame vierge, laissée pendant toute la durée de l'étude et observée à intervalles de quelques jours.
- Suite au détachement par le jet de pissette, une lame vierge a été placée dans le jus pendant 10 min, puis une seconde a été mise dans le jus pendant 10 min après avoir enlevée la première et ce jusqu'à 1h. Une dernière lame vierge a été placée après 1h et laissée pendant toute la durée de l'étude.

Des tests exacts de Fisher ont été réalisés afin de tester l'identité des résultats entre méthodes pour un même stade de détachement ou entre stades de détachement pour une même méthode de détachement.

V-B-3. Résultats

V-B.3.1. Estimations des sexes-ratios

Sur l'ensemble des 74 descendances de sporophytes étudiées (issues des 4 populations), la fréquence moyenne des gamétophytes femelles, au jour 20 (J20) de culture, est de 0.632 ± 0.224 alors qu'elle est de 0.900 ± 0.179 au jour 35 (J35) de culture (Figure V-B.3). Les valeurs sont très variables entre individus avec, par exemple à J20, une valeur minimum de 0.120 observée pour un individu de l'Aber Wrac'h (Aw) et une valeur maximale de 1 pour 7 individus de Brest (B) et un individu de l'Aber Wrac'h (Aw) (Figure V-B.4).

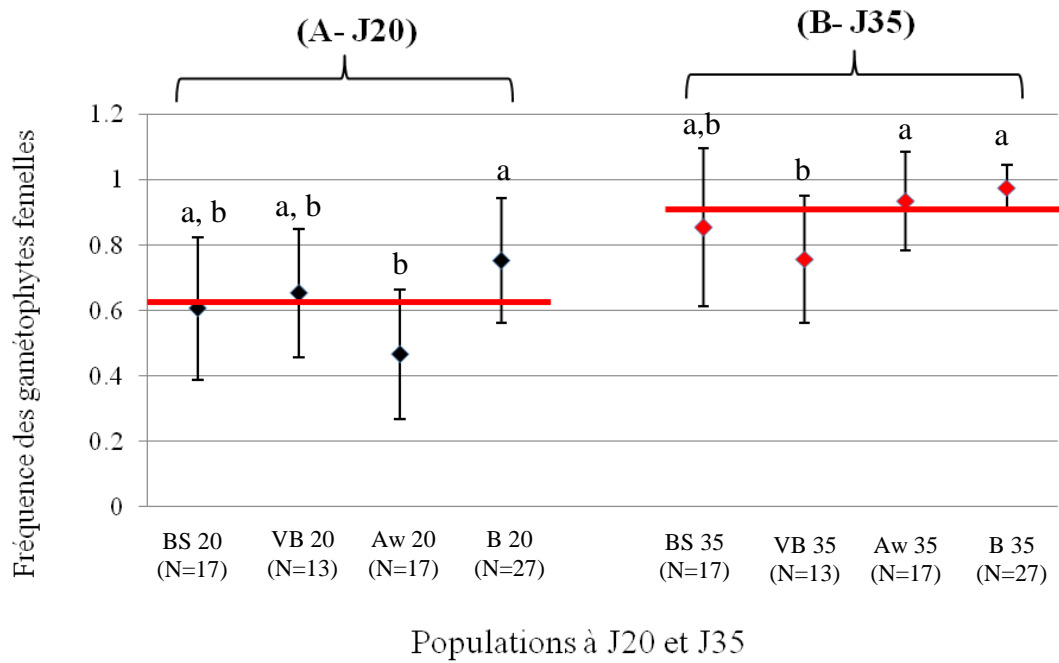


Figure V-B.3. Taux de gamétophytes femelles dans des descendance gamétophytiques obtenues à partir d'individus prélevés dans 4 populations bretonnes (Bs: Bas Sablons, Vb: Vauban, Aw: Aber Wrac'h, B: Brest)

La fréquence moyenne (et écart-type) des taux de gamétophytes femelles (par individu) est indiquée pour chacune des 4 populations analysées aux jours J + 20 (A) et J + 35 (B) de culture. La ligne rouge symbolise la moyenne sur l'ensemble des 74 descendance étudiées (0.632 ± 0.224 à J20 et 0.900 ± 0.179 à J35). Les populations avec des lettres différentes sont caractérisées par des valeurs significativement différentes (test de Tukey).

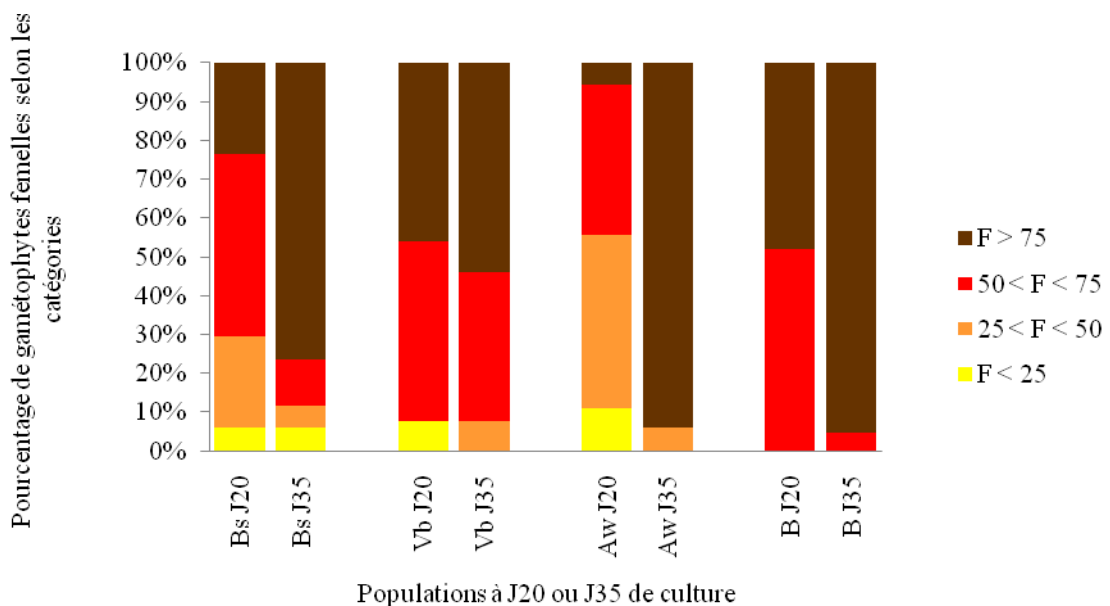


Figure V-B.4: Distribution des descendance gamétophytiques femelles (F) en 4 catégories ($F < 25\%$ de gamétophytes femelles, $25 < F < 50$, $50 < F < 75$, $F > 75$) pour les 4 populations (Bs: Bas Sablons, Vb: Vauban, Aw: Aber Wrac'h, B: Brest)

A J35, les valeurs sont toutefois beaucoup plus homogènes entre individus avec 50% des individus ne présentant plus que des gamétophytes femelles. Le taux de gamétophytes femelles est significativement différent entre population aux 2 dates (test de Kruskal-Wallis, $p < 10^{-3}$). En moyenne, la population de Brest est celle qui présente le plus fort taux de femelles dans les descendances (0.752 ± 0.192 à J20 et 0.975 ± 0.068 à J35 ; Figure V-B.3). Ces valeurs sont significativement différentes de celles observées pour l'Aber Wrac'h à J20 (0.467 ± 0.198 ; test de Mann-Whitney, $p = 10^{-4}$) et pour Vauban à J35 (0.757 ± 0.150 ; test de Mann-Whitney, $p = 2.10^{-4}$) (Figure IV-B.3).

En termes de sex-ratio, toutes les populations dévient significativement (test binomial, $p < 0.01$) d'un sex-ratio théorique caractérisé par 50% de gamétophytes femelles à J20 et J35, à l'exception de la population de l'Aw au jour 20.

A J20, 17.6% des individus de l'Aw, 33.3% des individus de Bs, 61.5% des individus de Vb et 74% des individus de B montrent un excès de femelles par rapport à cet attendu de 50% et une proportion de 5.6% des individus de Bs, 5,9% des individus de l'Aw, 7.7% des individus de Vb et 29.7% des individus de B montrent également un excès de femelles par rapport à un seuil de 90%.

A J35, ces chiffres s'accroissent de façon importante : 94.1% des individus de l'Aw, 88.2% des individus de Bs, 84.6% des individus de Vb et 100% des individus de B montrent des excès de femelles par rapport à un seuil de 50% et 64,7% des individus de Bs, 76.5% des individus de l'Aw, 23% des individus de Vb et 85.2% des individus de B montrent des excès de femelles par rapport à un seuil de 90%. La fréquence des femelles est significativement supérieure à J35 pour les 4 populations par rapport à J20 (test t pour données appariées, $p < 10^{-3}$ pour les 4 populations).

Par ailleurs, aucune corrélation n'a été trouvée, au seuil de 5%, entre la fréquence des gamétophytes femelles et la hauteur du sporophylle (J20 : $p = 0.786$; J35 : $p = 0.357$) et/ou le nombre d'ailettes (J20 : $p = 0.375$; J35 : $p = 0.075$).

V-B.3.2. Fixation des gamétophytes

La fixation, après détachement, est efficace avec les deux méthodes de détachement mais le taux de fixation est plus important après détachement par les ultrasons. Un test exact de Fisher montre qu'il existe une différence significative dans le taux de fixation post-détachement à J7 entre les 2 méthodes ($p = 0.02$; Tableau V-B.1). En revanche, il n'existe pas

de différences significatives de la fixation quand on compare les 2 « âges » de détachement ($p > 0.15$) malgré une fragmentation apparemment plus importante des gamétophytes âgés lors de leur détachement. Par ailleurs, il semble que ces résultats soient fortement influencés par le temps de contact : en effet, si une lame vierge est laissée plusieurs minutes dans la solution contenant les gamétophytes en suspension, les résultats positifs sont beaucoup moins nombreux.

Tableau V-B.1: Comparaison des taux de fixation après un détachement des gamétophytes à deux âges différents (7 jours et 25 jours de culture) et selon deux types de méthodes de détachement.

Le tableau indique la probabilité associée au test exact de Fisher. H0: taux de fixation identique entre les méthodes de détachement (pissette (P) vs. ultrasons (U)) ou l'âge du détachement (J7 vs J25).

Comparaisons	Probabilité
J7 P/J7 U	0.02
J25 P/ J25 U	1.00
J7 P/J25 P	0.15
J7 U/J25 U	0.78

V-B.4. Discussion

V-B.4.1. Biais de sexes-ratios ?

Cette étude a mis en évidence l'existence de biais de sex-ratio des gamétophytes *d'U. pinnatifida* avec un excès significatif en faveur des gamétophytes femelles dans les descendances gamétophytiques d'individus prélevés dans 4 populations spontanées bretonnes. En outre, sous l'hypothèse de production de descendances gamétophytiques uniquement femelles à partir de parthéno-sporophytes, nos résultats suggèrent la possibilité de ce mode de reproduction dans les populations étudiées. En effet, des descendances sporophytiques composées entièrement de gamétophytes femelles au jour 20 d'observation ont été observées dans 2 populations, Brest (7 des 27 individus étudiés) et Aber Wrac'h (1 des 17 individus étudiés) et des taux de 97% ont été observés pour un individu de chacune des 2 autres populations.

Cependant, l'analyse des résultats à J35 a montré que la proportion de gamétophytes femelles augmentait au cours du temps quelle que soit la population considérée, suggérant une mortalité différentielle, plus précoce, des gamétophytes mâles. Aussi, on ne peut pas exclure l'hypothèse que nos estimations de sexes-ratios aient été réalisées trop tard : il s'agit de trouver

un compromis entre le moment où les gamétophytes mâles et femelles peuvent être différenciés sans ambiguïté et l'instant où cette estimation est biaisée par une mortalité apparemment plus précoce des gamétophytes mâles. Il faudrait réaliser des observations plus tôt et régulières afin de déterminer avec précision le stade de développement où les gamétophytes mâles et femelles sont différenciables et d'évaluer les taux de mortalité relatifs des deux sexes.

Malgré ces doutes, il est intéressant de noter dès J20 la proportion importante de gamétophytes femelles dans les populations de Brest et Vauban (chacune avec plus de la moitié des individus caractérisés par des excès de gamétophytes femelles par rapport à un seuil de 50% à J20). Or pour ces deux populations, les lames présentaient une moindre densité en gamétophytes que celles obtenues pour les autres populations. Cet « effet densité » pourrait avoir favorisé le développement des gamétophytes femelles. Cependant, cet effet est limité car il n'existe pas d'effet lié à la population sur le caractère « fréquence des femelles ». Ce dernier résultat peut d'ailleurs paraître étonnant compte tenu de l'hétérogénéité des milieux de vie (ex. port de Vauban fermé par une écluse et où l'hydrodynamisme est moins important), de la morphologie des individus (ex. stipe torsadé, « verrues » au niveau du stipe ; Figure V-B.5) et surtout des différences entre les taux d'hétérozygotes multi-locus observés dans ces populations (*i.e.* les taux les plus importants avaient été observés à Vauban, voir Chapitre II, discussion de l'article). En effet, nous n'avons pas mis en évidence au cours de cette expérience un biais de sex-ratio vers les femelles ou des individus ayant 100% de gamétophytes femelles dans cette population de Vauban alors que les données de composition génotypique suggéraient une reproduction parthénogénétique importante dans cette population, et non pas dans la population de Brest.

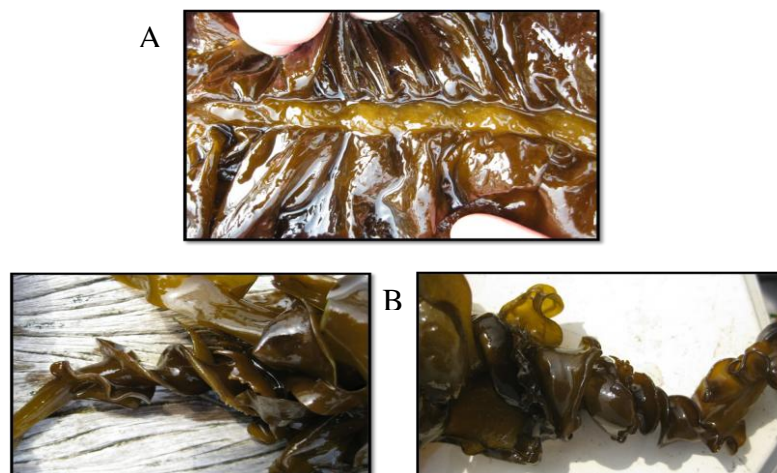


Figure V-B.5 : Caractéristiques des sporophytes de la population du Bassin Vauban à St Malo.

En A, présence de verrues sur la nervure centrale du thalle et en B, stipe torsadé.

Face à ces résultats, j'ai recommencé l'intégralité de l'expérience au printemps 2010 selon le même protocole, avec la mise en culture de 246 sporophytes, provenant des 4 mêmes populations. Un nombre satisfaisant d'individus a émis des spores au laboratoire (21% à 80%) bien que le nombre de spores par individus ait été faible. Malheureusement, des problèmes de culture des gamétophytes ne m'ont pas permis de maintenir une descendance gamétophytique viable plus de quelques jours. Je n'ai donc pas pu vérifier la validité des résultats obtenus au cours de la première expérience réalisée en 2009.

V-B.4.2. Gamétophytes : agents potentiels de dispersion ?

Cette étude nous a également permis de tester la capacité des gamétophytes à se fixer à nouveau sur un substrat après leur détachement. Elle a clairement montré que de jeunes gamétophytes détachés de leur substrat pouvaient se fixer à nouveau (et se développer en jeunes sporophytes). Jusqu'à présent, seuls les spores, les gamètes mâles et les sporophytes matures arrachés étaient considérés comme agents de dispersion de cette espèce. Notre résultat suggère que les gamétophytes pourraient être des vecteurs de dispersion naturelle chez *U. pinnatifida*, par exemple lors de fixations-détachements corrélées aux ballastages et déballastages de navires ou encore lors d'événements météorologiques type « tempêtes ». Reed et al. (1988) ont montré que ces événements pouvaient favoriser la dispersion. Ce mode de dispersion pourrait cependant être très limité dans le temps car les stades âgés de gamétophytes semblent plus sensibles au détachement, un grand nombre d'entre eux se fragmentant. Nous n'avons pas analysé le devenir de ces fragments, par manque de temps, mais ils pourraient avoir la capacité de se régénérer à l'instar de ce qui est réalisé dans l'aire d'origine pour la production massive de jeunes sporophytes en vue de culture (Liu et al. 2004) et ainsi, pouvoir éventuellement se fixer ultérieurement.

V-B.5 Conclusion

L'évolution des sex-ratios des gamétophytes, observée au cours de notre expérience, suggère une mortalité différentielle des deux types de gamétophytes en conditions de culture. Ainsi bien qu'on ait observé un important pourcentage de descendances avec un excès de femelles, il n'est pas possible de rejeter l'hypothèse d'un biais méthodologique pour expliquer les forts taux de femelles observés. Remarquons toutefois que dès le début de l'expérience,

quelques individus ne présentaient que des gamétophytes femelles ce qui va dans le sens de la possibilité de reproduction parthénogénétique.

Ainsi, la méthode que nous avons utilisée pour tester l'hypothèse de reproduction par parthénogénèse, bien que classique (voir Oppliger & Correa 2007 ; Oppliger et al. 2010) pourrait être biaisée et inadaptée. Il semble ainsi difficile ici d'établir définitivement le caractère parthénogénétique d'*U. pinnatifida* en populations naturelles et nos résultats devront être confirmés par exemple en poursuivant des approches indirectes basées sur l'observation de génotypes multilocus, méthode utilisée avec succès chez d'autres espèces d'algues brunes (ex. *Fucus vesiculosus*, Tararenkov et al. 2005).

Par ailleurs, une fois que les jeunes sporophytes avaient atteint une taille suffisante, j'ai envisagé une extraction d'ADN et un génotypage sur les 9 marqueurs microsatellites. Cette expérience avait pour but de comparer le génotype « parental » (sporophytique) et les gamétophytes afin de voir si les gamétophytes observés pouvaient également être le résultat d'autofécondation (théoriquement possible chez *U. pinnatifida* mais non démontrée). Un total de 17 descendances comprenant chacune 12 descendants ont été génotypés. Les premiers résultats de génotypage suggéraient néanmoins quelques cas de contaminations croisées entre descendances rendant impossibles des assignations parentales avec un niveau élevé de confiance. Nous avons décidé d'abandonner cette expérience. Les mauvais résultats des cultures réalisées au printemps 2010 ne nous ont pas permis de retenter cette expérience.

Cette étude nous a également permis de mettre en évidence le rôle potentiel des gamétophytes en tant que nouvel agent potentiel de dispersion. Il serait intéressant de renouveler cette expérience dans des conditions turbulentes, par exemple dans un système de canal à courant, plus proches de la situation expérimentée par les individus *in situ*, afin d'évaluer si ce processus peut vraiment se produire en conditions naturelles où le courant et la houle, les vagues sont des perturbations continues dans le milieu.

Conclusions & Perspectives

Conclusions & Perspectives

A. Synthèse des résultats

Ce travail de thèse avait pour but d'étudier les processus de dispersion et de recrutement à différentes échelles spatiales (régionales, à méso-échelle et à micro-échelle) chez une espèce introduite, l'algue brune *Undaria pinnatifida*. Décrypter ces processus peut en effet permettre de comprendre les dynamiques d'expansion mais également d'établissement durable des populations de cette espèce. Ces études basées sur des approches spatiales se sont principalement appuyées sur les outils moléculaires, les bases théoriques et les méthodes statistiques de la génétique des populations, un cadre conceptuel pertinent pour l'étude des invasions biologiques (Estoup & Guillemaud 2010; Geller et al. 2010, Roman & Darling 2007; Voisin 2007).

Au cours de cette thèse, j'ai développé des études à une échelle régionale, en utilisant comme sites d'étude des populations établies en milieu naturel ou artificiel en Bretagne Nord. Cette région présente des caractéristiques intéressantes pour analyser les processus d'installation et d'établissement d'*U. pinnatifida*. En effet, cette algue brune y est en étroite relation avec différents types d'activités humaines ou de forçages anthropiques. Il s'agit d'une espèce cultivée en différents points du littoral breton et qui occupe de nombreuses baies ou estuaire de ce littoral depuis plus de 25ans. De plus, elle occupe des habitats diversifiés tant naturels qu'artificiels.

Les principaux résultats concernant les études de la dispersion sont présentées dans ce manuscrit de thèse et sont synthétisés ci-dessous.

1. grâce à une étude de la connectivité des populations établies dans trois baies de Bretagne Nord (Aber Wrac'h, Baie de Lampaul et Baie de St-Malo) où l'introduction d'*U. pinnatifida* a la même source (mise en place de cultures), j'ai montré :
 - une forte structure génétique entre baies mais également à l'intérieur des baies, (entre populations distantes de 1-2km) ce qui suggère des dispersions efficaces sur de faibles distances. Ceci peut paraître surprenant compte tenu de l'origine commune des populations bretonnes mais est en accord avec les attendus basés

sur l'analyse des traits d'histoire de vie d'*U. pinnatifida* (faible capacité de dispersion naturelle par des spores de courtes durées de vie). On peut envisager que si cette situation se maintient durablement, des adaptations locales puissent émerger en fonction de l'environnement spécifique de chaque baie.

- une plus grande similarité génétique entre la Baie de Lampaul et l'Aber Wrac'h qui pourrait résulter de l'empreinte laissée par des échanges récents en lien avec des activités aquacoles, et en particulier des échanges entre les fermes d'*U. pinnatifida* présentes dans ces deux baies avant qu'elles aient stoppé la culture de cette algue, il y a une dizaine d'année,
- l'histoire primaire de l'introduction d'*U. pinnatifida* est en revanche quasi inexistante, 25-30 ans (\pm 50-60 générations) après l'introduction des souches cultivées en Bretagne. Ceci est notamment visible par la forte individualisation de la Baie de St-Malo bien que toutes les fermes et les premières populations aient été établies en Bretagne à partir d'une origine commune.

2. la prospection sur le terrain et les études génétique menées dans différents types d'habitats (ports, habitats naturels) au sein de la Baie de St-Malo et de l'Estuaire de la Rance ont montré

- une remarquable stabilité de la présence d'*U. pinnatifida* à l'échelle de la baie ainsi qu'à un niveau local (*i.e.* site), certains sites étaient déjà répertoriés par l'ADMS dans les années 1980-1990,
- une « indépendance » des lots cultivés par rapport aux populations naturelles établies dans la baie et *vice versa* soulignant comme dans l'étude précédente que les populations naturelles et les populations cultivées ont rapidement divergé les unes des autres ;
- des similarités génétiques entre un des ports (« Bas Sablons ») et certaines des populations naturelles suggérant une origine commune ou des migrations réciproques entre ces habitats qui pourraient en partie s'expliquer par des transports assistés par l'homme (pêches, activités de plongée etc.) favorisant l'arrachage et la dissémination de thalles matures pouvant disperser sur des distances beaucoup plus grandes que celles parcourues par les spores ;

- des populations naturelles qui semblent fonctionner comme des entités autonomes (au sens de « population fermée à la migration ») et caractérisée par une reproduction panmictique à une échelle locale.

Globalement, la structure génétique dans la Baie de St-Malo apparait comme une mosaïque génétique sur laquelle la distribution spatiale des populations et les types d'habitats n'apparaissent pas comme des facteurs explicatifs. Cette mosaïque génétique, peut être interprétée comme la résultante d'événements de dispersion saltatoire et stochastique dus à l'interaction de multiples vecteurs d'origine anthropiques et naturels.

3. l'étude de la microstructure de la diversité génétique spatiale au sein de deux populations établies en milieu rocheux a permis de démontrer que

- la dispersion efficace (*i.e.* dispersion réalisée, c'est-à-dire qui intègre les événements successifs de transport des propagules, de recrutement et de croissance des individus) chez *U. pinnatifida* s'effectue majoritairement sur de très courtes distances (inférieure à une dizaine de mètres) et rarement sur des distances supérieures (de l'ordre de 30m).

Il s'agit ici d'un des rares exemples dans le domaine marin pour lequel on observe une adéquation entre la distance de dispersion potentielle (*i.e.* approches expérimentales montrant que les spores se déplacent sur une dizaine de mètres) et la distance de dispersion réalisée (*i.e.* telle que mesurée par les flux de gènes). Pourtant les conditions environnementales locales, et en particulier le régime des marées dans cette baie mégatidale, auraient pu être à l'origine d'un nombre plus important d'événements de dispersion à longue distance. De plus, cette espèce est capable de coloniser de nouveaux habitats distants de plusieurs centaines de mètres des sources. Les observations faites ici suggèrent donc un fort contrôle par la communauté en place limitant le recrutement efficace de nouveaux individus, c'est-à-dire un effet des pressions de compétition exercé par les autres espèces (natives ou introduites), en milieu naturel.

4. le suivi de la colonisation d'un nouvel habitat artificiel (pontons & piliers d'une nouvelle marina) a mis en évidence qu'
 - *U. pinnatifida* est capable de coloniser, en l'espace de quelques mois, un substrat artificiel vierge par le biais des populations établies en milieu naturel dans l'estuaire. Les distances de dispersion depuis les populations sources sont ici très largement supérieures à celles observées au cours de l'étude précédente; on retrouve ainsi dans cette étude le caractère d'espèce pionnière mentionné par de nombreux auteurs comme étant une des caractéristiques responsables du succès de l'introduction d'*U. pinnatifida*. L'étude expérimentale d'éradication recolonisation réalisée dans les deux sites du littoral breton va également en ce sens : comme attendu chez une espèce pionnière, la mise à nu d'un substrat rocheux dans un milieu naturel peut faciliter de façon transitoire l'établissement de cette algue.
 - Suite à l'introduction initiale en un point du port, l'expansion rapide de la population semble être due à la reproduction des individus fondateurs déjà en place les mois précédents. Nous retrouvons donc pour cette seconde phase des schémas mis en évidence en milieu naturel (Chapitre III) ainsi qu'à une échelle régionale et locale (Chapitre I et II) : une dispersion efficace à courte distance et largement déterminée par la reproduction des individus locaux.

Au sein du port, la distribution spatiale a évolué, un doublement des surfaces colonisées par *U. pinnatifida* est observé. Cette espèce a continué à poursuivre sa colonisation et s'étend à partir des points signalés en 2008.

L'hétérogénéité spatiale et l'évolution temporelle du recrutement est ainsi le résultat des conditions environnementales hétérogènes (ex. différences d'exposition), de l'effet du hasard dans l'installation des propagules, des activités anthropiques au sein du port (ex. nettoyage des pontons, ombrage, phénomène de friction) et des caractéristiques biologiques de l'espèce (notamment un cycle de vie court avec une reproduction efficace).

B. Schémas de dispersion d'*U. pinnatifida* en Bretagne et implications sur le devenir de cette espèce à une échelle régionale

Le succès de l'introduction d'une espèce non indigène dans un nouvel environnement découle d'une cascade de processus, impliquant le franchissement de différentes barrières ou filtres depuis le prélèvement d'individus dans leur aire d'origine jusqu'à l'installation de nouvelles populations dans l'aire d'introduction, suivie éventuellement de leur prolifération locale et expansion géographique (cf. Introduction, Encadré 2 ; Occhipinti-Ambrogi 2007; Colautti et al. 2006). Le franchissement de chacune de ces étapes dépend de nombreux paramètres dont trois semblent être particulièrement importants (Facon et al. 2006; Sakai et al. 2001 ; Simberloff 2006 ; Simberloff 2009): la pression en propagules, les conditions environnementales dans le milieu nouvellement colonisé et les interactions avec les espèces (indigènes ou non-indigènes) constituant la communauté envahie.

L'algue *U. pinnatifida* a franchi chacune des étapes avec succès et s'est installée en moins de 30 ans à une échelle quasi mondiale. La couverture géographique actuelle (Silva et al. 2002 ; Wallentinus 2007) et la diversité de milieux colonisés (Silwa et al. 2006 ; Russell et al. 2008) suggèrent une assez large tolérance aux conditions écologiques rencontrées (Wallentinus 2007 et références citées dans cette revue). Cependant, ces introductions sont toutes relativement récentes et il est difficile de prévoir le devenir d'une espèce introduite sur le long-terme du fait de la complexité des processus écologiques et évolutifs mis en œuvre (Sax et al. 2007 ; Strayer et al. 2006b).

Au cours de mon travail de thèse, j'ai contribué à élargir nos connaissances sur l'installation d'*U. pinnatifida* en Bretagne, qui est parmi les zones les plus anciennement colonisées par cette espèce introduite à l'échelle mondiale (début des années 1980, suite à une introduction accidentelle antérieure en Méditerranée en 1971). Je me suis particulièrement intéressée à décrypter les processus de dispersion entre populations établies en Bretagne Nord. La dispersion, qu'elle soit naturelle ou assistée par l'homme, est en effet un processus clé intervenant à chacune des étapes de l'introduction, et notamment pour l'installation durable des espèces introduites dans un nouveau milieu. Le maintien de la connectivité entre les populations peut contribuer à maintenir de façon durable l'espèce à une échelle régionale comme locale, même si localement les populations sont peu adaptées aux conditions environnementales. En effet l'apport régulier de nouveaux migrants depuis des populations

démographiquement stables et adaptées aux conditions locales peut permettre le maintien d'une pression démographique suffisante dans des populations en déséquilibre démographique. Ce schéma représente un type de schéma en métapopulation (cf. Figure VI.1 pour une représentation de différents types de modèles méta-populationnels) dans lequel certaines populations jouent un rôle de source par rapport à des populations « puits » (cas C de la Figure VI.1).

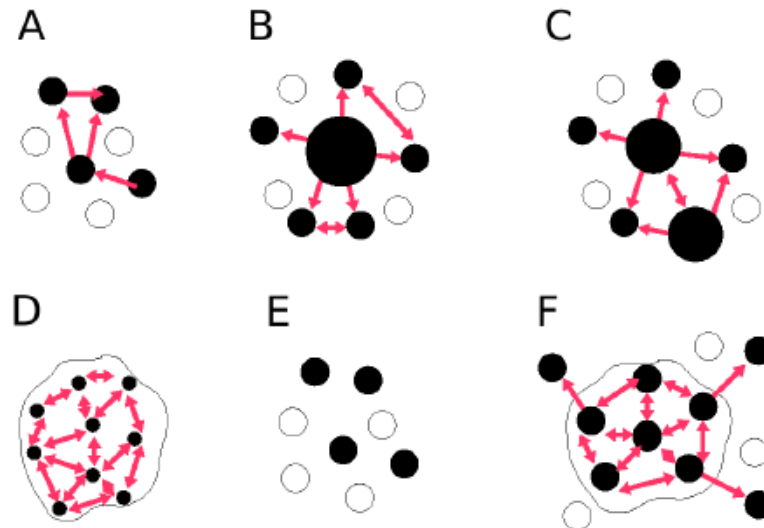


Figure IV.1. Différents modèles de fonctionnement en métapopulation tels que proposés par Harrison (1991)

A: Modèle original de Levins

B: Modèle continent-îles

C: Modèles sources-puits

D: Modèles de populations fragmentées sans extinction (taux de migration élevé)

E: Modèle de populations fragmentées en déséquilibre (taux de migration nul)

F: Modèle intermédiaire: sources-puits (centre-périphérie) + populations fragmentées

Nos résultats montrent que quelle que soit l'échelle d'observation, la connectivité est très réduite et que les courbes de dispersion réalisées associées sont caractérisées par un mode se situant à proximité des populations parentales (populations sources de migrants). L'analyse de la Baie de St-Malo montre en outre que malgré cette connectivité réduite, les populations sont stables au cours du temps. Il semble donc que l'installation régionale d'*U. pinnatifida* s'inscrive dans un schéma non pas de métapopulation de type source-puits, ni dans un schéma

de métapopulation ouverte mais correspond à une métapopulation caractérisée par des populations indépendantes démographiquement avec des échanges très limités. Ce type de fonctionnement a été décrit par Kritzer & Sale (2004) (Figure VI.2).

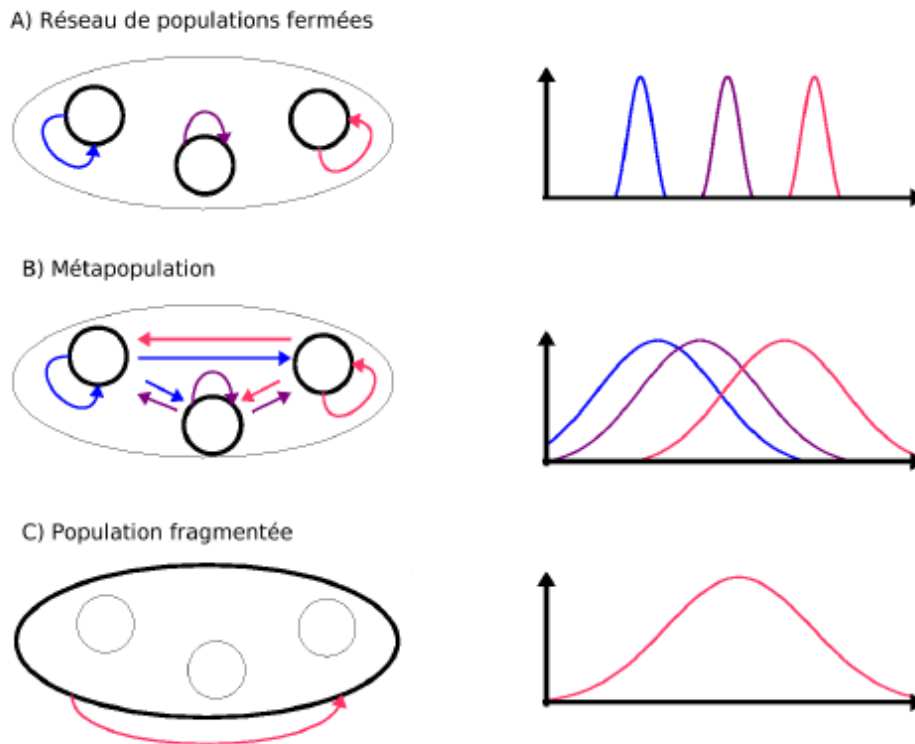


Figure VI.2. Modèles de métapopulations et courbes de dispersion associées proposés par Kritzer & Sale (2004) pour définir les types de métapopulations en milieu marin.

Chaque petit cercle noir ou gris représente une population (définie physiquement par une unité d'habitat par exemple). Les flèches représentent les migrations entre ces sous-unités.

Les traits noirs en gras indiquent l'échelle de la population réelle (au sens de l'existence d'une connectivité démo-génétique). Ainsi par exemple dans le cas A les populations locales sont caractérisées par des dynamiques indépendantes et sans échanges de migrants, en revanche dans le cas C, les populations locales sont fortement inter-connectées par des échanges et fonctionnent ensemble comme une seule unité panmictique.

Il est intéressant dans ce contexte de rappeler que lors de l'introduction initiale d'*U. pinnatifida*, une origine commune avait été démontrée et une expansion régionale rapide avait eu lieu suite à des transferts aquacoles (Voisin et al. 2005, Voisin 2007). Ainsi au moment de l'introduction primaire, le schéma de métapopulation le plus proche de ce fonctionnement était un système de type sources-puits (les sources étant les fermes et les puits pouvant être les populations naturelles avoisinantes ; type C dans la Figure VI.1) ou d'une population fragmentée (type C dans la figure VI.2). Depuis lors, le fonctionnement en métapopulation d'*U. pinnatifida* à une échelle régionale a évolué vers un système fermé (type A dans la figure VI.2). Au cours du temps, les dynamiques démographiques et les schémas de connectivité semblent ainsi avoir évolué du passage d'un stade du processus d'invasion au suivant. Cette dynamique démo-génétique actuelle des populations d'*U. pinnatifida* suggère que l'espèce s'est bien acclimatée ou adaptée aux conditions environnementales rencontrées dans les différents sites/habitats et les différentes baies. En absence de flux de gènes entre les populations installées en Bretagne Nord, l'évolution d'adaptation locale pourrait être de plus favorisée. Ceci conduit à suggérer qu'*U. pinnatifida* va s'installer de façon pérenne.

Peut-on généraliser cette prédiction à d'autres régions géographiques où *U. pinnatifida* a été introduite ? Il est difficile de répondre à cette question avec le même argumentaire car il n'existe pas de données génétiques analogues à celles obtenues dans le cadre de cette thèse dans les autres régions où l'algue a été introduite, et notamment en Australasie où elle est une algue invasive majeure. De plus, un facteur de complexité additionnel est que l'histoire de l'introduction d'*U. pinnatifida* en Australie et Nouvelle-Zélande est extrêmement différente de celle à l'échelle européenne : elle est le résultat de récurrences d'introduction, expliqué par de multiples vecteurs anthropiques, qui ont amené une large diversité génétique des populations introduites (Voisin et al. 2005, Voisin 2007, Wallentinus 2007). Cette différence dans les schémas d'introduction originels pourrait expliquer les différences de taux d'expansion de cette algue entre les différentes régions où elle a été introduite (Lyons & Scheibling 2009; cf. Introduction Figure 3).

Qu'est-ce qui pourrait contrebalancer la réussite et la pérennité d'installation d'*U. pinnatifida* en Bretagne ? Le résultat de l'étude de microstructure spatiale dans le site naturel du Breac'h Ver (Chapitre III) mis en vis-à-vis de l'étude de la colonisation du port de l'Aber Wrach' (Chapitre II) pourrait à première vue sembler paradoxal. Néanmoins, il apporte une réponse possible à cette question. Alors que nous avons assisté à une colonisation rapide du port de l'Aber Wrach' depuis des sources distantes (plusieurs centaines de mètres),

U. pinnatifida semble être « freinée » dans son expansion au sein d'une communauté naturelle. Ici, nous avons probablement un cas de « résistance biotique » à l'invasion telle qu'originellement définie par Elton (1958). Cette faible capacité de compétition d'*U. pinnatifida* semble donc avoir assez peu évolué depuis l'introduction originelle en Bretagne. En effet, le même constat a été fait sur des populations récemment installées en Bretagne par Floc'h et al. (1996) et Castric-Fey et al. (1993). Des résultats similaires ont également été observés dans d'autres régions d'introduction. Par exemple, Valentine & Johnson (2003) ont mis en évidence qu'*U. pinnatifida* était faiblement compétitive dans les habitats naturels en Tasmanie. Ses différents résultats confirment le classement d'*U. pinnatifida* dans les espèces introduites de type pionnières et opportunistes. Néanmoins, les interactions complexes agissant à l'échelle des communautés pourraient évoluer à plus long terme. Ainsi, la présence d'herbivores peut aussi favoriser la colonisation de cette espèce quand ceux-ci se nourrissent de la flore native (Valentine & Johnson 2005). Par ailleurs, il est remarquable que malgré un grand nombre de vecteurs potentiels de dispersion (spores, sporophytes matures dérivants etc.), le recrutement d'*U. pinnatifida* est limité: la pression de propagules, si essentielle dans la réussite des espèces introduites (Simberloff 2009) pourrait être insuffisante pour contrebalancer les effets d'interactions biotiques (compétitions, herbivories etc.) agissant sur le recrutement de jeunes sporophytes dans le milieu.

Nos résultats soulignent également le rôle prépondérant de l'artificialisation des milieux pour la réussite de l'installation initiale d'*U. pinnatifida*. Ils corroborent les interprétations de Fletcher et al. (1995) qui considère que cette algue est faiblement compétitive dans les habitats naturels en comparaison des habitats portuaires. Ces résultats sont également en accord avec les résultats d'expériences menées dans d'autres régions d'introduction, en particulier la Tasmanie (Valentine & Johnson 2003). En effet, quelques soient les régions d'introduction, il a été montré qu'une grande variabilité de substrat notamment d'origine anthropique est exploitée par *U. pinnatifida*: bois, métal, plastique, verre, caoutchouc, pontons flottants, digues, brise-lames, corps morts et coques des bateaux (Hay & Luckens 1987 ; Hay 1990 ; Sanderson 1990; Piriz & Casas 1994; Lewis 1999; Sinner et al. 2000).

