



HAL
open science

**Structures génétique et démographique des populations
de deux espèces d'ophiures aux caractéristiques
biologiques contrastées, *Acrocnida brachiata* et
Ophiothrix fragilis, en Atlantique Nord-Est**

Delphine Muths

► **To cite this version:**

Delphine Muths. Structures génétique et démographique des populations de deux espèces d'ophiures aux caractéristiques biologiques contrastées, *Acrocnida brachiata* et *Ophiothrix fragilis*, en Atlantique Nord-Est. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Paris 6, 2006. Français. NNT : . tel-01117696

HAL Id: tel-01117696

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01117696>

Submitted on 17 Feb 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.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité

Océanologie biologique

Présentée par

Mlle Delphine MUTHS

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Paris 6

Structures génétique et démographique des populations de deux espèces d'ophiures aux caractéristiques biologiques contrastées, *Acrocnida brachiata* et *Ophiothrix fragilis*, en Atlantique Nord-Est

Soutenue à Roscoff, le jeudi 14 décembre 2006

Devant le jury composé de :

M. Paul Nival, Professeur, Université Paris VI	(Président du jury)
Mme Monique Guillou, Ingénieur de recherche, UBO, Brest	(Rapporteur)
M. François Bonhomme, Directeur de recherche, CNRS, Montpellier	(Rapporteur)
Mme Anne Chenuil, Chargée de recherche, CNRS, Marseille	(Examinatrice)
M. Dominique Davoult, Professeur, Université Paris VI	(Directeur de thèse)
M. Didier Jollivet, Chargé de recherche, CNRS, Roscoff	(Directeur de thèse)

Structures génétique et démographique des populations de deux espèces d'ophiures aux caractéristiques biologiques contrastées, en Atlantique Nord-Est

La distribution des espèces dépend de leur histoire évolutive et de leur capacité à disperser et coloniser de nouveaux territoires. En milieu marin, cette capacité de dispersion est conditionnée par la durée de la phase larvaire et la répartition plus ou moins continue de leur habitat. Afin de mieux comprendre la part respective de ces différents facteurs, l'histoire passée et contemporaine des populations a été étudiée, par le biais de la génétique et de la dynamique des populations, pour deux espèces d'ophiures de l'Atlantique Nord-Est, *A. brachiata* et *O. fragilis*, qui présentent des caractéristiques biologiques contrastées.

L'espèce *A. brachiata* est constituée de deux lignées écotypiques dont la spéciation aurait été de nature allopatrique à la transition Mio-Pliocène (5 MA). Chaque lignée se répartit préférentiellement à un étage bathymétrique, l'une en milieu subtidal et l'autre en milieu intertidal, avec une histoire de colonisation de l'habitat propre à chaque lignée, depuis des refuges glaciaires différents. Les échanges entre populations sont très faibles, en raison de la fragmentation de l'habitat sablo-vaseux et de la phase dispersive courte (quatre jours). Des phénomènes d'hybridation rares sont observés entre lignées et apparaissent fortement contre-sélectionnés par l'habitat lors de la phase de recrutement. Des mécanismes de migration d'adultes semblent homogénéiser les populations à micro-échelle. Le fonctionnement des populations d'*A. brachiata* ne semble pas suivre un rythme de renouvellement annuel mais plutôt se faire par des épisodes de recrutement plus conséquents certaines années.

L'espèce *O. fragilis* est également constituée de deux lignées génétiques dont l'une est inféodée à la Méditerranée et aux côtes de la péninsule ibérique tandis que l'autre est présente sur les côtes bretonnes et de la Manche. Cette seconde lignée se subdivise en deux variétés écotypiques, l'une vraisemblablement adaptée à une vie subtidale grégaire et l'autre à des habitats intertidaux. L'existence de ces variétés induit un premier niveau de structure génétique relativement faible. En dépit du fait que l'espèce vit majoritairement sur des fonds caillouteux qui forment un continuum d'habitats favorables en Manche et que la durée de sa phase larvaire soit longue (environ 21 jours), la structure des populations d'*O. fragilis* semble être le reflet de processus locaux, tels que des effets Walhund temporels, plutôt que celui des processus d'isolement géographique. Le fonctionnement démographique d'*O. fragilis* montre d'importantes disparités entre sites, qui peuvent également contribuer à la structure globale de l'espèce.

L'ensemble de ces résultats, mis en parallèle, souligne l'importance des processus historiques dans la répartition globale de l'espèce et celle des processus locaux dans la structure contemporaine des populations.

Genetic and demographic structure of populations of two brittle-star species which display contrasted history traits of life, *Acrocnida brachiata* and *Ophiothrix fragilis*, in North-East Atlantic

Nowadays species distribution mainly depends on population history and abilities of migrants to colonize new territories. Dispersal capacities of marine organisms are mainly related to the time spent in the water column by larvae and by habitat fragmentation. Two species of brittle-star of the North-East Atlantic, *A. brachiata* and *O. fragilis*, which show different life history traits, have been studied. Parallel population genetics and dynamics approaches have been chosen in the aim of better delineate how past and present gene flow may explain the actual distribution of species.

A. brachiata includes two ecotypic sibling species which diverge 5 My ago, at the Mio-Pliocene transition. One lineage lives in intertidal, the second in subtidal. Colonization history seems to differ between these two lineages, because of different glacial refugia localisation. Populations are highly genetically structured: flow is mainly reduced due to a short larval phase and the high level of habitat fragmentation. Hybridization between lineages occur at low rate due to selection against hybrids in both habitat during recruitment. Adult migration might occur and is likely to homogenise genetic structure at microspatial scale. Demographic functioning seems to show a pluri-annual cycle as annual recruitment seems insufficient to ensure population sustainability.

O. fragilis is also a complex of two sibling species, one in the Southern Europe, the other one on North-Atlantic coasts. The latter is divided into two ecotypic varieties, one mainly adapted to subtidal life, the other to the intertidal one. Co-occurrence of the two varieties induces a first level of genetic structure. Actually, most of the genetic structure is due to local processes and not to geographical isolation, in agreement with a species displaying a long larval phase and living in continuous habitat. These local processes seem to induce a temporal Walhund effect, probably due to a metapopulation functioning. Great disparities in population dynamics between sites may also contribute to the chaotic genetic structure of populations.

Results obtained for these two species provide new insights on how past history influence species distribution and how local processes play a major role in structuring populations.

Remerciements

1. Introduction

« Thèse, Anti-Thèse, Synthèse ? » Il y a trois ans, j'en étais là, pendant trois ans, ce fut ma principale question, et il y a des chances que souvent encore je me pose la question du bien fondé de ce choix là : venir trois ans à Roscoff pour m'interroger sur le trépident de l'organisation populationnelle de mes copines à cinq bras.

Si je ne suis pas sûre de la réponse, je suis au moins bien consciente de tout ce, et surtout ceux, qui contribuent au bénéfice de ces trois années de thèse. Que les quelques lignes qui suivent puissent suffire à remercier le plus sincèrement possible tous ceux à qui je le dois, en tachant de n'oublier personne, ou si justement...c'est pas grave, c'est mon espace de liberté à moi !

2. Matériel et méthodes

2.1. L'encadrement

L'une des conditions de base pour le bon déroulement d'une thèse reste la qualité de l'encadrement. Et comme je suis une chanceuse, des chefs, j'en ai eu deux pour le prix d'un, et pas n'importe lesquels: Dominique Davoult et Didier Jollivet. Parce que je ne sais travailler que pour et/ou avec des gens que j'estime autant professionnellement qu'humainement, merci à eux deux d'être ce qu'ils sont et d'avoir été là pour moi.

Je tiens à les remercier le plus sincèrement possible pour m'avoir acceptée en thèse, et accepter de me construire un sujet à la carte (sans cloche & sans production), et par la suite donner les moyens de travailler dessus, donner la liberté de gérer mon temps et mon projet, et d'avoir été là quand j'en avais besoin. Pour leur soutien dans les périodes creuses (notamment quand H. tenta à deux reprises de me faire croire que les hybrides régissaient tout, puis qu'un certain P. prouvait à J-45 qu'il y avait des différences et qu'à J-30, je savais que ça ne suffirait pas), pour le perfectionnisme de l'un et le relativisme de l'autre, pour leur âme de gosse et leur côté paternel (ndlr : une fi-fille qui pleure, même beaucoup, sera toujours plus zen qu'un garçon qui intériorise!), pour les missions en mer, le colloque à Québec, la plongée à Marseille...bref sans aucun bémol, le plus sincèrement du monde, MERCI à vous deux.

2.2. Le matériel biologique

Les longues heures passées à mesurer les disques des ophiures et à broyer des fragments de bras n'auraient pu être possibles sans l'aide de toutes les personnes qui m'ont accompagné sur le terrain pour aller les chercher. Je remercie tout d'abord l'équipage de la Mysis, et notamment son capitaine Jean-Michel, pour toutes les fois où ils m'a emmenée en mer ou sur la grève, Renaud et Seb ; Jean-Marie et l'équipage du Sépia pour tous les échantillons du Ch'nord (et la Cédric-mobile pour le transport jusqu'ici) ainsi que les plongeurs de la SBR: Guillaume, Laurent, Willfried et Yann pour les échantillons de Morgat.

Je remercie tous les gentils 'volontaires' qui sont venus sur le terrain ou en mer pour me rendre service, parfois le week-end, parfois sous la grêle, parfois pour ne rien trouver, certains ne sont pas de la station,

certains l'ont fait envers et contre tous ('je batifole, tu batifoles, nous batifolons'). Donc un énorme merci à Cédric, Caro et Céline, les commis d'office ; Franck, Marie, Cyril, Inga, Gauthier, Marie-Laure, Manue, Carole, Cédric J., Thierry, Taim, Hélène, Marie-Cécile, François, Elodie, Dominique, Didier, Eric, Claire (les 3), Sabrina, Ludovic, Baptiste & Elodie, Sonny, Lise & Damien, Mél & Jean, mes parents et mon frangin (si, si j'ai osé faire ça !).

Je remercie aussi l'ensemble des personnes qui m'ont procuré des échantillons plus exotiques ou donné de précieux renseignements pour les trouver : à commencer par Louis Cabioch et Jacques Grall, notre maître à tous 'cet encore jeune homme aux yeux bleus' (Terre Sauvage, 2006); ainsi que A. Carlier, J. Murillo Perez, L. Dupont, R. Morgan, S. Stöhr, T. Brattegard, B. Sylvand, B. Guyonnet -le ken bûcheron de Caro - et F. Le Loch.

2.3. La méthodologie

Quand j'ai débarqué dans ce bout de couloir, il y avait, outre Dominique, trois poilus qui m'ont fait une place dans leur univers et m'ont souvent aidée, à la bino, en biblio, en stats, en relationnel et toujours soutenue : un grand merci à Franck, Thierry et Pascal. Même si Céline n'est en benthos que de cœur, elle a toujours été là pour me donner un coup de main et je lui suis vraiment reconnaissante de toute cette gentillesse. Je remercie sincèrement Louis Cabioch pour toutes les fois où il est venu me raconter des histoires sur les ophiures.

Quant à mon autre bout de couloir, the EGPM, je remercie Dominique LeGuen pour m'avoir montrée les joies des allozymes, Taim pour celles du mito et des analyses qui vont avec, pour avoir défriché le terrain, à Taim et Benoît pour m'avoir aidée contre l'angoisse de la page blanche, Claire pour la logistique, Fred pour les moments où elle a bien voulu se rendre accessible, Caro pour les analyses, Mymy pour essayer et y croire.

Je remercie Pierre Legendre pour avoir discuté statistiques avec Didier durant la mission Momareto, et pour tout le temps qu'il a bien voulu consacré à mon jeu de données par la suite.

Dans les petits derniers du couloir benthos, il y a Eric Thiebaut, petit nouveau en benthos mais pas dans mon cursus universitaire, que je tiens à remercier pour ses cours et son investissement dans le DEA (sans lesquels je n'aurai sans doute jamais continué). Et je profite de l'occasion pour remercier Paul Nival et Alain Nierga pour considérer les étudiants autrement que comme des numéros sur un dossier.

2.4. La logistique

Un grand merci à l'ensemble du personnel de 'services' de la station qui ont tous une vraie notion de ce qu'est un service rendu, pour tout le mal qu'ils se donnent à nous rendre la vie de stationnaires plus simple : de l'administration au restaurant, de la documentation à la plateforme du séquenceur, et du service technique au service info.

2.5. La linguistique

Merci à mes deux chefs pour avoir corrigé ma prose, et parce qu'il n'y a que comme ça que je réfléchis un peu. Et merci à toutes les personnes qui ont pris la peine de relire ce pavé pour corriger les fautes de forme et donner un avis plus ou moins éclairé sur le fond : Marie, Caro et Ben, Gauthier, François, mes parents et mon grand-père (si, si, ça aussi, j'ai osé le leur faire faire !). Et merci à ceux qui ont eu la patience de corriger mon anglais, Didier, Taim et Caro, notamment.

2.6. L'évaluation

Un grand merci aux membres du jury pour avoir accepté de lire ma prose et de se déplacer pour venir m'écouter, en espérant qu'ils ne jugent ça ni trop ennuyeux, ni pas assez rigoureux. Merci donc à François Bonhomme, Anne Chénuil, Monique Guillou & Paul Nival.

3. Résultats

3.1. En chiffres

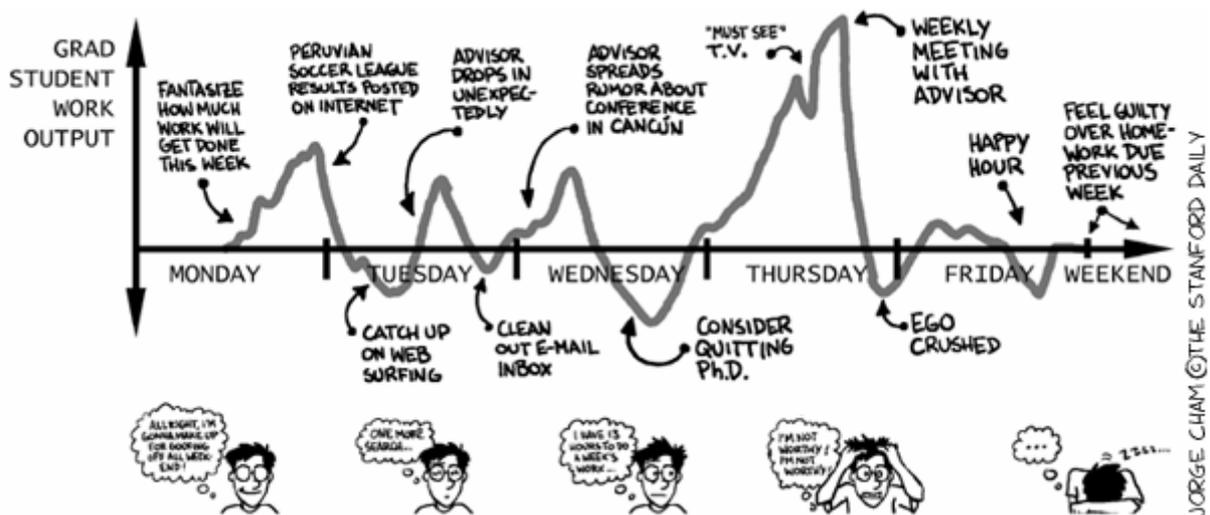
Une thèse, c'est 'une incroyable addition, une véritable machine de guerre' (Bernard Frederic)

3 années de thèse à Roscoff, c'est donc environ 10000 ophiures échantillonnées, 5000 km parcourus sur terre et en mer pour aller les chercher, 70 jours de terrain pour aller les récupérer, 2 paires de bottes usées, 3 boîtes de Mercalm. 10000 ophiures mesurées, c'est 90 jours derrière une bino, plus de 2000 individus broyés soit 5 kg d'amidon pour les faire migrer, des dizaines d'heures à aligner les séquences (4 bases x 650pb x 600séq = tout un univers merveilleux de relations interindividus) et des centaines d'heures à essayer de comprendre comment peut fonctionner un logiciel d'analyses, des journées à lire ce que d'autres ont fait avant moi et souvent mieux que moi, pour essayer de comprendre l'histoire que les données tentaient de me raconter.

3 années de thèse à Roscoff, au final, c'est les 150 pages qui vont suivre, et celles que j'ai écrites pour raconter cette même jolie histoire en anglais. C'est les 45 min de blabla et les 2h de questions qui vont faire que mon cœur va battre à 160 puls.min⁻¹ le jour J.

3.2. En images

Un grand merci à Jorge Cham qui sait si bien croquer les joies et les désillusions des thésards (www.phdcomics.com).



3.3. En personnes

3.3.1. Le BDE 176 : le chapitre sur la Marmotte

Car on peut mettre 1000 marmottes dans 1 tube PCR mais on ne peut pas mettre 1 marmotte dans 1000 tubes PCR...euh non, on peut mettre 1000 marmottes dans 1000 tubes PCR...euh non plus,...

L'un de mes premiers grands moments avec Cédric fut dans le Laber, sur son terrain, un samedi dès potron-minet, où nous avons discuté de bien des choses et surtout de nos divergences d'opinion. En plus j'aurai mieux fait de ne pas y aller puisque j'ai pas assez de force dans les bras pour tirer la carette ! Et que de toute façon les populations, c'est pas de la 'vraie' écologie! Depuis? Beaucoup de bons moments partagés dans le même bureau, de pétassages et de pétages de plomb collectifs...j'ai appris à déceler derrière ses airs de terroriste de bac à sable, toute l'ironie et la subtilité du personnage. Merci Cédric, pour tous les bons moments, les soutiens informatiques et statistiques, les fois où t'as posé des questions (même

si je sais qu'après, t'écoute pas les réponses et que tu retournes dans ta bulle...) et merci surtout, le 1^{er} fou, de ne pas m'avoir laissée me décourager au pied du 100^{ème} mur !

Mais Minus ne serait rien sans Cortex, et Cortex ne serait rien sans Minus (qui est Minus, qui est Cortex, l'histoire ne le dit pas) ...Bref, pour les pétassages et les pêtages de plomb nous n'étions pas que 2 dans ce bureau...merci à toi, Caro, pour ton sourire, ton optimisme, ton imaginaire (parce que dans C2M, le C vaut bien deux M), ta générosité e(s)t ta force. Je suis bien consciente que ça a pas du être simple de nous supporter, notamment durant le dernier mois pas très funky beat...eh oui partager son bureau avec deux thésards en rédaction relève du challenge,...surtout quand il faut faire apparaître un gâteau au chocolat en 10 min chrono! Mille mercis et mille excuses.

Thank you very mouch to U! and be strong! (Ça, c'est pour les remerciements en anglais de la convention Afnor-NF)

Et j'associe à ce bureau la Maman Kinder, Inga, pour sa naïveté perpétuelle et son humanisme extraordinaire. Pour m'avoir secoué les puces pendant plus de six mois, avoir soufflé le chaud-froid pendant tout ce temps au point de chambouler mes convictions sur tout, tout le temps...merci pour ta fraîcheur !

En outre, le BDE et le bout de couloir qui se cache derrière la porte ne cesse, depuis trois ans, de se peupler et se renouveler, merci à tous les benthologues, confirmés ou en devenir, qui sont passés par ce bout de couloir et en ont égayés le quotidien, rarement triste au demeurant : une pensée pour Cyril, Sandrine, Carole, Marie-Cécile 'une touche de finesse dans un monde de brutes', les inséparables, Jâââvano et Gogo le 'Grand ...Quelquechose', Helene, Aline. Un grand merci à Yvan, qui m'a supportée durant deux mois, quand je faisais mes débuts d'encadrante.

3.3.2. Les bisounours

Petit hommage à ma troupe de Bisounours, thésards egpmiens, qui font la principale force de cette équipe. Et qu'un jour, je sais, j'y crois, les gens commenceront à s'en rendre compte...En attendant, un gigantesque merci à eux parce que ces collègues de travail là, je ne les vois pas au travail, mais surtout dans mon quotidien extra-labo depuis 3 ans, autour d'un rhum, sous ou sur l'eau. Je ne me fais pas trop de soucis pour continuer à vous voir. Mais il faut rendre à César, le fait que sans vous, je n'aurai jamais autant apprécié le temps que j'ai passé ici. Un gigantesque merci à Marie, pour tout, tout simplement, depuis le début; à Baptiste et Emma, pour leur constance et leur calme, leur esprit mal placé, notre virée à Bordeaux, celle à Marseille ...et dire que vous partez à Sorrento sans moi; à Sabrina, alias Bohdi qui m'a appris à prendre la vague, et à François, qui m'a aidé quand j'étais dans le creux ...et pour avoir partagé avec moi le psychopathe du 2nd; à Mélanie, Yann & Sonny (oui, oui, je sais, vous n'êtes pas stationnaires, mais doublement Bisounours et bien présents durant ces trois années !); à Marie-Laure (la bouteille de 15 ans d'âge attend ton passage...ou mon départ pour la N^{lle}Z ?!); à Lise, finalement peut-être, la plus F. de nous 3 ;-); à Inken, pour l'appart avec vue sur le port.

Et surtout, surtout, méfiez vous du côté obscur de la force!

Et du syndrome de Stockholm (dixit Roger-René)!

4. Discussion

Une thèse, ce n'est qu'une étape, certes, mais c'est aussi l'aboutissement d'un parcours universitaire. Si ces 8 années d'études sont dans l'ensemble, un vrai plaisir, ponctuées de belles rencontres et de riches expériences, c'est avant tout car j'ai pu les réaliser dans les meilleures conditions possibles. Aussi je tiens à remercier mes parents pour leur soutien, autant financier que moral, encore et toujours, en tout! Parce que je ne sais que trop que je leur dois tout, parce qu'ils m'ont donné la chance de faire des études, et de partir en vacances, sans avoir à bosser le soir, et parce qu'ils ont en plus pris la peine de s'y intéresser! Merci donc à

mes parents, ainsi qu'à mon frerot Stéphane à qui j'ai eu la joie de faire découvrir Roscoff, à ma soeurette du bout du monde et à la smala dans tout son ensemble.

Parce que finalement tout cela ne reste qu'un travail, aussi prenant soit-il, il y a bien d'autres choses ailleurs...qu'ils sachent tous et toutes qu'ils comptent bien plus pour moi. Je leur suis reconnaissante de s'être intéressé à ce travail sans forcément comprendre l'intérêt de tout ça. Beaucoup ne comprennent pas comment on peut passer trois ans à bosser sur ces petites bêtes, ces petits trucs 'insignifiants'...et parce que pour la thèse, 'on sait pas trop mais au moins là-dessus, on ne se sera pas trompé'. Alors un grand merci à tous ceux qui portent un intérêt à tout ça, juste parce qu'il s'agit de ma vie. Notamment un grand merci à ma Marionnette, fidèle parmi les fidèles; à mes rennais, soutien de base, Marielle, Flo et GG (et une pensée pour le Petit Bonhomme qui y croyait déjà plus que moi); à mes binômes, Isa, Karine, Enora & Greg, et pour les amitiés qui en sont nées; à Claire, Nolwen et Marie-Sylvie; à Mike, pour tout et pour tous, Céline, Sandrine et Jean-Luc notamment; à Anthony. Et à toutes les belles rencontres de ces trois dernières années, des bretons bourrus aux sudistes souriants.

5. Perspectives

Une dernière pensée à tous les gnomes dont les naissances ont jalonné ces trois dernières années (...et celles d'avant) et qui en quelques minutes de sérénité partagées savent faire relativiser: Thibaut; le petit William; Jules et Zoé; Achille (Youssou et Nabila qui ne tarderont pas); Edwin; Line, alias Wendy-Salomé-Hubas Jr 2ème du nom et le petit prochain, Philibert.

Et parce que les voyages forment la jeunesse, il est temps pour moi d'aller voir ailleurs ce qu'il s'y passe.

SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	<i>1</i>
1. Espèce & spéciation	2
2. Répartition biogéographique & cas de la zone d'étude	5
3. Connectivité des populations marines	9
4. Les objectifs	13
<i>CHAPITRE I. MATERIEL & METHODES</i>	<i>17</i>
1. Zone d'étude et méthodes d'échantillonnage	17
2. Analyses de la structure génétique des populations	19
3. Analyses de la structure morphologique des populations	29
<i>CHAPITRE II. ACROCNIDA BRACHIATA</i>	<i>33</i>
Chapitre II.1. Identification de deux lignées écotypiques au sein de l'espèce <i>Acrocnida brachiata</i>. Caractérisation de la structure génétique des populations sur l'ensemble de la zone de répartition	35
Démarche	36
1. Identification de deux lignées écotypiques au sein de l'espèce <i>A. brachiata</i> et mécanismes de spéciation à l'origine	38
2. Histoire évolutive des deux lignées : colonisation récente dans la zone de transition Manche/Atlantique, degré de connectivité entre populations au sein de chaque lignée et échange entre les lignées	47
Chapitre II.2. Étude à micro-échelle, le cas de la Baie de Douarnenez : isolement entre populations voisines d'<i>A. brachiata</i> et maintien de l'intégrité des deux lignées écotypiques	64
Démarche	65
1. Microstructure spatiale des populations de la Baie de Douarnenez	66
2. Isolement entre lignées	74
Chapitre II.3. Structure démographique de deux populations intertidales d'<i>Acrocnida brachiata</i> : variabilité temporelle et répartition le long de l'estran	83
1. Description des sites	84
2. Variabilité spatio-temporelle du fonctionnement démographique	86
3. Discussion	92
Synthèse	96

CHAPITRE III. OPHIOTHRIX FRAGILIS _____ 99

Chapitre III.1. Les variétés au sein de l'espèce *O. fragilis* : légende naturaliste ou fait avéré ?

_____	103
1. Démarche _____	104
2. Résultats _____	106
3. Discussion _____	114

Chapitre III.2. Connectivité des populations d'*O. fragilis* dans la zone de transition entre Atlantique et mer du Nord _____

_____	117
1. Démarche _____	117
2. Résultats _____	119
3. Discussion _____	133

Chapitre III.3. Variabilité spatio-temporelle de la structure démographique de trois populations d'*O. fragilis* _____

_____	139
1. Description des sites _____	140
2. Structure temporelle des populations _____	142
3. Caractérisation des nuages larvaires au dessus des populations _____	145
4. Discussion _____	147

Chapitre III.4. Variabilité génétique des cohortes d'*O. fragilis* au sein de deux populations

_____	151
1. Résultats _____	152
2. Discussion _____	155

Synthèse _____ **157**

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES _____ 159

1. Notion d'espèce _____	159
2. Histoire évolutive des espèces _____	160
3. Connectivité des populations _____	163
4. Perspectives _____	166

BIBLIOGRAPHIE _____ 171

ANNEXES _____ 185

Les observations biologiques ne sont qu'une image figée d'un ensemble de processus, qui agissent et ont agi à différentes échelles de temps et d'espace (Figure i.1). S'intéresser à la biologie des populations d'une espèce, c'est donc essayer de comprendre en partie comment ces populations interagissent à l'heure actuelle, mais aussi comment elles se sont mises en place et donc tenter d'appréhender l'histoire de l'espèce dans son ensemble.

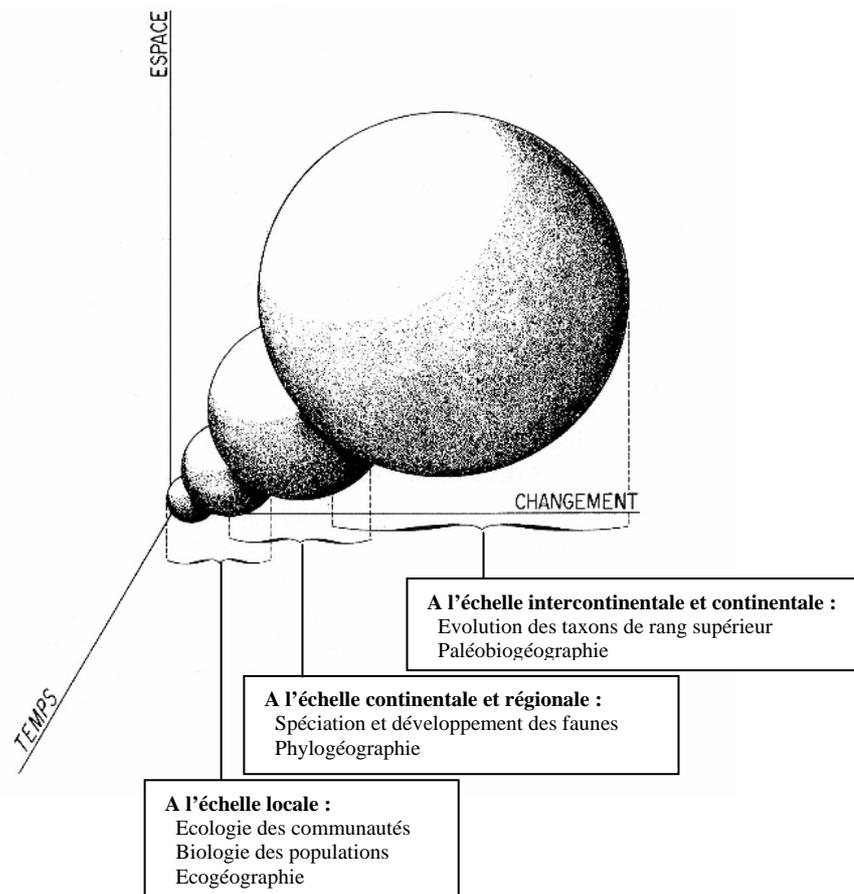


Fig i.1. Les processus biologiques peuvent être étudiés en fonction de trois échelles, celle de l'espace, celle du temps et celle du changement. Les différentes sphères représentent des 'domaines d'échelles' correspondant à des champs particuliers de la biologie mais elles sont interdépendantes en raison de transferts d'information d'une sphère à l'autre (d'après Blondel, 1995)

1. Espèce & spéciation

1.1. La notion d'espèce

L'espèce, unité systématique de base, a été définie par Mayr (1942) comme 'un groupe de populations naturelles réellement ou potentiellement interfécondes, isolé de tout autre groupement analogue'. Ce concept biologique considère les variations au sein de l'espèce, et, en ce sens, il se distingue du concept typologique (ou phénétique) qui ne reconnaît que le 'type', c'est-à-dire les caractères morphologiques de l'individu qui a été utilisé pour décrire le taxon. Ces deux concepts ne sont pas antinomiques ; ils correspondent juste à des approches différentes de l'analyse de l'espèce.

Le critère d'isolement reproductif a cependant parfois été jugé trop restrictif ; c'est pourquoi Templeton (1989) a proposé de nuancer les critères classiques en définissant l'espèce comme un groupe d'organismes ou de populations qui, malgré d'éventuels flux géniques avec d'autres groupes analogues, maintient une cohésion et une identité génétique au fil du temps. C'est sur cette identité génétique que repose aussi le concept phylogénétique de l'espèce (Cracraft, 1983) qui inclut la notion de descendance à partir d'ancêtres communs. Le problème est que cette approche n'intègre en rien la biologie actuelle de l'espèce.

La conception écologique de l'espèce définit celle-ci comme un ensemble d'organismes adaptés à une niche écologique particulière (Van Valen, 1976; Haq *et al.*, 1987; Marincovich & Gladenkov, 1999; McKenzie, 1999; Renssen & Vandenberghe, 2003; 2005; d'après les informations tirées de Brault *et al.*, 2004) et explique donc la cohérence de l'espèce en terme de sélection. La sélection peut parfois être suffisamment forte pour surpasser l'effet de la migration dans le sens d'une diversification par l'habitat ou, inversement, peut maintenir la cohérence d'une espèce en absence de flux géniques.

Au final, la migration et la sélection coopèrent à des degrés différents selon les taxons, pour produire des 'constellations phénétiques', communément dénommées espèces. L'apparition de certains taxons s'effectuerait ainsi plus sur des bases écologiques, alors que d'autres reposeraient sur des bases portant plus sur l'isolement reproductif ; aucun de ces deux concepts ne saurait suffire à la définition d'une espèce. D'une manière générale, la définition d'une espèce est désormais plus le fruit d'une conception pluraliste, ce qui vient à reconnaître explicitement qu'aucun concept unitaire ne peut s'appliquer à l'ensemble des espèces (Wilson, 1999).

1.2. Les modes de spéciation

L'événement capital dans l'apparition d'une espèce nouvelle est la mise en place d'un isolement reproductif. Cet isolement est la résultante de la mise en place de barrières aux flux géniques. Ces barrières peuvent être pré-zygotiques, d'ordre physique (les espèces occupent des habitats différents), mécanique (incompatibilité anatomique des organes génitaux), éthologique (attraction sexuelle faible entre membres d'espèces différentes), ou post-zygotiques (létalité, stérilité et dégénérescence des hybrides; Palumbi, 1992) permettant de définir ainsi des grands types de spéciation.

Le mode de spéciation le plus couramment admis est le mode allopatrique (Turelli *et al.*, 2001) due à une fragmentation de l'aire géographique ancestrale de l'espèce au cours du temps (Figure i.2). L'émergence d'une barrière physique à la migration va permettre aux populations d'évoluer séparément du fait de la dérive génétique et/ou de l'adaptation locale, induisant une différenciation des génomes de telle manière qu'ils seront potentiellement incompatibles, à plus ou moins brève échéance. Lorsque ces groupes sont remis en contact, l'isolement reproductif peut être plus ou moins complet. S'il est complet, le processus de spéciation est abouti. S'il est incomplet, la sélection naturelle, par contre-sélection des hybrides, va pouvoir renforcer l'isolement reproductif (Servedio & Noor, 2003). D'une manière générale, le modèle allopatrique sous-entend que la subdivision en deux groupes se fait de façon relativement égalitaire. Si seule une petite sous-population, en marge de l'aire géographique de l'espèce ancestrale, se sépare de celle-ci, la spéciation est dite péripatrique ; les effets de l'isolement et, éventuellement, de rencontre secondaire des deux populations restent les mêmes.

Par opposition, les autres modes de spéciation se définissent par l'apparition de barrières génétiques au sein d'une population en l'absence d'isolement géographique (Figure i.2), notamment suite à une modification de l'habitat, des interactions biotiques, du comportement reproducteur ou du génome (polyploïdie) : il s'agit donc de spéciation sympatrique (Johannesson, 2001). Ce type de spéciation est étroitement lié aux variations des conditions environnementales sur de très petites échelles spatiales. Des exemples récents (Ogden & Thorpe, 2002; Cruz *et al.*, 2004) tendent d'ailleurs à prouver l'importance des phénomènes adaptatifs comme une force évolutive majeure jouant sur la divergence entre populations et confirment ainsi les prédictions des modèles de spéciation écologique (Orr & Smith, 1998; Schemske, 2000; Schluter, 2001). Ces mécanismes de spéciation écologique sont néanmoins encore contestés (Wiens, 2004; Wiens & Graham, 2005), dans la mesure où il

semble plus facile et plus rapide pour une espèce de suivre le déplacement de son aire de prédilection et donc de conserver sa niche écologique plutôt que de s'adapter à une nouvelle niche. Cette théorie ne peut néanmoins fonctionner que si la niche demeure préservée malgré son déplacement, ce qui n'est pas évident. Ainsi malgré des modèles de spéciation sympatrique communément admis, ce type de spéciation semble toujours délicat à mettre en évidence (Via, 2001). Dans ce contexte plus théorique que démonstratif, les mécanismes de renforcement (accroissement de l'isolement reproductif par une sélection naturelle qui agit à l'encontre des hybrides) prennent encore plus d'importance pour expliquer le maintien des unités de reproduction indépendantes durant tout le temps de la spéciation (Servedio & Noor, 2003).

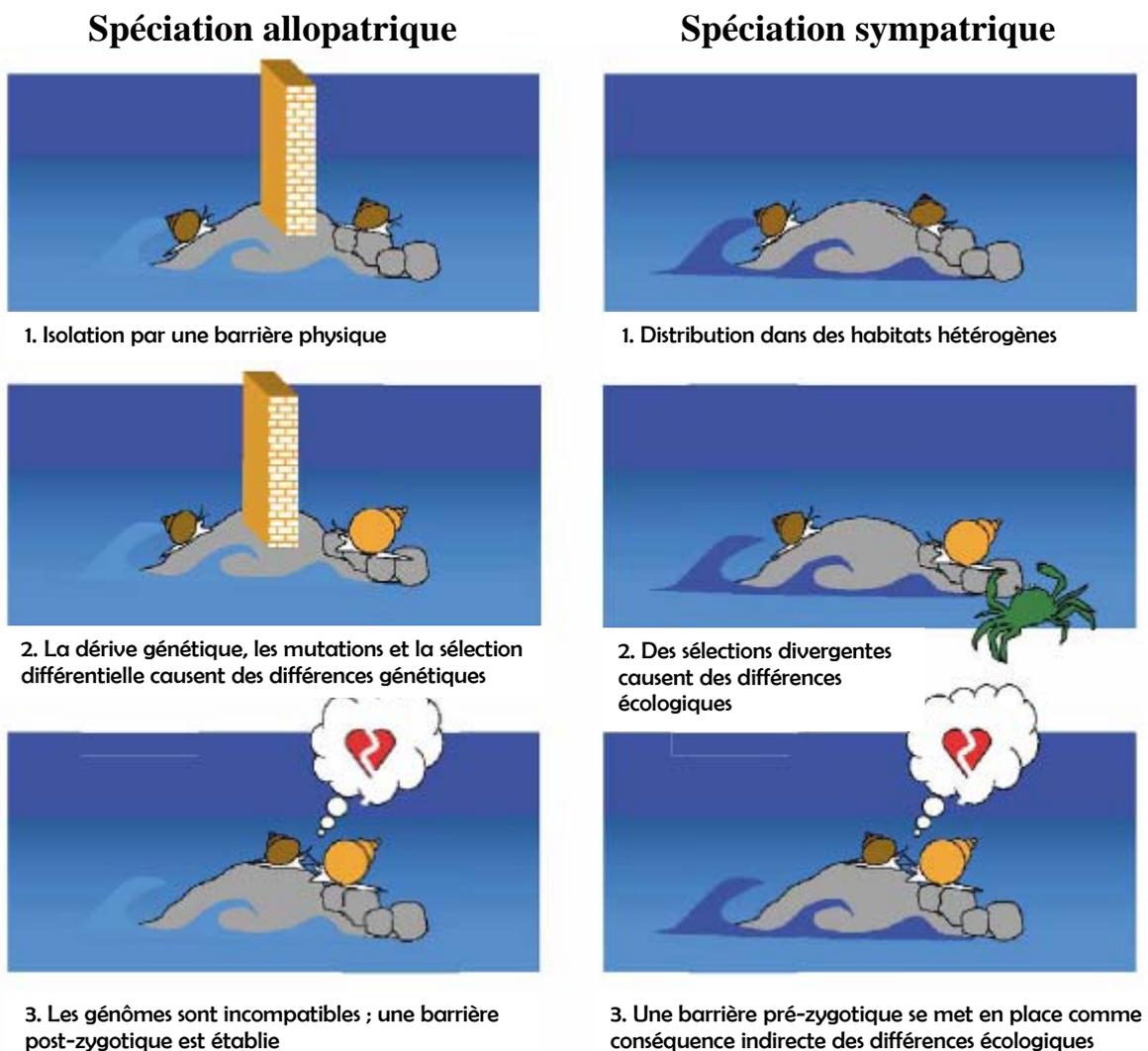


Figure i.2. Illustration de la spéciation allopatrique et sympatrique chez la littorine (Johannesson, 2003)

2. Répartition biogéographique & cas de la zone d'étude

2.1. L'évolution spatio-temporelle de la distribution des espèces

Qu'il s'agisse de spéciation sympatrique ou allopatrique, l'émergence de nouvelles espèces de même que l'évolution de la distribution de ces espèces est étroitement liée aux changements de l'environnement. Cette connexion entre les variations spatio-temporelles des habitats et des espèces est le point central des études de biogéographie. Cette discipline présente deux approches principales : la plus traditionnelle d'écogéographie et la seconde, la phylogéographie (Avisé, 2000).

L'écogéographie a pour but de décrire les cortèges d'espèces et leur distribution en fonction des types d'habitat et de comprendre les mécanismes qui contraignent ces répartitions. En milieu terrestre, ce sont surtout les formations végétales qui marquent le plus un paysage et ont permis la description des grandes provinces biogéographiques (Blondel, 1995). De nombreuses hypothèses sont actuellement discutées pour expliquer les gradients latitudinaux de biodiversité (Willig *et al.*, 2003) ; d'une manière générale, les interactions biotiques tendraient à limiter la distribution et l'abondance des espèces aux basses latitudes, alors que les facteurs abiotiques seraient prépondérants aux hautes latitudes. En milieu marin intertidal, des hypothèses similaires sont avancées pour expliquer les cortèges d'espèces le long de l'estran : les facteurs abiotiques (notamment les stress physiques durant l'émersion) fixeraient la limite supérieure des aires de distribution alors que les relations interspécifiques fixeraient leur limite inférieure (Connell, 1975). Par contre, la délimitation latitudinale des aires de distribution géographique apparaît plus délicate notamment du fait que les gradients environnementaux sont plus progressifs qu'en milieu terrestre. Néanmoins une importante similitude semble exister entre les variations latitudinales terrestres et marines côtières avec une concordance des zones de transition biogéographique. Au final la délimitation des aires de distribution géographique des espèces marines repose sur les régimes thermiques des masses d'eau et les gradients faunistiques côtiers associés (Figure i.3).

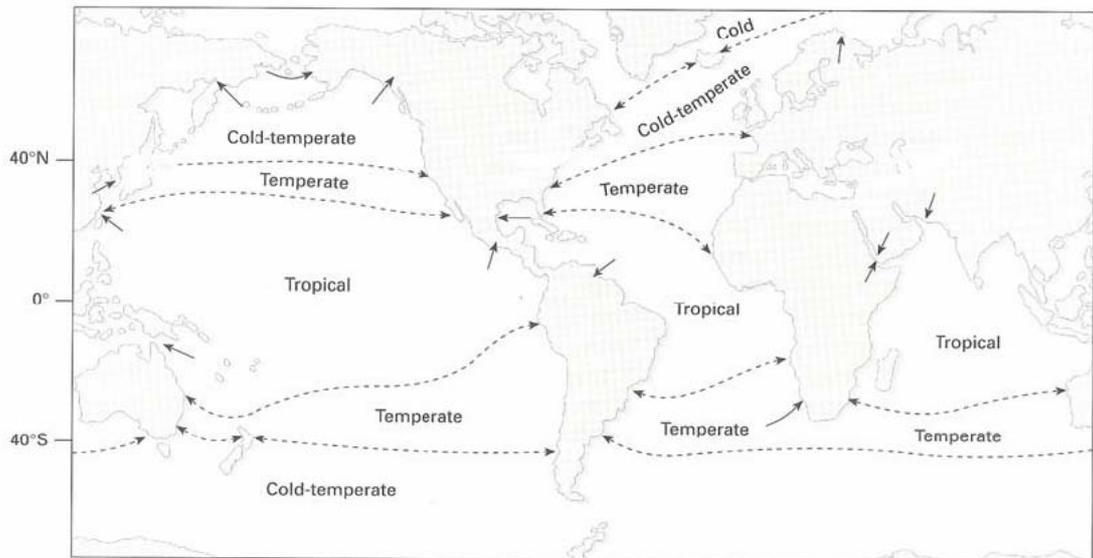


Figure i.3. Zones de transition biogéographique décrites en fonction du régime thermique des masses d'eau et des gradients thermiques (Cox & Moore, 2000)

La phylogéographie vise à étudier la distribution des lignées généalogiques, au sein d'une espèce et entre espèces proches (Avisé, 2000). Cette approche permet d'intégrer dans un contexte temporel plus vaste les perspectives écogéographiques qui soulignent préférentiellement les pressions écologiques actuelles. Ainsi l'utilisation des outils moléculaires permet de mieux cerner l'histoire relative de la colonisation des taxons, sur de plus ou moins longs termes. En effet, cela permet de retracer des processus très anciens de vicariance (liés à des phénomènes majeurs tels que la dérive des continents), des déplacements des aires de distribution plus récents en conséquence des variations climatiques jusqu'à des processus contemporains de dispersion. Les récentes approches de phylogéographie comparée (Arbogast & Kenagy, 2001) ont permis d'étudier ces processus sur diverses espèces d'un même habitat et ainsi renforcer, ou non, la véracité des scénarios proposés. En outre, Wiens & Donoghue (2004) soulignent la nécessité d'une approche biogéographique globale qui intègre à la fois les données d'écogéographie et celles de phylogéographie, notamment pour la compréhension des processus à grande échelle spatiale.

2.2. La zone d'étude : l'Atlantique Nord Est

L'Atlantique Nord Est se divise en trois grandes provinces biogéographiques (Figure i.4) : la province lusitanienne, tempérée chaude, la province boréale, tempérée froide et la province arctique/subarctique, froide (Briggs, 1995). Les îles britanniques se situent à la jonction de ces trois provinces. En effet, l'essentiel du pourtour britannique est de nature

boréale mais la partie nord est plutôt caractérisée par des communautés boréo-arctiques et la partie sud-ouest par des communautés lusitano-boréales. La côte nord-ouest de la Bretagne est d'ailleurs reconnue comme une zone de transition entre espèces lusitaniennes et boréales (Cabioch, 1968; Michanek, 1979) et semble d'ailleurs être aussi un point de rupture phylogéographique dans la mesure où des lignées cryptiques ont été découvertes chez une espèce de bivalves *Macoma balthica* (Luttikhuisen *et al.*, 2003) et deux espèces de polychètes, *Pectinaria koreni* et *Owenia fusiformis* (Jolly *et al.*, 2006), dont la répartition traverse cette zone frontière.

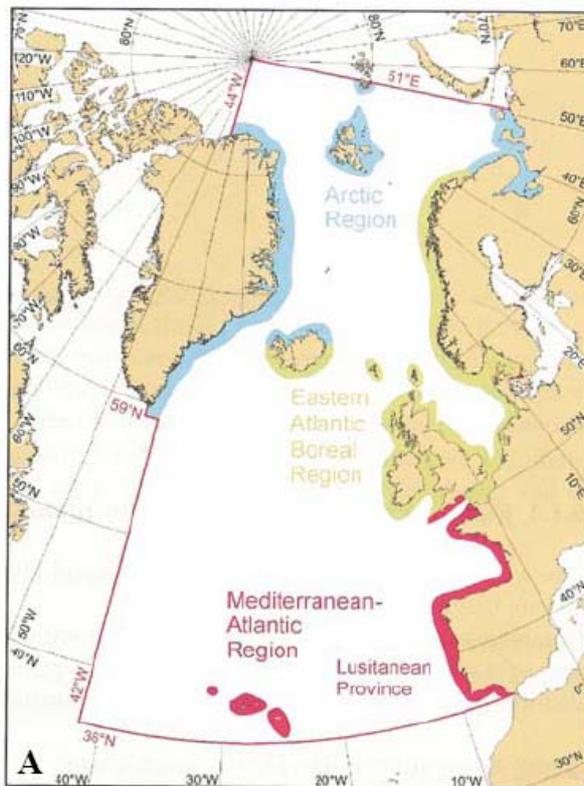


Figure i.4. Régions biogéographiques actuelles de l'Atlantique Nord Est (Briggs, 1995).

Les particularités de ces trois régions biogéographiques de l'Atlantique Nord Est et des zones de transition associées sont le fait de phénomènes historiques, géologiques et hydrodynamiques beaucoup plus anciens (synthésés sur la Figure i.5). Par exemple, la réouverture du détroit de Béring (4 à 7 millions d'années (= MA); Marinovich & Gladenkov, 1999) a vraisemblablement permis l'échange d'un grand nombre d'espèces marines polaires et tempérées, avec une dominance d'envahisseurs provenant du Pacifique et colonisant l'Atlantique (Vermeij, 1991; Cunningham & Collins, 1998). La fermeture complète de l'isthme de Panama (3,3 MA; Stehli & Webb, 1985) a, quant à elle, entraîné une modification des courants marins, notamment un renforcement et un réchauffement du Gulf Stream (Shackleton & Opdyke, 1977), ce qui a provoqué l'extinction massive des mollusques

tempérés froids dans l'Atlantique nord à la transition du Plio-Pleistocène (Reeb & Avise, 1990). En outre, le bouclier armoricain a subi plusieurs épisodes de transgression océanique. Il fut tout d'abord partiellement submergé au milieu du Miocène (8-9 MA) puis au Pliocène (4,5 MA), ce qui a favorisé l'installation d'une faune marine tandis que la phase de régression (3,3 MA) a favorisé l'installation d'une faune plus estuarienne (Brault *et al.*, 2004). Ces événements transgressifs sont en étroites relations avec les phénomènes de glaciation et se sont aussi accompagnés d'une modification des isothermes. Les derniers événements transgressifs du Pléistocène ont eu lieu 18000 à 23000 ans auparavant (LGM = Last Glacial Maximum). Les calottes glaciaires s'étendaient alors jusqu'au sud des îles britanniques (Braatz & Aubrey, 1987). Au niveau des zones lusitanienne et boréale, ces événements de glaciation ont conduit à un déplacement d'espèces boréales et d'espèces tempérées-froides vers des régions situées plus au sud (Taberlet *et al.*, 1998; Dinter, 2001), dans des zones 'refuge', où les conditions environnementales sont restées propices à la survie des organismes.

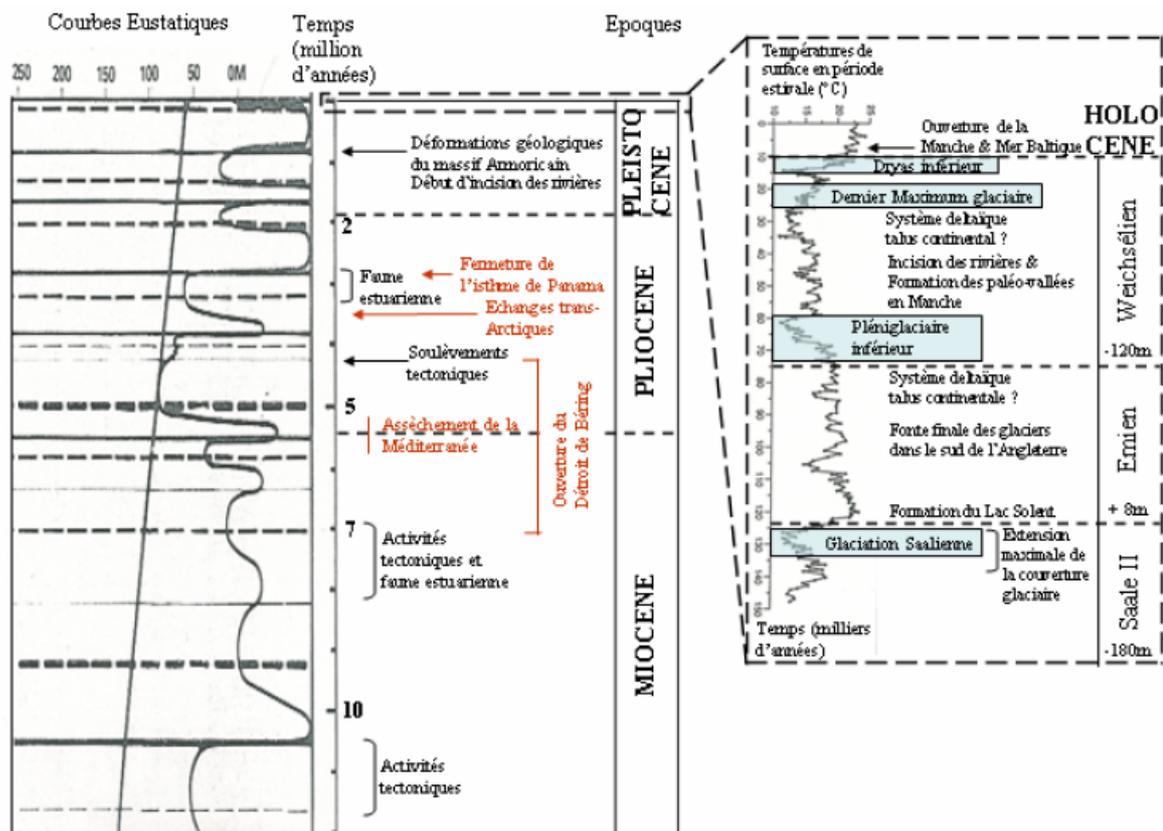


Figure i.5. Synthèse des variations eustatiques des 12 derniers millions d'années et des divers événements géologiques et climatiques ayant eu lieu en Europe de l'Ouest (au centre, en noir) et dans le reste du monde (en rouge). Ces événements géologiques sont également présentés (à droite) en fonction des variations de la température de surface pendant les 150 derniers milliers d'années : synthèse réalisée par Jolly (2005; d'après les informations tirées de Haq *et al.*, 1987; Smith, 1989; Marincovich & Gladenkov, 1999; McKenzie, 1999; Lambeck & Chappell, 2001; Renssen & Vandenberghe, 2003; 2005; d'après les informations tirées de Brault *et al.*, 2004)

Les échanges de faunes entre provinces boréale et lusitanienne ne se font néanmoins que depuis peu. En effet, la formation de la Manche est un phénomène très récent, progressif depuis sa partie occidentale (Lambeck, 1997) et catastrophique dans sa partie orientale (Smith, 1989). Le passage qui s'est établi entre la Manche et la Mer du Nord date de 9000 à 10000 ans (Smith, 1989). Les présents patrons de circulation océanique ne s'établissent qu'il y a 7000 - 8000 ans (Lambeck, 1997), après l'ouverture de la Manche et du détroit du Danemark.

Le régime hydrodynamique de la Manche est dominé par les courants instantanés de marée, dont la vitesse moyenne est d'environ 1 m.s^{-1} (Salomon, 1990). La Manche est alimentée, sous le seul effet de la marée, par un afflux d'eau chaude provenant de la dérive de l'Atlantique Nord, qui pénètre à proximité de l'île d'Ouessant et longe les côtes nord bretonnes jusqu'aux environs de la baie de Lannion. Là, le courant bifurque vers le Nord en direction de Plymouth. Une partie de la masse d'eau se dirige vers la Mer d'Irlande, alors que l'autre s'oriente vers le cap de la Hague où, du fait d'un rétrécissement local, le courant s'accélère. Les masses d'eau sont ensuite entraînées plus à l'est, en direction du Pas de Calais. Les intenses courants de marée contrôlent la distribution des sédiments superficiels, de sorte que les sédiments grossiers dominant en mer ouverte où l'hydrodynamisme est fort, alors que les sédiments fins sont confinés dans les baies et les estuaires où les courants sont plus faibles (Larsonneur *et al.*, 1982). Les peuplements benthiques sont distribués en relation avec les gradients hydrodynamiques et sédimentaires (Cabioch *et al.*, 1977), avec les peuplements de sables fins envasés répartis de façon discontinue, en taches isolées et les peuplements de sédiments grossiers de façon plus continue.