Russel et al (2008) ont suivi dans le détail l'expansion à méso-échelle de la colonisation par *U. pinnatifida* en différentes régions de Nouvelle-Zélande (voir un exemple en Figure VI.3) montrent une nette préférence d'installation sur des substrats artificiels vierges dans la région du Port d'Otago.

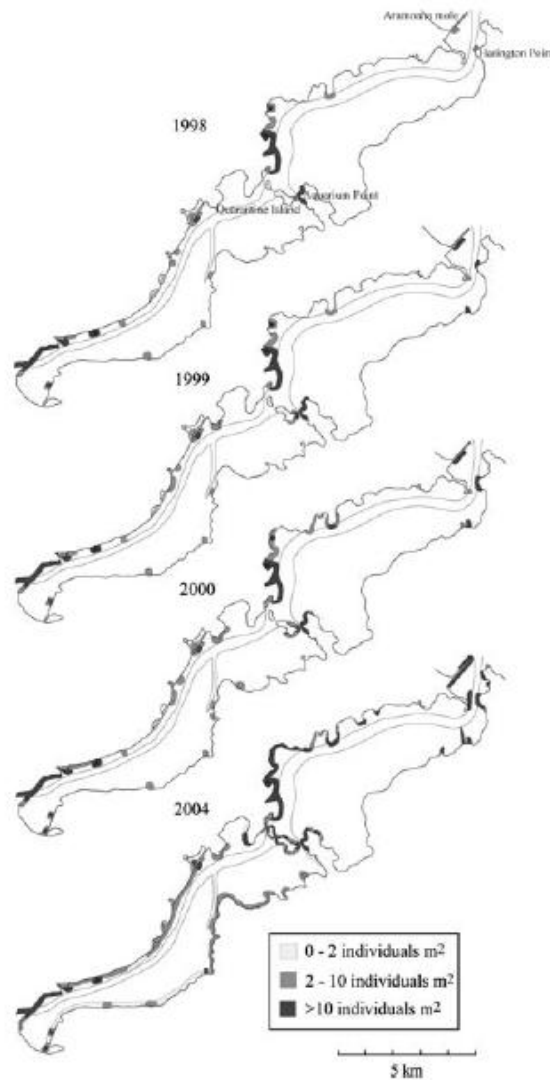


Figure VI.3. Exemple de progression de l'algue *U. pinnatifida* dans la région portuaire du port d'Otago en Nouvelle-Zélande de 1998 à 2004.

Tirée de Russel et al (2008).

Ce type d'environnement est généralement abrité, correspondant à une des caractéristiques des habitats typiques d'*U. pinnatifida*. Floc'h et al. (1996) avaient par exemple noté qu'en Bretagne *U. pinnatifida* semblait préférer des milieux abrités (ex. ports, baies et estuaire). Thornber et al. (2004) parviennent à la même conclusion en Californie. Cependant, Russel et al. (2008) ont observé dernièrement des individus dans des endroits

battus, soumis à l'action des vagues en Tasmanie. Ces auteurs suggèrent que l'algue pourrait continuer son expansion en colonisant de nouvelles niches écologiques.

Ces différents résultats et leur interprétation en termes de devenir des populations introduites d'*U. pinnatifida* m'amènent à proposer différentes pistes pour de futures recherches.

C. Perspectives

Les études menées au cours de ce travail de thèse ont permis d'apporter des réponses concernant les processus d'expansion et de maintien à différentes échelles spatiales (régionale, méso-échelle et micro-échelle) d'*U. pinnatifida* dans une des aires d'introduction à une échelle régionale. La dispersion naturelle est limitante (quelques dizaines de mètres) et les populations installées semblent se maintenir de manière autonome. Cependant au cours de mon travail de thèse, l'aspect temporel et adaptatif n'a été que très peu étudié que ce soit à l'échelle intra-spécifique ou à l'échelle des communautés. Cette réflexion forme la base des perspectives de recherche que je propose à l'issue de mon travail de thèse.

C.1. Etude de la possibilité d'évolution d'adaptation locale

Le succès d'introduction d'*U. pinnatifida* est mondial, avec des populations se développant dans les deux hémisphères, dans la plupart des océans et des mers du globe (excepté en Afrique et en Antarctique). Les populations des régions d'introduction sont de plus installées dans une large gamme d'environnements (ports, substrats naturels rocheux, corps morts) aux conditions biotiques et abiotiques très différentes (pollution organique, température, lumière, herbivorie, courants, etc). Par ailleurs, j'ai montré qu'il existait une forte structure génétique des populations même à une échelle locale qui suggère l'évolution de divergence génétique depuis l'introduction initiale en Bretagne. Par ces caractéristiques, *U. pinnatifida* semble offrir un cadre favorable à l'étude du développement de divergences adaptatives au niveau intra-spécifique. Il s'agirait ici d'analyser les capacités d'adaptation de l'espèce dans différents habitats ou régions d'introduction, ce qui permettrait d'améliorer notre compréhension des mécanismes sous jacents au succès d'installation pérenne d'espèces marines introduites en dehors de leur aire d'origine.

Pour répondre à cette question, la première étape serait de rechercher des preuves de l'existence de tels processus d'adaptation locale. En l'absence de données de génome complet pouvant être exploitées pour une approche de type gènes candidats, nous pourrions développer une méthode anonyme de balayage génomique (« scan génomique »). Les méthodes statistiques permettant de détecter les signatures de sélection et peuvent être classées en deux grandes catégories, selon qu'elles se basent sur des comparaisons inter-locus au sein d'une population ou entre des populations différentes (Storz 2005; Luikart et al. 2003). Pour l'étude proposée, des comparaisons de populations sont les plus appropriées. Ces méthodes cherchent à repérer parmi un très grand nombre de marqueurs génétiques, ceux qui présentent des caractéristiques atypiques en termes de structure génétique. Originellement, Lewontin & Krakauer (1973) ont développée la méthode permettant de détecter les loci avec une valeur de F_{st} statistiquement plus élevée que celle observée en moyenne sur l'ensemble du génome. Plusieurs variantes de ce test ainsi que de nouvelles méthodes basées sur des approches bayésiennes existent aujourd'hui (Foll & Gaggiotti 2008 ; Beaumont & Nichols 1996 ; Beaumont & Balding 2004).

La méthode de Beaumont & Nichols (1996) est celle qui est encore aujourd'hui la plus utilisée. Des simulations sont effectuées afin de modéliser le comportement des locus neutres sous différents scénarios, et les locus en dehors de la distribution neutre sont détectés comme atypiques. La figure VI.4 montre un exemple de résultats obtenus par cette méthode par Wilding et al. (2001) lors d'une étude de la différenciation écotypique entre le haut et le bas de l'estran chez le mollusque *Littorina saxatilis*.

Dans le cas d'*U. pinnatifida*, il serait possible d'envisager l'utilisation de marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism) pour réaliser ces études. L'avantage des marqueurs AFLP est qu'ils peuvent être obtenus facilement sans information préalable sur le génome, et utilisent une méthode peu onéreuse et rapide de génotypage pour un grand nombre d'individus. Les marqueurs AFLP présentent en outre l'avantage d'être abondants et sont considérés comme répartis aléatoirement dans le génome; on peut donc penser qu'ils sont représentatifs de sa variabilité. Néanmoins, techniquement ils nécessitent de l'ADN de bonne qualité en quantité suffisante (Meudt & Clarke 2007). Des AFLP ont déjà été développés chez les laminaires (Erting et al. 2004, Kusumo et al. 2004) et au sein du laboratoire d'accueil dans le but de réaliser de tels scans génomiques chez des mollusques, *Crepidula fornicata* (Daguin,

Riquet et Viard, données non publiées) et *Dreissena polymorpha* (Tarnowska, Daguin et Viard, en préparation). De premiers essais de mise au point de locus AFLP sur *U. pinnatifida* ont été réalisés par Cécile Ribout au sein du laboratoire et ont donné des résultats encourageants.

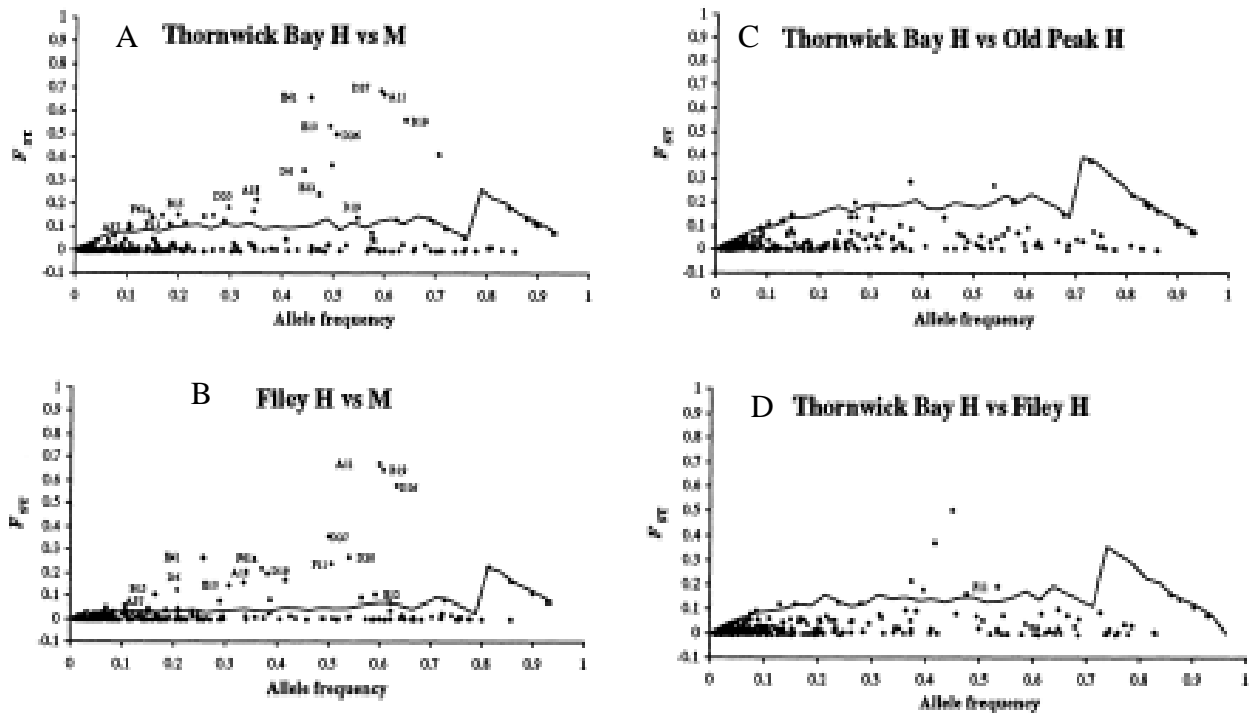


Figure VI.4. Exemple de l'utilisation de scan génomique pour l'étude de la différenciation écotypique chez le mollusque *Littorina saxatilis*.

Les différentes figures représentent en ordonnées la valeur de F_{st} en fonction des fréquences alléliques sur des marqueurs de type AFLP. La ligne représente l'enveloppe de confiance statistique (*i.e.* valeurs possibles compte tenu du jeu de données). Les loci « outliers » sont les loci pour lesquels des valeurs de F_{st} sont observées en dehors de l'enveloppe de confiance. Ces graphiques représentent des comparaisons deux à deux de différents groupes: (A) une sous-population de littorine du haut de l'estran par rapport à une population du bas de l'estran dans le site de Thornwick Bay ; (B) la même chose dans le site de Filey ; (C) les comparaisons des sous-populations de littorines du haut de l'estran entre les deux sites et (D) les comparaisons des sous-populations de littorines du bas de l'estran entre les deux sites. Cette étude met en évidence de nombreux loci outliers entre les populations hautes et basses suggérant ainsi la présence de deux écotypes adaptés à ces deux types d'habitats.

Deux types de questions pourraient alors être étudiées avec ces méthodes et outils moléculaires: (1) l'évolution d'adaptation consécutive au processus d'introduction et (2) l'évolution d'adaptation spécifique aux différents types d'habitats colonisés par *U. pinnatifida* dans une région d'introduction. Le premier point nécessite un bon échantillonnage de l'aire d'origine incluant les sources de l'introduction. Une telle étude nécessitera ainsi un temps important en termes de collecte d'échantillons. La seconde étude est plus facile à réaliser et répond bien aux questions que nous avons soulevées précédemment. Elle pourrait être réalisée en partant de la situation de la Baie de St-Malo dans laquelle tous les types d'habitats et de populations sont encore représentés (cultures, ports et habitats naturels, cf. Chapitre II). De plus, l'ADN est extrait et de bonne qualité. Cependant, si l'identification de loci sous sélection s'avère négative à cette échelle (par exemple du fait de flux de gènes cryptiques que nous n'aurions pas mis en évidence au cours de cette étude ou d'un temps insuffisamment long pour l'évolution d'adaptation locale), nous pourrions alors travailler à une plus grande échelle, l'échelle européenne, en regroupant par habitats les populations spontanées et cultivées disponibles. Actuellement, nous disposons de 14 populations portuaires, 11 populations naturelles rocheuses et 4 populations cultivées au niveau Européen (UK, Hollande, Belgique, France et Espagne) au laboratoire. Celles-ci sont représentés sur la carte en figure VI.5.

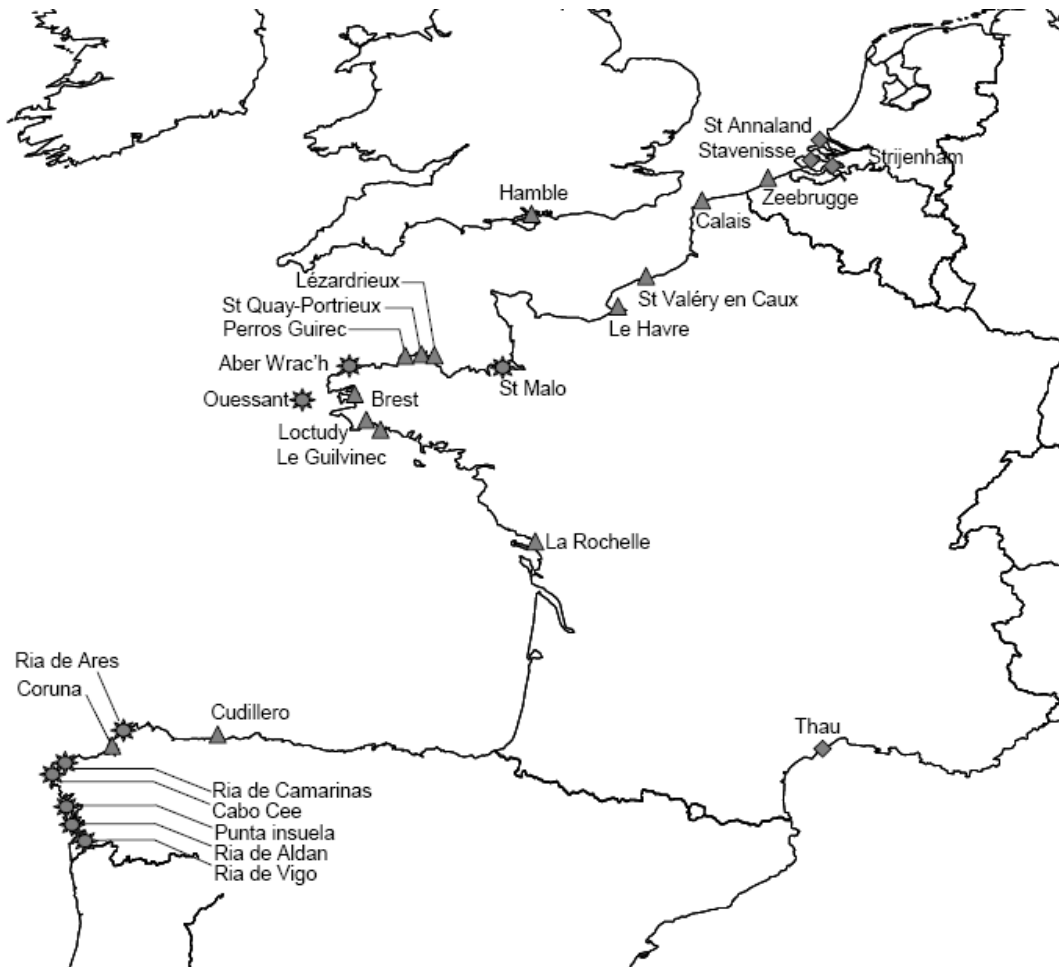


Figure VI.5 : Répartition des échantillons disponibles par type d'habitat à l'échelle européenne

Chaque figuré symbolise le type d'habitat dans lequel ont été échantillonnées les populations : (▲) marinas, (◆) digue ou enrochement à proximité de parcs ostréicoles, (☼) milieu naturel.

Tirée de Voisin (2007)

C.2. Effet de la domestication sur les populations cultivées

L'étude menée en Baie de St-Malo (Chapitre II) a mis en évidence que les deux lots cultivés présentent des caractéristiques génétiques différentes des populations spontanées (ports et naturelles rocheuses). Une plus faible diversité génétique (en comparaison des populations naturelles) et des excès en hétérozygotes ont été notamment observés pour les deux lots cultivés (voir Chapitre II, Table 1). Des observations similaires ont été observées dans l'aire native, en Corée (Huh & Huh 2002). Dans cette étude, 5 populations naturelles et 10 populations cultivées ont été analysées notamment pour voir si le processus de

domestication d'*U. pinnatifida* (i.e. action de l'homme) érodait le niveau de variation génétique des populations cultivées. Les résultats de cette étude ont montré que les populations cultivées avaient des valeurs plus faibles que les populations naturelles, quelque soit l'indice calculé : par exemple, le nombre d'allèles variait de 1.49 à 1.63 et le pourcentage de loci polymorphes entre 31.7% à 43.3%.

Les différences observées entre les populations cultivées et les populations naturelles d'*U. pinnatifida* pourraient résulter d'un goulot d'étranglement lié à l'utilisation d'un nombre limité d'individus pour produire des souches cultivées. Cet impact de la domestication a également été mis en évidence chez l'algue rouge, *Gracilaria chilensis* au Chili avec six marqueurs microsatellites (Guillemin et al. 2008). De plus, il a été mis en évidence que cette espèce à cycle de vie haplo-diploïde isomorphe se reproduisait en grande majorité par reproduction végétative dans les populations cultivées, au contraire des populations naturelles, suggérant que sur un plus long terme la domestication peut induire un changement du mode de reproduction. Nous n'avons pas de données quantitatives fiables montrant des différences du même ordre dans les populations cultivées d'*U. pinnatifida*, et donc s'il existe également un « syndrome de domestication » notamment en termes de traits phénotypiques ou de caractères associés au cycle de vie. Cependant, les collectes que nous avons réalisées sur les filières montrent des individus particulièrement grands et fins. Nous savons également que les cultivateurs tendent à sélectionner des individus ayant des longs thalles pour les utiliser pour produire les « semences » utilisées au cours de la saison de culture suivante.

Nous pourrions ainsi envisager de faire une comparaison de différents lots d'individus cultivés (français et étrangers) et de populations sauvages de cette algue. Outre les analyses génétiques, nous pourrions mettre en place des programmes expérimentaux en jardin commun (« common garden experiment »). Afin de tester si des individus sauvages et cultivés mis dans les mêmes conditions environnementales montrent une divergence pour certains caractères phénotypiques, par exemple le taux de croissance ou le développement de sporophylles.

C.3. Dispersion et recrutement en milieu naturel

Comme je l'ai rappelé dans la partie précédente, nos résultats sur les limites de la dispersion réalisée à micro-échelle suggèrent l'existence d'un transport des spores à faible distance couplé à des processus de « résistance biotique ». Pour avancer sur ces hypothèses, deux types d'approches pourraient être menées, l'une cherchant à suivre le devenir des spores

dans le milieu et l'autre pour tester les effets des communautés naturelles sur le recrutement et la croissance d'*U. pinnatifida*.

Concernant le premier point, dans l'ensemble de ce travail, nous n'avons pu discuter de l'influence des spores comme vecteurs de dispersion que de façon indirecte puisque nous avons travaillé au mieux avec de jeunes recrues et dans la plupart des cas avec des sporophytes déjà bien développés. Par ailleurs, notre dernière étude a mis en évidence qu'outre les dispersions des spores, nous ne pouvions pas exclure la dispersion de gamétophytes, qui ont la faculté de se fixer à nouveau, suite à leur détachement.

Dans ce contexte, beaucoup de questions peuvent être développées :

- Quelles sont les périodes de présence des spores d'*U. pinnatifida* dans la colonne d'eau ? Sont-elles corrélées avec l'apparition des premiers sporophytes sexuellement matures ?
- Quelle sera l'abondance des spores d'*U. pinnatifida* dans la colonne d'eau par rapport aux spores d'autres espèces avec lesquelles elle entrent en compétition, par exemple d'autres algues brunes de la famille des Laminariales ?
- Y-a-t-il, comme le laisse supposer les travaux de Bobadilla & Santelices (2005) une diminution de l'abondance des spores en fonction de l'éloignement géographique des sporophytes mères ?

Ces questions pourraient être abordées par des méthodes dérivées de marquages (FISH ; Fluorescence *In Situ* Hybridization, Glöckner et al. 1996) réalisées sur des échantillons d'eau de mer pour évaluer la composition en propagules de macroalgues. Cette méthode est déjà utilisée pour évaluer la composition phytoplanctonique (Not et al. 2002) et la composition taxonomique des communautés bactériennes (Bouvier & Del Giorgio 2003). J'ai pu dans le cadre de cette thèse initié ce travail qu'il reste maintenant à achever par la mise au point de technique FISH chez *U. pinnatifida*.

Concernant le second point, il me semble que l'approche la plus intéressante serait une approche expérimentale *in situ* manipulant le nombre de recrues d'*U. pinnatifida* et de compétiteurs ou de prédateurs potentiels trouvés dans le milieu (ex. *Helcion pellucidum*, *Littorina saxatilis* etc). Ce type d'expérience a été notamment menée sur l'algue introduite *Sargassum muticum* pour tester l'influence d'herbivores sur la croissance et la survie de

recrues (Sjotun et al. 2007) et sont en cours au laboratoire (Laure Noël, données non publiées) pour tester les effets de compétition entre *Sargassum muticum* et *Fucus serratus*, espèces indigènes en Bretagne.

Ainsi, il y a encore de nombreuses pistes de recherche à explorer pour comprendre les mécanismes sous-jacents à l'installation durable d'*U. pinnatifida*. En Bretagne, et dans la plus grande partie de l'Europe, cette espèce ne peut être classée comme espèce invasive au sens où elle ne prolifère pas localement et semble peu compétitive sur les espèces déjà en place. En revanche, elle occupe un vaste espace géographique (à différentes échelles spatiales, mondiales comme locales) qui fait qu'elle est devenue une espèce « banale », commune dans les milieux rocheux du haut infra-littoral. Elle partage cette caractéristique avec de nombreuses espèces introduites relativement anonymes mais qui n'ont pas moins changé de façon durable la composition des communautés naturelles.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abouheif E., Zardoya R. & Meyer A. 1998. Limitations of Metazoan 18S rRNA sequence data: Implications for reconstructing phylogeny of the animal kingdom and inferring the reality of the Cambrian explosion. *Journal of Molecular. Evoutionl.* **47**:394-405.
- Aguilar-Rosas R., Aguilar-Rosas L., Avila-Serrano G. & Marcos-Ramírez R. 2004. First record of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) on the Pacific coast of Mexico. *Botanica Marina* **47**:255-258.
- Akiyama K. 1965. Studies of ecology and culture of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. II. Environmental factors affecting the growth and maturation of gametophyte. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* **25**:143-170.
- Amann R. & Fuchs B. 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature review Microbiology* **6**:339-348.
- Amann R., Ludwig W. & Schleifer K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* **59**:143-169.
- Arakawa H. & Morinaga T. 1994. Influence of suspended particles on dispersion of brown algal zoospores. *Nippon Suisan Gakkaishi* **60**:61-64.
- Arzel P. 1989. Les laminaires sur les côtes bretonnes, Evolution de l'exploitation et de la flotille de pêche, état actuel et perspectives. *Ifremer*.

B

- Baez J. C., Olivero J., Peteiro C., Ferri-Yanez F. F., Garcia-Soto C. & Real R. 2009. Macro-environmental modelling of the current distribution of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Ochrophyta) in Northern Iberia. *Biological invasions*.
- Beaumont J. C., Brown C. J. & Sayer M. D. J. 2007. Evaluation of techniques used in the assessment of subtidal epibiotic assemblage structure. *Biofouling* **23**:343-356.
- Beaumont M. A. & Balding D. J. 2004. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology* **13**:969-980.
- Beaumont M. A. & Nichols R. A. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society, Series B: Biology Sciences* **263**:1619-1626.
- Birkett D. A., Maggs C. A., Dring M. J. & Boaden P. J. S. 1998. Infralittoral reef biotopes with kelp species: an overview of dynamic and sensitivity characteristics for conservation management of marine SACs, Scottish Association of Marine Science (UK Marine SACs Project).
- Bobadilla M. & Santelices B. 2005. Variations in the dispersal curves of macroalgal propagules from a source. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
- Boudouresque C. F. & Ribera M. A. 1994. Les introductions d'espèces végétales et animales en milieu marin: conséquences écologiques, économiques et législatifs. In C. F. Boudouresque, A. Meinesz, et V. Gravez, editors. First international Workshop on *Caulerpa taxifolia* GIS Posidonie, France, 29-102pp.
- Boudouresque C. F. & Verlaque M. 2002. Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes. *Marine Pollution Bulletin* **44**:32-38.
- Bouvier T. C. & Del Giorgio P. A. 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using

- fluorescence *in situ* hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *Microbiology Ecology* **44**:3-15.
- Britton-Simmons K. H. 2004. Direct and indirect effects of the introduced alga *Sargassum muticum* on benthic, subtidal communities of Washington State, USA. *Marine Ecology Progress Series* **277**:61-78.
- Broquet T. & Petit R. 2009. Molecular estimation of dispersal for ecology and population genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. **40**:193-216.
- Brown M. T. & Lamare M. D. 1994. The distribution of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer within Timaru Harbour, New Zealand. *Japanese Journal of Phycology* **42**:63-70.
- Bulleri F., Abbiati M. & Airoidi L. 2006. The colonisation of human-made structures by the invasive alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* in the North Adriatic Sea (NE Mediterranean). *Hydrobiologia* **555**:263-259.
- Bulleri F. & Airoidi L. 2005. Artificial marine structures facilitate the spread of a non-indigenous green alga, *Codium fragile* ssp. *tometonsoïdes* in the north Adriatic Sea. *Journal of Applied Phycology* **42**:1063-1072.

C

- Caamaño J. S., Neira C. D. & Castroviejo R. A. 1990. Aparicion de *Undaria pinnatifida* en las costas de Galicia (España). Un nuevo caso en la problematica de introduccion de especies foraneas. *Informes tecnicos del centro de investigaciones submarinas* **3**.
- Cabioc'h J., Floc'h J.-Y., Le Touquin A., Boudouresque C.-F., Meinesz A. & Verlaque M. 1992. Guide des algues des mers d'Europe. *Delachaux & Niestlé*: 231pp.
- Carlton J. T. & Geller J. B. 1993. Ecological roulette : the global transport of nonindigenous marine organisms. *Science* **261**:78-82
- Carlton J. T. 1996. Pattern, process and prediction in marine invasion ecology. *Biological invasions* **78**:97-106.
- Carlton J. T. 1999. The scale and ecological consequences of biological invasions in the world's oceans. In O. T. Sandlund, P. J. Schei, et A. Viken, editors. *Invasive species and Biodiversity management*. Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, 195-212 pp.
- Casas G. N. & Piriz M. L. 1996. Surveys of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Golfo Nuevo, Argentina. *Hydrobiologia* **326/327**:213-215.
- Castric-Fey A., Beupoil C., Bouchain J., Pradier E. & L'Hardy-Halos M. T. 1999a. The introduced alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Alariaceae) in the rocky shore ecosystem of the St Malo area: morphology and growth of the sporophyte. *Botanica Marina* **42**:71-82.
- Castric-Fey A., Beupoil C., Bouchain J., Pradier E. & L'Hardy-Halos M. T. 1999b. The introduced alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Alariaceae) in the rocky shore ecosystem of the St Malo area: growth rate and longevity of the sporophyte. *Botanica Marina* **42**:83-96.
- Castric-Fey A., Girard A. & L'Hardy-Halos M. T. 1993. The distribution of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) on the Coast of St-Malo (Brittany, France). *Botanica Marina* **36**:351-358.
- Chapman A. 1986. Population and community ecology of seaweeds. Blaxter JHS, New York.
- Chapman A. S., Scheibling R. E. & Chapman A. R. O. 2002. Species introductions and changes in the marine vegetation of Atlantic Canada. Canadian Forest Service, Ottawa.
- Clayton M. N. 1990. The adaptive significance of life history characters in selected orders of marine brown macroalgae. *Australian Journal of Ecology*. **15**:439- 452.
- Colautti R. I., Grigorovich I. A. & MacIsaac H. J. 2006. Propagule pressure: a null model for biological invasions. *Biological invasions* **8**:1023-1037.
- Connell S. D. 2000. Floating pontoons create novel habitats for subtidal epibiota. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* **247**:183-194.

- Connell S. D. 2001. Urban structures as marine habitat: an experimental comparison of the composition and abundance of subtidal epibiota among pillings, pontoons and rocky reefs. *Marine Environmental Research* **52**:115-125.
- Cornuet J.-M., Piry S., Luikart G., Estoup A. & Solignac M. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* **153**:1989-2000.

D

- Dafforn K. A., Glasby T. M. & Johnston E. L. 2009. Links between estuarine condition and spatial distributions of marine invaders. *Diversity and Distributions* **15**:807-821.
- Daguin C., Voisin M., Engel C. & Viard F. 2005. Microsatellites isolation and polymorphism in introduced populations of the cultivated seaweed *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales). *Conservation Genetics* **6**:647-650.
- Dayton P. K. 1973. Dispersion, dispersal and persistence of the annual intertidal alga, *Postelsia palmaeformis* (Ruprecht). *Ecology* **54**:433-438.
- De Long E. F., Trent Taylor L., Marsh T. L. & Preston C. M. 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic Archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:5554-5563.
- Deysher L. E. & Norton T. A. 1982. Dispersal and colonisation in *Sargassum muticum* Yendo Fensholt. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **56**:176-196.
- DiCiccio T. J. & Efron B. 1996. Bootstrap confidence intervals. *Statistical Science* **11**:189-228.
- Draisma S. G. A., Prud'homme van Reine W. F., Stam W. T. & Olsen J. L. 2001. A reassessment of phylogenetic relationships within the Phaeophyceae based on Rubisco large subunit and ribosomal DNA sequences. *Journal of Phycology* **37**:586-603.
- Dunstan P. K. & Jonhson C. R. 2007. Mechanisms of invasions: can the recipient community influence invasion rates? *Botanica Marina* **50**:361-372.
- Dupont L. 2004. Invasion des côtes françaises par le mollusque exotique *Crepidula fornicata* : contribution de la dispersion larvaire et du système de reproduction au succès de la colonisation. UPMC Paris VI.

E

- Elton C. S. 1958. The ecology of invasions by plants and animals. *London: Methuen & Co.*
- Engel C. R., Billard M. V. E. & Viard F. 2008. Conservation and polymorphism of mitochondrial intergenic sequences in brown algae (Phaeophyceae). *European Journal of Phycology* **43**:195-205.
- Erting L., Daugbjerg N. & Moller Pederson P. M. 2004. Nucleotide diversity within and between four species of *Laminaria* (Phaeophyceae) analysed using partial LSU and ITS rDNA sequences and AFLP. *European Journal of Phycology* **39**:243-256.
- Estoup A. & Guillemaud T. 2010. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what?. *Molecular Ecology* **19**:4113-4130.

F

- Facon B., Genton B. J., Shykoff J., Jarne P., Estoup A. & David P. 2006. A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology & Evolution* **21**:130-135.
- Fang T. C. 1983. A summary of the genetic studies of *Laminaria japonica* in China. In C. K., editor. Tseng. Science Press, Beijing, 123-136pp.

- Fang T. C., Jixun D. & Dengqin C. 1982. Parthenogenesis and the genetic properties of parthenosporophytes of *Undaria pinnatifida*. *Acta Oceanologica Sinica* **1**.
- Farell P. & Fletcher R. L. 2006. An investigation of dispersal of the introduced brown alga *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar and its competition with some species on the man-made structures of Torquay Marina (Devon, UK). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **334**:236-243.
- Fletcher R. L. & Farrell P. 1999. Introduced brown algae in the North East Atlantic, with particular respect to *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **52**:259-275.
- Fletcher R. L. & Manfredi C. 1995. The occurrence of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) on the South Coast of England. *Botanica Marina* **38**:335-338.
- Floch J.-Y., Pajot R. & Wallentinus I. 1991. The Japanese brown alga *Undaria pinnatifida* on the coast of France and its possible establishment in European Waters *J. Cons. Int. Explor. Mer* **47**:379-390.
- Floch J. Y., Pajot R. & Mouret V. 1996. *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) 12 years after its introduction into the Atlantic Ocean. *Hydrobiologia* **326/327**:217-222.
- Foll M. & Gaggiotti O. 2008. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a bayesian perspective. *Genetics* **180**:977-993.
- Forrest B. M. & Blakemore K. A. 2006. Evaluation of treatments to reduce the spread of a marine plant pest with aquaculture transfers. *Aquaculture* **257**:333-345.
- Forrest B. M., Brown S. N., Taylor M. D., Hurd C. L. & Hay C. H. 2000. The role natural dispersal mechanisms in the spread of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae). *Phycologia* **39**:547-553.
- Fredriksen S., Sjutun K., Lein T. E. & Rueness J. 1995. Spore dispersal in *Laminaria hyperborea* (Laminariales, Phaeophyceae). *Sarsia* **80**:47-53.
- Frontier S., Pichod-Viale D., Leprêtre A., Davoult D. & Luczak C. 1990. Ecosystèmes: Structure, Fonctionnement et Evolution, Dunod edition, Paris.549pp.

G

- Gaylord B., Reed D. C., Raimondi P. T. & Washburn L. 2006. Macroalgal spore dispersal in coastal environments: mechanistic insights revealed by theory and experiment. *Ecological Monographs* **76**:481-502.
- Gaylord B., Reed D. C., Raimondi P. T., Washburn L. & McLean S. R. 2002. A physically based model of macroalgal spore dispersal in the wave and current-dominated nearshore. *Ecology* **83**:1239-1251.
- Gaylord B., Reed D. C., Washburn L. & Raimondi P. T. 2004. Physical-biological coupling in spore dispersal of kelp forest macroalgae. *Journal of Marine Systems* **49**:19-39.
- Geller J. B., Darling J. A. & Carlton J. T. 2010. Genetic perspectives on marine biological invasions. *Annual Review Marine Science* **2**:401-427.
- Girard-Descatoire A., Castric-Fey A. & L'Hardy-Halos M. T. 1997. Inventaire de la faune et de la flore sur les fonds rocheux de Saint-Malo et de Dinard. Direction Régionale de l'Environnement Bretagne, Conseil Régional de Bretagne, Rennes.
- Glasby T. M. 1999. Effects of shading on subtidal epibiotic assemblages. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **234**:275-290.
- Glasby T. M., Connell S. D., Holloway M. G. & Hewitt C. L. 2007. Nonindigenous biota on artificial structures: could habitat creation facilitate biological invasions? *Marine Biology* **151**:887-895.

- Glöckner F. O., Amann R., Alfreider A., Pernthaler J., Psenner R., Trebesius K. & Schleifer K. 1996. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **19**: 403-406.
- Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate *F*- statistics." *Journal of Heredity* **86**:485-486.
- Gouletquer P., Bachelet G., Sauriau P.-G. & Noël P. 2002. Open Atlantic coast of Europe - A century of introduced species into french waters. In E. Leppäkoski, S. Gollasch, et S. Olenin, editors. *Introduced species in Atlantic French waters*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 276-290pp.
- Gray J. S. 1997. Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity & Conservation* **6**:153-175.
- Grizel H. & Héral M. 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Conseil International Explor. Mer* **47**:399-403.
- Grosholz E. 2002. Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. *Trends in ecology and evolution* **17**:22-27.
- Guillemin M.-L., Faugeron S., Destombe C., Viard F., Correa J. & Valero M. 2008. Genetic variation in wild and cultivated populations of the haploid-diploid red alga *Gracilaria Chilensis*: how farming practices favor asexual reproduction and heterozygosity. *Evolution* **62**:1500-1519.
- Guillot G., Estoup A., Mortier F. & Cosson J.-F. 2005a. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* **170**:1261-1280.
- Guillot G., Mortier F. & Estoup A. 2005b. Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* **5**.
- Guillot G., Santos F. & Estoup A. 2008. Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* **00**:1-2.

H

- Hardy C. W. 2002. *Sex ratios: Concepts and research Methods*, Cambridge University press.
- Hardy O. J. & Vekemans X. 1999. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity* **83**:145-154.
- Hardy O. J. & Vekemans X. 2002. SPAGEDi : a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology* **2**:618-620.
- Harrison S. 1991. Local extinction in a metapopulation context: An empirical evaluation. *Biol. J. Linn. Soc.* **42**:73-88.
- Hay C. H. 1990. The dispersal of sporophytes of *Undaria pinnatifida* by coastal shipping New Zealand, and implications for further dispersal of *Undaria* in France. *Bulletin British Phycological*. **25**:301-313.
- Hay C. H. & Luckens P. A. 1987. The Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta, Laminariales) found in a New Zealand harbour. *New Zealand Journal of Botany* **25**:329-332.
- Hay C. H. & Sanderson J. C. 1999. Dispersal of the Asian kelp *Undaria pinnatifida* in Australasia, University of the South pacific, Java, Fiji.
- Hernandez-Carmona G., Hughes B. & Graham M. H. 2006. Reproductive longevity of drifting kelp *Macrocystis pyrifera* (Pheophyceae) in Monterey Bay, USA. *Journal of Phycology* **42**:1199-1207.
- Hewitt C. L., Campbell L. M. & Schaffelke B. 2007. Introductions of seaweeds: accidental transfer pathways and mechanisms. *Botanica Marina* **50**:326-337.
- Hewitt C. L., Campbell M. L., Mc Enulty F., Moore K. M., Murfet N. B., Robertson B. & Schaffelke B. 2005. Efficacy of physical removal of a marine pest: the introduced kelp *Undaria pinnatifida* in a Tasmanian marine reserve. *Biological invasions* **7**:251-263.

- Hewitt C. L., Campbell M. L., Thresher R. E., Martin R. B., Boyd S., Cohen B. F., Currie D. R., Gomon M. F., Keough M. J., Lewis J. A., Lockett M. M., Mays N., Mc Arthur M. A., O'Hara T. D., Poore G. C., Ross D. J., Storey M. J., Watson J. E. & Wilson R. S. 2004. Introduced and cryptogenic species in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *Marine Biology* **144**:183-202pp.
- Hoffmann A. J. & Santelices B. 1991. Banks of algal microscopic forms: hypotheses on their functioning and comparisons with seed banks. *Marine Biology* **79**:185-194.
- Hoffmann A. J. & Ugarte R. 1985. The arrival of propagules of marine macroalgae in the intertidal zone. *Journal Experimental Marine Biology Ecology* **92**:83-95.
- Hruby T. & Norton T. A. 1979. Algal colonization on rocky shores in the firth of Clyde. *Journal of Ecology* **67**:65-77.
- Huh M. K. & Huh H. W. 2002. Genetic diversity and population structure of wild and cultivated brown sea mustard, *Undaria pinnatifida*. *Protistology* **2**:159-168.

J

- Jackson J. B. C. 2008. Ecological extinction and evolution in the brave new ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105** (Supplement 1):11458-11465.
- Jones C. G., Lawton J. H. & Shachak M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* **69**:373-386.
- Jones G., Almany G., Russ G., Sale P., Steneck R., van Oppen M. & Willis B. 2009. Larval retention and connectivity among populations of corals and reef fishes: history, advances and challenges. *Coral Reefs* **28**:307-325.

K

- Kanda T. 1936. On the gametophytes of some Japanese species of Laminariales. *Sci. Pap. Inst. Alg. Res.* **1**:221-260.
- Kendrick G. A. & Walker D. I. 1991. Dispersal distance for propagules of *Sargassum spinuligerum* (Sargassaceae, Phaeophyta) measured directly by vital staining and venturi suction sampling. *Marine Ecological Progress Series*. **79**:133-138.
- Kendrick G. A. & Walker D. I. 1995. Dispersal of propagules of *Sargassum* spp. (Sargassaceae: Phaeophyta): Observations of local patterns of dispersal and consequences for recruitment and population structure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **192**:273-288.
- Kim Y. S. & Nam K. W. 1997. Temperature and light responses on the growth and maturation of gametophytes of *Undaria pinnatida* (Harvey) Suringar in Korea. *J. Korean Fish. Soc.* **30**:505-510.
- Kinlan B. P. & Gaines S. D. 2003. Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology* **84**: 2007–2020.
- Kinlan B. P., Gaines S. D. & Lester S. E. 2005. Propagule dispersal and the scales of marine community process. *Diversity and Distributions* **11**:125-130.
- Kolar C. S. & Lodge D. M. 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution* **16**:199-204.
- Kritzer J. P. & Sale P. F. 2004. Metapopulation ecology in the sea: From Levin's model to marine ecology and fisheries science. *Fish and Fisheries* **5**.
- Kusumo H. T. & Druehl L. D. 2000. Variability over space and time in the genetic structure of the winged kelp *Alaria marginata*. *Marine Biology* **136**:397-409.

- Kusumo H. T., Pfister C. A. & Wootton J. T. 2004. Dominant (AFLP) and co-dominant (microsatellite) markers for the kelp *Postelsia palmaeformis* (Laminariales). *Molecular Ecology Notes* **4**:372-375.

L

- Lane C. & Mayes C. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* **42**:493-512.
- Lavoie D. M., Smith L. D. & Ruiz G. M. 1999. The potential for intracoastal transfer of non-indigenous species in the ballast water of ships. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **48**:551-564.
- Le Goff-Vitry M. C., Chipman A. D. & Comtet T. 2007. *In situ* hybridization on whole larvae: a novel method for monitoring bivalve larvae. *Marine Ecology Progress Series* **343**:161-172.
- Leblois R., Rousset F., Tickel D., Moritz C. & Estoup A. 2000. Absence of evidence for isolation by distance in expanding cane toad (*Bufo marinus*) population: an individual-based analysis of microsatellite genotypes. *Molecular Ecology* **9**:1905-1909.
- Ledoux J. B., Garrabou J., Bianchimani O., Drap P., Féral J. P. & Aurelle D. 2010. Fine-scale genetic structure and inferences on population biology in the threatened Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*. *Molecular Ecology* **19**:4204-4216.
- Leliaert F., Kerckhof F. & Coppejans E. 2000. Eerste waarnemingen van *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) en de epifyt *Pterothamnion plumula* (Ellis) Nägeli (Ceramiales, Rhodophyta) in Noord Frankrijk en België. *Dumortiera* **75**:421-426.
- Levin L. A. 2006. Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. *Integrative and Comparative Biology* **46**:282-297.
- Lewis J. A. 1999. A review of the occurrence of exotic macroalgae in Southern Australia, with emphasis on Port Phillip Bay, Victoria. Report final N°20, Center for Research on Introduced Marine Pests, CSIRO Marine Research, Hobart, Australia.
- Lewontin R. C. & Krakauer J. 1973. Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics* **74**:175-195.
- Liu J., Dong L., Shen Y. & Wu C. 2004. Effect of light period on egg discharge of gametophyte clones of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta). *Journal of Applied Phycology* **16**:519-521.
- Lockwood J. L., Cassey P. & Blackburn T. 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **20**:223-228.
- Logde D. 1993. Biological invasions: lessons for ecology. *Tree* **8**:133-137.
- Lowe S., Browne M., Boudjelas S. & De Poorder M. 2004. 100 of the Worlds Worst Invasive Alien Species a Selection from the Global Invasive Species Database ISSG and SSC of IUCN Auckland, New Zealand.
- Luikart G., England P. R., Tallmon D., Jordan S. & Taberlet P. 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature review Genetics* **4**:981-994.
- Lyons D. A. & Scheibling R. E. 2009. Range expansion by invasive marine algae: rates and patterns of spread at a regional scale. *Diversity and Distributions* **15**:762-775.

M

- Macaya E. C., Boltana S., Hinojosa I. A., Macchiavello J. E., Valdivia N. A., Vasquez N. R., Buschmann A. H., Vasquez J. A., Alonso Vega J. M. & Thiel M. 2005. Presence of sporophylls in floating kelp rafts of *Macrocystis spp.* (Phaeophyceae) along the Chilean Pacific coast. *Journal of Phycology* **41**:913-922.

- Maier I. & Muller D. G. 1986. Sexual pheromones in algae. *The Biological Bulletin* **170**:145-175.
- Manel S., Gaggiotti O. E. & Waples R. S. 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology & Evolution* **20**:136-141.
- Manel S., Schwartz M. K., Luikart G. & Taberlet P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **18**:189-197.
- Manly B. F. J. 1997. Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology. *London: Chapman & Hall*.
- Martin J. P. & Cuevas J. M. 2006. First record of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta, Laminariales) in Southern Patagonia, Argentina. *Biological Invasions* **8**:1399-1402.
- Meinesz A. 2007. Methods for identifying and tracking seaweed invasions. *Botanica Marina* **50**:373-384.
- Meudt H. M. & Clarke A. C. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Ecology & Evolution* **12**:106-117.
- Miller A. W., Chang A. L., Cosentino-Manning N. & Ruiz G. M. 2004. A new record and eradication of the Northern Atlantic alga *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae) from San Francisco bay, California, USA. *Journal of Phycology* **40**:1028-1031.
- Mineur F., Johnson M. P., Maggs C. A. & Stegenga H. 2007. Hull fouling on commercial ships as a vector of macroalgal introduction. *Marine Biology* **151**:1299-1307.
- Molnar J. L., Gamboa R. L., Revenga C. & Spalding M. D. 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Journal of Ecology and Environment* **6**:485-492.
- Moran P. A. P. 1948. The interpretation of statistical maps. *Journal of the Royal Statistical Society, B* **10**:243-251.
- Moran P. A. P. 1950. Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika* **37**.
- Myers J. H., Simberloff D., Kuris A. M. & Carey J. R. 2000. Eradication revisited: dealing with exotic species. *Tree* **15**:316-320.

N

- Norton T. A. 1978. The factors influencing the distribution of *Saccorhiza polyschides* in the region of Lough Ine. *Journal of Marine Biological Association UK* **58**:527-536.
- Norton T. A. 1992. Dispersal by macroalgae. *Bulletin British Phycological*. **27**:293-301.
- Not F., Simon N., Biegala I. C. & Vaultot D. 2002. Application of fluorescent *in situ* hybridization coupled with Tyramide Signal Amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. *Aquatic microbial ecology* **28**:157-166.
- Nyberg C. D. & Wallentinus I. 2005. Can species traits be used to predict marine macroalgal introductions? *Biological Invasions* **7**:265-279.

O

- Occhipinti-Ambrogi A. 2007. Global change and marine communities: alien species and climate change. *Marine Pollution Bulletin* **55**:342-352.
- Ojeda F. P. & Santelices B. 1984. Ecological dominance of *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta) in central Chile. *Marine Ecology Progress Series*. **19**:83-91.
- Oppliger V., Correa J., Faugeron S., Beltran J., Tellier F., Valero M. & Destombe C. 2010. Sex ratio variation in the *Lessonia nigrescens* complex (Laminariales, Phaeophyceae): effect of latitude, temperature and marginality. *Journal of Phycology*.
- Oppliger V. L. & Correa J. A. 2007. Parthenogenesis in the brown alga *Lessonia nigrescens* (Laminariales, Phaeophyceae) from central Chile. *Journal of Phycology* **43**:1295-1301.

P

- Palumbi S. R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* **13**:S146-S158.
- Peakall R., Ruibal M. & Lindenmayer D. B. 2003. Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* **57**:1182-1195.
- Perez R. 1969. Le repeuplement des champs de *Laminaria digitata*: influence comparée de la coupe et de l'arrachage. *Science et pêche, Bulletin Institut Pêches maritimes*. **181**.
- Pérez R., Kaas R. & Barbaroux O. 1984. Culture expérimentale de l'algue *Undaria pinnatifida* sur les côtes de France. *Science et Pêche, Bulletin Institut Pêches maritimes*. **343**.
- Pérez R., Kass R., Barbaroux O., Arbault S., Le Bayon N. & J-Y. M. 1990. Technique de culture pour les côtes bretonnes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida* - Tableau de marché et étude économique *Archi-Mer, Institutional Archive of Ifremer*:1-68pp.
- Pérez R., Yongchui Lee J. & Juge C. 1981. Observations sur la biologie de l'algue japonaise *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar introduite accidentellement dans l'étang de Thau. *Science et Pêche, Bulletin Institut Pêches maritimes*, **315**:1-12.
- Pineda J., Hare J. A. & Sponaugle S. 2007. Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography* **20**:22-39.
- Piriz M. L. & Casas G. N. 1994. Occurrence of *Undaria pinnatifida* in Golfo Nuevo, Argentina. *Applied Phycology Forum* **10**:4.
- 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.
- Plotnick R. E., Gardner M. G. & O'Neill R. V. 1993. Lacunarity indices as measures of landscape texture. *Landscape Ecology* **8**:201-211.
- Plotnick R. E., Gardner R. H., Hargrove W. W. 1996. Prestegard K. & Perlmutter M. 1996. Lacunarity analysis: a general technique for the analysis of spatial patterns *Physical review* **53**:5461-5468.
- Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-959.
- Pritchard J. K. & Wen S. 2003. Documentation for STRUCTURE software: Version 2. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu>.
- Provan J., Murphy S. & Maggs C. A. 2005. Tracking the invasive history of the green alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*. *Molecular Ecology* **14**:189-194.
- Provasoli L. & Carlucci A. F. 1974. Vitamins and growth regulation, Stewart, W. D. P. edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B., W. L., Peplies J. & Glöckner F. O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB: Opens external link in new window. *Nucleic Acids Research*. **35**:7188-7196.

Q

- Queller D. C. & Goodnight K. F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**:258-275.

R

- Rannala B. & Mountain J. L. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**:9197-9201.
- Raymond M. & Rousset F. 1995. GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. **86**:248-249.
- Reed D. C. 1992. Dispersal in kelps: factors affecting spore swimming and competency. *Ecology* **73**:1577-1585.
- Reed D. C., Anderson T. W., Ebeling A. W. & Anghera M. 1997. The role of reproductive synchrony in the colonization potential of kelp. *Ecology* **78**:2443-2457.
- Reed D. C., Laur D. R. & Ebeling A. W. 1988. Variation in algal dispersal and recruitment: the importance of episodic events. *Ecological Monograph* **58**:321-335.
- Reed D. C., Raimondi P. T., Carr M. H. & Goldwasser L. 2000. The role of dispersal and disturbance in determining spatial heterogeneity in sedentary organisms. *Ecology* **81**:2011-2026.
- Reed D. C., Schroeter S. C. & Raimondi P. T. 2004. Spore supply and habitat availability as sources of recruitment limitation in the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* **40**:275-284.
- Rigal F., Viard F., Ayata S.-D. & Comtet T. 2010. Does larval supply explain the low proliferation of the invasive gastropod *Crepidula fornicata* in a tidal estuary? *Biological Invasions* **12**:3171-3186.
- Ripley B. D. 1976. The second-order analysis of stationary point processes. *Journal Applied Probability* **13**:255-266.
- Roman J. & Darling J. 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions *Trends in Ecology & Evolution* **22**:454-464.
- Ronce O. 2007. How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annual Review Ecology Evolution Systematics* **38**:231-253.
- Rosenberg M. S. 2009. PASSAGE: Pattern Analysis, Spatial Statistics, and Geographical Exegesis, Version 2 (Beta). Centre for Evolutionary Functional Genomics & School of Life Sciences, Arizona State University.
- Roughgarden J., Gaines S. & Possingham H. 1988. Recruitment dynamics in complex life cycles. *Science* **241**:1460-1466.
- Rousseau F., Burrowes R., Peters A. F., Kuhlenkamp R. & De Reviers B. 2001. A comprehensive phylogeny of the Phaeophyceae based on rDNA sequences resolves the earliest divergences. *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Sciences de la Vie* **324**: 305-319.
- Rousset F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-Statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**:1219-1228.
- Rousset F. 2000. Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* **13**:58-62.
- Rousset F. 2008a. Demystifying Moran's I. *Heredity* **100**:231-232.
- Rousset F. 2008b. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**:103-106.
- Ruiz G., Carlton J. T. & Hines A. H. 1997. Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent and consequences. *American Zoology* **37**:621-632.
- Russell D. J. 1983. Ecology of the imported red seaweed *Eucheuma striatum* Schmitz on Coconut Island, Oahu. *Hawaii. Pac. Sci* **37**:87-107.
- Russell L. K., Hepburn C. D., Hurd C. L. & Stuart M. D. 2008. The expanding range of *Undaria pinnatifida* in southern New Zealand: distribution, dispersal mechanisms and the invasion of wave-exposed environments *Biological Invasions* **10**:103-115.

S

- Sakai A. K., Allendorf F., Holt J. S., Lodge D. M., Molofsky J., With K. A., Baughman S., Cabin R. J., Cohen J. E., Ellstrand N. C., McCauley D. E., O'Neil P., Parker I. M., Thompson J. N. & Weller S. G. 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review Ecology and Systematics* **32**:305-332.
- Salinas J. M., Llera E. M. & Fuertes C. 1996. Nota sobre la presencia de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) en Asturias (Mar Cantabrico). *Boletín Instituto Español de Oceanografía* **12**:77-79.
- Sanderson J. C. 1990. A preliminary survey of the distribution of the introduced macroalga, *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar on the East Coast of Tasmania Australia. *Botanica Marina* **33**:153-157.
- Santelices B. 1990. Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*. **28**:177-276.
- Santelices B., Hoffmann A. J., Aedo D., Bobadilla M. & Otaiza R. 1995. A bank of microscopic forms on disturbed boulders and stones in tide pools. *Marine Ecology Progress Series*. **129**:215-228.
- Sax F., Stachowicz J., Brown J., Bruno F., Dawson M., Gaines S. D., Grosberg R., Hastings A., Holt R., Mayfield M., O'Connor M. & Rice W. 2007. Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**:465-471.
- Schaffelke B., Campbell S. J. & Hewitt C. L. 2005. Reproductive phenology of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) in Tasmania, Australia. *Phycologia* **44**:84-94.
- Schiel D. R. & Foster M. S. 2006. The population biology of large brown seaweeds: ecological consequences of multiphase life histories in dynamic coastal environments. *Annual Review Ecology and Systematics*. **37**:343-372.
- Schneider S., Roessli D. & Excoffier L. 2000. ARLEQUIN: a software for population genetics data analysis. User manual version 2.0. Genetics and Biometry *in*. Free program distributed by the authors over internet from lgb.unige.ch/arlequin/, Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Shan T. F. & Pang S. 2009. Assessing genetic identity of sporophytic offspring of the brown alga *Undaria pinnatifida* derived from mono-crossing of gametophyte clones by use of amplified fragment length polymorphism and microsatellites markers. *Phycological Research* **57**:36-44.
- Shanks A. L. 2009. Pelagic larval duration and dispersal distance revisited. *Biological Bulletin* **216**:373-385.
- Shanks A. L., Grantham B. A. & Carr M. H. 2003. Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Journal of Applied Ecology*. **13**:S159-S169.
- Siegel D. A., Kinlan B. P., Gaylord D. & Gaines S. D. 2003. Lagrangian descriptions of marine larval dispersion. *Marine Ecology Progress Series*. **260**:83-96.
- Silva P. C., Woodfield R. A., Cohen A. N., Harris L. H. & Goddard J. H. R. 2002. First report of the Asian kelp *Undaria pinnatifida* in the northeastern Pacific Ocean. *Biological Invasions* **4**:333-338.
- Silwa C., Johnson C. R. & Hewitt C. L. 2006. Mesoscale dispersal of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* attached to unstable substrata. *Botanica Marina* **49**:396-405.
- Simberloff D. 2006. Invasional meltdown 6 years later: important phenomenon, unfortunate metaphor, or both? *Ecology Letters* **9**:912-919.
- Simberloff D. 2009. The role of propagule pressure in biological invasions. *Annual Review Ecology, Evolution and Systematics*.:81-102.
- Simon N., Campbell L., Örnolfsdóttir E., Groben R., Guillou L., Lange M. & Medlin L. K. 2000.

- Oligonucleotide probes for the identification of three algal groups by Dot Blot and fluorescent whole-cell hybridization. *Journal of Eukaryotes Microbiology*. **47**:76-84.
- Sinner J., Forrest B. & Taylor M. 2000. A strategy for managing the Asian kelp *Undaria pinnatifida*. Cawthron Report N° 578.
- Sjotun K., Eggereidel S. F. & Hoisaeter T. 2007. Grazer-controlled recruitment of the introduced *Sargassum muticum* (Phaeophyceae, Fucales) in northern Europe. *Marine Ecology Progress Series* **342**:127-138.
- Sokal R. R. & Oden N. L. 1978. Spatial autocorrelation analysis in biology. *Biological Journal of the Linnean Society* **10**:199-228.
- Souveyran Y. 2008. Espèces exotiques envahissantes dans les collectivités françaises d'Outre-Mer, Paris, France.
- Staehr P. A., Pedersen M. F., Thomsen M. S., Wernberg T. & Krause-Jensen D. 2000. Invasion of *Sargassum muticum* in Limfjorden (Denmark) and its possible impact on the indigenous macroalgal community. *Marine Ecology Progress Series* **207**:79-88.
- Stegenga H., Karremans M. & Simons J. 2007. Zeewieren van de voormalige oesterputten bij Yerseke. *Gorteria* **32**:125-143.
- Storz J. F. 2005. Using genome scan of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology* **14**:671-688.
- Strayer D. L., Eviner V. T., Jeschke J. M. & Pace M. L. 2006a. Understanding the long-term effects of species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **21**:645-651.
- Strayer D. L., Eviner V. T., Jeschke J. M. & Pace M. L. 2006b. Understanding the long-term effects of species invasions. *Trends in ecology and evolution* **21**:646-651.
- Stuart M. D. 2004. Review of research on *Undaria pinnatifida* in New Zealand and its potential impacts on the eastern coast of the South Island. New Zealand Department of Conservation, Wellington, New Zealand.
- Suetsuna K., Maekawa K. & Chen J.-R. 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* **15**:267-272.
- Suto S. 1950. Studies on shedding, swimming and fixing of the spores of seaweeds. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **16**:1-9.
- Suto S. 1952. On shedding of zoospores in some algae of Laminariaceae *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **18**.

T

- Tararenkov A., Bergstrom L., Jonsson R., Serrao E. A., Kautsky L. & Johannesson K. 2005. Intriguing asexual life in marginal populations of the brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Molecular Ecology* **14**:647-651.
- Thompson K. D. & Dragar C. 2004. Antiviral activity of *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus. *Phytotherapy Research* **18**:551-555.
- Thornber C. S., Kinlan B. P., Graham M. H. & Stachowicz J. J. 2004. Population ecology of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in California: environmental and biological controls on demography. *Marine Ecology Progress Series* **268**:69-80.
- Trowbridge C. D. & Todd C. D. 2001. Host-plant change in marine specialist herbivores: Ascoglossan sea slugs on introduced macroalgae. *Ecological Monographs* **71**:219-243.

U

- Underwood A. J. 1998. Grazing and disturbance: an experimental analysis of patchiness in recovery from a severe storm by intertidal alga *Hormosira banksii* on rocky shores in New South Wales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **231**:291-306.

V

- Valentine J. P. & Johnson C. R. 2003. Establishment of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* in Tasmania depends on disturbance to native algal assemblages. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **295**:63-90.
- Valentine J. P. & Johnson C. R. 2005. Persistence of the exotic kelp *Undaria pinnatifida* does not depend on sea urchin grazing. *Marine Ecology Progress Series* **285**:43-55.
- Valentine J. P., Magierowski R. H. & Johnson C. R. 2007. Mechanisms of invasion: establishment, spread and persistence of introduced seaweed populations. *Botanica Marina* **50**:351-360.
- Vellend M., Harmon L., Lockwood J., Mayfield M., Hughes A., Wares J. & Sax F. 2007. Effects of exotic species on evolutionary diversification. *Trends in Ecology & Evolution* **22**:481-488.
- Vincent T. 1999. *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, algue laminaire allochtone, une confirmation de son implantation et de sa progression en plusieurs points du littoral normand. *Bull. Trim. Soc. Géol. Normandie et Amis Muséum du Havre* **86**:35-37.
- Voisin M. 2006. Etat d'avancement à 18 mois et perspectives de travail. Comité de Thèse, Station biologique de Roscoff.
- Voisin M. 2007. Les processus d'invasions biologiques en milieu côtier marin: le cas de l'algue brune *Undaria pinnatifida*, cultivée et introduite à l'échelle mondiale. Université Pierre et Marie Curie, Roscoff.
- Voisin M., Engel C. R. & Viard F. 2005. Differential shuffling of native genetic diversity across introduced regions in a brown alga: aquaculture vs. maritime traffic effects. *Proceedings of the national academic of science* **102**:5432-5437.

W

- Wahl M. 2009. Marine hard bottom communities: patterns, dynamics, diversity, and change. Springer.
- Wallentinus I. 2007. Alien species alert: *Undaria pinnatifida* (wakame or Japanese kelp). *Ices Cooperative Research Report* **283**:40.
- Watts P., Rousset F., Saccheri I. J., Leblois R., Kemp S. J. & Thompson D. J. 2007. Compatible genetic and ecological estimates of dispersal rates in insect (*Coenagrion mercuriale*: odonata : Zygoptera) populations: analysis of 'neighbourhood size' using a more precise estimator. *Molecular Ecology* **16**:737-751.
- Weersing K. & Toonen R. J. 2009. Populations genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology-Progress Series* **393**:1-12.
- Weir B. S. & Cockerham C. C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**:1358-1370.
- Wilding C. S., Butlin R. K. & Grahame J. 2001. Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *Journal of Evolutionary Biology* **14**:611-619.
- Williams S. L. & Smith J. E. 2007. A global review of the distribution, taxonomy, and impacts of introduced seaweeds. *Annual Review Ecology, Evolution and Systematics* **38**:327-359.

- Williamson M. H. & Fitter A. 1996. The characters of successful invaders. *Biological Conservation* **78**:163-170.
- Wilson J. U., Dormontt E. E., Prentis P. J., Lowe A. J. & Richardson D. M. 2009. Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends in Ecology & Evolution* **24**:136-144.
- Wolff W. J. & Reise K. 2002. Oyster imports as a vector for the introduction of alien species into northern and western european coastal waters. In E. Leppakoski, editor. *Invasive Aquatic Species of Europe*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 193-205pp
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* **28**:114-138.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**:323–354.

Y

- Yamanaka R. & Akiyama K. 1993. Cultivation and utilization of *Undaria pinnatifida* (wakame) as food. *Journal of Applied Phycology* **5**:249-253.

Z

- Zechman F. W. & Mathieson A. C. 1985. The distribution of seaweed propagules in estuarine, coastal and offshore waters of New Hampshire, (U.S.A). *Botanica Marina* **28**:283-294.

ANNEXES

SOMMAIRE

Annexe 1 : Processus et dynamique d'installation des espèces introduites en milieu marin : une illustration avec l'algue brune asiatique *Undaria pinnatifida*

Annexe 2 : Conditions d'amplification et de migration des locus microsatellites d'*U. pinnatifida* avec le séquenceur capillaire ABI

Annexe 3 : Différences génétiques entre les populations d'*U. pinnatifida* de la Baie de St Malo et l'estuaire de la Rance

Annexe 4-A : Détail de la localisation des individus d'*U. pinnatifida* nouvellement apparus dans le port de l'Aber Wrac'h (suivi de janvier à juillet 2008)

Annexe 4-B : Résultats des analyses de lacunarité

Annexe 4-C : Résultats des tests d'isolement par la distance

Annexe 5-A : Protocole expérimental de l'expérience d'éradication/recolonisation

Annexe 5-B : Présentation du dispositif d'éradication/recolonisation au sein des deux sites intertidaux

Annexe 5-C : Présentation du dispositif d'éradication/recolonisation au sein du site subtidal
47

Annexe 5-D : Inventaire qualitatif global de la faune et de la flore réalisée lors de l'expérience d'éradication sur les trois sites réalisés

Annexe 5-E : Inventaire quantitatif du nombre d'*U. pinnatifida* au sein des trois sites

Annexe 6-A : Protocole d'amplification du marqueur mitochondrial trnP/rnL

Annexe 6-B : Protocole d'amplification de l'ADNr 18S & 28S

Annexe 6-C : Protocole de séquençage de l'ADNr 18S & 28S

Annexe 6-D : Séquences obtenues sur le gène 18S au sein des espèces cibles

Annexe 6-E : Séquences obtenues sur le gène 28S au sein des espèces cibles

Annexe 6-F: Protocole pour le Dot Blot

Annexe 6-G : Protocole pour le FISH

ANNEXE 1

Article publié

Annexe 1 : Processus et dynamique d'installation des espèces introduites en milieu marin : une illustration avec l'algue brune asiatique *Undaria pinnatifida*

Publié par le Journal de la Société de Biologie en Juin 2007

Auteurs : Marie Voisin, Claire Daguin, Carolyn Engel, Daphné Grulois, Cédric Javanaud & Frédérique Viard

Unité « Adaptation & Diversité en Milieu Marin » (UMR CNRS-UPMC 7144), Équipe Évolution et Génétique des Populations Marines, Station Biologique de Roscoff, Place Georges-Teissier, BP 74, 29682 Roscoff cedex.

Correspondance : voisin@sb-roscoff.fr; viard@sb-roscoff.fr

Processus et dynamique d'installation des espèces introduites en milieu marin : une illustration avec l'algue brune asiatique *Undaria pinnatifida*

par Marie Voisin, Claire Daguin, Carolyn Engel, Daphné Grulois, Cédric Javanaud & Frédérique Viard

Unité « Adaptation & Diversité en Milieu Marin » (UMR CNRS-UPMC 7144), Équipe Évolution et Génétique des Populations Marines, Station Biologique de Roscoff, Place Georges-Teissier, BP 74, 29682 Roscoff cedex.
Correspondance : voisin@sb-roscoff.fr; viard@sb-roscoff.fr

Reçu le 22 juin 2007

RÉSUMÉ

Les introductions biologiques sont en constante augmentation et sont reconnues comme la deuxième cause de diminution de la biodiversité, après la fragmentation ou la disparition des habitats. Au delà de la menace qu'elles représentent pour l'équilibre des écosystèmes, les espèces introduites constituent des modèles privilégiés pour aborder des questions fondamentales en écologie et en évolution, telles que les modalités de la dispersion et les capacités d'adaptation. Dans ce contexte, les espèces introduites à une échelle mondiale et dans un large spectre d'environnements sont des modèles particulièrement intéressants. Elles offrent en effet l'opportunité de comparer les mécanismes responsables de l'introduction et de l'installation durable entre différentes régions d'introduction et/ou habitats. Dans cet article, nous présentons quelques uns des aspects liés aux processus d'introduction et illustrons l'intérêt de l'analyse du polymorphisme

génétique pour leur étude. Le modèle utilisé ici est l'algue brune *Undaria pinnatifida* introduite mondialement en moins de 30 ans. Nos résultats montrent que *i*) de multiples schémas d'introduction ont favorisé l'introduction de cette algue à une échelle mondiale, soulignant la nécessité d'étudier les espèces en regard de l'écosystème envahi, *ii*) que les récurrences d'introduction sont essentielles dans la dynamique globale d'installation et que *iii*) si les activités anthropiques sont responsables de l'introduction primaire, elles peuvent également constituer des « réservoirs » et agir dans l'établissement durable des espèces introduites dans les milieux naturels. Ces résultats démontrent qu'en regard de la complexité des processus agissant sur l'installation des espèces introduites, la prise en compte de dimensions à la fois spatiale et temporelle dans l'étude des espèces introduites est indispensable.

SUMMARY Introduction and establishment processes of marine species: a study case with the japanese brown help *Undaria pinnatifida*

The number of biological introductions has increased since the 1970's and is now considered as the second major cause of the biodiversity erosion, after fragmentation or disappearance of habitat. Beyond the threat they represent for the ecosystem equilibrium, introduced species are interesting models to study fundamental issues in ecology and evolution like the processes of dispersal and adaptation to novel environments. In this context, species introduced over a large geographic range and spectrum of habitats provide an excellent opportunity for comparing the mechanisms that promote introduction and settlement between different environments. In this paper, based on a case study, the worldwide introduction of the brown alga *Undaria pinnatifida*, and on the use of

molecular tools, we aim at examining several processes promoting or occurring during biological introductions. Our results showed that *i*) multiple processes can account for the success of the pandemic introduction of this alga, highlighting the necessity to study introduced species in relation with the ecosystem they invaded, *ii*) the recurrence of introductions is a critical component in the dynamics of settlement and *iii*) human activities can play a major role not only during the primary introduction but also for the sustainable settlement of introduced species in natural environments by providing reservoir of migrants. Taken together, these results demonstrate that the complexity of mechanisms occurring in biological invasion require spatial but also long-term analysis.

INTRODUCTION

Les aires de répartition des espèces et la composition des peuplements résultent de phénomènes évolutifs pro-

gressifs et rythmés par des phénomènes géologiques ou climatiques à grande échelle. Les peuplements se modifient ainsi à l'échelle des temps géologiques, en fonction des phénomènes de compétition, de spéciation et d'adap-

tation des espèces les constituant. Les introductions biologiques, au contraire, sont définies comme l'apparition soudaine et imprévisible d'espèces originaires d'aires géographiques éloignées (Carlton, 1996a). Ce phénomène n'est pas nouveau en milieu marin, puisque dès les premiers voyages transcontinentaux, des espèces fixées sur les coques des caravelles ont été transportées et introduites hors de leur aire naturelle de distribution (Carlton, 1996a). À l'heure actuelle, près de 3 000 espèces sont transportées, chaque jour, dans les eaux de ballast des navires et sont susceptibles d'être dispersées hors de leur aire native (Carlton, 1996b). Seule une faible proportion de ces espèces introduites dans une nouvelle aire s'établit durablement, et une part encore plus faible pose de véritables problèmes (Williamson, 1996). Néanmoins, compte tenu de l'intensification des activités humaines et du très grand nombre d'espèces transportées, les cas d'invasions biologiques sont en constante augmentation depuis le début des années 1970 et sont désormais considérés comme l'une des principales menaces de la biodiversité, particulièrement en zones côtières (Mooney & Cleland, 2001 ; Sakai *et al.*, 2001 ; Grosholz, 2002).

Les invasions biologiques sont souvent des phénomènes irréversibles, tant les efforts et les coûts d'éradication sont importants (Myers *et al.*, 2000) et les stratégies par lutte biologique risquées (Bax *et al.*, 2001). Anticiper et prévoir apparaissent comme les principales solutions soit en empêchant l'introduction initiale, soit en proposant des stratégies de lutte dans les premiers stades d'introduction (*i.e.* avant la prolifération conduisant à l'invasion). De nombreuses études récentes ont essayé de synthétiser les mécanismes d'introduction et les caractéristiques communes aux introductions biologiques. L'objectif est de définir le « profil type » d'une espèce invasive et d'identifier les écosystèmes pouvant être envahis (Kolar & Lodge, 2001 ; Rejmanek & Reichard, 2001 ; Sax *et al.*, 2005). Bien qu'un certain nombre de critères semble commun à de nombreuses espèces introduites (par exemple, des temps de génération courts, de la reproduction asexuée, une production importante de propagules, etc.) et à de nombreux écosystèmes envahis (ex : milieux perturbés, voir Lozon & MacIsaac, 1997), les nombreux contre-exemples empêchent toute généralisation (Ruiz *et al.*, 1997). Facon *et al.* (2006) attribuaient finalement notre faible capacité de prédiction au fait que la majorité des études s'intéresse aux espèces introduites et aux écosystèmes envahis séparément, plutôt qu'à leur adéquation.

Au-delà de l'étude de leurs conséquences et de leur gestion, les espèces exotiques représentent d'excellents modèles d'étude des processus de colonisation et d'adaptation des espèces dans de nouveaux habitats. L'introduction d'espèces dans un nouvel environnement, dans lequel elles ne sont *a priori* pas adaptées, permet en effet d'aborder des questions fondamentales d'écologie, d'évolution et de biogéographie à une échelle de temps très courte et de mesurer directement certains processus, comme les capacités de dispersion des espèces ou les taux d'évolution (Reznick & Ghahambor, 2001).

Les espèces introduites à large spectre de distribution, quelque fois mondial, sont dans ce contexte des modèles d'étude privilégiés puisqu'ils offrent l'opportunité de comparer les processus écologiques et évolutifs responsables de leur installation initiale, de leur maintien local, de leur dispersion et de leur installation durable, entre les différentes régions d'introduction. L'algue brune *Undaria pinnatifida* est un exemple emblématique de ces espèces qui ont parfaitement réussi leur installation à une échelle mondiale. Originaires d'Asie, elle a colonisé depuis les années 1970 et en moins de 30 ans la plupart des océans du globe ; elle est aujourd'hui présente en Australie et Nouvelle-Zélande, en Europe (mer Méditerranée, océan Atlantique, Manche et mer du Nord), Argentine et États-Unis (côtes de Californie) ainsi qu'au Mexique (Silva *et al.*, 2002). En Europe, comme dans son aire d'origine, cette espèce est cultivée pour l'alimentation humaine, mais des populations se développent également dans les ports, marinas et autres types d'enrochements ainsi qu'en milieu naturel rocheux parmi les espèces algales locales. *U. pinnatifida*, définie comme l'une des espèces d'algues présentant les plus forts potentiels d'invasion (Nyberg & Wallentinus, 2005), a ainsi été introduite avec succès à l'échelle mondiale sur un large spectre d'environnements et accroît progressivement sa répartition au sein des régions d'introduction, en marge des activités anthropiques.

Dans cet article, nous ferons le point sur quelques questions relatives aux processus d'introduction biologique et d'expansion géographique en utilisant *U. pinnatifida* comme exemple. Nous nous intéresserons en particulier aux questions suivantes :

1 - Comment une espèce parvient-elle à coloniser de multiples environnements ? Est-ce que les mêmes vecteurs d'introduction sont intervenus dans les différentes régions d'introduction ?

2 - Quelle influence les activités anthropiques peuvent-elles avoir sur l'expansion des populations d'une espèce introduite par rapport aux capacités intrinsèques de l'espèce à se disperser ? En d'autres termes, une fois le processus d'introduction primaire réalisé (depuis l'aire native vers la région d'introduction), quelle est la part des activités humaines dans la dispersion régionale et locale de l'espèce ?

Ces différents aspects des introductions biologiques seront abordés ici grâce aux résultats d'études basées sur l'analyse du polymorphisme génétique selon les méthodes et concepts de la génétique des populations. Ces outils moléculaires sont des compléments essentiels aux observations des relevés de terrain et aux expériences d'écologie (Sakai *et al.*, 2001). Ils permettent en particulier de retracer l'histoire des introductions et d'identifier des introductions cryptiques (*i.e.* nouveaux événements d'introduction non distinguables des premiers sur le terrain) et des espèces cryptogéniques (*i.e.* espèce dont le statut introduit *vs.* natif est ambigu du fait de très fortes interactions avec les activités humaines), de caractériser les taux et les distances de dispersion efficace dans les régions d'introduction, d'analyser des traits

d'histoire de vie ou encore d'étudier l'hybridation potentielle avec la faune/flore native.

INTRODUCTION INITIALE : IDENTIFIER LES SOURCES ET LES VECTEURS

L'identification des sources et des vecteurs d'introduction est cruciale dans l'étude des processus d'installation d'une espèce exotique. En effet, le potentiel d'invasibilité, tel qu'il est décrit par Williamson & Fitter (1996), est en relation directe avec les conditions biotiques et abiotiques des milieux d'origine. Plus spécifiquement, en déterminant quels sont les points d'origine et les vecteurs d'introduction (ex : culture, eaux de ballast), il est possible de canaliser et de limiter les récurrences d'introductions à l'origine d'un renforcement des populations nouvellement installées. La détermination de la zone d'origine permet également d'avoir un référentiel quant à l'environnement dans lequel a évolué l'espèce et donc de leur capacité d'évolution vis-à-vis des nouvelles conditions environnementales rencontrées.

Les différents processus d'invasion, à l'origine du succès d'installation d'une espèce, ont des signatures génétiques spécifiques – en termes de diversité et de structure génétique des populations – décelables sur de longues périodes (Fig. 1). En théorie, des introductions multiples, depuis des populations génétiquement différenciées, se

traduisent par une forte diversité dans les populations introduites. En revanche, des événements d'introduction rares ou d'un faible nombre d'individus entraînent une perte de diversité (*i.e.* goulot d'étranglement) dans les populations introduites (Fig. 1).

Ces différents scénarios ne sont pas virtuels : ils ont déjà été identifiés en milieu marin. Par exemple, dans le cas de l'algue verte *Caulerpa taxifolia*, les populations introduites en mer Méditerranée sont peu polymorphes et très proches phylogénétiquement des souches cultivées en Europe occidentale. Jousson *et al.* (1998) ont ainsi proposé que l'introduction de la caulerpe en Méditerranée serait due à des individus échappés des aquariums de la côte méditerranéenne. En revanche, chez le gastéropode *Crepidula fornicata*, les niveaux de diversité allozymiques des populations introduites européennes sont similaires à ceux trouvés dans les populations de l'aire d'origine (Dupont *et al.*, 2003); les résultats de Wolff & Reise (2002) et Dupont *et al.* (2003) suggèrent que des événements d'introduction multiples ont eu lieu depuis des populations peu différenciées de la côte est des États-Unis. Quant au gastéropode *Cyclope neritea* introduit le long des côtes atlantiques françaises, il illustre tout à fait le scénario C de la figure 1 : la diversité génétique des populations introduites est très largement supérieure à celle observée dans les populations de l'aire naturelle (Simon-Bouhet *et al.*, 2006), montrant que l'introduction a eu lieu depuis des groupes de populations génétique-

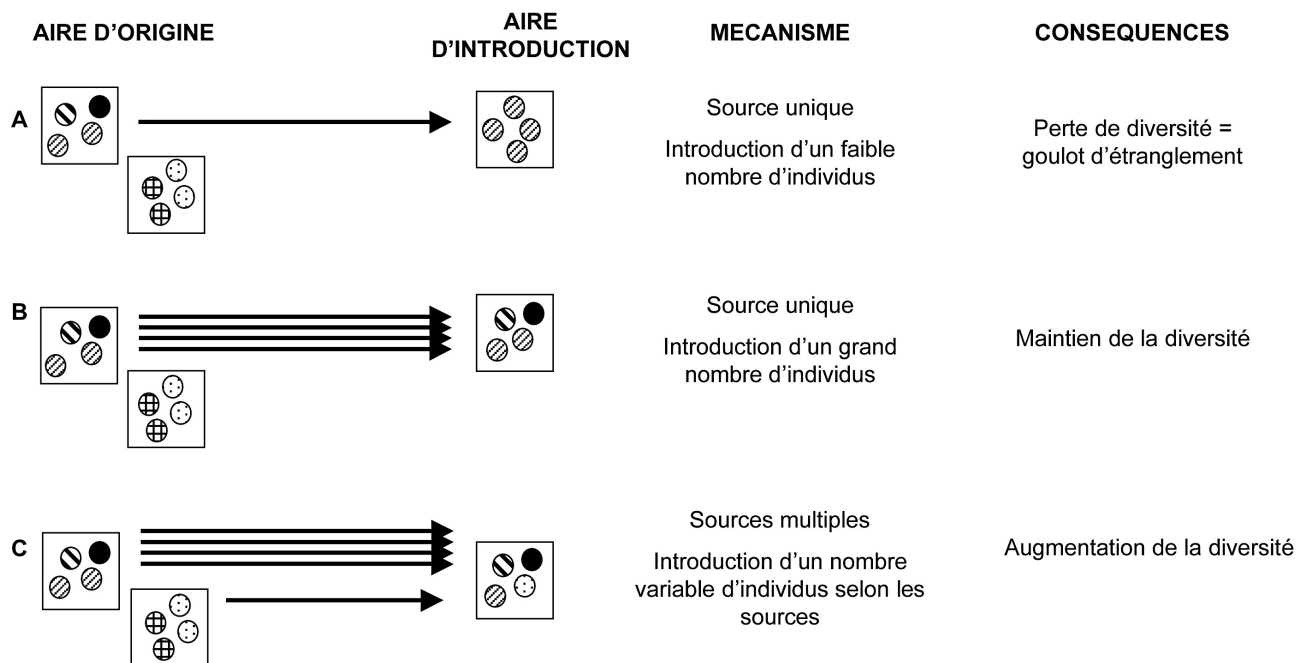


FIG. 1. – Différents scénarios d'introduction primaire et signatures génétiques associées. Chaque carré représente une population et les cercles les individus la constituant. L'identité génétique des individus est symbolisée par des figurés différents. Trois scénarios sont explicités : (A) effet de fondation (caractérisé notamment par une perte de diversité génétique entre l'aire d'origine et l'aire d'introduction) lié à l'introduction d'un nombre limité d'individus et d'un événement unique d'introduction, (B) absence d'effet de fondation due à l'introduction d'un grand nombre d'individus pouvant impliquer plusieurs événements d'introduction depuis la même source, (C) absence d'effet de fondation due à l'introduction de différentes sources qui sont génétiquement différentes; dans ce dernier scénario, la diversité génétique dans une population introduite est supérieure à la diversité génétique moyenne d'une population de l'aire d'origine.

ment différenciés et ainsi à l'origine de la mise en contact d'individus provenant de populations isolées depuis très longtemps dans leur aire naturelle.