3. Connectivité des populations marines

3.1. Population & métapopulation

Une population peut être définie, de façon assez complète, comme un ensemble d'individus appartenant à la même espèce, susceptibles de se reproduire entre eux, occupant une aire géographique commune et jouant un rôle particulier dans un écosystème donné (Odum, 1983). Ainsi une population doit répondre aux critères phénétique et biologique de l'espèce, auxquels se rajoutent des critères de cohérence spatiale et écologique. L'habitat auquel l'espèce est inféodée occupe rarement l'ensemble de l'aire de distribution

géographique ; l'espèce est donc distribuée de façon plus ou moins discontinue, en populations. Les flux entre populations assurent ainsi l'homogénéité de l'espèce.

Plusieurs niveaux de connectivité peuvent ainsi exister entre populations, permettant de décrire une gradation depuis des populations continues, vers des populations structurées puis des métapopulations et enfin des populations isolées, même si la limite reste assez floue entre ces diverses catégories. Une population isolée, ou fermée, se définit par l'absence d'immigrants, en opposition aux populations dites ouvertes. Le concept de métapopulation, quant à lui, a été introduit en écologie par Levins (1969) : il repose sur l'idée d'un ensemble de populations structurées spatialement échangeant entre elles des migrants. La métapopulation persiste au travers d'un équilibre entre extinctions locales et recolonisations. Les risques d'extinction sont équivalents pour toutes les populations et les taux de colonisation sont indépendants des distances séparant les populations. Levins (1969) suggère également que le taux de migration doit être faible de sorte que la migration ne modifie pas la dynamique des populations locales existantes. De ce fait, la dynamique des populations locales est beaucoup plus rapide que celle de la métapopulation.

Plusieurs types de métapopulation ont, d'après la définition du modèle initial de Levins (Figure i.6 ; a), été décrits par Harrison & Hastings (1996):

(b) le modèle 'continent-îles' ou 'source-puits' dans lequel la persistance de la métapopulation dépend de l'existence d'une ou plusieurs populations résistantes à l'extinction

(c) le modèle 'population fragmentée' dans lequel la dispersion entre les sous-populations est si importante que le système fonctionne comme une unique population résistante à l'extinction

(d) le modèle des 'populations fragmentées en déséquilibre' dans lequel les populations sont faiblement interconnectées et les extinctions locales ne sont pas contre-balancées par les recolonisations

(e) les modèles intermédiaires qui combinent les structures du modèle 'continent-île' et le modèle 'populations fragmentées' : la dispersion s'effectue préférentiellement au niveau des zones centrales mais devient suffisamment faible avec les populations des zones périphériques pour autoriser des extinctions locales.

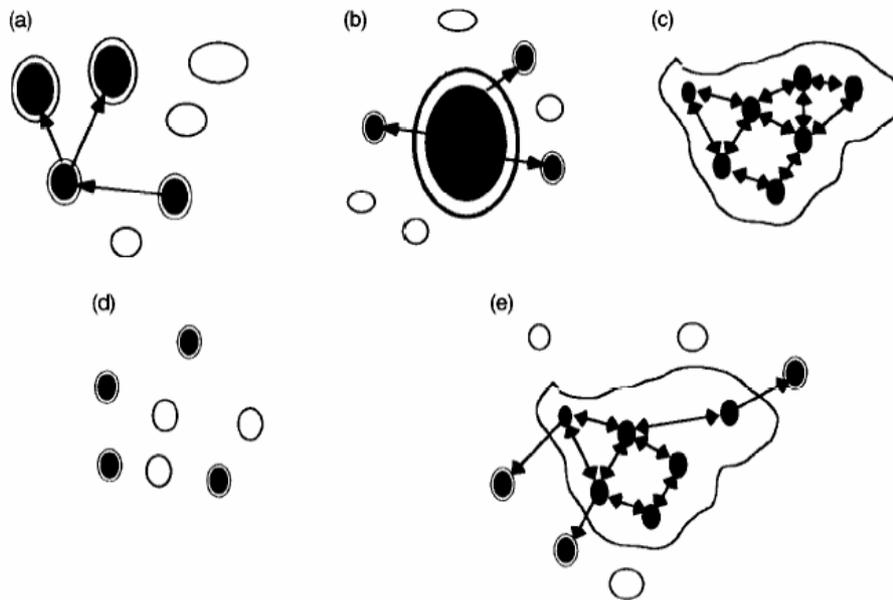


Figure i.6. Représentation schématique des différents types de métapopulation définis par Harrison & Hastings (1996) d'après la définition du modèle initial de Levins (a) ; (b) le modèle 'continent-îles' ou 'source-puits' ; (c) le modèle 'population fragmentée' ; (d) le modèle des 'populations fragmentées en déséquilibre' ; (e) un modèle intermédiaire.

La dynamique de la métapopulation est conditionnée par l'extinction des populations locales et la recolonisation subséquente de ces zones mais surtout par la migration des individus entre les habitats. Le renouvellement important des populations a tendance à diminuer la taille efficace de la métapopulation et donc accélérer les phénomènes de dérive génétique (Gilpin, 1991; Pannell & Charlesworth, 2000), affectant par là même les attendus théoriques des modèles classiques de différenciation génétique entre populations, tel que l'isolement par la distance ou le modèle en îles.

3.2. La migration en milieu marin

En zone côtière tempérée, 70% des invertébrés benthiques présentent un cycle de vie de type benthopélagique (Thorson, 1950). La phase larvaire constitue la phase dispersive et est donc censée assurer la connectivité entre les populations (Figure i.7).

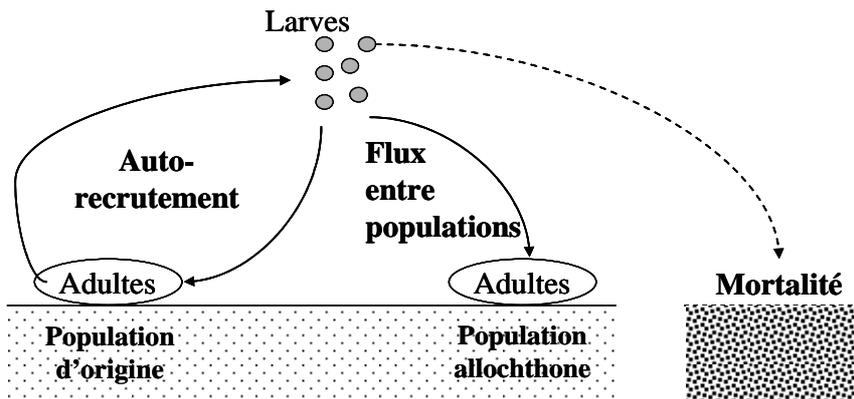


Figure i.7. Schéma d'un cycle de vie benthopélagique : la rétention de larves assure la pérennité des populations locales tandis que la dispersion assure la connectivité entre populations éloignées. Les larves peuvent également recruter dans un habitat défavorable et disparaître.

Selon une relation simple, plus la phase larvaire dure longtemps et plus la connectivité entre populations distantes est supposée importante. Dit autrement, l'homogénéisation entre populations du fait de la dispersion larvaire est supposée en relation avec la durée de cette phase larvaire (Figure i.8), ce que tend à prouver certaines études génétiques (Siegel *et al.*, 2003). Malgré de nombreux exemples qui semblent confirmer cette tendance (McMillan *et al.*, 1992; Mladenov *et al.*, 1997; Arndt & Smith, 1998), la dispersion en milieu marin ne saurait être limitée à cette relation. En effet, des contre-exemples existent où, malgré une phase larvaire longue, des espèces présentent une forte structure génétique, témoignant d'un isolement conséquent entre populations (Kordos & Burton, 1993; Todd *et al.*, 1998; Shanks *et al.*, 2003).

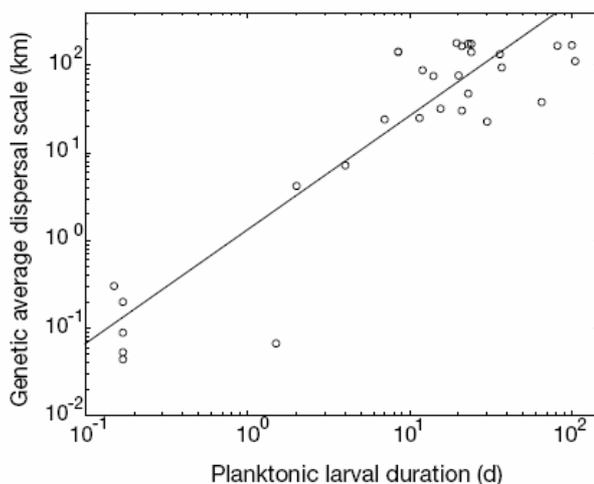


Figure i.8. Relation entre la durée de phase larvaire et la dispersion moyenne estimée sur la base des distances génétiques, pour 32 espèces marines (Siegel *et al.*, 2003).

Divers mécanismes sont susceptibles de moduler les échanges entre populations. L'hydrodynamisme est le premier de ces facteurs ; l'existence de structures physiques tels que

les gyres et les 'upwellings' font office de barrières aux flux de larves et modifient ainsi la connectivité entre les populations (Rougharden *et al.*, 1988). La nature irrégulière du trait de côte tend à renforcer les structures hydrodynamiques de rétention et/ou d'expulsion à proximité des côtes et ainsi modifier les trajectoires larvaires (Gaines & Bertness, 1992). Les études récentes de modélisation du transport larvaire tendent d'ailleurs à souligner l'importance des phénomènes de rétention locale des larves (Cowen *et al.*, 2000; Ellien *et al.*, 2000; Sponaugle *et al.*, 2002). En outre, certaines études tendent à montrer que le comportement larvaire est suffisamment efficace pour que les larves ne soient pas véhiculées par les courants hydrodynamiques comme des particules passives (Olmi, 1994; Thiébaud *et al.*, 1996; Shanks & Brink, 2005) et ainsi limiter leur dispersion, même pour des espèces avec une longue phase pélagique.

3.3. Avantages et désavantages de la phase larvaire

Puisqu'il existe des organismes à phase larvaire courte et d'autres à phase larvaire longue, et qu'il existe en outre des possibilités de moduler cette dispersion, c'est qu'il existe donc des avantages à disperser et d'autres à rester à proximité du lieu d'émission. L'intérêt majeur que présente la dispersion a été abordé précédemment : elle permet la connectivité entre populations et donc le maintien d'une homogénéité au sein de l'espèce, tout en limitant les possibilités d'autofécondation et donc de dépression consanguine. De plus, elle permet l'augmentation potentielle de l'aire géographique, la capacité de (re)colonisation et limite donc les risques d'extinction de l'espèce (Pechenik, 1999). A l'inverse, s'éloigner de la population d'origine comporte un risque majeur dans la mesure où les larves ne sont pas sûres de trouver au moment du recrutement, un habitat favorable, auquel elles sont adaptées (Palumbi, 1994). Les pressions de prédation et le coût énergétique sembleraient également plus importants pour des larves à phase dispersive longue (Pechenik, 1999).

4. Les objectifs

C'est dans ce cadre très général de distribution des espèces en fonction de leur histoire biogéographique et des capacités de dispersion et de connectivité entre populations en fonction de la durée de la phase larvaire que se situe ce travail de thèse.

L'histoire et le fonctionnement actuel des populations ont ainsi été estimés, par le biais de la génétique des populations, pour deux espèces d'ophiures, *Acrocnida brachiata* (Montagu, 1804) et *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard, 1789), qui présentent des caractéristiques

de cycle de vie contrastées. En effet, ces deux espèces d'ophiures vivent dans des habitats différents : *A. brachiata* est inféodée à un habitat sablo-vaseux, typique des fonds de baie en Manche et donc très fragmenté (Cabioch *et al.*, 1977), tandis qu'*O. fragilis* vit majoritairement sur des fonds caillouteux dans des zones de fort hydrodynamisme qui forment un continuum d'habitat favorable en Manche (Cabioch, 1968). En outre, la durée de la phase larvaire est cinq à six fois plus longue pour la seconde espèce : cycle larvaire court, de quatre jours pour *A. brachiata* (Muths *et al.*, 2006) contre 21 à 26 jours pour *O. fragilis* (McBride, 1907; Morgan & Jangoux, 2002).

Les objectifs de ce travail se divisent en quatre grandes parties :

(1) Travailler sur la structure des populations d'une espèce nécessite avant tout de vérifier qu'il s'agit bien d'un groupe monophylétique. Les deux taxons étudiés correspondent-ils à des entités homogènes ? Si oui, sont-elles suffisamment homogènes pour répondre au concept biologique et typologique de l'espèce ?

(2) La distribution des espèces semble pouvoir s'expliquer, en partie, du fait de leur inféodation à un habitat (Wiens & Graham, 2005). Aussi, si des espèces partagent à l'heure actuelle, le même habitat, il semble raisonnable d'envisager qu'elles partagent également une partie de leur histoire. Les lignées cryptiques découvertes chez deux espèces de polychètes des peuplements de sables fins envasés (*Pectinaria koreni* et *Owenia fusiformis* ; Jolly *et al.*, 2006) suggèrent que ces deux espèces ont vécu, au moins en partie, une histoire vicariante commune. L'ophiure *A. brachiata*, inféodée à l'habitat de ces deux polychètes, partage-t-elle la même histoire de vicariance ou cette espèce a-t-elle eu une histoire évolutive différente reflétant plus son développement larvaire ? A l'inverse, bien que vivant dans un habitat différent des sables fins envasés, l'ophiure *O. fragilis* partage-t-elle la même histoire du fait d'une durée de vie larvaire plus proche ? Qu'en est-il de l'intégrité génétique de cette espèce au travers de la zone frontalière Boréo-lusitanienne ?

(3) A ces patrons historiques de colonisation de la Manche se superposent les échanges actuels de gènes entre populations. Cette juxtaposition pose de nombreuses questions : quelle est la part des phénomènes contemporains sur la structure actuelle des populations d'ophiures ? Est-il possible de dissocier les flux géniques historiques et contemporains à l'échelle de l'Atlantique Nord et de la Manche ? Si oui, existe-t-il un lien entre le degré de connectivité entre populations et la durée de la phase larvaire ? L'espèce *O. fragilis* est considérée, par le biais de la modélisation de la dispersion larvaire, comme une seule métapopulation à l'échelle de la Manche, englobant l'ensemble des populations au sud et au

centre de la Manche (Ellien, 2001). Cette importante capacité de dispersion suffit-elle à homogénéiser l'espèce à grande échelle spatiale, au delà des fronts hydrodynamiques et des zones de transition ? A l'inverse, une phase dispersive très réduite permet-elle d'assurer un minimum de connectivité entre les populations ?

(4) Enfin, estimer le degré de connectivité entre populations à grande échelle passe également par une meilleure connaissance du fonctionnement démographique des populations. Les deux espèces présentent des fonctionnements démographiques connus, du fait d'études préalables, en Baie de Douarnenez et en Baie de Seine pour *A. brachiata* (Bourgoin, 1987; Harlay *et al.*, en prep.) et dans le détroit du Pas de Calais et en Belgique pour *O. fragilis* (Davoult *et al.*, 1990; Morgan, 2004). Ces études présentent d'importantes disparités qui poussent à s'interroger sur la stabilité spatio-temporelle de ce fonctionnement et de son influence potentielle sur la pérennité des populations. Existe-t-il des règles de fonctionnement propres à chaque population ou le fonctionnement est-il de type chaotique ? Le schéma de métapopulation appliqué à l'espèce *O. fragilis* peut-il expliquer des écarts de structure et de fonctionnement à grande échelle par rapport aux attendus théoriques des modèles classiques de population ? L'ensemble de ces observations permet-elle de mieux cerner la dynamique globale de l'espèce ?

Pour répondre à ces multiples questions, une approche complémentaire de génétique et de dynamique de populations a été adoptée pour l'étude en parallèle des deux espèces.



Dans le but de pouvoir comparer les travaux effectués sur les deux espèces d’ophiures à travers la structure de leurs populations, une stratégie d’étude similaire a été adoptée. Aussi et afin d’éviter les redondances dans les chapitres suivants, le maximum d’informations méthodologiques est présenté dans ce chapitre. Une description plus détaillée des aires et des stratégies d’échantillonnage est réalisée au sein des chapitres propres à chacune des deux espèces.

1. Zone d’étude et méthodes d’échantillonnage

1.1. Echantillonnage réalisé pour les analyses génétiques

L’étude de la structure génétique des populations d’ophiures a nécessité un échantillonnage spatialisé (Figure I.1), principalement réalisé lors de missions océanographiques à bord des navires Côtes de la Manche et Côtes d’Aquitaine: Pectow en 2003 pour les échantillons de Manche, Pectirl en 2004 pour les échantillons de Mer d’Irlande, Ophirois I, II et III en 2005 pour les populations de Bretagne.

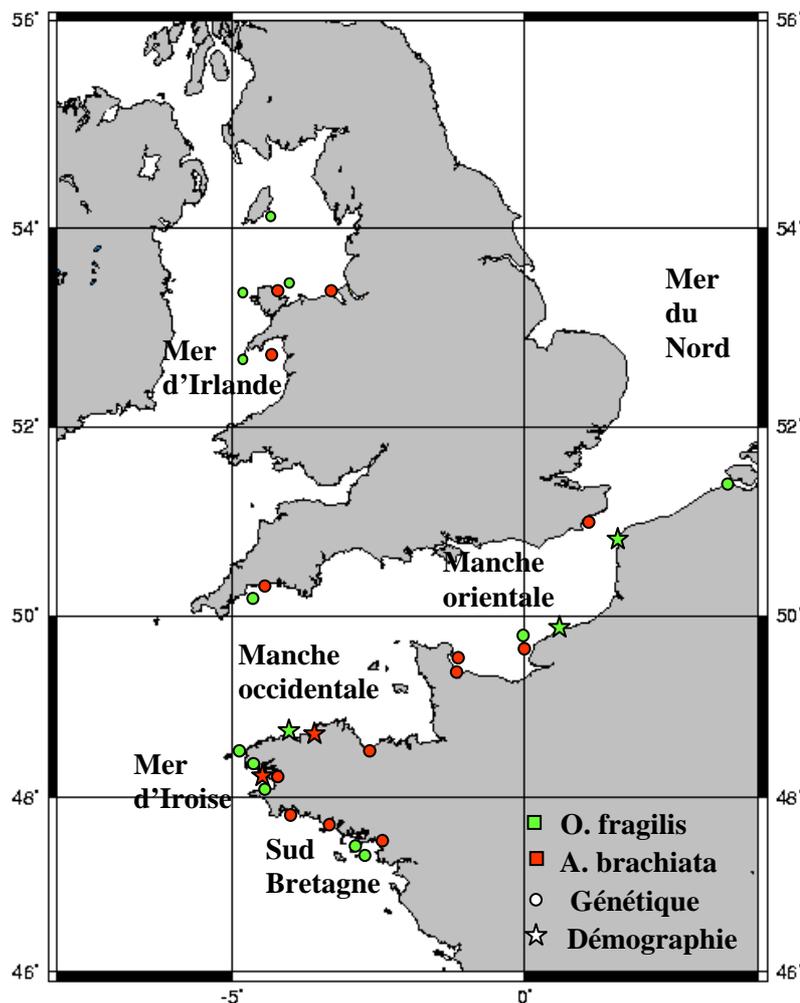


Figure I.1. Carte représentant l’aire géographique échantillonnée pour les deux espèces *A. brachiata* et *O. fragilis*.

Les échantillons d'*O. fragilis* sont réalisés par dragage (Figure I.2); quand l'échantillonnage est réalisé sur une population dense, un seul coup de drague peut permettre de récolter plusieurs centaines d'individus. Les échantillons subtidaux d'*A. brachiata* sont récoltés à la benne Smith ou Hamon (surface échantillonnée = 0,1 m² et 0,25 m² respectivement). Plusieurs coups de benne sont souvent nécessaires pour récupérer une cinquantaine d'individus, même sur des populations denses (car les corps des ophiures sont enfouis profondément dans un sédiment compact). Les échantillons intertidaux sont obtenus grâce à des collectes isolées. A ces échantillons, s'ajoutent des spécimens plus 'exotiques' généreusement envoyés par des collaborateurs européens.



Figure I.2. Techniques d'échantillonnage des ophiures : En haut à gauche, quadrat, tamis et bêche pour les échantillons intertidaux d'*A. brachiata*. En bas à gauche, remontée de la Benne Hamon à bord du Côtes de la Manche. Le sédiment prélevé est ensuite tamisé et trié à bord (en bas à droite), afin de récupérer et fixer les échantillons subtidaux d'*A. brachiata*. En haut à droite, la drague Rallier du Baty pour les échantillons subtidaux d'*O. fragilis*, les échantillons sont triés de la même façon que ceux récoltés à l'aide de la Benne Hamon.

1.2. Échantillonnage réalisé pour les suivis temporels des populations

Dans la mesure du possible, l'échantillonnage des suivis démographiques a été réalisé à raison de six prélèvements par an, en parallèle sur deux ou trois sites (Figure I.1). Les prélèvements ont été effectués d'octobre 2003 à novembre 2005. Les sites ont été sélectionnés en fonction des connaissances préalables des populations (pérennité, densité), de leur

localisation, de la facilité et de la régularité avec laquelle il était possible d'effectuer l'échantillonnage. Dans le cas d'*O. fragilis*, les trois populations sont subtidales et ont été échantillonnées à la drague Rallier du Baty; il s'agit donc d'un échantillonnage non quantitatif. A l'inverse, les échantillons d'*A. brachiata*, réalisés en deux sites intertidaux, ont permis un échantillonnage quantitatif grâce à l'utilisation de 25 quadrats de 0,1m², le contenu des quadrats étant ensuite récupéré sur des tamis de 2 mm. Le sédiment est bêché, au minimum, sur les quinze premiers centimètres et jusqu'à la couche anoxique. En accord avec les études préalables faites sur chacune des deux espèces, les individus d'*O. fragilis* sont conservés et mesurés vivants tandis que les échantillons d'*A. brachiata* sont fixés au formol à 10% avant les mesures.

De mi-mars à mi-juillet 2006, un échantillonnage complémentaire d'*A. brachiata* a été réalisé par les plongeurs de la Station Biologique de Roscoff, en parallèle dans une population intertidale et une population subtidale de la Baie de Douarnenez, afin d'étudier le suivi temporel de l'indice gonadique selon l'habitat.

2. Analyses de la structure génétique des populations

Afin d'étudier les divers niveaux de structure qui peuvent exister chez ces deux espèces d'ophiures, deux marqueurs génétiques ont été utilisés conjointement : le polymorphisme enzymatique et le polymorphisme nucléotidique du gène mitochondrial Cytochrome Oxidase I (mtCOI).

2.1. Choix des marqueurs génétiques : le problème de la neutralité

Parce que les allozymes ont été parmi les premiers marqueurs génétiques disponibles, ils ont été pendant longtemps les plus utilisés en génétique des populations. Leur faible coût a aussi été un argument important à leur utilisation massive. Cependant, un marqueur intéressant en génétique des populations doit avant tout être polymorphe, certes mais également neutre. Or la neutralité des marqueurs allozymiques a été fortement remise en cause. En effet, certaines études montrent une forte discordance entre les données des microsatellites et celles obtenues sur les allozymes chez, par exemple, l'huître américaine *Crassostrea virginica* (Karl & Avise, 1992) ou chez le bar *Dicentrarchus labrax* (Lemaire et al., 2000), cette discordance étant due à la sélection qui agirait sur les allozymes et balancerait les fréquences alléliques en dépit de fortes contraintes aux flux géniques. De nombreuses autres études tendent à démontrer que certains locus allozymiques sont fortement soumis à

sélection : c'est par exemple le cas de la Phospho-Gluco Mutase chez la palourde *Ruditapes decussatus* (Borsa *et al.*, 1992), de la Mannose Phosphate Isomérase et la Phospho-Gluco Isomérase chez la balane *Semibalanus balanoides* (Schmidt & Rand, 2001; Dufresne *et al.*, 2002; Veliz *et al.*, 2004) ou de la Malate Deshydrogénase chez le papillon *Bicyclus aninana* (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Cependant, la synthèse réalisée par Baer (1999) sur 102 études de populations de poissons indique que la variance inter-locus des distributions de fréquences alléliques révèle une faible influence de la sélection qui agit généralement sur un petit nombre de locus. Ainsi, si la sélection peut influencer sur les distributions alléliques à un ou plusieurs locus, des jeux de données multi-locus semblent néanmoins pouvoir retracer les processus de flux entre populations, avec toujours une réserve lors de l'interprétation du fait de la non-neutralité des marqueurs allozymiques.

L'autre marqueur génétique utilisé dans cette étude est l'ADN mitochondrial de la Cytochrome Oxydase I. Du fait du développement des techniques d'amplification de l'ADN et de séquençage, ce marqueur est désormais couramment utilisé en génétique des populations, notamment pour tracer l'histoire évolutive des taxons. Le gène mitochondrial présente comme avantages majeurs d'évoluer rapidement (donc d'être souvent polymorphe et de présenter, en absence d'effet sélectif, une relation directe entre ce polymorphisme et la taille de la population), d'être non-recombinant (puisque à transmission uniparentale, chez de nombreuses espèces) et de présenter un polymorphisme neutre. Or ces deux derniers postulats, longtemps établis, sont actuellement remis en cause. Des phénomènes de recombinaison ont ainsi été mis en avant pour expliquer les taux de mutation rencontrés chez les Hominidés (Awadalla *et al.*, 1999) et chez les animaux (Smith & Smith, 2002), même si d'autres études tendent à minimiser l'hypothèse de la recombinaison (Innan & Nordborg, 2002). Il en va de même pour l'évolution neutre du gène mitochondrial. Des travaux récents (Bazin *et al.*, 2006; Eyre-Walker, 2006) semblent montrer que la diversité du gène mitochondrial serait plus sous l'influence d'une évolution adaptative récente que de la variation de la taille des populations (ce qui en fait son principal attrait d'un point de vue démogénétique). Si ces découvertes tendent à nuancer les attraits du gène mitochondrial, le débat demeure cependant ouvert (Wares *et al.*, en prep.).

Au vu de ces problèmes de neutralité, l'utilisation conjointe de deux marqueurs génétiques semble être une stratégie pertinente pour valider certaines interprétations. En outre, ces deux types de marqueurs permettent de différencier, de façon plus ou moins sensible, les processus qui agissent ou ont agi à différentes échelles spatio-temporelles. Le polymorphisme nucléotidique du gène mitochondrial de la COI permet ainsi de déceler des ruptures

phylogéographiques et des processus de colonisation à macroéchelle qui peuvent être confirmés par le polymorphisme enzymatique. A l'inverse, les allozymes permettent d'analyser les échanges génétiques actuels entre les populations, à des échelles géographiques plus réduites. En outre, en raison de modes d'hérédité distincts entre le génome nucléaire (à hérédité biparentale) et le génome mitochondrial (à hérédité uniparentale), la comparaison des résultats obtenus sur les deux types de marqueurs peut permettre de révéler des processus non détectés par l'étude d'un seul type de marqueur (Asmussen & Basten, 1994). La confrontation des profils obtenus avec les deux types de marqueurs peut par exemple mettre en évidence des processus d'hybridation et d'introgession. Cela multiplie, en outre, les chances d'observer dans l'aire naturelle des espèces, des signatures génétiques distinctes en fonction des régions ou des populations étudiées. L'étude cyto-nucléaire peut être ainsi révélatrice du mélange de lignées évolutives divergentes au sein d'une même population ou encore de phénomènes de dérive génétique marquée (Awise *et al.*, 1990; Fu & Arnold, 1992).

La question s'est néanmoins posée de travailler avec d'autres marqueurs génétiques. Le développement d'une banque microsatellite s'avérait être une entreprise trop délicate, d'autant qu'il y avait deux espèces cibles. De plus, les microsatellites sont souvent caractérisés par un très fort polymorphisme (jusqu'à 50 allèles par locus; Jarnes & Lagoda, 1996), notamment chez les invertébrés marins (Jolly *et al.*, 2003); un excès de polymorphisme devient alors vite limitant dans l'interprétation des signaux génétiques. Des amplifications d'introns (Jarman *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2002; Peterson *et al.*, 2004) ont également été tentées, en vain. Il semble cependant fréquent que des amorces 'universelles' se révèlent inefficaces pour l'amplification de gènes chez les échinodermes (Baric & Sturmbauer, 1999). Cette étude a donc été effectuée principalement grâce à l'utilisation conjointe du séquençage d'un fragment du gène mitochondrial de la cytochrome oxydase I et du génotypage des individus à certains locus allozymiques.

2.2. Analyses du polymorphisme nucléotidique mitochondrial

2.2.1. Extraction – Amplification – Séquençage

Les extractions d'ADN sont réalisées grâce au protocole CTAB défini dans Jolly *et al.* (2003) et détaillé en annexe. Les premières amplifications du gène mitochondrial de la Cytochrome Oxydase I (COI) ont été réalisées grâce à des amorces définies par Mc Mullin *et al.* (2003) dans des régions du gène COI conservées entre diverses espèces d'Invertébrés.

L'obtention de ces séquences a permis la synthèse d'amorces spécifiques : pour *A. brachiata*, Ab-COIF: 5'- ATTTGGAAACTGACTYGTCC - 3' et Ab-COIr: 5'- GTYGCTGCTGTRAARTAGG - 3' et pour *O. fragilis*, OF-COIF : 5'- CCCATAATGATAGGAGGATT -3' et OF-COIr : 5'- TTGTASYGGCGGTGAAGW - 3', permettant d'amplifier des fragments de 598 et 542 pb, respectivement. Les réactions d'amplification (par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR) se font dans les mêmes conditions pour les deux espèces, soit dans 27 µl contenant 1X de tampon, 2mM de MgCl₂, 25 µM de chaque dNTP, 0,2 µM de chaque amorce, 0,5 U de Taq-Polymérase et environ 25 ng d'ADN. La réaction d'amplification comporte 40 cycles à trois températures (45 sec à 94°C, 60 sec à 54°C et 70 sec à 72°C) compris entre une phase de dénaturation initiale (5 min à 94°C) et une phase d'élongation finale (7 min à 72°C). Un contrôle d'amplification est réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose (1% dans TBE 1X, visualisation grâce au Bromure d'Ethidium).

Afin d'augmenter la qualité du signal, les premières réactions de séquençage sont effectuées après multiplication du nombre de copies du fragment de la COI par clonage bactérien. Dans ce cas, les produits PCR sont ligués à l'aide du kit de clonage pGEM®-T Vector Systems (Promega corporation, Madison, W.I., USA). Cette étape consiste à insérer le fragment d'ADN dans un vecteur, dans un ratio 1/2 à 1/5, contenant un gène de résistance à un antibiotique, l'ampicilline dans le cas présent. La seconde étape est la transformation de bactéries compétentes avec le plasmide contenant l'insert : incorporation de ces vecteurs, par choc thermique (90 sec à 42°C), dans des bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5α-phage résistantes. Ces bactéries sont ensuite mises en culture sur milieu gélosé LuriaBertani (LB), supplémenté en Ampicilline (100 µg.ml⁻¹), X-galactose (2%) et IPTG (0,2 M) à 37° sur une nuit. Les colonies bactériennes présentant un insert (contrôle visuel) sont repiquées dans 1250 µl de milieu LB liquide supplémenté en ampicilline (100 µg.ml⁻¹) et mises en culture durant une nuit à 37°C sous agitation à 300 rpm. La taille de l'insert est vérifiée par amplification. Les plasmides contenant l'insert sont purifiés par 'miniprep' selon le protocole de Sambrook et al. (1989); les produits purifiés vont ensuite servir à la réaction de séquençage. Le clonage est utilisé pour l'acquisition des cent premières séquences. Par la suite, le séquençage est effectué directement sur les produits de la PCR (purifiés grâce à un filtrage par le vide sur les plaques MultiScreen-PCR MANU03010 (Millipore) et une remise en suspension de l'ADN cible retenu dans de l'eau stérile).

La réaction de séquence est réalisée par la technique d'incorporation de nucléotides fluorescents (Big Dye Terminator, PerkinElmer); elle comporte, après une phase de

dénaturation initiale de 5 min à 94°C, 50 cycles de trois phases (30 sec à 96°C, 30 sec à 54°C et 4 min à 60°C). A l'issue de cette réaction de séquençage, une étape de purification est réalisée sur plaques MAHVN4510 (Millipore) avant que les séquences soient visualisées sur un séquenceur automatique à capillaire ABI3100. Afin de dupliquer l'information, l'ensemble des produits de PCR est séquencé dans les deux sens, avec les amorces spécifiques Ab-COIf/Ab-COIr et OF-COIf/OF-COIr. La qualité de chacune des séquences est vérifiée visuellement et les erreurs (pics anormaux sur le chromatogramme, différences entre le chromatogramme et la séquence au format texte) sont corrigées en comparant les brins positif et négatif, permettant d'obtenir une séquence unique, de qualité, par individu. L'ensemble des séquences est aligné grâce au programme Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) intégré au programme BioEdit (Hall, 1999).

D'autres réactions d'amplification, de clonage et de séquençage ont été effectuées selon le même protocole pour le gène ribosomique 28S et l'espaceur ribosomique ITS2 (Internal transcribed spacer) pour l'espèce *A. brachiata*. Les amplifications sont réalisées grâce à des couples d'amorces universelles (définies par Holland *et al.* (1991) pour l'espaceur ribosomique ITS2 : 5'-AATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3' et PH19 : 5'-CATCGACACTTYGAACGCA-3'; et définies par Williams *et al.* (1993) pour le gène ribosomique 28S MT3 : 5'-AAAGGATCCGATAGYSRACAAGTACCG-3' et MT4 : 5'-CCCAAGCTTGGTCCGTGTTTCAAGAC-3'). Les conditions d'amplification sont : 24 µl de solution contenant 1X de tampon, 2,5 mM de MgCl₂, 25 µM de chaque dNTP, 0,4 µM de chaque amorce, 1 U de Taq-Polymérase et environ 25 ng d'ADN. Les trois phases des 40 cycles de la réaction d'amplification sont : 45 sec à 94°C, 60 sec à 50°C et 60 sec à 72°C.

2.2.2. Quantification des hybrides

Les réactions d'amplification et de séquençage du gène ribosomique 28S et de l'espaceur ribosomique ITS2 ont pour objectif de détecter l'existence d'événements d'hybridation au sein de l'espèce *A. brachiata* (Chapitre II.2.2) par utilisation de profils de digestion. Pour cela, une recherche d'enzymes de restriction susceptibles de discriminer les profils a été effectuée avec le logiciel BioEdit 6.6 (Hall, 1999). Les produits de la PCR sont ainsi mis à digérer pendant 2 h, parallèlement avec différentes enzymes de restriction, selon les recommandations du fabricant (Biolabs), dans un mélange contenant environ 1 µg d'ADN. Afin d'augmenter l'efficacité de digestion, de la spermidine est ajoutée au mélange (10 mM par puits). Les produits de digestion sont ensuite mis à migrer sur un gel d'agarose et visualiser (TBE 1X, 4% agarose, 0,5 µg.ml⁻¹ BET).

2.2.3. Analyses des données

Les variations génétiques observées sur le marqueur mitochondrial sont le polymorphisme de séquences (nombre et distribution des substitutions nucléotidiques). Une mutation est dite synonyme lorsque, du fait de la redondance du code génétique, elle n'entraîne aucune modification de la séquence protéique. Le terme d'haplotype correspond à une séquence nucléotidique, qui peut être commune à plusieurs individus, mais diffère des autres haplotypes par une ou plusieurs substitution de nucléotides. Un haplotype privé est un haplotype qui ne se retrouve que dans une seule population.

Les relations entre individus ou populations sont visualisées via la construction d'arbres, par agglomération des plus proches voisins (arbres dits de « Neighbor-joining » = NJ, (Saitou & Nei, 1987)), basée sur un calcul de matrice de distances génétiques qui a pour objectif la minimisation de la longueur totale de l'arbre. La distance utilisée est celle du Kimura-2p (= 2 paramètres) qui intègre le fait que les transitions (Q) et les transversions (P) ne sont pas équiprobables lors de l'évolution des séquences, notamment pour l'ADN mitochondrial où les transitions peuvent représenter 90% des mutations (Kimura, 1980). La distance du K2P se calcule selon la formule :

$$D_{K2P} = -\frac{1}{2}\ln(1 - 2P - Q) - \frac{1}{4}\ln(1 - 2Q)$$

La construction des arbres ainsi que les tests sur la constance du taux d'évolution entre lignées et les calculs des distances moyennes (D_{moy}) entre populations et/ou groupes de populations sont effectués grâce au logiciel Mega 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

Les relations entre haplotypes peuvent également être appréhendées par la construction de réseaux d'haplotypes (Figure I.3). Les réseaux de lien moyen (Bandelt *et al.*, 1999), choisis dans cette étude, intègrent l'information contenue dans plusieurs arbres d'envergure minimale ; les connexions ne se font pas que sur les haplotypes présents dans l'échantillonnage mais également sur des haplotypes manquants, augmentant ainsi la diversité du réseau. Ces réseaux d'haplotypes sont construits grâce au logiciel Network 4.1 (disponible à : www.fluxus-technology.com). La construction de ces réseaux est basée sur la théorie de la coalescence (Kingman, 2000). Cette théorie consiste en une approche rétrospective qui décrit mathématiquement le processus de fusion binaire de tous les lignages généalogiques d'un échantillon de gènes jusqu'à leur plus proche ancêtre commun.

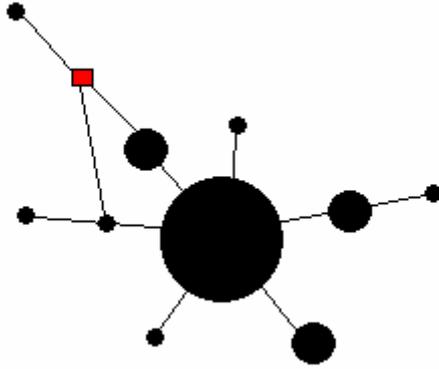


Figure I.4. Exemple de réseau d'haplotypes. Chaque cercle correspond à un haplotype ; la taille du cercle est proportionnelle à la fréquence de l'haplotype dans le jeu de données. La longueur des segments entre chaque haplotype est proportionnelle au nombre de mutations qui les sépare (pas mutationnels). Le carré rouge symbolise un haplotype non détecté durant l'étude mais nécessaire à la construction du réseau (haplotypes manquants ou perdus par dérive au cours de l'évolution).

Les diversités haplotypique et nucléotidique sont estimées pour chaque population grâce au programme DNA_{SP} 4.0 (Rozas *et al.*, 2003). La diversité haplotypique (Hd) définit la probabilité que deux gènes tirés au hasard dans un échantillon soient différents (Nei, 1987) et prend en compte le nombre d'individus ainsi que la fréquence des haplotypes. Le calcul de Hd , avec n , le nombre de gènes dans l'échantillon (égal au nombre d'individus quand le locus est haploïde) et p_i la fréquence de chaque haplotype, est défini par:

$$Hd = \frac{n}{n-1} (1 - \sum p_i^2)$$

La diversité nucléotidique π mesure la divergence nucléotidique moyenne entre toutes les paires de séquences d'un même échantillon (Tajima, 1983) ; elle définit la probabilité que deux gènes tirés au hasard dans un échantillon soient différents au niveau d'un nucléotide donné. Le calcul de π se fait selon la formule :

$$\pi = \sum_{ij} p_i p_j d_{ij}$$

avec p_i la fréquence de l'haplotype i et d_{ij} le nombre de mutations entre les haplotypes i et j .

Le programme DNA_{SP} 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) est également utilisé pour calculer différents tests de neutralité, notamment les valeurs de D de Tajima (1989) et le test de McDonald & Kreitman (1991). La statistique D est basée sur une comparaison de deux estimateurs de θ (mesure du polymorphisme attendu dans une séquence). Lorsque le polymorphisme génétique s'explique par un équilibre entre la mutation et la dérive, alors les deux paramètres sont égaux et le D de Tajima est nul. Au contraire, un excès de variants peu divergents (une ou deux bases de divergence) entraîne un D de Tajima négatif ; cet excès peut être dû à un balayage sélectif (apparition et propagation rapide d'un mutant avantageux dans la population) ou à une expansion démographique récente. Un excès de variants intermédiaires entraîne un D de Tajima positif ; cet excès peut être dû à un effet de sélection

balancée (maintien d'allèles avantageux ancestraux) ou à une diminution démographique (goulot d'étranglement génétique). Le programme DNA_{SP} 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) permet aussi une représentation graphique des distributions de différences nucléotidiques par paires de séquences dans un échantillon défini, permettant la visualisation de l'écart qui peut exister entre la distribution observée des mutations dans la population étudiée et celle théorique (attendue dans une population stable, à l'équilibre mutations-dérive, c'est-à-dire sans variation de taille, sans sélection).

Le test de McDonald & Kreitman (1991) compare l'homogénéité entre les distributions des mutations synonymes et non-synonymes qui sont fixées entre taxons (le ratio K_N/K_S) et de celles qui s'accumulent au sein d'un taxon (le ratio θ_N/θ_S). Si le ratio K_N/K_S est supérieur au ratio θ_N/θ_S , cela signifie qu'au moins un des deux taxons est sous l'effet d'une sélection darwinienne positive, tandis qu'à l'inverse un ratio K_N/K_S inférieur indique le maintien d'un polymorphisme ancestral entre taxons, l'accumulation de mutations légèrement délétères dans le polymorphisme ou l'émergence d'un polymorphisme adaptatif au sein d'un des deux taxons.

Les valeurs de différenciation génétique par paire de populations (ϕ_{st}) ainsi que les probabilités associées sont estimées grâce au logiciel Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2001). Soit π_t la diversité nucléotidique estimée pour l'ensemble des populations et π_s la diversité nucléotidique moyenne de chaque population, alors le calcul de ϕ_{st} prend la forme :

$$\phi_{st} = \frac{\pi_t - \pi_s}{\pi_t}$$

Le logiciel Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2001) est aussi utilisé pour les analyses de variance moléculaire (AMOVA) qui permettent de partitionner la variance totale entre covariances dues à différents niveaux de structure prédéfinis : dans le cas d'une hiérarchie spatiale, par exemple, à l'intérieur d'une population (avec l'indice de fixation associé Φ_{ST}), entre populations à l'intérieur d'un groupe (avec l'indice de fixation associé Φ_{CT}) et entre groupes (avec l'indice de fixation associé Φ_{SC}).

Des estimations des taux de migration passée et des tailles de populations efficaces historiques sont simulées avec le logiciel Migrate_n (Beerli & Felsenstein, 2001) dont le principe repose sur la théorie de la coalescence. Le paramètre θ est estimé, dans le cas d'un gène mitochondrial, par la formule $\theta = N_e \cdot \mu$ (avec N_e , la taille de population efficace et μ , le taux de mutation par site nucléotidique par génération) d'où se déduit $N_e m$, le nombre de migrants moyen efficace par génération, par $N_e m = \theta \cdot M$ (avec $M = m/\mu$, et m , le taux de

migration par génération). Le logiciel s'appuie sur une approche de Monte Carlo par chaînes de Markov (MCMC) pour déterminer, selon la méthode du maximum de vraisemblance, l'arbre de coalescence le plus vraisemblable dans l'univers des généalogies possibles. Le logiciel permet de coupler petites et longues chaînes MCMC (dans notre cas, dix courtes chaînes de 500 pas et trois longues chaînes de 5000 pas) et de synthétiser plusieurs jeux de simulations (dix dans notre cas), augmentant encore la vraisemblance des résultats.

2.3. Analyses allozymiques

2.3.1. Manipulations

Les allozymes ont déjà été utilisés pour caractériser la structure génétique de nombreuses espèces d'Echinodermes (Poulin & Féral, 1994; Féral *et al.*, 1995; Knott & Hopkins, 1998; Uthicke *et al.*, 1998; Manchenko & Yakovlev, 2001; Matsuoka & Asano, 2003). Sur la base de ces études, une vingtaine de systèmes enzymatiques a été identifiée comme *a priori* informatifs et testée pour les deux espèces d'intérêt. Seules cinq enzymes pour *A. brachiata* et sept pour *O. fragilis* sont polymorphes et présentent des bandes facilement identifiables (Tableau I.1).

Tableau I.1. Caractéristiques des différents systèmes enzymatiques utilisés pour chacune des espèces

Nom	Systèmes enzymatiques			<i>A. brachiata</i>		<i>O. fragilis</i>	
	Abbré- viation	Code international	Structure quaternaire	Tampon	Voltage	Tampon	Voltage
Hexokinase	<i>Hk</i>	EC 2.7.1.1	Monomère	TBE 8,6	160V	TBE 8,6	200V
Malate Deshydrogenase	<i>Mdh</i>	EC 1.1.1.37	Dimère	-	-	TC 8	200V
Malico-Enzyme	<i>Me</i>	EC 1.1.1.40	Trimère	Tris-HCl	150V	TC 8	200V
Mannose Phosphate Isomérase	<i>Mpi</i>	EC 5.3.1.8	Monomère	Tris-HCl	150V	TBE 8,6	200V
Phospho Gluco Isomérase	<i>Pgi</i>	EC 5.3.1.9	Dimère	Tris-HCl	150V	TC 8	200V
Phospho Gluco Mutase	<i>Pgm</i>	EC 2.7.5.1	Monomère	TBE 8,6	160V	TC 8	200V
Pyruvate Kinase	<i>Pk</i>	EC2.7.1.40	Monomère	-	-	TBE 8,6	200V

Les extraits allozymiques sont obtenus par broyage manuel du disque des animaux (frais ou congelés) dans 100-200 µl de tampon d'extraction (recette en annexe) puis récupérés dans le surnageant après centrifugation (10 min, 14000g, 4°C). Les extraits sont ensuite placés dans un gel d'amidon 12%. Les conditions de migration et de révélation histochimique pour les différentes enzymes sont celles décrites dans Pasteur *et al.* (1987), présentées dans le Tableau I.1 et détaillées en annexe. L'allèle le mieux représenté à chaque locus est appelé 100, les autres allèles sont ensuite numérotés en fonction de leur migration respective vis-à-vis de cet allèle. Chaque individu est ainsi génotypé pour les différentes enzymes.

Les extractions allozymiques des individus la Baie de Douarnenez (Chapitre II.2) ont été réalisées en binôme avec Yvan LeBras, stagiaire de M1 (janvier 2006).

2.3.2. Analyses des données

Différents descripteurs statistiques sont calculés afin de mieux cerner la diversité génétique qui caractérise les populations de chaque espèce : le nombre moyen d'allèles par locus ainsi que la richesse allélique (nombre moyen d'allèles par locus, estimé pour une taille de population théorique, commune à l'ensemble des populations : elle permet une comparaison plus fiable de la diversité entre populations). L'hypothèse nulle d'indépendance entre les locus est testée à l'aide d'une analyse de déséquilibre de liaison génotypique entre les locus. Le calcul des fréquences alléliques permet ensuite d'estimer les écarts entre l'hétérozygotie observée et l'hétérozygotie attendue non biaisée selon Nei (1987). L'ensemble de ces paramètres, sauf la richesse allélique estimée par FSTAT 2.9 (Goudet, 1995), est calculé grâce au logiciel Genepop 3.3 (Raymond & Rousset, 1995).

La déviation par rapport aux proportions d'Hardy-Weinberg (structure attendue dans une population panmictique) est estimée au sein de chaque population par le calcul du Fis (Wright, 1969). Le niveau de différenciation génétique par paire de populations est estimé grâce au calcul de l'estimateur θ de Weir & Cockerham (1984). L'estimation de θ , pour un locus tous allèles i confondus, est donnée par la formule :

$$\theta = \frac{\sum a_i}{\sum (a_i + b_i + c_i)}$$

avec, a_i la composante de la variance des fréquences alléliques inter-population, b_i la composante intra-population, et c_i , la composante, entre gamètes à l'intérieur de chaque individu (avec les calculs de a_i , b_i et c_i détaillés dans Weir & Cockerham, 1984). Les valeurs de Fis et de θ sont calculées avec le logiciel Genetix 4.02 (Belkhir *et al.*, 2000) de même que leur significativité, évaluée par la méthode des permutations aléatoires. Dans le cas des tests multiples de θ , le seuil de significativité α a été utilisé tel quel mais a également été corrigé à l'aide d'une procédure de Bonferroni. Le logiciel Genepop 3.3 (Raymond & Rousset, 1995) est utilisé pour calculer les probabilités associées aux tests de Mantel qui permet de tester le degré de corrélation de deux matrices de distances (distance génétique et distance géographique, dans le cas présent).

Des analyses AMOVA sont effectuées sur la base des fréquences allozymiques, comme avec les données mitochondriales, grâce au logiciel Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2001).

Le logiciel PCA-Gene 1.2 (Goudet, 1999) est utilisé pour réaliser des Analyses en Composantes Principales (ACP) sur les fréquences alléliques par population tandis que le logiciel Genetix 4.02 (Belkhir *et al.*, 2000) permet d'effectuer des Analyse Factorielles des Correspondances (AFC) sur les génotypes individuels.

Les tests d'assignation sont effectués grâce au logiciel GeneClass v2 (Piry *et al.*, 2004). Cette méthode est basée sur l'approche bayésienne développée par Rannala & Mountain's (1997) et l'algorithme de simulation de Paetkau *et al.* (2004) qui détermine la probabilité d'obtenir un génotype multilocus particulier connaissant un résident et une source potentielle, sous l'hypothèse que les locus sont indépendants. Les individus sont assignés à la plus probable des populations parmi celles de l'étude. Les différents groupes d'appartenance peuvent être définis, par exemple, en fonction de l'origine géographique des individus ou de leur signature haplotypique (pour détecter des hybrides).

3. Analyses de la structure morphologique des populations

3.1. Mesures biométriques

Le critère communément retenu pour les analyses démographiques chez les ophiures est le diamètre du disque (Dd), représenté sur la Figure I.4, comme défini par Guille (1964), c'est à dire la distance entre l'extrémité d'une paire de boucliers dorsaux (= plaques dorsales) et le milieu du segment défini par les deux paires de boucliers dorsaux qui lui font face. Les mesures sont réalisées sous loupe binoculaire, avec un oculaire micrométrique (précision = 1/12^{ème} de mm).



Figure I.4. La mesure du diamètre du disque qui sert aux études démographiques (Dd) est représentée par la double flèche rouge. Les photos des disques céphaliques des deux espèces, *A. brachiata* et *O. fragilis*, sont présentés à côté pour imaginer l'allure des plaques dorsales chez chacune de ces deux espèces (les disques présentés font environ 10 mm).

Dans le cadre de la recherche de critères biométriques validant l'hypothèse de variétés chez *O. fragilis* (chapitre III.1), des mesures morphométriques ont été effectuées, avec pour

chaque individu, six paramètres mesurés : le diamètre du disque (Dd), la longueur du bras entier le plus long (Lg), la largeur d'un bras au niveau du second segment apparent en face dorsale (larg), la longueur des piquants brachiaux sur ce second segment (Piqt Br : moyenne des mesures effectuées sur cinq piquants), la longueur (LPD) et la base (BPD) d'une plaque dorsale. L'ensemble de ces mesures est également effectué sous loupe binoculaire, à l'aide d'un oculaire micrométrique.

3.2. Analyses démographiques

Les mesures individuelles de diamètre de disque sont regroupées par classe de taille permettant la construction d'histogramme de distribution de fréquences de classe de taille. Le pas de classe utilisé est celui pris en compte lors d'études précédentes sur ces deux espèces, soit 0,5 mm pour *A. brachiata* et 1 mm pour *O. fragilis*. Afin d'identifier les différentes cohortes apparaissant et croissant au sein de chaque population, ces histogrammes subissent une décomposition modale selon la méthode des différences logarithmiques de Battacharya (1967), effectuée grâce au logiciel Normsep de Tomlinson (1970) adapté par Glémarec & Ménesguen (1979). La décomposition est basée sur une méthode itérative qui utilise un critère de maximum de vraisemblance pour donner le meilleur ajustement mathématique (testé par un χ^2 de conformité) entre une combinaison de distributions normales et la distribution observée (Figure I.5). Les estimations de croissance des cohortes sont effectuées en suivant la valeur moyenne de ces distributions normales au cours du temps.

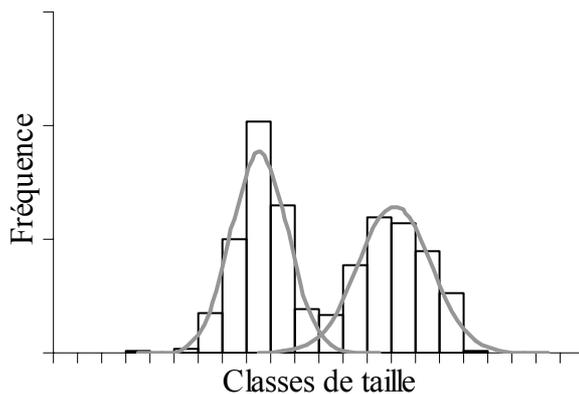


Figure I.5. Exemple de décomposition modale selon le logiciel Normsep. L'histogramme représente les fréquences observées des différentes classes de taille. Les courbes, en gris, représentent les décompositions modales associées à chaque cohorte.

3.3. Analyses de la maturité sexuelle

La maturité sexuelle des populations est étudiée uniquement pour *A. brachiata* (Chapitre II.2.2), par le biais d'un suivi temporel de l'indice gonadique. Celui-ci a été effectué selon le même protocole que celui utilisé par Bourgoïn (1987). Une vingtaine d'individus (de diamètre de disque supérieur à 7 mm) a été fixée au Bouin puis disséquée sous binoculaire.

Les gonades sont séparées du reste de l'organisme ; les tissus somatiques et gonadiques sont placés séparément à l'étuve à 60°C pendant 24 heures avant d'être pesés au 1/10^e de mg près. Les bras, coupés au niveau du disque, ne sont pas pris en compte dans l'évaluation du poids total du corps (excluant ainsi la variabilité inter-individus due à des proportions différentes de bras en régénération). L'indice gonadique (IG) est déterminé grâce au rapport suivant :

$$IG = \left(\frac{\text{poids sec de gonades}}{\text{poids sec total}} \right) \times 100$$

3.4. Analyses statistiques

Les analyses multivariées sont des méthodes mathématiques qui permettent de synthétiser l'information contenue dans un ou plusieurs tableaux de données, par une représentation dans un espace de dimension réduite.

L'analyse factorielle des correspondances (AFC) permet de décrire de manière synthétique un tableau de contingence par calcul d'une distance de χ^2 entre le tableau de données brutes et le tableau théorique (si l'ensemble des observations est indépendant des variables). Dans la présente étude, l'AFC est utilisée pour analyser les données démographiques (Chapitre III.3). Elle permet de mieux déceler les tendances cycliques et de visualiser les décalages temporels de structure, entre sites ou entre années.

L'analyse en composantes principales (ACP) est utilisée quand le tableau n'est pas de type contingent, donc traitant plutôt des données quantitatives (n individus, ou objets, décrits par p variables numériques) en utilisant les corrélations existant entre ces variables. L'ACP est utilisée pour traiter les données biométriques chez *O. fragilis*, en fonction de leur origine géographique, leur variété ou leur bathymétrie (Chapitre III.1).