L'introduction mondiale d'*U. pinnatifida* offre l'opportunité d'étudier si différents processus et mécanismes d'introduction ont eu lieu dans les régions d'introduction et peuvent expliquer l'apparent paradoxe de la colonisation, par cette espèce, d'un large spectre d'environnement. L'étude que nous avons réalisée (Voisin *et al.*, 2005) a porté sur des populations échantillonnées sur l'ensemble de l'aire de répartition d'*U. pinnatifida*, (*i.e.* aire d'origine asiatique et aires d'introduction européenne, australienne, américaine) et l'analyse du polymorphisme de séquences de deux régions inter-géniques mitochondriales (Engel *et al.*, 2008). Les événements d'introduction d'une espèce sont classiquement séparés en deux catégories : *i*) les introductions de types « pré-adaptés », associées à une forte diminution de la diversité génétique ou *ii*) les introductions récurrentes depuis des sources multiples, associées à une forte diversité et une forte capacité d'adaptation. Nos résultats ont montré que chez *U. pinnatifida* différents schémas d'introduction avaient eu lieu selon les régions d'introduction (Fig. 2).

En Australasie, les haplotypes (*i.e.* signature génétique mitochondriale des individus) qui composent les populations sont très divergents et la diversité génétique de

ces populations est identique voire supérieure à celle observée dans les populations de l'aire d'origine. Localement certaines populations présentent ainsi une diversité double (*e.g.* population de Dunedin en Nouvelle-Zélande, Voisin *et al.*, 2005). Ce résultat indique que des introductions récurrentes et indépendantes ont eu lieu depuis des régions d'Asie génétiquement différenciées vers l'Australie et la Nouvelle-Zélande. Ceci est en accord avec les données de trafic maritime en Nouvelle-Zélande qui avaient permis de suggérer au moins trois événements d'introduction indépendants d'*U. pinnatifida* (Hay & Luckens, 1987 ; Hay, 1990). Le succès d'introduction d'*U. pinnatifida* en Australasie serait donc dû à des introductions récurrentes *via* le trafic maritime entre l'Asie et l'Australasie.

En Europe en revanche, les haplotypes sont génétiquement proches (Fig. 2). De plus, l'haplotype majoritaire (63 %) et présent dans toutes les populations européennes est rare dans les populations naturelles asiatiques, mais présent dans les deux populations cultivées asiatiques analysées dans cette étude. L'introduction initiale d'*U. pinnatifida* en Europe a eu lieu suite à l'importation de naissains d'huîtres de *Crassostrea gigas*, depuis le Nord du Japon (Perez, 1981 ; Wolff & Reise, 2002), région ostréicole et de cultures de wakamé. Il y a ainsi eu un effet de fondation important, en comparaison de la

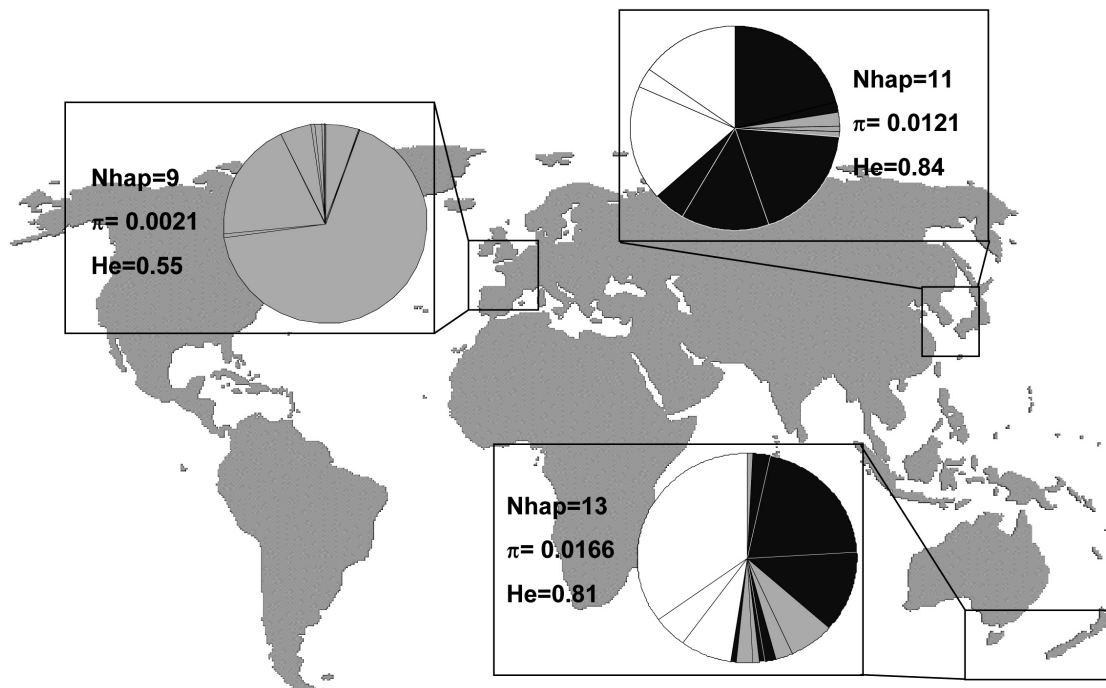


FIG. 2. – Polymorphisme génétique observé sur un échantillon de populations de l'aire d'origine (Asie) et des deux principales régions d'introduction (Europe et Australasie) d'*Undaria pinnatifida*.

Chaque camembert représente la composition génétique des populations d'une région et le code couleur (noir, gris, blanc) symbolise la proximité phylogénétique entre les différents variants génétiques. Le nombre de variants génétiques (haplotype mitochondrial, Nhap) ainsi que les indices de diversité nucléotique (π) et haplotypique (He) sont donnés pour chaque région.

Tableau I. – Quelques exemples de signature génétique associée aux processus d'introduction d'invertébrés sur les côtes européennes. La diversité génétique moyenne (H_{emoy}) ou totale (H_{etot}) est donnée pour chaque espèce, dans l'aire d'origine et dans l'aire d'introduction.

Espèce	Diversité des populations dans l'aire native	Diversité des populations dans l'aire d'introduction
<i>Crepidula fornicata</i> ¹	États-Unis (côte est) $H_{\text{emoy}} = 0,25$	France (Manche et Atlantique) $H_{\text{emoy}} = 0,23$
<i>Ocenebrellus inornatus</i> ²	Asie $H_{\text{emoy}} = 0,30$	France (Atlantique) $H_{\text{emoy}} = 0,32$
<i>Cyclope neritea</i> ³	Bassin Méditerranéen $H_{\text{emoy}} = 0,22$	France (Atlantique) $H_{\text{emoy}} = 0,74$
<i>Undaria pinnatifida</i> ⁴	Asie $H_{\text{etot}} = 0,84$	France (Atlantique) $H_{\text{etot}} = 0,55$

1 - Dupont *et al.*, 2004 ; 2 - Martel *et al.*, 2004 ; 3 - Simon-Bouhet *et al.*, 2006 ; 4 - Voisin *et al.*, 2005.

situation en Australie/Nouvelle-Zélande, lié aux activités aquacoles, le vecteur majeur d'introduction primaire et secondaire d'*U. pinnatifida* en Europe.

Le schéma d'introduction d'*U. pinnatifida* en Europe est ainsi très différent des schémas d'introduction identifiés pour de nombreuses espèces d'invertébrés introduites sur ces côtes : une récurrence d'évènements d'introductions et une forte diversité génétique dans les populations introduites a été en effet observé chez ces espèces qui ont également eu des relations étroites avec les activités aquacoles et conchylicoles (par exemple : *Crepidula fornicata* (Dupont *et al.*, 2003) ; *Ocenebrellus inornatus* (Martel *et al.*, 2004) ; *Cyclope neritea* (Simon-Bouhet *et al.*, 2006) (Tableau I).

Ainsi, les processus d'introductions biologiques apparaissent diversifiés dans leurs mécanismes à une échelle globale. Ceci implique des stratégies de gestion adaptées non seulement pour chaque espèce mais également des ajustements spécifiques pour chaque région. La pression de propagule est un des facteurs clés dans le succès d'introduction des espèces exotiques (Lockwood *et al.*, 2005) qui pourrait expliquer le caractère aléatoire, voire paradoxal, du succès d'introduction de certaines espèces. L'intensification des transports entre deux régions, et l'intérêt de l'homme pour une espèce sont néanmoins toujours déterminants. Dans le cas d'*U. pinnatifida*, ces deux situations sont illustrées par le rôle du trafic maritime en Australasie et celui de l'aquaculture en Europe.

COLONISATION EXPANSION DANS LES RÉGIONS D'INTRODUCTION

La proximité des espèces exotiques avec les activités humaines peut également jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes d'expansion au sein des régions d'introduction. Le transport de propagules sur de longues distances peut en effet augmenter considérablement la vitesse d'expansion géographique d'une espèce (Bossenbroek *et al.*, 2001 ; Lockwood *et al.*, 2005).

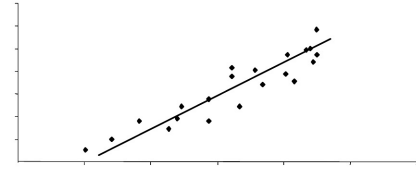
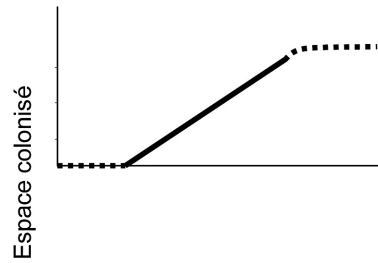
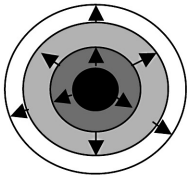
Cette probabilité de transport saltatoire, à longue distance, associée aux activités humaines fait ainsi partie

des critères utilisés par Nyberg & Wallentimus (2005) pour déterminer le caractère invasif et à risque des algues exotiques, au même titre que la tolérance des espèces aux conditions environnementales et leurs conséquences sur les écosystèmes envahis. La culture d'*U. pinnatifida* dans certaines régions d'introduction, comme la France et l'Espagne, et la capacité de se développer sur des substrats artificiels et mobiles (ex. coques des navires, coquilles de mollusques), ont ainsi largement contribué à classer *U. pinnatifida* parmi les espèces d'algues introduites présentant le plus fort potentiel d'invasion (Nyberg & Wallentimus, 2005).

Il semble que les activités humaines aient bien contribué à l'expansion de cette espèce le long des côtes européennes. En Espagne par exemple, où elle est cultivée, des populations d'*U. pinnatifida* ont été signalées dans des marinas ou à proximité d'activités aquacoles, sur l'ensemble de la façade Atlantique. Chacun de ces points chauds d'activité humaine peut représenter un noyau de dispersion source pour l'expansion de l'espèce. Expansion graduelle ou saltatoire, deux scénarios qui peuvent être testés avec des approches de génétique des populations (Figs 3A et 3B). Dans le cas d'*U. pinnatifida*, afin de distinguer l'importance relative des processus de colonisation graduelle et de dispersion saltatoire liée aux activités humaines, nous avons étudié la structure génétique de 8 populations espagnoles, avec 10 locus microsatellites (Voisin *et al.*, en préparation). Aucune relation entre la distance génétique et la distance géographique des populations, caractéristique d'une dispersion naturelle graduelle, n'a été révélée (Fig. 3C). Les échanges entre bassins conchylicoles et les trajectoires des bateaux sont aléatoires, sans continuité particulière. L'absence de structure géographique des populations suggère donc que la colonisation de la côte espagnole aurait été largement favorisée par le transport d'individus fixés sur les coques de bateaux de marinas en marinas ou par des échanges entre bassins aquacoles.

Des introductions secondaires au sein des régions d'introduction accélèrent donc le phénomène d'introduction d'*U. pinnatifida* à l'échelle européenne. D'autres espèces exotiques, dont le succès d'introduction est particulièrement remarquable, ont également profité des activités humaines pour augmenter rapidement leur

A- dispersion graduelle



B- dispersion saltatoire

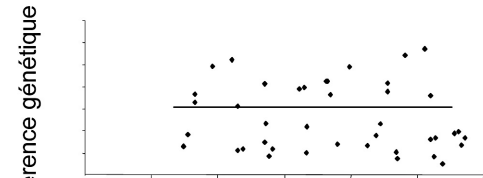
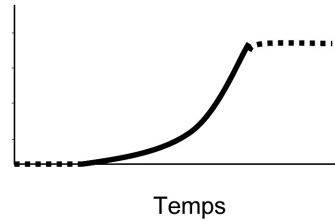
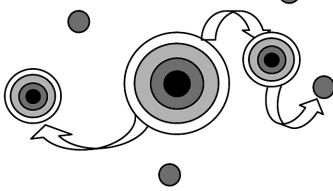
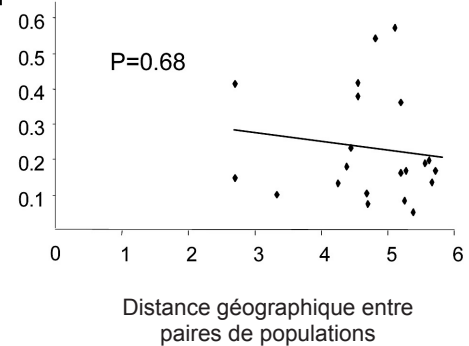
C- dispersion d'*Undaria pinnatifida* en Galice

FIG. 3. – Dynamique spatio-temporelle d'expansion dans une région d'introduction en fonction de modes de dispersion graduel ou saltatoire et conséquences génétiques associées (adapté de Dupont 2004).

A) Une dispersion graduelle depuis le point d'introduction initial (cercles concentriques autour du cercle noir) implique généralement une expansion spatiale lente et progressive au cours du temps. Sous ce scénario, les différences génétiques entre paires de populations sont une fonction linéaire de la distance géographique les séparant (modèle d'isolement par la distance).

B) Une dispersion saltatoire à partir du point d'introduction initial conduisant à la formation de populations satellites à plus ou moins longue distance se traduit par un schéma d'expansion géographique importante et rapide. L'aspect aléatoire de la formation des nouvelles populations ne se traduit pas par un modèle d'isolement par la distance.

C) Illustration avec le cas d'*U. pinnatifida* : l'absence de modèle d'isolement par la distance montre le rôle important de la dispersion par les bateaux et les activités aquacoles dans l'expansion régionale.

répartition dans les régions d'introduction. C'est notamment le cas de *C. fornicata*, dont la colonisation à grande échelle a largement été favorisée par les échanges entre bassins conchylicoles français (Wolff & Reise, 2002 ; Dupont *et al.*, 2003). Dans le cas de l'expansion de la moule zébrée *Dreissena polymorpha*, les observations de terrain suggéraient une expansion graduelle et les analyses du polymorphisme de six locus microsatellites ont révélé que des phénomènes de dispersion saltatoire, liés au trafic maritime, avaient également favorisé son expansion rapide (Wilson *et al.*, 1999).

Ces introductions secondaires au sein de la région d'introduction sont à l'origine d'une installation de nouvelles populations, y compris dans des habitats plus favorables à l'espèce, ou à des renforcements démographiques de populations déjà installées favorisant alors leur installation voire leur prolifération locale. Globalement, les activités humaines au sein de la région d'introduction

agissent comme des vecteurs de dispersion à longue distance ou des réservoirs (*i.e.* de sources potentielles récurrentes) de propagules augmentent la probabilité d'installation durable des populations. Le rôle de réservoir joué par des populations situées au contact direct des activités humaines a été analysé chez *U. pinnatifida* dans une baie particulièrement colonisée de la côte bretonne, la baie de Saint-Malo, où trois types de populations coexistent : *i*) des populations cultivées maintenues par l'homme et récoltées à maturité, *ii*) des populations dans les marinas, sur les pontons et les coques des bateaux et *iii*) des populations en milieu naturel rocheux, au milieu de espèces indigènes comme *Laminaria digitata* et *Himantalia elongata*. Les deux premiers types de populations pourraient jouer un rôle de sources, permettant le maintien des populations naturelles.

Afin d'analyser les relations entre la diversité génétique de ces populations et les activités humaines et de

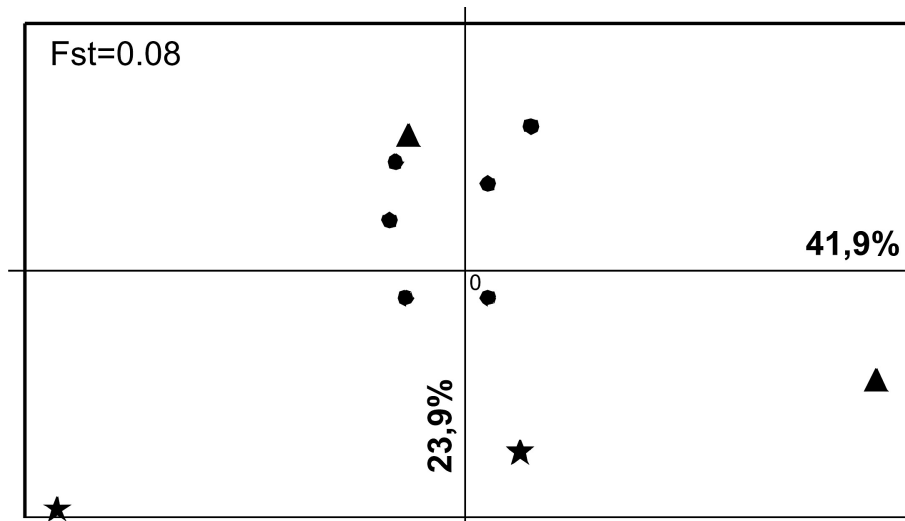


FIG. 4. – Résultats d'une analyse en composante principale basée sur les fréquences alléliques obtenues dans 10 populations d'*Undaria pinnatifida* de la baie de Saint-Malo en 2006. La position des populations les unes par rapport aux autres est fonction de leur différence génétique. Les deux premiers axes expliquent 65,89 % de la variance totale. Les populations cultivées sont représentées par une étoile (★), les populations des marinas par des triangles (▲) et les populations de milieu rocheux par des points (●).

déterminer le rôle de ces activités dans le renforcement des populations de milieu rocheux, nous avons analysé 10 populations (2 cultures, 2 marinas et 6 populations spontanées de milieu naturel) à l'aide de 10 locus microsatellites (Voisin & Viard, en préparation). Les différents types de populations présentent des caractéristiques génétiques contrastées et des niveaux d'interaction variables (Fig. 4).

Les deux populations cultivées sont les populations les moins diversifiées et les plus différentes génétiquement par rapport aux populations des marinas et du milieu rocheux (Fig. 4). Ce résultat peut être mis en relation avec les pratiques culturales utilisées pour l'obtention des semences, qui sont issues d'un faible nombre d'individus matures, prélevés aléatoirement dans différents sites du milieu naturel. Les populations des marinas et des milieux rocheux naturels présentent des caractéristiques communes. Leur niveau de diversité est similaire et la plupart ne sont pas génétiquement très différentes les unes des autres. Seule une des deux marinas apparaît nettement différenciée des autres populations du jeu de données (Fig. 4). Cette population est une marina fermée par une écluse, accueillant peu de bateaux. Il est donc peu surprenant que les flux de gènes entre les populations de la baie et cette population soient limités. L'absence de différences génétiques entre les populations du milieu rocheux et la seconde marina étudiée suggère en revanche un lien entre ces populations : la population d'*U. pinnatifida* dans cette marina comprend plusieurs centaines voire milliers d'individus se développant sur toutes sortes de substrats (ex : les bouts, les pontons, les coques des bateaux) et semble constituer un formidable réservoir de migrants pour alimenter les populations du milieu rocheux alentours.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos études des patrons d'introduction et de colonisation d'*U. pinnatifida* ont révélé que différents processus

d'introduction et d'expansion avaient favorisé l'installation de cette algue sur un large spectre d'environnements et d'habitats en dehors de son aire de répartition. Les activités humaines, comme l'aquaculture, le trafic maritime et les activités nautiques ont largement contribué à ce succès. Néanmoins, les populations d'*U. pinnatifida* semblent désormais installées durablement dans l'environnement naturel, hors des habitats fortement anthropisés. Il apparaît indispensable de suivre l'évolution de ces populations (par exemple pour analyser les processus d'adaptation locale ou examiner l'évolution démographique des populations), ainsi que les modifications des écosystèmes envahis, grâce à des études à long terme. L'intégration d'une dimension temporelle à l'étude des introductions biologiques est nécessaire pour le développement de stratégies de gestion de ces espèces exotiques installées durablement. À l'heure actuelle, par manque de données empiriques et de cadre théorique, il est difficile de prédire comment les espèces exotiques vont évoluer dans les environnements envahis et quels vont être leurs impacts à long terme (Strayer *et al.*, 2006).

Remerciements. – MV remercie la Région Bretagne pour avoir financé son allocation de recherche doctorale (programme AREC, projet CAIN-UP, resp. FV). Cet article repose également sur des études réalisées grâce au soutien financier du CNRS (projet ATIP-Biodiversité attribué à FV) et du Réseau d'Excellence Européen « *Marine Genomics Europe* ». Les échantillonnages réalisés en Bretagne lors de la thèse de MV n'auraient pas pu être menés à bien sans l'aide précieuse des plongeurs du Service Mer & Observation, Laurent LÉVEQUE, Guillaume DE LIEGE, Wilfried THOMAS, Sylvain MERY et Yann FONTANA. Les étudiants et membres de l'équipe EGPM ont également largement participé aux suivis des populations d'*U. pinnatifida*. Mr Alain CABIOCH du club de plongée Émeraude de St-Malo nous a permis de mettre en place la logistique nécessaire sur ce site d'étude. Les cultivateurs de wakamé, Patrick PODEUR, Scarlette LECORRE, Magali MOLLA et Jean-François ARBONA, ont également toujours répondu positivement à nos sollicitations. Enfin, l'échantillonnage mondial a été réalisé grâce au concours de très nombreux collègues de par le monde (cf. Annexes dans Voisin *et al.* (2005)). Les auteurs remercient vivement toutes ces personnes pour leur contribution et leur collaboration à la réalisation de ces travaux de recherche.

BIBLIOGRAPHIE

- Bax N., Carlton J. T., Mathews-Amos A., Haedrich R. L., Howarth F. G., Purcell J. E. & Gray A., The control of biological invasions in the world's oceans. *Conserv. Biol.*, 2001, 15, 1234-1246.
- Bossenbroek J. M., Kraft C. E. & Nekola J. C., Prediction of long-distance dispersal using gravity models: Zebra mussel invasion of Inland Lakes. *Ecol. Appl.*, 2001, 11, 1778-1788.
- Carlton J. T., Biological invasions and cryptogenic species. *Ecology*, 1996a, 77, 1653-1655.
- Carlton J. T., Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology. *Biol. Conserv.*, 1996b, 78, 97-106.
- Dupont L., Invasion des côtes françaises par le mollusque exotique *Crepidula fornicata* : contribution de la dispersion larvaire et du système de reproduction au succès de la colonisation. *ED Diversité du Vivant UPMC*, Paris VI, 2004.
- Dupont L., Jollivet D. & Viard F., High genetic diversity and ephemeral drift affects in a successful introduced mollusc (*Crepidula fornicata*: Gastropoda). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2003, 253, 183-195.
- Engel C. R., Billard E., Voisin M. & Viard F., Conservation and polymorphism of mitochondrial intergenic sequences in brown algae. *Eur. J. Phycol.*, 2008, sous presse.
- Facon B., Genton B. J., Shykoff J., Jarne P. & Estoup A. & David P., A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends Ecol. Evol.*, 2006, 21, 130-135.
- Grosholz E., Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. *Trends Ecol. Evol.*, 2002, 17, 22-27.
- Hay C. H., The dispersal of sporophytes of *Undaria pinnatifida* by coastal shipping in New-Zealand, and implications for further dispersal of *Undaria* in France. *Br. Phycol. J.*, 1990, 25, 301-313.
- Hay C. H. & Luckens P. A., The Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) found in a New-Zealand harbour. *N. Z. J. Bot.*, 1987, 25, 329-332.
- Jousson O., Pawlowski J., Zaninetti L., Meinesz A. & Boudouresque C. F., Molecular evidence for aquarium origin of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced to the Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1998, 172, 275-280.
- Kolar C. S. & Lodge D., Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends Ecol. Evol.*, 2001, 16, 199-204.
- Lockwood J. L., Cassey P. & Blackburn T., The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends Ecol. Evol.*, 2005, 20, 223-228.
- Lozon J. D. & MacIsaac H. J., Biological invasions: are they dependent on disturbance? *Environ. Rev.*, 1997, 5, 131-144.
- Martel C., Viard F., Bourguet D. & Garcia-Meunier P., Invasion by the marine gastropod *Ocenebrellus inornatus* in France. I. Scenario for the source of introduction. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 2004, 305, 155-170.
- Mooney H. A. & Cleland E. E., The evolutionary impact of invasive species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 5446-5451.
- Myers J. H., Simberloff D., Kuris A. M. & Carey J. R., Eradication revisited: dealing with exotic species. *Trends Ecol. Evol.*, 2000, 15, 316-320.
- Nyberg C. D. & Wallentinus I., Can species traits be used to predict marine macroalgal introductions? *Biol. Invasions*, 2005, 7, 265-279.
- Perez R., Observations sur la biologie de l'algue japonaise *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar introduite accidentellement dans l'étang de Thau. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, 1981, 315, 1-12.
- Rejmanek M. & Reichard S., Predicting invaders. *Trends Ecol. Evol.*, 2001, 16, 545.
- Reznick, D. N. & Ghalambor C. K., The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica (Dordr)*, 2001, 112-113, 183-198.
- Ruiz G. M., Carlton J. T., E.D. G. & Hines A. H., Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent, and consequences. *Am. Zool.*, 1997, 37, 621-632.
- Sakai A. K., Allendorf F. W., Holt J. S., Lodge M., Molofsky J., K.A. W., Baughman S., Cabin R. J., Cohen J. E., Ellstrand N. C., Mc Cauley D. E., O'Neil P., Parker I. M., Thompson J. N. & Weller S. G., The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 2001, 32, 305-332.
- Sax D. F., Stachowicz J. J. & Gaines S. D., Species invasions – Insights into ecology, evolution and biogeography – 2005, Sinauer Associates, Inc.
- Silva P. C., Woodfield A. R., Cohen A. N., Harris L. H. & Goddard J. H. R., First report of the Asian kelp *Undaria pinnatifida* in the northeastern Pacific Ocean. *Biol. Invasions*, 2002, 4, 333-338.
- Simon-Bouhet B., Garcia-Meunier P. & Viard F., Multiple introductions promote range expansion of the mollusc *Cyclope neritea* (Nassaaridae) in France: evidence from mitochondrial sequence data. *Mol. Ecol.*, 2006, 15, 1699-1711.
- Strayer D. L., Eviner V. T., Jeschke J. M. & Pace M. L., Understanding the long-term effects of species invasions. *Trends Ecol. Evol.*, 2006, 21, 645-651.
- Voisin M., Engel C. R. & Viard F., Differential shuffling of native genetic diversity across introduced regions in a brown alga: Aquaculture vs. maritime traffic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 5432-5437.
- Voisin M., Javanaud C. & Viard F., Secondary introductions or natural expansion of populations of the introduced brown alga *Undaria pinnatifida* in Europe? En préparation.
- Voisin M. & Viard F., Populations of the brown alga *Undaria pinnatifida* suffering different anthropogenic pressures exhibited different genetic characteristics. En préparation.
- Williamson M., Biological invasions, 1996 London, Chapman & Hall.
- Williamson M. H. & Fitter A., The characters of successful invaders. *Biol. Conserv.*, 1996, 78, 163-170.
- Wilson A. B., Naish K.-A. & Boulding E. G., Multiple dispersal strategies of the invasive quagga mussel (*Dreissena bugensis*) as revealed by microsatellites analysis. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 1999, 56, 2248-2261.
- Wolff W. J. & Reise K., Oyster imports as a vector for the introduction of alien species into northern and western European coastal waters. In: Leppakoski E. (Ed.) Invasive aquatic species of Europe. 2002, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 193-205.

ANNEXE 2

**Protocole d'amplification des
marqueurs microsatellites
chez *U. pinnatifida***

**Annexe 2 : Conditions d'amplification et de
migration des locus microsatellites d'*U. pinnatifida*
sur le séquenceur capillaire ABI**

Conditions d'amplification et de migration des locus microsatellites d'*Undaria pinnatifida* avec le séquenceur capillaire ABI

Les génotypes sont obtenus par électrophorèse capillaire : les fragments d'ADN marqués par un fluorochrome sont injectés dans des capillaires contenant un polymère soumis à un courant électrique, ce qui permet une séparation des molécules d'ADN selon leur taille.

A) Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR).

Les amplifications sont réalisées par série de 96 individus. L'ADN issu de l'extraction est dilué au 1/100^{ème} puis 2,5 µL de chaque dilution sont déposés sur une plaque de 96 puits. Après ajout de 12,5 µL de mélange réactionnel contenant les réactifs du tableau suivant, l'amplification sélective de l'ADN est réalisée sur des thermocycleurs MJResearch PTC 200.

Sur le séquenceur automatique utilisé (ABI 3130 xl), 5 fluorochromes aux longueurs d'ondes différentes peuvent être lus en même temps. Une de ces « couleurs » (« ROX ») étant réservée au marqueur de taille, les locus microsatellites amplifiés peuvent être marqués par 4 couleurs au choix (NED, FAM, VIC et PET). Les conditions optimales d'amplification n'étant pas identiques pour les 10 locus (Daguin et al. 2005), 3 réactions PCR dites « multiplex » car permettant l'amplification simultanée de plusieurs locus ont été réalisées pour chaque ADN (cf. Tableau X.1 en page suivante).

L'amplification « Multiplex 1 » permet d'amplifier les fragments d'ADN correspondants aux locus 1C1, 1B5, 4C12, 4G2 ; les couleurs utilisées pour chacun de ces locus sont respectivement PET, FAM, VIC et NED. L'amplification « Multiplex 2c » correspond aux locus 1B2, 1H5, 1G2, 4E9 marqués respectivement par les couleurs NED, FAM, VIC et PET. La PCR dite « Multiplex 3d » permet d'amplifier les locus 2E8 et 2C1, marqués par les couleurs VIC et FAM.

À noter que pour chaque série d'amplifications réalisée dans des plaques de 96 puits, 6 puits sont occupés par des ADN d'individus témoins dont le génotype est connu.

Tableaux ci-dessous : Mélanges réactionnels utilisés dans les PCRs « multiplex »

Dans les tableaux donnés ci-dessous sont indiqués les mélanges réactionnels de PCR pour chaque multiplexe. Pour chacun des locus, l'amorce directe dite « forward » est marquée par un fluorochrome soit NED (jaune), FAM (bleu), VIC (vert) ou PET (rouge) pour une lecture sur un séquenceur capillaire de type ABI 3130 xl. La deuxième colonne indique les concentrations des solutions mères et enfin la troisième indique les volumes utilisés pour un individu.

MULTI P1 (65-55)		
Réactifs	[C] solution mère	1 puit (µl)
Tampon	10X	1.50
MgCl ₂	25mM	1.50
dNTP	2.5mM	1.50
BSA	1mg/ml	2.00
Amorce F 4G2 NED	10µM	0.15
Amorce R 4G2	10µM	0.15
Amorce F 1C1 PET	10µM	0.22
Amorce R 1C1	10µM	0.22
Amorce F 1B5 FAM	10µM	0.15
Amorce R 1B5	10µM	0.15
Amorce F 4C12 VIC	10µM	0.15
Amorce R 4C12	10µM	0.15
Taq	5U/µL	0.07
H ₂ O		4.59
Sous-total		12.50
ADN	1/100	2.50
Total		15.00

MULTI P2c (60-50)		
Réactifs	[C] solution mère	1 puit (µl)
Tampon	10X	1.50
MgCl ₂	25mM	1.50
dNTP	2.5mM	1.50
BSA	1mg/ml	2.00
Amorce F 1B2 NED	10µM	0.20
Amorce R 1B2	10µM	0.20
Amorce F 1H5 FAM	10µM	0.15
Amorce R 1H5	10µM	0.15
Amorce F 1G2 VIC	10µM	0.30
Amorce R 1G2	10µM	0.30
Amorce F 4E9 PET	10µM	0.10
Amorce R 4E9	10µM	0.10
Taq	5U/µL	0.07
H ₂ O		4.43
Sous-total		12.50
ADN	1/100	2.50
Total		15.00

MULTI P3d (60-50)		
Réactifs	[C] solution mère	1 puit (µl)
Tampon	10X	1.50
MgCl ₂	25mM	1.50
dNTP	2.5mM	1.50
BSA	1mg/ml	2.00
Amorce F 2C1 FAM	10µM	0.09
Amorce R 2C1	10µM	0.09
Amorce F 2E8 VIC	10µM	0.10
Amorce R 2E8	10µM	0.10
Taq	5U/µL	0.07
H ₂ O		5.13
Sous-total		12.50
ADN	1/100	2.50
Total		15.00

Les programmes d'amplification sont indiqués ci-dessous.

- **Multiplex P1 (PCR « touch-down » 65-55)**

1. dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C
2. 10 cycles en « touch-down » de -1°C/cycle
 - 45 sec à 94°C
 - 45 sec à la température d'appariement (température initiale 65°C)
 - 45 sec à 72°C
3. 20 cycles
 - 45 sec à 94°C
 - 45 sec à 55°C
 - 45 sec à 72°C
4. élongation finale : 12min à 72°C

- **Multiplex P2c et P3d (PCR « touch-down » 60-50)**

1. dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C
2. 10 cycles en « touch-down », -1°C/cycle
 - 45 sec à 94°C
 - 45 sec à la température d'appariement (température initiale 60°C)
 - 45 sec à 72°C
3. 20 cycles
 - 45 sec à 94°C
 - 45 sec à 50°C
 - 45 sec à 72°C
4. élongation finale : 12min à 72°C

B) Préparation des échantillons pour le passage au séquenceur

Le génotypage est réalisé en plaques de 384 puits. La première étape consiste à diluer les produits de PCR. Le multiplex 1 (1) est dilué au 1:16; (2) 1:25 et (3) 1:100. Les multiplex 2 et 3 sont regroupés dans la même plaque pour le passage au séquenceur à l'aide du robot de la plateforme de séquençage. Lors de la deuxième étape, 2µL de chaque multiplex sont ajoutés au 5µL de tampon de charge contenant 0.07µL de standard de taille (GeneScan-500 LIZ) et de 4.93µL de formamide (Applied Biosystems). Vu les quantités infimes, le robot est à nouveau utilisé. Avant la détection par séquenceur, la plaque de 384 puits contenant le mix est ainsi dénaturé à 92°C pendant 3min. Il est à noter que les plaques de 96 puits sont aussi utilisés, la quantité de 500-LIZ est alors de 2.25µL par puits pour un volume total de 12µL/puits.

C) Analyse des génotypes par le séquenceur.

La détection est exécutée par un séquenceur ABI 3130XL (Applied Biosystem) avec un polymère POP7 et des capillaires de 50cm. Le mixage des multiplex 2c et 3d vont générer 6 marqueurs microsatellites lors de la détection. Les locus 1H5 (multiplex 2C) et 2C1 (multiplex 3d) sont marqués par le même fluorochrome FAM (bleu) mais diffèrent de façon importante par leur taille d'amplification (*i.e.* environ 100 paires de base) ce qui permet de les distinguer sans ambiguïtés sur les profils obtenus post-séquençage. De même pour les locus 1G2 (multiplex 2C) et 2E8 (multiplex 3d) marqués par le fluorochrome VIC (vert) mais différent de 160 paires de base environ.