AFC et ACP sont des méthodes dites descriptives par opposition aux méthodes dites explicatives, telle que l'analyse canonique de redondance (ACR). Cette dernière consiste à trouver les combinaisons linéaires qui existent entre variables à expliquer (variables biométriques et/ou génétiques) et variables explicatives (paramètres du milieu : type d'habitat, profondeur ; paramètres de l'espèce : appartenance à une variété) en maximisant la différence entre groupes tout en minimisant la variabilité à l'intérieur de chaque groupe. Seuls les descripteurs discriminants sont retenus pour la représentation graphique.

Les AFC et ACP sont réalisées grâce au logiciel Statbox v6.6. Ce logiciel est aussi utilisé pour réaliser l'ensemble des statistiques univariées de ce travail. Les ACR ont été réalisées par le Pr P. Legendre grâce au programme RDACCA_polynomiale (disponible à : <http://www.fas.umontreal.ca/BIOL/legendre/>).



L'espèce *A. brachiata* (Figure II.1) vit enfouie dans les 15 premiers centimètres du sédiment, dans des substrats de type sablo-vaseux. Elle est répertoriée depuis la Méditerranée (Massé, 1971) jusqu'en Mer du Nord (Ursin, 1960) où elle est abondante et se répartit de part et d'autre du Dogger Bank. Elle est très commune sur les côtes atlantiques françaises, en Manche et sur les côtes irlandaises (Koehler, 1921; Glémarec, 1969; Keegan & Mercer, 1986). L'espèce est présente dans les domaines intertidal et subtidal. Dans son aire méridionale, elle est signalée sur des fonds de 25 m tandis qu'elle peut atteindre les 60 m à l'ouest du Dogger Bank. Par contre, en Mer du Nord, elle est absente de la zone intertidale (Ursin, 1960). L'espèce forme, en milieu subtidal, des peuplements denses pouvant atteindre près de 1000 individus par m² (Keegan & Mercer, 1986; Harlay *et al.*, en prep.). Les densités sont nettement plus faibles sur les hauts fonds et en intertidal, de 50 à 200 individus par m² (Bourgoin, 1987).



Figure II.1. L'espèce *A. brachiata* est caractérisée par un disque arrondi, assez réduit (< 15 mm) et des bras grêles très allongés (15 à 20 fois la taille du diamètre). Les boucliers dorsaux font environ 1/5^{ème} du diamètre du disque.

A. brachiata présente un cycle de vie benthopélagique avec une durée de vie larvaire estimée très courte en conditions naturelles. En effet, le développement larvaire, jusqu'à la métamorphose, se déroule en 4 jours en conditions *in situ* (Figure II.2; Muths *et al.*, 2006). En outre, les larves d'*A. brachiata* n'ont jamais été observées dans aucun suivi planctonique. Le niveau de fécondité est relativement faible (11000 ovocytes par femelle; Gentil & Zakardjian, 1990), avec des pontes constituées d'œufs de diamètre important (entre 180 et 350 µm; Bourgoin, 1987; Gentil & Zakardjian, 1990). L'ensemble de ces observations tend à souligner une phase dispersive très réduite chez cette espèce.

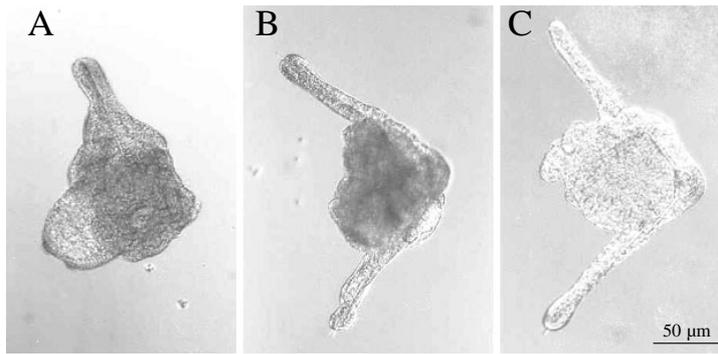


Figure II.2. Observations d'ophioplutei d'*A. brachiata* effectuées par F.Gentil, en juillet 1993 : la larve est âgée en (A) de 6h, en (B) de 36h et en (C) de 60 h. La métamorphose démarre peu après, le squelette du juvénile est déjà en train d'apparaître. Ces larves ont été obtenues en aquarium (eau oxygénée non chauffée) après une ponte spontanée d'adultes collectés à marée basse à Morgat.

L'espèce *A. brachiata* est présente dans les peuplements sablo-vaseux ; c'est, en Manche, le principal échinoderme associé aux communautés à *Abra alba* (Gentil *et al.*, 1986). Les deux espèces de polychètes *Pectinaria koreni* et *Owenia fusiformis* sont également associées à ces communautés. Ces espèces ont récemment fait l'objet d'études génétiques, révélant l'existence de lignées cryptiques au sein des deux espèces (Jolly *et al.*, 2005; Jolly *et al.*, 2006), avec une probable histoire de vicariance très ancienne partagée au sein de l'habitat sablo-vaseux. Deux espèces de Polychètes du genre *Sabellaria* ont vraisemblablement divergé à la même période (Rigal, 2005). Dans le cadre de cette hypothèse, il paraissait intéressant de mener le même type d'approche phylogéographique sur un taxon d'un autre embranchement à vie larvaire courte.

Est-t-il possible d'identifier des lignées au sein de l'espèce *A. brachiata* ? Si oui, est-ce que ces lignées partagent la même histoire que les autres espèces du peuplement de sables fins ? Si non, quelle structure génétique caractérise les populations sur l'ensemble de la zone de répartition ? Existe-t-il alors une influence d'une phase larvaire aussi réduite, à grande échelle spatiale ? Qu'en est-il à plus fine échelle spatiale ? Les résultats confortent-ils l'hypothèse d'isolement des populations par la distance ?

Existe-t-il une stabilité démographique des populations dans le temps ? Qu'en est-il de l'homogénéité spatiale du fonctionnement démographique des populations ?

Dans ce chapitre consacré à l'espèce *A. brachiata*, nous tâcherons donc de voir s'il est possible de retracer l'histoire évolutive de cette espèce et dans quelle mesure elle correspond à celle d'autres espèces du même habitat, de détecter l'existence de flux contemporains de migrants entre populations et de voir en quoi l'étude du fonctionnement démographique peut fournir des pistes pour mieux comprendre les patrons de structure observés entre populations.

Chapitre II.1. Identification de deux lignées écotypiques au sein de l'espèce *Acrocnida brachiata*. Caractérisation de la structure génétique des populations sur l'ensemble de la zone de répartition

(NB Les résultats et discussions de ce chapitre font l'objet d'un article, présenté en Annexe : Muths D., Davoult D., Gentil F. & Jollivet D., 2006. 'Incomplete cryptic speciation between intertidal and subtidal morphs of *Acrocnida brachiata* (Echinodermata: Ophiuroidea) in the Northeast Atlantic', *Molecular Ecology*, 15, 3303-3318)

L'étude à grande échelle spatiale de la structure génétique des populations a été effectuée afin de répondre à deux objectifs majeurs dont le premier était de statuer sur l'homogénéité de l'espèce *A. brachiata* sur l'ensemble de sa zone de répartition. Existe-t-il au sein de l'espèce *A. brachiata*, des lignées cryptiques comme chez les deux espèces de polychètes des peuplements de sables fins (*Pectinaria koreni* et *Owenia fusiformis* ; Jolly *et al.*, 2006) ? Si oui, quels mécanismes ont pu permettre l'apparition et le maintien de ces lignées ? Si non, comment expliquer que des espèces qui partagent actuellement le même habitat n'aient pas vécu la même histoire ? Est-il possible de retracer l'histoire évolutive de cette espèce et de voir dans quelle mesure elle la partage avec d'autres espèces ?

Le deuxième objectif de ce travail était de clarifier le niveau d'organisation spatiale des populations de cette espèce. Au sein d'une lignée, est-il possible de dissocier les flux génétiques historiques et contemporains à l'échelle de l'Atlantique Nord et de la Manche ? Est-ce qu'une phase larvaire courte permet de prédire le degré de connectivité entre les populations d'*A. brachiata* dans la zone d'étude ? Si la structure génétique observée entre les populations reflète la durée réduite de la phase larvaire et la fragmentation de l'habitat, alors un schéma marqué d'isolement par la distance devrait pouvoir être observé : qu'en est-il ?

Démarche

Dans cette partie de l'étude, la structure génétique d'*A. brachiata* est analysée pour des populations des côtes françaises et anglaises, échantillonnées dans le domaine intertidal et subtidal (cf. Figure II.3 pour la localisation des sites et Tableau II.1 pour les coordonnées exactes). Ces populations se répartissent au sein de cinq grands bassins : le Sud Bretagne, la mer d'Iroise (notamment dans la Baie de Douarnenez), la Manche Occidentale, la Manche Orientale et la Mer d'Irlande. L'ensemble des individus est typé à l'aide des séquences d'une portion du gène mitochondrial de la cytochrome oxydase I et de marqueurs allozymiques. Les effectifs d'individus analysés par population sont indiqués dans le Tableau II.1.

(Le symbole # qui apparaît sur les figures et dans les tableaux signifie que l'échantillon a été prélevé en milieu intertidal ; le même symbole est utilisé tout au long de ce chapitre).

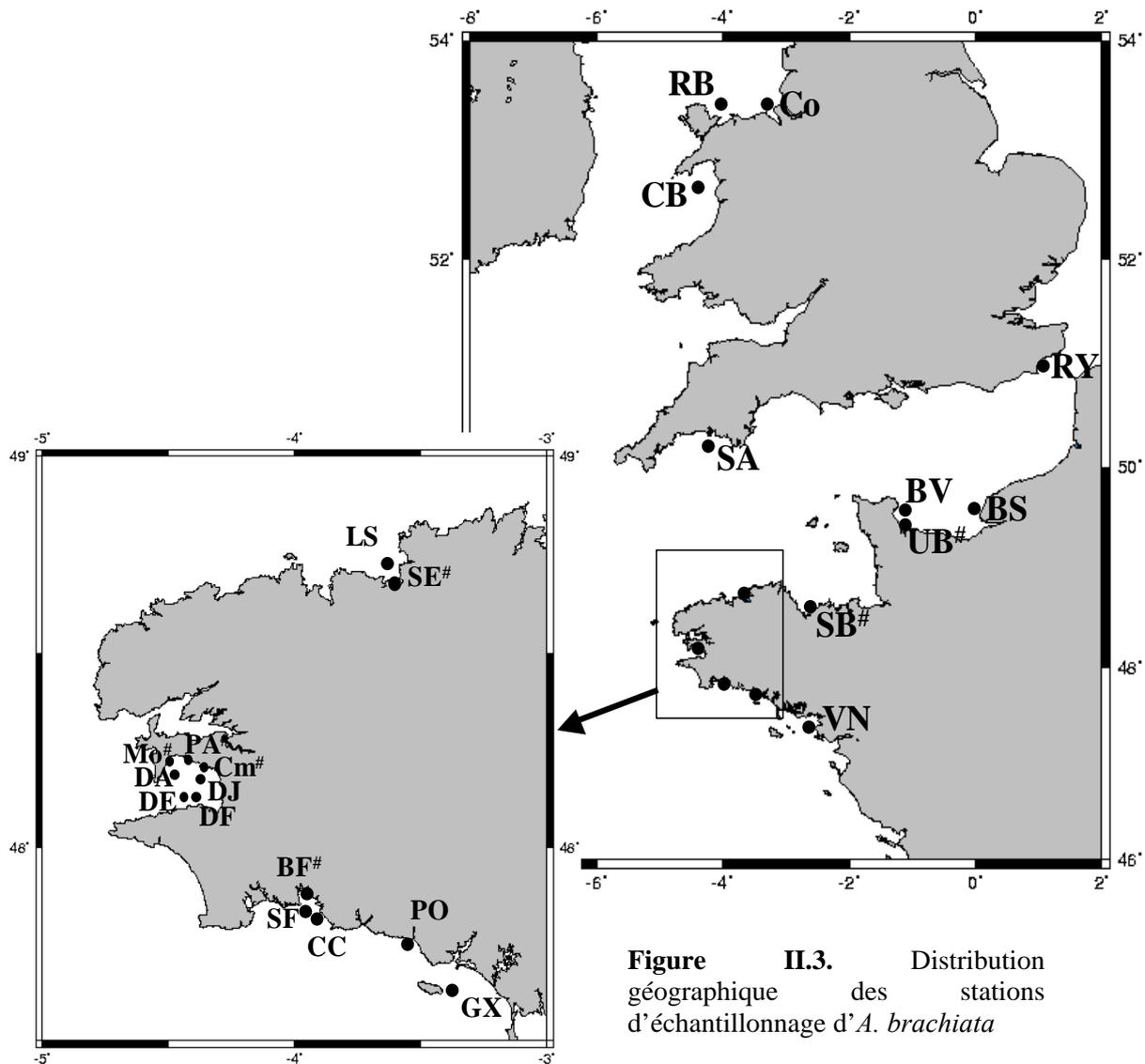


Figure II.3. Distribution géographique des stations d'échantillonnage d'*A. brachiata*

Tableau II.1. Coordonnées des stations d'échantillonnage des populations d'*A. brachiata* et effectifs des échantillons (avec des effectifs totaux $N_{all} = 770$ et $N_{COI} = 594$)

<i>Population</i>	<i>Label</i>	<i>Habitat</i>	<i>Latitude</i>	<i>Longitude</i>	<i>N allozymes</i>	<i>N COI</i>
Portugal	Por	Intertidal	40°53.20'N	8°32.59'W	-	2
Vilaine	VN	Subtidal	47°28.67'N	2°32.74' W	8	4
Groix	GX	Subtidal	47°37.94'N	3°17.98'W	7	7
Pouldu	PO	Subtidal	47°44.06'N	4°31.91'W	26	18
Concarneau	CC	Subtidal	47°51.50'N	3°57.50'W	-	7
Baie de la Forêt	BF #	Intertidal	47°53,42'N	3°57,48'W	48	25
Sous Forêt	SF	Subtidal	47°52.30'N	3°58.12'W	36	12
Morgat	Mo #	Intertidal	48°13.54'N	4°30.30'W	35	26
Douarnenez-A	DA	Subtidal	48°13.53'N	4°29.00'W	33	33
Douarnenez-E	DE	Subtidal	48°07.05'N	4°24.94'W	36	36
Douarnenez-F	DF	Subtidal	48°08.02'N	4°23.46'W	51	51
Douarnenez-J	DJ	Subtidal	48°12.03'N	4°20.17'W	57	57
Cameros	Cm #	Intertidal	48°12.25'N	4°19.27'W	42	42
Aber	PA #	Intertidal	48°13.66'N	4°25.89'W	48	20
Saint Efflam	SE #	Intertidal	48°40.75'N	3°36.41'W	47	27
Lannion-S	LS	Subtidal	48°44.95'N	3°36.50'W	14	13
Saint Brieuc	SB #	Intertidal	48°33.08'N	02°41.24'W	48	15
Baie des Veys	BV	Subtidal	49°32.00'N	1°15.50'W	48	26
Utah Beach	UB #	Intertidal	49°25.04'N	1°10.32'W	48	23
Baie de Seine	BS	Subtidal	49°28.30'N	0°02.28'E	35	31
Cardigan Bay	CB	Subtidal	52°51.23'N	4°11.42'W	35	21
Redwharf Bay	RB	Subtidal	53°20.10'N	4°07.13'W	48	39
Colwyn Bay	CO	Subtidal	53°25.75'N	3°30.06'W	20	19
Rye Bay	RY	Subtidal	50°53.44'N	0°53.45'E	-	19
St Austell Bay	SA	Subtidal	50°18.97'N	4°44.94'W	-	21

1. Identification de deux lignées écotypiques au sein de l'espèce *A. brachiata* et mécanismes de spéciation à l'origine

L'une des principales attaques contre le concept typologique de l'espèce repose sur le diagnostic de nombreuses espèces cryptiques (Mayr, 1948), espèces dont la distinction est à l'origine de débats taxonomiques ou dont la découverte repose sur des caractères non morphologiques. De nombreuses espèces cryptiques ont été découvertes dans la plupart des principaux taxons marins (Knowlton, 2000). Le fait que les espèces cryptiques soient plus communément rencontrées en milieu marin qu'en milieu terrestre repose sur des problèmes d'identification morphologique liés au biologiste certes - car il est logiquement plus délicat d'observer la variabilité morphologique *in situ* - mais aussi liés aux espèces - car les systèmes de reconnaissance entre conspécifiques en milieu marin sont souvent chimiques, plus que visuels (Knowlton, 1993). Des espèces cryptiques ont été découvertes chez de nombreux Echinodermes (Matsuoka & Hatanaka, 1991; Baric & Sturmbauer, 1999; Hart *et al.*, 2003), dont une espèce d'oursin de sable *Echinocardium cordatum*, fréquemment rencontrée en sympatrie avec *A. brachiata* (Chenuil & Féral, 2003). La découverte de lignées cryptiques au sein de l'espèce *A. brachiata* fait l'objet du présent chapitre.

1.1. Résultats

1.1.1. MtCOI

Le séquençage d'un fragment de 598 pb de long du gène mitochondrial de la COI révèle l'existence de 212 sites polymorphes, permettant ainsi de définir 227 haplotypes sur l'ensemble des 558 individus séquencés. Sur ces 212 sites polymorphes, 86,8% des sites sont parcimonieusement informatifs et 13,2% sont des singletons.

Les niveaux de diversité génétique sont présentés dans le Tableau II.2. Les moyennes de diversité haplotypique (Hd) et nucléotidique (π) sont très élevées, respectivement de l'ordre de 0,88 et de 0,005, et du même ordre de grandeur quelle que soit la population. La population de Cameros présente une diversité haplotypique très faible par rapport au reste des populations.

Tableau II.2. Diversité génétique pour l'ensemble des populations avec :

- N_{coi} , le nombre d'individus séquencés ; h , le nombre d'haplotypes ; Hd , la diversité haplotypique ; π , la diversité nucléotidique et Php , la proportion d'haplotypes privés dans chaque population
- N , le nombre d'individus génotypés ; Rs , la richesse spécifique ; $Hn.b.$, l'hétérozygotie attendue non biaisée et $Hobs.$, l'hétérozygotie observée.

	Diversité mitochondriale					Diversité allozymique			
	N_{coi}	h	Hd	π	Php	N	Rs	$Hn.b.$	$Hobs.$
Portugal	2	2	1,000	0,0093	0,5	-	-	-	-
Vilaine	4	4	1,000	0,0011	0,75	8	2,52	0,460	0,375
Groix	7	6	0,952	0,0011	0,57	7	2,80	0,506	0,457
Pouldu	18	15	0,961	0,0048	0,61	26	2,52	0,460	0,423
Concarneau	7	5	0,857	0,0064	0,43	-	-	-	-
Baie de la Forêt	25	20	0,973	0,0060	0,28	48	2,71	0,470	0,327
Sous Forêt	12	11	0,985	0,0064	0,67	36	2,49	0,457	0,484
Morgat	26	15	0,898	0,0052	0,19	35	2,76	0,366	0,383
Douarnenez-A	33	22	0,917	0,0056	0,6	33	2,76	0,480	0,455
Douarnenez-E	36	22	0,911	0,0040	0,45	36	2,32	0,545	0,428
Douarnenez-F	51	19	0,892	0,0069	0,47	51	2,47	0,432	0,349
Douarnenez-J	57	42	0,942	0,0049	0,7	57	2,65	0,492	0,375
Cameros	42	8	0,672	0,0039	0,12	42	2,30	0,458	0,381
Aber (PA-a)	16	11	0,933	0,0047	0,44	44	2,67	0,328	0,300
Aber (PA-b)	4	3	0,833	0,0047	0,5	-	-	-	-
Saint Efflam	28	18	0,960	0,0072	0,44	47	2,35	0,471	0,447
Lannion-S	12	9	0,939	0,0058	0,5	14	2,74	0,418	0,329
Saint Brieuc	15	9	0,914	0,0051	0,67	48	2,59	0,442	0,367
Baie des Veys	25	14	0,874	0,0054	0,31	48	2,54	0,393	0,383
Utah Beach	23	10	0,885	0,0048	0,26	48	2,46	0,407	0,400
Baie de Seine	31	17	0,910	0,0046	0,29	35	3,00	0,437	0,406
Cardigan Bay	21	14	0,938	0,0068	0,24	35	2,82	0,502	0,406
Redwharf Bay	39	21	0,938	0,0059	0,31	48	2,90	0,536	0,421
Colwyn Bay	19	13	0,906	0,0041	0,27	20	3,29	0,494	0,320
St Austell Bay	21	13	0,929	0,0040	0,43	-	-	-	-
Rye Bay	19	9	0,778	0,0033	0,37	-	-	-	-
Lignée S	414	183	0,906	0,0054	0,46	546	2,70	0,507	0,395
Lignée I	144	44	0,861	0,0055	0,35	220	2,52	0,445	0,381

L'analyse des séquences révèle, au sein de l'espèce, l'existence de deux groupes très fortement divergents. Un arbre de lien moyen (basé sur les distances moyennes entre les individus par paires de populations ; Figure II.4) montre en effet une importante divergence de l'ordre de 19,6% entre deux lignées : d'une part, la lignée I qui regroupe la plupart des populations intertidales (à la seule exception de celle de Baie de la Forêt) et, d'autre part, la

lignée S qui réunit l'ensemble des populations subtidales. La population de l'Aber est subdivisée en deux sous-populations, chacune appartenant à une lignée (PA-a dans la lignée S et PA-b dans la lignée I). Cette importante divergence est d'autant plus marquée que la divergence moyenne entre populations au sein de chaque lignée est inférieure à 1%.

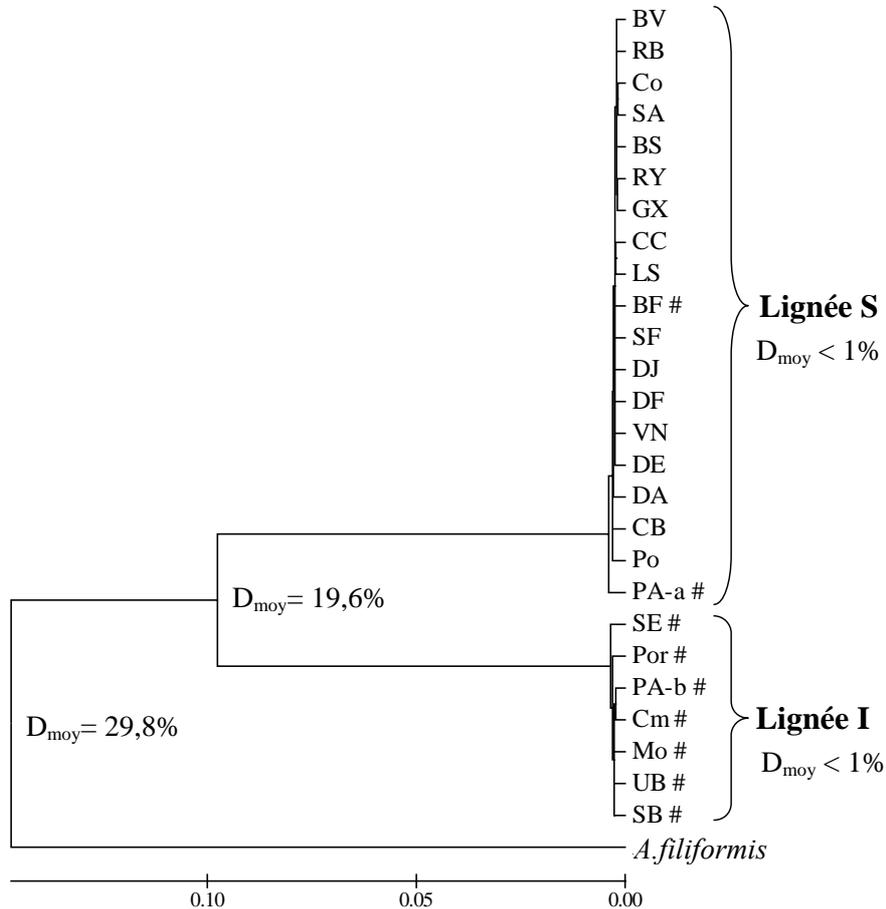


Figure II.4. Arbre NJ basé sur des distances entre paires de populations d'*A. brachiata* (distance de Kimura2p ; réalisé avec le logiciel Mega). D_{moy} est la valeur de divergence moyenne entre deux groupes.

L'hypothèse de la constance du taux d'évolution entre les différentes branches de l'arbre n'est pas rejetée au seuil de 5%, permettant ainsi d'estimer le temps écoulé depuis la séparation en deux lignées. Sur la base d'un taux d'évolution préalablement publié par Bermingham et Lessios (1993) sur les oursins tropicaux (soit 2% substitutions par MA), un taux classiquement rencontré chez les animaux (Rand, 1994), une divergence de 19,6% daterait de plus de 4 MA. Comme comparaison, la divergence entre *A. brachiata* et *Amphiura filiformis*, l'espèce la plus proche, est d'environ 29,8%.

La quasi-totalité des mutations (89,4%) a lieu sur la 3ème base du codon ; cependant,

23 sont non-synonymes. Deux de ces mutations non-synonymes sont fixées entre les lignées, les autres se retrouvent dans le polymorphisme des deux lignées. Pour savoir si l'accumulation de mutations non-synonymes dans chaque lignée reflète un processus adaptatif, une recherche d'un effet sélectif positif au sein des lignées est effectuée le long des séquences. Aucune variation significative de la diversité nucléotidique (π) et de l'écart à l'évolution neutre (D de Tajima) n'est observée le long des séquences. En outre, le ratio de substitutions non-synonymes/synonymes ne dévie pas significativement des attendus neutres (statistique G de McDonald, $G = 1,25$; $p > 0,26$) avec θ_N/θ_S peu différent de K_N/K_S , suggérant que des phénomènes de sélection positive n'ont pas eu d'influence majeure sur l'évolution des lignées.

1.1.2. Allozymes

L'ensemble des individus a été génotypé sur cinq locus enzymatiques polymorphes. Le nombre d'allèles varie de trois à sept, avec une moyenne de 5,4 ($\pm 1,8$). La richesse allélique est sensiblement la même dans toutes les populations, entre 2,30 et 3,29. Les fréquences alléliques (f) soulignent une structure génétique contrastée pour au moins trois des cinq locus (*Hk*, *Pgm*, *Pgi*) pour lesquels deux à quatre allèles sont impliqués (Figure II.5). Alors que cinq des six populations intertidales (toutes à l'exception de celle de Baie de la Forêt) sont caractérisées par des fréquences élevées des allèles *Hk-90* et *Hk-95* ($f > 0,95$), les allèles les plus fréquemment rencontrés dans les populations subtidales sont *Hk-100* et *Hk-105* ($f > 0,95$). Bien que les allèles *Hk-95*, *Hk-100* et *Hk-105* soient présents dans toutes les populations, *Hk-80* et *Hk-90* sont exclusifs des populations intertidales et *Hk-110* n'est présent que dans les populations subtidales. Les locus de la *Pgm* et de la *Pgi* montrent également des schémas d'inversion de fréquences alléliques similaires mais moins prononcés. En fait, les fréquences alléliques sont plus proches entre deux populations distantes de plusieurs centaines de kilomètres habitant le même étage bathymétrique qu'entre deux populations voisines habitant des profondeurs différentes. C'est le cas entre les populations intertidales de Saint Efflam et d'Utah Beach et leurs voisines subtidales respectives de Lannion-S et de Baie des Veys. Cette importante disparité dans les fréquences alléliques de la plupart des populations intertidales d'une part, et de l'ensemble des populations subtidales d'autre part, confirme l'existence de deux groupes génétiques distincts qui ne correspondent pas à leur position géographique mais plutôt à leur position bathymétrique. La population de Baie de la Forêt constitue une exception puisque, bien qu'échantillonnée en intertidal, elle montre un profil allozymique nettement plus proche de celui des populations subtidales.

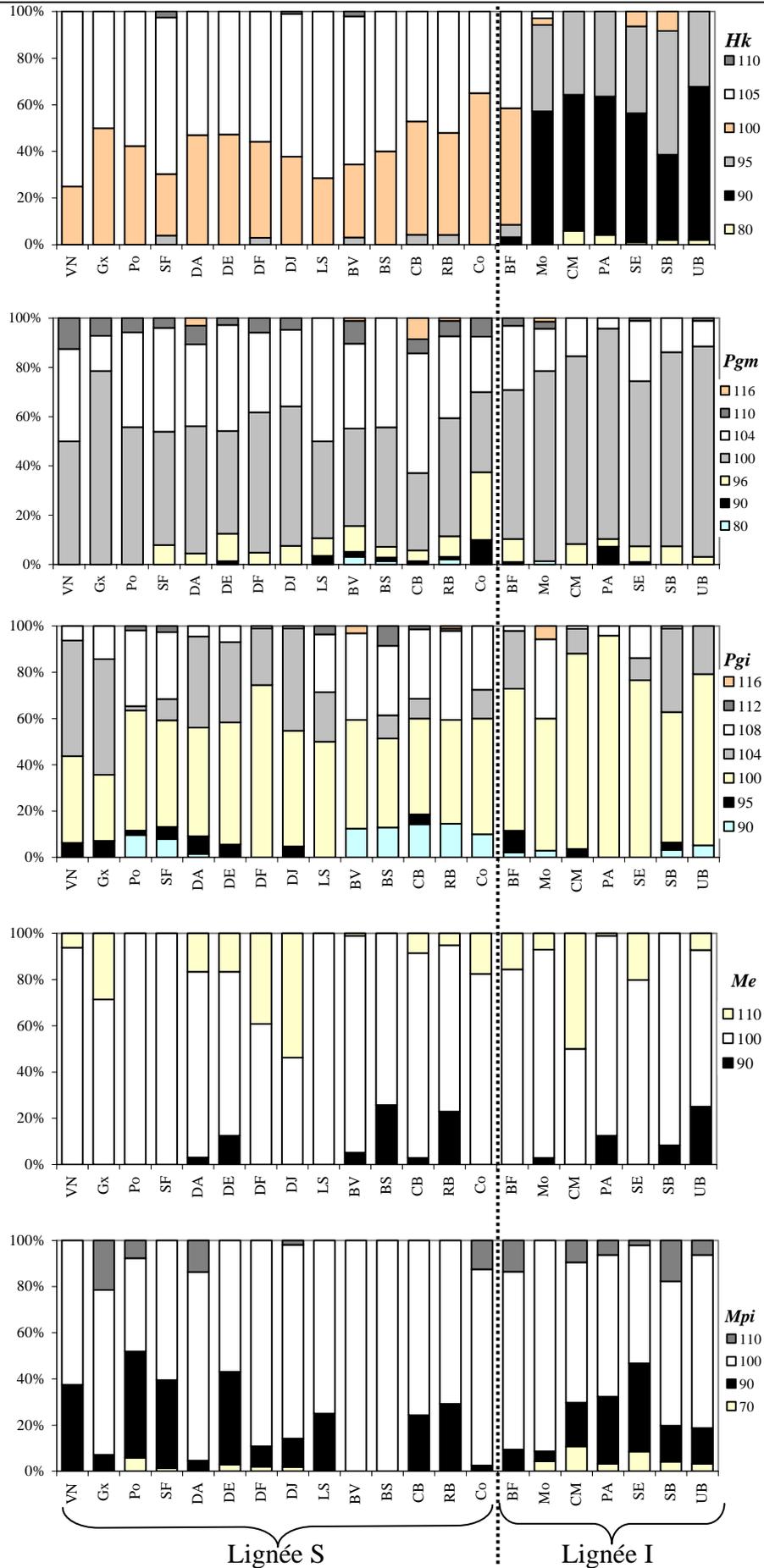


Figure II.5. Fréquences alléliques pour chacune des populations d'*A. brachiata* et pour les cinq locus de l'étude.

L'analyse en composantes principales permet de subdiviser l'ensemble des populations en deux sous-ensembles distincts soulignant la différence génétique marquée qui existe entre les populations intertidales et les populations subtidales (Figure II.6), à l'exception toujours de la population intertidale de Baie de la Forêt qui se regroupe avec l'ensemble des populations subtidales. L'axe 1 synthétise, à lui seul, 58,22% de la variance, et ce de façon significative ($p < 0,05$). Une AMOVA a été utilisée pour tester la robustesse de ce découpage en deux groupes génétiques. Bien que la majeure partie de la variance génétique soit associée au niveau intra-population (75,71% du total de la variance: $\Phi_{ST} = 0,24$; $p < 0,001$) et que la variance entre populations soit non négligeable (6,35%) et significative ($\Phi_{SC} = 0,07$; $p < 0,001$), la part de la variance génétique associée à l'existence de ces deux groupes est conséquente (17,94%) et significative ($\Phi_{CT} = 0,18$; $p < 0,001$).

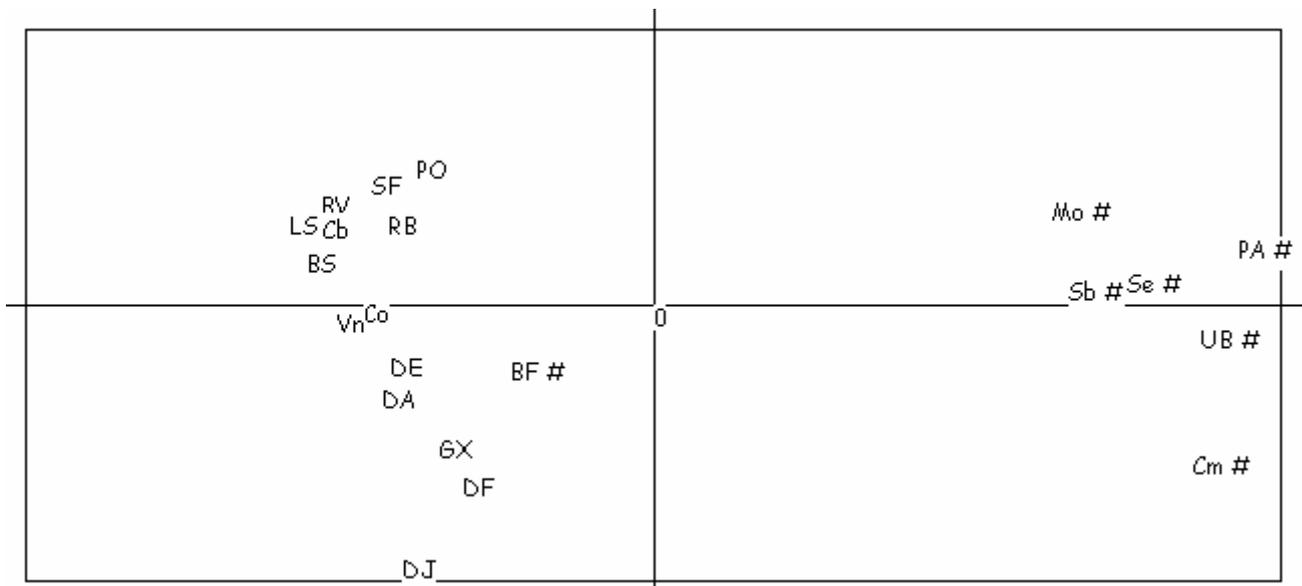


Figure II.6. Analyse en composante principale basée sur les fréquences alléliques au sein de chaque population (réalisée avec PCA-gene). L'axe 1 synthétise 58,22% de la variance et l'axe 2 16,60%, tous deux de façon significative ($p < 0,05$)

1.2. Discussion

Les résultats obtenus grâce aux deux marqueurs génétiques suggèrent l'existence de deux groupes fortement divergents chez l'ophiure *Acrocnida brachiata*, répartis le long des côtes de l'Europe Nord Ouest, avec une inféodation de chacun des groupes à un type d'habitat. Cette espèce d'échinoderme ne devrait plus être considérée comme une espèce unique mais plutôt comme un complexe de deux anciennes lignées jumelles. En effet, les séquences mitochondriales se ségrèguent en deux lignées fortement divergentes (environ 20%

de divergence), l'une réunissant la plupart des populations intertidales (toutes sauf celles de Baie de la Forêt) et l'autre, l'ensemble des populations subtidales. Les inversions de fréquences alléliques à trois des cinq locus enzymatiques séparent les populations de manière similaire. La divergence entre ces deux lignées est probablement plus le fait d'un unique événement de spéciation ancien, suivi dans un second temps d'une phase d'expansion et de colonisation de l'ensemble de l'aire actuelle, plutôt que le résultat de pressions locales de sélection. Le fait que de l'adaptation locale agisse exactement dans le même sens et avec la même intensité, de façon indépendante, au sein de chaque localité semble peu probable. En outre, si cela pourrait être envisagé pour les inversions alléliques, ce n'est pas le cas au niveau de l'accumulation des mutations dans la divergence mitochondriale. Les mécanismes de spéciation qui ont pu engendrer l'émergence de ces deux lignées écotypiques peuvent néanmoins être de deux types : allopatrique (avec séparation géographique suivie d'une remise en contact secondaire), ou sympatrique (avec une divergence rapide du fait d'une adaptation locale subtidale/intertidale et des flux géniques réduits entre les habitats au sein d'une zone ancestrale unique). Les inversions de fréquences alléliques pourraient alors traduire de l'adaptation sur le long terme à des pressions environnementales contrastées, chaque lignée présentant des niveaux différents de tolérance physiologique à la dessiccation, la température, ou l'hypoxie, et renforçant ainsi la ségrégation de chaque lignée à un habitat pour aboutir progressivement à l'émergence de deux lignées. Cette hypothèse nécessite que les pressions de sélection soient fortes et que les flux de gènes soient considérablement réduits (Via, 2001), ce qui pourrait être le cas entre des habitats très contrastés et avec une phase larvaire très réduite. Cependant, les données mitochondriales tendent à réfuter l'hypothèse adaptative. En effet, le test de McDonald & Kreitman s'avère non significatif ; les substitutions non-synonymes ne s'accumulent pas préférentiellement entre les lignées. De plus, aucune variation dans la distribution de la diversité nucléotidique ni dans les valeurs de la statistique D de Tajima ne peut être détectée le long des séquences. Ainsi, ces résultats invalident l'hypothèse selon laquelle la spéciation au sein d'*A. brachiata* pourrait être due à des processus sympatriques par spécialisation écotypique. La spéciation observée au sein d'*A. brachiata* semble donc bien être le reflet d'événements allopatriques. Néanmoins, compte tenu de la forte adéquation entre lignée et milieu, les interactions écologiques ont probablement été d'une importance cruciale dans le renforcement et le positionnement bathymétrique des deux lignées, une fois qu'elles se sont séparées (Bernardi, 2005).

Sur la base du taux de substitution préalablement publié chez les échinodermes (Bermingham & Lessios, 1993), la divergence existant entre les deux lignées est supposée

dater d'environ 5 MA (divergence de 20% avec un taux de mutation de 2% par MA), soit aux alentours de la transition Mio-Pliocène. Cette ère géologique est caractérisée par des phénomènes de continentalisation de l'Europe de l'Ouest (Meulenkamp & Sissingh, 2003) ainsi que par des changements climatiques importants et des mouvements tectoniques (Brault *et al.*, 2004). Haq *et al.* (1987) ont montré l'existence de nombreuses variations eustatiques durant cette période avec des augmentations très importantes du niveau de la mer, pouvant aller jusqu'à 100 m d'amplitude, entre 6-5 MA et entre 4-3 MA, avec des périodes de baisse du niveau des eaux entre deux. Durant cette période, aucun corridor marin n'assurait la communication entre l'océan Atlantique et la Mer du Nord, à l'exception d'un passage par le Nord des îles britanniques. Comme conséquence, les échanges étaient temporairement réduits entre la Mer du Nord et l'Atlantique, avec une forte incidence sur les migrations d'invertébrés marins. L'élévation continentale et la baisse du niveau des océans ont ainsi pu fortement influencer les processus de différenciation entre les deux lignées d'*A. brachiata*. Un des scénarii possibles serait d'imaginer que l'isolement génétique a commencé durant une période de baisse du niveau de la mer : une lignée aurait pu être isolée sous des conditions froides tandis que l'autre lignée aurait pu trouver refuge dans des eaux plus tempérées (soit à des latitudes différentes, soit à des profondeurs différentes). Les contacts secondaires entre les deux lignées se seraient alors produits à la suite d'une remontée du niveau des eaux, l'ouverture du bassin de la Mer du Nord et/ou l'ouverture de la Manche (10-8 KA). Dans ce cas, l'introduction de chaque lignée au niveau de la zone de transition induirait des phénomènes de maladaptation, renforçant la spécialisation de chaque lignée à un habitat et/ou à un niveau bathymétrique. Ce type de scénario est également celui avancé par Jolly *et al.* (2006) pour expliquer des niveaux de divergence similaires rencontrés chez deux genres de Polychètes de l'Atlantique Nord-Est, associés aux peuplements de sables fins envasés et vivant en association avec *A. brachiata*. En effet, une divergence génétique d'environ 20% existe entre espèces proches de *Pectinaria* et entre les lignées intertidales et subtidales d'*Owenia fusiformis* (25,9% et 19,2%, respectivement; Jolly *et al.*, 2006) ainsi qu'entre deux espèces de Polychètes du genre *Sabellaria*, l'une (*S. spinulosa*) vivant en milieu subtidal et l'autre (*S. alveolata*) en milieu intertidal (20,6%; Rigal, 2005). Que le même niveau de divergence soit rencontré au sein de plusieurs complexes d'espèces des communautés de sables fins suggère l'existence d'évènements de vicariance. En outre, le fait que certaines de ces lignées ou espèces soient restreintes au domaine intertidal sur l'ensemble de l'aire de distribution géographique renforce l'idée que ces espèces ont probablement vécu une histoire similaire à la transition Mio-Pliocène. Ceci appuie l'hypothèse de processus allopatriques

avec la séparation ancestrale de la communauté des sables fins envasés en deux entités distinctes, chacune sous l'influence de conditions environnementales différentes.

Bien que l'espèce *A. brachiata* ait été considérée jusque là comme morphologiquement facilement identifiable (Koehler, 1921; Moyses & Tyler, 1995), il paraît vraisemblable qu'une aussi profonde divergence se traduise par des variations morphologiques. La seule variabilité morphologique révélée jusqu'à présent est une différence de longueur de bras entre populations intertidale et subtidale (Bourgoin & Guillou, 1994), avec des bras plus courts en milieu intertidal. Cette différence était jusqu'à présent considérée comme une conséquence de l'autotomie. La capacité des Echinodermes, et des ophiures principalement, de s'auto-mutuler sous des conditions de stress et de régénérer leurs parties amputées est un phénomène bien connu (Emson & Wilkie, 1980). Le plus souvent, l'autotomie remplit une fonction de défense, le bras sectionné servant à dissiper l'attention du prédateur pendant une fuite du reste de l'individu. Or ce mécanisme peut être utilisé pour réduire le volume de l'organisme dans des conditions défavorables, appelée autotomie économique (Emson & Wilkie, 1980). Les individus intertidaux d'*A. brachiata* étaient ainsi supposés limiter la régénération des bras sectionnés, afin d'allouer leur énergie à d'autres processus physiologiques (Bourgoin & Guillou, 1994). Cette différence de longueur de bras pourrait en fait remplir une fonction adaptative et participer aux phénomènes d'inféodation d'une lignée à un habitat. Une diagnose détaillée des deux lignées sera finalement effectuée début 2007 par Sabine Stöhr du Musée d'Histoire Naturelle de Suède (Stockholm).

2. Histoire évolutive des deux lignées : colonisation récente dans la zone de transition Manche/Atlantique, degré de connectivité entre populations au sein de chaque lignée et échange entre les lignées

Les événements de spéciation qui ont conduit à l'émergence de ces deux lignées semblent relativement anciens. A l'inverse, l'expansion géographique de chacune des lignées pourrait être le fait de processus paléo-climatiques beaucoup plus récents, due à la libération de niches écologiques suites à la fonte des glaces (24-18 KA) et/ou à l'ouverture de la Manche (10-8 KA). La structure observée à l'heure actuelle est à la fois le reflet de ces phénomènes historiques et des flux contemporains qui peuvent exister entre ces populations. Aussi réduite soit-elle, la phase larvaire peut permettre des échanges, si ce n'est entre grandes régions géographiques, au moins entre les populations voisines.

Des analyses plus approfondies du polymorphisme mitochondrial et allozymique permettent de retracer une partie de l'histoire évolutive de chaque lignée et, notamment, de mieux cerner les processus qui ont abouti à la répartition géographique actuelle de ces deux lignées évolutives et ceux qui maintiennent actuellement une structure génétique entre les populations.

Compte tenu de l'existence de la forte divergence intra-spécifique, la suite des analyses génétiques est conduite parallèlement pour chacune des deux lignées. Cependant, le nombre réduit d'échantillons disponibles en milieu intertidal a restreint le nombre d'analyses par rapport à ce qui a été possible de faire pour la lignée S. Les populations analysées sont les mêmes que celles de la partie II.1.1.

2.1. Résultats pour la lignée S

Les populations de la lignée S présentent 183 haplotypes dont seulement 35 sont présents à plus d'un exemplaire. La proportion d'haplotypes privés (Tableau II.2) varie de 0,25 à 0,73 avec les valeurs les plus faibles en Manche et en Mer d'Irlande, et des valeurs plus fortes en Sud Bretagne. Les diversités haplotypiques et nucléotidiques sont quant à elles du même ordre de grandeur entre les populations.

Le réseau d'haplotypes construit pour la lignée S (Figure II.7) présente une distribution en étoile avec un haplotype principal (HS1), fortement représenté dans toutes les populations. La plupart des haplotypes divergents sont directement originaires de l'haplotype HS1. La distribution géographique des 22 haplotypes partagés est également présentée sur la Figure II.8. Seul l'haplotype HS1 est présent dans les cinq bassins. Certains haplotypes ne sont partagés qu'entre deux bassins; c'est le cas notamment pour neuf des treize haplotypes des échantillons de Douarnenez dont six sont uniquement partagés avec le Sud Bretagne (HS5 à HS10) et trois avec l'Irlande (HS11 à HS13).

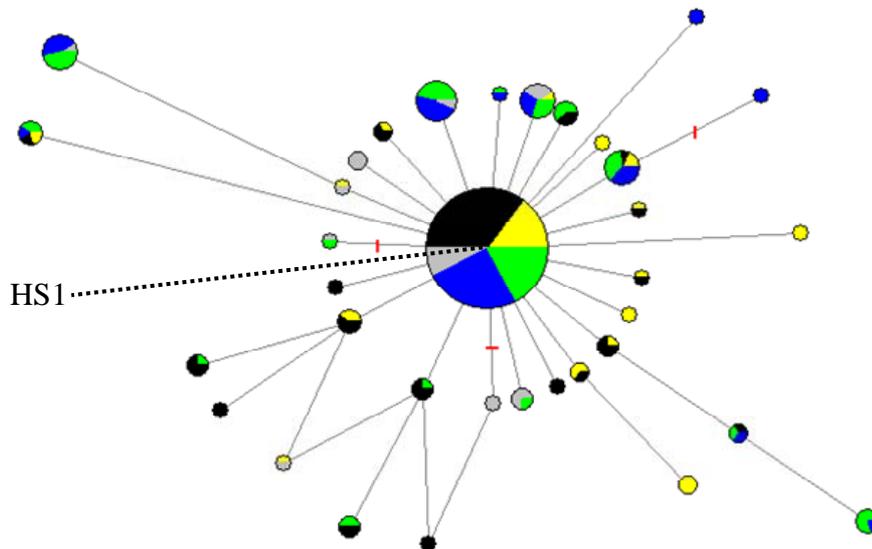


Figure II.7. Réseau d'haplotypes représentant les relations évolutives minimales entre les différents haplotypes de la lignée S d'*A. brachiata*. Pour plus de clarté, ne sont représentés sur le graphique que les haplotypes présents plus d'une fois dans la lignée. Le code couleur permet de visualiser la situation géographique de ces haplotypes : les populations du Sud de la Bretagne (Sud BZH) en jaune, celles de Douarnenez (DZZ) en noir, celles de Manche occidentale (Moc) en gris, celles de Manche orientale (Mor) en bleu et celles d'Irlande (Irl) en vert. Les bâtons rouges indiquent les mutations non synonymes.

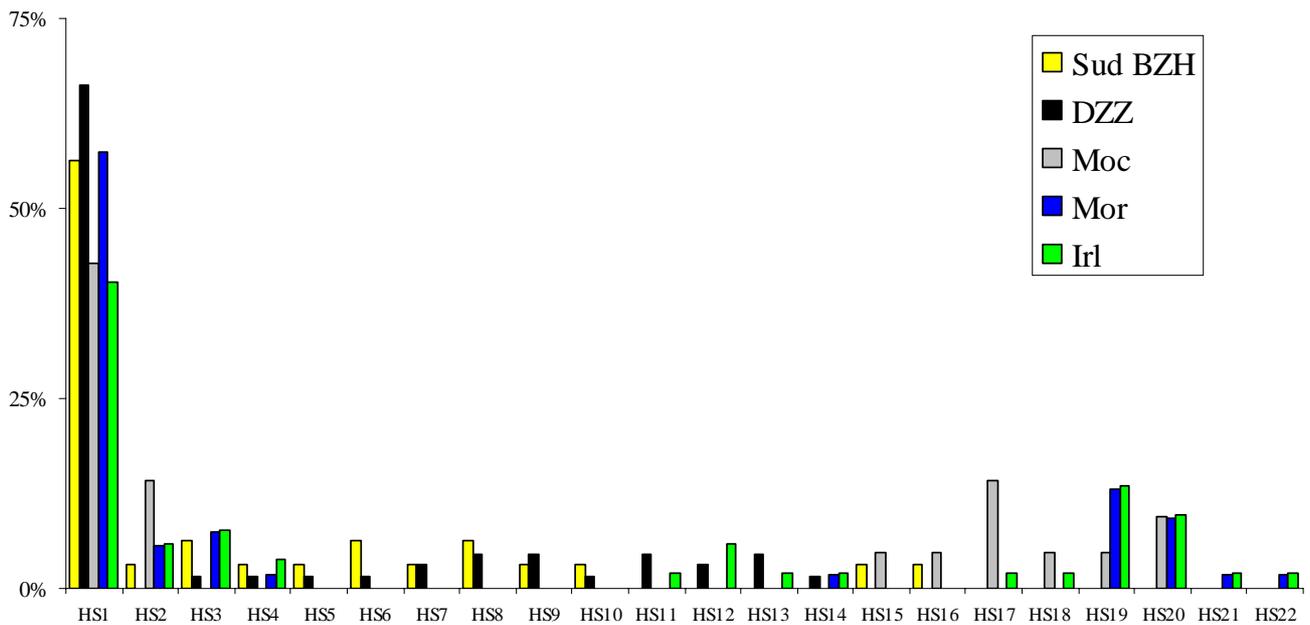


Figure II.8. Fréquence des haplotypes partagés au sein de la lignée S en fonction des 5 bassins. Le code couleur est le même que pour la figure II.7.

Les distributions des fréquences du nombre de différences nucléotidiques entre deux séquences générées pour la lignée S sont présentées sur la Figure II.9. La distribution est unimodale avec une valeur de D de Tajima négative et significative ($D = -2,64$; $p < 0,001$). Cette valeur négative indique un excès de variants de faibles fréquences, ce qui peut être due à une expansion démographique et/ou un balayage sélectif.

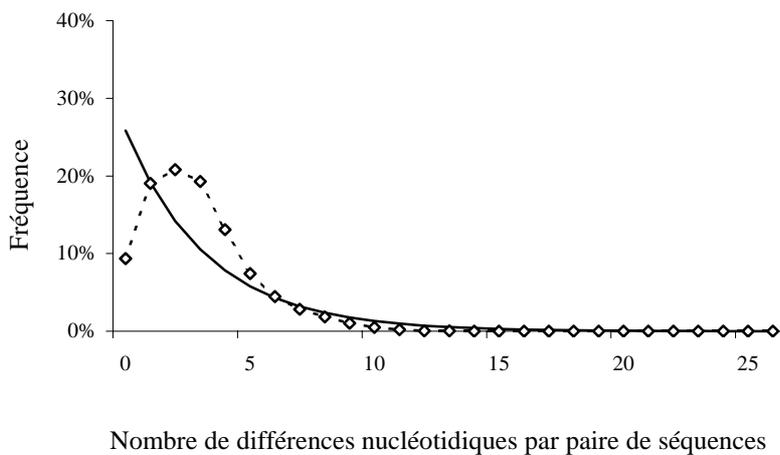


Figure II.9. Courbes de distributions des fréquences du nombre de différences nucléotidiques entre deux séquences pour la lignée S ; nombre observé (en pointillé) et attendu (en trait plein), sous l'hypothèse d'une population stable, c'est-à-dire sans variation de taille, ni effet sélectif au cours du temps.

Les estimations des flux de gènes entre les cinq régions géographiques obtenus par simulations sous Migrate_n sont fortement asymétriques (Tableau II.3). La plupart des migrants sont originaires de la Baie de Douarnenez et, dans une moindre mesure, de Bretagne Sud, avec de nombreux individus qui ont colonisé la Manche et la Mer d'Irlande depuis ces deux bassins. De la même manière, les flux entre ces deux bassins sont importants et asymétriques avec une dominance des migrations depuis Douarnenez vers le Sud Bretagne. En comparaison, les migrations entre Manche et Mer d'Irlande apparaissent minimes.

Tableau II.3. Estimation des flux de gènes passés entre les différentes régions durant la dernière expansion démographique, obtenues grâce aux simulations sous Migrate-n. Les populations émettrices sont en colonnes (avec l'estimation de la taille efficace de la population entre parenthèses) et les populations receveuses sont en lignes.

	Sud BZH (0,0839)	DZZ (0,3629)	Manche O (0,012)	Manche E (0,0113)	Irl (0,0094)
Sud BZH	*	228,42	7,38	6,01	4,08
DZZ	46,57	*	2,33	2,90	2,04
Manche O	14,26	40,63	*	5,07	1,66
Manche E	15,01	70,35	3,84	*	1,94
Irl	14,55	76,95	5,19	6,43	*

Les estimations de différenciation génétique par paire de populations obtenues sur les séquences de mtCOI (ϕ_{st}) et sur les allozymes (θ) sont présentées dans le Tableau II.4. La plupart des valeurs de ϕ_{st} sont faibles et non-significatives tandis que la plupart des valeurs de θ sont significativement différentes de zéro au sein de la lignée S ($0 < \theta < 0,13$). Les valeurs significatives, quel que soit le marqueur, sont principalement celles qui impliquent les populations de la Baie de Douarnenez, notamment opposées aux populations de la Manche et de Mer d'Irlande. Les valeurs de différenciation génétique θ entre paires de populations sont reliées aux distances géographiques qui séparent ces populations (Figure II.10). Le profil d'isolement par la distance n'est pas significatif (test de Mantel, $p = 0,15$), des populations voisines étant souvent aussi distantes génétiquement que des populations situées aux extrémités de la zone d'étude.

Tableau II.4. Valeurs de différenciation génétique calculées par paire de populations pour la lignée S. Les valeurs sont basées sur les séquences mitochondriales (ϕ_{st}) (au-dessus de la diagonale) ou sur les allozymes (au dessous de la diagonale, en gras). (Permutations effectuées avec Arlequin et Genetix, respectivement ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; après correction de Bonferroni, seules les valeurs avec une $p < 0,001$ sont significatives)

	VN	Gx	Po	CC	BF	SF	DA	DE	DF	DJ	LS	BV	BS	CB	RB	Co	SA	RY
VN	0,022	0,06	0,079	0,073	0,042	0,077	0,153***	0,009	0,097	0,056	0,134	0,137	0,085	0,103	0,119	0,132	0,196*	
Gx	0,029	-0,018	0	-0,021	-0,034	-0,029	-0,001	0,006	-0,012	-0,014	-0,005	0,021	-0,016	-0,007	0,000	0,037	0,011	
Po	0,054***	0,123***	-0,027	0,002	0,008	-0,005	-0,005	0,031***	0,023***	-0,019	0,026	0,027***	0,005	0,013	-0,021	0,035***	0,023	
CC	-	-	-	-0,023	-0,019	-0,039	-0,028	-0,025	-0,032	-0,027	0,002	0,009	-0,022	-0,009	0,001	0,027	0,015	
BF	0,056*	0,016	0,092***	-	-0,031	-0,002	0,004	0,033	0,002	-0,008	0,024*	0,026*	0,006	0,011	-0,009	0,018	0,003	
SF	0,021	0,119***	0,01	0,081***	-	-0,010	0,009	0,027*	0	-0,012	0,029***	0,030***	0,001	0,005	-0,002	0,023	0,01	
DA	0,024	-0,003	0,109***	0,004	0,081***	-	-0,012	0,031***	0,003	-0,004	0,020*	0,016***	-0,004	0,007	-0,031	0,016***	-0,006	
DE	0,003	0,044	0,054***	0,043***	0,048***	0,033***	-	0,032***	0,005	0,001	0,027***	0,026***	0,007	0,012	-0,024	0,036***	0,003	
DF	0,097***	0,059*	0,159***	0,033*	0,131***	0,035***	0,062***	-	0,022	0,018	0,039***	0,039***	0,02	0,043	0,01	0,052***	0,037	
DJ	0,082***	0,025	0,189***	0,075***	0,159***	0,046***	0,066***	0,022***	-	0,016	0,025***	0,018***	0,008	0,019***	-0,012	0,023*	-0,006	
LS	-0,007	0,098*	0,038***	0,056*	-0,006	0,042***	0,031*	0,097***	0,126***	-	0,016	0,022	-0,003	-0,004	-0,009	0,038	0,025*	
BV	0,121***	0,148***	0,123***	0,088***	0,067***	0,081***	0,125***	0,121***	0,168***	0,038***	-	0,012	-0,007	-0,002	-0,008	0,016	0,003	
BS	0,104***	0,101*	0,131***	0,078***	0,085***	0,057***	0,092***	0,100***	0,128***	0,049***	0,023*	-	-0,006	-0,001	-0,003	0,030*	0,015	
CB	0,049	0,087***	0,044***	0,055***	0,025***	0,048***	0,038***	0,098***	0,127***	0,009	0,039***	0,040***	-	-0,013	-0,016	0,016	-0,001	
RB	0,065***	0,077***	0,039***	0,067***	0,034***	0,068***	0,044***	0,097***	0,125***	0,035*	0,048***	0,030***	0,014	-	-0,033	-0,001	0,000	
Co	0,111***	0,058	0,114***	0,031*	0,102***	0,040*	0,069***	0,082***	0,113***	0,073*	0,061***	0,066	0,029*	0,047***	-	-0,022	-0,012	
SA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,014	

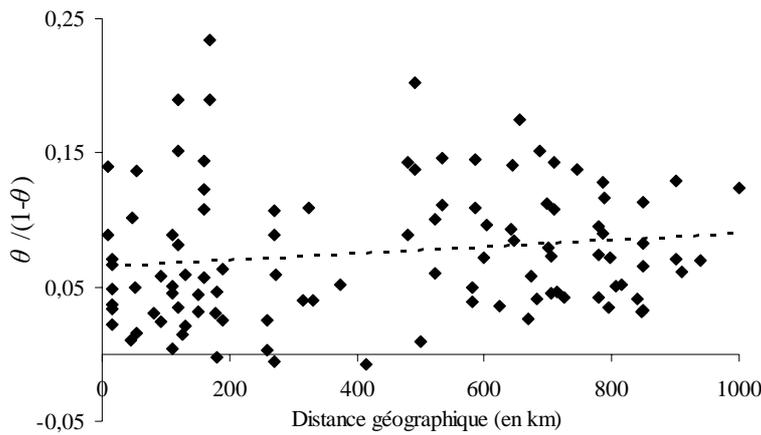


Figure II.10. Distribution des distances génétiques allozymiques ($\theta/(1-\theta)$) en fonction des distances géographiques par paire de populations pour la lignée S.

Des AMOVA ont été effectuées pour estimer la part respective de la variance génétique associée à différents niveaux de subdivisions géographiques : au sein des populations, entre populations au sein d'un bassin et entre les bassins (Tableau II.5). Ces trois niveaux de partition de la variance expliquent une part significative de la variance génétique. En effet, malgré le fait que la quasi-totalité de cette variance (plus de 90%) soit associée au niveau intra-population, la variance due à la structure entre les 15 populations et entre les cinq bassins est aussi significative, bien que très faible.

Tableau II.5. Analyse hiérarchique de la variance génétique entre différents niveaux de découpage géographique (au sein d'une population, entre populations au sein d'une région et entre régions géographiques) effectuée pour la lignée S ; analyse effectuée avec Arlequin.

		Ddl	Carré moyen	% de la variance totale	Indices de fixation	p
Lignée S	MtCOI	Entre les régions géographiques	2	6,31	0,81	0,008 < 0,05
		Entre populations au sein d'une région	15	25,11	0,80	0,008 < 0,05
		Au sein des populations	385	550,46	98,39	0,016 < 0,001
	Allozymes	Entre les régions géographiques	4	57,16	3,84	0,038 < 0,05
		Entre populations au sein d'une région	10	49,51	4,53	0,047 < 0,001
		Au sein des populations	985	1157,70	91,63	0,084 < 0,001

Des similitudes assez importantes existent dans les fréquences alléliques des populations d'un même bassin ; elles se visualisent sur l'ACP représentée par la figure II.11. Les axes 1 et 2 synthétisent respectivement 46,10% et 21,09% de la variance génétique. La population de Lannion-S présente des fréquences alléliques intermédiaires à celles de Sud Bretagne et Mer d'Irlande, plutôt que similaires à la Manche orientale.

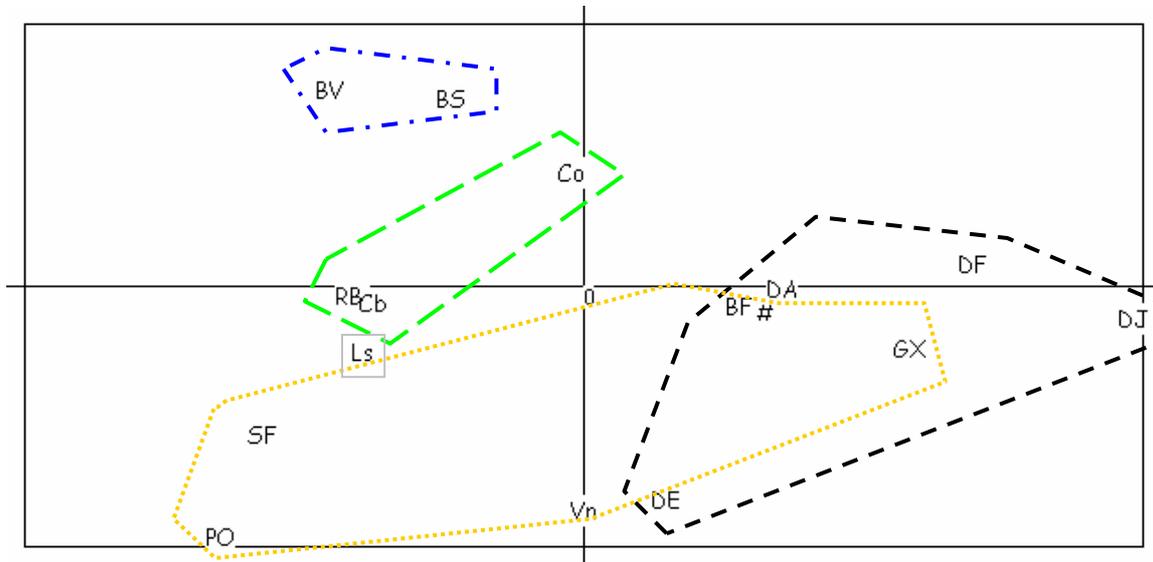


Figure II.11. Analyse en composante principale basée sur les fréquences alléliques de chaque population au sein de la lignée S (réalisée avec PCA-gene). L'axe 1 synthétise 46,10 % de la variance et l'axe 2 21,09%, tous deux de façon significative ($p < 0,05$). Les encadrés de couleur regroupent les diverses populations d'un même bassin : en jaune, le Sud Bretagne, en noir, la baie de Douarnenez, en gris, l'unique population de Manche Occidentale, en bleu, la Manche orientale et en vert, la Mer d'Irlande.

Les valeurs de F_{IS} monolocus et multilocus sont présentées dans le Tableau II.6. Des déficits en hétérozygotes significatifs sont observés pour 10 des 15 populations de la lignée S, les valeurs allant de $-0,048$ pour la population de Sous Forêt à $0,416$ pour Colwyn Bay. Les plus forts écarts aux proportions de l'équilibre d'Hardy-Weinberg concernent les populations d'Irlande et de Baie de Douarnenez, pour lesquelles, de plus, un déséquilibre de liaison entre locus est détecté. Une association entre locus est en effet détectable pour : *Me-Mpi* à Douarnenez-E et dans les trois populations de Mer d'Irlande ($p < 0,05$), pour *Pgm-Me* à Douarnenez-J ($p < 0,05$), pour *Hk-Pgi* à Douarnenez-A et Redwharf Bay ($p < 0,05$).

Tableau II.6. Estimations monolocus et multilocus des indices de fixation *F_{is}* au sein de chaque population de la lignée S. Les valeurs de probabilité associées sont calculées par permutations grâce à Genetix (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

	VN	GX	PO	SF	Da	DE	DF	DJ	LS	BV	BS	CB	RB	Co	BF#
<i>Hk</i>	-0,273	0,75	-0,084	-0,143	-0,019	0,011	-0,165	0,186	-0,538	-0,121	0,299	0,273	0,193	-0,073	0,269***
<i>Pgm</i>	0,222	-0,125	0,232	0,053	0,128	0,305*	0,282***	0,221*	0	0,182*	0,004	0,269***	0,270*	0,358	0,188
<i>Pgi</i>	0,233	-0,263	0,016	-0,138	-0,314*	0,124	0,092	-0,120	0,484	-0,093	0,032*	-0,074*	0,15	0,329*	0,290***
<i>Me</i>	---	-0,333	---	---	0,364***	0,341***	0,514***	0,664***	---	0,305	-0,033	0,460*	0,377**	0,835**	0,299
<i>Mpi</i>	0,517	0,415	0,143**	-0,012	0,426***	0,309***	0,308	0,198	0,429	---	---	0,314	0,103	0,633*	0,567***
<i>Moyenne multilocus</i>	0,195***	0,128	0,061*	-0,048	0,054	0,217***	0,194***	0,225***	0,075	0,055*	0,06	0,248***	0,219**	0,416***	0,323***

2.2. Résultats pour la lignée I

La lignée I est constituée de 44 haplotypes dont seuls cinq sont partagés entre les populations. La proportion d'haplotypes privés varie de 33 à 88% avec une valeur moyenne autour de 65% (Tableau II.2). Ces valeurs sont en moyenne plus importantes dans les populations de la lignée I que dans celles de la lignée S. Les diversités haplotypiques et nucléotidiques sont similaires entre les populations de la lignée I et également proches de celles rencontrées au sein de la lignée S.

Le réseau d'haplotypes construit pour la lignée I (Figure II.12) révèle une structure plus complexe, avec quatre haplotypes principaux ainsi qu'une branche fortement divergente d'une longueur de 14 pas mutationnels caractérisant huit des haplotypes trouvés. La distribution géographique des cinq haplotypes partagés est présentée d'une façon différente sur la Figure II.13. Bien que majoritaire, l'haplotype majoritaire HI1 est absent de la population de Saint-Brieuc. Cependant, comparé à l'haplotype majoritaire HS1 de la lignée S, il n'est que faiblement représenté. De même, l'haplotype HI5 est absent de la population d'Utah Beach.

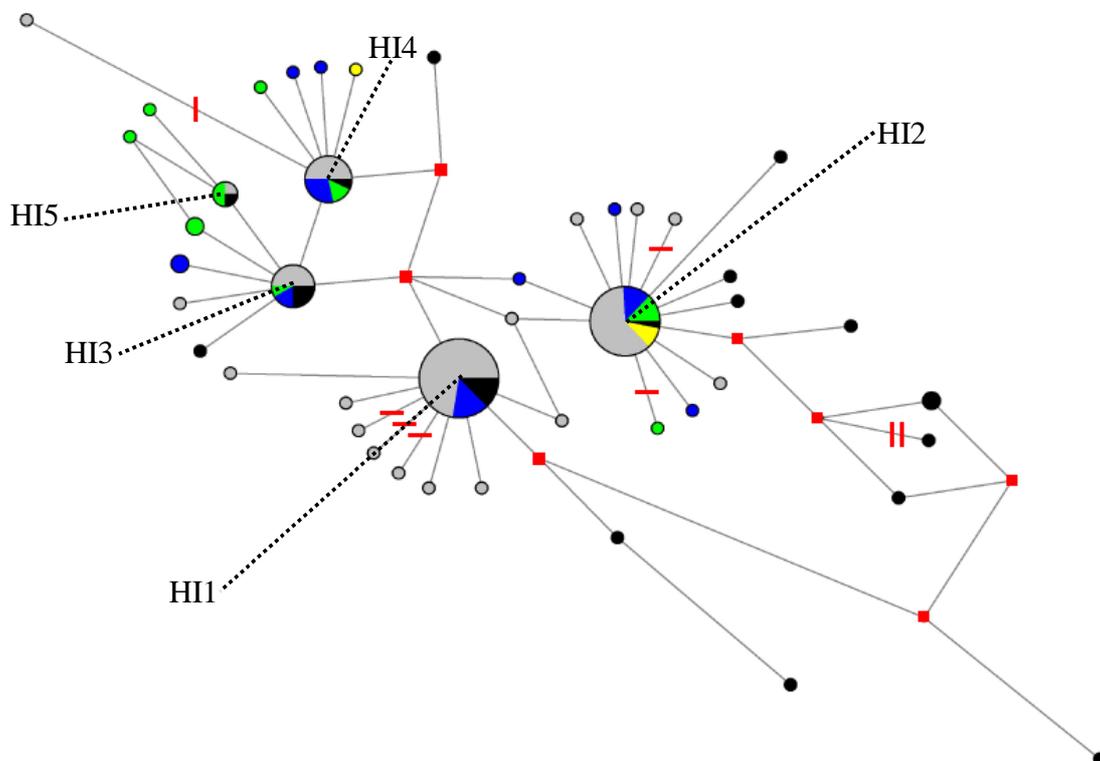


Figure II.12. Réseau d'haplotypes représentant les relations évolutives minimales entre les différents haplotypes de la lignée I d'*A. brachiata*. Le code couleur permet de visualiser la situation géographique de ces haplotypes : les populations du Portugal en jaune, celles de Douarnenez (DZZ) en gris, celles de Saint Eflam (SE) en noir, celles de Saint Brieuc (SB) en vert et celles d'Utah Beach (Irl) en bleu. Les carrés rouges symbolisent des haplotypes non détectés durant l'étude mais nécessaire à la construction du réseau. Les bâtons rouges indiquent les mutations non synonymes.

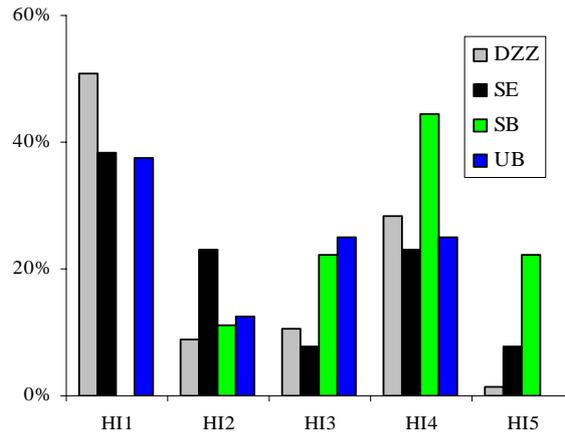


Figure II.13. Fréquence des haplotypes partagés au sein de la lignée I en fonction des populations ou bassins d'origine. Le code couleur est le même que pour la figure II.12.

Les distributions en fréquence du nombre de différences nucléotidiques entre deux séquences générées pour la lignée I sont présentées sur la Figure II.14. La distribution montre une structure avec un pic correspondant à la divergence entre les quatre haplotypes majoritaires, tous distants de trois pas mutationnels. La valeur de D de Tajima associée est négative et significative ($D = -1,82$; $p < 0,05$). Cette valeur négative indique un excès de variants de faible divergence.

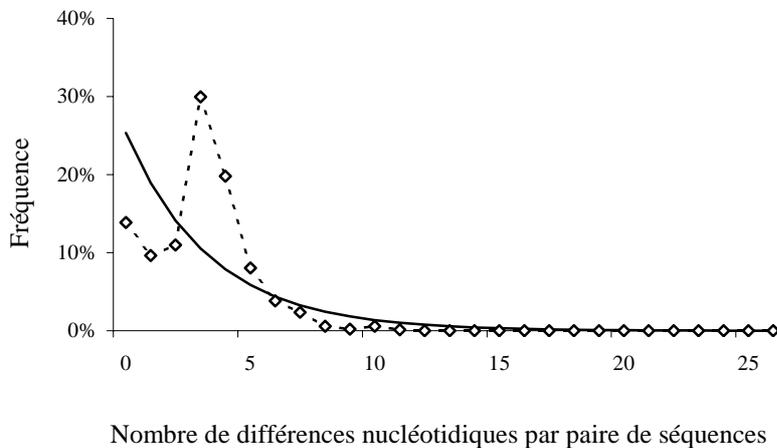


Figure II.14. Courbes de distribution en fréquence du nombre de différences nucléotidiques entre deux séquences pour la lignée I ; nombre observé (en pointillé) et attendu (en trait plein), sous l'hypothèse d'une population stable, c'est-à-dire sans variation de taille, ni effet sélectif au cours du temps.

Les estimations de différenciation génétique par paire de populations obtenues sur les séquences de mtCOI (ϕ_{st}) et sur les allozymes (θ) sont présentées pour la lignée I dans le Tableau II.7. Six des 15 valeurs de ϕ_{st} sont significatives, pour des paires de populations impliquant souvent une station de la Baie de Douarnenez et une population de Manche. A l'inverse, toutes les valeurs θ sont fortement significatives, sans toutefois qu'il existe une relation entre distance génétique et distance géographique. En effet, le profil d'isolement par la distance présenté sur la Figure II.15 est non-significatif (test de Mantel ; $p = 0,59$). Une

tendance négative où les populations les plus proches géographiquement présentent également les plus fortes distances génétiques est néanmoins observée graphiquement.

Tableau II.7. Valeurs de différenciation génétique calculées par paire de populations pour la lignée I. Les valeurs sont basées sur les séquences mitochondriales (ϕ_{st}) (au-dessus de la diagonale) ou sur les allozymes (en dessous de la diagonale, en gras). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, testées par permutations avec les logiciels Arlequin et Genetix ; après une correction de Bonferroni, seules les valeurs significatives à $p < 0,001$ le restent).

	Mo #	Cm #	PA-b #	SE #	SB #	UB #
Mo #		0,043	0,089***	0,019	0,078*	0,045*
Cm #	0,131***		-0,009	0,059***	0,129***	0,051*
PA-b #	0,105***	0,096***		0,047	0,066	0,005
SE #	0,080***	0,045***	0,043***		0,029	0,005
SB #	0,090***	0,118***	0,092***	0,065***		0,011
UB #	0,074***	0,065***	0,043***	0,057***	0,060***	

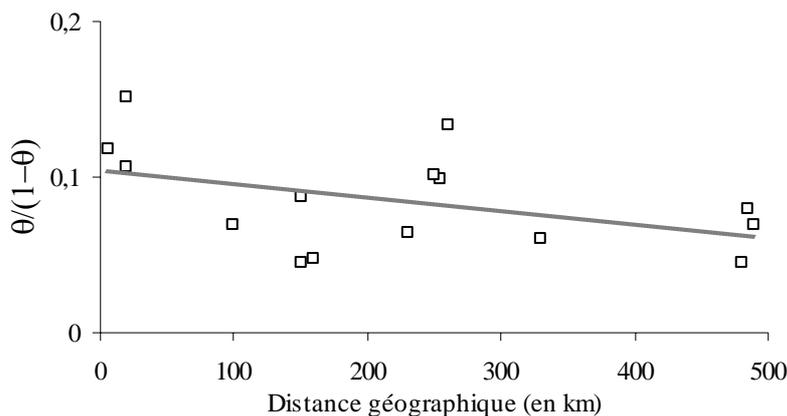


Figure II.15. Distribution des distances génétiques (allozymes avec $\theta/(1-\theta)$) en fonction des distances géographiques par paire de populations pour la lignée I.

Les AMOVA effectuées pour estimer la part respective de la variance génétique associée à différents niveaux de subdivisions géographiques sont présentées dans le Tableau II.8. Au sein de la lignée I, la variance associée à la différenciation entre les groupes géographiques n'est pas significative ($p = 0,29$ sur la base du mitochondrial et $p = 0,89$ sur la base des allozymes). Bien que le maximum de la variance soit associée au niveau intrapopulation, la variance associée à la différenciation génétique entre les populations d'un même bassin est, quant à elle, plus importante que pour la lignée S et révèle donc l'existence d'une structure génétique marquée mais peu gouvernée par la géographie.

Tableau II.8. Analyse hiérarchique de la variance génétique entre les différents niveaux de découpage géographique (au sein d'une population, entre populations au sein d'une région et entre régions géographiques) effectuée pour la lignée I avec Arlequin.

		Ddl	Carré moyen	% de la variance totale	Indices de fixation	p	
Lignée I	MtCOI	Entre les régions géographiques	2	8,22	1,18	0,012	0,29
		Entre populations au sein d'une région	3	9,79	5,58	0,056	< 0,05
		Au sein des populations	135	187,23	93,24	0,068	< 0,001
	Allozymes	Entre les régions géographiques	2	13,06	0,00	-0,022	0,89
		Entre populations au sein d'une région	3	29,99	9,41	0,092	< 0,001
		Au sein des populations	522	541,76	90,59	0,072	< 0,001

Les valeurs de F_{IS} monolocus et multilocus sont présentées dans le Tableau II.9. Les déficits en hétérozygotes concernent cinq des six populations avec des valeurs allant de -0,003 à Utah Beach à 0,241 à Saint Brieu. Des associations entre locus sont détectables au sein de certaines de ces populations : pour *Pgm-Pgi* à Morgat ($p < 0,01$), *Me-Mpi* à Cameros ($p < 0,05$), pour *Pgi-Me* à Saint Efflam ($p < 0,01$) et pour *Pgi-Mpi* à Utah Beach ($p < 0,05$).

Tableau II.9. Estimations monolocus et multilocus des indices de fixation F_{is} au sein de chaque population de la lignée I. Les valeurs de probabilité associées sont calculées grâce à Genetix (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

	Mo #	Cm #	PA #	SE #	SB #	UB #
<i>Hk</i>	-0,002	-0,159	0,035	-0,032*	0,252*	-0,021
<i>Pgm</i>	0,022	-0,091	-0,101	0,267*	0,053	-0,118
<i>Pgi</i>	-0,386**	0,052	-0,033	-0,205	-0,386***	-0,167
<i>Me</i>	0,238	0,814***	0,567***	0,284	0,732***	0,350**
<i>Mpi</i>	0,477**	0,142*	0,032	-0,008*	0,554***	-0,061
<i>Moyenne multilocus</i>	0,070**	0,171***	0,100*	0,061***	0,241***	-0,003

2.3. Recherche d'hybrides entre les deux lignées

Les quatre individus de la Plage de l'Aber (PA-a) échantillonnés en intertidal mais présentant la signature mitochondriale de la lignée S, la présence des allèles *Hk100* et *Hk105*, typiques de la lignée S mais présents en faible fréquence dans la lignée I, les forts déficits en hétérozygotes et les déséquilibres de liaison sont autant d'indices qui laissent supposer l'existence de potentiels hybrides entre les deux lignées. Des tests d'assignation ont été réalisés afin de coupler les données des deux marqueurs génétiques et ainsi détecter ces

potentiels hybrides. Le jeu de données a été partitionné en deux grands groupes correspondant aux deux lignées mitochondriales. Des tests d'assignation ont ensuite été réalisés en fonction de l'information allozymique. Seize individus (soit 2% de l'échantillonnage total) apparaissent mal-assignés, c'est-à-dire qu'ils présentent une signature allozymique plus proche de celle des individus de l'autre groupe mitochondrial que de celle de leur propre groupe. Ces individus sont tous échantillonnés dans le domaine intertidal. Sur ces seize ophiures, huit individus (quatre de la plage de l'Aber (PA-a) et quatre de Baie de la Forêt (BF)) présentent un haplotype subtidal mais une signature allozymique typique du domaine intertidal. A l'inverse, huit individus dont deux de Morgat, deux de Saint Efflam et quatre de Saint Briec possèdent un haplotype intertidal mais sont assignés à la lignée S sur la base de leur génotype allozymique.

2.4. Discussion

L'histoire de colonisation diffère entre les deux lignées.

Les analyses du polymorphisme mitochondrial, sous l'hypothèse de neutralité, fournissent des pistes intéressantes sur l'histoire de l'expansion géographique de chaque lignée. De forts pourcentages de singletons, des divergences intra-lignée faibles (< 1%) et des valeurs D de Tajima négatives et significatives définissent chaque lignée. En l'absence d'effet sélectif, ces caractéristiques suggèrent une récente augmentation de la taille des populations. Cette récente explosion démographique pourrait être due à la colonisation de nouveaux territoires après le dernier maximum glaciaire (24-18 KA auparavant) et/ou suite à la formation de la Manche (10-8 Ka). En effet, l'ouverture de la Manche de même que la fonte des glaces a permis l'apparition de nombreux habitats vides. En outre, l'eau provenant de la fonte des glaces n'est pas entrée directement dans les océans mais a constitué des réserves d'eaux douces sur les continents qui se sont ensuite déversées de façon précipitée (Pirazzoli, 1998), entraînant ainsi d'importants mouvements sédimentaires et des réorganisations de communautés. Un déplacement de masses d'eaux conséquent a eu lieu de la Mer du Nord vers la Manche lors de l'ouverture brutale du Déroit du Pas de Calais (Smith, 1989). Ces phénomènes ont ainsi pu promouvoir le déploiement des lignées depuis leur dernier refuge glaciaire vers de nouveaux habitats et ainsi entraîner leur rencontre sur une partie ou la totalité de l'aire d'étude. Les deux lignées semblent néanmoins présenter des patrons de colonisation différents.

La configuration en étoile du réseau d'haplotypes pour la lignée S avec peu de pas

mutationnels suggère que les séquences ont divergé récemment, et que la plupart des mutations observées est majoritairement due à des diversifications postérieures au dernier maximum glaciaire (Hewitt, 2000). Les flux de gènes estimés selon Migrate_n proposent un profil de colonisation asymétrique avec des flux massifs depuis la baie de Douarnenez et, dans une moindre mesure, du sud Bretagne vers la Manche et la Mer d'Irlande. La proportion d'haplotypes privés moins importante en Mer d'Irlande qu'en Sud Bretagne est cohérente avec l'idée que la différenciation se fait depuis moins longtemps en Mer d'Irlande (Hewitt, 1996). La colonisation massive depuis le Sud vers les bassins du Nord suggère que la lignée S aurait probablement subsisté dans un refuge glaciaire situé plus au Sud, selon le modèle déjà avancé par Hewitt (2000), probablement au niveau de la péninsule ibérique. Ce scénario est cohérent avec celui également proposé par Jolly *et al.* (2006) pour le clade 2 de *P. koreni* et le clade 1 d'*O. fusiformis* qui auraient pu persister, durant le dernier épisode glaciaire (LGM), au niveau de la Galice.

La structure plus complexe du réseau d'haplotypes de la lignée I suggère une rétention de diversité ancestrale avec moins de diversification récente suggérant une expansion plus limitée que la lignée S. La valeur du D de Tajima est d'ailleurs plus faible pour la lignée I que pour la lignée S (respectivement -1,82 et -2,64). La lignée I semble avoir une distribution géographique plus limitée, présente en Baie de Douarnenez et au nord des côtes bretonnes jusqu'à l'entrée de la Manche orientale où elle disparaît. L'espèce *A. brachiata* n'a jamais été observée dans le domaine intertidal en Mer du Nord (Ursin, 1960). Du fait d'une expansion géographique plus limitée, il semble possible que la distribution actuelle de la lignée I inclue la zone refuge de la période glaciaire. L'existence dans cette zone, avant l'ouverture de la Manche, d'une réserve d'eaux saumâtres, le lac Solent, aurait pu servir de refuge glaciaire pour cette lignée, comme il semble que cela ait été le cas pour d'autres espèces intertidales de la Manche (Gysels *et al.*, 2004; Provan *et al.*, 2005). De récentes études tendent d'ailleurs à montrer que des refuges glaciaires en Europe du Nord étaient plus fréquents que précédemment supposé durant le LGM (Willis & Whittaker, 2000; Stewart & Lister, 2001).

Des histoires de colonisation quaternaire contrastées entre deux lignées proches mais présentant des caractéristiques écologiques différentes sont également constatées chez des poissons intertidaux sur la côte ouest américaine (Hickerson & Cunningham, 2005); l'espèce qui vit en fond de baie semble avoir persisté dans son aire actuelle de distribution tandis que l'espèce qui vit de façon moins restreinte à la côte présente une expansion géographique depuis un refuge glaciaire plus au sud.

Le fait que la population de Baie de la Forêt soit plus proche des populations de la

lignée S que des autres populations intertidales pourrait également constituer un indice du remplacement de la lignée I par la lignée S plus au Sud et donc une indication de limite d'aire. Cependant, les deux individus des côtes portugaises, échantillonnés en milieu intertidal, présentent la signature génétique de la lignée I, indiquant ainsi que la lignée I est plus répandue en Atlantique que précédemment pensé. Les côtes portugaises constituent d'ailleurs une zone de mélange pour d'autres espèces cryptiques, notamment pour les deux clades de *P. koreni* alors que le clade 1 n'est pas présent ailleurs au Sud de la Bretagne (Jolly *et al.*, 2006).

L'histoire récente des lignées d'*A. brachiata*, telle qu'elle est en partie retracée par l'évolution mitochondriale, renforce l'idée d'une histoire évolutive commune entre les différentes espèces des peuplements de sables fins envasés d'Europe depuis le dernier épisode glaciaire. Dans le cas d'*A. brachiata*, l'échantillonnage s'avère un facteur limitant, surtout pour la lignée I, dans l'interprétation des patrons de colonisation. Ces patrons, de même que les patrons de divergence du chapitre II.1.1, se trouvent renforcés du fait qu'ils sont partagés par plusieurs espèces du même peuplement. Ainsi, comme l'énonçaient Bermingham & Moritz (1998), des approches comparatives utilisant des espèces de différents embranchements, inféodées au même type d'habitat mais présentant des modes de vie contrastés, semblent être un outil très pertinent pour mieux identifier les événements de vicariance et ainsi appréhender l'histoire plus ou moins ancienne des espèces et son rôle dans la structure actuelle des populations.

Mais le scénario diffère aussi selon les marqueurs

Les analyses génétiques conduites sur les allozymes tendent à montrer un très fort niveau de structure génétique, traduisant ainsi une limitation des flux de gènes entre populations. En effet, la plupart des valeurs de différenciation génétique par paire sont significativement différentes de zéro, quelle que soit la lignée. Ainsi, dans le cas d'*A. brachiata*, une faible durée de vie larvaire se traduit réellement par une connectivité faible entre populations. A l'instar des exemples cités en introduction (McMillan *et al.*, 1992; Hoskin, 1997; Arndt & Smith, 1998), une larve qui présente une durée de vie de quelques jours ne peut disperser sur de grandes distances, entraînant ainsi des isolements conséquents entre populations. De plus, dans le cas de cette espèce, l'extrême fragmentation de l'habitat peut renforcer l'isolement. En Manche, les habitats de sables fins envasés sont souvent discontinus car localisés en fond de baie. Or, du fait de l'hydrodynamisme intra-baie, les apports allochtones ont tendance à y être réduits (Gaines & Bertness, 1992). En outre, l'isolement s'avère plus conséquent pour les populations de la lignée I que pour celles de la

lignée S. L'émersion pourrait sans doute augmenter les difficultés pour des larves allochtones de s'implanter dans une population : un cycle de marée réduit presque de moitié le temps durant lequel les larves peuvent recruter en milieu intertidal.

Néanmoins, il existe un vrai décalage entre les valeurs de différenciation génétique par paire estimées à partir des marqueurs allozymiques et celles calculées sur le locus mitochondrial : la grande majorité des valeurs basées sur le mitochondrial est faible et non significative. Or l'hypothèse des flux réduits entre populations du fait d'une phase larvaire courte semble assez vraisemblable. Comment justifier alors l'absence de différenciation entre populations sur la base des données mitochondriales ? Ces faibles valeurs de différenciation sont avant tout basées sur l'accumulation de mutations neutres et donc le reflet d'une homogénéité intraspécifique due à un faible niveau de divergence depuis l'ancêtre commun, ce qui est cohérent avec une colonisation récente datant de moins de 10000 ans. Les valeurs de D de Tajima, précédemment imputées à une expansion démographique récente peuvent également s'expliquer par des phénomènes de balayage sélectif, avec l'apparition et la propagation rapide d'un mutant avantageux. Ces très faibles valeurs seraient ainsi sans doute le reflet d'une histoire évolutive complexe qui inclurait variations démographiques et balayage sélectif (Mishmar *et al.*, 2003; Bensch *et al.*, 2006). Les fortes différenciations allozymiques pourraient alors traduire des effets démographiques locaux (effet de dérive) qui masqueraient l'isolement par la distance.

A l'inverse, si les valeurs de différenciation basées sur le mitochondrial sont considérées comme justes, les populations devraient donc être considérées comme homogènes sur l'ensemble de l'aire d'échantillonnage. Comment peuvent alors se justifier de si fortes valeurs de différenciation allozymique ? Qui plus est, le degré de différenciation semble indépendant de la proximité géographique des populations puisque aucune tendance d'isolement par la distance n'a pu être décelée pour la lignée S et qu'elle est même négative pour la lignée I. La principale hypothèse est qu'il existe au sein des diverses populations des niveaux différents d'hybridation et d'introgression entre les deux lignées écotypiques d'*A. brachiata*. Cette hypothèse permettrait, en outre, d'expliquer les importants déficits en hétérozygotes, les déséquilibres de liaison entre locus et le fait que les différences de fréquences alléliques entre les deux lignées écotypiques soient moins franches pour les quatre locus autres que celui de *Hk* (Chapitre II.1.1). Les tests d'assignation suggèrent fortement l'existence de phénomènes d'hybridation entre les deux lignées. Certaines zones semblent être plus concernées par ce phénomène, notamment la Baie de Douarnenez.

Il existe cependant des valeurs de différenciation mitochondriales significatives, plus nombreuses pour la lignée I que pour la lignée S. Ainsi, les échanges réduits pourraient expliquer une part de la structure génétique et donc justifier que de nombreuses fréquences allozymiques soient significativement différentes entre populations par dérive. Par ailleurs, l'existence d'hybrides pourrait expliquer pourquoi ces valeurs de différenciation allozymique sont aussi fortes, sans que le facteur géographique ne soit explicatif. Le décalage qui existe entre les deux marqueurs pourrait ainsi s'expliquer par un scénario intermédiaire, cumulant histoire de colonisation récente, flux réduits, phénomènes d'hybridation et sensibilité différentielle des marqueurs aux forces évolutives (migration/dérive vs mutation/dérive). De la même manière, Addison & Hart (2004; 2005) décèlent d'importantes disparités entre les données de différenciation génétique sur le marqueur nucléaire et le marqueur mitochondrial de l'oursin *Strongylocentrotus droebachiensis*, qu'ils expliquent par le cumul au niveau des marqueurs de l'histoire de la colonisation de l'Atlantique Nord et de phénomènes d'hybridation interspécifique. L'association de deux types de marqueurs est d'ailleurs considérée comme un minimum pour pouvoir mettre en évidence des phénomènes d'introgession même si flux de gènes et polymorphisme ancestral sont souvent très durs à dissocier (Mallet, 2005).

Chapitre II.2. Étude à micro-échelle, le cas de la Baie de Douarnenez : isolement entre populations voisines d'*A. brachiata* et maintien de l'intégrité des deux lignées écotypiques

L'étude à macro-échelle spatiale de la structure génétique des populations d'*A. brachiata* n'a pas permis d'évaluer avec certitude le degré de connectivité qui existe entre les populations. En effet, compte tenu des nombreux phénomènes, historiques et introgressifs, qui interagissent sur la signature génétique, il est apparu difficile de voir à quelle échelle pouvait se faire les échanges entre populations. Compte tenu de la faible durée de la phase larvaire, se placer à une échelle spatiale plus petite semble une approche intéressante pour détecter les éventuels mouvements de migration entre populations proches. De même, il paraissait intéressant de suivre les populations à différents moments de leur cycle de vie, notamment en situations *a priori* post-recrutement, dans l'optique de détecter plus facilement des arrivées allochtones. Cette étude à micro-échelle spatiale avait également pour objectif d'affiner les observations sur la répartition préférentielle des lignées dans les habitats intertidal et subtidal et de mieux quantifier le degré d'hybridation entre les deux lignées. Dans le chapitre précédent, la structure génétique des populations de la Baie de Douarnenez présentait quelques particularités laissant supposer l'existence d'une hybridation inter-lignées puisque six des seize individus mal assignés en provenaient. C'est pourquoi, la structure génétique d'*A. brachiata* a été analysée pour la Baie de Douarnenez de façon plus détaillée.

Située à l'extrémité de la Bretagne, entre la presqu'île de Crozon et le Cap Sizun, la baie de Douarnenez constitue un bassin d'effondrement dont la profondeur n'excède pas 40 mètres. Elle s'ouvre à l'ouest sur la mer d'Iroise par un goulet de 9 km de large. L'hydrodynamisme est faible ou modéré en général ; les courants de marée les plus intenses sont enregistrés dans la partie nord du goulet, au sud du Cap de la Chèvre. La baie présente un système de courants giratoires, en se remplissant par le sud et en se vidant par le nord. Du fait de la faible profondeur, les vents ont une forte influence sur l'homogénéisation des masses

d'eau, au sein de la baie mais aussi avec l'extérieur. Cette baie présente tous les types de substrats ; elle est caractérisée par une forte diversité et une grande abondance en échinodermes vagiles (Blanchet *et al.*, 2004).

Démarche

L'échantillonnage a été réalisé le long de deux radiales, en juin et septembre 2005, lors des campagnes Ophirois II et III. Chaque radiale est constituée d'une station intertidale, une station subtidale à 10 m de profondeur et une station subtidale à 30 m de profondeur (Figure II.16). Ces radiales ne constituent pas, sur toute leur longueur, un continuum d'habitat favorable à l'espèce : la zone comprise entre 0 et 10 m présente un sédiment homogène de sables fins, tandis que des bancs de sables grossiers et de cailloutis s'intercalent entre les stations à 10 et 30 m. Les stations à 10 m de profondeur correspondent aux premiers individus subtidaux rencontrés le long des radiales au départ, respectivement, de Morgat et de Cameros (donc les individus les plus proches de la zone de balancement des marées).

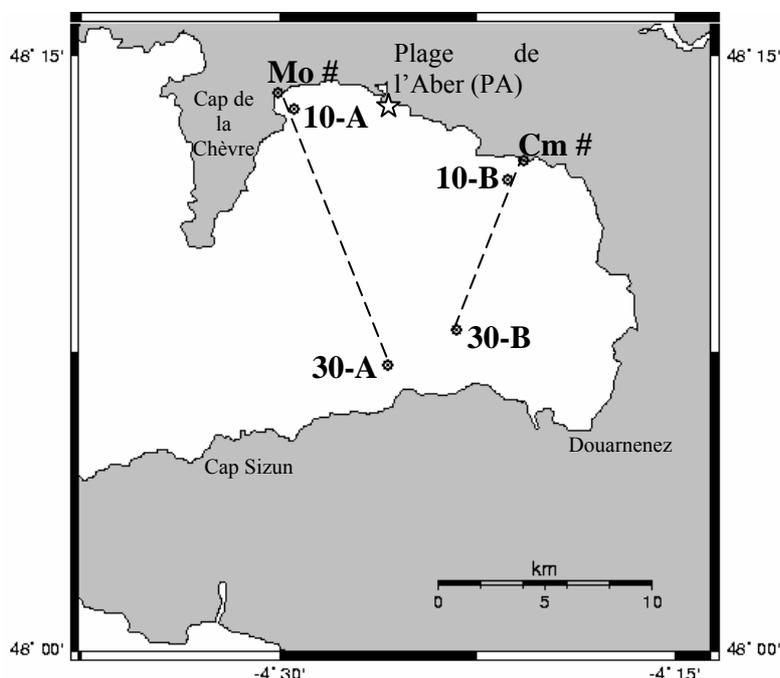


Figure II.16. Distribution géographique des six stations d'échantillonnage en Baie de Douarnenez : Morgat et Cameros en intertidal et quatre stations subtidales. La profondeur des stations et la taille des échantillons, en juin et en septembre, sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

		Prof.	n (juin)	n (sept)
Radiale 1	Mo	0 m	53	45
	10-A	10 m	33	48
	30-A	28 m	36	52
Radiale 2	Cm	0 m	42	22
	10-B	10 m	57	31
	30-B	30 m	51	59

1. Microstructure spatiale et temporelle des populations de la Baie de Douarnenez

Les barrières physiques, tels que les reliefs géographiques, les fronts hydrodynamiques et la fragmentation de l'habitat peuvent s'opposer aux flux d'individus. Certaines caractéristiques intrinsèques de l'espèce, comme la faible durée de vie de la larve d'*A. brachiata*, peuvent néanmoins être plus ou moins sensibles à ces barrières physiques. Un très fort isolement entre populations et bassins a pu être mis en exergue au chapitre précédent, sans pour autant pouvoir le mettre en relation avec le faible potentiel dispersif de l'espèce. L'analyse de la structure génétique entre populations à une plus fine échelle géographique fait l'objet du présent sous-chapitre.

1.1. Résultats

Les niveaux de diversité génétique sont présentés dans le Tableau II.11. Ils sont du même ordre de grandeur entre les différentes populations, de même qu'entre les échantillons de juin et de septembre, et ce quel que soit le marqueur génétique considéré avec, d'une manière générale, une tendance à une légère hausse entre les deux dates.

Tableau II.11. Variation spatio-temporelle de la diversité génétique entre juin et septembre 2005 pour les différentes populations de la Baie de Douarnenez avec :

Pour les données mitochondriales, *Hd*, la diversité haplotypique et π , la diversité nucléotidique
 Pour les données allozymiques, *Rs*, la richesse spécifique ; *Hn.b.*, l'hétérozygotie attendue non biaisée et *Hobs.*, l'hétérozygotie observée.

	Subtidal								Intertidal			
	10A-J	10A-S	30A-J	30A-S	10B-J	10B-S	30B-J	30B-S	Mo-J	Mo-S	Cm-J	Cm-S
<i>Hd</i>	0,917	0,950	0,911	0,890	0,942	0,988	0,892	0,940	0,779	0,833	0,672	0,833
π	0,0056	0,0047	0,0040	0,0037	0,0049	0,0070	0,0069	0,0048	0,0038	0,0042	0,0039	0,0047
<i>Rs</i>	3,5	3,0	3,3	3,6	3,0	3,4	2,8	3,2	3,1	3,5	3,1	2,8
<i>Hnb</i>	0,480	0,488	0,545	0,538	0,492	0,527	0,432	0,483	0,343	0,457	0,458	0,415
<i>Hobs</i>	0,455	0,492	0,428	0,485	0,375	0,403	0,349	0,381	0,328	0,469	0,381	0,464

Les valeurs de F_{IS} monolocus et multilocus sont présentées dans le Tableau II.13. Les déficits en hétérozygotes concernent sept des 12 échantillons avec des valeurs allant de -0,027 à Morgat en septembre à 0,239 à la station 30B en juin et en septembre. Alors que le déséquilibre de liaison entre locus est non significatif à l'échelle de la baie, des associations significatives entre locus sont cependant détectables au sein de sept de ces échantillons ($p < 0,05$), pour: *Hk-Pgi* à 10A-J, *Hk-Mpi* à 30A-J, *Me-Mpi* à 10B-S, *Hk-Me* à 30B-S, *Pgm-Me* et *Pgi-Mpi* à Morgat-J, *Hk-Pgm* et *Pgi-Me* à Cameros-J et *Pgi-Mpi* à Cameros-S.

Tableau II.13. Estimations monolocus et multilocus des indices de fixation F_{IS} au sein des six stations de la Baie de Douarnenez, pour juin et septembre 2005. Les valeurs de probabilité associées sont calculées par permutations grâce à Genetix (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

	10A-J	10A-S	30A-J	30A-S	10B-J	10B-S	30B-J	30B-S	MJ	MS	CJ	CS
<i>HK</i>	-0,019	-0,35	0,011	-0,144	0,186	0,009	-0,165	0,079	-0,011	-0,070	-0,159	-0,066
<i>PGM</i>	0,128	-0,016	0,305*	0,004	0,221*	0,267*	0,282***	0,484***	-0,049	0,104	-0,091	-0,027
<i>PGI</i>	0,314*	0,076	0,124	-0,079	-0,120	0,060	0,092	-0,161	-0,097	-0,313	0,052	-0,400
<i>ME</i>	0,364***	0,192***	0,341***	0,279***	0,664***	0,542***	0,514***	0,166***	0,633***	0,024	0,814***	-0,167
<i>MPI</i>	0,426***	0,200***	0,309***	0,542***	0,198***	0,467***	0,308***	0,45***	-0,021	0,113	0,142*	0,031*
<i>Moyenne multilocus</i>	0,055	-0,008	0,217***	0,101***	0,194***	0,213***	0,239***	0,238***	0,043	-0,027	0,171***	-0,119

Les valeurs de différenciation génétique par paire indiquent que des différences significatives peuvent être observées dans la composition génétique des populations de Baie de Douarnenez dans l'espace et dans le temps. Ainsi, les valeurs de différenciation génétique temporelle obtenues sur les données mitochondriales (Tableau II.12), indiquent que deux des six échantillons de septembre sont significativement différents de leurs homologues respectifs du mois de juin. Les valeurs obtenues sur les données allozymiques indiquent que cinq des six échantillons présentent des variations temporelles significatives.

Tableau II.12. Indices de différenciation génétique temporelle calculés par station, entre l'échantillon du mois de juin et celui du mois de septembre du même site. Les valeurs sont basées sur les données mitochondriales (ϕ_{st}) ou allozymiques (θ). Les valeurs de probabilité associées sont indiquées par : * pour $p < 0,05$ et *** pour $p < 0,001$.

	Subtidal				Intertidal	
	10-A	30-A	10-B	30-B	Mo	Cm
ϕ_{st}	-0,008	-0,001	0,022*	0,039*	0,001	-0,034
θ	0,023*	0,010	0,027*	0,093***	0,060***	0,051***

Les Figures II.17 et II.18 permettent de visualiser les différences spatio-temporelles observées au niveau des fréquences mitochondriales et allozymiques, entre les populations de la Baie de Douarnenez en juin et septembre 2005. Les fréquences des haplotypes communs et privés ne sont pas similaires entre juin et septembre, quelle que soit la population. Cependant, ces variations ne sont significatives que pour les stations 10B et 30B.

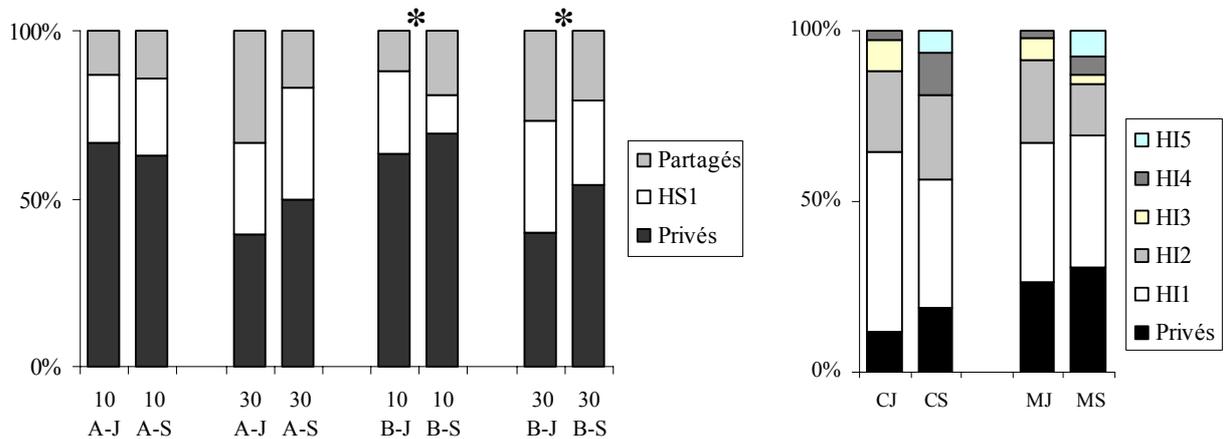


Figure II.17. Variations spatio-temporelles des fréquences relatives des haplotypes communs et privés au sein des quatre stations subtidales de Baie de Douarnenez (première lettre de la légende en abscisses : 10A, 30A, 10B et 30B) à gauche, et des deux stations intertidales (M pour Morgat et C pour Cameros) à droite, entre juin et septembre 2005 (dernière lettre de la légende en abscisses : J et S). Les astérisques indiquent quand les variations temporelles sont significatives avec $p < 0,05$.

A l'inverse, les données allozymiques montrent que seule la station 30A possède une structure génétique homogène entre juin et septembre (Tableau II.12). La station 30B et les stations intertidales présentent à l'inverse de fortes variations temporelles. De plus, les locus ne contribuent pas de façon similaire à ces variations temporelles (Figure II.18). Les locus *Hk* et *Pgm* ne présentent pas de fortes variations temporelles ni spatiales entre les quatre populations subtidales. A l'inverse, les fréquences alléliques de la *Pgi*, *Me* ou *Mpi* sont significativement différentes pour plusieurs populations subtidales. Par exemple, l'allèle *Pgi-108* a tendance à être plus représenté en septembre au sein des populations subtidales, et ce de façon significative pour les deux stations de la radiale B. Les variations temporelles semblent plus conséquentes en intertidal, avec des différences de fréquences alléliques à trois locus à Morgat et deux locus à Cameros, avec par exemple, en septembre, l'allèle *Hk-95* deux fois moins représenté à Morgat et l'allèle *Pgi-104* deux fois plus représenté au sein des deux populations intertidales, qu'en juin dans ces mêmes populations. Les allèles *Hk-100* et *Hk-105*, principalement représentés dans les populations subtidales, sont présents à Morgat et leur fréquence relative diminue entre les deux dates ; l'allèle *Pgi-108* semble suivre la même tendance.

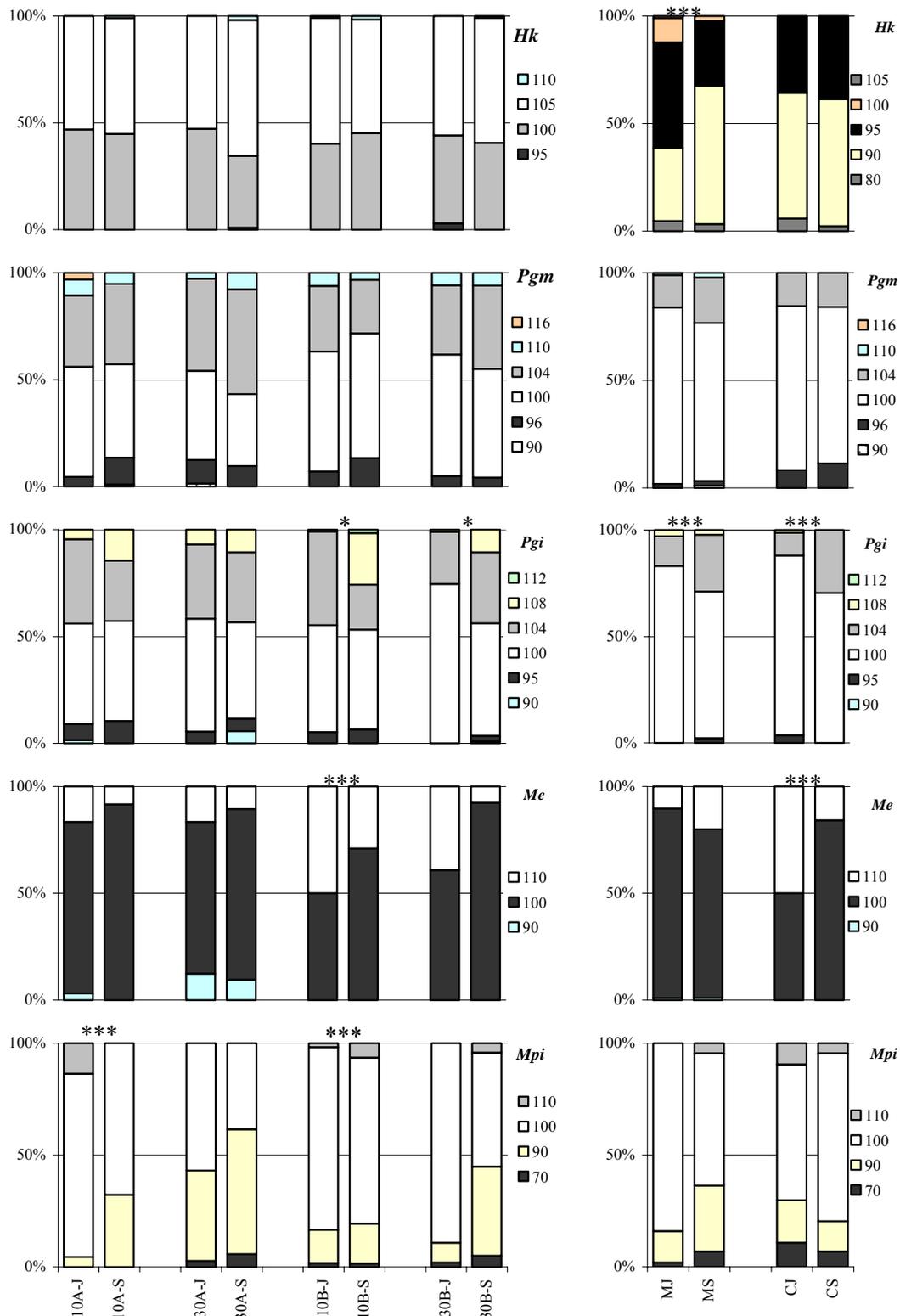


Figure II.18. Variations spatio-temporelles des fréquences alléliques des 5 loci de l'étude, au sein des quatre stations subtidales (avant le tiret, légende en abscisses : 10A, 30A, 10B et 30B) et des deux stations intertidales (M pour Morgat et C pour Cameros) de Baie de Douarnenez, entre juin et septembre 2005 (seconde lettre de la légende en abscisses : J et S). Les astérisques indiquent quand les variations temporelles sont significatives avec * pour $p < 0,05$ et *** pour $p < 0,001$.