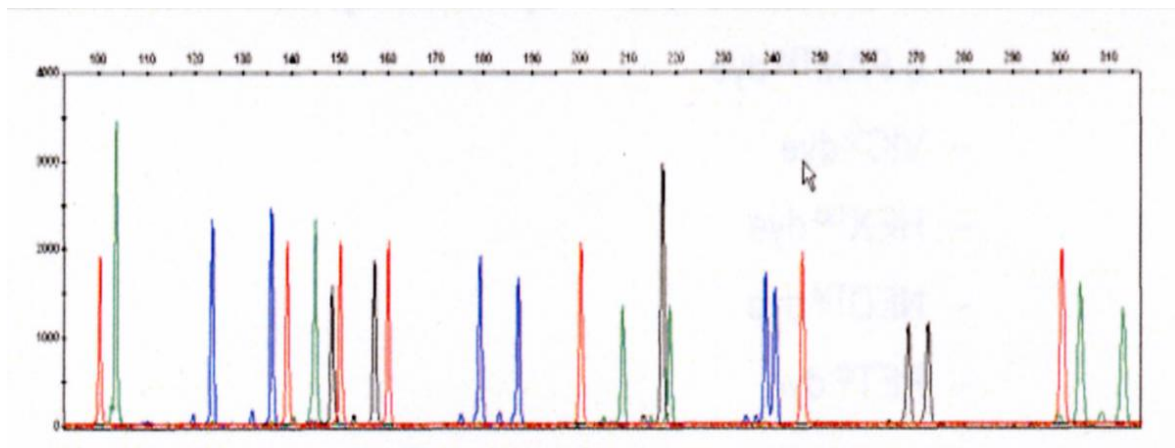


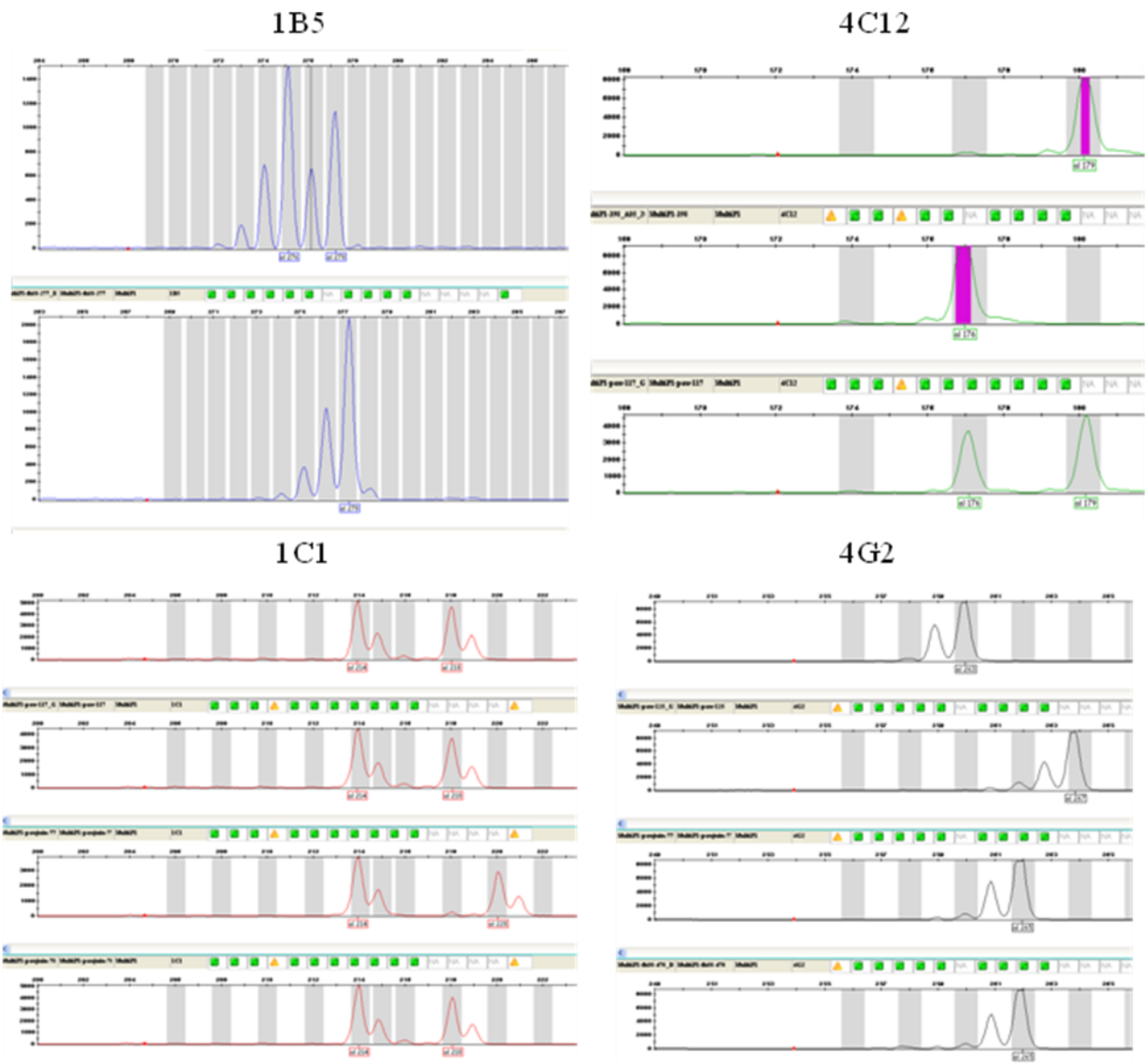
Figure 1 : Exemple d'électrophorégramme obtenu par un séquenceur capillaire.

En abscisse, la taille des fragments et en ordonnée, l'intensité du signal (quantité de fluorochrome). Chaque couleur correspond à un fluorochrome (donc à un locus). Le logiciel GeneMapper® permet de visualiser, vérifier et modifier (si nécessaire) l'assignation des allèles aux pics d'intensité du fluorochrome. La concordance des génotypes des témoins avec l'électrophorégramme est aussi vérifiée.

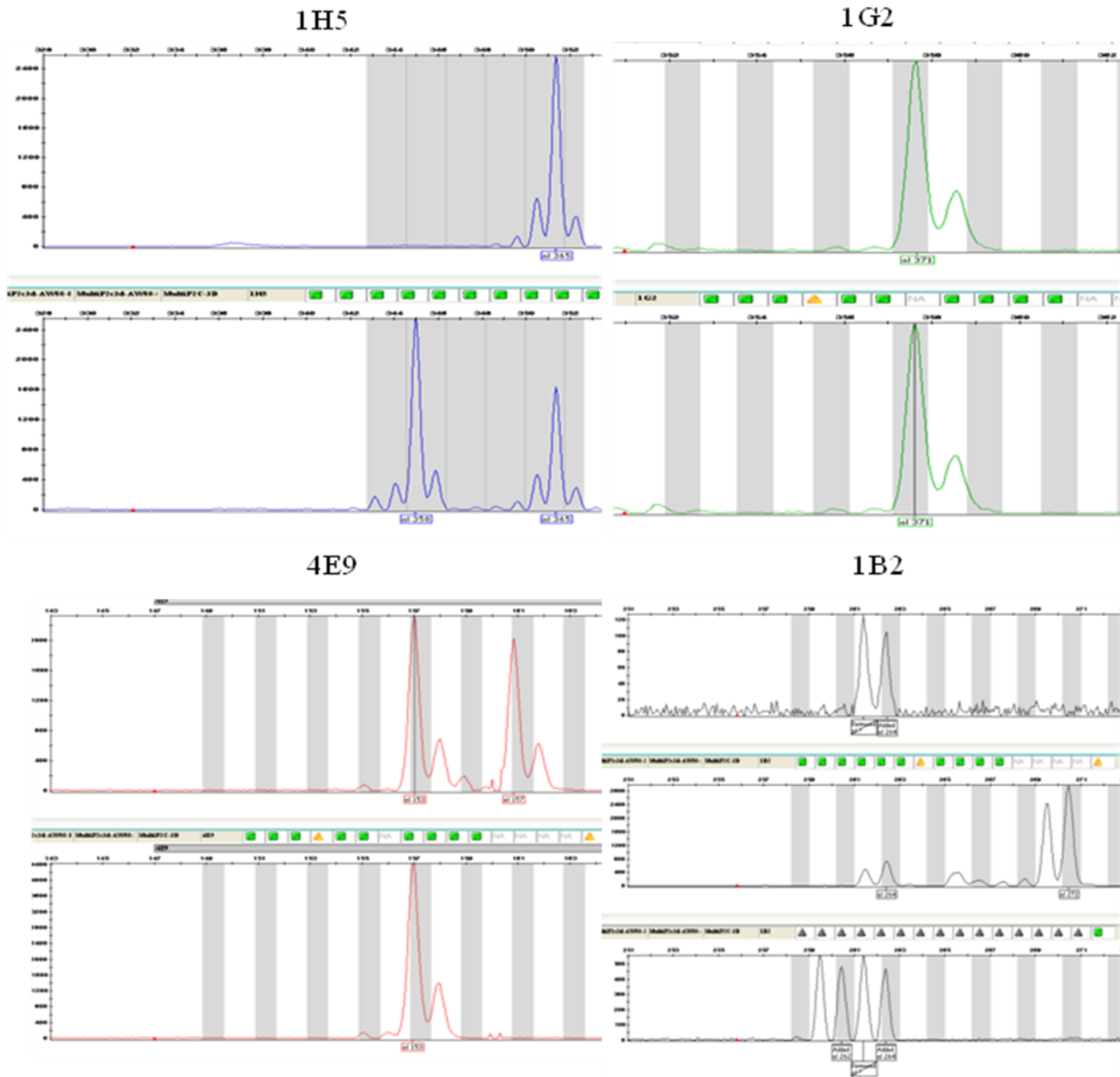
La caméra du séquenceur convertit la fluorescence émise par le fluorochrome en signal électrique, ce qui permet d'obtenir, pour chaque individu et chaque multiplex, un électrophorégramme (exemple figure ci-dessus) visualisable avec le logiciel GeneMapper® Software v4.0.

Ci-dessous sont donnés des exemples de profil allélique observé pour chacun des 9 locus utilisés au cours de ce travail.

Profil type rencontré dans le Multiplex 1 : 4 locus

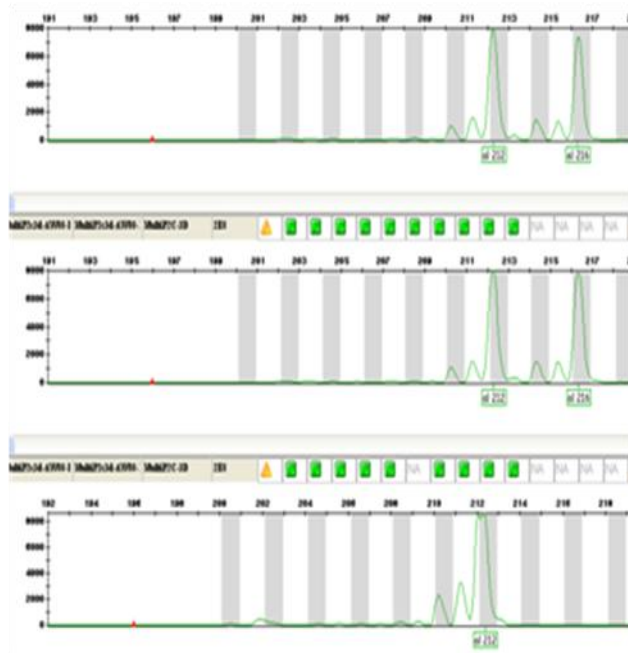


Profil type rencontré dans le Multiplex 2c : 4 locus

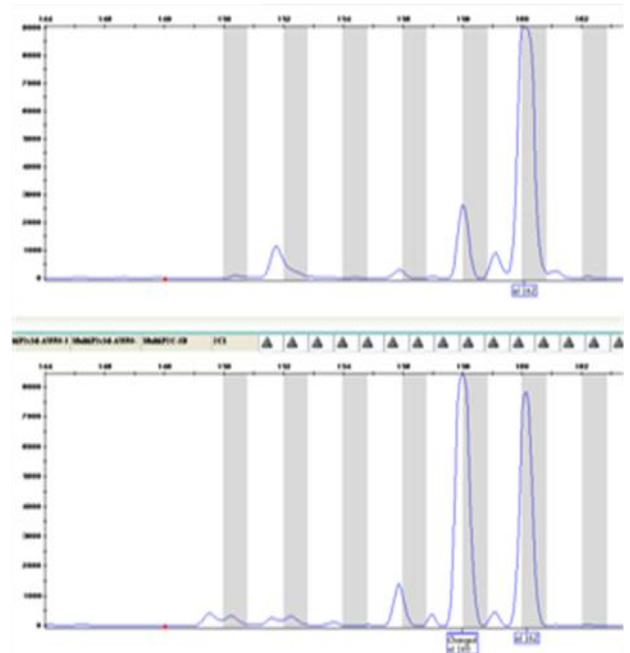


Profil type rencontré dans le Multiplex 3d : 2 locus

2E8



2C1



ANNEXE 3

Chapitre II :

Connectivité & Migration entre les populations à l'intérieur d'une baie

Annexe 3 : Différences génétiques entre les populations d'*U. pinnatifida* de la Baie de St Malo et de l'estuaire de la Rance

Les valeurs de l'estimateur F_{st} sont en dessous de la diagonale et les probabilités des tests exacts associés sont au dessus de la diagonale.

Les valeurs en gras sont les probabilités non significatives au seuil de 5%

Les valeurs soulignées sont les valeurs de F_{st} non significatives au seuil de 5%.

Les populations sont indiquées par leur identifiant correspondant à la Table 1 disponible dans l'article du Chapitre II.

	1	2	3	7	8	<10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	25	26	27	29	30	32	33	34	35	36	39
1	-	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶
2	0.09	-	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	
3	0.19	0.22	-	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	
7	0.22	0.17	0.27	-	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	
8	0.13	0.12	0.17	0.15	-	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	
10	0.07	0.08	0.11	0.13	0.07	-	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	
11	0.08	0.10	0.18	0.08	0.08	0.04	-	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	
12	0.04	0.07	0.12	0.15	0.09	0.04	0.05	-	0.02	0.00	0.06	0.00	0.02	0.02	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.07	0.02	0.39	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	0.17	<10 ⁻⁶
13	0.04	0.06	0.09	0.16	0.08	0.03	0.05	<u>0.01</u>	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	0.10	<10 ⁻⁶
14	0.05	0.07	0.12	0.12	0.08	0.04	0.03	<u>0.01</u>	0.01	-	0.00	0.00	0.00	0.01	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.02	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	0.01	<10 ⁻⁶
15	0.07	0.04	0.09	0.12	0.05	0.02	0.05	<u>0.02</u>	0.01	0.02	-	<10 ⁻⁶	0.00	0.01	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	0.01	<10 ⁻⁶	0.26	0.02	0.00	0.00	0.17	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	0.28	<10 ⁻⁶
16	0.08	0.15	0.09	0.22	0.11	0.05	0.09	0.06	0.05	0.07	0.06	-	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	
17	0.08	0.06	0.15	0.11	0.06	0.05	0.06	0.02	0.04	0.03	0.02	0.11	-	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.03	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	0.34	<10 ⁻⁶
18	0.07	0.07	0.16	0.14	0.07	0.03	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.07	0.05	-	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.10	0.01	0.00	0.00	0.02	0.23	0.15	0.10	<10 ⁻⁶	0.00	0.25	<10 ⁻⁶
19	0.16	0.18	0.13	0.27	0.08	0.09	0.13	0.07	0.06	0.10	0.08	0.07	0.11	0.07	-	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	
20	0.13	0.08	0.18	0.17	0.08	0.09	0.09	0.05	0.05	0.07	0.02	0.14	0.06	0.03	0.09	-	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶
21	0.11	0.14	0.12	0.13	0.13	0.07	0.07	0.04	0.04	0.04	0.06	0.09	0.05	0.07	0.12	0.13	-	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	0.00	<10 ⁻⁶
22	0.05	0.04	0.18	0.12	0.07	0.05	0.04	0.03	0.03	0.01	0.02	0.11	0.02	0.02	0.12	0.06	0.07	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.35	0.00	<10 ⁻⁶	0.09	<10 ⁻⁶	
23	0.03	0.06	0.13	0.13	0.05	0.03	0.02	<u>0.01</u>	<u>0.01</u>	<u>0.01</u>	0.02	0.03	0.03	0.03	0.00	0.07	0.06	0.06	0.02	-	0.48	0.12	0.02	0.00	0.09	0.00	0.18	<10 ⁻⁶	0.21	<10 ⁻⁶
25	0.03	0.07	0.12	0.14	0.06	0.02	0.04	0.02	0.02	0.03	<u>0.01</u>	0.02	0.04	0.02	0.07	0.07	0.06	0.03	<u>-0.01</u>	-	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.04	<10 ⁻⁶	
26	0.07	0.10	0.12	0.12	0.05	0.04	0.04	<u>0.00</u>	0.02	0.01	0.02	0.07	<u>0.01</u>	0.02	0.06	0.05	0.03	0.02	<u>0.01</u>	0.03	-	0.00	0.00	0.20	0.00	0.01	<10 ⁻⁶	0.09	<10 ⁻⁶	
27	0.03	0.04	0.15	0.19	0.08	0.03	0.06	0.03	0.01	0.04	0.03	0.05	0.05	0.03	0.09	0.08	0.08	0.02	0.01	0.01	0.05	-	0.00	0.08	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.03	<10 ⁻⁶	
29	0.13	0.09	0.15	0.12	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.02	0.11	0.04	0.02	0.07	0.02	0.09	0.05	0.04	0.05	0.03	0.06	-	0.02	0.00	0.00	<10 ⁻⁶	0.00	<10 ⁻⁶	
30	0.07	0.04	0.16	0.09	0.07	0.03	0.03	<u>0.02</u>	0.02	0.02	<u>0.01</u>	0.10	0.01	<u>0.01</u>	0.10	0.04	0.05	<u>0.00</u>	<u>0.02</u>	0.03	<u>0.01</u>	<u>0.02</u>	<u>0.02</u>	-	0.65	0.08	<10 ⁻⁶	0.96	<10 ⁻⁶	
32	0.08	0.06	0.15	0.10	0.10	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.10	0.04	<u>0.01</u>	0.12	0.06	0.04	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	<u>0.00</u>	-	0.01	<10 ⁻⁶	0.11	<10 ⁻⁶	
33	0.07	0.06	0.17	0.10	0.06	0.06	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.08	0.03	<u>0.00</u>	0.09	0.04	0.05	0.02	<u>0.01</u>	0.03	0.01	0.04	0.03	<u>0.01</u>	0.02	-	<10 ⁻⁶	0.01	<10 ⁻⁶	
34	0.35	0.21	0.47	0.22	0.34	0.29	0.26	0.26	0.28	0.26	0.24	0.40	0.23	0.25	0.41	0.23	0.25	0.23	0.29	0.30	0.27	0.27	0.25	0.17	0.16	0.22	-	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	
35	0.10	0.06	0.13	0.10	0.09	0.04	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01	0.09	0.05	0.02	0.10	0.03	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.01	0.01	0.02	0.18	-	0.00	<10 ⁻⁶
36	0.05	0.03	0.13	0.10	0.06	0.02	0.04	<u>0.01</u>	<u>0.01</u>	0.01	<u>0.00</u>	0.07	0.00	<u>0.01</u>	0.09	0.04	0.05	<u>0.01</u>	<u>0.01</u>	0.01	0.01	<u>0.01</u>	0.01	<u>-0.01</u>	0.00	0.01	0.20	0.02	-	<10 ⁻⁶
39	0.31	0.23	0.45	0.18	0.31	0.28	0.24	0.22	0.25	0.23	0.22	0.39	0.20	0.24	0.39	0.21	0.23	0.20	0.27	0.28	0.21	0.29	0.24	0.17	0.17	0.19	0.12	0.17	0.19	-

ANNEXE 4

Chapitre IV-A :

Analyse démo-génétique de l'établissement d'une nouvelle population dans un habitat artificiel

Annexe 4-A : Détail de la localisation des recrues d'*U. pinnatifida* nouvellement apparues dans le port de l'Aber Wrac'h (suivi de Janvier à Juillet 2008)

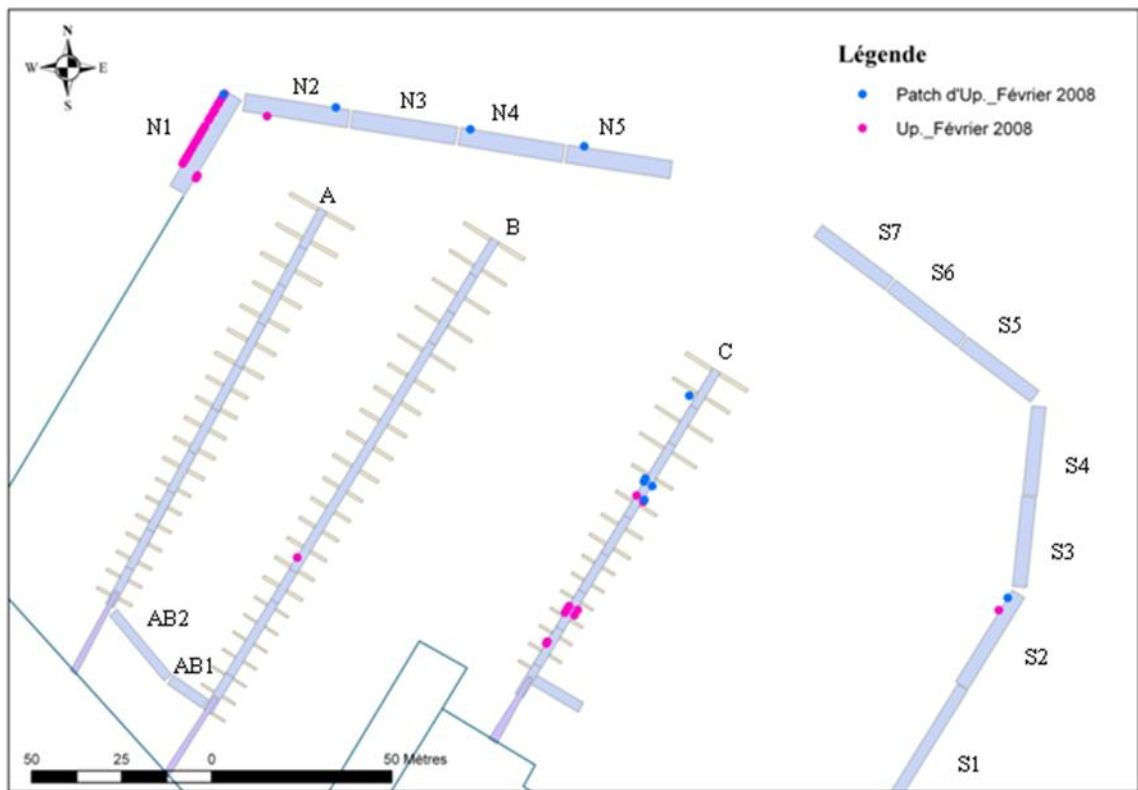
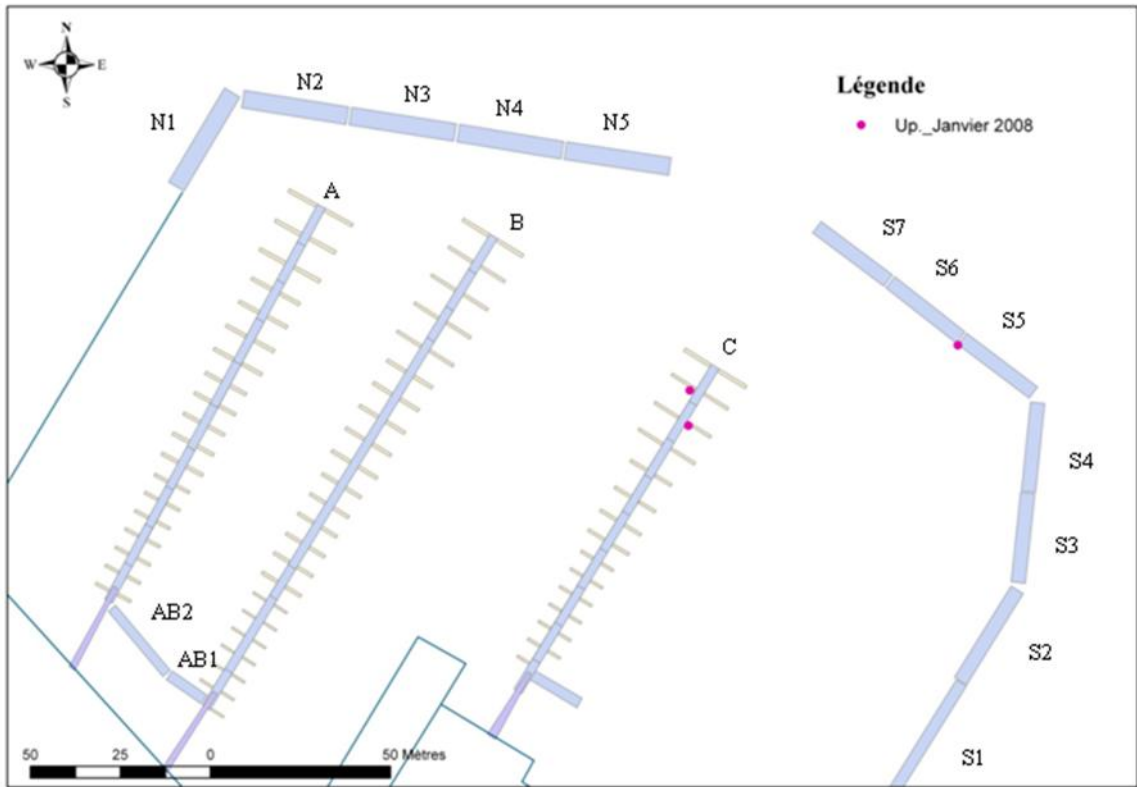
- Les six premières cartes présentées dans les pages suivantes correspondent chacune à un mois du suivi.

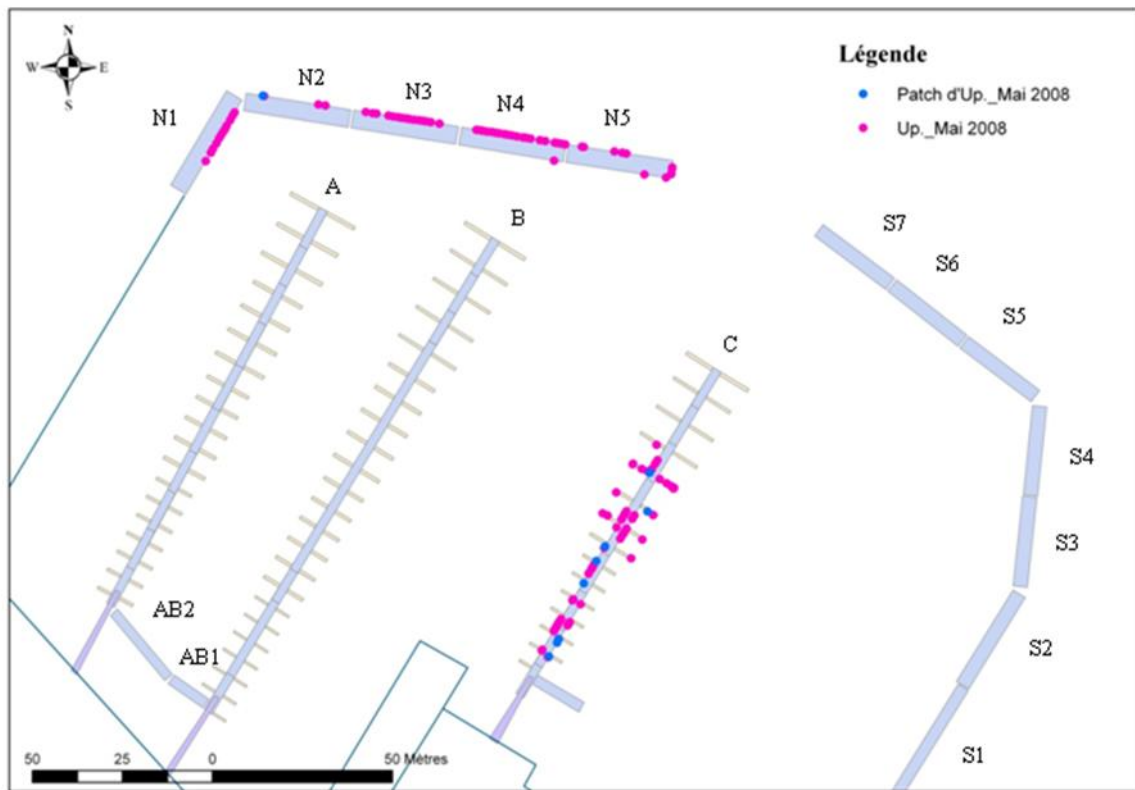
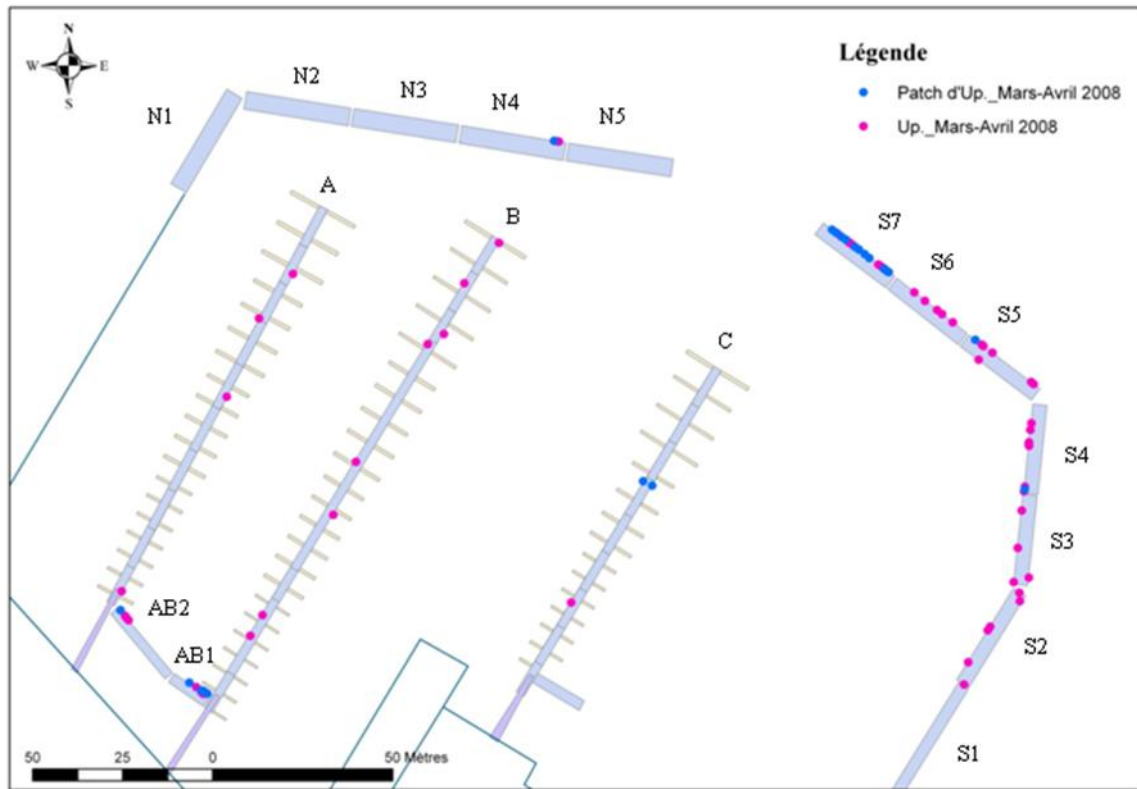
Les ronds roses indiquent des recrues d'*U. pinnatifida* isolées.

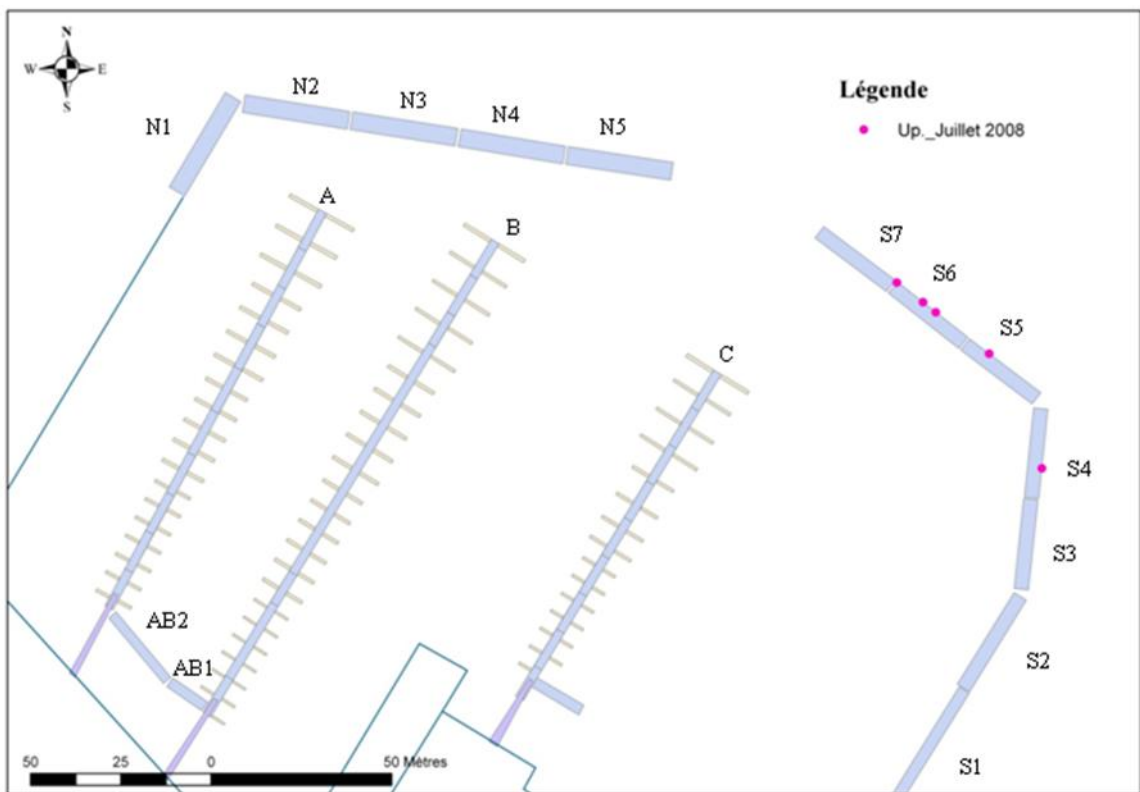
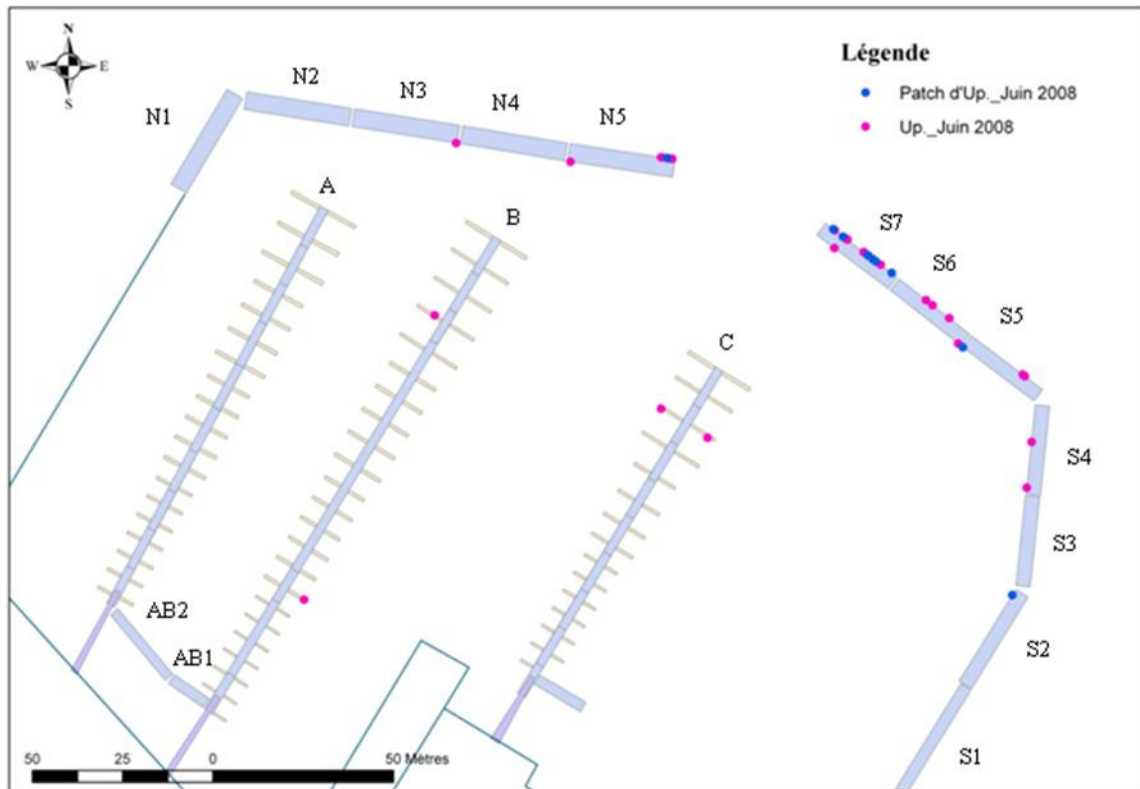
Les traits roses indiquent des zones fortement colonisés par *U. pinnatifida*.

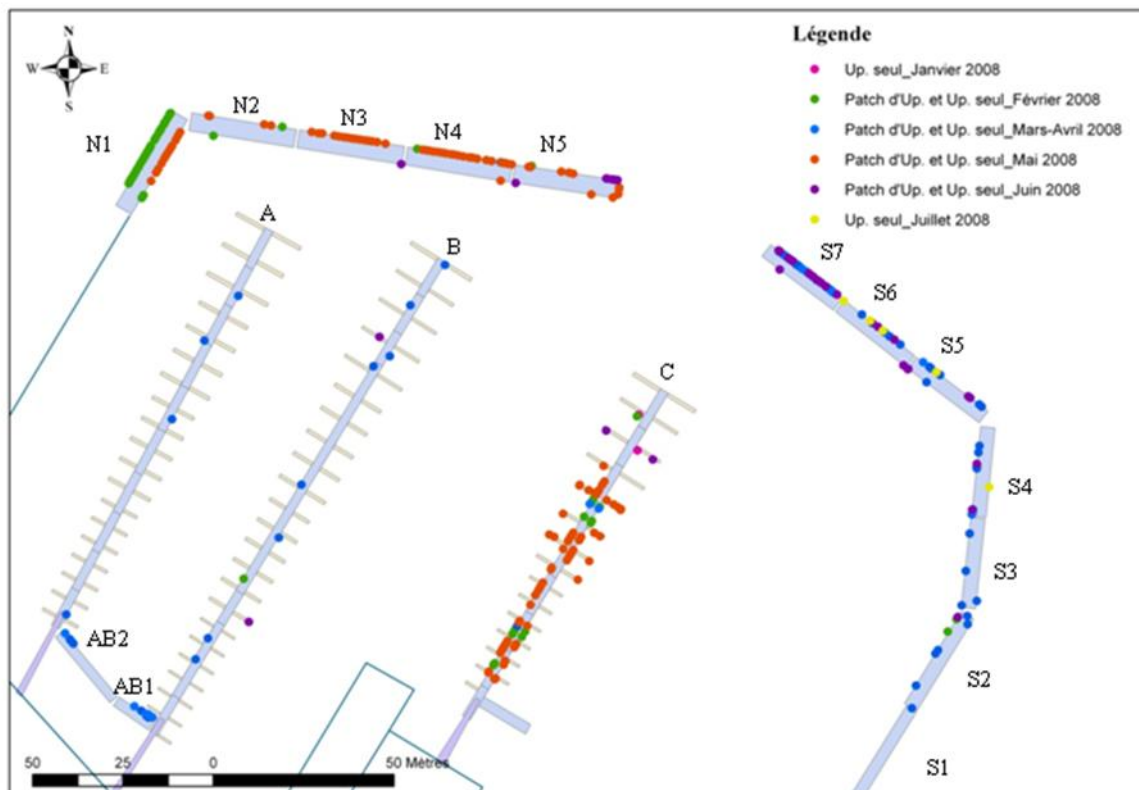
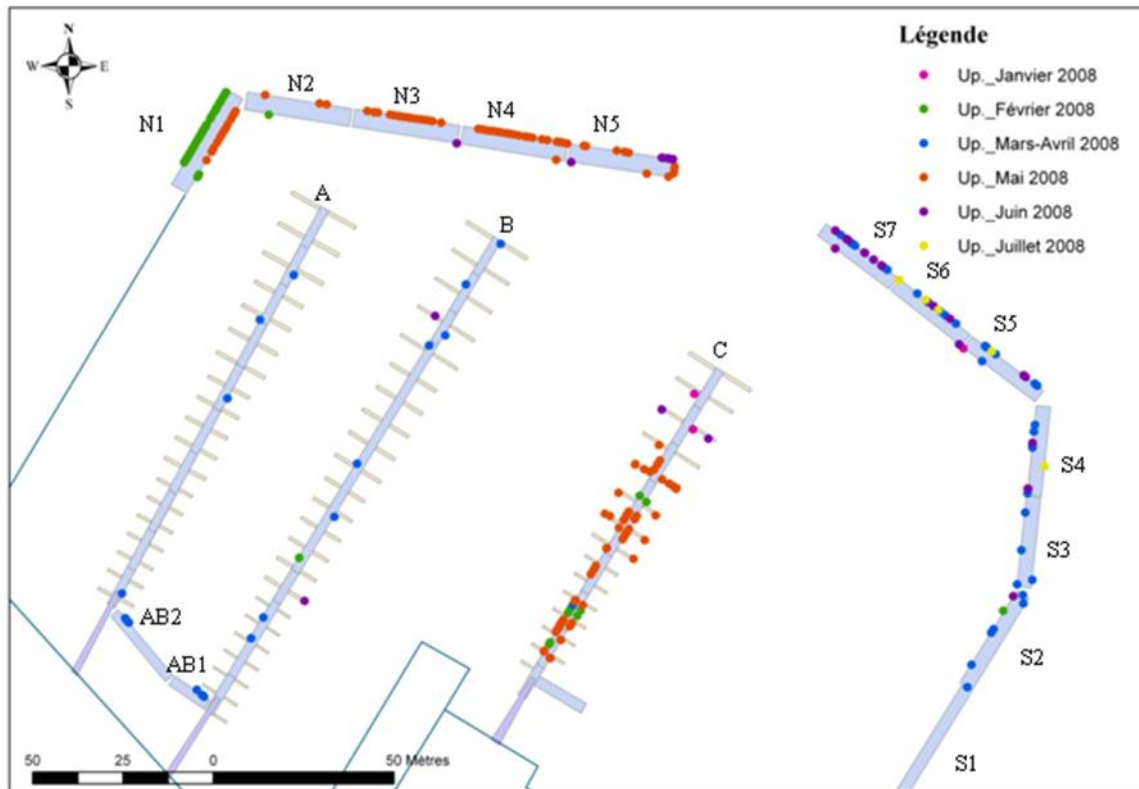
Les ronds bleus indiquent des « patchs » de recrues d'*U. pinnatifida* (*i.e.* groupe d'individus aux crampons mélangés)

- Les deux dernières cartes présentent une situation globale (cumul des 6 cartes précédentes). La carte du haut indique la relation présence-date. La carte du bas sert à distinguer les recrues isolées des « patchs ».