La Figure II.19 présente l'ensemble des valeurs de différenciation spatiale, en juin d'une part et, en septembre d'autre part. Les valeurs de différenciation en juin sont comprises entre 0,018 et 0,099 et toutes significatives, traduisant une structure génétique spatiale forte. En septembre, seules cinq des sept valeurs sont significatives. Les trois valeurs de différenciation latérale le long des isobathes sont maximales en juin et faibles, voire nulles, en septembre. Inversement, seule une des quatre valeurs de différenciation entre profondeurs différentes diminuent entre juin et septembre.

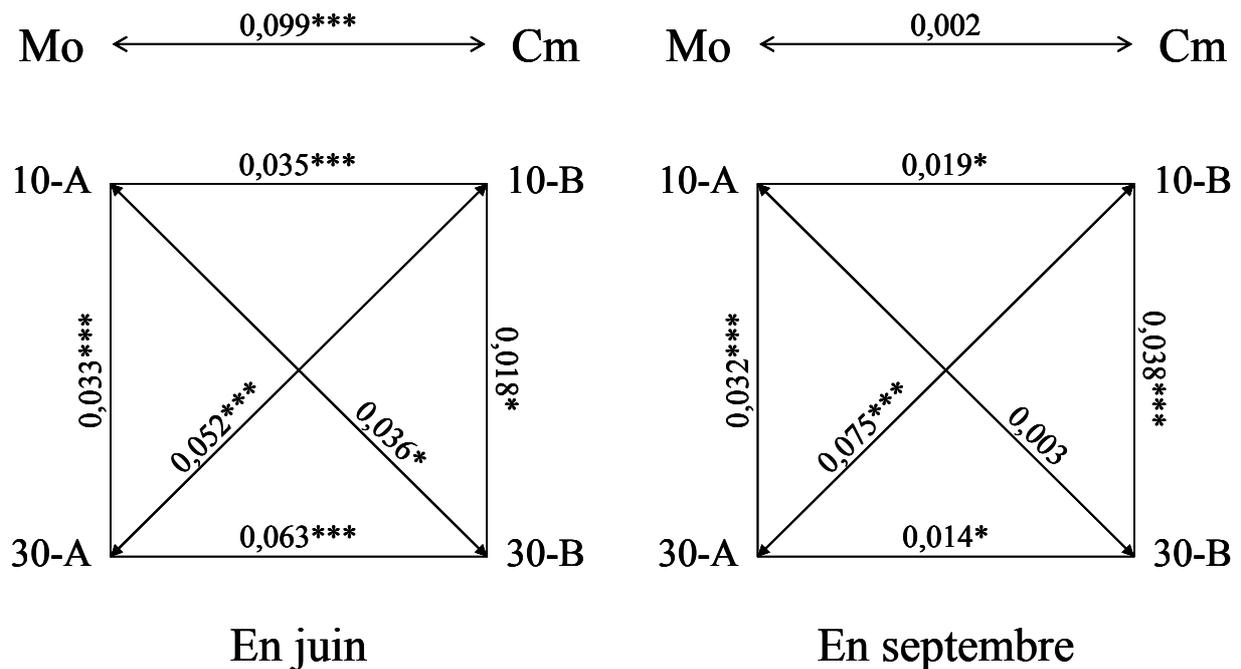


Figure II.19. Valeurs de différenciation génétique basées sur les données allozymiques (θ), calculées par paire de populations au sein des quatre stations subtidales de Baie de Douarnenez (10-A, 10-B, 30-A et 30-B) d'une part, et des deux stations intertidales (Mo pour Morgat et Cm pour Cameros) d'autre part, pour juin et septembre. Les valeurs de probabilité associées sont indiquées par * pour $p < 0,05$ et *** pour $p < 0,001$. Après correction de Bonferroni, seules valeurs à $p < 0,001$ restent significatives.

1.2. Discussion

La structure génétique observée en juin entre les populations de la Baie de Douarnenez est marquée, indiquant une absence d'échanges entre les populations, en accord avec les résultats du Chapitre I.2. Cependant, les différences significatives observées en juin ne se retrouvent pas forcément en septembre entre les mêmes localités. Ce changement de structure dans le temps pourrait s'expliquer par une arrivée de nouveaux individus dans la population, notamment suite à un événement de recrutement. Or, aucun individu de petite taille n'est présent dans les échantillons, éliminant l'hypothèse d'une modification de la structure

génétique par une arrivée de juvéniles. En effet, les échantillons sont uniquement constitués d'individus de plus de 7 mm donc d'adultes de trois ans et plus (Bourgoin, 1987; Harlay *et al.*, en prep.). Les différences dans la composition génétique des populations entre juin et septembre ne sont ainsi pas le fait de l'arrivée de jeunes individus. Il existe donc d'autres processus qui influent, par le biais de la modification du pool d'adultes, sur la structure génétique spatio-temporelle des populations d'*A. brachiata* en baie de Douarnenez, avec deux principales hypothèses : des phénomènes de mortalité différentielle associée, ou non, à de l'introgession avec contre-sélection des hybrides ou de la migration d'adultes.

Les mortalités d'adultes peuvent se faire de façon aléatoire ou sous sélection. Une mortalité adulte importante entre juin et septembre s'effectuant de façon aléatoire entraînerait un remodelage disparate de la composition génétique de chaque population, en renforçant la dérive génétique tandis qu'une mortalité sous sélection induirait une réorganisation dirigée des fréquences alléliques. Dans le cas présent, la structure génétique ne semble pas évoluer de façon totalement chaotique. Les variations de fréquences alléliques entre juin et septembre montrent des tendances similaires, avec les mêmes allèles (dé)favorisés entre les deux mois, et ce pour les populations intertidales et subtidales. Ainsi des mortalités pourraient avoir lieu durant l'été et se feraient plutôt de façon dirigée, entraînant des modifications de la composition génétique des populations en accord avec des hypothèses de sélection, ou plus exactement de contre-sélection, dans le cas présent. Des mortalités estivales d'*A. brachiata*, suite à l'effort de reproduction, ont déjà été observées (Bourgoin, 1987). Elles pourraient justifier les modifications de la structure génétique détectées à ces périodes. Enfin, si les mortalités se font de façon dirigée, des variations inter-annuelles devraient pouvoir être observées (Hedrick, 1986; Schmidt *et al.*, 2000). En effet, compte tenu de la variabilité des conditions environnementales et de l'hétérogénéité de l'habitat, les variations génétiques dues aux mortalités estivales ne devraient pas présenter la même signature d'une année sur l'autre. L'hypothèse des mortalités permet en outre d'expliquer la diminution de porteurs des allèles *Hk-100* et *Hk-105* dans la population intertidale de Morgat. Ces allèles font partie des allèles diagnostiques des populations subtidales, et pourraient constituer une trace de l'hybridation préférentielle des individus des deux lignées situées en fond de baie (Morgat) lors de la période printanière. Leur disparition pourrait alors indiquer une contre-sélection des hybrides pendant la période estivale. Il en va de même pour l'allèle *HK-95* dans la population 30B, diagnostique des populations intertidales, qui serait contre-sélectionner entre les deux mois. Mais comment expliquer alors que ce même allèle se retrouve à la station 30A en septembre alors qu'il n'était pas représenté en juin ?

L'hypothèse alternative repose sur la possibilité de migrations d'adultes latérales pendant l'été. La migration des ophiures adultes dont *A. brachiata* a déjà été suggérée (Tyler & Banner, 1977). Les comportements de « rafting » existant chez certaines ophiures (Hendler & Miller, 1991; Hendler *et al.*, 1999) n'ont cependant jamais été observés chez *A. brachiata* ; ces comportements sont cependant envisageables chez cette espèce, même si elle vit enfouie dans les dix premiers centimètres du sédiment. Il est possible d'imaginer, notamment en zone intertidale, que les individus sortent du sédiment et profitent des courants de marée pour se déplacer vers le bas ou le haut de l'estran, comme c'est le cas pour d'autres invertébrés marins (Farke & Berghuis, 1979; Guillou, 1980; Goodacre, 2006). D'autres mécanismes peuvent également permettre le flux d'adultes comme, par exemple, des phénomènes de migration passive par remise en suspension du sédiment. Ces migrations passives ont déjà été décrites pour des invertébrés marins de substrat meuble (Tamaki, 1987; Zühlke & Reise, 1994; Grant *et al.*, 1997). Dans le cas présent, des migrations d'adultes pourraient expliquer l'apparition de l'haplotype commun HI5 dans les populations en septembre alors que celui-ci n'était pas présent dans les mêmes populations en juin. Si les phénomènes de sélection peuvent expliquer pour quoi les fréquences relatives de certains allèles ou certains haplotypes varient, elles peuvent malheureusement difficilement expliquer l'apparition de nouveaux haplotypes. L'apparition de l'haplotype HI5 pourrait certes aussi s'expliquer du fait du manque de représentativité des échantillons, les échantillons de juin et de septembre ne donnant pas exactement la même information juste du fait de la stochasticité de l'échantillonnage. Il semble néanmoins bizarre que ce biais s'observe à l'identique dans les deux populations intertidales. S'il n'est pas possible d'exclure le rôle des mortalités estivales dans les variations temporelles des signatures génétiques des populations, l'hypothèse de migrations d'adultes apparaît être une alternative très plausible. En outre, il semblerait que ces migrations se fassent sur un même niveau bathymétrique. En effet, les différenciations entre stations d'un même niveau bathymétrique sont toutes fortement atténuées entre les deux mois d'échantillonnage, ce qui n'est pas observé lorsque les comparaisons sont effectuées à différents niveaux bathymétriques.

2. Isolement entre lignées

Les barrières génétiques sont les seules à pouvoir maintenir de façon durable l'intégrité des espèces. Ces mécanismes d'isolement reproducteur peuvent être d'origine exogène ou endogène et s'exercent à différents moments du cycle de vie (Figure II.20). Sur l'ensemble de l'aire d'échantillonnage (Chapitre II.1), l'appartenance de la lignée S à l'habitat subtidal et inversement de la lignée I à l'habitat intertidal semble assez marquée. En effet, les seules exceptions sont la présence de quatre individus avec une signature subtidale au niveau de la Plage de l'Aber (PA-a) et la présence d'individus avec une signature subtidale dans la population intertidale de Baie de la Forêt, soit environ 7% de l'échantillonnage total. La question s'est donc posée de savoir quelle était la limite de répartition bathymétrique entre les deux lignées et si la bathymétrie pouvait avoir un rôle dans l'isolement des lignées. Une limite franche entre les deux lignées pourrait avoir des conséquences en terme de reproduction préférentielle eu sein de chaque habitat. Une reproduction asynchrone entre lignées serait un autre mécanisme susceptible d'assurer un isolement reproducteur. Ce type de mécanisme est envisageable chez la plupart des invertébrés marins des zones tempérées car ces animaux présentent en général un cycle de reproduction avec une période de ponte limitée dans le temps : c'est d'ailleurs le cas pour *A. brachiata* (Bourgoin, 1987; Gentil & Zakardjian, 1990).

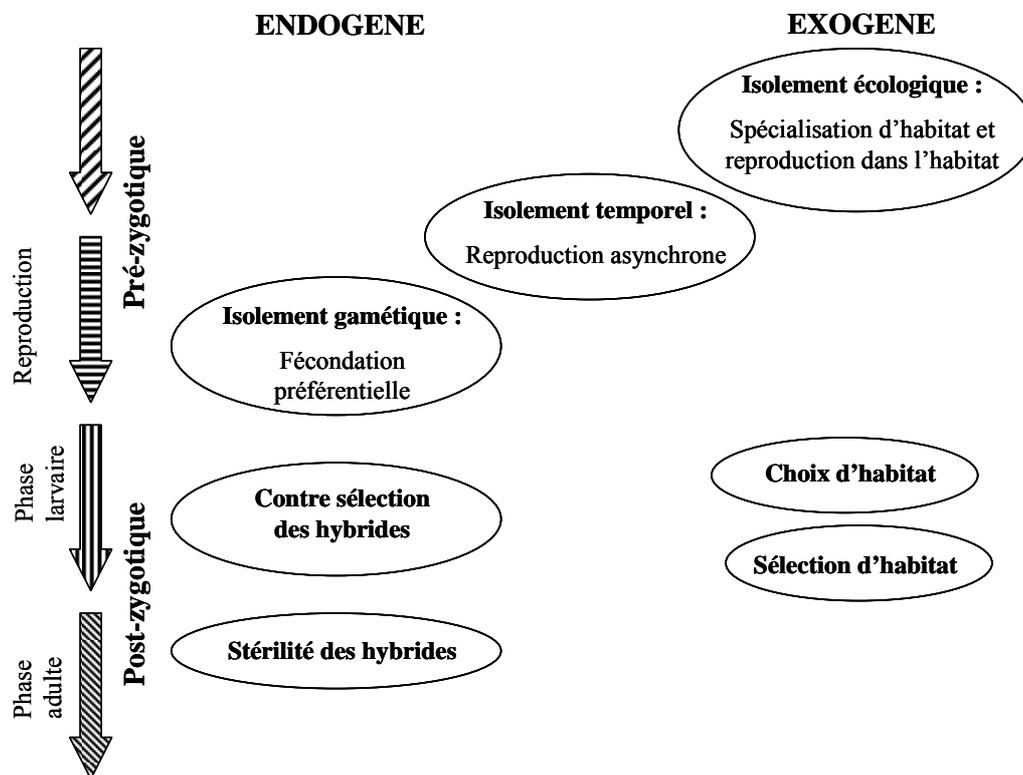


Figure II.20. Les différents mécanismes d'isolement reproducteur possibles chez les invertébrés marins (Bierne, 2001).

Dans la sous-partie 2 du chapitre II.2, il est donc proposé de (1) quantifier l'importance des événements d'hybridation au sein des six stations de la Baie de Douarnenez, échantillonnées en juin (2) étudier certains des différents niveaux d'actions des mécanismes d'isolement reproducteur.

2.1. Quantification des hybrides

L'ensemble des individus échantillonnés en juin est génotypé aux cinq locus enzymatiques et séquencé au niveau d'un fragment du gène de la COI, permettant ainsi l'estimation indirecte des événements d'hybridation par des tests d'assignation. Les mêmes individus sont également génotypés sur les profils de digestion des séquences ITS2, permettant une diagnose plus précise des hybrides.

La partie du gène 28S amplifiée s'est en effet avérée conservée entre les deux lignées alors que l'espaceur ribosomique ITS2 présente sept mutations fixées entre les lignées. Trois enzymes (Sml1, Eco88 et Xho1) présentent un patron de restriction permettant d'identifier les deux lignées et donc de rechercher d'éventuels hybrides. Sont considérés comme hybrides (Figure II.21), les individus qui présentent, pour chaque enzyme, à la fois le profil attendu pour un individu de la lignée S et celui attendu pour un individu de la lignée I. Les séquences ITS2 et les schémas de restriction des enzymes sont présentés en annexe.

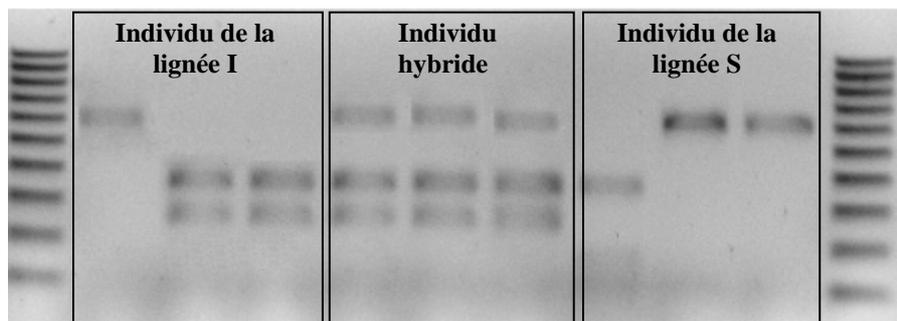


Figure II.21. Profil de migration des fragments du gène ITS2 après digestion par les trois enzymes de restriction (Sml1, Eco88, Xho1). Le fragment total ITS2 d'un individu de la lignée I ne subit aucune digestion par l'enzyme Sml1 (614pb) mais le fragment est découpé en 2 petits fragments par les enzymes Eco88 et Xho1. A l'inverse, le fragment d'un individu de la lignée S n'est pas découpé en 2 petits fragments par les enzymes Eco88 et Xho1 mais subit une digestion par l'enzyme Sml1. Le fragment de l'individu hybride présente des sites de restriction pour les 3 enzymes.

Sur la base des allozymes et des séquences de la COI, les tests d'assignation réalisés sur ces six populations soulignent l'existence de cinq hybrides potentiels. D'autre part, sur l'ensemble des 272 individus de la baie de Douarnenez analysés sur la base du gène ITS2, cinq apparaissent comme réellement des hybrides pour seulement deux détectés par les tests d'assignation (Figure II.22). En tout, les hybrides potentiels représentent huit individus. Cela correspond à 2,2% de l'échantillonnage, avec des individus aussi bien issus du domaine intertidal (6/8) que subtidal (2/8).

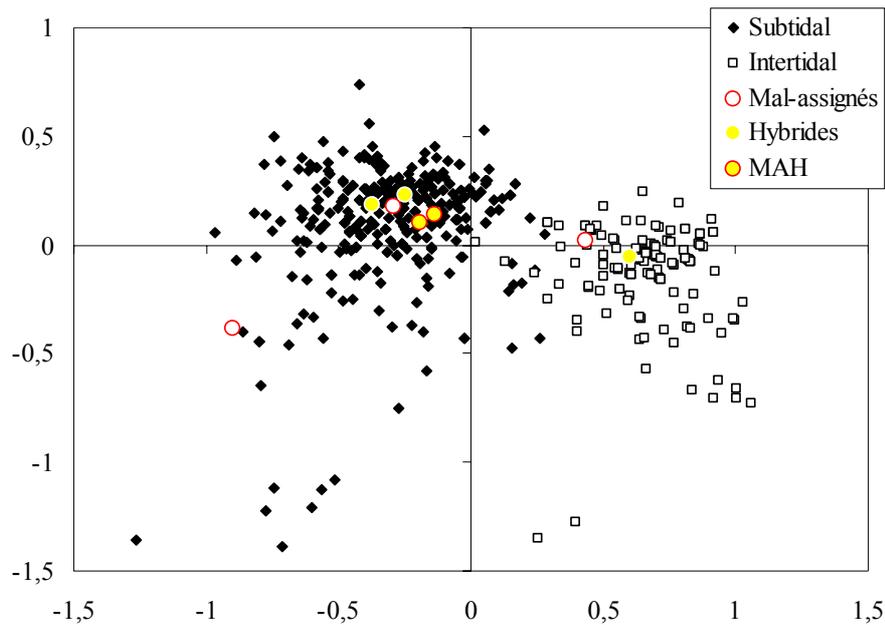


Figure II.22. AFC réalisée avec Genetix sur les fréquences génotypiques des individus de la Baie de Douarnenez. Les individus sont classés en fonction des tests d'assignation et d'identification des hybrides. En noir, les individus de la lignée S, assignés correctement à cette lignée. En blanc, les individus de la lignée I, assignés correctement à cette lignée. En rouge, les individus assignés par leur génotype à la lignée à laquelle ils n'appartiennent pas (donc les hybrides potentiels), en jaune, les hybrides diagnostiqués sur la base de l'ITS2 et en rouge et jaune, les individus hybrides, détectés par les assignations et l'ITS2.

2.2. Isolement écologique

En juin 2005, 100% des individus échantillonnés dans un habitat présentent la signature génétique mitochondriale de la lignée de prédilection (Figure II.23). En effet, 100% des individus échantillonnés en milieu subtidal sont de la lignée S, même pour les stations en limite d'aire, et 100% des individus récoltés en milieu intertidal sont de la lignée I. En septembre 2005, 100% des individus échantillonnés en milieu intertidal présentent la signature génétique mitochondriale de la lignée I alors qu'un individu (sur les 190) échantillonné en milieu subtidal présente la signature de la lignée I ; il est originaire de la station 10-B.

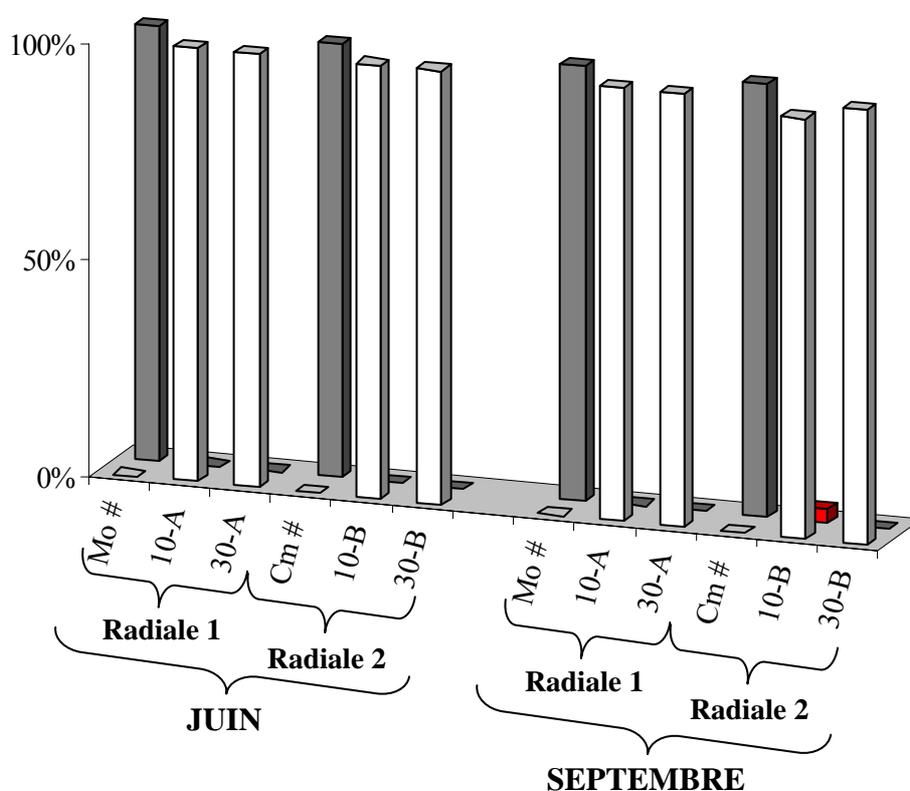


Figure II.23. Proportions relatives des deux lignées aux différentes stations d'échantillonnage : en blanc, pourcentage des individus de la lignée S et en gris, pourcentage des individus de la lignée I. En rouge, le seul individu échantillonné dans un habitat et correspondant à la lignée de l'autre habitat.

L'AFC, réalisée sur les géotypes individuels (Figure II.22) montre une opposition franche entre groupes subtidal et intertidal, avec quelques rares géotypes intermédiaires. Les fréquences alléliques des échantillons de juin et septembre révèlent une structure aussi tranchée, avec une opposition nette entre stations intertidales et subtidales illustrée par l'ACP (Figure II.24), confirmant donc les résultats de l'AFC réalisée sur les données de juin uniquement.

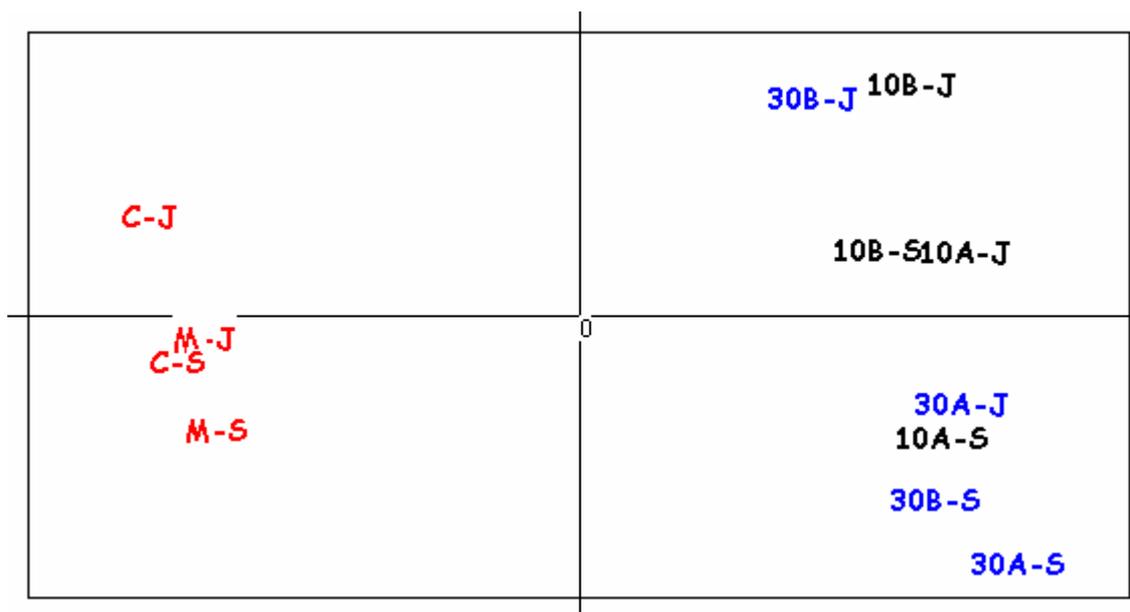


Figure II.24. Analyse en composantes principales basée sur les fréquences alléliques au sein des six stations de la Baie de Douarnenez, en juin et en septembre 2005 (réalisée avec PCA-gene). En rouge, les stations intertidales, en noir, celles à 10 m de profondeur et en bleu, celles à 30 m. L'axe 1 synthétise 67,54% de la variance et l'axe 2 16,13%, tous deux de façon significative ($p < 0,05$)

2.3. Isolement temporel

L'ACP (Figure II.24) sépare les échantillons selon la date de récolte, avec la majorité des échantillons de juin en opposition à ceux de septembre sur l'axe 2, soulignant une différenciation temporelle.

Le suivi de l'indice gonadique a été effectué en parallèle pour les stations intertidale de Morgat et subtidale 10-A, de mi-mars à mi-juillet 2006, pour une dizaine d'individus de chaque sexe par date (Tableau II.14).

	Subtidal			Intertidal		
	M	F	I	M	F	I
17/03/06	5	10	3	8	12	-
13/04/06	10	10	-	10	10	-
26/04/06	12	6	2	14	6	-
15/05/06	11	9	-	9	11	-
29/05/06	10	10	-	11	6	-
16/06/06	10	10	-	12	8	-
13/07/06	10	10	-	10	10	-

Tableau II.14. Nombre d'individus disséqués pour l'indice gonadique en fonction des dates d'échantillonnage et selon les sexes : mâles (M), femelles (F) et individus dont le sexe est indéterminable (I).

A chaque date et pour chaque habitat, l'indice gonadique entre mâles et femelles ne diffère pas de façon significative (test de Mann et Whitney, $p > 0,05$ pour les 14 tests) même si d'une manière générale, l'IG est légèrement supérieur chez les mâles. Aussi, les données des deux sexes sont regroupées à chaque date.

L'évolution de l'IG de chaque habitat est présentée sur la Figure II.25. L'IG augmente de manière significative, entre les échantillons du 13 et du 26 avril pour la lignée S et entre les échantillons du 26 avril et du 15 mai pour la lignée I (test de Mann et Whitney, $U = 2,72$ et $3,75$, respectivement avec $p < 0,001$). Par la suite, une chute brutale de l'indice, qui indique la période qui suit l'émission des gamètes, est observée entre le 15 et le 29 mai pour la lignée S ($U = 4,63$; $p < 0,001$) et entre le 29 mai et le 16 juin pour la lignée I ($U = 3,26$; $p < 0,001$). Ce décalage de 15 jours dans l'évolution de l'IG entre les deux lignées induit une différence significative entre les valeurs d'IG de la lignée S et celles de la lignée I à chacune des quatre dates comprises entre le 26 avril et le 16 juin 2006 ($U = 2,39 - 2,22 - 5,03$ et $3,71$ dans l'ordre chronologique ; $p < 0,001$).

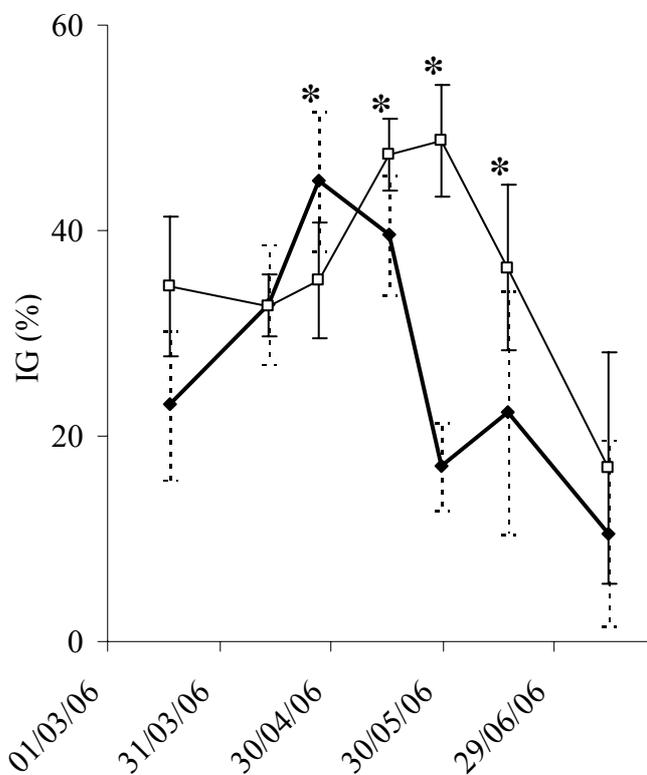


Figure II.25. Evolution temporelle de l'indice gonadique (IG) mesuré chez *A. brachiata* en baie de Douarnenez. La courbe épaisse avec les losanges noirs représente les données de la lignée S, la courbe fine avec les carrés blancs celles de la lignée I. Les astérisques indiquent les dates pour lesquelles l'indice gonadique est significativement différent entre lignée S et lignée I.

2.4. Mécanismes d'isolement gamétique et post-zygotique

En parallèle au suivi gonadique, l'échantillonnage réalisé en Baie de Douarnenez de mars à juillet 2006 avait pour objectif l'obtention d'individus matures afin de pouvoir réaliser des croisements et étudier les phénomènes de fécondation préférentielle au sein d'une lignée. Pour les quatre prélèvements qui ont eu lieu entre le 13 avril et le 13 juin 2006, des expériences de croisement ont été tentées. Plusieurs protocoles ont été appliqués pour déclencher la ponte en accord avec des études préalablement réalisées sur les ophiures (Morgan & Jangoux, 2002; Fourgon, 2006). Malheureusement, aucun des stimuli (choc

thermique, stimulation mécanique et contrôle du rythme circadien) ne s'est révélé suffisamment efficace. Sans ponte, il a donc été impossible d'observer les phénomènes de fécondation préférentielle, et par la suite, de contre-sélection des hybrides.

2.5. Discussion

La présence d'hybrides entre les deux lignées en milieu naturel indique que le processus de spéciation n'est pas totalement abouti. Les expériences d'hybridation en laboratoire, de même que certaines observations *in situ*, tendent à montrer qu'il existe une corrélation linéaire négative entre la distance génétique (et donc le temps depuis la séparation des lignées) et les croisements entre lignées (Mallet, 2005). Ainsi, des hybridations entre des lignées divergentes de 20% sur les séquences mitochondriales, qui se font de façon spontanée en conditions naturelles, semblent être des événements assez rares et renforcent l'idée que les mécanismes d'isolement qui existent entre les lignées d'*A. brachiata* sont en passe de conduire à l'isolement complet des lignées.

L'isolement écologique semble pourtant très fort dans le cas d'*A. brachiata*, avec une séparation marquée des lignées avec l'habitat. Lorsque des espèces cryptiques vivent en sympatrie, il n'est en effet pas rare de trouver des préférences pour des microhabitats distincts (Knowlton, 1993). Deux types de contraintes peuvent expliquer cette forte inféodation :

(1) les milieux intertidaux et subtidaux sont très contrastés en terme de pressions environnementales : il semble vraisemblable que les lignées inféodées à chaque habitat présentent des adaptations écologiques et physiologiques à leur habitat respectif. Des études ont d'ores et déjà montré l'influence directe (Kirby *et al.*, 1997) ou indirecte (Cruz *et al.*, 2004) de la bathymétrie sur la distribution spatiale de types génétiques. Cette adaptation à un environnement donné induit par la suite des phénomènes de mortalité différentielle. La sélection post-zygotique par le biais de la rétention locale de larves ou de jeunes recrues pré-adaptées et l'élimination de larves non-adaptées peut ainsi grandement contribuer à renforcer les barrières aux flux de gènes entre les deux lignées (Bierne *et al.*, 2003).

(2) des phénomènes de reproduction préférentielle entre individus inféodés au sein d'un même habitat. En effet, même si la fécondation des ophiures est externe, certains phénomènes extrinsèques (synchronisme induit par les paramètres environnementaux) ou intrinsèques (comportement reproducteur, comme par exemple, émission de phéromones spécifiques à chaque lignée et stimulation mécanique) peuvent favoriser la reproduction au sein d'une

même lignée et ainsi renforcer le positionnement bathymétrique des lignées et donc permettre leur sympatrie au sein d'une localité donnée. Le mélange hétérogène de gamètes entre lignées pourrait ainsi renforcer d'autres processus pré-zygotiques comme la reconnaissance gamétique qui semble être un processus particulièrement efficace et nécessaire pour assurer l'isolement d'espèces proches chez les invertébrés benthiques à fécondation externe (Palumbi, 1994; Levitan, 2002; Kruse & Reise, 2003; Levitan *et al.*, 2004).

De la même manière, l'isolement temporel des lignées par asynchronisme de reproduction semble assez marqué et pourrait assurer une évolution distincte des lignées tel que décrit par Hendry & Day (2005). Le cycle sexuel avec un pic de maturation gonadique bien marqué durant le printemps présente effectivement un décalage entre milieux subtidal et intertidal, en accord avec ce qu'observait Bourgoin (1987), dans la même zone d'échantillonnage, sur deux années consécutives. L'asynchronisme de ponte semble donc être une constante entre les populations intertidales et subtidales d'*A. brachiata* en Baie de Douarnenez. D'une manière générale, de nombreuses espèces jumelles présentent un asynchronisme de ponte en milieu marin (Knowlton, 1993) avec, dans certains cas, une spécialisation de chaque lignée à une profondeur. Une période de ponte plus tardive dans la zone intertidale serait ainsi une conséquence de l'adaptation de la lignée I aux conditions plus rigoureuses rencontrées en milieu intertidal. C'est aussi l'hypothèse avancée par Nichols & Barker (1984) pour expliquer un décalage dans la période d'émission des gamètes entre deux populations d'*Asterias rubens* en Manche, l'une en subtidal et l'autre en intertidal.

Cependant, l'émission des gamètes chez les espèces des eaux tempérées est aussi fortement dépendante des variations saisonnières de température et d'abondance en nutriments. Or, ces paramètres varient en fonction de la latitude, au moins autant, si ce n'est plus, qu'en fonction de la bathymétrie. Il serait donc intéressant de vérifier que l'asynchronisme de ponte observé pour *A. brachiata* en Baie de Douarnenez existe dans les autres localités, par exemple, en Baie des Veys où populations intertidales et subtidales sont aussi proches géographiquement.

Isolements écologique et temporel ont vraisemblablement contribué à l'isolement des deux lignées. Néanmoins, si ces mécanismes permettent de limiter les mélanges entre lignées, ils ne suffisent pas à les empêcher complètement. Seuls les mécanismes gamétiques ou post-zygotiques permettent un isolement complet des lignées. Du fait de l'absence de ponte *in vivo*, aucun croisement n'a pu être tenté et aucun nouvel indice n'a pu être apporté sur ces

mécanismes chez *A. brachiata*. Il apparaîtrait intéressant de pouvoir prolonger les expérimentations de reproduction *ex situ* ainsi que le suivi génétique des recrues *in situ*. L'hybridation est sans doute très éphémère du fait des nombreux mécanismes de contre-sélection, aussi il apparaît important de pouvoir génotyper les juvéniles au moment du recrutement et donc de fournir un effort d'échantillonnage supplémentaire. L'hybridation naturelle entre lignées d'*A. brachiata* semble être très localisée, sans doute favorisée par des processus hydrodynamiques : la population de Morgat semble ainsi accueillir potentiellement plus d'hybrides (plus d'allèles introgressés) du fait de sa position en fond de baie, avec des courants giratoires qui faiblissent à cet endroit et des populations des deux lignées relativement proches et constituerait donc une zone d'étude à privilégier.

Des expérimentations écophysiologiques, telles que celles menées par Edmands & Deimler (2004), constitueraient une approche complémentaire enrichissante pour déterminer la part des processus de régulation impliqués dans le maintien des écotypes d'*A. brachiata*. Ce type d'approche permettrait peut-être de comprendre comment une lignée peut se substituer à l'autre et s'adapter à un environnement qui n'est *a priori* pas celui de prédilection (par exemple, la population intertidale de Baie de la Forêt constituée exclusivement d'individus de la lignée S – Chapitre I.1).

Chapitre II.3. Structure démographique de deux populations intertidales d'*Acrocnida brachiata* : variabilité temporelle et répartition le long de l'estran

Les objectifs concernant le suivi de dynamique de populations de deux sites intertidaux de la côte bretonne entre 2003 et 2005 sont multiples :

(1) voir si la démographie de la population d'*A. brachiata* de la plage de l'Aber, faites 20 ans auparavant, est stable dans le temps. Un suivi démographique a en effet été réalisé au même endroit en 1984-85 (Bourgoin, 1987) ; la Plage de l'Aber avait alors été identifiée comme étant le site intertidal de la Baie de Douarnenez présentant les plus fortes densités d'*A. brachiata* (30 ind.m⁻², en moyenne). Revenir sur une population dont le fonctionnement démographique est déjà connu permet de se rendre compte de la stabilité de celui-ci.

(2) comparer les démographies d'*A. brachiata* dans le temps mais aussi dans l'espace. C'est pourquoi le suivi a été mené parallèlement en deux sites intertidaux de la côte bretonne : la Plage de l'Aber et la plage de Saint-Efflam. En outre, la forte densité d'*A. brachiata* rencontrée sur ce deuxième site et l'étendue de la population ont permis de spatialiser le suivi démographique. L'étude de la démographie a été mise en œuvre à trois stations de ce site, disposées le long de l'estran, permettant ainsi de tester certaines hypothèses sur le déplacement des ophiures le long de l'estran.

L'étude de la structure génétique des populations d'*A. brachiata* dans la Baie de Douarnenez (chapitre II.2) a en effet mis en avant quelques singularités dans l'évolution spatio-temporelle de la population : d'une part, une absence de recrues et même d'individus de petite taille dans les échantillons récoltés en juin et septembre 2005, et d'autre part, de potentielles migrations d'adultes. L'objectif est donc de voir si l'ensemble des observations du suivi démographique permet d'expliquer en partie ces observations.

1. Description des sites

1.1. La plage de l'Aber (en Baie de Douarnenez)

La Plage de l'Aber se présente comme une petite anse sableuse, d'environ 300 m de longueur sur à peine 100 m de largeur (Figure II.26). L'estran dégagé à basse mer est de faible superficie. L'échantillonnage a été effectué tous les deux mois de mai 2004 à septembre 2005, à raison de cinq stations de 0,25 m² réparties aléatoirement sur la grève.



Figure II.26. Photographie aérienne de la plage de l'Aber (48°N13,666 – 4°W25,913), avec cinq stations matérialisées par des ronds blancs et réparties aléatoirement sur l'estran

1.2. La plage de Saint Efflam (en Baie de Lannion)

La plage de Saint-Efflam est une vaste baie de 5 km² émergeant presque entièrement aux grandes marées de vives eaux (Figure II.27). Environ deux kilomètres de grève séparent la limite entre les basses mers de mortes eaux et les basses mers de vives eaux. Cette grève est connue pour les importants phénomènes de marées d'ulves qui s'y développent depuis 20 ans, pour les ³/₄ du seul fait des apports en nitrate de la Yar, l'un des six ruisseaux du bassin versant (Menesguen, 1999). La présence d'une population assez dense d'*A. brachiata* sur cette plage avait déjà été rapportée par Chassé (1972). L'échantillonnage a été effectué de janvier 2004 à novembre 2005, à raison d'une récolte d'ophiures tous les deux mois, plus un échantillon en juillet 2006.



Figure II.27. Photographie aérienne de la plage de Saint Efflam, avec les trois stations de la radiale matérialisées par des ronds blancs (A : 48°N40,753 – 3°W36,411 à C : 48°N40,877 – 3°W36,362)

La forte densité d'*A. brachiata* et la topologie de la plage ont permis de spatialiser le suivi démographique sur l'estran, le long d'une radiale côte-large. En fait, un échantillonnage préliminaire a permis de délimiter la zone de forte densité, à l'intérieur de laquelle une radiale de trois stations a été définie. La plus haute station sur l'estran (A) correspond au début de la zone de forte densité d'*A. brachiata*. En amont de cette station, sur le haut de l'estran, la densité est inférieure à 10 ind.m⁻². La station intermédiaire (B) est placée à 1/3-2/3 du chemin entre les deux stations extrêmes, plus proche de A. Enfin, la plus basse station (C) correspond à la limite d'émersion pour une marée de coefficient 90 et correspond à la limite inférieure de la population. Les *A. brachiata* sont absentes sur quelques centaines de mètres en aval de la station C et réapparaissent, au-delà, sous forme clairsemée (moins d'1 ind.m⁻²). L'analyse génétique a montré que ces individus étaient de la lignée S. Sur l'ensemble de la période d'échantillonnage, la proportion de temps d'immersion de chaque station diffère : les stations A, B et C sont respectivement immergées 86%, 89% et 96% du temps, en moyenne. A chacune de ces trois stations, dix quadrats de 0,1 m² ont été réalisés.

2. Variabilité spatio-temporelle du fonctionnement démographique

2.1. Densités moyennes des deux populations

Les deux populations échantillonnées présentent des densités totalement différentes, de 10 ind.m⁻² en moyenne à la plage de l'Aber contre 290 ind.m⁻² à la plage de Saint-Efflam. Les évolutions temporelles de densité sont présentées sur les Figures II.28 et II.29. Les densités observées sur la plage de l'Aber sont néanmoins trop faibles pour observer une quelconque tendance saisonnière. La densité moyenne a chuté de 35 ind.m⁻² à moins de 10 ind.m⁻² durant les 16 mois du suivi.

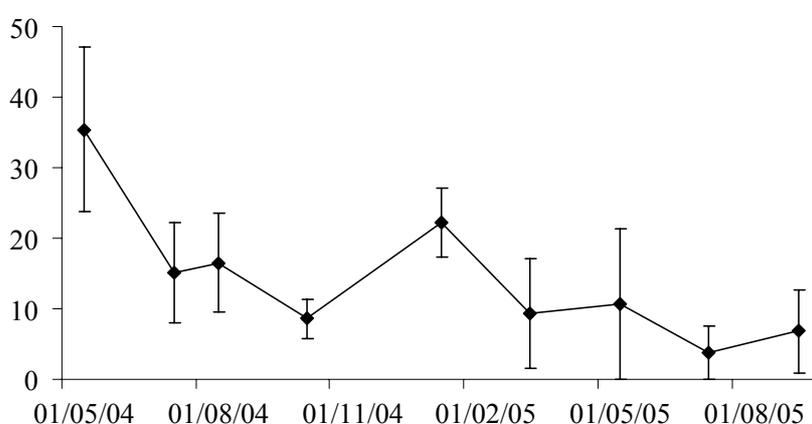


Figure II.28. Evolution temporelle de la densité (en ind.m⁻²; ± écart-type) de la population d'*A. brachiata* à la plage de l'Aber

A l'inverse, les densités de la population de la plage de Saint-Efflam montrent des variations de type saisonnier assez importantes, avec un doublement de densité au printemps-été, suivi d'une décroissance automnale (Figures II.28). Cette forte augmentation se produit entre mai et juillet 2004 et entre mars et mai 2005, mais ne se retrouve pas dans le prélèvement de juillet 2006. Les variations de la densité totale sont fortement liées à celles des grands individus (Dd > 5 mm). Hormis les deux premiers prélèvements, la densité des petits individus (Dd < 5 mm) est faible et correspond toujours à moins de 20% de la densité totale, soit une représentativité très faible des petits individus même les mois où les plus fortes densités sont observées.

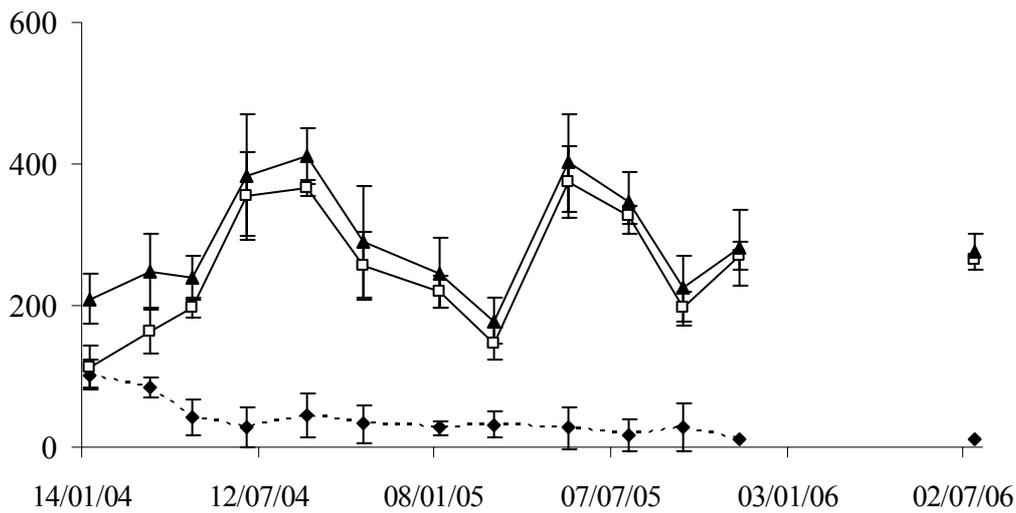


Figure II.29. Evolution temporelle de la densité (en ind.m⁻²; ± écart-type) de la population d'*A. brachiata* à la plage de Saint Efflam. Les triangles noirs indiquent la densité totale, les carrés blancs, celle des individus de grande taille ($Dd > 5$ mm) et les losanges noirs, celle des petits individus ($Dd < 5$ mm).

2.2. Evolution temporelle de la structure démographique des deux populations

Les histogrammes de fréquence de taille des individus sont présentés pour la plage de l'Aber et celle de Saint-Efflam sur les Figures II.30 et II.31, respectivement.

Pour la plage de l'Aber, la plupart des échantillons ne comporte qu'un seul mode, dont la moyenne est comprise entre 4,5 et 5 mm et semble stable au cours du temps. En juillet 2004, un second mode de très faible amplitude, constitué d'individus de très petite taille (< 2 mm), apparaît. Quatre mois après, ce mode fusionne avec le pic d'adultes, soit une croissance moyenne de $0,5 \text{ mm.mois}^{-1}$ sur les quatre mois de croissance. Ce mode correspond à moins de 10% de l'effectif total de l'échantillon. Une autre arrivée de juvéniles de petite taille a lieu en septembre 2005. En août 2004, un troisième mode apparaît ; il est constitué de grands individus (8 mm en moyenne) et ne se retrouve qu'à cette date.

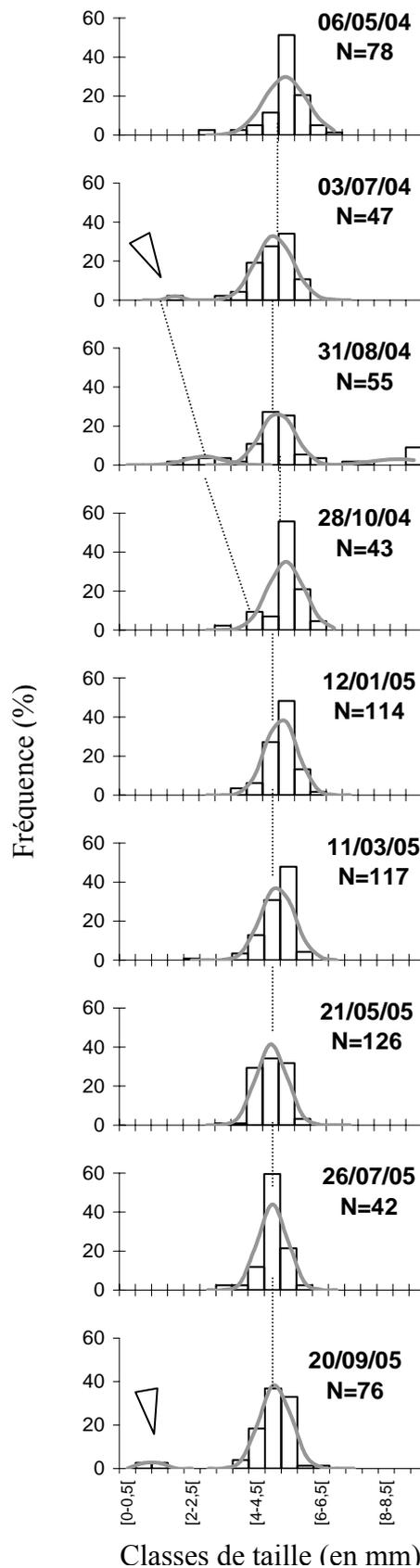
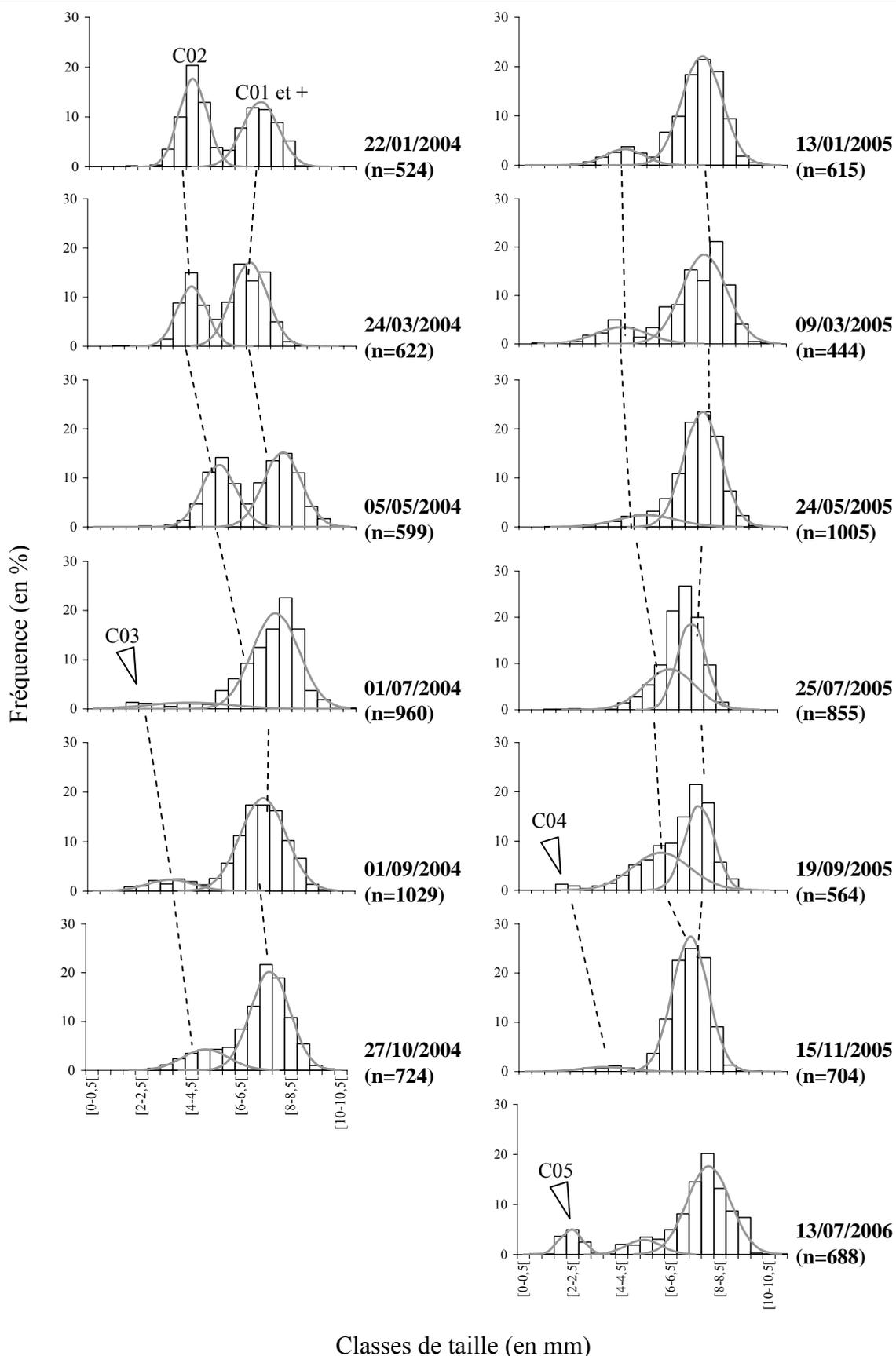


Figure II.30. Suivi démographique de la population intertidale d'*A. brachiata* de la plage de l'Aber. Pour chaque échantillon réalisé entre mai 2004 et septembre 2005, un histogramme de fréquences de diamètre du disque (exprimées en %) est présenté avec, en superposition, les composantes modales correspondant aux diverses cohortes (courbes grises). L'effectif est indiqué sous la date de prélèvement. Le pas entre deux classes de taille est de 0,5 mm. Les triangles blancs indiquent l'arrivée dans les populations de jeunes individus.

Pour la plage de Saint-Efflam (Figures II.30), la plupart des échantillons comportent deux modes, avec des valeurs modales aux environs de 4 et 8 mm respectivement. Au début du suivi, ces deux modes sont de même importance jusqu'en juillet 2004, date à laquelle ils fusionnent. Des nouveaux modes de petits individus apparaissent en juillet 2004 (C03), en septembre 2005 (C04) et en juillet 2006 (C05). La valeur moyenne de ces modes est de 2 mm la première fois qu'ils sont observés. Ces individus de petite taille vont ensuite grandir jusqu'à fusionner avec le premier pic d'adultes. La croissance de la cohorte C03 est d'environ $0,5 \text{ mm.mois}^{-1}$ en moyenne, sur les quatre mois nécessaires pour que la valeur modale atteigne celle du premier pic d'adultes.



Classes de taille (en mm)

Figure II. 31. Suivi démographique de la population intertidale d'*A. brachiata* de la plage de Saint Efflam. Pour chaque échantillon réalisé entre janvier 2004 et juillet 2006, un histogramme de fréquences de diamètre du disque est présenté avec, en superposition, les composantes modales correspondant aux diverses cohortes (courbes grises). Les triangles blancs indiquent l'apparition dans les échantillons d'individus de très petites tailles, correspondant au recrutement de l'année précédente. L'effectif est indiqué sous la date de prélèvement. Le pas entre deux classes de taille est de 0,5 mm.

2.3. Structure spatiale de la population de Saint Efflam

Les variations de densité au sein des trois stations de la radiale sont présentées sur la Figure II.32 ; elles suivent logiquement les tendances des variations saisonnières de la densité moyenne. Néanmoins, les changements de densité ne suivent pas totalement le même patron entre les trois zones. Ainsi la phase de doublement de la densité moyenne en juillet 2004 correspond à une forte augmentation de la densité en B; en mai 2005, cette augmentation se fait conjointement en B et en C. Les augmentations de densité sont plus lentes et moins importantes en A.

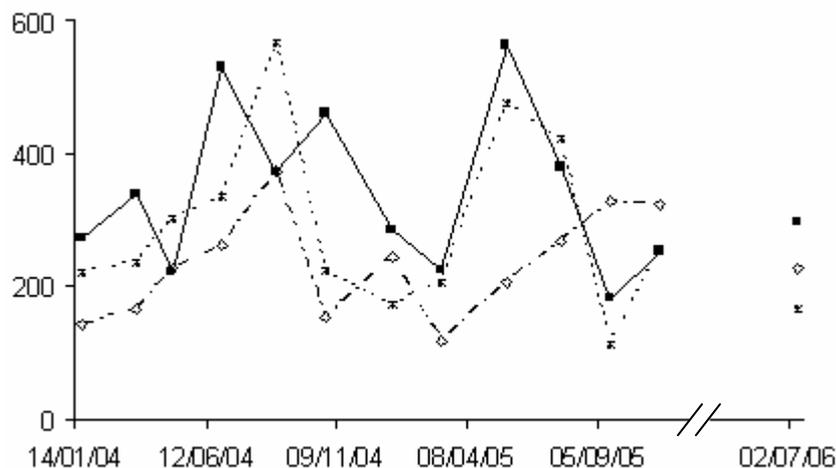


Figure II.32. Evolution temporelle de la densité (en ind.m⁻²) au sein des trois stations de la population d'*A. brachiata* de la plage de Saint Efflam: la station A en haut de l'éstran, C en bas de l'éstran et B entre les deux (A, B et C, respectivement représentés par des losanges blancs, des carrés noirs et des astérisques).

Ces variations spatiales de densité ont été décomposées entre les individus de petite et de grande taille (Figure II.33). Des tests du χ^2 ont été effectués afin de savoir si les abondances relatives de chaque groupe de taille sont similaires au sein de chaque station. A l'exception des échantillons de juillet et de novembre 2005, tous les prélèvements présentent une différence significative dans la répartition spatiale des deux groupes de taille (21,4 (en juillet 2004) $< \chi^2 < 149$ (en mars 2004); $p < 0,01$). Le groupe de jeunes individus est rarement réparti de façon homogène entre les stations mais de façon chaotique entre les stations au cours du temps. Les adultes ne sont pas répartis de façon homogène entre les stations mais ils sont nettement mieux représentés au sein de la station B. La Figure II.33 montre les augmentations de densité qui s'opèrent au printemps-été. Celles-ci sont dues à une augmentation des individus de grande taille à la station B. En juillet 2004, par exemple, la densité augmente de 25% en A et en C et de plus de 150% en B.

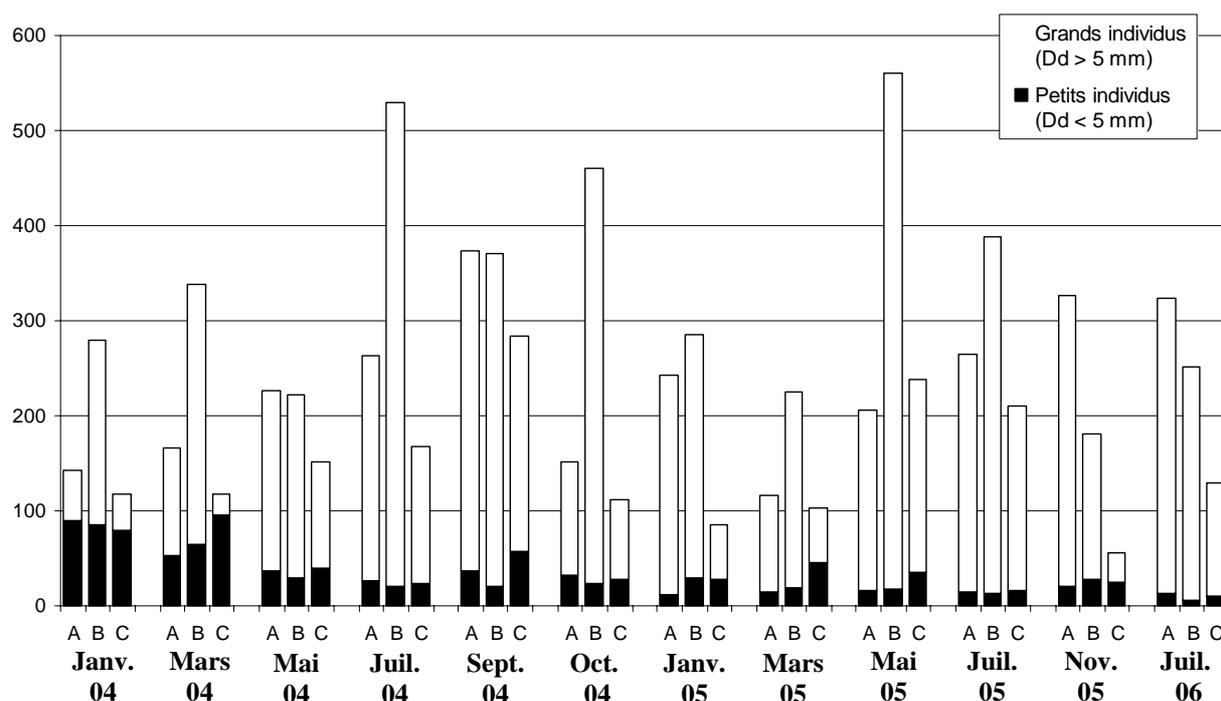


Figure II.33. Répartition spatiale des deux groupes de tailles à chaque date de prélèvement : en noir, le groupe des individus de petite taille et en blanc le groupe des individus de grande taille.

3. Discussion

Le fonctionnement démographique d'*A. brachiata* présente des différences entre les deux sites étudiés, bien qu'il s'agisse de deux populations intertidales de la pointe de Bretagne. Le fonctionnement présente quelques différences vis-à-vis des études préalables effectuées par Bourgoïn (1987) à la plage de l'Aber et par Harlay *et al.* (en prep.) en milieu subtidal.

Tout d'abord, il paraît important de souligner que les pics d'individus de petite taille observés dans notre suivi ne correspondent pas à des événements de recrutement, au sens où un recrutement correspond à une arrivée de nouveaux individus dans la population. Les pics de jeunes individus observés correspondent à une arrivée dans les échantillons mais pas dans la population. En fait, l'utilisation d'un tamis de maille de 2 mm ne semble pas suffisante pour retenir des individus de diamètre de disque < 2 mm. En effet, les études préalables (Bourgoïn, 1987; Harlay *et al.*, en prep.) utilisaient un tamis de 1 mm et observaient des individus de plus petite taille. De même, l'échantillonnage préliminaire avait été réalisé avec un tamis de maille de 1 mm ; ce tamis avait été abandonné car il ne permettait pas d'échantillonner suffisamment rapidement mais de plus petits individus avaient été observés en nombre. De plus, les données de croissance disponibles pour cette espèce (Bourgoïn, 1987;

Harlay *et al.*, en prep.) montrent que les individus de 2 mm correspondent en fait aux juvéniles qui ont recruté l'été précédent, arrivés dans la population à une taille d'environ 200 μm et dont la croissance se fait de façon prononcée sur trois ou quatre mois d'été et devient quasi-nulle en hiver ; les individus d'environ 4,5 mm correspondent ainsi aux adultes de deux ans et ceux de 8 mm environ à des adultes de trois ans et plus. Les taux de croissance qui ont pu être calculés à partir du suivi d'une cohorte sur les plages de l'Aber et de Saint-Efflam semblent ainsi en accord avec les études préalables. Ainsi, le suivi démographique entrepris dans ces deux populations ne permet pas d'observer les phénomènes de recrutement l'année où ils ont lieu mais est néanmoins suffisant pour observer la structure temporelle des populations.

La population de la plage de l'Aber se caractérise par une structure très originale avec une absence d'individus de grande taille (8 mm) alors que ceux-ci étaient présents dans le suivi fait 20 ans auparavant (Bourgoin, 1987) et également présents dans les populations voisines de Morgat et Cameros lors de l'échantillonnage effectué en 2005. L'unique mode bien représenté est donc constitué d'individus âgés de deux ans. Il peut également s'agir d'individus plus âgés dont la croissance serait limitée par des caractéristiques limitantes apparues dans le milieu. Avec une taille inférieure à 6 mm, les individus de la population de la Plage de l'Aber ne sont vraisemblablement pas matures (Gentil & Zakardjian, 1990) et donc incapables d'assurer le renouveau de la population en 2005. Deux hypothèses peuvent alors être émises : la population subsiste grâce à des apports allochtones (population puits) ou bien la population subsiste avec une importante variabilité inter-annuelle de densité et de recrutement. Les résultats concernant la structure génétique des populations intertidales de la Baie de Douarnenez laissent supposer que des mouvements migratoires, plus ou moins passifs, pourraient exister entre les populations. La pérennité des populations s'expliquerait alors du fait de ces apports allochtones. En outre, cette population présentait un fonctionnement démographique autonome en 1984-85 ; l'hypothèse d'un épisode de non-recrutement semble donc aussi possible. En effet, si un groupe d'adultes matures étaient présents en 2003, il peut suffire à justifier la présence de jeunes individus à l'heure actuelle : cela témoignerait d'une très forte variabilité inter-annuelle du recrutement. D'aussi fortes variations dans le recrutement pourraient permettre d'expliquer pourquoi aucun jeune individu n'a été échantillonné lors des missions Ophirois en 2005 (les hypothèses de biais d'échantillonnage pouvant être écartées car les techniques de prélèvement sont les mêmes en

Baie de Douarnenez et en Baie de Seine où les juvéniles sont correctement représentés dans les échantillons).

La population de la plage de Saint-Efflam présente une composition en classes de taille plus classique, avec un mode d'individus de grande taille, un mode d'individus de taille intermédiaire et une arrivée estivale de juvéniles de 2 mm dans la population adulte qui correspond au recrutement de l'année précédente. Ce recrutement présente cependant des variabilités inter-annuelles assez fortes : la cohorte C02 correspond à 50% de l'échantillon tandis que les cohortes C04 et C05 correspondent à moins de 20% de l'échantillon. Malgré un minimum assuré chaque année, le renouvellement de la population se ferait donc de façon assez chaotique du fait d'une importante variabilité de l'intensité du recrutement et/ou de la mortalité post-recrutement. Le renouvellement complet de la population nécessiterait ainsi plus de quatre ans. Ce cycle est semblable à celui observé par le passé, en milieu intertidal (Bourgoin, 1987) et en milieu subtidal (Harlay *et al.*, en prep.).

Les fortes variations spatiales et inter-annuelles observées dans la structure démographique des populations d'*A. brachiata* se retrouvent chez d'autres échinodermes (Balch & Scheibling, 2000; Tomas *et al.*, 2004) et d'autres espèces de peuplements de sables fins envasés (Guillou, 1980; Ellien *et al.*, 2000), sans pour autant remettre en cause la stabilité des populations. Ces variations semblent pouvoir s'expliquer du fait de la variabilité des événements de recrutement dont l'importance peut être influencée par de nombreux facteurs environnementaux (par exemple des événements météorologiques de type catastrophique comme des tempêtes hivernales) mais aussi modulée par l'espèce du fait de régulation densité-dépendante afin de limiter les compétitions entre classes d'âge (Pechenik, 1999).

Si le fonctionnement démographique de la population de la plage de Saint-Efflam suit une tendance similaire à celles étudiées précédemment (Bourgoin, 1987; Harlay *et al.*, en prep.), les variations annuelles de densité qui s'opèrent en 2004 et 2005 n'ont pas la même origine. En effet, dans le cas des études préalables, les augmentations de densité s'expliquent clairement par l'arrivée de recrues alors que dans le cas présent, elles sont le fait d'arrivées d'adultes. Bien que le doublement de densité ait lieu au niveau de la station B deux années consécutives suite à une arrivée rapide d'individus adultes, les fluctuations de densité ne peuvent s'expliquer de façon logique par des phénomènes de compensation entre stations de la radiale ; elles sont donc le fait de migrations plus ou moins passives (voir la discussion du Chapitre II.2.1) depuis l'extérieur de la zone d'étude. Dans la mesure où la population

intertidale de Saint-Efflam, uniquement constituée d'individus de la lignée I, s'arrête à la station C (lignée S plus bas sur l'estran), ces adultes ne peuvent provenir de l'infralittoral. Les ophiures proviennent donc des côtés de la radiale ou du haut de l'estran. En effet, même si les densités sont plus faibles sur le haut de l'estran (de 30 à 90 ind.m⁻²), la zone de répartition est suffisamment grande pour imaginer qu'une migration, même partielle, de ces individus vers le bas de l'estran suffit à doubler les densités au niveau de la radiale.

En outre, ces doublements de densité totale s'effectuent pendant ou juste après la période de reproduction. Deux scénarii peuvent alors être imaginés : une migration avant la période de reproduction pour concentrer les adultes et optimiser l'effort de reproduction (de la périphérie vers le centre de la zone favorable) ou alors une migration post-reproduction des adultes vers le bas de l'estran pour fuir les importantes variations thermiques estivales du haut de l'estran. Le retour des densités à un niveau moyen peut ensuite s'expliquer par de fortes mortalités estivales et/ou par des migrations en sens inverse. Cette seconde hypothèse semble plus probable dans la mesure où elle permettrait d'assurer la pérennité du phénomène. L'hypothèse d'un regroupement des adultes afin d'augmenter l'effort de reproduction ou pour échapper à des conditions environnementales, et ce de façon réversible, nécessite que ces migrations soient un phénomène actif, plutôt que passif par remise en suspension du sédiment.

Synthèse

L'étude à grande échelle spatiale de la structure génétique des populations a été réalisée afin de répondre à deux objectifs majeurs : tester l'hypothèse de lignées cryptiques chez l'espèce *A. brachiata* sur l'ensemble de la zone d'étude et décrire le degré d'organisation spatiale entre les populations de cette espèce. L'homogénéité génétique de l'espèce est d'emblée contestée par la découverte de lignées cryptiques au sein de l'espèce *A. brachiata*, avec une forte relation entre lignées et écotypes. En effet, l'une des deux lignées se retrouve principalement dans le domaine subtidal tandis que l'autre lignée occupe l'habitat intertidal. Néanmoins, les mécanismes qui ont pu permettre l'apparition de ces lignées ne semblent pas, sur la base des données mitochondriales, être de type écologique, mais vraisemblablement de type allopatrique, du fait des profonds bouleversements tectoniques et environnementaux à la transition Mio-Pliocène. L'existence de lignées présentant un niveau de divergence similaire à a été observé chez des polychètes des peuplements de sables fins (Rigal, 2005; Jolly *et al.*, 2006) et permet de supporter l'idée d'une probable histoire vicariante commune entre ces espèces. Cependant, chacune des lignées semble différée dans son histoire de colonisation. En effet, la lignée intertidale semble avoir survécu au dernier maximum glaciaire dans une zone au nord, proche de la Manche, tandis que la signature génétique de la lignée subtidale suggère un refuge glaciaire au sud. La forte structure génétique observée entre les populations est partiellement due à la durée réduite de la phase larvaire et à la fragmentation de l'habitat. Néanmoins les profonds décalages qui existent entre les deux types de marqueurs génétiques en terme de différenciation génétique invitent à la prudence quant à la dissociation des flux géniques historique et contemporain. Statuer sur le degré de connectivité qui existe entre les populations s'avère donc délicat, d'autant plus que la signature génétique intègre vraisemblablement la trace d'événements d'hybridation inter-lignée. En effet, des hybrides ont été découverts, témoignant d'un isolement incomplet entre lignées, malgré la mise en évidence de mécanismes d'isolement écologique et temporel en Baie de Douarnenez. Les mécanismes d'isolement reproducteur pré-zygotiques de même que les phénomènes de mortalité différentielle des larves et des hybrides n'ont malheureusement pas pu être abordés en raison de la difficulté à récolter ces individus nouvellement recrutés. Le rôle des phénomènes de mortalité et de migration dans la structure génétique observée n'a ainsi pu être

reliée aux larves. Par contre, des phénomènes de mortalité et de migration ont pu être mis en avant chez les ophiures adultes. En effet, une partie de la différenciation génétique entre populations d'*A. brachiata* de même que certaines caractéristiques du fonctionnement démographique semble devoir s'expliquer par ces deux processus. Ainsi, si les populations d'*A. brachiata* apparaissent démographiquement stables, il semble exister une importante variabilité interannuelle dans l'intensité du recrutement et/ou de la mortalité post-recrutement, avec un événement de recrutement conséquent et efficace seulement tous les deux ou trois ans, ce qui pourrait également expliquer une partie des différenciations génétiques observées entre populations.



L'espèce *O. fragilis* est présente dans les zones intertidales et subtidales de fort hydrodynamisme, jusqu'à une profondeur de 85 m, sur des fonds caillouteux, graveleux et hétérogènes envasés (Nataf, 1954; Cabioch, 1967; Allain, 1974). L'espèce est répertoriée en Atlantique, du Cap de Bonne Espérance au nord de la Norvège (Moyses & Tyler, 1995). Elle est signalée sur toutes les côtes françaises, en Méditerranée (Guille, 1964), le long de la façade atlantique (Glémarec, 1969), en Manche occidentale (Cabioch, 1968; Retière, 1979) et orientale (Gentil, 1976; Davoult, 1988). L'espèce présente une grande diversité de formes et de couleurs ; quatre variétés dont la distinction entre les formes repose sur des caractères morphologiques mais également écologiques sont couramment reconnues, celles décrites par Koehler (1921). En milieu subtidal, l'espèce présente un comportement grégaire (Brun, 1969; Broom, 1975) et forme des bancs denses constitués de plusieurs centaines ou milliers d'individus par m² (Gentil, 1976; Davoult, 1988). Le réseau dense ainsi formé présente plusieurs avantages pour l'espèce, notamment du point de vue de la résistance au courant, de la captation des particules présentes dans la colonne d'eau (et donc un avantage net pour une alimentation suspensivore) et de la maximisation de la fécondation, en augmentant les chances de rencontre des gamètes (Warner, 1971).

O. fragilis présente un cycle de vie benthopélagique avec un ophiopluteus de durée de vie estimée entre 21 et 26 jours (McBride, 1907; Morgan & Jangoux, 2002). Le premier stade larvaire apparaît 12 heures après la fécondation. La larve se développe pendant 16 jours, puis elle commence sa métamorphose, au cours de laquelle il y a régression de trois des quatre paires de bras larvaires. La paire postéro-latérale subsiste et aboutit à la formation du rudiment. La métamorphose se termine au 26^{ème} jour de vie planctonique. Suite à celle-ci, la post-larve s'avère capable de mouvements natatoires et pourrait alors explorer le fond jusqu'à trouver le substrat idéal (McBride, 1907). A l'inverse, dans la colonne d'eau, les larves sont réparties de façon homogène et ne présentent vraisemblablement pas de comportement migratoire particulier (Lefebvre & Davoult, 1998). Des phénomènes d'attraction permettent aux juvéniles de recruter préférentiellement sur les bancs d'adultes (Morgan & Jangoux, 2005) et assurer ainsi la pérennité de ces agrégats. A l'inverse, en Méditerranée, les juvéniles préfèrent s'établir sur des éponges plutôt que sur leurs conspécifiques adultes (Turon *et al.*, 2000).

Le fonctionnement démographique d'*O. fragilis* semble présenter des disparités importantes entre les différentes populations. Ainsi la population de Wimereux, à l'extrémité orientale de la Manche, présente quatre événements de recrutement par an, dont le principal en septembre correspond à 40% de l'effectif de la population (Davoult *et al.*, 1990). A l'inverse, une population du littoral belge présente un niveau de renouvellement des populations nettement plus faible (Morgan, 2004). Contre toute attente dans une aire mégatidale comme la Manche et pour une espèce à durée de vie larvaire longue, les résultats de modélisation de dispersion larvaire établis sur les populations d'*O. fragilis* de Manche (Figure III.1) montrent que la majorité des populations fonctionnent grâce à l'autorecrutement (Lefebvre *et al.*, 2003), avec des niveaux de rétention larvaire néanmoins différents d'un site à l'autre. De plus, certaines populations, comme celle de Plymouth, apparaissent isolées tandis que le reste des populations de Manche semble interagir sous la forme d'une importante métapopulation (Ellien, 2001), la connexion entre populations étant rendue possible grâce à une longue phase larvaire.

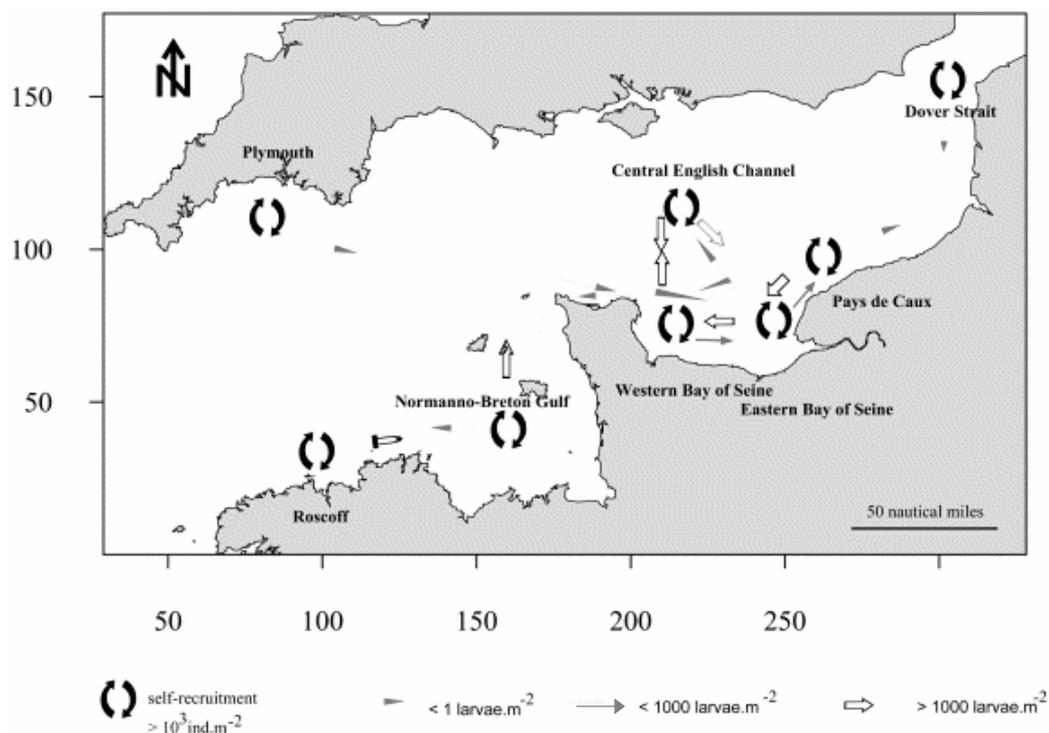


Figure III.1. Principaux flux larvaires entre les diverses populations d'*O. fragilis* à l'échelle de la Manche (simulations faites avec des larves de 26 jours) obtenus grâce à la modélisation de la dispersion larvaire (Ellien, 2001; Lefebvre *et al.*, 2003).

Dans ce chapitre consacré à *O. fragilis*, nous tâcherons donc de voir si les phénomènes de rétention larvaire sont aussi dominants que le prédit le modèle de dispersion larvaire, et donc si malgré une longue phase dispersive, une structure géographique est identifiable au sein de l'espèce.

Avant tout, nous essayerons de mieux cerner le problème de l'important polymorphisme variétal au sein de l'espèce. La grande diversité de formes et de couleurs au sein de l'espèce *O. fragilis* correspond-elle à des variétés avérées ou celles-ci ne sont-elles qu'une légende naturaliste ?

Au vu de la longue durée de la phase larvaire, la connectivité des populations d'*O. fragilis* est-elle effective ou théorique ? Quelle influence a l'important pouvoir de dispersion de l'espèce, en terme de flux entre les populations ?

Le modèle prédit un autorecrutement suffisant pour assurer le renouvellement des populations mais les précédentes études démographiques indiquent une importante variabilité entre sites. Existe-t-il une variabilité temporelle et spatiale de la structure démographique au sein des populations d'*O. fragilis* ou le fonctionnement global est-il similaire entre populations ? Dans quelle mesure se fait le renouvellement ? Les événements de recrutement, conséquents en nombre et en fréquence à Wimereux, peuvent-ils avoir une influence sur la structure génétique globale de l'espèce ?

Chapitre III.1. Les variétés au sein de l'espèce *O. fragilis* : légende naturaliste ou fait avéré ?

“*Ophiothrix* is the Salmo of the Echinoderms : well defined and peculiar as a genus, it has a crowd of species, many of which are the despair of the specific zoologist!” (Lyman, 1876) ; cet avertissement de Lyman se vérifie depuis un siècle et demi. En effet, l'extrême variabilité des individus à l'intérieur d'une même espèce ou d'espèces proches du genre *Ophiothrix* se retrouve au niveau de nombreuses populations à l'échelle du globe (Guille, 1964; Baric & Sturmbauer, 1999; Hart & Podolsky, 2004; Hendler, 2005). Dans le cas d'*Ophiothrix fragilis*, quatre variétés sont couramment reconnues, celles décrites par Koehler (1921) dont la distinction entre les formes repose sur des caractères morphologiques et écologiques (Tableau III.1). Même dans la description qu'il fait initialement, Koehler (1921) reconnaît l'existence de nombreux intermédiaires entre les variétés et la plupart des critères d'identification se juxtapose entre variétés.

Tableau III.1. Critères d'identification des quatre variétés d'*O. fragilis* publiés par Koehler (1921).

	Var. <i>abildgaardi</i>	Var. <i>echinata</i>	Var. <i>lusitanica</i>	Var. <i>pentaphyllum</i>
Habitat principal	Littoral	Littoral	Littoral	Sublittoral
Présence	Dispersée	Dispersée	Dispersée	Bancs denses
Couleur	-	Peu vive, verdâtre à brunâtre, bras annelés	Uniformément rosée, gris ou verdâtre	Vive, à dominante rose, bras annelés
Bras	Larges et courts, carène peu marquée	Assez courts et peu robustes	Courts	Forts et allongés
Boucliers dorsaux	Petits et enfoncés	Grands	Petits et apparents	Très apparents
Espaces interradiaux	Piquants et batonnets	Piquants et batonnets	Batonnets	Piquants et batonnets
Piquants	Opaques, faiblement denticulés	De la couleur du disque, denticulés	Courts, opaques, denticulés	Aplatis, fortement denticulés

Face à la forte diversité de formes et aux nombreux intermédiaires de couleur, diverses études basées sur la physiologie et l'écologie de cette espèce ont, depuis, soulevé à nouveau la question de la véracité de ces variétés (Nataf, 1954; Allain, 1974), sans néanmoins revenir sur la question du manque de précision de l'identification morphologique. C'est pourquoi, dans cette partie de l'étude, la plasticité morphologique d'*O. fragilis* a été étudiée selon la description initiale de Koehler (1921) à partir de critères biométriques précis et de données génétiques.

1. Démarche

La variance morphologique et génétique intraspécifique est analysée sur dix populations européennes (cf. Figure III.2 pour la localisation des sites et Tableau III.2 pour les coordonnées et les effectifs). Afin de maximiser les chances d’avoir des variétés différentes, ces populations ont été échantillonnées dans des habitats différents, dans le domaine intertidal et subtidal, dans des populations denses ou clairsemées. Malheureusement, seules les deux variétés les plus courantes (*pentaphyllum* et *echinata*) ont pu être échantillonnées.

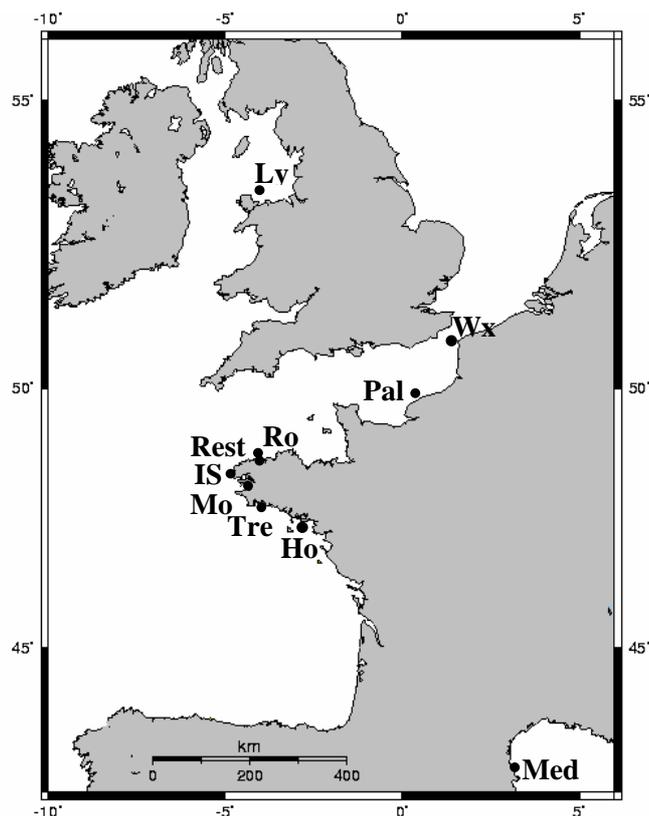


Figure III.2. Position des dix populations d’*O. fragilis* qui ont servi à l’analyse de la variance morphométrique et génétique

Tableau III.2. Coordonnées géographiques des dix populations d’*O. fragilis*. Les différents types d’habitat sont les bancs denses d’ophiures sur cailloutis (BDO), les ophiures échantillonnées dans les bancs de maërl (OBM), les individus clairsemés en intertidal (RI) ou en subtidal (RS). Les effectifs ayant servi aux analyses morphométriques et génétiques (mitochondriales et allozymiques) sont indiqués respectivement dans les trois dernières colonnes.

Population	Label	Prof.	Latitude	Longitude	Type d’habitat	Variété	Morpho.	Ncoi	Nallo.
Houat	Ho	13 m	47°24,54’N	2°58,31’W	BDO	<i>pentaphyllum</i>	20	14	48
Trevignon	Tre	15 m	47°52,15’N	3°58,05’W	OBM	<i>echinata</i>	20	11	34
Morgat	Mo	0 m	48°13,54’N	4°29,50’W	RI	<i>echinata</i>	12	0	12
Ile Segal	IS	0 m	48°26,29’N	4°46,94’W	RI	<i>echinata</i>	64	17	48
Roscoff	Ro	71 m	48°47,42’N	3°58,79’W	BDO	<i>pentaphyllum</i>	80	33	50
Restran	Rest	0 m	48°43,70’N	3°58,02’W	RI	<i>echinata</i>	20	13	23
Paluel	Pal	30 m	49°53,10’N	0°35,10’E	BDO	<i>pentaphyllum</i>	75	21	38
Wimereux	Wx	31 m	50°55,00’N	1°35,00’E	BDO	<i>pentaphyllum</i>	100	28	60
Lyna’s point	Ly	31 m	53°25,46’N	4°13,13’W	BDO	<i>pentaphyllum</i>	50	16	48
Méditerranée	Med	20 m	42°29,23’N	3°09,15’E	RS	<i>echinata</i>	33	0	0

Ces deux variétés sont effectivement les plus courantes sur nos côtes avec la variété *pentaphyllum* qui constitue les bancs denses subtidaux et la variété *echinata* qui constitue les populations clairsemées en milieu subtidal et la totalité des populations en milieu intertidal (Allain, 1974). Une très grande diversité chromatique caractérise chacune des variétés, avec des individus plus colorés pour la variété *pentaphyllum* et des individus plus sombres pour la variété *echinata* (Figure III.3).



Figure III.3. Exemples de la diversité chromatique intraspécifique chez *O. fragilis* : des individus avec des corps aux couleurs vives et aux piquants blancs pour la var. *pentaphyllum* (ligne du haut) et des individus aux corps et aux piquants sombres pour la var. *echinata* (ligne du bas).

L'appartenance d'une population à une des deux variétés est définie sur la base de leur répartition écologique, de leur couleur, des études préalables effectuées en Manche (Nataf, 1954; Cabioch, 1968; Allain, 1974; Davout, 1988) et avec les conseils de Louis Cabioch. Compte tenu des problèmes d'identification individuelle, cette appartenance est définie pour la population dans son ensemble.

Les six mesures morphométriques effectuées par individu (Chapitre I.3.2) sont comparées entre populations et entre variétés par des analyses statistiques simples et multivariées. D'autres individus provenant de ces mêmes populations ont été génotypés (allozymes et séquences mitochondriales ; Chapitre I.2.) pour tester l'hypothèse d'une base génétique à la mise en place de ces types variétaux, et donc de discuter la véracité de l'existence des variétés.

2. Résultats

2.1. Données morphométriques

D'importants écarts existent dans les mesures morphologiques entre les individus des diverses populations (Tableau III.3). Le diamètre moyen de la population varie de 4,5 mm pour la population de Morgat à 11,5 mm dans la population de Lyna's point. D'une manière générale, la variété *pentaphyllum* semble se caractériser par de plus gros individus que la variété *echinata*. L'ensemble des paramètres évolue dans le même sens mais pas forcément dans les mêmes proportions. Ainsi la population de l'Ile Segal et celle de Roscoff présentent une valeur moyenne de diamètre de disque équivalente ; pourtant, les valeurs moyennes de longueur et largeur de bras sont moindres à l'Ile Segal. Cette tendance semble se vérifier à l'échelle des variétés.

Tableau III.3. Moyenne (\pm écart-type) des différentes variables morphométriques mesurées sur les dix populations d'*O. fragilis* (en mm)

	N	Var.	Diamètre	Lg Bras	largeur Bras	Piqt Br	LPD	BPD
Houat	20	P	8,3 \pm 1,1	38,3 \pm 5,1	2,3 \pm 0,3	2,0 \pm 0,2	3,0 \pm 0,5	1,5 \pm 0,3
Roscoff	80	P	6,8 \pm 2,6	50,0 \pm 20,0	1,9 \pm 0,8	2,3 \pm 0,9	2,3 \pm 1,0	1,2 \pm 0,5
Paluel	75	P	9,4 \pm 1,4	54,0 \pm 10,1	2,7 \pm 0,4	2,4 \pm 0,4	3,2 \pm 0,5	1,7 \pm 0,3
Wimereux	100	P	7,5 \pm 1,6	48,5 \pm 11,4	2,1 \pm 0,5	2,0 \pm 0,3	2,5 \pm 0,5	1,3 \pm 0,3
Lyna's point	50	P	11,5 \pm 2,9	65,1 \pm 17,7	2,7 \pm 0,6	3,2 \pm 0,6	3,6 \pm 1,0	2,0 \pm 0,6
Méditerranée	33	E	7,6 \pm 1,0	48,7 \pm 8,4	2,0 \pm 0,3	1,8 \pm 0,3	2,2 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2
Trévignon	20	E	8,3 \pm 1,1	38,3 \pm 5,1	2,3 \pm 0,3	2,0 \pm 0,2	3,0 \pm 0,5	1,5 \pm 0,3
Morgat	12	E	4,5 \pm 0,9	23,8 \pm 6,9	1,1 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	1,4 \pm 0,4	0,7 \pm 0,2
IleSegal	64	E	6,8 \pm 1,9	37,0 \pm 11,3	1,6 \pm 0,5	1,5 \pm 0,5	2,1 \pm 0,7	1,1 \pm 0,3
RoskoEstran	20	E	8,5 \pm 1,9	52,2 \pm 12,6	2,3 \pm 0,6	2,0 \pm 0,4	2,7 \pm 0,7	1,4 \pm 0,4
<i>Var. pentaphyllum</i>	325		8,4 \pm 2,6	52,0 \pm 15,9	2,3 \pm 0,6	2,3 \pm 0,7	2,8 \pm 0,9	1,5 \pm 0,5
<i>Var. echinata</i>	129		6,9 \pm 2,0	39,2 \pm 12,9	1,7 \pm 0,6	1,6 \pm 0,5	2,1 \pm 0,7	1,1 \pm 0,3

Afin de s'affranchir des problèmes de croissance différentielle entre sites, la suite des analyses est conduite sur les données pondérées par le diamètre (= paramètre / Dd) qui sont ensuite centrées réduites pour donner le même poids à chaque rapport.

Une analyse en composantes principales est réalisée sur la base des rapports entre diamètre et les cinq autres variables. Les deux premiers axes de l'ACP réalisée sur ces rapports morphométriques synthétisent 64% de la variance totale. Le cercle de corrélations des différents paramètres de l'ACP est présenté sur la Figure III.4. La variable qui contribue le plus à l'axe 1 est le rapport concernant la largeur des bras. Les deux rapports concernant les plaques dorsales sont étroitement associés dans la partie positive de l'axe 2 et s'opposent aux rapports concernant longueur des bras et longueur moyenne des piquants, qui eux se regroupent dans la partie négative de l'axe 2.

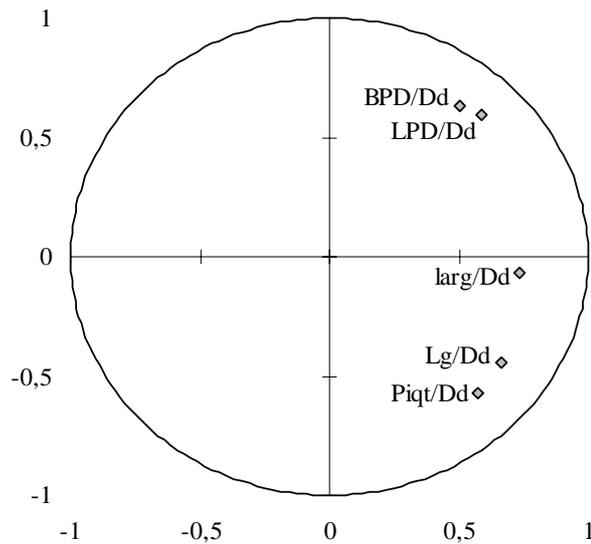


Figure III.4. Analyse en composantes principales : position des différents rapports morphométriques pour l'ensemble des individus d'*O. fragilis* dans le premier plan. Les axes 1 (horizontal) et 2 de projection des variables (vertical) synthétisent respectivement 38% et 26% de la variance

La projection des individus dans ce plan est présentée sur la Figure III.5, en fonction de leur origine géographique (individu par individu et en valeur moyenne) ou de leur variété. Les populations qui contribuent le plus à l'axe 1 sont les populations de Roscoff d'une part et celles de Méditerranée, Morgat et l'Île Segal, d'autre part. A l'inverse, les populations de Trevignon, Paluel ou Wimereux sont très peu différenciées sur l'axe 1. Sur l'axe 2, les populations de Roscoff et de Méditerranée s'opposent à celle de Trevignon de manière peu contrastée. Il existe une telle variabilité intrapopulation que tous les écart-types se chevauchent. L'ensemble des populations de la variété *echinata* se regroupe dans la partie négative de l'axe 1 et trois des quatre populations de la variété *pentaphyllum* se regroupent dans la partie positive. La projection des individus est également présentée en fonction des deux variétés (Figure III.5, en bas). Cette représentation confirme nettement une tendance variétale, avec un décalage des nuages de points le long de l'axe 1 malgré une superposition de ces deux groupes d'individus au centre de la projection.

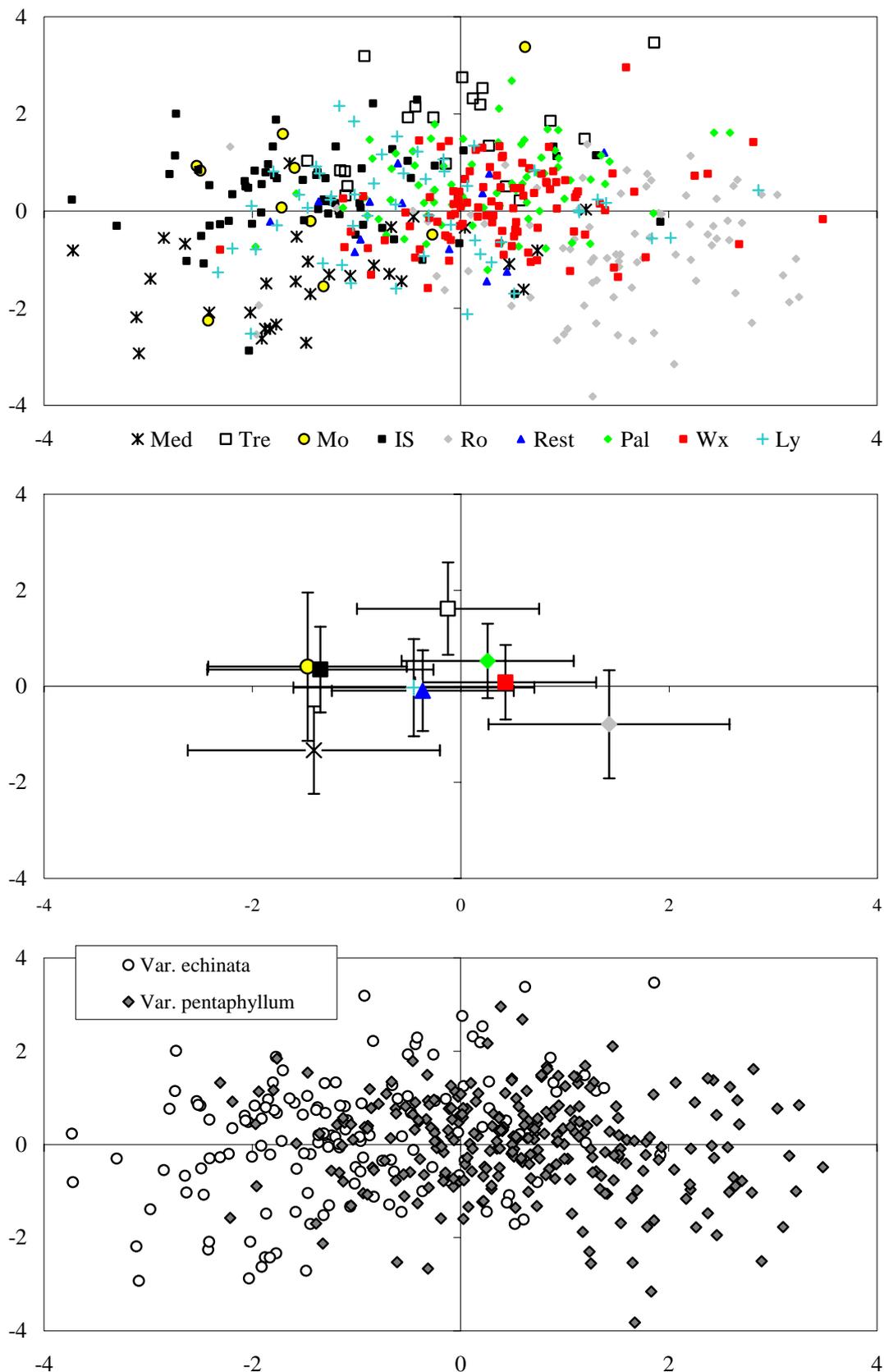


Figure III.5. Analyse en composantes principales réalisée sur les rapports morphométriques : (en haut) projection des individus, dans le premier plan, en fonction de leur population d'origine; (au milieu) valeur moyenne de chaque population avec les écart-types respectifs ; (en bas) projection des individus en fonction de leur variété.

Une analyse canonique de redondance (Figure III.6) est alors réalisée afin de mieux cerner la part de la variation morphologique expliquée par l'existence de ces deux variétés. L'ensemble des variables à expliquer, les rapports morphométriques, est dirigé dans la partie positive de l'analyse. L'existence des variétés permet d'expliquer de manière significative la variance des rapports morphométriques pour l'ensemble des individus ($p < 0,001$). Les rapports concernant la longueur et la base des plaques dorsales (LPD et BPD) sont ceux qui semblent le plus associés à l'effet variété, à l'inverse de l'ACP qui avait plutôt tendance à faire ressortir l'effet de largeur des bras.

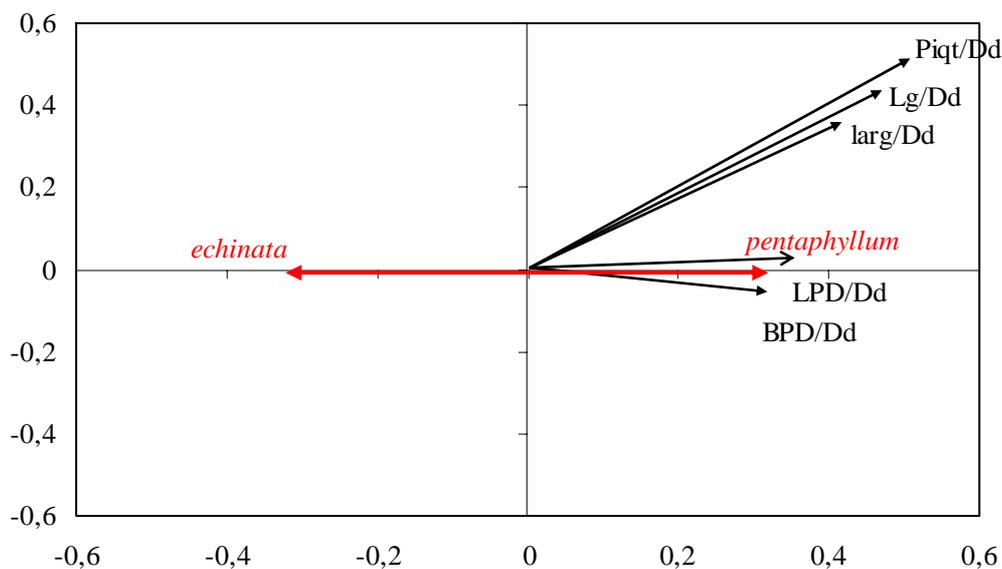


Figure III.6. Analyse canonique de redondance. Les variétés (en rouge) sont les seules variables explicatives qui synthétisent la variance des rapports morphométriques (en noir) de façon significative.

Des comparaisons de moyennes sont alors effectuées afin de tester les différences pour les différents rapports. Les moyennes des rapports morphométriques de la variété *echinata* sont toutes significativement inférieures à celles de la variété *pentaphyllum* (Tableau en bas, à droite, de la Figure III.7) Autrement dit, pour un même diamètre de disque, un individu de la variété *echinata* présente des bras plus petits et plus frêles qu'un individu de la variété *pentaphyllum*, avec des piquants plus courts et des plaques dorsales plus petites. Néanmoins il existe une très forte variabilité au sein des variétés, avec une superposition non négligeable des valeurs, comme l'illustre la Figure III.7.

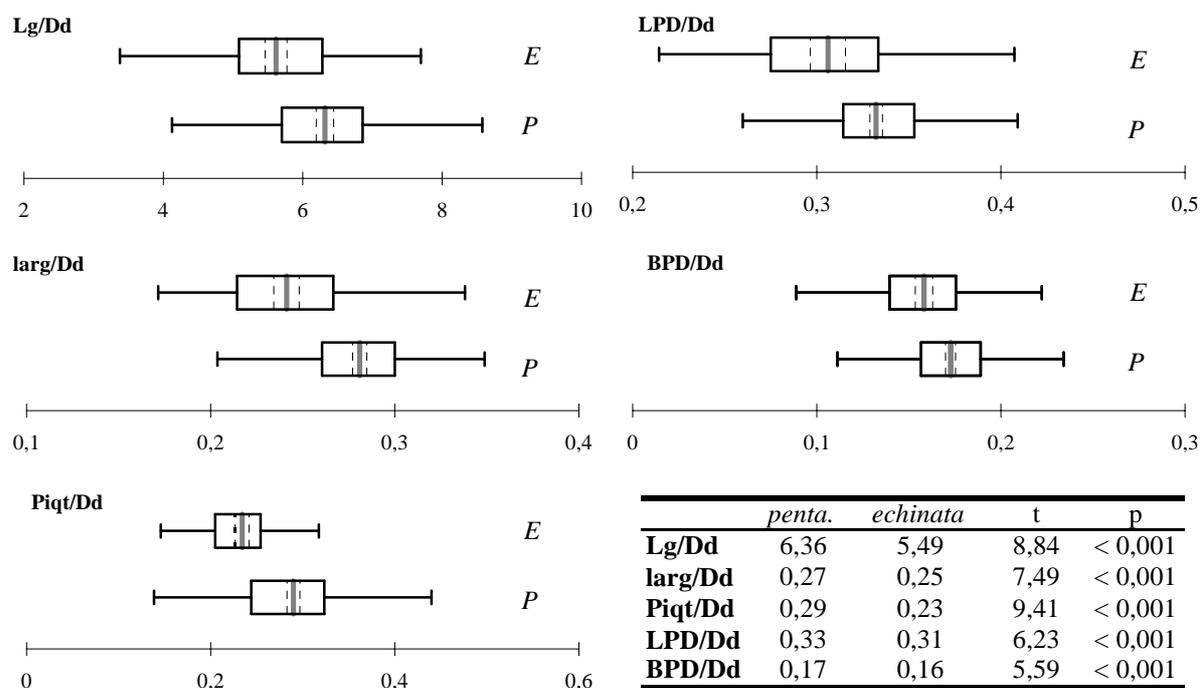


Figure III.7. Représentation schématique des variables descriptives caractéristiques de chacun des cinq rapports morphométriques pour chaque variété (var. *echinata* (E) et un pour la var. *pentaphyllum* (P)) par une boîte à moustache où sont indiqués la moyenne (en trait épais gris) et vers l'extérieur, l'intervalle de confiance de la moyenne ($p < 0,05$; en pointillé), les premiers et troisièmes quartiles (limites de la boîte) et les valeurs minimales et maximales (limites de l'axe).

Le tableau indique les valeurs moyennes de ces cinq rapports pour chacune des variétés, ainsi que la valeur des tests de comparaison de moyenne et la probabilité associée.

2.2. Données génétiques

2.1.1. Données mitochondriales

Une analyse moléculaire de variance (AMOVA) est réalisée afin de tester si l'existence de ces variétés explique la variance génétique observée à l'échelle des dix populations. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.4. La totalité de la variance est associée au niveau intrapopulation. La part de variance génétique due à la subdivision entre variétés est donc quasi-nulle.

Tableau III.4. Analyse hiérarchique de la variance génétique mitochondriale basée sur les distances génétiques ϕ_{st}

	Degré de liberté	Somme des carrés	% de variance totale	Indices de fixation	p-value
Effet des variétés					
Entre variétés	1	2,28	0	-0,003	0,89
Entre populations d'une même variété	6	17,58	0	-0,004	0,75
Au sein des populations	129	406,64	100	-0,007	0,74

Les relations entre les 56 haplotypes des deux variétés sont représentées sur la Figure III.8. Les individus de la variété *echinata* de même que ceux de la variété *pentaphyllum* se répartissent uniformément sur l'ensemble du réseau, traduisant une absence de structure génétique mitochondriale forte entre les deux variétés.

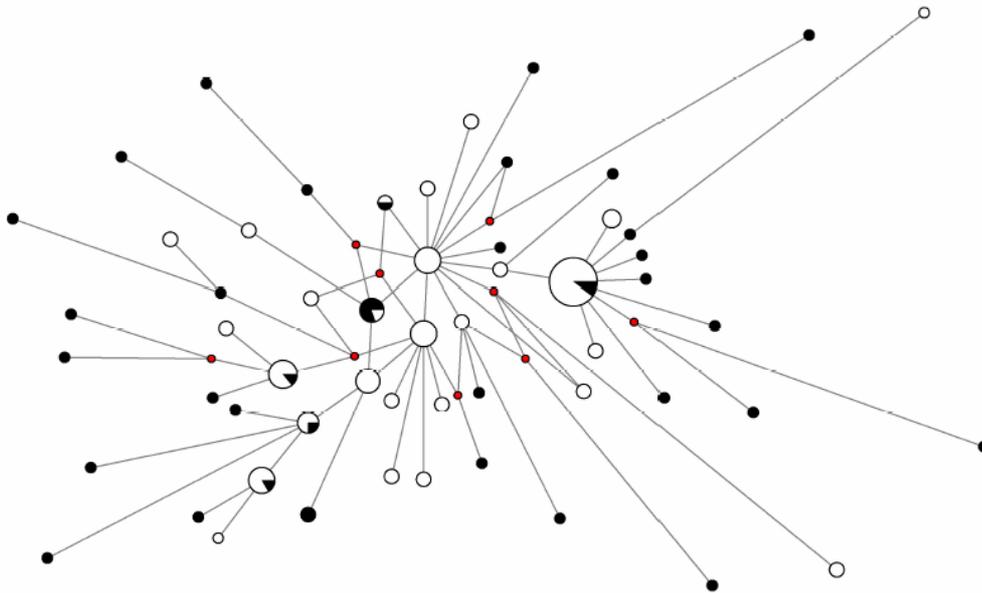


Figure III.8. Réseau d'haplotypes représentant les relations évolutives minimales entre différents haplotypes de l'espèce *O. fragilis*. Le code couleur permet d'évaluer la représentativité par variété de ces haplotypes : en noir, les individus de la var. *echinata* et en blanc, ceux de la var. *pentaphyllum*. Les ronds rouges symbolisent des haplotypes non détectés durant l'étude mais nécessaires à la construction du réseau.

Les individus de Méditerranée ne sont pas représentés sur ce réseau. En effet, les séquences mitochondriales de ces individus présentent une divergence de l'ordre de 18% avec l'ensemble des séquences des autres individus. La divergence génétique qui existe entre les individus de la variété *echinata* (hors individus de Méditerranée) est inférieure à 1% et du même ordre de grandeur que celle trouvée entre individus de la variété *pentaphyllum* mais également entre individus des deux variétés confondues.