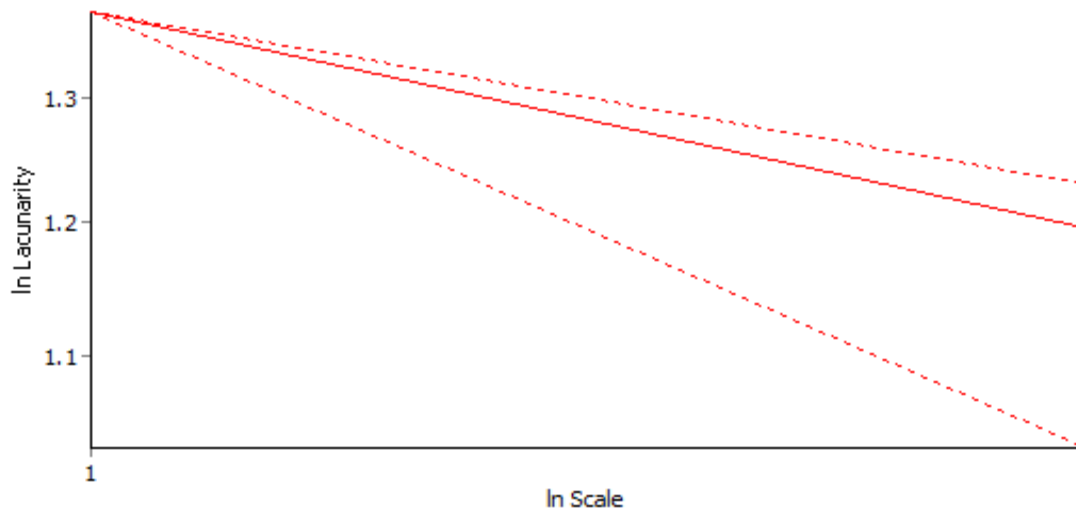


Annexe 4-B : Résultats des analyses de lacunarité

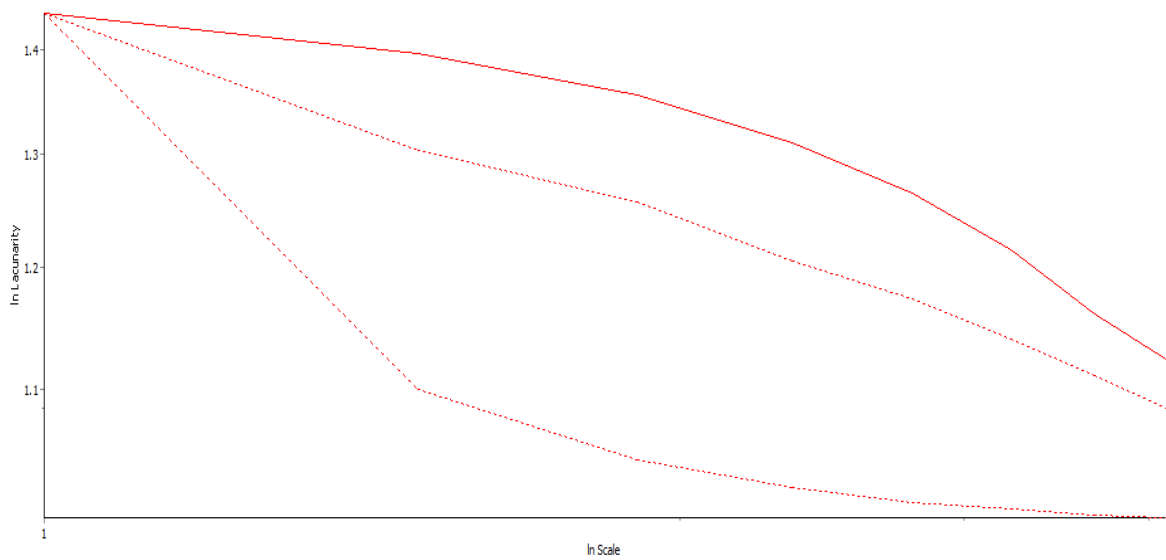
Les 10 graphiques présentés dans les pages suivantes présentent les graphes des analyses de lacunarité pour chacun des 10 transects étudiés.

Les courbes en pointillés indiquent l'enveloppe de confiance sur les résultats (en trait plein).

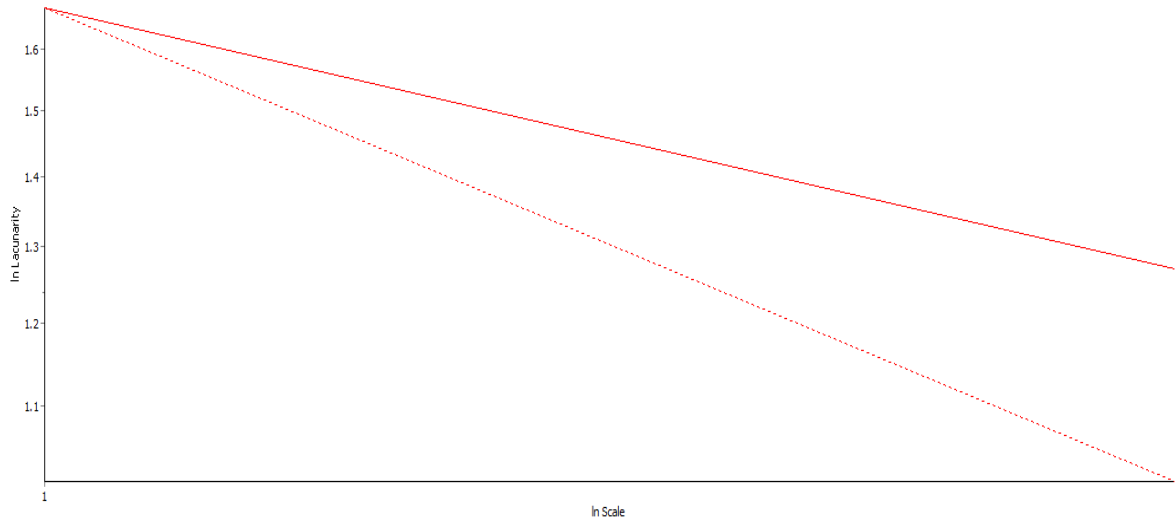
Transect A-Est & Ouest



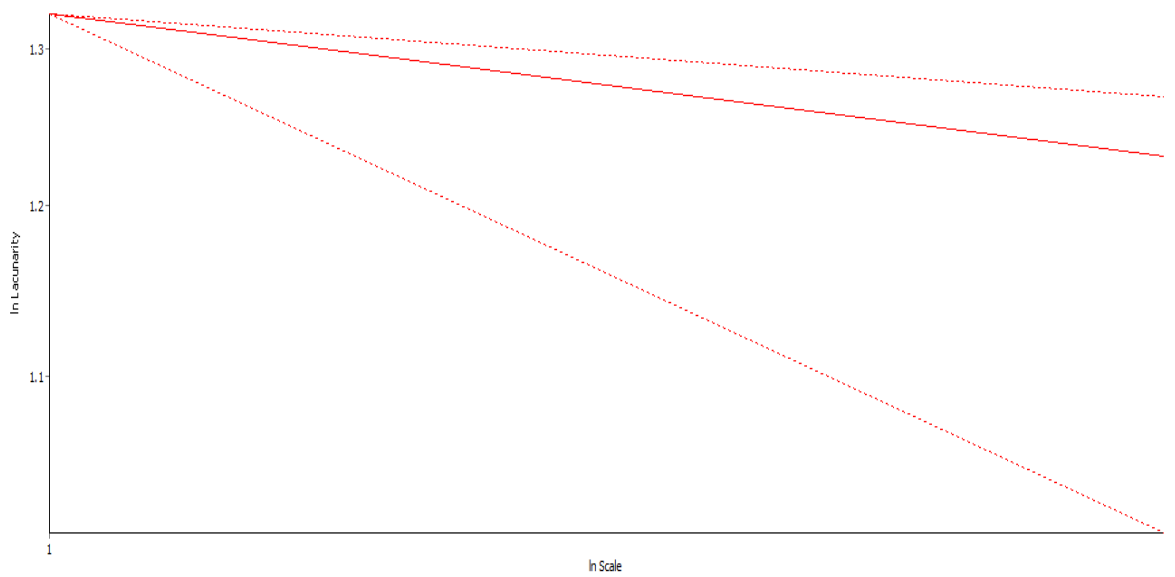
Transect AB-Nord



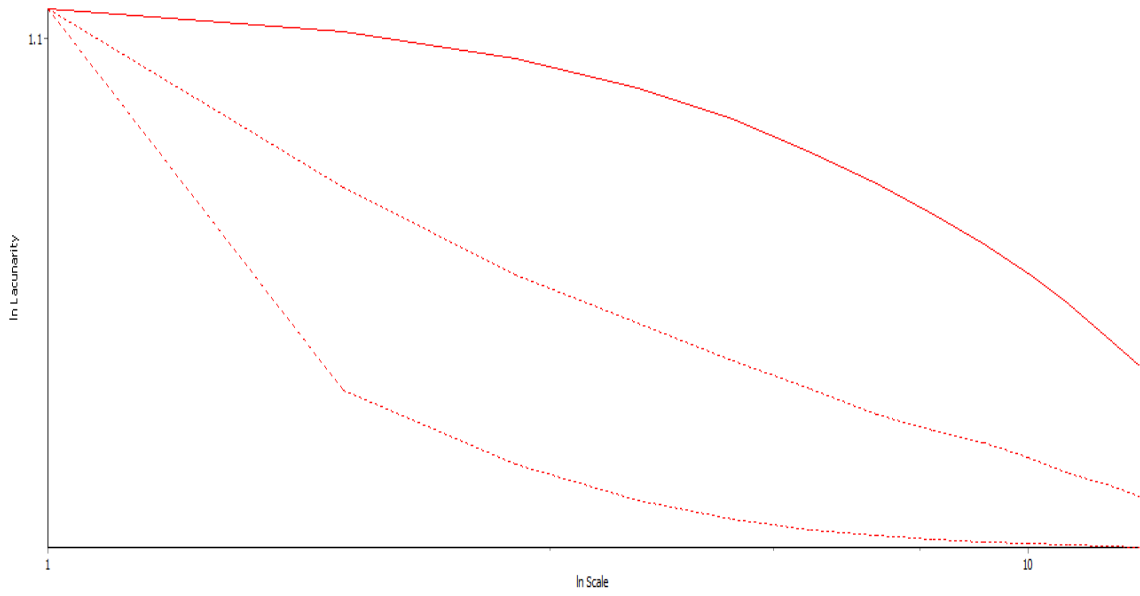
Transect B-Est



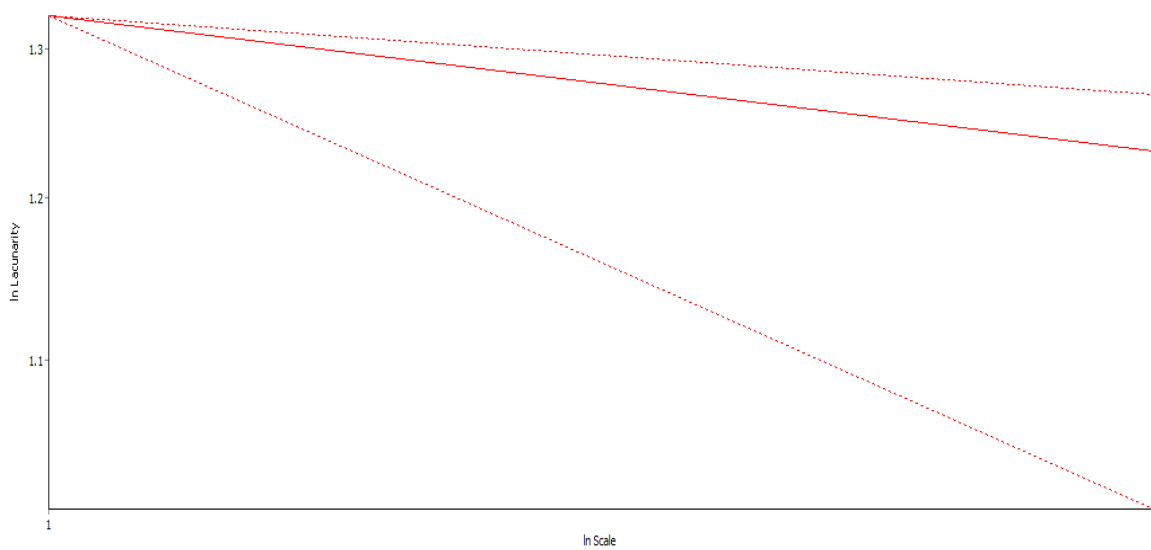
Transect B-Ouest



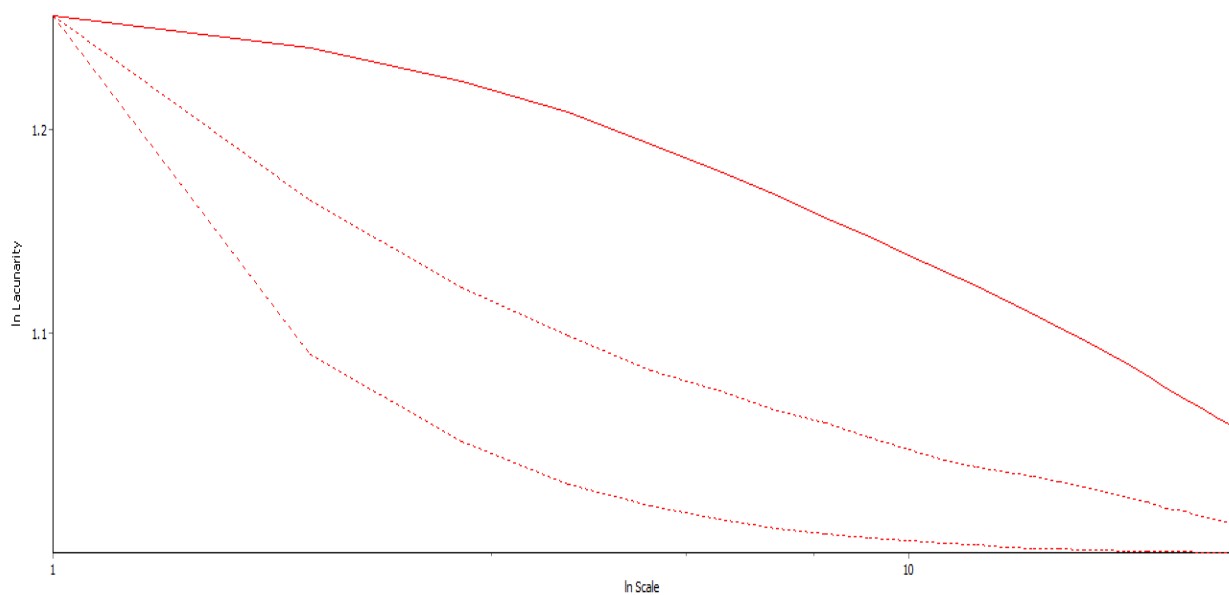
Transect C-Est



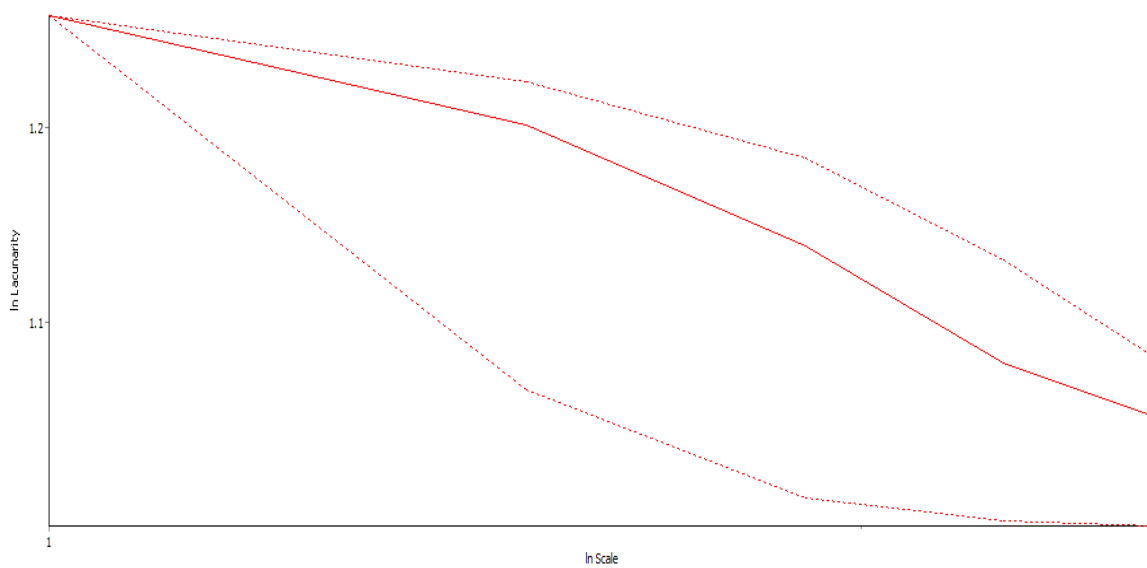
Transect C-Ouest



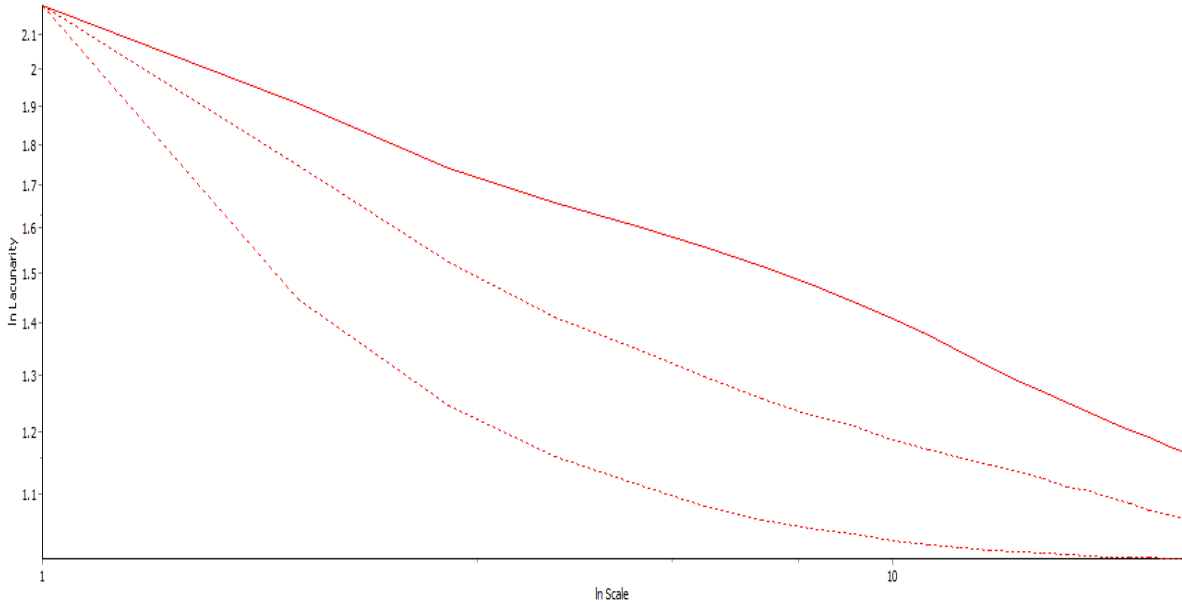
Transect Nord-Nord



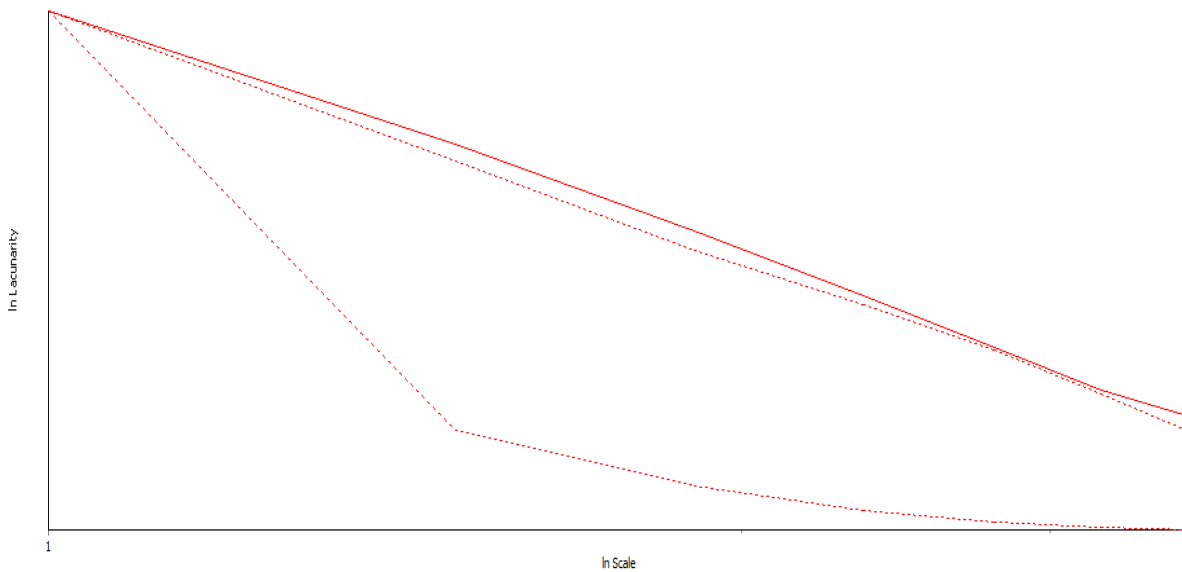
Transect Nord-Sud



Transect Sud-Nord



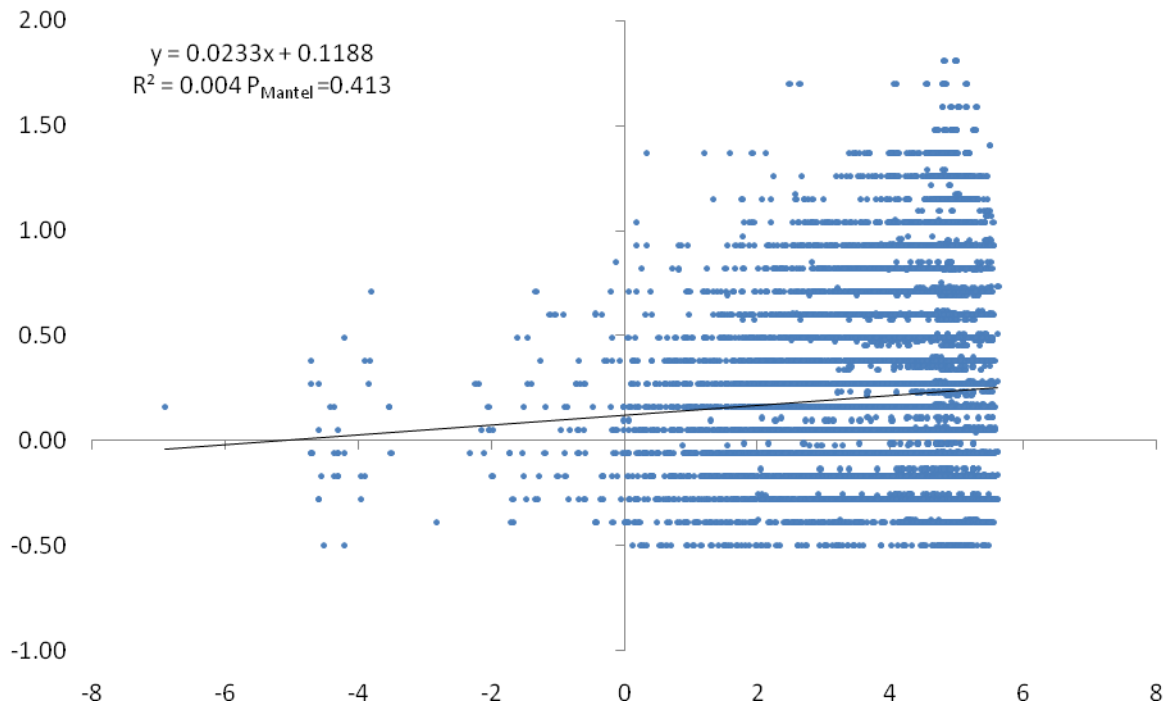
Transect Sud-Sud



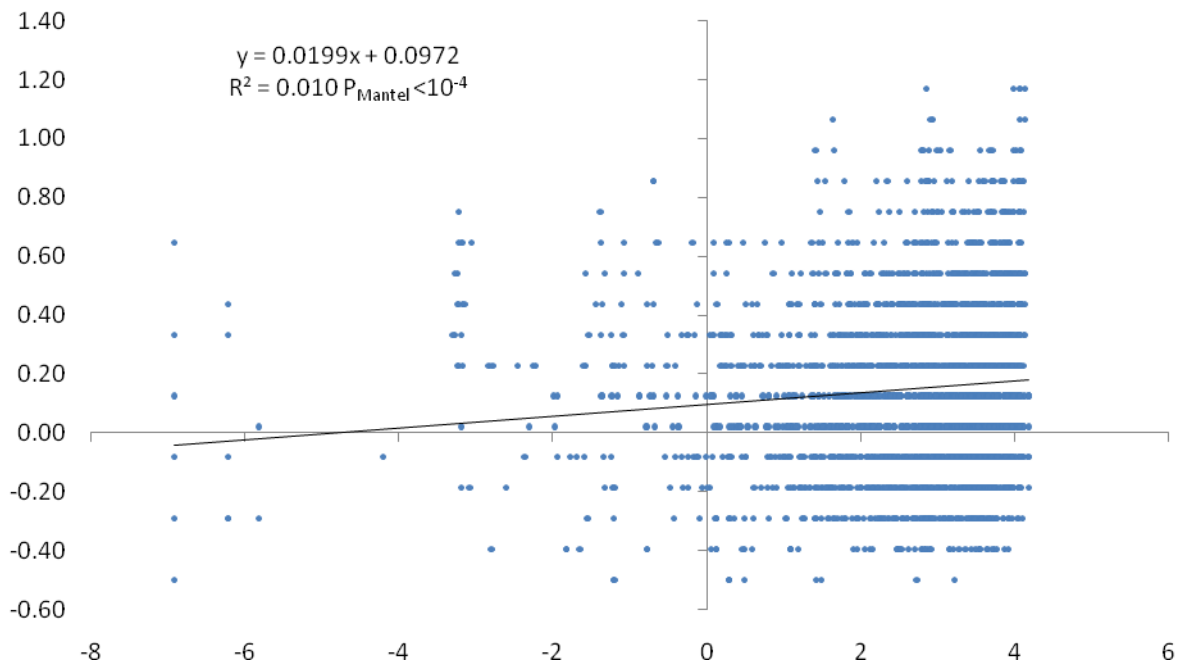
Annexe 4-C : Résultats des tests d'isolement par la distance

Les 10 graphiques représentent les résultats des isolements par la distance sur l'ensemble des individus d'Avril-Mai (219 individus) sur les trois transects les plus abondants (C, N et S) par exposition.