2.1.2. Données allozymiques

La variance associée aux fréquences génotypiques des deux variétés est synthétisée par l'AFC et projetée sur les deux premiers axes (AFC présentée sur la Figure III.9, basée sur 338 individus, originaires de huit des dix populations, toutes sauf celles de Méditerranée et de Morgat). Les deux variétés présentent une forte dispersion dans le plan, avec une superposition complète des deux groupes. Les deux axes n'extraient qu'une partie minime de la variance (moins de 10% à tous les deux).

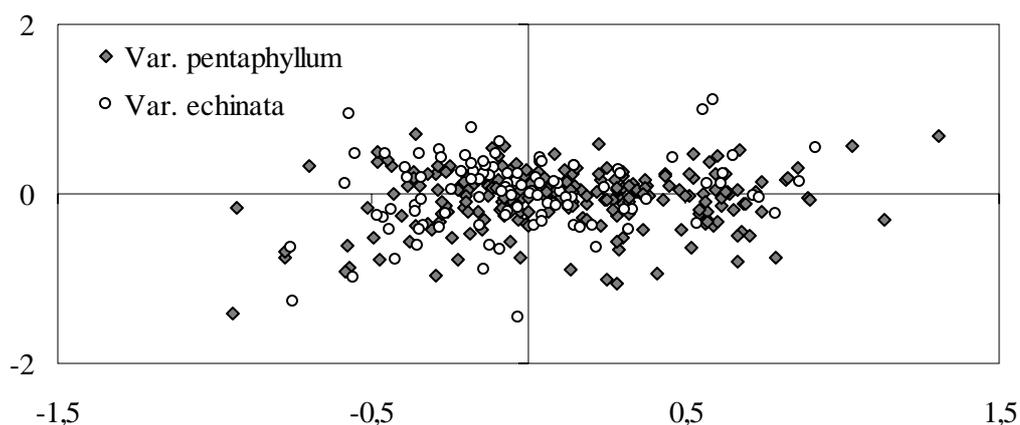


Figure III.9. AFC synthétisant la variance génétique sur la base des données allozymiques en fonction des deux variétés (réalisée avec le logiciel Genetix). Les axes 1 et 2 synthétisent respectivement 4,7 % et 4,6 % de la variance.

Cependant l'AMOVA réalisée sur les données allozymiques tend à montrer que la séparation des individus selon les deux variétés influe sur la répartition de la variance génétique. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.5. Même si 92% de la variance est associée au niveau intrapopulation, la part de variance associée à la différenciation entre variétés est significative ($p = 0,03$).

Tableau III.5. Analyse hiérarchique de la variance génétique allozymique basée sur les distances génétiques θ

	Degré de liberté	Somme des carrés	% de variance totale	Indices de fixation	p-value
Effet des variétés					
Entre variétés	1	31,78	1,68	0,031	0,03
Entre populations d'une même variété	18	199,69	5,84	0,109	< 0,001
Au sein d'une population	1692	2926,89	92,48	1,729	< 0,001

Une analyse canonique de redondance (Figure III.10) est alors réalisée afin de mieux cerner la part de la variation génétique expliquée par l'existence de ces deux variétés. La seule variable explicative qui permet de synthétiser de manière significative la variance allozymique observée est l'existence de ces variétés ($p = 0,045$). Les autres variables explicatives (profondeur, région géographique, type d'habitat, année d'échantillonnage) se révèlent non structurantes, tout du moins pas de façon significative. Cette analyse permet de faire ressortir les relations qui existent entre les variétés et certains allèles. Ainsi la variété *echinata* se trouve associée avec l'allèle *Pk100* et *Mdh88* dans une moindre mesure tandis que la variété *pentaphyllum* est associée avec la *Pk90* et la *Mdh100*.

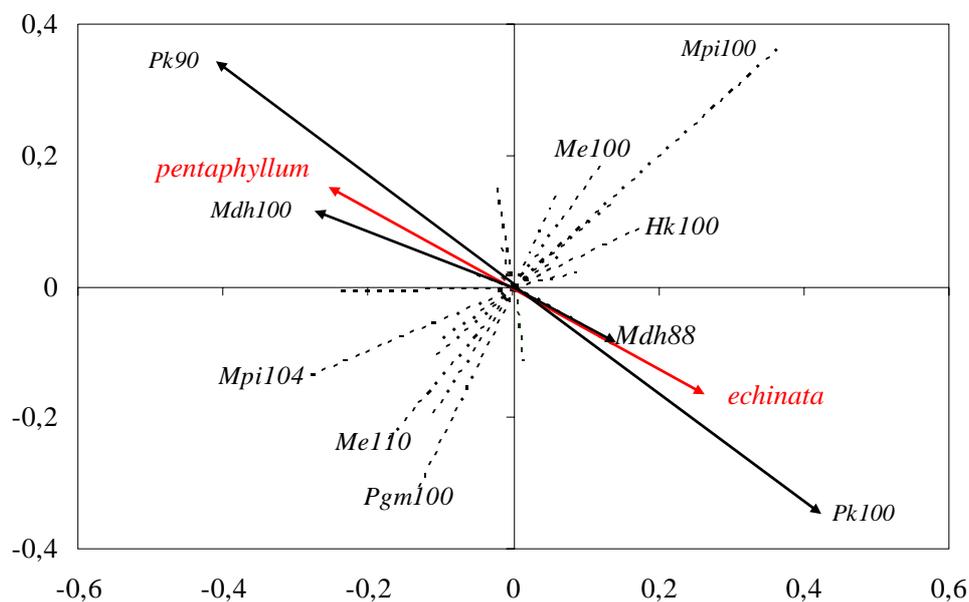


Figure III.10. Analyse canonique de redondance. Les variétés (en rouge) sont les seules variables explicatives qui synthétisent la variance allozymique de façon significative. Les variables à expliquer (en noir) sont les fréquences alléliques (seules les plus importantes sont représentées par des vecteurs, les autres apparaissent sous forme de point).

La Figure III.11 représente les fréquences alléliques de ces deux locus entre variétés. Les différences observées dans ces fréquences s'avèrent significatives ($\theta = 0,122$ pour la *Pk* et $\theta = 0,052$ pour la *Mdh* ; $p < 0,001$). Les autres locus présentent d'ailleurs également des différences plus faibles mais significatives induisant une différence globale significative entre les deux variétés ($\theta = 0,023$; $p < 0,01$). Il est néanmoins difficile de dissocier un effet variétal d'un effet population, la variable 'variété' étant associée à la population et non à l'individu.

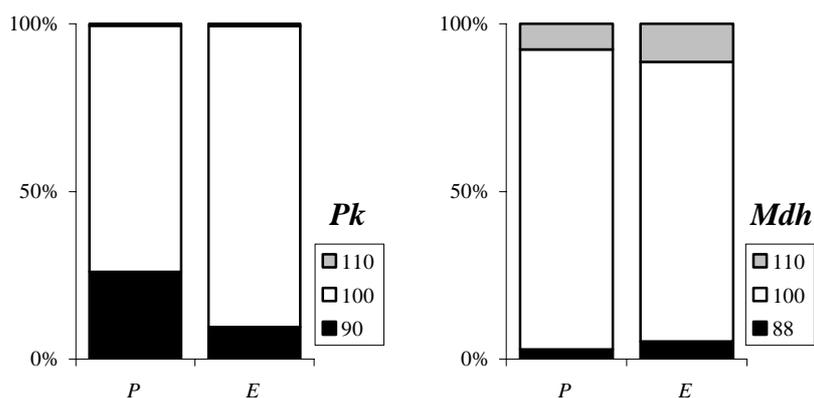


Figure III.11. Fréquences alléliques des deux locus *Pk* et *Mdh* pour les variétés *pentaphyllum* (P) et *echinata* (E).

3. Discussion

La classification des populations en deux variétés permet d'expliquer une part faible mais significative de la variabilité morphologique au sein de l'espèce *O. fragilis*. En outre, bien que peu marquée, il semble exister une base génétique à l'occurrence de ces deux variétés. En effet, celles-ci présentent des profils mitochondriaux identiques mais des différences significatives au niveau des allozymes. Le locus de la *Pk* présente notamment des fréquences alléliques contrastées entre les deux variétés, qui témoignent d'un probable effet variétal sur la structure génétique des populations. Ainsi, il semble donc exister (au moins) deux variétés morphologiques au sein de l'espèce *O. fragilis*. Néanmoins, la variabilité individuelle des rapports morphométriques et des profils génétiques au sein de chaque variété est très importante. Si le postulat de départ est que les deux variétés existent, alors les rapports morphométriques et les données allozymiques montrent des différences entre ces deux variétés. Par contre, ces rapports et ces données allozymiques ne peuvent suffire à la diagnose formelle des variétés et encore moins à l'assignation d'individus nouveaux à l'une ou l'autre de ces variétés. Une telle plasticité phénotypique n'est cependant pas très surprenante en milieu marin. C'est le cas, par exemple, de trois espèces de patelles, bien identifiées génétiquement, qui ne sont différenciables par aucun critère morphologique, les facteurs environnementaux influençant fortement la coloration et la morphologie des coquilles de ces trois espèces (Mauro *et al.*, 2003).

La plasticité variétale de la morphologie pourrait correspondre à une adaptation de l'espèce face à des environnements différents, adaptation qui aurait été sélectionnée au fil du temps. Koehler (1921) considérait déjà que les variations morphologiques observées entre individus d'*O. fragilis* tenaient des localités et des profondeurs auxquelles les individus étaient échantillonnés. En effet, la variété *echinata* se trouve majoritairement en milieu

intertidal ou sous forme de populations clairsemées. Les bras plus courts constitueraient alors un avantage pour se camoufler et limiter la prédation en milieu intertidal. A l'inverse, des bras plus longs seraient avantageux face au mode de nutrition suspensivore et serait donc plus adapté au milieu subtidal. Des longueurs de bras inférieures ont, en outre, déjà été observées pour des ophiures intertidales comparées à leurs conspécifiques subtidaux (Bourgoin & Guillou, 1994). Les couleurs plus sombres de la variété *echinata* constitueraient également un atout pour le camouflage ; à l'inverse, le polychromatisme important de la variété *pentaphyllum* ne présenterait pas particulièrement de caractère adaptatif. La grande variété de couleurs serait simplement maintenue du fait qu'elle n'induit aucun coût pour l'espèce (DeWitt *et al.*, 1998), tant qu'elle est en milieu subtidal. De nombreux invertébrés marins présentent d'ailleurs d'importantes variétés chromatiques sans que ce caractère ne joue sur le statut spécifique des organismes ; c'est par exemple le cas de nombreuses ascidies (Sabbadin, 1982; Lopez-Legentil & Turon, 2004). Si des individus de la variété *echinata* se retrouvaient au milieu des bancs denses subtidaux de *pentaphyllum*, ils auraient, du fait de leurs bras plus courts, un accès plus restreint à la nourriture. Si des ophiures de la variété *pentaphyllum* se retrouvaient en milieu intertidal, elles seraient, du fait de leurs couleurs vives, plus facilement détectables et donc plus sujettes à la prédation. Chaque variété semble ainsi mieux adaptée à un type d'environnement. Les stress environnementaux relatifs à chaque habitat pourraient ainsi induire des mortalités différentielles, certains génotypes étant ainsi éliminés dans un habitat donné. Ce type de sélection est souvent mis en avant pour expliquer les importantes disparités dans les fréquences alléliques observées chez une espèce, sur un ou deux locus seulement; c'est le cas, par exemple, de la Malate Déshydrogénase chez le papillon *Bicyclus aninana* (Van Oosterhout *et al.*, 2004) qui témoigne d'effet sélectif marqué. Les phénomènes de contre-sélection vont, sur le long terme, accentuer les adaptations de chaque variété à un type d'environnement. Néanmoins, compte tenu du fait que les différences génétiques entre variétés sont peu marquées, il s'agit peut-être plus de plasticité adaptative de l'espèce (Pigliucci, 2005), plutôt qu'une sélection différentielle de chaque variété vis-à-vis d'un habitat.

Le comportement individuel de camouflage semble ainsi être compensé, en milieu subtidal, par un comportement d'agrégation (Broom, 1975; Ellis & Rogers, 2000), supposé plus efficace pour faire face à la prédation. Morgan & Jangoux (2004) montrent l'existence de caractéristiques morphologiques et comportementales entre juvéniles et adultes qui favorisent ce comportement grégaire chez les individus de la variété *pentaphyllum*. Il serait intéressant de voir dans quelle mesure ces caractéristiques existent chez les juvéniles de la variété

echinata. Si les juvéniles de la variété *echinata* ne présentent pas ces adaptations, leur chance de recruter efficacement sur un banc d'adultes de *pentaphyllum* est moindre par rapport aux juvéniles *pentaphyllum*, ce qui aurait tendance à renforcer les hypothèses de sélection différentielle plutôt que celles de plasticité adaptative de l'espèce. De plus, d'une manière générale, les ophiures sont des animaux lucifuges (Barraclough Fell, 1966). Le fait que la variété *pentaphyllum* soit rarement présente à des profondeurs inférieures à 20 m pourrait témoigner d'une sensibilité plus prononcée de la variété à une forte luminosité. Des expériences de survie des deux variétés face à des stress lumineux, de même que des dosages de rhodopsine, pigment visuel des échinodermes (Johnsen, 1997), pourraient permettre d'aller plus loin dans la réflexion sur l'empreinte de l'environnement sur chaque variété, et prendraient toute leur importance dans un contexte plus général de compréhension des mécanismes de spéciation écotypique.

Le cas de la population de Méditerranée sera discuté plus précisément dans le paragraphe suivant, il renforce néanmoins l'idée d'une très forte variabilité morphologique intraspécifique et par contre, d'une assez grande homogénéité morphologique interspécifique dans le genre *Ophiothrix*.

Chapitre III.2. Connectivité des populations d'*O. fragilis* dans la zone de transition entre Atlantique et mer du Nord

(NB Les résultats et discussions de ce chapitre et des deux précédents font l'objet d'un article, présenté en Annexe : Muths D., Jollivet D., Gentil F. & Davoult D. 'Do long-term dispersal and recruitment heterogeneity explain large-scale chaotic genetic patchiness in the brittle-star *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard, 1789) in the North East Atlantic?' à soumettre à Marine Biology,)

L'étude à grande échelle spatiale de la structure génétique des populations d'*O. fragilis* est effectuée afin de statuer sur le niveau de connectivité entre les populations de cette espèce. Une phase dispersive longue a longtemps été supposée pouvoir assurer une connectivité importante entre populations distantes. Cependant, de plus en plus d'études tendent à montrer que les populations marines fonctionnent majoritairement grâce à l'autorecrutement, peu importe la durée de vie larvaire, limitant par là même la connectivité qui pourrait exister entre les populations (Sponaugle *et al.*, 2002; Swearer *et al.*, 2002). En fait, il s'agit là de souligner la distinction que font Kinlan *et al.* (2005) entre dispersion théorique, dispersion maximale (importante en terme d'expansion et de connectivité longue distance) et dispersion moyenne (importante en terme de renouvellement démographique des populations), trop souvent confondues selon eux. Les résultats du modèle de dispersion larvaire d'*O. fragilis* en Manche (Lefebvre *et al.*, 2003) suggèrent que même si ces populations fonctionnent grâce à l'autorecrutement, les populations de cette espèce sont majoritairement des populations ouvertes, c'est-à-dire qu'une partie du recrutement local est découplé de la reproduction locale et dépend d'apports larvaires allochtones (Caley *et al.*, 1996). Qu'en est-il alors de la connectivité génétique des populations ? Est-ce que la phase larvaire longue permet d'assurer un minimum de flux géniques entre les populations de la zone d'étude ?

1. Démarche

La structure génétique d'*O. fragilis* est analysée à partir de 21 populations de l'Atlantique Nord Est qui se répartissent au sein de cinq grands bassins : le Sud Bretagne, la Mer d'Iroise, la Manche Occidentale, la Manche Orientale et la Mer d'Irlande (Figure III.12

pour la position des sites et Tableau III.6 pour les coordonnées exactes). Des individus ont été échantillonnés dans quatre populations aux extrémités européennes de l'aire de répartition de l'espèce, pour servir de référence : une population en Méditerranée, une en Galice et deux en Scandinavie. Les individus récoltés sont typés à l'aide du séquençage du gène mtCOI et des marqueurs allozymiques (Chapitre I). Les effectifs analysés par population sont indiqués dans le Tableau III.6. Au vu des résultats obtenus dans le chapitre III.1, l'analyse des données mitochondriales est conduite sur l'ensemble du jeu de données alors que certaines analyses utilisant les données allozymiques sont parfois dissociées par variété.

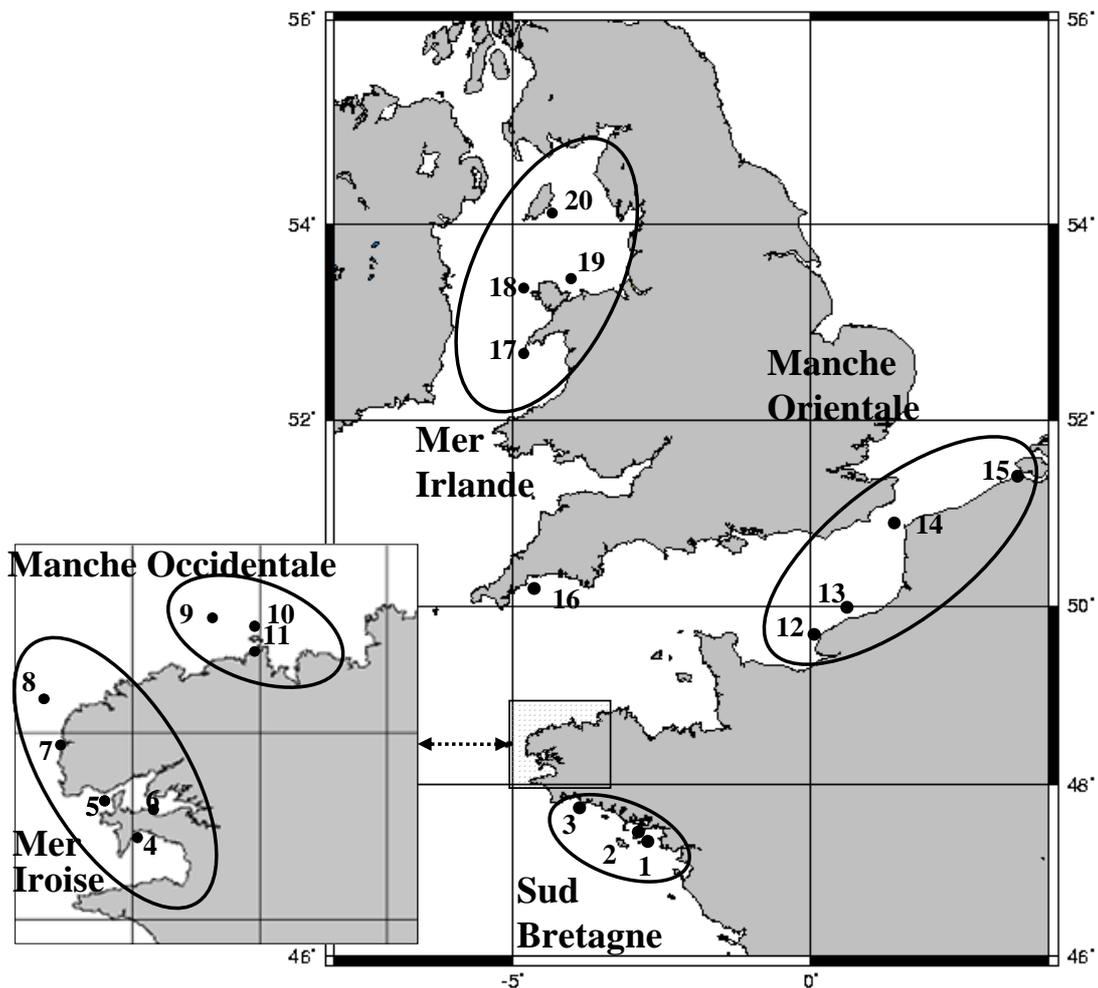


Figure III.12. Localisation géographique des principales populations d'*O. fragilis*. Les noms des populations correspondant aux numéros sont indiqués dans le Tableau B6.

Tableau III.6. Coordonnées géographiques des populations d'*O. fragilis*. En plus de la profondeur et des coordonnées GPS exactes, le type d'habitat est également indiqué : bancs denses d'ophiures (BDO), ophiures associées aux bancs de Maerl (OBM), rares individus échantillonnés sur l'éstran rocheux en zone intertidale (RI) ou en zone subtidale (RS). Les deux variétés sont *echinata* (E) et *pentaphyllum* (P). La taille des échantillons utilisés pour chacun des deux marqueurs est indiquée dans les deux dernières colonnes (respectivement, N_{coi} et N_{all} pour le mtCOI et les allozymes).

	<i>n</i> ^o	Population	Label	Prof.	Latitude	Longitude	Habitat	Variété	<i>N</i> _{coi}	<i>N</i> _{all}
Sud Bretagne	1	Hoedig	Dig	11 m	47°21,75'N	2°49,35'W	BDO	P	14	48
	2	Houat	Ho	13 m	47°24,54'N	2°58,31'W	BDO	P	14	48
	3	Trevignon	Tre	15 m	47°52,15'N	3°58,05'W	OBM	E	11	34
Mer Iroise		Pentrez	Pen	15 m	48°10,32'N	4°19,55'W	OBM	E	-	45
	4	Cap Chevre	CCh	27 m	48°09,02'N	4°29,02'W	BDO	P	12	48
	5	Camaret	Cam	22 m	48°18,04'N	4°37,02'W	BDO	P	15	48
	6	Rade Brest	RB	10 m	48°19,22'N	4°23,26'W	OBM	P	20	48
	7	Ile Segal	IS	0 m	48°26,29'N	4°46,94'W	RI	E	17	48
	8	Portsall	Por	94 m	48°36,2'N	4°49,40'W	RS	E	7	18
Manche Occidentale	9	Keremma	Ker	80 m	48°46,5'N	4°10,00'W	RS	E	10	32
	10	Roscoff	Ro	71 m	48°47,42'N	3°58,79'W	BDO	P	33	50
	11	Restran	Rest	0 m	48°43,70'N	3°58,02'W	RI	E	13	23
Manche Orientale	12	Antifer	Ant	30 m	49°58,24'N	0°14,41'E	BDO	P	9	-
	13	Paluel	Pal	30 m	49°53,10'N	0°35,10'E	BDO	P	21	38
	14	Wimereux	Wx	31 m	50°55,00'N	1°35,00'E	BDO	P	28	60
	15	Belgique	Be	25 m	51°31,00'N	4°00,00'E	BDO	P	16	48
	16	Plymouth	Ply	2 m	50°21,16'N	4°07,52'W	RS	E	10	36
Mer Irlande	17	Cardigan Bay	CB	53 m	52°51,08'N	4°47,48'W	BDO	P	14	52
	18	West Anglesey	WA	54 m	53°22,95'N	4°59,77'W	BDO	P	15	48
	19	Lyna's point	Ly	31 m	53°25,46'N	4°13,13'W	BDO	P	16	48
	20	Ile Mann est	IE	42 m	54°01,23'N	4°17,55'W	BDO	P	15	48
	-	Méditerranée	Med	20 m	42°29,23'N	3°09,15'E	RS	E	3	-
	-	Galicie	Gal	0 m	42°46,20'N	8°59,57'W	RI	E	3	-
	-	Norvège	Nor	0 m	60°20,00'N	5°12,00'E	RI	-	3	-
	-	Suède	Swed	46 m	58°15,00'N	11°24,00'E	RS	-	3	-

2. Résultats

2.1 MtCOI

L'analyse des séquences indique la présence de 198 sites polymorphes, ce qui permet de définir 289 haplotypes (sur 322 séquences obtenues). Sur ces sites polymorphes, 77,9% s'avèrent informatifs avec parcimonie et 22,1% sont des singletons. Un arbre NJ basé sur les distances moyennes entre paires de populations est présenté sur la Figure III.13(a). Une faible divergence existe entre la majorité des échantillons atlantiques (moins de 1% de divergence). Au contraire, une profonde divergence (18,6%) existe entre les populations de Méditerranée et de Galice d'une part, et, d'autre part, le reste des échantillons atlantiques. Les relations qui unissent les divers haplotypes (dont seuls 10% sont partagés) sont suffisamment complexes pour que le réseau d'haplotypes qui en découle présente une structure indéchiffrable (en aucune manière en forme d'étoile). Les relations entre haplotypes sont donc présentées sur la

Figure III.13(b) par un arbre simplifié de distance en NJ entre individus de la lignée Atlantique. Les individus se regroupent en douze groupes haplotypiques dont un est majoritaire (A ; 144 individus), d'autres branches divergentes présentant des groupes secondaires (dont les deux principaux sont B et C ; respectivement 29 et 47 individus).

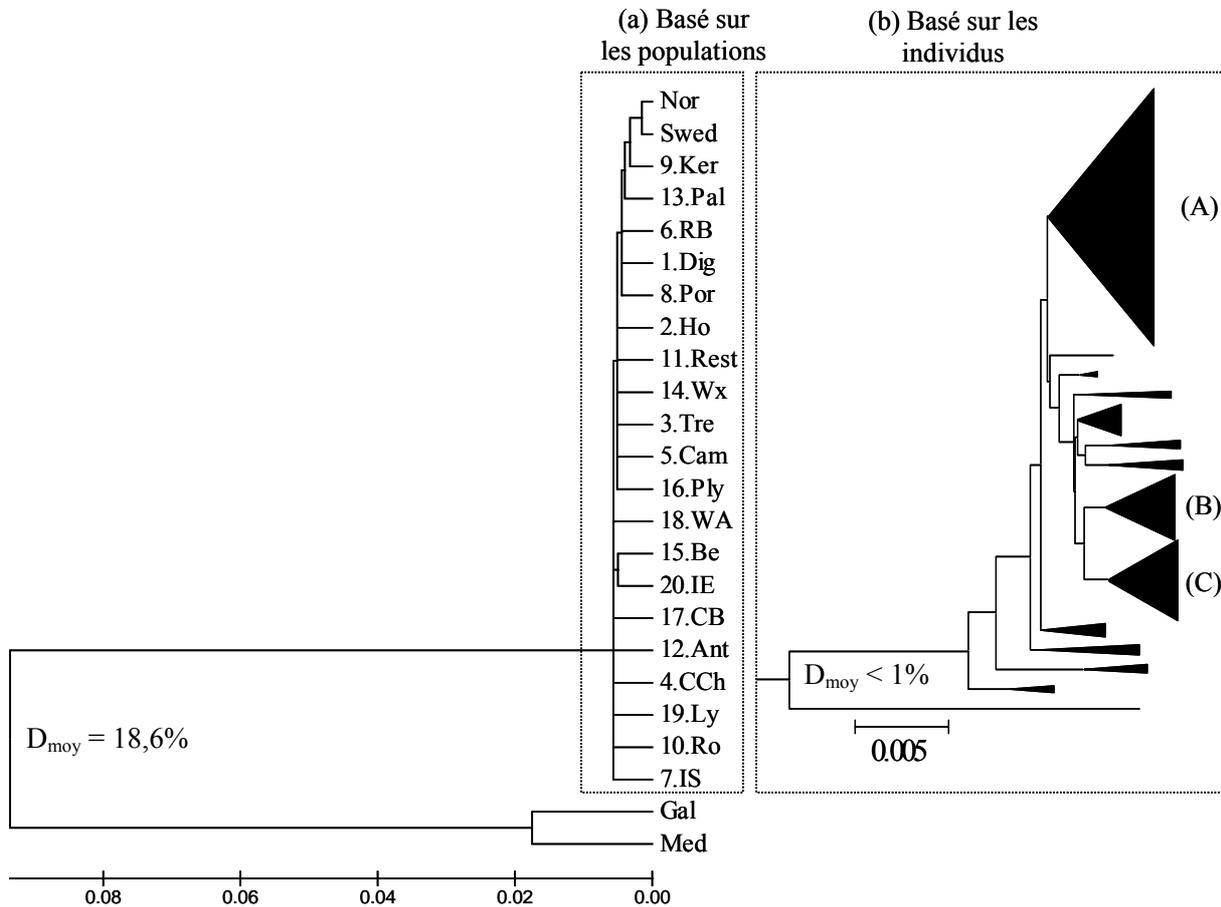


Figure III.13. Arbre en NJ basé sur les distances moyennes entre séquences de mtCOI d'*O. fragilis* par paire de populations (a). La structure de l'arbre basé sur les individus est compressée et dessinée en (b). Après compression, trois groupes majeurs peuvent être identifiés (A, B et C) et neuf autres groupes secondaires. L'épaisseur des triangles est proportionnelle au nombre d'individus regroupés.

La Figure III.14 représente la contribution relative de ces trois groupes principaux (A, B et C) dans la composition génétique des populations de chaque variété et de chacune des cinq régions géographiques. Les différences dans les proportions de ces trois groupes apparaissent très réduites entre variétés, tout comme entre les cinq régions. Il en est de même pour les deux autres groupes d'effectif supérieur à cinq individus, et même lorsque les regroupements sont constitués de moins de cinq individus, il y a toujours plusieurs origines géographiques au sein des regroupements d'haplotypes.

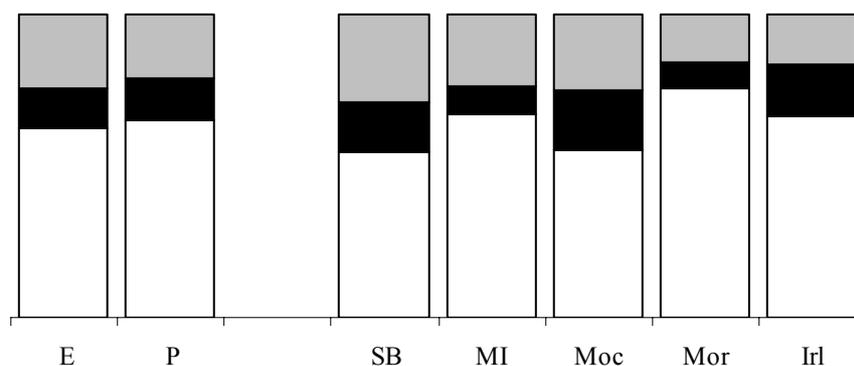


Figure III.14. Les trois principaux groupes identifiés suite à la compression de l'arbre en NJ basé sur les distances entre individus (Figure III.13a) sont quantifiés dans chaque population et groupés par variété puis par grande région géographique (groupe A en blanc, B en noir et C en gris). Les deux variétés sont *echinata* (E) et *pentaphyllum* (P). Les cinq régions sont le Sud Bretagne (SB), la Mer d'Iroise (MI), la Manche occidentale (Moc), la Manche orientale (Mor) et le Mer d'Irlande (Irl).

Un niveau de diversité génétique très élevé existe de façon homogène sur l'ensemble des populations échantillonnées (Tableau III.7). Les diversités moyennes, haplotypiques (H_e) et nucléotidiques (π), sont du même ordre d'importance entre les populations, respectivement d'environ 0,99 et 0,01. Les proportions d'haplotypes privés varient de 33 à 89% avec une valeur moyenne de 67%. La valeur de D de Tajima associée à l'ensemble de ces séquences est de -2,48 ($p < 0,001$).

Tableau III.7. Diversité génétique mitochondriale pour les populations d'*O. fragilis* (N_{coi} = nombre de séquences ; h = nombre d'haplotypes ; H_d = diversité haplotypique ; π = diversité nucléotidique; Php = pourcentage d'haplotypes privés)

		Diversité mitochondriale				
		N_{coi}	h	H_d	π	Php
Sud Bretagne	Hoedig	14	13	0,989	0,0135	0,62
	Houat	14	14	1	0,0131	0,53
	Trevignon	11	10	0,982	0,0113	0,64
	CapChèvre	12	11	0,985	0,0102	0,75
	Camaret	15	12	0,978	0,0106	0,50
	Rade de Brest	20	20	1	0,0107	0,65
	Ile Segal	17	17	1	0,0122	0,76
	Portsall	7	7	1	0,0079	0,71
Manche Occidentale	Keremma	10	10	1	0,0096	0,40
	Roscoff	33	27	0,997	0,0126	0,78
	Restran	13	12	0,987	0,0120	0,83
Manche Orientale	Antifer	9	9	1	0,0150	0,89
	Paluel	21	21	1	0,0106	0,83
	Wimereux	28	25	0,992	0,0105	0,67
	Belgique	16	15	0,992	0,0097	0,62
	Plymouth	10	10	0,933	0,0113	0,75
Mer Irlande	Cardigan Bay	14	11	1	0,0111	0,71
	West Anglesey	15	9	0,964	0,0114	0,71
	Lyna's point	16	15	0,992	0,0122	0,75
	Ile Mann est	15	15	1	0,0011	0,67

Des AMOVA sont réalisées successivement pour tester l'effet géographique et celui de l'habitat sur la répartition de la variance génétique. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.8. Quel que soit le paramètre testé, plus de 90% de la variance est associée au niveau intrapopulation ($0,020 < \Phi_{ST} < 0,064$; tous les $p < 0,001$). Le niveau de différenciation génétique entre populations est significatif au sein des régions géographiques ($\Phi_{CT} = 0,023$, $p < 0,001$) et au sein des habitats ($\Phi_{CT} = 0,079$, $p < 0,001$) mais la part de variance génétique due à la subdivision entre groupes n'est pas significative pour ces deux paramètres testés. Les observations faites sur la Figure III.14 au niveau d'une absence de structure mitochondriale entre les régions sont ainsi renforcées.

Tableau III.8. AMOVA (analyse hiérarchique de la variance génétique mitochondriale) basée sur les distances génétiques ϕ_{st} réalisée avec Arlequin

	Degré de liberté	Somme des carrés	% de variance totale	Indices de fixation	p-value
Effet géographique					
Entre groupes géographiques	5	18,54	0	-0,003	0,58
Entre populations d'un même groupe	16	64,84	2,34	0,023	<0,001
Au sein des populations	288	882,48	97,66	0,02	<0,001
Effet de l'habitat					
Entre groupes d'habitat	3	8,14	-0,92	-0,029	1
Entre populations d'un même groupe	18	75,24	2,55	0,079	<0,001
Au sein des populations	288	882,48	98,36	3,064	<0,001

Les estimations de différenciation génétique par paire de populations ϕ_{st} obtenus sur la base des séquences de mtCOI sont présentées dans le Tableau III.9. La plupart des valeurs significatives de ϕ_{st} concernent trois populations de Camaret, Paluel et Belgique. Cependant, ces trois populations n'apparaissent guère plus divergentes sur l'arbre. Les autres valeurs de ϕ_{st} sont faibles et non-significatives, quelle que soit la distance géographique entre populations, ne validant pas l'hypothèse d'un isolement par la distance (test de Mantel, $p = 0,41$; Figure III.15).

Table III.10. Valeurs de différenciation génétique calculées par paire de populations d'*O. fragilis*, basées sur les séquences mitochondriales (ϕ_{st}). La significativité est indiquée par * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; après correction de Bonferroni, seules les valeurs avec une probabilité associée initiale de $p < 0,001$ restent significatives.

	Ho	Tre	CCh	Cam	RB	IS	Por	Ker	Ro	Rest	Pal	Wx	Be	Ply	CB	WA	Ly	IE
Dig	-0.008	0.009	-0.083	0.032*	0.008	0.013	-0.032	0.031	-0.001	-0.016	0.027	0.015	0.031	0.023	0.004	0.005	0.004	0.016
Ho		-0.020	-0.062	0.013	-0.013	-0.025	-0.015	0.002	-0.020	-0.019	0.007	-0.015	0.036	0.012	-0.010	0.004	-0.016	0.002
Tre			-0.022	-0.022	-0.025	-0.024	0.012	0.021	-0.025	-0.002	-0.012	-0.011	0.079*	-0.005	0.008	0.004	-0.002	0.030
CCh				-0.036	-0.022	-0.026	-0.032	0.048	-0.061	-0.032	-0.018	-0.031	0.080	-0.040	0.014	0.026	-0.006	0.018
Cam					0.010	0.012	0.043	0.097	0.008	0.033	0.022	0.025	0.138***	0.020	0.061*	0.050*	0.043*	0.079*
RB						-0.025	-0.014	0.013	-0.007	-0.007	-0.006	-0.006	0.044*	-0.001	-0.010	0.008	0.004	0.005
IS							-0.009	-0.008	-0.009	-0.006	-0.010	-0.009	0.040*	0.022	-0.005	0.001	-0.015	0.011
Por								-0.001	-0.012	-0.008	-0.011	-0.010	0.017	0.065	-0.026	-0.030	0.005	0.002
Ker									0.003	0.021	0.024	0.008	0.019	0.094***	-0.019	0.005	-0.002	-0.005
Ro										-0.005	0.006	-0.008	0.048*	0.016	-0.003	0.002	0.001	0.019
Rest											0.032*	0.005	0.003	-0.007	-0.024	0.002	-0.026	-0.014
Pal												0.003***	0.076**	0.039	0.023	0.007	0.029**	0.039**
Wx													0.049	0.036	0.001	0.004	0.007	0.021
Be														0.091	-0.014	0.020	-0.006	-0.017
Ply															0.040	0.070*	0.022	0.028
CB																-0.016	-0.021	-0.029
WA																	0.001	0.005
Ly																		-0.013

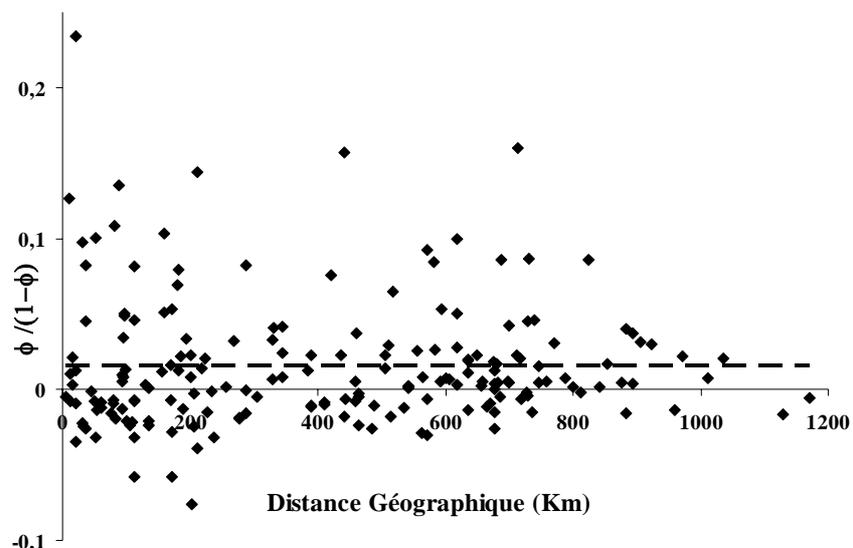


Figure III.15. Correspondances entre distances génétiques mitochondriales corrigées (i.e. $\phi_{st} / (1 - \phi_{st})$) et distances géographiques par paire de populations d'*O. fragilis* (test de Mantel, $p = 0,41$)

Les estimations de flux de gènes entre ces cinq régions géographiques montrent des niveaux très asymétriques d'échanges entre bassins (Tableau III.10). Les populations qui donnent le plus semblent être celles de Manche Occidentale, qui sont aussi celles avec la plus grande taille de population efficace.

Tableau III.10. Estimations des flux de gènes ayant existé entre les populations d'*O. fragilis* des cinq grandes régions géographiques, obtenues grâce aux simulations sous Migrate-n. Les populations émettrices sont en colonnes (avec l'estimation de $\theta = 2N_e \mu$ entre parenthèses) et les populations receveuses sont en lignes.

	Sud Bretagne	Mer Iroise	Manche Occidentale	Manche Orientale	Mer Irlande
<i>MtCOI</i>	(0,0492)	(0,2086)	(0,3516)	(0,1021)	(0,1587)
Sud Bretagne	*	25,775	41,964	12,484	21,190
Mer Iroise	6,997	*	298,765	34,699	83,725
Manche Occidentale	49,768	75,886	*	14,613	21,551
Manche Orientale	73,049	77,584	69,555	*	95,684
Mer Irlande	46,912	91,616	334,727	83,864	*

2.2. Allozymes

Aucun déséquilibre génotypique n'est détecté entre les sept locus enzymatiques polymorphes utilisés durant cette étude ($p > 0,05$) ; les locus donnent donc des informations indépendantes. Le nombre d'allèles varie de 3 à 10, avec une moyenne de 5,6 ($\pm 2,6$). La richesse allélique est sensiblement similaire entre les populations (Tableau III.11).

Tableau III.11. Diversité génétique pour les populations d'*O. fragilis* pour les allozymes : N_{all} = nombre d'individus; R_s = richesse allélique estimée pour un échantillon d'une taille minimale de 16 individus; H_{obs} = hétérozygotie observée; H_{nb} = hétérozygotie non biaisée (Nei, 1987)

		Diversité allozymique			
		N_{all}	R_s	H_{nb}	H_{obs}
Sud Bretagne	Hoedig	48	3,06	0,46	0,41
	Houat	48	3,07	0,47	0,40
	Trevignon	34	3,07	0,46	0,41
Mer Iroise	Pentrez	45	3,31	0,48	0,40
	CapChèvre	48	3,13	0,42	0,28
	Camaret	48	3,31	0,50	0,47
	Rade de Brest	48	3,55	0,53	0,48
	Ile Segal	48	3,36	0,52	0,45
	Portsall	18	2,71	0,40	0,25
	Manche Occidentale	Keremma	32	2,81	0,40
Roscoff	50	3,92	0,57	0,46	
Restran	23	3,81	0,55	0,40	
	Paluel	38	3,78	0,54	0,48
	Wimereux	60	3,69	0,55	0,44
	Belgique	48	3,67	0,53	0,54
	Plymouth	36	3,39	0,44	0,37
Mer Irlande	Cardigan Bay	52	3,68	0,44	0,34
	West Anglesey	48	3,55	0,50	0,42
	Lyna's point	48	3,73	0,57	0,50
	Ile Mann est	48	3,47	0,50	0,45

Les déficits en hétérozygotes sont hautement significatifs dans toutes les populations. Les valeurs monocus et multilocus de F_{IS} sont présentées dans le Tableau III.12. Les valeurs globales sont comprises entre 0,015 pour la population de Belgique et 0,397 pour celle de Portsall ; 18 des 20 populations présentent un déficit significatif en hétérozygotes. Une importante hétérogénéité existe dans la contribution des différents locus aux déficits en hétérozygotes entre les populations. Ainsi une valeur très forte de déficit existe au Cap de la Chèvre ($F_{IS} = 0,397$) juste du fait d'un locus, alors que la population de Wimereux présente une valeur multilocus deux fois plus faible mais due à des déficits pour cinq des sept locus. A l'inverse des autres locus, le locus *Pk* présente des excès en hétérozygotes non significatifs pour toutes les populations, traduisant un potentiel effet sélectif. Or ce locus est celui qui est associé à la diagnose des deux variétés.

Tableau III.12. Estimations monolocus et multilocus des indices de fixation Fis pour chaque population d'*O. fragilis*. Les valeurs de probabilité associées sont calculées grâce à Genepop (*p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001)

	Dig	Ho	Tre	Pen	CCh	Cam	RB	IS	Por	Ker	Ro	Rest	Pal	Wx	Be	Ply	CB	WA	Ly	IE
<i>PGI</i>	0.125*	0.166	0.209***	0.226	0.045	0.053	0.320***	-0.010	0.274	0.045	0.063	0.148	0.055	0.254	0.100	-0.051	0.222***	0.147**	-0.003	0.234*
<i>PGM</i>	0.170	0.471***	0.229***	0.369**	0.164	0.030	0.301***	0.174***	0.491***	0.344**	0.367***	0.254	0.375***	0.127***	-0.002	0.094	0.243***	0.262***	0.298**	0.121
<i>MDH</i>	-0.046	0.396*	0.245*	0.407**	-0.035	0.068	-0.051	-0.110	0.671**	0.142	0.234	0.495	-0.093	0.503***	-0.065	0.339	-0.064	0.090	0.068	-0.113
<i>ME</i>	0.284***	0.118	0.011	0.263	0.201	0.299***	0.080	0.293	0.521*	0.162	0.197*	0.410	0.138	0.381***	-0.049	0.340**	0.370***	0.103	-0.043	-0.047
<i>HK</i>	0.446*	0.052	-0.099	0.402**	0.192	-0.083	0.007	-0.001***	-0.097	-0.125	0.452***	-0.122	0.040	0.230***	0.014	0.184	0.046	0.135*	0.200***	0.107
<i>MPI</i>	-0.095	0.115*	0.050	0.438***	0.378**	0.252***	0.081*	0.206*	0.292	0.488***	0.161***	0.697***	0.190	0.263***	-0.043	0.279**	0.328*	0.307**	0.363***	0.380***
<i>PK</i>	-0.306	-0.324	-0.000	0.184	-0.105	-0.382	-0.277	0.218	-	-	-0.354*	-0.143	-0.281	-0.203	-0.083	-	-0.063	-0.001	-0.242	-0.126
<i>Multiloci</i>																				
<i>average</i>	0.120***	0.147**	0.105***	0.168***	0.332***	0.052	0.104***	0.133***	0.397***	0.216***	0.182***	0.286***	0.115***	0.201***	0.015	0.179***	0.225***	0.155***	0.121***	0.107***

Les valeurs de différenciation génétique par paire de populations, calculées selon l'estimateur θ de Weir & Cockerham (1984), sont présentées dans le Tableau III.13. La plupart sont significativement différentes de zéro ($-0,001 < \theta < 0,171$; 96% des $p < 0,01$). En moyenne, les valeurs par paire de populations d'une même variété sont inférieures à celles par paire de populations entre deux variétés ($\theta = 0,065$ pour la variété *echinata*, $\theta = 0,052$ pour la variété *pentaphyllum* et $\theta = 0,076$ pour les paires intervariétés). Aucune tendance d'isolement par la distance n'est observée sur l'ensemble du jeu de données ($p = 0,65$, test de Mantel; voir Figure III.16), pas plus que lorsque les variétés sont considérées séparément ($p = 0,76$ pour la variété *echinata* et $p = 0,23$ pour la variété *pentaphyllum*).

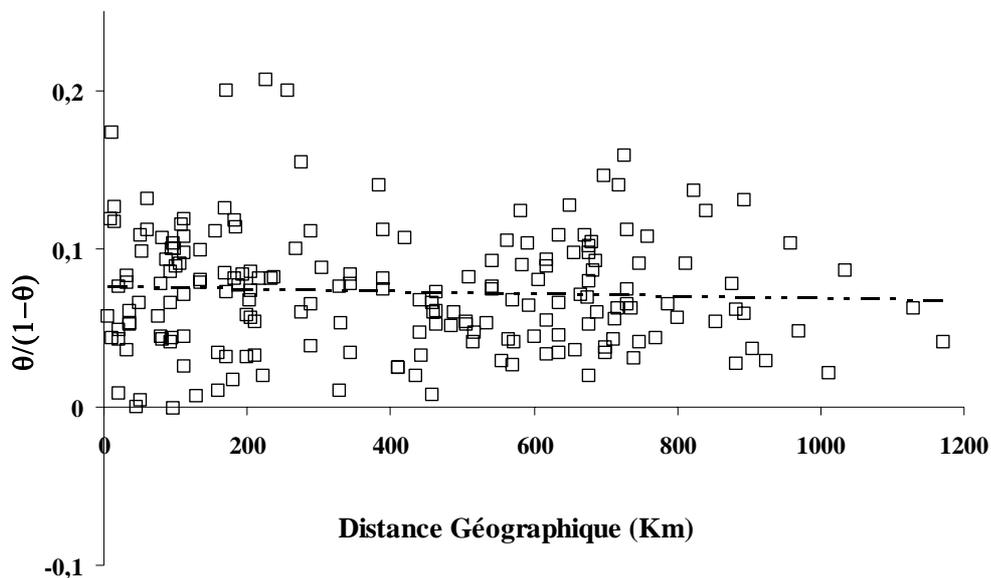


Figure III.16. Correspondances entre distances génétiques allozymiques corrigées (i.e. $\theta/(1-\theta)$) et distances géographiques par paire de populations d'*O. fragilis* (test de Mantel, $p = 0,65$)

Table III.13. Valeurs de différenciation génétique calculées par paire de populations d'*O. fragilis* ; les valeurs sont basées sur les données allozymiques. La significativité, calculée par permutations avec Genetix, est indiquée par * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; après correction de Bonferroni, seules les valeurs avec une probabilité associée initiale de $p < 0,001$ restent significatives.

	Ho	Tre	Pen	CCh	Cam	RB	IS	Por	Ker	Ro	Rest	Pal	Wx	Be	Ply	CB	WA	Ly	IE
Dig	0.147***	0.078***	0.105***	0.063***	0.077***	0.054***	0.075***	0.076***	0.091***	0.060***	0.099***	0.032***	0.039***	0.035***	0.100***	0.079***	0.097***	0.056***	0.051***
Ho		0.096***	0.068***	0.166***	0.074***	0.072***	0.054***	0.171***	0.166***	0.056***	0.133***	0.074***	0.058***	0.115***	0.123***	0.098***	0.083***	0.057***	0.110***
Tre			0.085***	0.103***	0.081***	0.083***	0.073***	0.100***	0.102***	0.069***	0.079***	0.050***	0.066***	0.120***	0.081***	0.042***	0.092***	0.083***	0.042***
Pen				0.106***	0.046***	0.076***	0.050***	0.098***	0.094***	0.025***	0.106***	0.044***	0.025***	0.100***	0.051***	0.050***	0.110***	0.059***	0.088***
CCh					0.041***	0.072***	0.057***	0.004	-0.001	0.097***	0.088***	0.064***	0.063***	0.069***	0.031***	0.049***	0.082***	0.123***	0.064***
Cam						0.042***	0.009***	0.049***	0.041***	0.042***	0.091***	0.019***	0.028***	0.052***	0.019***	0.045***	0.060***	0.061***	0.056***
RB							0.034***	0.089***	0.091***	0.042***	0.065***	0.032***	0.039***	0.029***	0.075***	0.056***	0.041***	0.033***	0.035***
IS								0.070***	0.061***	0.042***	0.072***	0.024***	0.024***	0.036***	0.031***	0.057***	0.069***	0.049***	0.061***
Por									-0.018	0.101***	0.116***	0.069***	0.074***	0.094***	0.017	0.048***	0.095***	0.127***	0.089***
Ker										0.105***	0.112***	0.072***	0.077***	0.098***	0.009	0.039***	0.093***	0.137***	0.084***
Ro											0.054***	0.010	0.007	0.052***	0.078***	0.049***	0.070***	0.019***	0.043***
Rest												0.070***	0.061***	0.081***	0.111***	0.067***	0.084***	0.073***	0.033***
Pal													0.007	0.037***	0.050***	0.041***	0.061***	0.028***	0.026***
Wx														0.033***	0.056***	0.053***	0.072***	0.021***	0.045***
Be															0.085***	0.093***	0.079***	0.039***	0.059***
Ply																0.033***	0.096***	0.113***	0.076***
CB																	0.054***	0.089***	0.031***
WA																		0.074***	0.039***
Ly																			0.061***

Une analyse en composantes principales est réalisée sur les fréquences alléliques ; les sorties de l'ACP sont présentées sur la Figure III.17 et montrent la position des différentes populations échantillonnées le long des deux premiers axes qui résument environ 50% de la variance génétique. Les populations ne se regroupent pas en fonction des variétés, ni en fonction de leur position géographique ou de leur type d'habitat. Les quatre populations qui contribuent le plus à l'axe 1, du côté positif, sont parmi celles situées à l'ouverture occidentale de la Manche, dont celles du Cap de la Chèvre, de Portsall, de Keremma et de Plymouth. Ces quatre populations forment donc un ensemble génétique assez proche, ce qui confirme les valeurs de différenciation génétique θ non significatives entre ces quatre populations. Elles ne sont néanmoins proches ni géographiquement, ni en terme d'habitat ou de profondeur. L'ACP, à l'inverse des résultats de l'analyse canonique (Figure III.10), ne souligne pas la part de structure génétique due à l'existence de variétés.

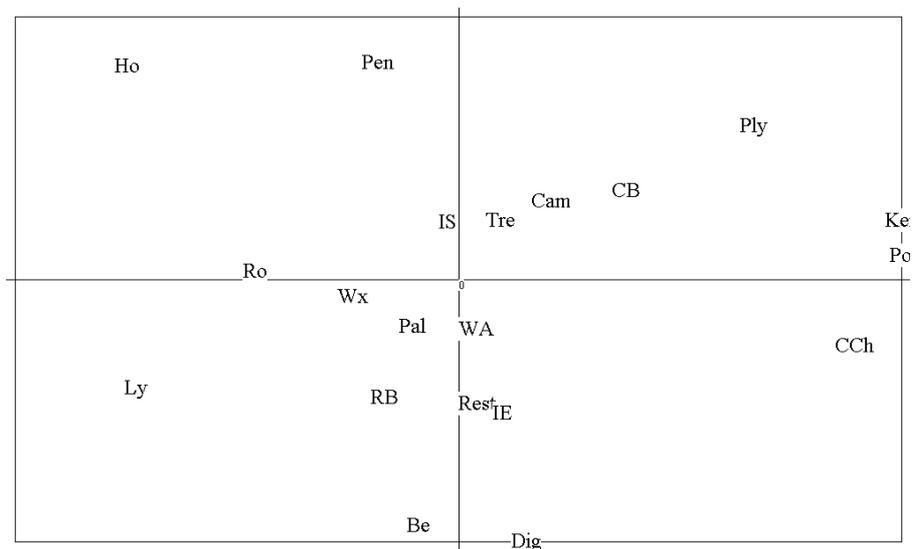


Figure III.17. Analyse en composante principale réalisée sur les données allozymiques des 20 populations d'*O. fragilis* grâce à PCA-Gene. Les axes 1 et 2 synthétisent respectivement 28,7% et 18,7% de la variance (tous deux de façon significative, $p < 0,05$).

De la même manière, les analyses factorielles de correspondances réalisées sur les fréquences génotypiques (Figure III.18) permettent de souligner les fortes similitudes interindividuelles qui existent entre les différentes régions géographiques, les habitats ou les profondeurs.