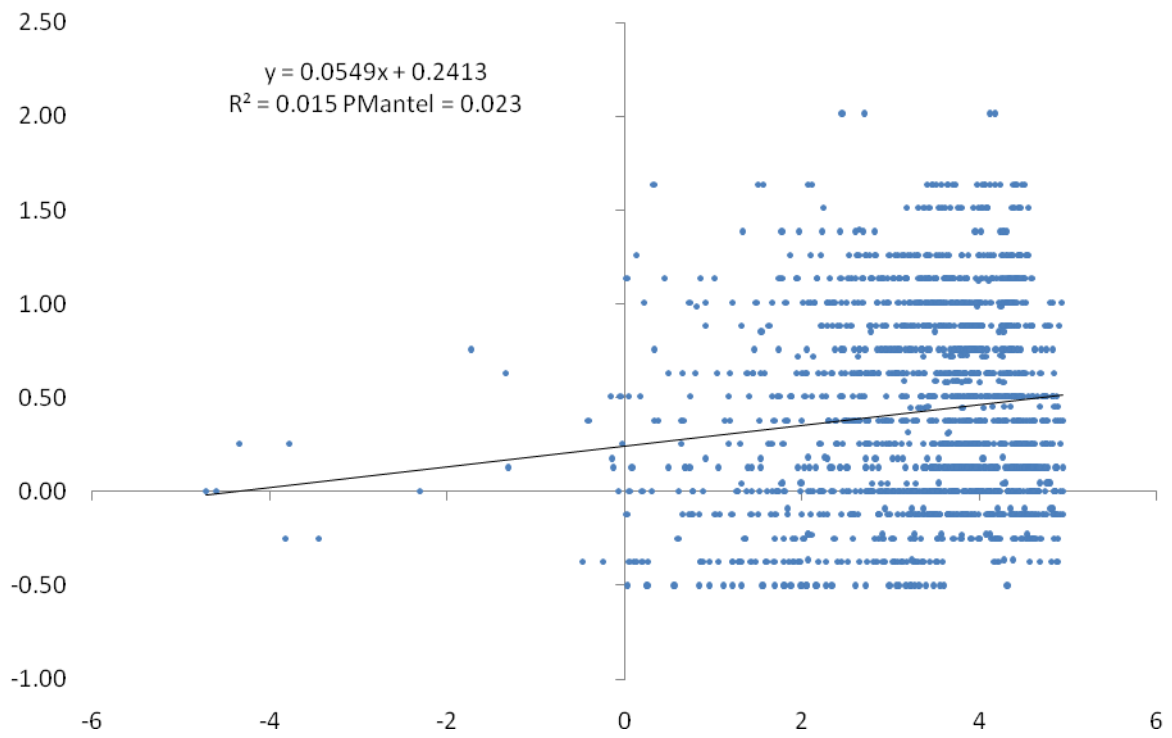
Sur tous les individus d'Avril-Mai



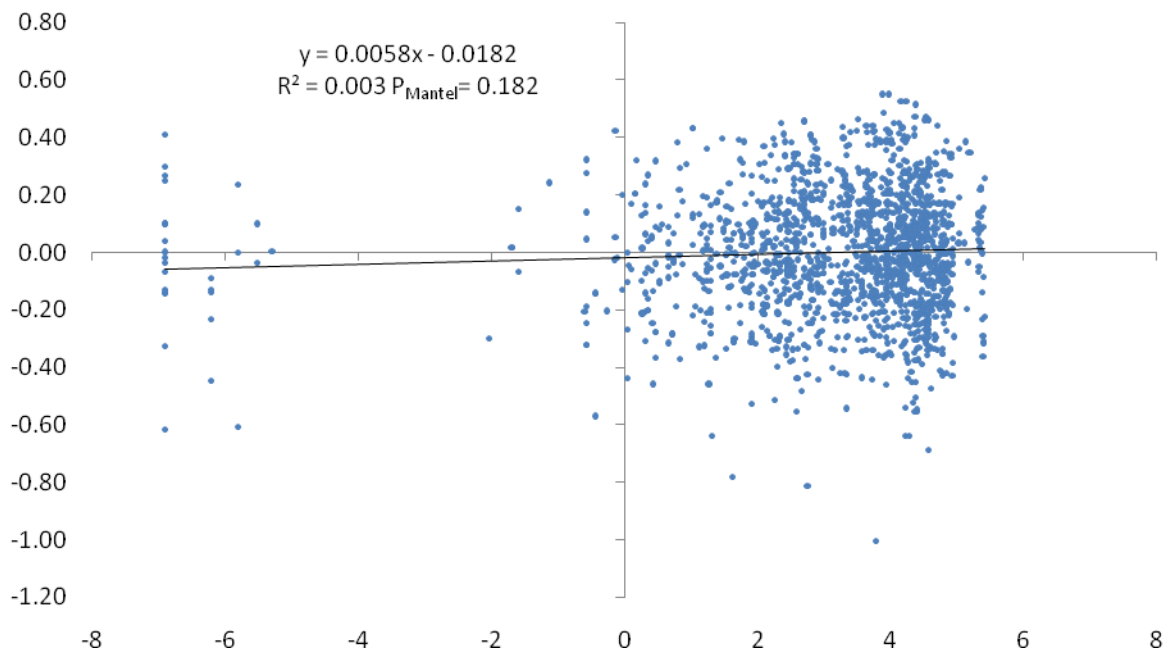
Transect C : Est & Ouest



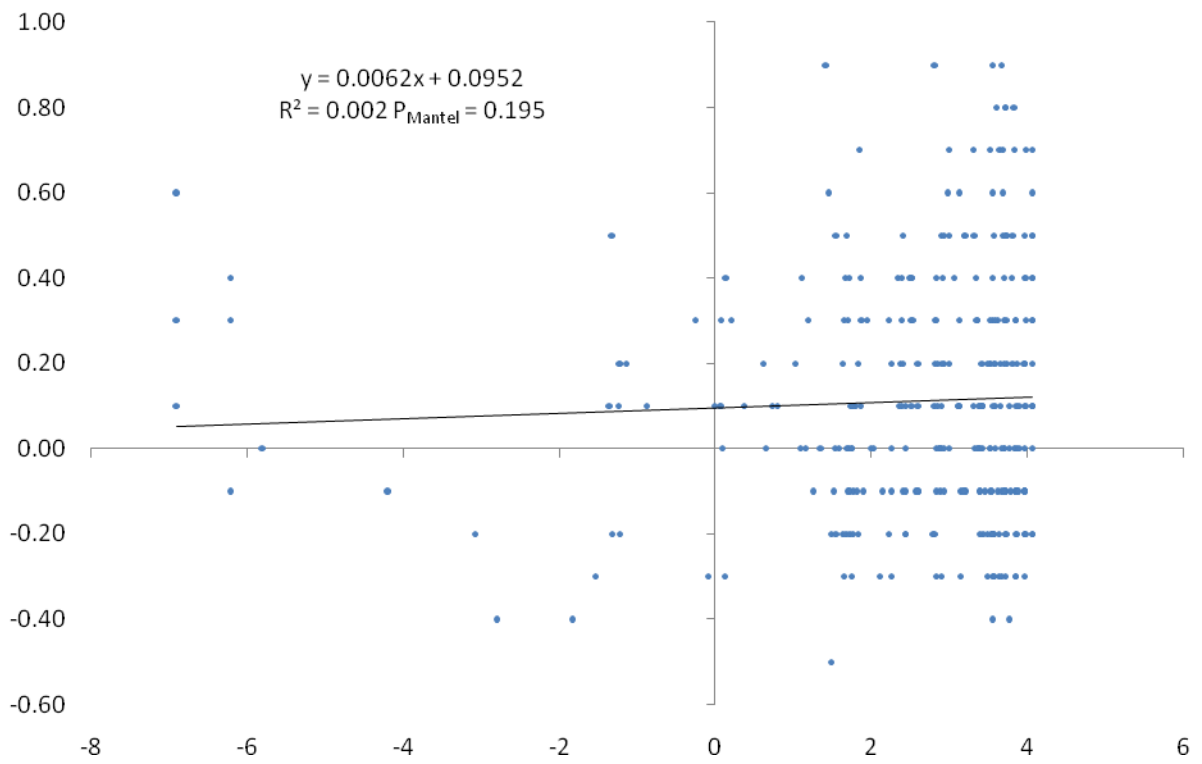
Transect Nord : Nord & Sud



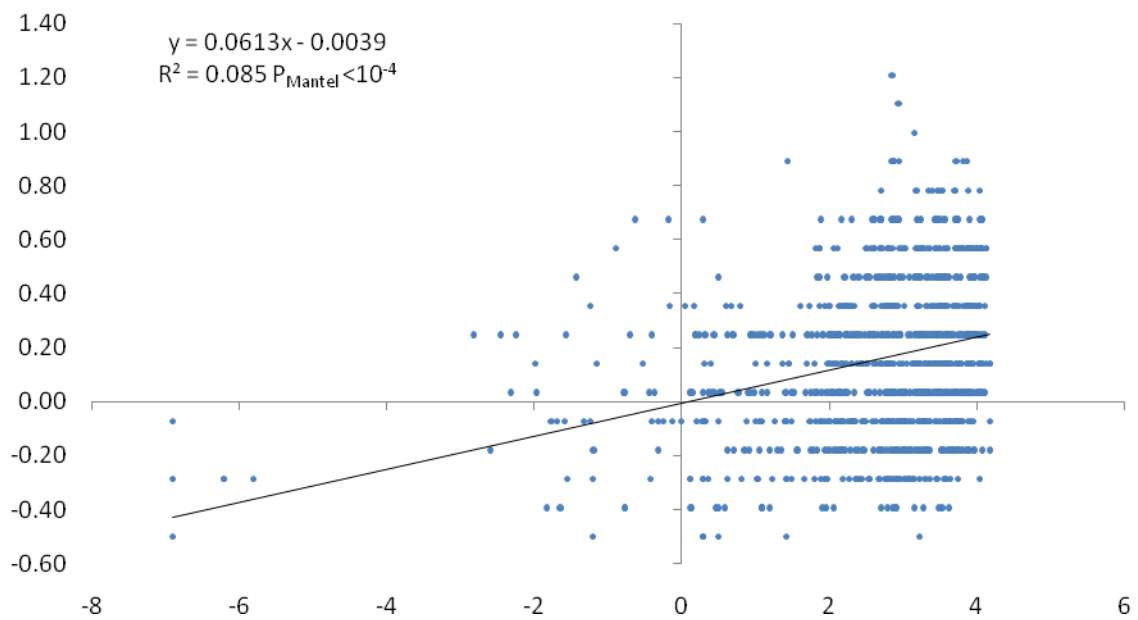
Transect Sud : Nord & Sud



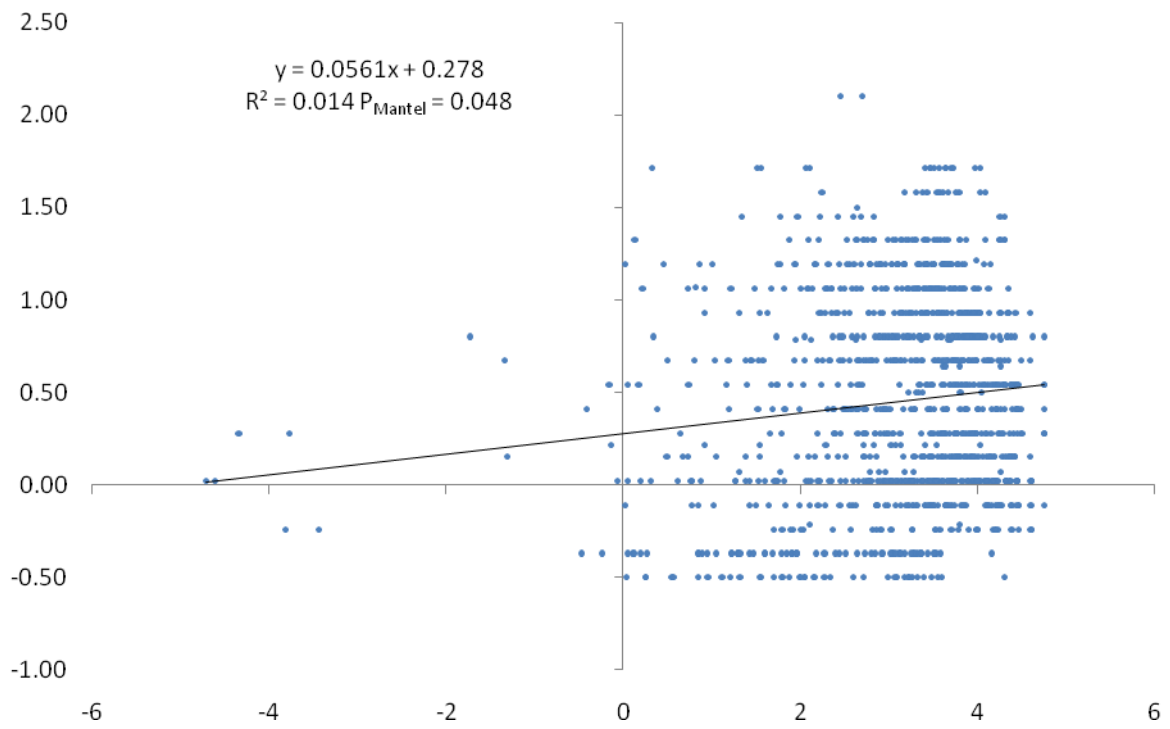
Transect C : Ouest



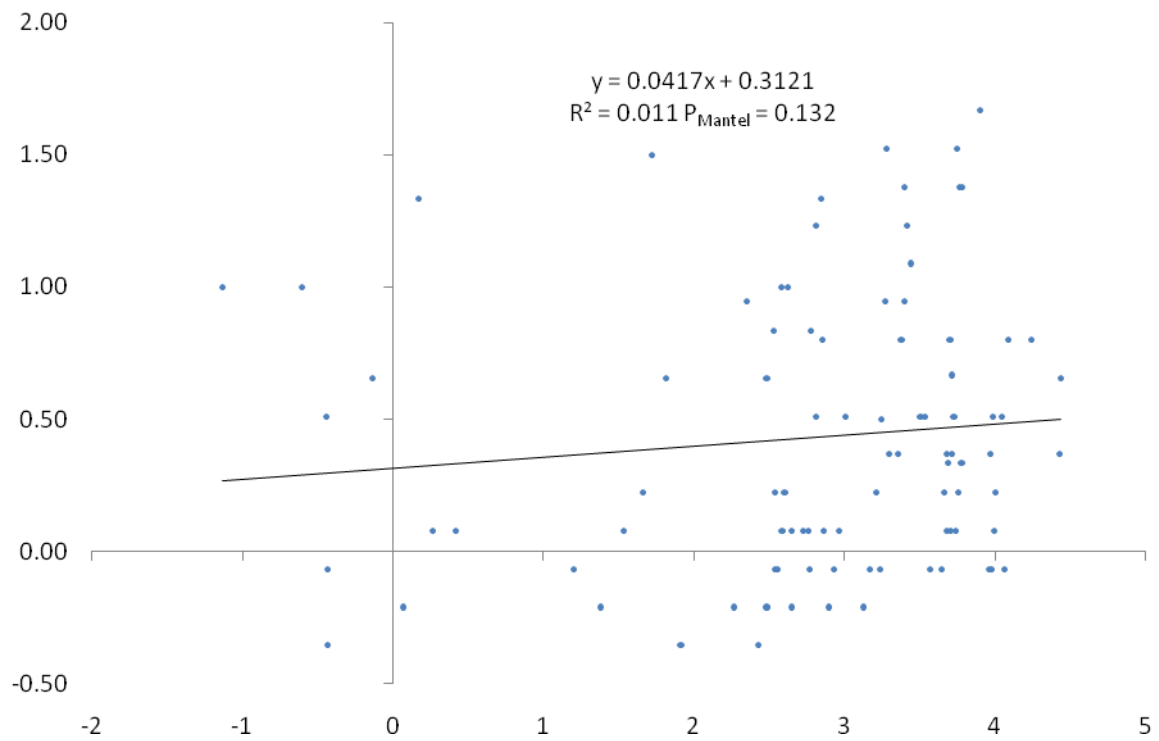
Transect C : Est



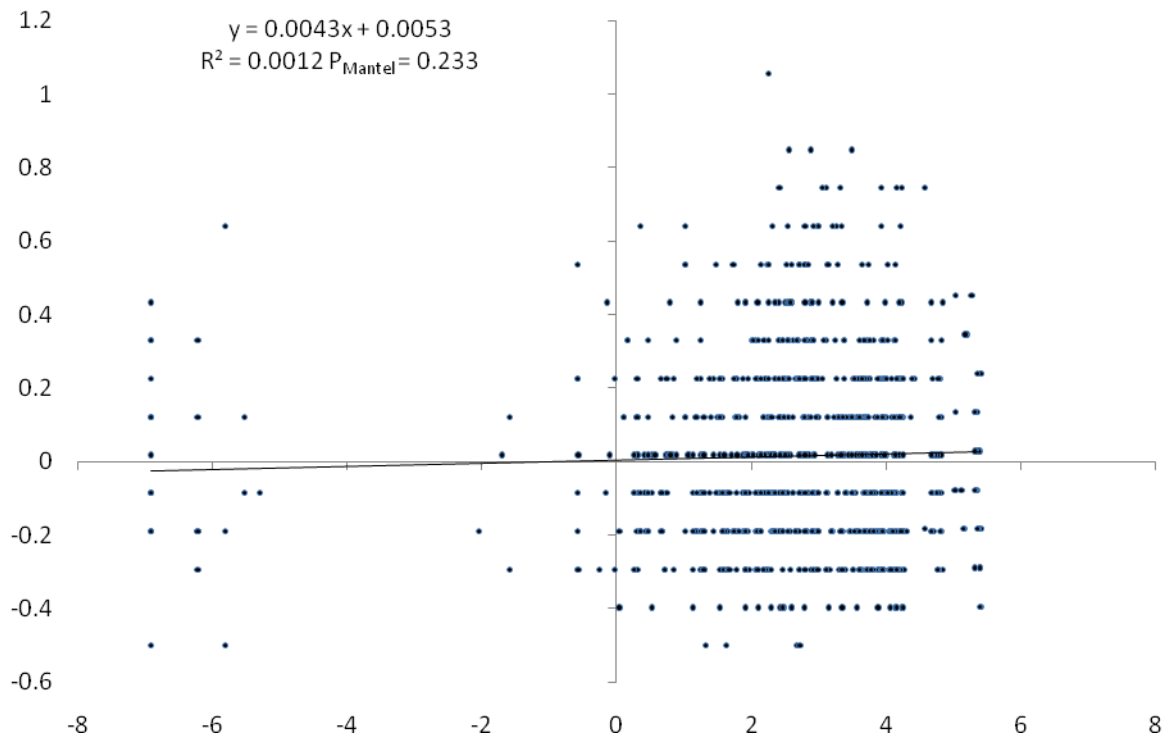
Transect Nord : Nord



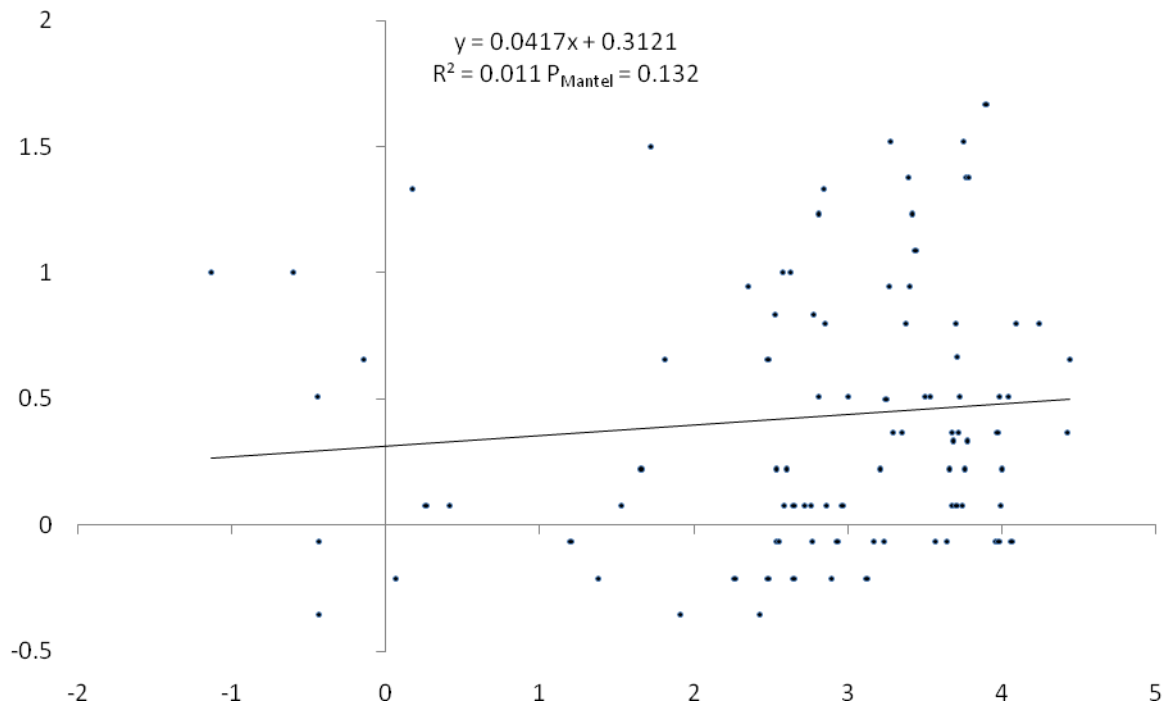
Transect Nord : Sud



Transect Sud : Nord



Transect Sud : Sud



ANNEXE 5

Chapitre IV-B :

Approche expérimentale de l'étude de la dynamique de recolonisation d'un site naturel suite à une éradication locale

Annexe 5-A : Protocole expérimental de l'expérience d'éradication/recolonisation

Au point A, le protocole expérimental détaillé exécuté dans les sites intertidaux.

Au point B, le protocole expérimental détaillé exécuté dans le site subtidal.

A) Sites intertidaux

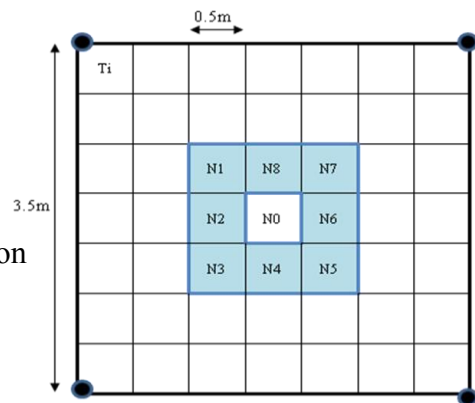
Ces échantillonnages et expérimentations ont été réalisés sur deux sites: Breac'h Ver (Aber Wrac'h) & Les Thermes (St-Malo). Ces sites sont accessibles à pied aux marées basses de vives eaux avec des coefficients de marée supérieurs à 100

Mise en place de l'expérimentation :

- Au sein d'un carré virtuel de 3.5x3.5m, on pose un cadrat central (en rose sur le dessin ci-dessous) de 1.5m*1.5m identifié par des tubes PVC et quadrillé par des ficelles afin de former 9 carrés de 0.5m*0.5m. L'ensemble des macro-algues et de la macro-faune sera enlevé sur les zones N0 à N8
- Au sein de ce même carré virtuel, les zones entourant le cadrat central destructif seront des cadrats témoins (T1 à T40). Pour visualiser les sections T1 à T40, un cadrat de 1m de côté divisé en 4 carrés (0.5m*0.5m) par une corde sera utilisé.
- L'ensemble est repéré grâce à des pitons installés de façon permanente dans la roche.

Cadrat fixe PVC maillé

Des photos des cadrats (0.5m*0.5m) avant et après l'éradication seront prises ainsi qu'un relevé de position GPS.



Opérations :

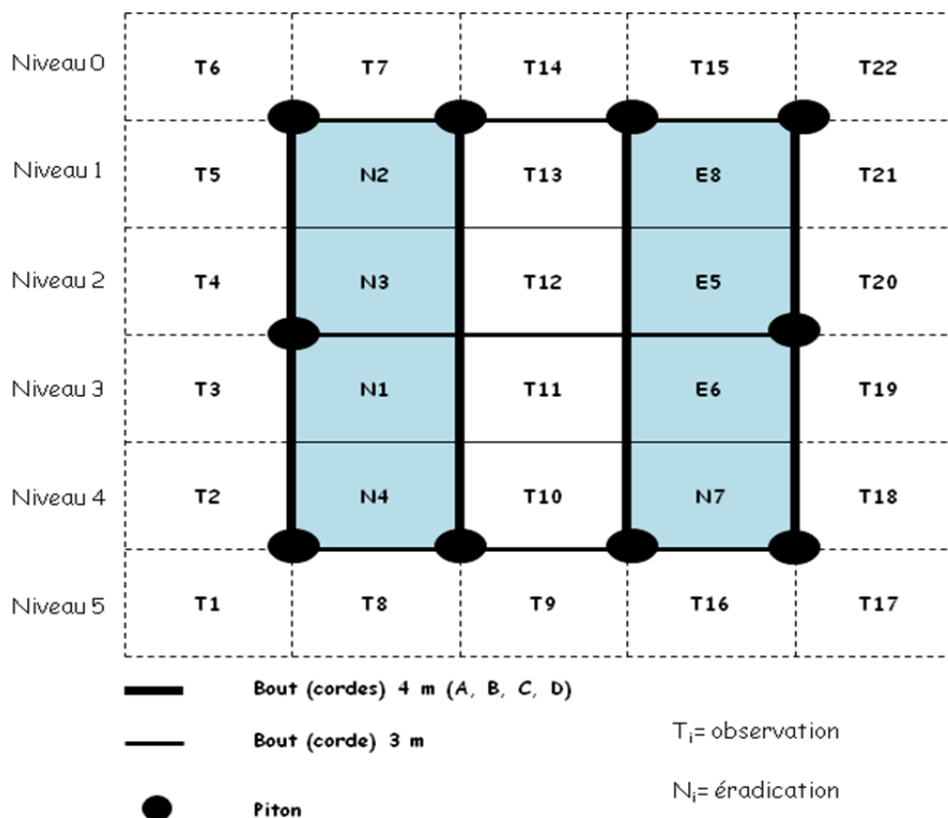
- Pour les cadrats T1 et T40: on compte le nombre d'individus d'*U. pinnatifida*. En fin d'expérience, si le temps était suffisant : les autres laminaires étaient comptées; des mesures de taille des individus d'*U. pinnatifida* étaient réalisées ; une observation /description succincte du cadrat est faite.
- Pour les cadrats destructifs N0 à N8 : la flore (macro-algues) est récoltée et conservée dans un sac à petite maille (type « sacs à pomme de terre » doublés) numérotés. La macro-faune (en particulier les brouteurs) est récoltée dans des flacons en plastiques numérotés de N0 à N8. A la fin de la récolte d'un cadrat de 0.5m*0.5m, le flacon numéroté est mis dans le sac de flore associée afin d'avoir un identifiant et de limiter les risques de perte de la macro-faune

B) Site subtidal :

Cette expérience a été réalisée sur un site subtidal: La Grande Conchée à St-Malo (voir Chapitre 2 ; Figure II.1). Ce site est uniquement accessible par zodiac et l'expérience a été effectuée en plongée.

Mise en place de l'expérimentation :

Nous avons procédé de la même manière que sur les sites intertidaux mais les deux zones d'éradication forment des couloirs de 1 m de large séparés en 4 parties (N1 à N8) ont été créés et des couloirs témoins de 1m entourant les zones d'éradication ont été suivis.



Opérations :

- Pour les cadrats T1 à T22: on compte le nombre d'individus d'*U. pinnatifida*. En fin d'expérience, si le temps était suffisant : les autres laminaires étaient comptées.
- Pour les cadrats destructifs N1 à N8: la flore (macro-algues) a été récoltée (type « sacs à pomme de terre » doublés) numérotés. La macro-faune (en particulier les brouteurs) est récoltée dans des flacons en plastiques numérotés d'N1 à N8. A la fin de la récolte d'un cadrat de 1m*1m, le flacon numéroté est mis dans le sac de flore associée afin d'avoir un identifiant et de limiter les risques de perte de la macro-faune

Annexe 5-B : Présentation du dispositif d'éradication/recolonisation au sein des deux sites intertidaux

Chaque photo représente le dispositif d'éradication (9 cadrats centraux) dans les deux sites intertidaux : Breac'h Ver (à gauche) et Rocher des Thermes (à droite) avant et après éradication et puis pour les 4-5 observations selon le site d'étude.

Rappel des dates d'observations:

Opération	Date
Eradication	Mars-Avril 2007
1 ^{ère} observation	Septembre 2007
2 ^{ème} observation	Mars 2008
3 ^{ème} observation	Septembre 2008
4 ^{ème} observation	Mars 2009
5 ^{ème} observation	Septembre 2009

Les photos de la 3^{ème} observation ne sont plus disponibles (perte des photos).

Breac'h Ver

Rocher des Thermes

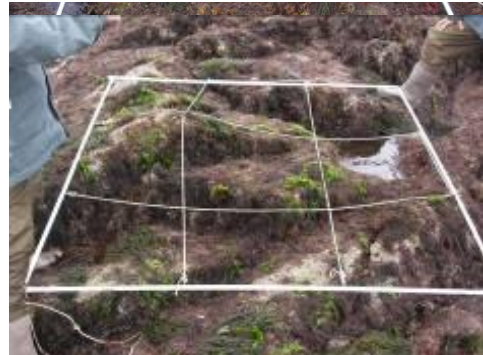
Avant l'éradication



Après l'éradication



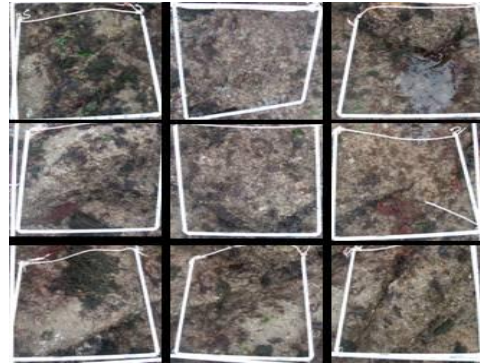
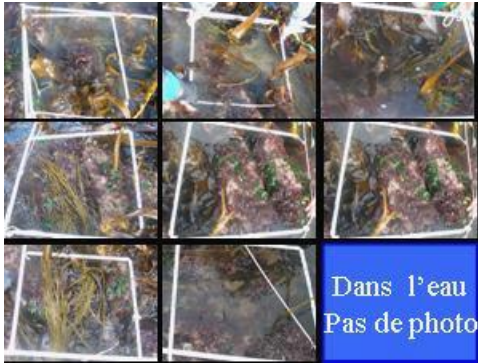
1^{ère} Observation



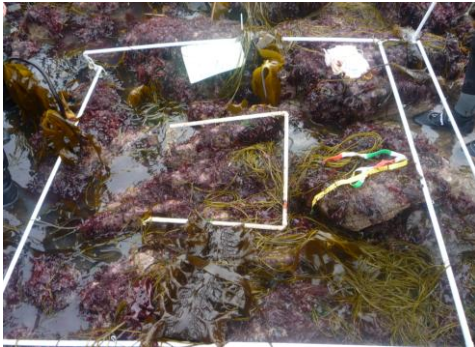
Breac'h Ver

Rocher des Thermes

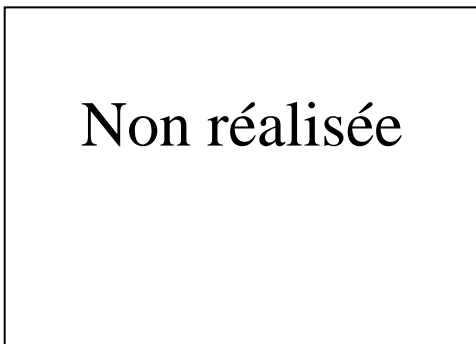
2^{ème} Observation



4^{ème} Observation



5^{ème} Observation



Annexe 5-C : Présentation du dispositif d'éradication/recolonisation au sein du site subtidal

Chaque photo représente le dispositif mis en place sur un tombant au site de la Grande Conchée à St-Malo : avant et après éradication suivi de la première observation.

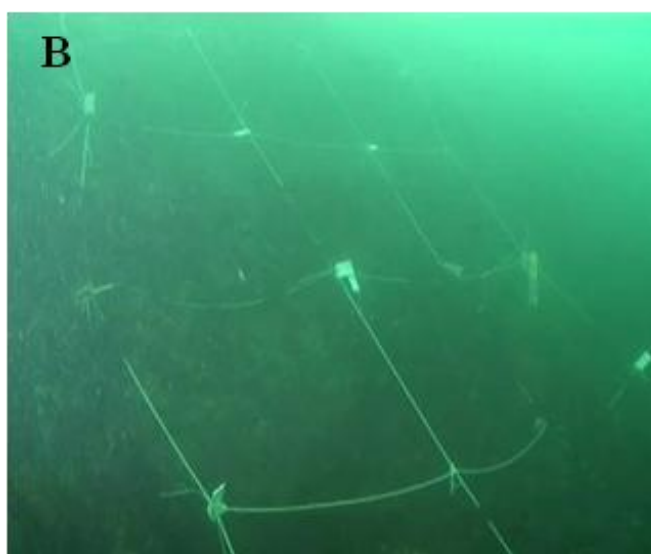
Rappel des dates d'observations:

Opération	Date
Eradication	Mai 2007
1 ^{ère} observation	Septembre 2007
2 ^{ème} observation	Mars 2008

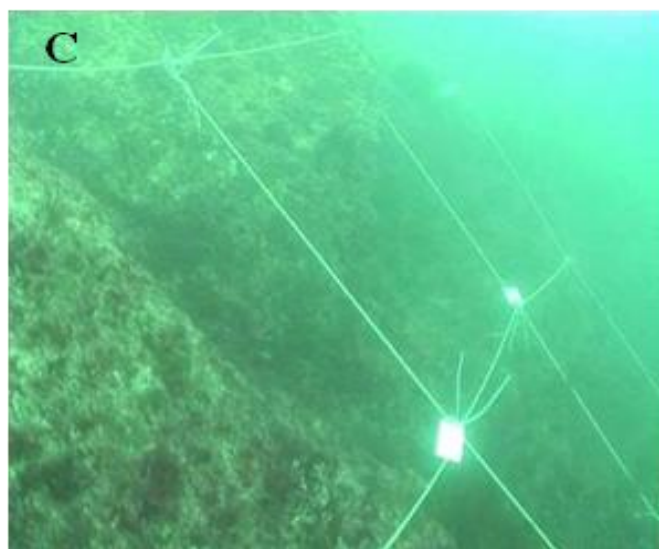
Localisation du site vu
depuis la surface



Dispositif en cours
d'éradication



Dispositif après
éradication



Annexe 5-D : Inventaire qualitatif global de la faune et de la flore réalisée lors de l'expérience d'éradication sur les trois sites réalisés

Dans le tableau est présentée la liste d'espèces observée lors de l'éradication dans les trois sites. Les noms des espèces écrites en rouge sont des espèces introduites.

Macroalgues	BV	TH	GC	Faune	BV	TH	GC
Heterokontophyta				Crustacea			
<i>Undaria pinnatifida</i>	X	X	X	<i>Necora puber</i>	X		
<i>Himanthalia elongata</i>	X		X	<i>Pilumnus hirtellus</i>	X		X
<i>Laminaria digitata</i>	X		X	<i>Galathea squamifera</i>	X		
<i>Saccharina latissima</i>	X			<i>Anapagurus hyndmanni</i>	X		
<i>Laminaria ochroleuca</i>	X		X	Mollusca			
<i>Dictyota dichotoma</i>		X		<i>Crepidula fornicata</i>		X	X
<i>Fucus serratus</i>		X	X	<i>Patella vulgata</i>		X	X
<i>Sargassum muticum</i>		X		<i>Gibbula cineraria</i>	X		
<i>Saccorhiza polyschides</i>	X		X	<i>Calliostoma zizyphinum</i>	X	X	
<i>Colpomenia peregrina</i>		X		<i>Gibbula pennanti</i>	X		
<i>Halopteris filicina</i>	X		X	<i>Nassarius incrassatus</i>	X		X
Rhodophyta				<i>Trivia monacha</i>	X		
<i>Lomentaria articulata</i>	X	X	X	<i>Ocenebra erinacea</i>	X		
<i>Chondrus crispus</i>	X	X	X	<i>Littorina obtusata</i>	X		
<i>Osmundea pinnatifida</i>	X	X	X	<i>Diodora graeca</i>	X		
<i>Chondrocanthus acicularis</i>	X	X		<i>Haliotis tuberculata</i>	X		
<i>Petrocelis cruenta</i>	X	X	X	<i>Nucella lapilus</i>			X
<i>Gelidium latifolium</i>	X	X		<i>Mytilus edulis</i>			X
<i>Cryptopleura ramosa</i>		X	X	<i>Crassostrea gigas</i>		X	
<i>Plocamium cartilagineum</i>	X		X	Echinodermata			
<i>Callophyllis laciniata</i>	X			<i>Ophiothrix fragilis</i>	X		
<i>Calliblepharis jubata</i>	X	X	X	<i>Luidia ciliaris</i>	X		
<i>Gastroclonium ovatum</i>	X	X	X	<i>Asterina gibbosa</i>	X		
<i>Furcellaria lumbricalis</i>	X	X		Tunicata			
<i>Dilsea carnosa</i>		X		<i>Botrylus schlosseri</i>		X	
<i>Palmaria palmata</i>	X		X	<i>Cliona ovata</i>		X	
<i>Apoglossum ruscifolium</i>	X			<i>Aplidium punctatum</i>		X	X
<i>Hypoglossum woodwardii</i>	X			<i>Ascidia mentula</i>	X		
<i>Kallymenia reniformis</i>	X			Cnidaria			
<i>Polysiphonia elongata</i>		X		<i>Anemonia viridis</i>	X		
<i>Polyneura bonnemaisonii</i>	X			Bryozoa			
<i>Halopteris scoparia</i>		X		<i>Electra pilosa</i>	X		
<i>Heterosiphonia plumosa</i>	X			Vertebrata			
<i>Ceramium sp.</i>	X		X	<i>Lepadogaster sp.</i>	X		
<i>Corallina sp.</i>	X	X	X	<i>Gobius sp.</i>	X		
<i>Lithophyllum incrustans</i>	X			Annelida			
Chlorophyta				<i>Potamoceros lamarcki</i>		X	
<i>Porphyra umbilicalis</i>		X		Sessilia			
<i>Codium fragile ssp. tomenoides</i>		X	X	<i>Balanus perforatus</i>		X	X
<i>Ulva sp.</i>	X	X	X	<i>Elminus modestus</i>			X

Annexe 5-E : Inventaire quantitatif du nombre *d'U. pinnatifida* au sein des trois sites

Dans les figures suivantes, pour les trois sites d'études, la répartition *d'U. pinnatifida* au sein des cadrats d'éradication et témoins est représentée.

Site intertidal: Balise du Breac'h Ver

Vue du dispositif avant éradication : Mars 2007

T9	T8	T6	T4	T1	T12	T13
	1 UP	1 UP				
T10	T7	T5	T3	T2	T11	T14
			1 UP			1 UP
T20	T19	N6	N7	N0	T15	T16
	1 UP	8 UP	2 UP	2 UP		
T21	T22	N3	N1	N5	T17	T18
	1 UP		11 UP	2 UP		
T24	T23	N4	N2	N8	T15	/
		3 UP		3 UP		
T27	T28	T31	T32	/	/	/
T26	T25	T30	T29	/	/	/
1 UP						

Légende :

En rose est indiqué le nombre d'*U. pinnatifida* par cadrats

Cad rats éradiqués : N0 à N8

Cad rats Témoins : T1 à T40

Les / représentent les cad rats non observés durant l'expérience par manque de temps
Les 0 représentent les cad rats où seuls les individus d'*U. pinnatifida* sont comptés

1^{ère} observation : fin Septembre 2007

	T8	T6	T4	T1	T12	T13
			2 UP		1 UP	2 UP
T10	T7	T5	T3	T2	T11	T14
	1 UP	2 UP	1 UP		3 UP	
T20	T19	N6	N7	N0	T15	T16
	1 UP	4 UP	1 UP	3 UP	2 UP	
T21	T22	N3	N1	N5	T17	T18
	3 UP	5 UP	10 UP	6 UP	1 UP	1 UP
T24	T23	N4	N2	N8	/	/
1 UP	1 UP	1 UP	1 UP	3 UP		
T27	T28	T31	T32	/	/	/
T26	T25	T30	T29	/	/	/

2^{ème} Observation : Mars 2008

T9	T8	T6	T4	T1	T12	T13
2 UP	1 UP			1 UP		
T10	T7	T5	T3	T2	T11	T14
2 UP	1 UP					
T20	T19	N6	N7	N0	T15	T16
2 UP					2 UP	
T21	T22	N3	N1	N5	T17	T18
		2 UP	4 UP			
T24	T23	N4	N2	N8	T40	T39
		6 UP	1 UP	1 UP	1 UP	
T27	T28	T31	T32	T33	T37	T38
0	0	0	0			
T26	T25	T30	T29	T34	T35	T36
0	0	0				

Site intertidal : Balise du Breac'h Ver

3^{ème} observation : Septembre 2008

T9	T8	T6	T4	T1	T12	T13
T10	T7	T5	T3	T2	T11	T14
T20	T19	N6	N7	N0	T15	T16
T21	T22	N3	N1	N5	T17	T18
T24	T23	N4	N2	N8	/	/
T27	T28	T31	T32	/	/	/
T26	T25	T30	T29	/	/	/

Légende :

En rose est indiqué le nombre d'*U. pinnatifida* par cadrats

Cadrats érodés : N0 à N8

Cadrats Témoins : T1 à T40
 Les / représentent les cadrats non observés durant l'expérience par manque de temps
 Les 0 représentent les cadrats où seuls les individus d'*U.pinnatifida* sont comptés

4^{ème} observation : Mars 2009

T9	T8	T6	T4	T1	T12	T13
T10	T7	T5	T3	T2	T11	T14
T20	T19	N6	N7	N0	T15	T16
T21	T22	N3	N1	N5	T17	T18
T24	T23	N4	N2	N8	/	/
T27	T28	T31	T32	/	/	/
T26	T25	T30	T29	/	/	/

5^{ème} Observation : Septembre 2009

T9	T8	T6	T4	T1	T12	T13
T10	T7	T5	T3	T2	T11	T14
T20	T19	N6	N7	N0	T15	T16
T21	T22	N3	N1	N5	T17	T18
T24	T23	N4	N2	N8	T40	T39
T27	T28	T31	T32	T33	T37	T38
T26	T25	T30	T29	T34	T35	T36

Site intertidal: Rocher des Thermes Marins

Vue du dispositif avant éradication : mi-Avril 2007

T31	T30	T33	T35	T37	T39	T41
2 UP	2 UP	2 UP	2 UP	2 UP	2 UP	2 UP
T25	T26	T32	T34	T36	T38	T40
1 UP						
T27	T28	N1	N8	N7	T19	T20
			3 UP		2 UP	
T23	T24	N2	N0	N6	T17	T18
			2 UP	1 UP	1 UP	1 UP
T22	T21	N3	N4	N5	T15	T16
2 UP	2 UP	1 UP	3 UP	1 UP	1 UP	1 UP
T1	T2	T5	T7	T9	T11	T13
4 UP	4 UP	4 UP	1 UP	1 UP	3 UP	1 UP
T3	T4	T6	T8	T10	T12	T14
1 UP	3 UP	1 UP	2 UP	1 UP	1 UP	2 UP

Légende :

En rose est indiqué le nombre d'U. pinnatifida par cadrats

Cadrats érodés : N0 à N8

Cadrats Témoins : T1 à T41 (pas de T29)

1^{ère} observation : fin Septembre 2007

T31	T30	T33	T35	T37	T39	T41
T25	T26	T32	T34	T36	T38	T40
				1 UP		
T27	T28	N1	N8	N7	T19	T20
			1 UP			
T23	T24	N2	N0	N6	T17	T18
			1 UP			
T22	T21	N3	N4	N5	T15	T16
			1 UP			
T1	T2	T5	T7	T9	T11	T13
T3	T4	T6	T8	T10	T12	T14
				1 UP		

2^{ème} Observation : début Mars 2008

T31	T30	T33	T35	T37	T39	T41
T25	T26	T32	T34	T36	T38	T40
2 UP						
T27	T28	N1	N8	N7	T19	T20
			1 UP			
T23	T24	N2	N0	N6	T17	T18
			1 UP			
T22	T21	N3	N4	N5	T15	T16
			1 UP			
T1	T2	T5	T7	T9	T11	T13
2 UP						
T3	T4	T6	T8	T10	T12	T14
			2 UP			

Site intertidal: Rocher des Thermes Marins

4^{ème} observation : Mars 2009

T31	T30	T33	T35	T37	T39	T41
T25	T26	T32	T34	T36	T38	T40
T27	T28	N1	N8	N7	T19	T20
T23	T24	N2	N0	N6	T17	T18
T22	T21	N3	N4	N5	T15	T16
T1	T2	T5	T7	T9	T11	T13
T3	T4	T6	T8	T10	T12	T14

5^{ème} Observation : Septembre 2009

T31	T30	T33	T35	T37	T39	T41
T25	T26	T32	T34	T36	T38	T40
T27	T28	N1	N8	N7	T19	T20
T23	T24	N2	N0	N6	T17	T18
T22	T21	N3	N4	N5	T15	T16
T1	T2	T5	T7	T9	T11	T13
T3	T4	T6	T8	T10	T12	T14

3^{ème} observation : Septembre 2008

T31	T30	T33	T35	T37	T39	T41
T25	T26	T32	T34	T36	T38	T40
T27	T28	N1	N8	N7	T19	T20
T23	T24	N2	N0	N6	T17	T18
T22	T21	N3	N4	N5	T15	T16
T1	T2	T5	T7	T9	T11	T13
T3	T4	T6	T8	T10	T12	T14

Légende :

- En rose est indiqué le nombre d'*U. pinnatifida* par cadrats
- Cadrats érodés : N0 à N8
- Cadrats Témoins : T1 à T41 (pas de T29)

ANNEXE 6 :

Chapitre V-A :

Mise au point de marqueurs diagnostiques sur les spores de Laminariales

Annexe 6-A : Protocole d'amplification du marqueur mitochondrial trnP/rnL

A) Préparation du MIX de PCR

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume en μL /puit
H ₂ O	-	-	5.7
BSA	1mg/mL	0.1 mg/mL	2.0
Tampon 10X	10X	1X	2.0
M _g Cl ₂	25 mM	2.0 mM	1.6
dNTP	2.5 mM	200 μM	1.6
Primer R	10 μM	500 nM	1.0
Primer F	10 μM	500 nM	1.0
Taq	5U/ μL	0.5 U	0.1
Sous-total	-	-	15
ADN	100X	1X	5
Total	-	-	20

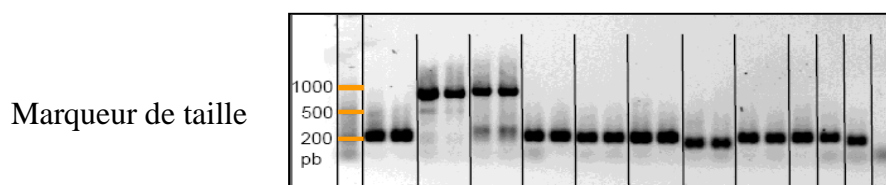
Séquence des amorces R et F (5'-3') : GAGGTGACGCAGTGGTAGC

CGCCTATATTTTTCTTCCAAGG

B) Programme PCR : TD 60-55 (5+ 30 cycles)

- dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C
- 5 cycles en « touch-down », -1°C/cycle
 - 30 sec à 95°C
 - 45 sec à la température d'appariement (température initiale 60°C)
 - 45 sec à 72°C
- 30 cycles
 - 30 sec à 95°C
 - 45 sec à 55°C
 - 45 sec à 72°C
- élongation finale : 12min à 72°C

C) Lecture sur gel d'agarose 1%, 110V pendant 80min



Ld : *Laminaria digitata* ; *Lh* : *Laminaria hyperborea* ; *Sp* : *Saccorhiza polyschides* ; *Lo* : *Laminaria ochroleuca* ; *Sl* : *Saccharina latissima* ; *Up* : *Undaria pinnatifida* ; *Sm* : *Sargassum muticum* ; *Mp* : *Macrocystis pyrifera* ; *Alaria* : *Alaria esculenta* ; *Chorda* : *Chorda filum* ; *Lessonia* : *Lessonia nigrescens*.

Annexe 6-B : Protocole d'amplification de l'ADNr 18S & 28S

A) Préparation du MIX de PCR

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume en μL /puit
H ₂ O	-	-	5.9
BSA	1mg/mL	0.1 mg/mL	2.0
Tampon 10X	10X	1X	2.0
M _g Cl ₂	25 mM	2.0 mM	1.5
dNTP	2.5 mM	200 μM	1.5
Primer R	5 μM	250 nM	1.0
Primer F	5 μM	250 nM	1.0
Taq	5U/ μL	0.5 U	0.1
Sous-total	-	-	15
ADN	100X	1X	5
Total	-	-	20

Tableau synthétique des caractéristiques des marqueurs utilisés pour amplifier les 7 espèces cibles.

ADNr	Séquence Amorce R	Séquence Amorce F	Taille du fragment
18S	TGATCCTTCYGCAGGTTAC	CCGCGGTAATTCCAGCTC	\pm 1080pb
28S	GGGTCCCAACATYCYCG	TTCCCCAGTAACGGCGAGTG	\pm 600pb

Amorce R du 18S est appelé dans la littérature : Euk 329R et l'amorce F du 18S, Euk 528F. Toutes deux sont couramment utilisées pour l'amplification du phytoplancton. Les amorces du 28S ont été réalisées par Claire Daguin et moi-même à partir des séquences disponible dans Genbank. La lettre Y peut prendre la place d'un C ou d'un T.

B) Programme PCR

- Dénaturation initiale de 4 minutes à 95°C
- Hybridation : 40 cycles
 - 1min à 95°C
 - 1 min à 55°C
 - 1 min à 72°C
- Elongation finale : 7min à 72°C

Annexe 6-C : Protocole de séquençage de l'ADNr 18S & 28S

A partir des produits de PCR brut obtenu par le protocole de l'annexe précédente, plusieurs étapes sont effectuées au vue du séquençage.

1) Purification Exo-SAP-IT en vue d'une réaction de séquences avec deux amorces

Réactifs	Volume initial en μL /puit	V pour 67 ind. (4 runs)
H ₂ O	5	335
ExoSAP-IT	1	67
Total	6	402

- Répartir 6 μL de mix dans chaque puits à l'aide du Distriman
- Ajouter 4 μL de PCR brut à purifier
- Filmer la plaque, centrifuger puis la mettre dans le thermocycleur,
- Sélectionner le programme EXOSAP : 15min à 37°C, suivi de 15min à 80°C et enfin à l'infini à 4°C.

Un produit PCR purifié de 10 μL est obtenu. Répartir ce volume en 2 plaques pour faire la réaction de séquence.

2) Réaction de séquences :

Elle est effectuée dans la même plaque que la purification.

Réactifs	Volume initial en μL /puit	V pour 67 ind. (4 runs)
Kit BDT	0.5	33.5
Tampon 5X	1.75	117.25
Amorce 5 μM (18S ou 28S)	1	67
H ₂ O	1.75	117.25
Produit PCR purifié	5	5
Total	10	-

- Distribuer 5 μL de mix dans chaque puits à l'aide du Distriman dans la plaque contenant les 5 μL de produit PCR purifié.
- Filmer la plaque, centrifuger puis la mettre dans le thermocycleur. Lancer le programme suivant :
 1. Dénaturation initiale de 5 minutes à 96°C
 2. Hybridation : 25 cycles
 - 10 sec à 96°C
 - 5 sec selon le T_m de l'amorce (dans notre cas, 55°C)
 - 4 min à 60°C
 3. Stockage : ∞ à 4°C

Annexe 6-D : Séquences obtenues sur le gène 18S au sein des espèces cibles

```

570      580      590      600      610      620      630      640
Alaria fistulosa: seq. réf. GTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTGTGGCGCGGCCCTCCGGCGGGGCTCTTCATTAGGGCCGTTTGTCCGGTTTTTCGG
Ae1_Ploug-FR .....
Ae3_Schoodic .....
Lh4_Norvege .....
Lh1_Ploug-FR .....
Ld2_CapGrisNez-FR .....
SL2_Brest-FR .....
SL1_Roscoff-FR .....
Lo_Roscoff-FR .....
Up_Shimoda-JAP .....
Up_Aber_Wrac'h-FR .....
Up_Thermes-FR .....
Up_SantaBarbara-US .....
Up_NZ .....
Up_Thau-France .....
Up_Thau-FR .....
Up_Hamble-RU .....
Up_Chine .....
Up_Cudillero-ESP .....
SP1_Ploug-FR .....T.....CA.T.C.G.....T.....A
Sp3_Brest-FR .....T.....CA.T.C.G.....T.....A

```

```

650      660      670      680      690      700      710      720
Alaria fistulosa: seq. réf. CCGTCCATTCTCGGGTAGCGTGTCCCTGGCATTAGGTTGTCCGGCTTCTCGCCCGTCGTTTACTGTGAAAAAATAG
Ae1_Ploug-FR .....
Ae3_Schoodic .....
Lh4_Norvege .....
Lh1_Ploug-FR .....
Ld2_CapGrisNez-FR .....
SL2_Brest-FR .....
SL1_Roscoff-FR .....
Lo_Roscoff-FR .....C.....
Up_Shimoda-JAP .....
Up_Aber_Wrac'h-FR .....
Up_Thermes-FR .....
Up_SantaBarbara-US .....
Up_NZ .....
Up_Thau-France .....
Up_Thau-FR .....
Up_Hamble-RU .....
Up_Chine .....
Up_Cudillero-ESP .....
SP1_Ploug-FR .....G.....A.....T.....
Sp3_Brest-FR .....G.....A.....T.....

```

```

730      740      750      760      770      780      790      800
Alaria fistulosa: seq. réf. AGTGTTCAAAGCAGGCTTAGGCCGTTGGATACATTAGCATGGAATAATGAGATAGGGCCACGACGGTCTATTTTGTGGT
Ae1_Ploug-FR .....
Ae3_Schoodic .....
Lh4_Norvege .....
Lh1_Ploug-FR .....
Ld2_CapGrisNez-FR .....
SL2_Brest-FR .....
SL1_Roscoff-FR .....
Lo_Roscoff-FR .....
Up_Shimoda-JAP .....
Up_Aber_Wrac'h-FR .....
Up_Thermes-FR .....
Up_SantaBarbara-US .....
Up_NZ .....
Up_Thau-France .....
Up_Thau-FR .....
Up_Hamble-RU .....
Up_Chine .....
Up_Cudillero-ESP .....
SP1_Ploug-FR .....AA.....
Sp3_Brest-FR .....AA.....

```

```

810      820      830      840      850      860      870      880
Alaria fistulosa: seq. réf. TTGCAGTTGTGCTAATGATTAACAGGAACGGTTGGGGTATTTCGATTCAATTGTCAGAGGTGAATTCCTGGATTAT
Ae1_Ploug-FR .....
Ae3_Schoodic .....
Lh4_Norvege .....
Lh1_Ploug-FR .....
Ld2_CapGrisNez-FR .....
SL2_Brest-FR .....
SL1_Roscoff-FR .....
Lo_Roscoff-FR .....
Up_Shimoda-JAP .....
Up_Aber_Wrac'h-FR .....
Up_Thermes-FR .....
Up_SantaBarbara-US .....
Up_NZ .....
Up_Thau-France .....
Up_Thau-FR .....
Up_Hamble-RU .....
Up_Chine .....
Up_Cudillero-ESP .....
SP1_Ploug-FR .....C.A.....
Sp3_Brest-FR .....C.A.....

```



```

      890      900      910      920      930      940      950      960
Alaria fistulosa: seq. réf. GGAAGACGAACACTGCGAAAGCATTCCCAAGGATGTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATT
Ae1_Ploug-FR
Ae3_Schoodic
Lh4_Norvege
Lh1_Ploug-FR
Ld2_CapGrisNez-FR
SL2_Brest-FR
SL1_Roscoff-FR
Lo_Roscoff-FR
Up_Shimoda-JAP
Up_Aber_Wrac'h-FR
Up_Thermes-FR
Up_SantaBarbara-US
Up_NZ
Up_Thau-France
Up_Thau-FR
Up_Hamble-RU
Up_Chine
Up_Cudillero-ESP
SP1_Ploug-FR
Sp3_Brest-FR

```

```

      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
Alaria fistulosa: seq. réf. AGATACCATCGTAGTCTTAACCATAACTATGCCGACTAGGGATTGGCGGTCGTTAAATTCAGGACTCCGTCAGCACCT
Ae1_Ploug-FR
Ae3_Schoodic
Lh4_Norvege
Lh1_Ploug-FR
Ld2_CapGrisNez-FR
SL2_Brest-FR
SL1_Roscoff-FR
Lo_Roscoff-FR
Up_Shimoda-JAP
Up_Aber_Wrac'h-FR
Up_Thermes-FR
Up_SantaBarbara-US
Up_NZ
Up_Thau-France
Up_Thau-FR
Up_Hamble-RU
Up_Chine
Up_Cudillero-ESP
SP1_Ploug-FR
Sp3_Brest-FR

```

```

      1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
Alaria fistulosa: seq. réf. TCCGAGAAATCAAAGTCTTTGGSTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACC
Ae1_Ploug-FR
Ae3_Schoodic
Lh4_Norvege
Lh1_Ploug-FR
Ld2_CapGrisNez-FR
SL2_Brest-FR
SL1_Roscoff-FR
Lo_Roscoff-FR
Up_Shimoda-JAP
Up_Aber_Wrac'h-FR
Up_Thermes-FR
Up_SantaBarbara-US
Up_NZ
Up_Thau-France
Up_Thau-FR
Up_Hamble-RU
Up_Chine
Up_Cudillero-ESP
SP1_Ploug-FR
Sp3_Brest-FR

```

```

      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
Alaria fistulosa: seq. réf. ACCAGGAGTGGACCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTTACCAGGTCGGACATAGTGAGGATTGACAGAT
Ae1_Ploug-FR
Ae3_Schoodic
Lh4_Norvege
Lh1_Ploug-FR
Ld2_CapGrisNez-FR
SL2_Brest-FR
SL1_Roscoff-FR
Lo_Roscoff-FR
Up_Shimoda-JAP
Up_Aber_Wrac'h-FR
Up_Thermes-FR
Up_SantaBarbara-US
Up_NZ
Up_Thau-France
Up_Thau-FR
Up_Hamble-RU
Up_Chine
Up_Cudillero-ESP
SP1_Ploug-FR
Sp3_Brest-FR

```

```

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
Alaria fistulosa: seq. réf. TGAGAGCTTTCTTGGTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTAGTTGGTGGAGTGATTGCTGGTTAATCCGT
Ae1_Ploug-FR .....
Ae3_Schoodic .....
Lh4_Norvege .....
Lh1_Ploug-FR .....
Ld2_CapGrisNez-FR .....
SL2_Brest-FR .....
SL1_Roscoff-FR .....
Lo_Roscoff-FR .....
Up_Shimoda-JAP .....
Up_Aber_Wrac'h-FR .....
Up_Thermes-FR .....
Up_SantaBarbara-US .....
Up_NZ .....
Up_Thau-France .....
Up_Thau-FR .....
Up_Hamble-RU .....
Up_Chine .....
Up_Cudillero-ESP .....
SP1_Ploug-FR .....
Sp3_Brest-FR .....

```

```

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
Alaria fistulosa: seq. réf. TAACGACGAGACCCCGCTGCTAAATAGTGGCTTACGCTTCTGTAGGTGCTCGCTTCTAGAGGGACTTTCGGT
Ae1_Ploug-FR .....
Ae3_Schoodic .....
Lh4_Norvege .....
Lh1_Ploug-FR .....
Ld2_CapGrisNez-FR .....
SL2_Brest-FR .....
SL1_Roscoff-FR .....
Lo_Roscoff-FR .....
Up_Shimoda-JAP .....
Up_Aber_Wrac'h-FR .....
Up_Thermes-FR .....
Up_SantaBarbara-US .....
Up_NZ .....
Up_Thau-France .....
Up_Thau-FR .....
Up_Hamble-RU .....
Up_Chine .....
Up_Cudillero-ESP .....
SP1_Ploug-FR .....TA.C.....
Sp3_Brest-FR .....TA.C.....

```

```

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
Alaria fistulosa: seq. réf. GACTAACCGAAGGAGTTGGGGCAATACAGGCTCTGTGATGCCCTTAGATGCTGGG-CCGACGCGCCTACACTGA
Ae1_Ploug-FR .....
Ae3_Schoodic .....
Lh4_Norvege .....
Lh1_Ploug-FR .....
Ld2_CapGrisNez-FR .....
SL2_Brest-FR .....
SL1_Roscoff-FR .....
Lo_Roscoff-FR .....
Up_Shimoda-JAP .....
Up_Aber_Wrac'h-FR .....
Up_Thermes-FR .....
Up_SantaBarbara-US .....
Up_NZ .....
Up_Thau-France .....
Up_Thau-FR .....
Up_Hamble-RU .....
Up_Chine .....
Up_Cudillero-ESP .....
SP1_Ploug-FR .....
Sp3_Brest-FR .....

```

```

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
Alaria fistulosa: seq. réf. TGCATGCAACGACTTCTTTTTTTCTGGTGGGCGAGAGGCCCGGTAATCTGTTGAACGTGCATCGTAGGGATAGATC
Ae1_Ploug-FR .....
Ae3_Schoodic .....
Lh4_Norvege .....
Lh1_Ploug-FR .....
Ld2_CapGrisNez-FR .....
SL2_Brest-FR .....
SL1_Roscoff-FR .....
Lo_Roscoff-FR .....C.....
Up_Shimoda-JAP .....
Up_Aber_Wrac'h-FR .....
Up_Thermes-FR .....
Up_SantaBarbara-US .....
Up_NZ .....
Up_Thau-France .....
Up_Thau-FR .....
Up_Hamble-RU .....
Up_Chine .....
Up_Cudillero-ESP .....
SP1_Ploug-FR .....C.....
Sp3_Brest-FR .....C.....

```

	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
Alaria fistulosa: seq. réf.	ATTGCAATATGATCTTGAACGAGGAATCCTAGTAAACGGAGTCATCAGCTCGCATGATTACGTCCTGCCCTTG							
Ae1_Ploug-FR
Ae3_Schoodic
Lh4_Norvege
Lh1_Ploug-FR
Ld2_CapGrisNez-FR
SL2_Brest-FR
SL1_Roscoff-FR
Lo_Roscoff-FR
Up_Shimoda-JAP
Up_Aber Wrac'h-FR
Up_Thermes-FR
Up_SantaBarbara-US
Up_NZ
Up_Thau-France
Up_Thau-FR
Up_Hamble-RU
Up_Chine
Up_Cudillero-ESP
SP1_Ploug-FR	N
Sp3_Brest-FR	N

	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
Alaria fistulosa: seq. réf.	TACACACGCCCGTCGCACCTACCGATTGAATGTTTCGGTGAAGATTCGGGACTGTGGCTCGCGTGCTTCACGGCG--T							
Ae1_Ploug-FR
Ae3_Schoodic
Lh4_Norvege
Lh1_Ploug-FR
Ld2_CapGrisNez-FR
SL2_Brest-FR
SL1_Roscoff-FR
Lo_Roscoff-FR	C
Up_Shimoda-JAP
Up_Aber Wrac'h-FR
Up_Thermes-FR
Up_SantaBarbara-US
Up_NZ
Up_Thau-France
Up_Thau-FR
Up_Hamble-RU
Up_Chine
Up_Cudillero-ESP
SP1_Ploug-FR	C	C
Sp3_Brest-FR	C	C

Annexe 6-E : Séquences obtenues sur le gène 28S au sein des espèces cibles

Le positionnement des sondes positives pour le Dot Blot est surligné par des couleurs différentes pour les différentes espèces cibles.

réf. Sp.UK
réf. Sp Sp2
réf. Sp.Sp1
réf. Sp.
réf. Sp
S11_28S_F
S12_28S_F
S13_28S_F
S14_28S_F
réf. S1
SM28_28S_F
SM29_28S_F
SM39_28S_F
SM44_28S_F
SM28_28S_R
SM29_28S_R
SM39_28S_R
réf. SM
réf. SM

CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGTGTCGAAACCCCCGTGCGCAGTGAAAGTGAAATGCAGGTGGGAAGCCGCAAGGTGGCA
CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGTGTTCAAACCCCCGTGCGCAGTGAAAGTGAAATGCAGGTGGGAAGCCGCAAGGTGGCA
CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGTGTTCAAACCCCCGTGCGCAGTGAAAGTGAAATGCAGGTGGGAAGCCGCAAGGTGGCA
CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGTGTTCAAACCCCCGTGCGCAGTGAAAGTGAAATGCAGGTGGGAAGCCGCAAGGTGGCA
CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGTGTTCAAACCCCCGTGCGCAGTGAAAGTGAAATGCAGGTGGGAAGCCGCAAGGTGGCA
CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGTGA -CAAACCCCCGTGCGAAGTGAAAGTGAACTAGGTGGGACGCTTC --GGCTGCA
CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGTGA -CAAACCCCCGTGCGAAGTGAAAGTGAACTAGGTGGGACGCTTC --GGCTGCA
CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGTGA -CAAACCCCCGTGCGAAGTGAAAGTGAACTAGGTGGGACGCTTC --GGCTGCA
CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGTGA -CAAACCCCCGTGCGAAGTGAAAGTGAACTAGGTGGGACGCTTC --GGCTGCA
CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGTGA -CAAACCCCCGTGCGAAGTGAAAGTGAACTAGGTGGGACGCTTC --GGCTGCA
CAAGGAGTC TAACATGCCCGCGAGTACAGGGGGCG -CAAACCCCCGTGCGCAGTGAAAGTGAAATGTAGGTGGGACGCTTC --GGCTGCA

Annexe 6-F: Protocole pour le Dot Blot

A) Amplification de la zone comprenant les sondes des espèces ciblées

Voir protocole de l'Annexe 6-B.

B) Préparation de la membrane et filtration

Les membranes sont stables entre 15 et 25°C et sont à protéger de la lumière, vérifier la date avant utilisation. Après une 1^{ère} hybridation, on peut stocker le blot pour un temps illimité avant la suivante hybridation et aussi longtemps que la membrane reste sec, scellée dans un sac plastique et à l'abri de la lumière à température ambiante.

1. Faire un MIX comprenant pour chaque individu :
 - 45µl de TE 1X
 - 5µl de NaOH 5M
 - 5µl de produits de PCR
2. Distribution dans chaque puit 50µl de TE + NaOH (baignoire multicanaux)
3. Dénaturation du produit de PCR à 100°C pendant 10min.
4. Ajouter par individus 24µl de 20X SSC
5. Pré-mouillée la membrane en la plaçant doucement à 45° dans un bac contenant la solution SSC 6X pendant 10min. Sortir la membrane en laissant couler l'excédant. La poser sur du papier Whatman.
6. Rinçage de la membrane dans un bain d'H₂O puis 2X SSC.
7. Assembler l'appareil Bio-dot et disposer la membrane
8. Transférer 100µl de SSC 6X par puits
9. Manipuler la pompe pour filtration
10. Transférer les échantillons dénaturés (\pm 79µl). Plusieurs chargements peuvent être effectués. Les meilleurs résultats sont observés avec les plus petits volumes liés et remplir tous les puits avec le même volume pour obtenir une filtration homogène. Si la plaque n'est pas pleine, mettre de l'eau.
11. Manipuler la pompe pour filtration
12. Puis transférer 100µl de NaOH 0.4M
13. Rinçage des échantillons avec 2X SSC filtré
14. Désassembler l'appareil Bio-Dot, enlever la membrane et la rincer avec du SSC 2X.

15. Exposer la membrane sous les UV pendant \pm 3min (Cross linker).
16. La membrane peut être utilisée de suite pour l'hybridation ou stockée à 4°C pour une future utilisation.

Recette des solutions à préparer :

- TE 1X : 10mM Tris-HCL, pH 8, 1mM EDTA pH 8

Diluer 10mL 1M Tris-HCL, pH 8 et 4mL 0.250 M EDTA pH8 dans 1l d'H₂O

- 20X SSC: 20X SSC, 3M NaCL, 0.3M trisodium citrate

Diluer 175g de NaCL et 88.2g de trisodium citrate dans H₂O et ajusté le volume à 1l.

- 2X SSC et 6X SSC :

Mettre 100ml de 20X SSC dans 1l d'H₂O ; 166.6 de 20X SSC dans 1l d'H₂O

C) Pré-hybridation & hybridation

1. Placer la membrane de manière longitudinale dans un tube en verre conçu pour le four d'hybridation (attention au sens, côté chargé vers l'intérieur).
2. Injecter 20mL de solution de pré-hybridation (standard buffer) pendant 1h à selon le T_H. Plusieurs membranes peuvent être dans le même tube. T_H voir Tableau V-A.1 pour température d'hybridation.
3. Jeter la solution de pré-hybridation
4. Injecter 20mL de solution de pré-hybridation + 2 μ L de sonde marquée à la DIG pendant la nuit à des températures variables selon la sonde testée dans un mini four d'Appligene.
5. La solution d'hybridation peut être récupérée car une grande quantité de sonde est non hybridée. La solution peut être stockée à 20°C et stables pendant un an au frigo.

Remarque : vérifier la température d'hybridation à l'intérieur des tubes d'hybridation. Il peut y avoir une différence entre la température interne et externe. Vérifier la température avec un tube rempli d'eau et y injectant un thermomètre.

Recette des solutions à préparer et à autoclaver:

Solution	Concentration initiale	Concentration finale	Forme	Volume pour 1l
Tampon de pré-hybridation	SSC 20X	SSC 5X	liquide	250ml
	293.38g/mol	0.1% (w/v) N_lauroylsarcosine	poudre	1g
	SDS 20%	0.02% (w/v) SDS (à mettre en dernier car ça précipite !!)	liquide	1ml
		1% Agent bloquant (dispo dans le kit)	poudre	10g

Pour réaliser le tampon d'hybridation, il suffit d'ajouter 2 μ L de sonde marquée à la DIG à 20 mL de solution de pré-hybridation.

D) Bains de lavages

Ces lavages permettent d'enlever les sondes non hybridées et donc d'éliminer le bruit de fond lors de la détection. Attention, les solutions de lavages sont à mettre à la température considérée avant le démarrage des lavages.

- 2 lavages avec 2X SSC, 0.1% SDS à température ambiante pendant 5min.
- 2 lavages avec 2X SSC, 0.1% SDS à T_L °C pendant 15min.
- 2 lavages avec 0.5X SSC, 0.1% SDS à T_L °C pendant 15min
- 1 lavage avec 0.1XSSC, 0.1% SDS à T_L pendant 15min.

T_L : voir dans le tableau V-A.1 pour les températures de lavages

Les membranes peuvent être stocké dans de l'acide maléique dans un sac plastique pour utilisation future (le lendemain).

E) Détection & visualisation

1. Après l'hybridation et les bains de lavages, rincer la membrane brièvement (1 à 5min) dans le tampon de lavage,
2. Incuber pendant 30 min dans 100mL de solution bloquante,

3. Incuber pendant 30 min dans 2mL de solution d'anti-corps dans une pochette plastique étanche,
4. Effectuer deux lavages de 15 min dans 100mL de tampon de lavage,
5. Equilibrer 2 à 5min dans 20ml de tampon de détection
6. Placer la membrane face contenant l'ADN vers le haut et appliquer 2mL de solution CSPD dilué.

CSPD : chemiluminescent substrate alkaline phosphatase detection

7. Immédiatement couvrir avec le plastique de la pochette afin d'étendre le produit et sans faire de bulles sur la membrane,
8. Incuber pendant 5min,
9. Enlever l'excédent et mettre les membranes à 37°C pendant 5 à 15min afin d'activer la réaction de luminescence,
10. Exposer au Typhoon selon les paramètres recommandés par

Note : la luminescence continue à émettre pendant 24h. Le signal reste constant durant les premières heures. De multiples expositions peuvent diminuer le signal

Contenu du kit :

- Anti-dioxygénine-AP : 100µL
- Agent bloquant (poudre) : 2 bouteilles de 50g chacune
- CSPD : 1mL de chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase

Recette des solutions à préparer :

Tampon	Ci Stock	Cf	pH	Forme	pour 1l
Tampon de lavage	116.07g/mol	0.1M acide maléique	pH 7.5 (20°C)	poudre	11.607g
	55.44g/mol	0.15M NaCl		poudre	8.316g
		0.3% (v/v) Tween 20		liquide	3ml
Tampon d'acide maléique	116.07g/mol	0.1M acide maléique	Ajusté avec NaOH (solide) à pH 7.5 (20°C)	poudre	11.607
	55.44g/mol	0.15M NaCl		poudre	8.316
Tampon de détection	121.1g/mol	0.1 M Tris-Hcl	pH 9.5 (20°C)	liquide	100ml à 1M
	55.44g/mol	0.1M NaCl,		poudre	5.544g

Toutes les solutions ont été ajustées au pH souhaité avec le pH-mètre de l'équipe de Catherine Boyen.

Solution	Préparation	Stockage	Utilisation
CSPD	Diluer CSPD 1 :100 dans tampon de détection	2-8°C à l'obscurité	Détection chimiluminescence
Solution Anti-corps	Centrifuger anti-dioxygénine-Ap pendant 5min à 10 00 rpm et diluer anti-dioxygénine-Ap 1 :10000 dans la solution bloquante	12h à 2-8°C	Lier aux sondes marquées à la DIG
Solution Stock de la solution bloquante (10X)	Diluer l'agent bloquant (10%) dans le tampon de l'acide maléique à une T°C de 65°C. le solution reste opaque	2-8°C de -15°C à -25°C	Préparation de la solution bloquante
Solution bloquante	Préparer une solution de travail en diluant 1/10 ^{ème} de solution bloquante dans du tampon d'acide maléique.	Toujours frais	Bloquer les sites non spécifiques sur la membrane

Annexe 6-G : Protocole pour le FISH

Hybridation in situ-Tyramide signal amplification (F.I.S.H-T.S.A) d'eucaryotes sur filtres

Principe :

Après fixation, filtration, déshydratation et perméabilisation des cellules de façon à pouvoir faire pénétrer les sondes oligonucléotidiques marquées à l'HRP (Horse Radish Peroxidase) et spécifiques de certains taxons. On hybride ces sondes avec les ARNr 18s des eucaryotes (hybridations ADN/ARN) dans des conditions appropriées de stringence. Les oligonucléotides sont détectés par la réaction de TSA (Tyramide Signal Amplification) qui permet la fixation covalente du complexe tyramide-fluorochrome (ici fluorescéine) dans l'environnement proche de l'HRP.

I- Fixation des cellules.

- Afin d'éviter toute contamination des cultures, les cellules sont prélevées sous la hotte stérile. Ou bien, l'eau de mer est pré filtrée si nécessaire.
- Ajouter 1 volume de paraformaldéhyde (PFA) pour 9 volumes de culture/SW. Au final on a donc une fixation à 1% de PFA.
- Laisser incuber 1 heure à 4°C dans le noir.

II- Filtration et perméabilisation des cellules.

- Filtrer un échantillon de culture sur un filtre de 25 mm de diamètre et ayant des pores de 0.22µm (Filtre ANODISC). La filtration s'effectue sous une aspiration d'environ 200 mmHg.

NB : Il est important que le matériel de filtration soit propre (le rincer entre chaque filtration)

- Une fois le volume de culture/SW filtré, on passe les cellules dans des bains d'alcool :

- 2ml de 50% EtOH pendant 3 minutes puis on remet la pompe en fonctionnement.
- 2ml de 80% EtOH pendant 3 minutes puis on remet la pompe en fonctionnement.
- 2ml de 100% EtOH pendant 3 minutes puis on remet la pompe en fonctionnement.

- Laisser le filtre sécher à l'air puis lorsque le filtre est sec il peut être conservé dans une boîte en plastique dans le noir pendant plusieurs années (-80°C pour plus de sécurité mais RT convient également).

III- Hybridation *in situ*.

III-1 Hybridation.

- Une chambre humide est préparée à l'aide d'un papier Whatman® (2.6cm/6cm). Ce papier est placé dans la chambre humide (Récipient de 50 ml en polypropylène), et est ensuite imbibé (env. 700µl) du même tampon que celui utilisé plus tard pour l'hybridation. La chambre humide est mise à 35°C afin d'égaliser les températures (au moins 30 minutes). *Attention, le formamide est toxique.*

→ Des morceaux de filtres sont découpés puis la face contenant les cellules est marquée à l'aide de tipex® (correcteur blanc) et d'une trace de marqueur noir. Les filtres sont ensuite placés sur la lame suivant le plan établi. 9µl de tampon d'hybridation, optimisé en ce qui concerne la stringence (% de formamide adéquat), est déposés sur le filtre. Ajouter ensuite 1µl de sondes et si besoin 1µl de sondes compétitrices non marquées (ceci permet d'éviter l'hybridation non spécifique). Enfin la lame est mise à incuber dans la chambre humide. L'hybridation nécessite une incubation de 2h30-3 heures à 35°C.

III-2 Rinçage.

→ Le tampon de rinçage est frais pour chaque hybridation. Ce tampon doit avoir la même stringence que le tampon d'hybridation (mais sans formamide, l'ajustement se fait avec le NaCl). Le rinçage est effectué à une température supérieure à celle de l'hybridation de 2 °C de façon à éviter le marquage non spécifique (37°C). Le lavage permet d'éliminer les sondes en excès. Les filtres sont enlevés de la lame et placés (toujours suivant le plan de lame établi au départ) dans un récipient en plastique contenant 6 puits dans lesquels se trouve ~3 ml de tampon. Ce tampon aura été mis précédemment au moins 30 minutes à 37°C afin d'égaliser les températures. Le premier lavage dure 20 minutes à 37°C.

→ Un second lavage est effectué dans du tampon propre, ce lavage est équivalent au premier.

III-3 Equilibration.

→ L'équilibration se fait en trempant les filtres dans ~3ml de tampon TNT pendant 15 minutes à température ambiante et dans le noir

III-4 Réaction avec le TSA.

→ La solution de fluorochrome est préparée, chaque filtre est placé de nouveau sur une lame propre puis l'on dépose 10µl de cette solution sur les filtres. Une incubation de 30 minutes dans le noir et à température ambiante est nécessaire pour que l'amplification se fasse.

→ Les filtres sont ensuite retirés des lames puis mis dans un bain de ~3ml de tampon TNT à 55°C pendant 20 minutes. (Penser à mettre le TNT à 55°C préalablement). Cette opération est répétée une seconde fois.

Dans le cas d'une double hybridation, les morceaux de filtres sont mis 10 minutes dans de l'eau stérile puis placés sur une nouvelle lame. Les filtres sont mis à sécher à 37°C. Une fois sec la deuxième hybridation peu se faire. (Retour au point III-1)

III-5 Coloration au DAPI.

Cette étape n'est pas obligatoire, le marquage au DAPI peut se faire en incluant le DAPI dans l'anti fading (cityfluor). Dans ce cas passer à l'étape III-6

→ Le stock de DAPI (à 4°C) 1mgml⁻¹ est utilisé à une concentration de 5µgml⁻¹ (mets 1µl dans 200µl). On dépose 10µl de DAPI par puits, sur une lame propre et l'on place les filtres dans les puits. Une incubation à température ambiante dans le noir pendant 7-8 minutes est nécessaire. Les filtres sont ensuite mis 7 minutes dans ~3ml d'eau stérile, toujours à température ambiante et dans le noir. Enfin les filtres sont placés sur une nouvelle lame et sont séchées à 37°C.

III-6 Montage pour l'observation au microscope.

La partie plastique (celle qui supporte la trace de marqueur noir) des filtres ANODISC est découpée à l'aide d'un scalpel.

- Déposer ensuite 100µl de City fluor uniformément répartis sur les différents filtres présents sur la lame puis recouvrir d'une lamelle.
- Fixer la lamelle par ses quatre coins à l'aide de vernis à ongle.
- Laisser à l'obscurité et à température ambiante avant l'observation immédiate (pour séchage du vernis) ou à 4°C si l'observation se fait ultérieurement.

III-7 Stockage des lames.

- Les lames sont stockées à 4°C. Le marquage peut être observé jusqu'à un mois (voir plus) après l'hybridation.

Recettes des solutions pour l'hybridation in situ

I- Tampon d'hybridation

- X % de formamide déionisé (stocké à -20°C)
- 0.9 M NaCl
- 20 mM Tris
- 0.01% SDS
- 10% Agent bloquant (stocker à 4°C)

Pour 10mL final (aliquoté à 1mL et conservé à -20°C) :

- H₂O stérile
- Y mL formamide
- 1.8 mL NaCl 5M
- 200 µL Tris 1M pH 7.5
- 100 µL 1% SDS
- 2 mL Agent bloquant (Boehringer Mannheim)
- Filtre sur 0.2µm avec seringue stérile

NB : De façon à modifier la stringence il est souhaitable de jouer sur le paramètre % de formamide plutôt que sur la température ou le NaCl, sachant que 0.7% formamide équivaut à une augmentation de température de 1°C.

Il faut préparer environ 1 mL de tampon par lame utilisée.

II- Tampon de rinçage

NB : Ce tampon ne contient pas de formamide. Par conséquent, de façon à avoir la même stringence que celle du tampon d'hybridation il faut jouer sur le paramètre NaCl.

- NaCl eq. X % formamide

- 5 mM EDTA (Quand X>20%)
- 0.01% SDS
- Tris 20mM

Pour 50 mL de tampon (eq 50% de formamide):

- 180 μ L NaCl 5M (eq. 50% formamide)
- 500 μ L EDTA 0.5M
- 500 μ L 1% SDS
- 1 mL Tris 1M
- H₂O stérile

% Formamide	[NaCl] mol/L	ML de NaCl pour 50mL final
0	0.900	9.000 pas d'EDTA
5	0.636	6.300 pas d'EDTA
10	0.450	4.500 pas d'EDTA
15	0.318	3.180 pas d'EDTA
20	0.225	2.150 pas d'EDTA
25	0.159	1.490 avec EDTA
30	0.112	1.020 avec EDTA
35	0.080	0.700 avec EDTA
40	0.056	0.460 avec EDTA
45	0.040	0.300 avec EDTA
50	0.028	0.180 avec EDTA

III- Tampon TNT (tampon d'équilibration)

- Tris 0.1M pH 7.5
- NaCl 0.15M
- Tween 20

Pour 250 mL :

- 25 mL Tris 1M pH 7.5
- 7.5 mL NaCl 5M
- 0.185 mL Tween 20
- 217 mL d'H₂O stérile

IV- Solution de TSA

NB : On dépose 10 μ L de solution par puits. Cependant il est bon de préparer un peu plus de solution (ex : 18 puits→220 μ L)

- 1 Vol de dextrane sulfate 40% (à 4°C) pour 1 Vol d'amplification diluent (à 4°C).
- 1 Vol de Fluorescéine Tyramide (à 4°C) pour 50 Vol de solution.
Ex : pour 220 μ L on a 110 μ L de DS ; 110 μ L de AD ; 4.4 μ L de FT.

V- City fluor

→ La solution stock est aliquotée et conservée à 4°C.

VI- Préparation du PFA 10X (Amman 1995b)

- 65 mL d'H₂O stérile à 60°C
- 10g de paraformaldéhyde
- Ajouter quelques gouttes de NaOH 2M en agitant, jusqu'à ce que la solution s'éclaircisse.
- Enlever la solution de la source de chaleur et ajouter 33 mL de PBS 3X pH 7.2
- Ajuster le pH à 7.2 avec de l'HCl concentré
- Filtrer sur 0.2 µm
- Conservation à 4°C ou congelé à -20°C pour une conservation plus longue.

VII- Préparation NaCl 5M (500ml)

Pèse 146,1 gr de NaCl que l'on dissout dans 400 ml d'eau milliQ. Complète à 500 ml.
Dissolution assez longue car on est à la concentration maxi de dissolution.

VIII- Préparation EDTA 0,5M pH 8 (500ml)

93,05 gr EDTA.2H₂O
400 ml eau milliQ
environ 15 gr de pastille de NaOH.
Ajuste à pH 8 et complète à 500 ml avec eau milliQ

IX- Préparation Tris 1M pH 7,5 (1000 ml)

121,1 gr de trizma base
800 ml eau milliQ
60 ml HCl 35 %
Vérifie pH et complète à 1 litre avec eau milliQ

X- Préparation de l'acide Maléique (100 ml)

1,161 gr maleic acid (100 mM MW 116,1)
3 ml NaCl 5M (150 mM NaCl)
50 ml eau milliQ
Ajusté à pH 7,5 avec NaOH (environ 4 ml)
Complété à 100 ml avec eau milliQ

XI- Préparation Dextran sulfate 40%

Pèse 1,6 gr de dextran sulfate pour 4 ml eau milliQ
Pèse 8 gr de dextran sulfate pour 20 ml eau milliQ

Dissout dans bain marie à 70°C. aliquot et stock

Etude de la dispersion et du recrutement à différentes échelles spatiales chez *Undaria pinnatifida*, une macro-algue introduite sur les côtes bretonnes

Les invasions biologiques sont la deuxième cause de diminution de la biodiversité mondiale, après la destruction des habitats. Les espèces introduites se sont néanmoins révélées d'excellents modèles d'étude pour appréhender les processus micro-évolutifs et écologiques liés à la colonisation et à l'adaptation rapide d'espèces dans de nouveaux milieux. Par des approches spatiales basées sur la génétique des populations, l'objectif de cette thèse a été de décrire les modalités de dispersion agissant à différentes échelles spatiales chez la macro-algue *Undaria pinnatifida*, introduite en Europe du Nord depuis une trentaine d'années.

Dans un premier temps, une étude génétique de la connectivité a été menée sur 19 populations distribuées dans 3 baies de Bretagne Nord (628 individus génotypés à 9 loci microsatellites). Les principaux résultats montrent qu'en dépit d'une origine commune due à l'aquaculture, les populations d'*U. pinnatifida* sont génétiquement diversifiées même à une échelle spatiale fine (quelques kilomètres), suggérant une divergence génétique rapide des populations établies dans le milieu naturel et une influence limitée des activités anthropiques. L'étude détaillée d'une des baies (Estuaire de la Rance et de la Baie de St Malo, 955 individus échantillonnés sur 30 sites) montre une structure en mosaïque, indépendante de la situation géographique ou de l'habitat. Cette structure hétérogène suggère que de multiples facteurs, dont les transports anthropiques et des événements de dispersion naturelle à longue distance, ont interagi pour façonner les schémas actuels d'installation de l'espèce depuis son introduction initiale il y a 35 ans. Une étude menée à une échelle encore plus fine au sein de 2 populations pendant 2 années (1021 individus) indique cependant qu'*U. pinnatifida* se disperse majoritairement sur de courtes distances spatiales (quelques dizaines de mètres), notamment par le biais de spores, et minoritairement sur des distances plus grandes (> 30m) probablement par des fragments de sporophytes matures. Par ailleurs, le suivi temporel (7 mois ; > 400 individus) de la colonisation du port de l'Aber Wrac'h a permis de mettre en évidence qu'*U. pinnatifida* était capable de coloniser en l'espace de quelques mois un substrat artificiel vierge à partir des populations naturelles établies. Cette expansion rapide de la population semble être due à la reproduction des individus fondateurs déjà en place les mois précédents. Ces observations ont été soutenues par une expérience de perturbation (mise à nu) d'un substrat rocheux en milieu naturel (3 réplicats) qui a montré que la disponibilité d'un substrat vierge pouvait faciliter de manière transitoire l'établissement d'*U. pinnatifida*, confirmant ainsi son statut d'espèce pionnière. Finalement, des études ont été menées sur les stades microscopiques d'*U. pinnatifida*. En particulier afin de détecter spécifiquement des spores dans la colonne d'eau, 7 sondes oligonucléotidiques ont été optimisées afin de réaliser des hybridations de type « FISH ». Des études expérimentales sur les gamétophytes ont de plus permis de montrer qu'ils pouvaient être un nouvel agent de dispersion.

Ces différents résultats soulignent l'interaction entre de multiples modalités de dispersion dans l'établissement durable d'*U. pinnatifida*. Par ailleurs, bien qu'étant une espèce invasive à une échelle mondiale, ses capacités de dispersion naturelle apparaissent comme un facteur limitant de son expansion à une échelle locale et régionale, contrebalancée principalement par les activités anthropiques et la disponibilité en habitats artificiels.

Mots clés : dispersion, recrutement, colonisation, structure génétique spatiale, vecteurs naturels, activités anthropiques, espèces invasives, macro-algues

Study of dispersal and recruitment at different spatial scales in *Undaria pinnatifida*, an introduced kelp on the Brittany coast

Biological invasions are the second cause of worldwide biodiversity loss, behind habitat destruction. However, introduced species appeared to be excellent models for studying micro-evolutionary and ecological processes related to colonization and adaptation in new environments on short time scales. Using spatial population genetics, this PhD aimed at analysing the patterns of dispersal and recruitment at different spatial scales by the Japanese kelp *U. pinnatifida*, introduced 30 years ago in Northern Europe, to determine the vectors of dispersal acting at these different scales.

First, a large scale connectivity study was conducted using 19 populations distributed in 3 bays in Northern Brittany (628 individuals genotyped at 9 microsatellite loci). The main results show that despite a shared history of introduction and common genetic background due to aquaculture activities, populations of *U. pinnatifida* are found to be genetically diversified and structured over small spatial scales (a few km), suggesting a rapid genetic divergence of populations established in the wild and a limited influence of human-mediated transports. Secondly, 30 sites were sampled within a bay (river Rance Estuary and the Bay of St-Malo, 955 individuals). The results at this intermediate scale show a mosaic genetic structure independent of geographic location or habitats. This suggests that multiple factors, human transports and long-distance natural dispersal events, interacted to shape the current patterns of settlement of this species its initial introduction 20-30 years ago. Third, a fine scale study conducted in 2 populations over 2 years (1021 individuals) show that *Undaria pinnatifida* disperse effectively over short spatial distances (a few tens of meters). Some longer distance dispersal also occurs, probably through drifting by mature sporophytes. Fourth, monitoring the colonization of a newly established marina (monitored during 7 months; > 400 individuals sampled) allowed us to highlight that *U. pinnatifida* was able to colonize a new artificial substrate within a few months. These observations were in agreement with the results of an experiment where rocks in natural habitat were cleared and surveyed for the re-establishment of species, showing that *U. pinnatifida* was transiently favoured by newly available habitats (thereby confirming its pioneer species status). Finally, the microscopic stages of the life cycle of *U. pinnatifida* were investigated. In particular, we designed 7 oligonucleotide probes to achieve fluorescent in situ hybridizations for the detection of spores in natural habitat and showed that gametophytes might act as a new potential vector of dispersal.

The above mentioned results underlined that the sustainable establishment of invasive populations of *U. pinnatifida* established in Brittany benefitted from multiple dispersal pathways. Its spread is thus limited by its natural dispersal abilities but these limitations are balanced by human-mediated transports and availability of artificial habitats.

Key words: dispersal, recruitment, spread, spatial analysis, genetic diversity, natural vectors, human activities, invasive species, kelp