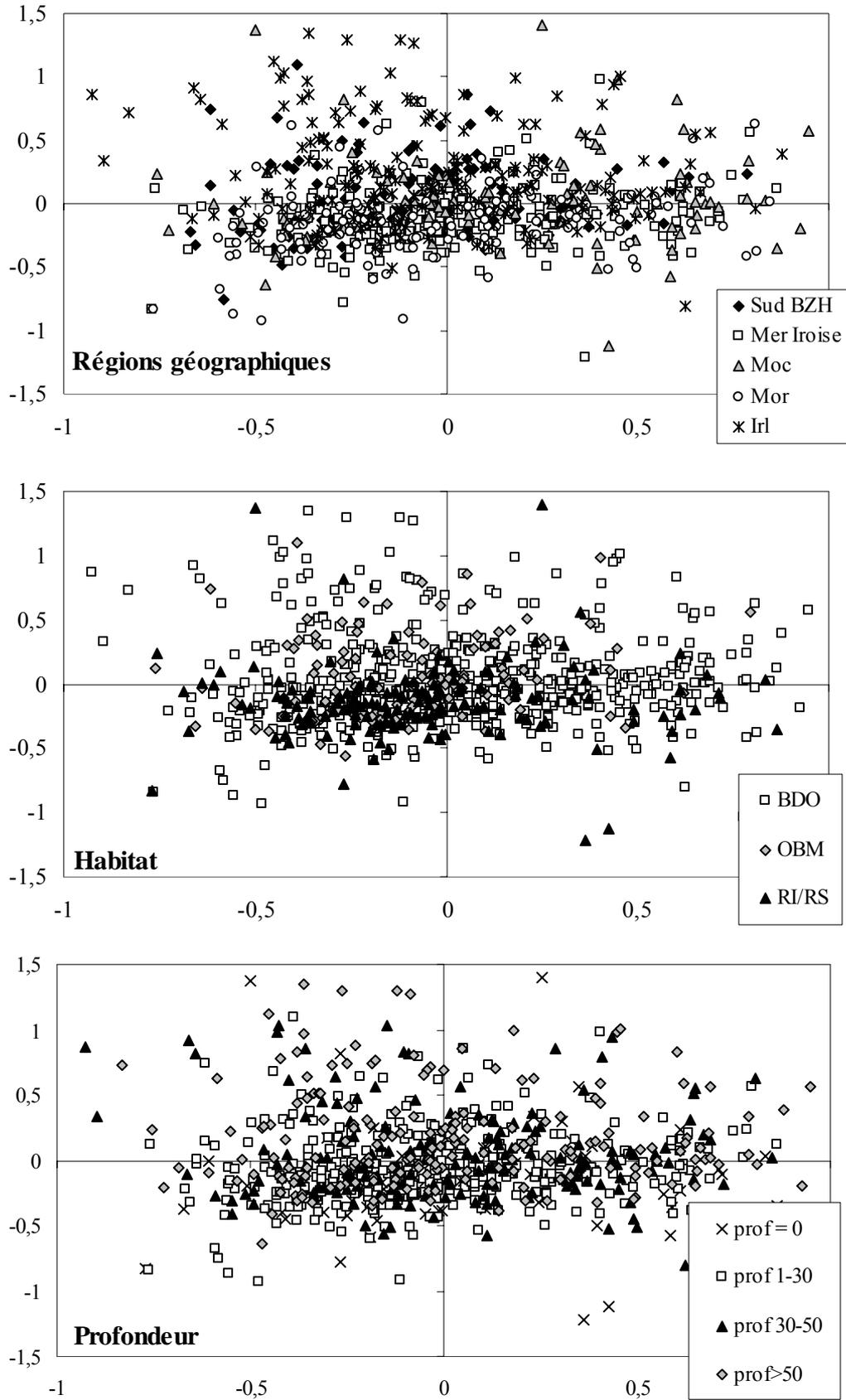


Figure III.18. Analyse factorielle des correspondances réalisée sur les fréquences génotypiques d'*O. fragilis* grâce à Genetix. Les sorties sont réalisées sur les individus puis classées en fonction des régions géographiques, des habitats et des profondeurs (en m).

La subdivision en cinq groupes géographiques ne semble effectivement pas influencer sur la variance génétique de façon significative comme l'indique l'AMOVA basée sur les groupes géographiques pour la variété *pentaphyllum* (Tableau III.14). La majeure partie de la variance génétique est, en fait, expliquée par l'hétérogénéité au sein des populations (94,35%; $p < 0,001$).

Tableau III.14. Analyse hiérarchique de la variance génétique allozymique des populations de la variété *pentaphyllum*

	Degré de liberté	Somme des carrés	% de variance totale	Indices de fixation	p-value
Effet géographique					
Entre groupes géographiques	4	41,59	-0,62	-0,012	0,8
Entre populations d'un même groupe	8	104,25	6,27	0,118	<0,001
Au sein des populations	1231	2189,83	94,35	1,779	<0,001

Des tests d'assignation sont effectués afin d'estimer la part de l'information génétique due à un groupe ancestral commun. Les résultats par populations sont présentés sur la Figure III.19. Le pourcentage d'individus bien assignés à leur population varie de 16% au Cap de la Chèvre à 59% à Houat, avec une valeur moyenne de 31% sur l'ensemble des populations.

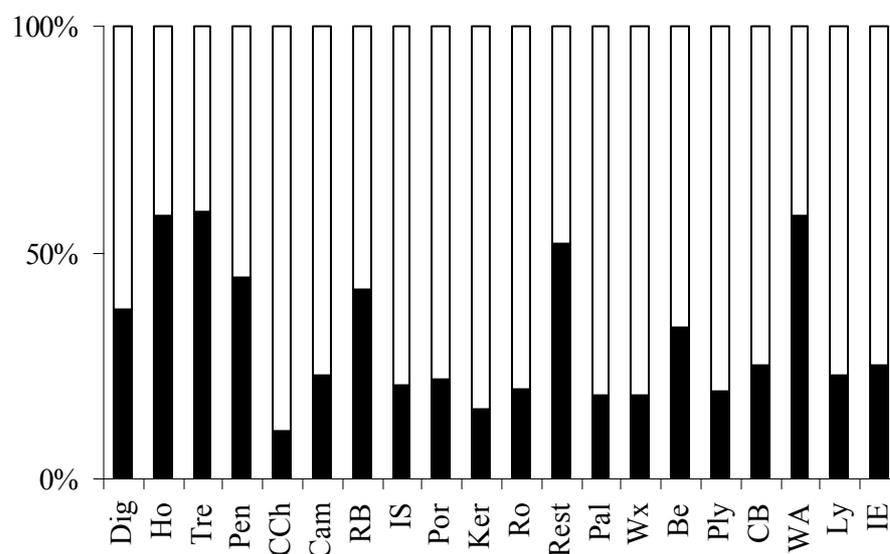


Figure III.19. Proportion d'individus d'*O. fragilis* assignés à leur propre population (en noir) ou à une autre population que leur population d'origine (en blanc)

En dépit d'une absence de structure significative entre les bassins, les populations sont regroupées par proximité géographique afin de réaliser des tests d'assignation et les estimations de flux de migrants sur les populations de la variété *pentaphyllum*. Néanmoins les résultats des deux types d'analyses sont similaires quand les individus de la variété *echinata* sont ajoutés à l'analyse. Les résultats des tests d'assignation sont présentés dans le Tableau III.15 et montrent que les individus d'un bassin sont plus à même d'être assignés à leur propre bassin qu'à un autre.

Tableau III.15. Proportion respective pour les individus d'*O. fragilis* var. *pentaphyllum* d'être assignés à l'un des cinq bassins. Les lignes représentent les bassins dans lesquels les individus sont échantillonnés, les colonnes, les bassins pour lesquels les individus sont assignés. La diagonale représente donc les valeurs d'auto-assignation. (NB : la somme des lignes est donc égale à 100% des individus assignés à l'une ou l'autre des régions).

	Sud BZH	Iroise	Moc	Mor	Irl
Sud BZH	48,96	15,63	7,29	18,75	9,38
Iroise	10,42	53,47	12,50	12,50	11,11
Moc	16,33	16,33	44,90	6,12	16,33
Mor	22,63	12,41	14,60	38,69	11,68
Irl	13,27	17,35	8,67	11,22	49,49

Les estimations de flux génétiques entre les populations de la variété *pentaphyllum* des cinq régions géographiques sont présentées dans le Tableau III.16. Les flux apparaissent très réduits, encore plus qu'avec les données mitochondriales et ce, même si les tailles de populations efficaces sont plus importantes.

Tableau III.16. Estimations des flux de gènes ayant existé entre les populations d'*O. fragilis* entre les cinq grandes régions géographiques, obtenues grâce aux simulations sous Migrate-n. Les populations émettrices sont en colonnes (avec l'estimation de $\theta = 4N_e\mu$ entre parenthèses) et les populations receveuses sont en lignes.

	Sud Bretagne	Mer Iroise	Manche Occidentale	Manche Orientale	Mer Irlande
<i>Allozymes</i>	(0,3502)	(0,4534)	(0,3539)	(0,2376)	(0,6915)
Sud Bretagne	*	3,77	1,737	1,587	4,300
Mer Iroise	1,780	*	1,133	1,592	3,616
Manche Occidentale	1,630	4,165	*	2,988	8,238
Manche Orientale	3,373	7,074	3,351	*	5,973
Mer Irlande	1,970	3,134	1,472	0,810	*

3. Discussion

3.1. Les lignées cryptiques au sein de l'espèce *Ophiothrix fragilis*

L'unité taxonomique de l'espèce *Ophiothrix fragilis* préalablement remise en question sur la base de la morphologie avait également été discutée sur la base de la génétique, par Baric & Sturmbauer (1999). Leurs travaux identifiaient deux lignées distinctes au sein de chacune des deux espèces proches d'Ophiotricidae, chaque lignée étant isolée de part et d'autre du détroit de Gibraltar. De plus, chaque lignée d'*O. fragilis* apparaissait plus proche de la lignée d'*O. quinquemaculata* habitant dans la même région géographique qu'à la seconde lignée d'*O. fragilis* (et réciproquement). Les présentes données confirment l'existence de deux lignées génétiques divergentes au sein de l'espèce *O. fragilis*. La répartition de chaque lignée semble néanmoins moins restreinte que précédemment pensée ; il pourrait y avoir, au moins pour une portion de la côte espagnole atlantique, sympatrie de ces deux lignées. En fait, la population de Galice est plus proche de la population de Méditerranée (même si 4% de divergence les séparent).

Le niveau de divergence observé sur le mtCOI (19%) correspond à celui observé pour *A. brachiata* et pour les espèces de Polychètes de sables fins précédemment évoquées (Jolly *et al.*, 2005; Jolly *et al.*, 2006). Les scénarii de vicariance évoqués pour les peuplements de sables fins semblent donc pouvoir expliquer les divergences rencontrées pour des espèces inféodées à d'autres types d'habitat, renforçant l'idée que les phénomènes d'eustasie et de continentalisation de l'Ouest de l'Europe à la transition Mio-Pliocène (Haq *et al.*, 1987; Brault *et al.*, 2004) ont eu une influence très importante sur les communautés benthiques et ont engendré nombreux phénomènes de spéciation le long des côtes européennes.

De même qu'*O. fragilis*, certaines espèces présentent une répartition géographique des lignées assez tranchée avec une transition entre les aires de répartition de chaque lignée aux environs du détroit de Gibraltar (Féral *et al.*, 1995; Naciri *et al.*, 1999; Roman & Palumbi, 2004; Saavedra & Pena, 2005; Remerie *et al.*, 2006). La Mysidacé *Mesodopsis slabberi* présente en outre une divergence moyenne de 17% sur le gène mitochondrial de la COI entre lignées cryptiques, avec une lignée composée de populations atlantiques et l'autre lignée constituée majoritairement de populations méditerranéennes ; seule une population de la côte atlantique portugaise fait exception puisqu'elle se regroupe avec l'ensemble des populations Méditerranéennes (Remerie *et al.*, 2006). Ce schéma rappelle fortement celui observé sur *O. fragilis*. Ces espèces présentent donc des niveaux de divergence similaire, et ce quel que soit le type d'habitat, avec dans certains cas des patrons de répartition très semblables, consolidant

le postulat d'une histoire évolutive commune sous l'influence des perturbations environnementales à la transition Mio-Pliocène.

3.2. Histoire récente de la colonisation sur l'ensemble de l'aire géographique en Atlantique

De même que pour *A. brachiata*, des phénomènes de spéciation anciens semblent se combiner à une phase d'expansion géographique plus récente. Ainsi un D de Tajima négatif et significatif, avec une forte proportion de singletons, traduit, en absence d'effet sélectif, une forte augmentation de la taille de la population et donc vraisemblablement une expansion géographique récente suite à la création de niches écologiques (déglaciation et ouverture de la Manche). A l'exception de la population de Galice, toutes les populations atlantiques sont génétiquement assez homogènes avec une divergence intralignée inférieure à 1% entre toutes les populations témoignant de l'origine commune de ces populations, quelles que soient leur variété ou leur distribution actuelle. Même les échantillons de Scandinavie sont similaires à ceux des côtes françaises et anglaises. Les faibles niveaux de différenciation mitochondriale entre populations d'*O. fragilis* suggèrent que la colonisation de l'ensemble de l'aire d'étude est très récente et a probablement eu lieu à partir d'une zone refuge unique. La fin du dernier maximum glaciaire date de 18000 ans mais l'expansion de cette espèce depuis une zone refuge n'a sans doute pu se faire qu'une fois la Manche complètement ouverte (Smith, 1989) et les importants courants marins actuels mis en place (Lambeck, 1997) soit il y a 7000 ans seulement, expliquant pourquoi le niveau de différenciation entre populations est très faible (peu de mutations accumulées). Les estimations de flux de gènes (sur la base mitochondriale) tendent à montrer que, entre ces cinq bassins, la plupart des migrants sont originaires de la partie occidentale de la Manche, ce qui est en accord avec les proportions d'haplotypes privés (et les richesses alléliques) plus importantes à Roscoff et Paluel. L'espèce aurait pu trouver refuge dans cette zone du Nord de l'Europe durant le dernier maximum glaciaire, à proximité de l'ouverture occidentale de la Manche. Certaines espèces d'algues semblent partager un profil de colonisation similaire avec un refuge potentiel en Manche, comme par exemple *Fucus serratus* (Coyer *et al.*, 2003; données non publiées) et *Palmaria palmata* (Provan *et al.*, 2005). Cependant, il semble difficile d'être plus précis sur la localisation des refuges. Un échantillonnage spatial plus conséquent le long des côtes européennes (bassin de Gascogne, Portugal et Mer du Nord) permettrait sans doute de préciser l'histoire de la colonisation, de même que l'histoire évolutive des lignées atlantique et méditerranéenne.

3.3. Connectivité minimale assurée entre populations

Avec une phase larvaire longue, un habitat fréquemment rencontré le long des côtes européennes et un hydrodynamisme important dans la zone d'étude, l'espèce *O. fragilis* est supposée ne pas avoir de barrières à la migration entre populations d'une même variété. Néanmoins, les valeurs de différenciation allozymique sont importantes et significatives, aussi bien entre populations proches qu'entre populations éloignées. L'homogénéité observée sur la base du mitochondrial ne se retrouve pas avec les allozymes ; c'est donc qu'il existe des mécanismes de structuration contemporains (sous l'hypothèse d'absence de balayage sélectif sur le gène mitochondrial). Les flux géniques estimés grâce aux allozymes donnent un nombre de migrants relativement réduits entre régions (sous l'hypothèse d'un modèle en îles). Pourtant l'importante hétérogénéité des profils génotypiques (représentée par les AFC) ne semble pas pouvoir s'expliquer du fait de la répartition géographique, ni d'ailleurs des types d'habitat ou de la profondeur. Ainsi des populations voisines sont, souvent, aussi différenciées que des populations très distantes. Par exemple, les populations d'Hoedig et d'Houat sont deux populations de la même variété, distantes de 15 km à peine, habitant le même habitat, à des profondeurs similaires et sous les mêmes conditions hydrodynamiques. Elles présentent pourtant une des valeurs de θ les plus élevées et ne sont clairement pas groupées par l'ACP. Une des hypothèses pour expliquer ces fortes valeurs pour des populations aussi proches serait qu'il existe, pour les espèces à phase larvaire longue, une distance minimale en deçà de laquelle une larve a une probabilité moindre de recruter (correspondant à la période réfractaire). Dit autrement, la distance parcourue par la larve pendant le temps nécessaire au développement modifierait le schéma théorique linéaire d'isolement par la distance, par une relation curvilinéaire (Figure III.20; Toonen & Grosberg, sous presse).

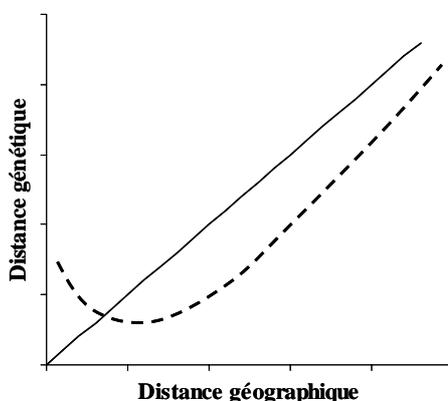


Figure III.20. Représentation théorique de schémas d'isolement par la distance, selon une relation linéaire classique (en trait plein) ou curvilinéaire (en pointillés; Toonen & Grosberg, sous presse). Dans le second cas, il existerait une distance intermédiaire pour laquelle les larves auraient plus de chance de recruter qu'à proximité immédiate de leur lieu d'émission.

Cette hypothèse ne semble cependant pas pouvoir être décelable dans le cas présent, la variabilité dans les valeurs de différenciation génétique pour des distances géographiques

similaires étant très importante, autant pour les faibles que les grandes distances. Un schéma global de métapopulation pourrait également masquer la tendance d'isolement par la distance du fait des effets de dérive associés aux importants renouvellements des populations (Gilpin, 1991; Pannell & Charlesworth, 2000). Or les modélisations de dispersion larvaire d'*O. fragilis* en Manche (Lefebvre *et al.*, 2003) suggèrent que les populations pourraient constituer une métapopulation unique, avec des populations dont le renouvellement serait principalement assuré par l'autorecrutement mais avec des apports larvaires allochtones non négligeables (en accord avec les tests d'assignation). Une relation simple entre dispersion théorique et connectivité effective ne semble donc guère applicable dans le cas présent pour expliquer la forte structure génétique 'chaotique' existant entre les populations ; il existe donc probablement des mécanismes de structuration locale.

Les résultats des AMOVA associent d'ailleurs toujours plus de 90% de la variance génétique avec le niveau intrapopulationnel. Cette importante structure intrapopulationnelle pourrait être due à la coexistence d'au moins deux groupes génétiquement différents au sein des populations, entraînant un 'effet Wahlund', cet effet pouvant être spatial ou temporel. Dans le cas d'*O. fragilis*, la première hypothèse avancée pour expliquer l'effet Wahlund repose sur le polymorphisme variétal et une reproduction préférentielle entre morphes, comme c'est le cas pour d'autres espèces (Matsuoka & Hatanaka, 1991; Manchenko & Kulikova, 1996; Tarjuelo *et al.*, 2004). L'appartenance à une variété est, dans le cas présent, définie pour l'ensemble d'une population. Or, il peut exister un mélange de variétés au sein d'une population qui induirait cet effet Wahlund. En outre, seules deux des quatre variétés ont été prises en considération dans cette étude ; il n'est donc pas exclu que les autres variétés puissent aussi se retrouver en mélange dans une population et induire des différences génétiques intrapopulation.

Comme il a été montré dans le chapitre III.1, la diagnose des variétés repose principalement sur les locus *Pk* et *Mdh*. Or ces deux locus ne présentent pas de déficits en hétérozygotes. A l'inverse les valeurs de *Fis* associées à la *Pk* sont négatives pour toutes les populations. Bien que non significative, cette tendance contraste fortement avec les déficits trouvés aux autres locus et pourrait suggérer qu'une sélection en faveur des hétérozygotes s'opère à ce locus. Cet effet sélectif pourrait en outre contrebalancer et masquer des effets plus faibles d'effet Wahlund.

Enfin, une autre hypothèse pour expliquer les déficits en hétérozygotes est celle d'une reproduction préférentielle entre différentes classes de taille au sein de la même population, encore appelée 'effet cohorte', qui pourrait également expliquer les différences génétiques

‘chaotiques’ entre populations. Cette hypothèse a déjà été mise en avant pour expliquer de forts niveaux de variance intrapopulation chez des invertébrés marins benthiques (David *et al.*, 1997) et justifier le fait qu’il n’existe pas de structure géographique entre populations. De tels effets ont fait l’objet des travaux de Johnson & Black (1982; 1984) et sont à la base de la théorie du ‘chaotic genetic patchiness’. Expliquer la variance intrapopulation par des fluctuations dans la composition génétique des cohortes nécessite d’abord d’avoir une bonne connaissance du fonctionnement démographique des populations. C’est ce que le chapitre III.3 se propose d’aborder, avant de détailler un peu plus dans le Chapitre III.4 les mécanismes qui permettraient de justifier d’une structure chaotique en agrégats.

Chapitre III.3. Variabilité spatio-temporelle de la structure démographique de trois populations d'*O. fragilis*

(NB Les résultats et discussions de ce chapitre font l'objet d'un article, présenté en Annexe : Variability in population dynamics of the common brittle-star *Ophiothrix fragilis* in three sites of the English Channel ; Muths D., Davoult D. & Jollivet D., soumis dans 'Proceedings of the 12th International Echinoderm Conference 2006')

Les bancs denses d'*O. fragilis* sont considérés, en Manche, comme des populations stables dans le temps (Cabioch, 1968; Davoult, 1988; Brylinski *et al.*, 2006) qui, selon les résultats du modèle de dispersion larvaire (Lefebvre *et al.*, 2003), se maintiendraient majoritairement grâce à de l'autorecrutement. L'importance de l'autorecrutement dans la stabilité des populations adultes a déjà été reportée pour d'autres échinodermes tel que l'étoile de mer *Pisaster ochraceus* (Sewell & Watson, 1993) et l'oursin *Evechinus chloroticus* (Lamare, 1998). Néanmoins, l'étude de la structure génétique d'*O. fragilis* a mis en exergue une importante structure intrapopulation, avec des différences entre populations marquées, mais non structurées géographiquement. L'une des principales hypothèses pour expliquer cette structure intrapopulation est celle d'une importante disparité entre les cohortes. En effet, l'uniformité des abondances dans le temps ne signifie que rarement qu'il y a homogénéité dans les processus qui les gouvernent, tel que le recrutement et la mortalité (Hughes *et al.*, 1999). Deux études démographiques de l'espèce *O. fragilis* ont déjà été réalisées à Wimereux de 1987 à 1989 (Davoult *et al.*, 1990) et en Belgique de 2001 à 2004 (Morgan, 2004) et montrent des différences de fonctionnement, en terme d'importance et de variabilité temporelle du recrutement. La présente étude du fonctionnement démographique a été mise en place, en parallèle, en trois sites subtidaux de la Manche - dont Wimereux - entre 2003 et 2005 afin de pouvoir apporter des éléments de discussion sur la variabilité spatio-temporelle du recrutement.

1. Description des sites

Les trois sites du suivi ont également été échantillonnées pour l'étude génétique; les coordonnées exactes ont donc été présentées dans le tableau III.6 (Chapitre III.2). La position des sites est rappelée sur la Figure III.21. Les trois populations correspondent à des bancs denses d'individus de la variété *pentaphyllum*.

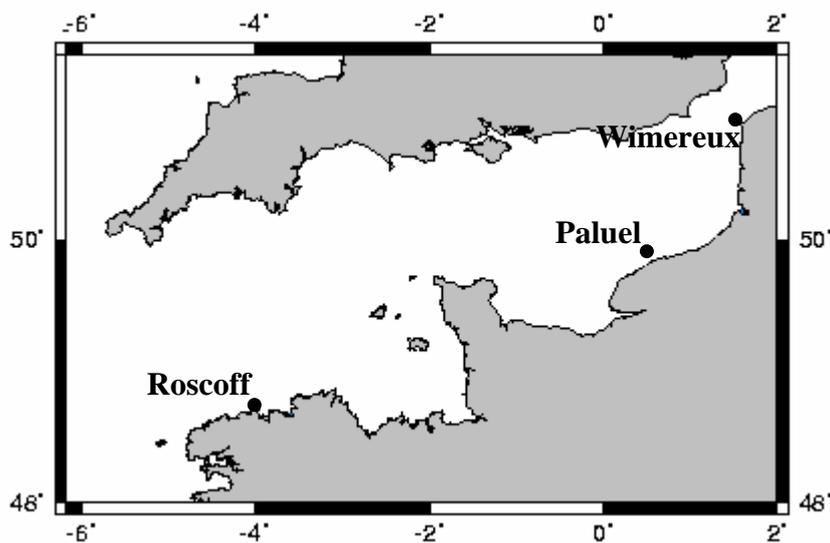


Figure III.21. Position géographique des trois sites d'échantillonnage des populations d'*O. fragilis*

1.1. Roscoff

La population subtidale dite de Roscoff se situe en fait au Nord de l'île de Batz sur un fond à cailloutis dans une zone de forts courants (2 à 3 nœuds), à une profondeur de plus de 70 m. Le recouvrement dans ce site est de plus de 90%. Du fait de la profondeur et de la densité de la population (environ 500 ind.m⁻²), ce site est surnommé le « Trou aux singes », les singes étant le nom donné aux ophiures par les pêcheurs locaux. Cette population est stable depuis au moins 40 ans (Cabioch, 1968). L'échantillonnage a été effectué de mai 2004 à octobre 2005, à raison d'un échantillon tous les deux mois.

En plus de l'échantillonnage des populations adultes, un suivi du nuage larvaire a été effectué d'avril à novembre 2005, à raison d'un échantillon vertical tous les 15 jours, autant que possible en basse mer de mortes eaux (filet de maille 200 µm). Un échantillon est effectué au dessus de la population adulte de Roscoff et un autre plus proche de la côte, au dessus de la station d'observation du milieu littoral Somlit (48°46,44N ; 3°57,96W), sur 67 m de fond, au dessus d'un fond dépourvu d'ophiures. L'identification spécifique des larves repose sur des caractéristiques morphologiques (processus médian unique à la base des bras postéro-latéraux (Geiger, 1964)) et sur le séquençage du gène mtCOI d'une partie des larves. Les *ophioplutei* d'*O. fragilis* possèdent des bras postéro-latéraux typiquement très longs : des données biométriques sur les larves permettent de calculer le rapport B/C (B, longueur du bras et C,

longueur du corps ; Figure III.22) qui est égal à 2,5 environ, en accord avec ce que Lefebvre (1999) trouvait pour cette espèce.

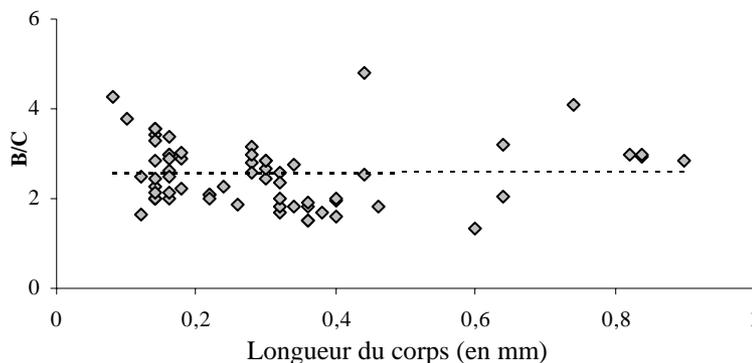


Figure III.22. Rapport morphométrique B/C (= longueur du corps/ longueur d'un bras postéro-latéral) en fonction de la longueur du corps (en mm). N = 65

1.2. Paluel

La population dite de Paluel est située sur le littoral normand, dans une zone de courants moyens (1 à 2 nœuds), à 30 m de profondeur et à cinq kilomètres de la côte, non loin de la centrale électronucléaire de Paluel. C'est d'ailleurs dans le cadre de la surveillance écologique de l'impact de cette centrale, ouverte en 1984, que l'échantillonnage est réalisé à raison de quatre fois par an. Les sédiments marins aux alentours de la centrale de Paluel sont essentiellement composés de cailloutis et de graviers, idéals pour les populations d'*O. fragilis*. La population de Paluel est stable depuis 1992, au moins. Elle domine le peuplement à raison de 69% des individus récoltés au printemps et 81% en automne (Brylinski *et al.*, 2006), avec une densité moyenne estimée à 1000 ind.m⁻² (Lefebvre, 1999).

1.3. Wimereux

La population dite de Wimereux se situe à 31m de profondeur, dans le faciès côtier de fort hydrodynamisme du détroit du Pas de Calais. Les forts courants de marée (4 nœuds) conditionnent fortement la nature du sédiment et le fonctionnement des peuplements benthiques associés. Le sédiment est constitué de plus de 80% de cailloutis. L'espèce *O. fragilis* domine largement le peuplement avec 1000 à 2000 ind.m⁻² et 62% de la biomasse totale (Davoult, 1988). Un suivi démographique a déjà été réalisé pour cette population de 1987 à 1989 (Davoult *et al.*, 1990) de même qu'un suivi de la croissance gonadique, mettant en parallèle les populations de Wimereux et Roscoff (Lefebvre *et al.*, 1999).

Les données des suivis larvaires effectués à Wimereux, en 1995 et 1996, selon le protocole que nous avons reproduit à Roscoff, par Lefebvre & Davoult (2000), sont présentées dans ce chapitre à titre de comparaison.

2. Structure temporelle des populations

Les histogrammes de fréquence de classes de taille et leur décomposition modale sont présentés sur la Figure III.23, en parallèle pour les trois sites.

A Roscoff, les échantillons d'octobre montrent deux groupes d'individus : un mode aux environs de 6 mm et un second aux environs de 9 mm correspondant respectivement aux adultes âgés d'un et deux ans. Après les événements de recrutement, entre mai et juillet, un ou deux nouveaux modes apparaissent : il s'agit des recrues qui constituent moins de 20% de la taille totale de l'échantillon. A Paluel, plus de 80% de la population est toujours constitué par un pic unique d'adultes (taille moyenne de 10 mm). Les événements de recrutement semblent avoir lieu plusieurs fois par an mais à un niveau très faible. Au final, les recrues contribuent à moins de 10% de la taille totale de l'échantillon. A Wimereux, les événements de recrutement sont plus fréquents et plus conséquents. En effet, il y a deux événements de recrutement en 2004 dont le plus important a lieu en septembre (40% de l'échantillon total) et quatre recrutements en 2005 dont le plus important est en juin (80% de la taille totale de l'échantillon). Le mode d'adultes (autour de 9 mm) n'est que rarement majoritaire.

Les données par classes de taille sont également étudiées par le biais d'une analyse factorielle des correspondances (Figure III.24). Les axes 1 et 2 synthétisent respectivement 43 et 29% de la variance. L'AFC présente un effet Gutman très prononcé, c'est-à-dire une disposition des points en "fer à cheval" (qui indique que le second axe est une fonction quadratique du premier). Les classes de taille, les petites à droite et les grandes à gauche, sont presque classées par ordre décroissant. Les échantillons, qui se répartissent en fonction des classes de taille majoritaires en leur sein, se regroupent en fonction du site puis de la date. Les échantillons de Paluel sont ainsi regroupés autour des grandes classes de taille (10-12 mm), indiquant que l'échantillon est dominé par des individus de grande taille quelle que soit la date d'échantillonnage. A l'opposé, la majeure partie des échantillons de Wimereux se regroupe du fait de la dominance des petits individus, soulignant des recrutements plus marqués et répartis de façon plus homogène dans le temps. Les échantillons de Roscoff sont principalement caractérisés par les classes moyennes (5-10 mm), comme deux des échantillons de Wimereux (novembre 2003 et mars 2004) et occupe donc une position intermédiaire sur l'axe 1 de l'AFC. La structure démographique des échantillons apparaît ainsi clairement dépendante du site et non de la date. Des variations temporelles plus marquées apparaissent néanmoins dans les échantillons de Wimereux.

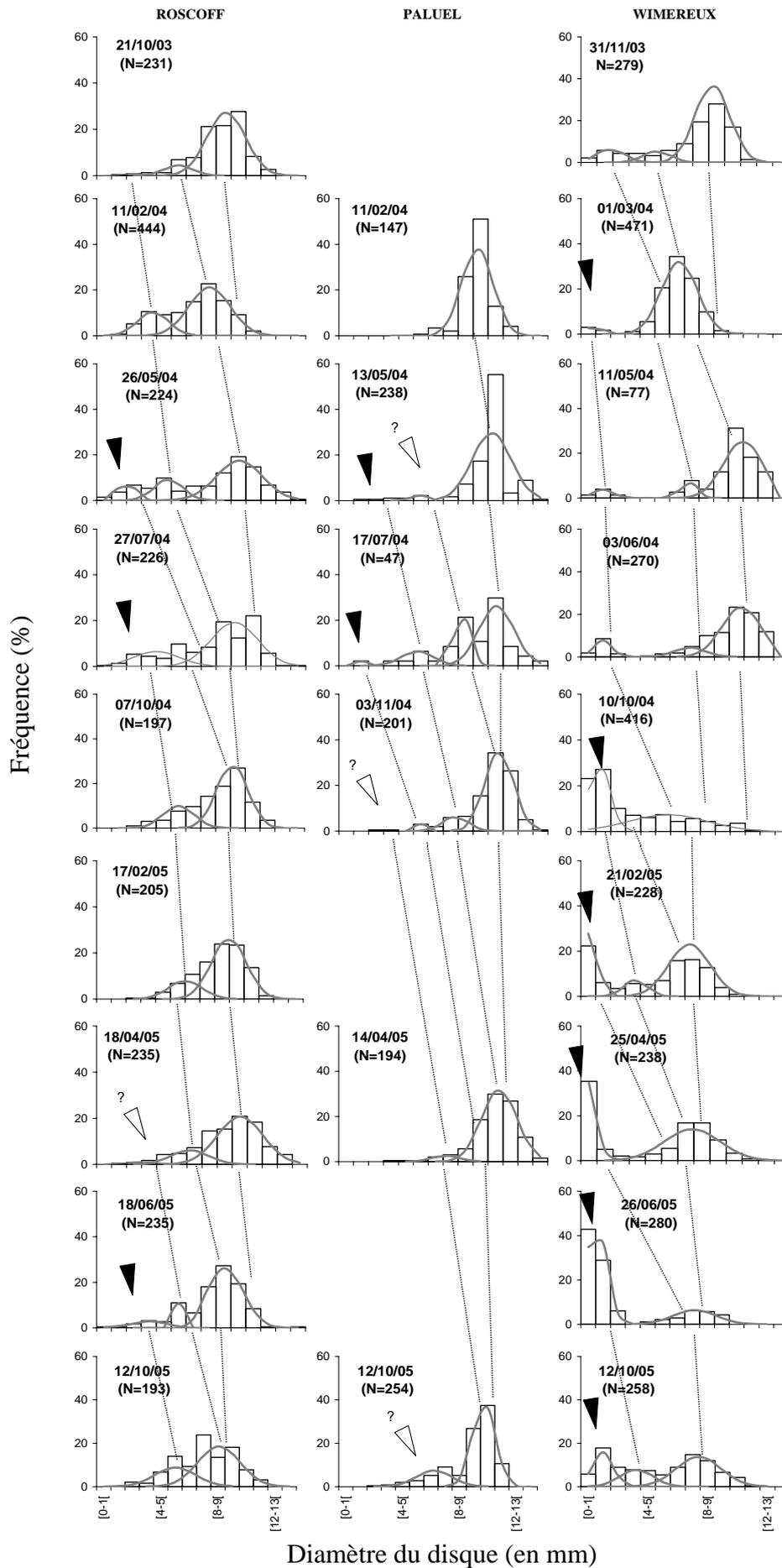


Figure III.23. Histogrammes de classe de taille et décompositions modales présentés pour les trois populations du suivi démographique d'*O. fragilis*. Les dates d'échantillonnage sont indiquées sur chaque graphe, suivi du nombre d'individus mesurés (entre parenthèses). Les triangles noirs indiquent les différents événements de recrutements observés et les triangles blancs, les événements de recrutement non détectés mais suspectés.

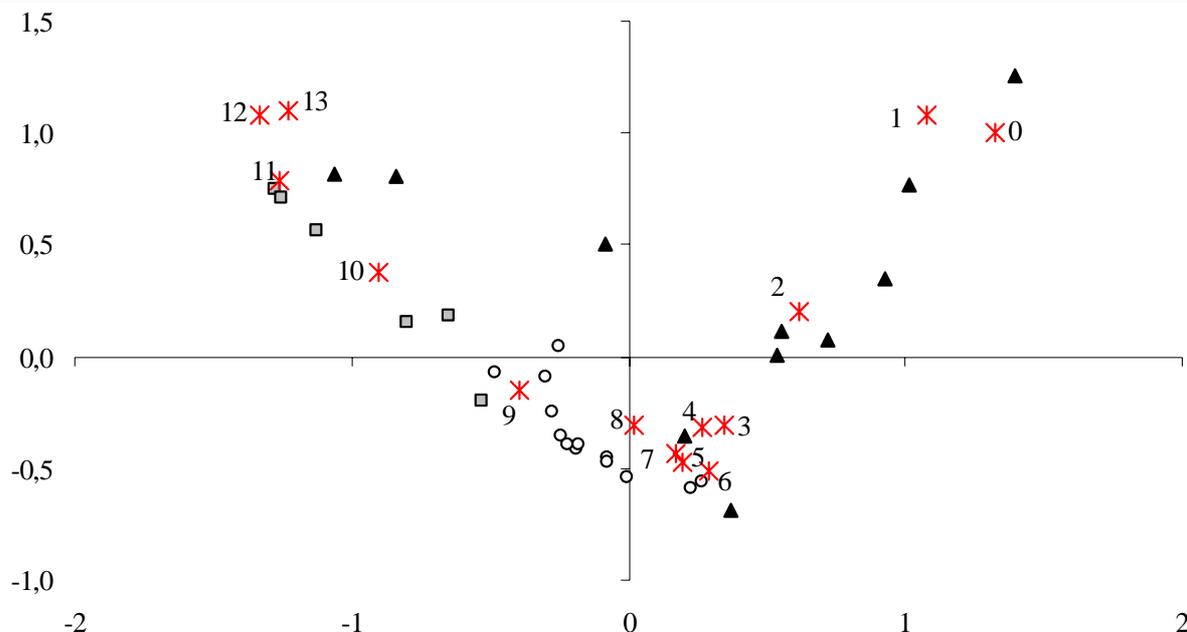


Figure III.24. Analyse factorielle des correspondances (AFC) réalisée sur les données par classes de tailles. Les axes 1 et 2 synthétisent respectivement 43 et 29% de la variance. Chaque étoile rouge indique une classe de taille, dont le chiffre à côté définit la borne inférieure de la classe. Les autres symboles représentent les échantillons temporels : respectivement, des cercles blancs pour Roscoff, des carrés gris pour Paluel et des triangles noirs pour Wimereux.

La décomposition modale des histogrammes permet le suivi des cohortes dans le temps et donc d'estimer la croissance individuelle de l'espèce au sein de chaque localité. Une courbe de croissance est constituée par population, pour une cohorte théorique, à partir de son recrutement et durant l'année et demie qui suit (Figure III.25). Les taux de croissance semblent relativement proches, avec un palier durant l'hiver qui suit le recrutement. Ce palier est plus réduit à Wimereux puisque la cohorte théorique intègre les recrutements d'été comme de septembre.

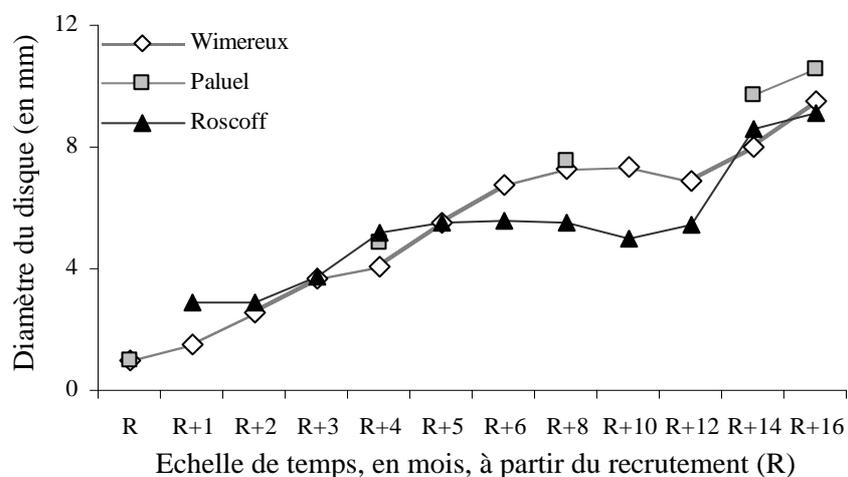


Figure III.25. Croissance du diamètre du disque d'une cohorte théorique d'*O. fragilis* pour chacun des trois sites (R = événement de recrutement ; R+1 = un mois après le recrutement ; ...)

3. Caractérisation des nuages larvaires au dessus des populations

3.1. Roscoff

En 2005, la présence de larves d'*O. fragilis* dans le milieu est limitée dans le temps, de juillet à septembre uniquement, avec un pic d'abondance très net en août. Apparition et disparition du nuage larvaire se font en moins de quinze jours. Les densités, à cette date, sont d'environ 150 ind.m⁻², que ce soit au dessus de la population ou à quelques kilomètres au large de celle-ci (Figure III.26).

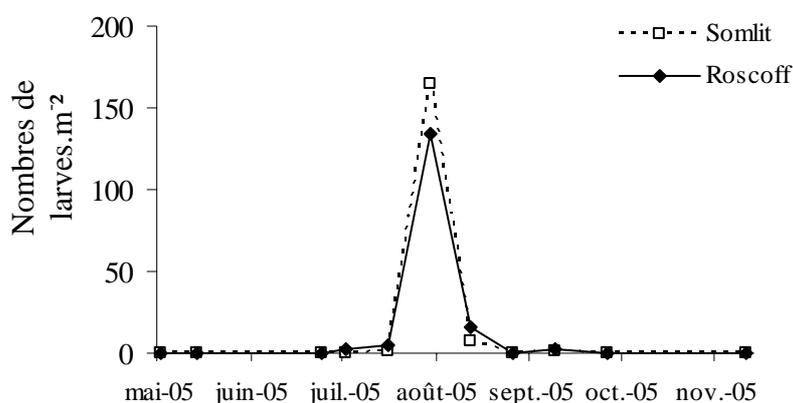


Figure III.26. Abondance de larves d'*O. fragilis* (en nb d'ind.m⁻²) dans la colonne d'eau au dessus de la population de Roscoff et du point de Somlit.

Le développement des *ophioplutei* d'*O. fragilis* est marqué par l'apparition chronologique des bras qui permet de définir des stades (à deux, quatre, six et huit bras) dont la proportion relative a été suivie dans le temps (Figure III.27). Les successions entre les différents stades se font sans cohérence particulière. Avant le pic d'abondance, des larves à six ou huit bras (respectivement âgées de plus de quatre et sept jours ; Morgan & Jangoux, 2002) sont déjà présentes dans la colonne d'eau. A l'inverse, en septembre, un mois après le pic d'abondance larvaire à Roscoff, des individus à deux bras sont de nouveau présents.

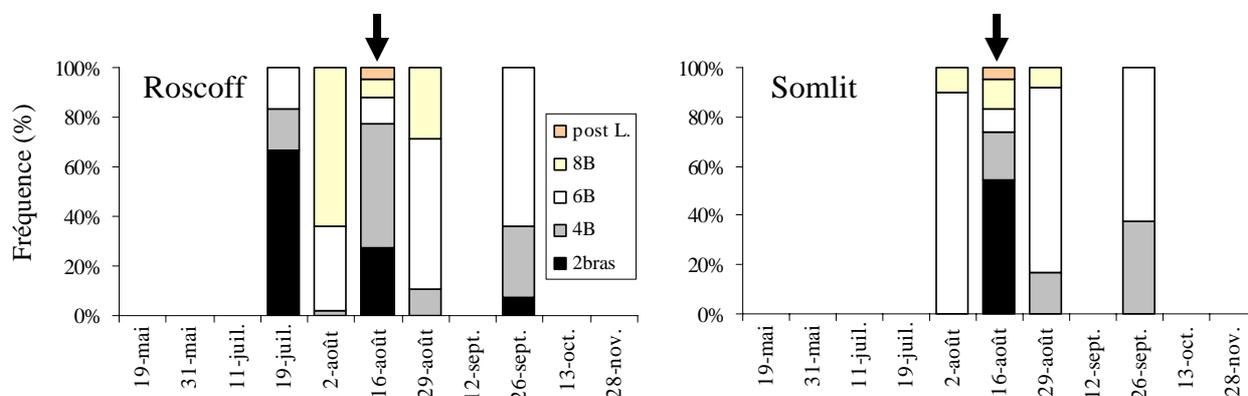


Figure III.27. Variabilité spatio-temporelle dans l'abondance relative des différents stades larvaires d'*O. fragilis*. Les flèches noires indiquent les pics d'abondance larvaire, en accord avec la figure III.23

3.2. Wimereux

Les résultats suivants sont ceux obtenus à Wimereux, en 1995 et 1996 (Lefebvre & Davoult, 2000) et donnés à titre de comparaison.

En 1995, deux épisodes de présence larvaire sont observés, le premier à la mi-juin et le second début août, avec des densités moyennes de 2000 larves.m⁻² pour les deux épisodes. En 1996, seul un pic d'abondance est observé, avec une très forte densité d'environ 180000 ind.m⁻² (Figure III.28).

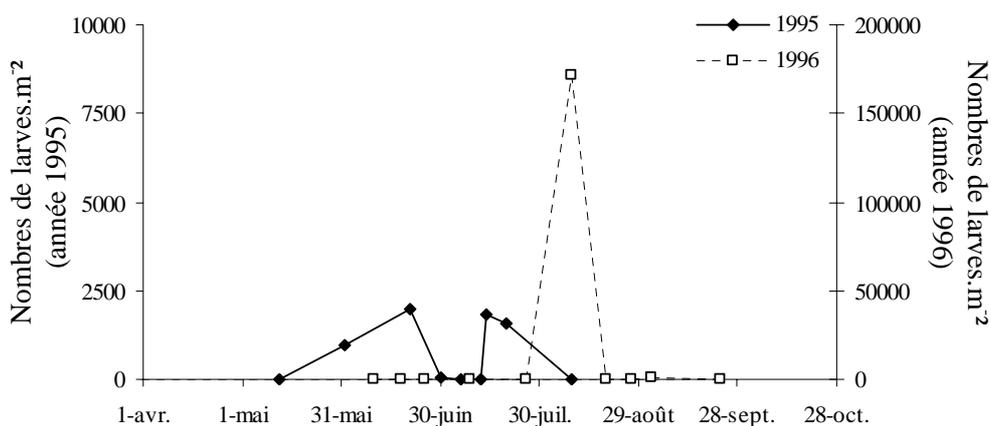


Figure III.28. Abondance de larves d'*O. fragilis* (en nb d'ind.m⁻²) dans la colonne d'eau au dessus de la population de Wimereux en 1995 (en noir et trait plein, échelle de gauche) et 1996 (en blanc et pointillé, échelle de droite)

Les successions entre les différents stades d'*ophioplutei* (Figure III.29) se font sans cohérence particulière. Des larves à six ou huit bras sont déjà présentes dans la colonne d'eau avant le pic d'abondance.

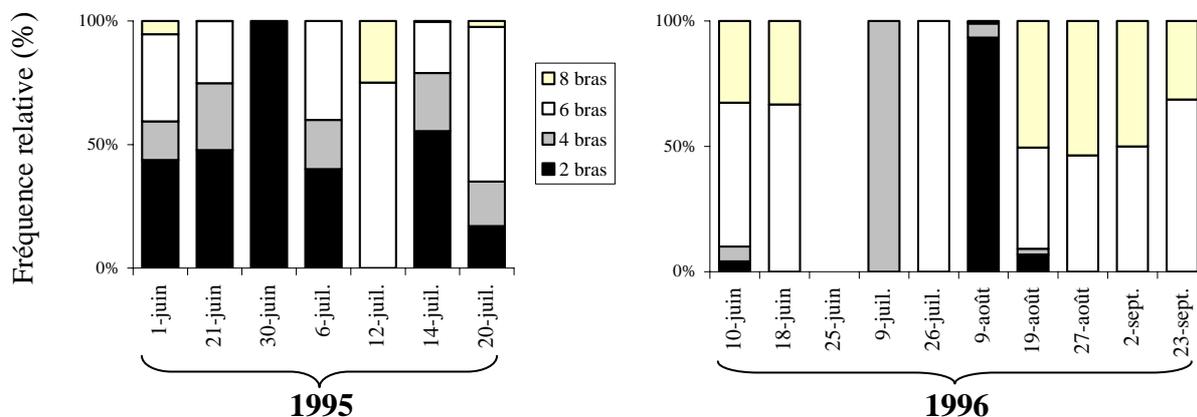


Figure III.29. Variabilité spatio-temporelle dans l'abondance relative des différents stades larvaires d'*O. fragilis* à Wimereux, en 1995 et 1996 (Lefebvre & Davoult, 2000).

4. Discussion

Les trois populations d'*O. fragilis* étudiées sont considérées comme stables au fil des années depuis au moins 20 ans (Cabioch, 1968; Davoult, 1988; Brylinski *et al.*, 2006), suggérant un fonctionnement démographique efficace quelle que soit la population. Les suivis de dynamique de populations mettent pourtant en exergue une importante variabilité spatio-temporelle dans le fonctionnement démographique de ces populations. En effet, le principal événement de recrutement correspond à plus de 40% de la taille de la population à Wimereux alors qu'il correspond à peine à 20% à Roscoff et à moins de 10% à Paluel. En fait, les événements de recrutement secondaires observés à Wimereux sont d'une importance supérieure aux événements de recrutement principaux dans les deux autres sites. Ainsi, le taux de renouvellement des populations à Roscoff ou Paluel est vraisemblablement beaucoup plus faible qu'à Wimereux ou peut être du fait d'événements plus irréguliers. Le fonctionnement présentement constaté à Wimereux confirme les observations faites 20 ans auparavant (Davoult *et al.*, 1990), soulignant la stabilité d'un tel mécanisme. La population de Wimereux semble constituer une véritable exception en terme de fonctionnement démographique de l'espèce. Les estimations de durée de vie d'*O. fragilis* varient de deux à dix ans, selon qu'elles sont basées sur le renouvellement démographique de Wimereux (Davoult *et al.*, 1990) ou sur les stries de croissance (Gage, 1990), avec des possibilités de régulation densité-dépendante de cette durée de vie par mortalité des adultes. La seconde estimation permettrait de mieux comprendre comment le renouvellement des populations peut se faire à Roscoff ou Paluel. En outre, des événements de recrutement plus importants certaines années sont envisageables et assureraient un renouvellement des populations plus conséquent bien que plus chaotique. Cette hypothèse est aussi celle avancée par Morgan (2004) qui observe un fonctionnement démographique pour une population du littoral belge similaire à ce qui est observé à Roscoff et Paluel. En fait, une variabilité interannuelle semble s'ajouter à la variabilité spatiale. Le recrutement sur l'année 2004 est plus important à Roscoff et Paluel qu'en 2005 alors qu'à l'inverse, il est moins conséquent à Wimereux. L'existence de variabilité interannuelle du fonctionnement démographique fait écho à celle soulignée chez *A. brachiata*, en parallèle également à d'autres espèces d'échinodermes et d'invertébrés benthiques (Guillou, 1980; Balch & Scheibling, 2000; Ellien, 2001; Tomas *et al.*, 2004).

Néanmoins les résultats de modélisation du transport larvaire suggèrent que les différences dans l'effort de reproduction pourraient être compensées par des niveaux de rétention larvaire différents selon les sites. Une population comme Wimereux, même avec un

taux de rétention très faible (< 1% en présence de vent ; 6% en absence de vent) mais une importante production larvaire, semble largement subsister grâce à l'autorecrutement (Lefebvre *et al.*, 2003). Les auteurs jugent qu'un tel recrutement en mode semi-fermé est probablement applicable aux autres populations de la Manche ; selon leur logique, le taux de rétention est nettement supérieur à Roscoff (10% en moyenne) et suffirait à compenser le niveau de reproduction trois à quatre fois plus faible, pour pérenniser la population. Cependant, les événements de recrutement observés sont nettement plus faibles à Roscoff. En fait, les résultats du modèle sont obtenus pour des valeurs de fécondité égales à travers l'ensemble de la zone d'étude. Or, l'indice gonadique est trois fois plus important à Wimereux qu'à Roscoff (Lefebvre *et al.*, 1999). Donc, même en considérant que le taux de rétention, différent selon les sites, compensent partiellement les différences d'investissement dans la reproduction, le renouvellement de la population est forcément plus lent à Roscoff qu'à Wimereux et pourrait être compensé par une mortalité des adultes plus modérée.

Afin de mieux comprendre les processus de recrutement, des échantillonnages larvaires ont été effectués. Ainsi, certains pics de recrutements à Roscoff, de même qu'à Wimereux (Lefebvre & Davoult, 2000), semblent avoir lieu sans que des larves soient observées précédemment dans le milieu. Face aux faibles densités larvaires observées, la faible représentativité de ce type d'échantillonnage planctonique (selon un trait de filet vertical) semble être une explication majeure. De plus, un pas de temps de quinze jours entre deux échantillonnages est sans doute suffisant pour mésestimer certains épisodes de ponte. Néanmoins le suivi des densités larvaires et de l'indice gonadique apporte des éléments de comparaison intéressants. Le cycle de développement présente des différences importantes entre Roscoff et Wimereux. Si les deux populations présentent une période de maturation gonadique synchronisée (juin-juillet), l'indice gonadique est trois fois plus important à Wimereux (Lefebvre *et al.*, 1999), ce qui pourrait expliquer ensuite les différences dans les densités de larves observées dans la colonne d'eau. La ponte principale qui se déroule vraisemblablement fin juillet-début août, dans les deux sites, est effectivement suivie de la présence de larves dans la colonne d'eau : à Roscoff, la densité est d'environ 150 larves.m⁻² tandis qu'à Wimereux les pics d'abondance larvaire sont de 3000 larves.m⁻² en 1995, et de 480000 larves.m⁻² en 1996 (Lefebvre & Davoult, 2000). En outre, le suivi de l'indice gonadique à Wimereux indique des diminutions ponctuelles, de faible importance comparée à la ponte principale mais de la même importance que la ponte globale à Roscoff (Lefebvre *et al.*, 1999). Ces diminutions peuvent correspondre à des événements de pontes secondaires et contribuerait au recrutement global à Wimereux, accentuant les différences de fonctionnement

démographique entre Roscoff et Wimereux. En admettant que de telles variations de densité du nuage larvaire se retrouvent d'année en année, elles peuvent contribuer aux importantes différences observées dans les niveaux de recrutement entre les deux sites, selon un schéma classique de 'supply-side ecology' qui accorde un rôle prépondérant à la phase larvaire sur la variabilité et la structure des populations benthiques (Rougharden *et al.*, 1988; Underwood & Fairweather, 1989). Dans ce contexte, les interactions juvéniles-adultes prennent toute leur importance, afin de limiter les pertes de larves et augmenter le succès de recrutement. De telles interactions, morphologiques et comportementales, ont d'ailleurs été mises en évidence chez *O. fragilis* au moment du recrutement (Morgan & Jangoux, 2004) de même que par la suite des comportements de protection des juvéniles dans les fentes bursales des adultes.

Des prélèvements planctoniques effectués fin mai 2004 révèlent des densités de 255 larves.m⁻² au dessus de la population de Lyna's Point, en Mer d'Irlande (Sagarduy Casal & Comtet, 2006). Cette densité est supérieure à la densité maximale observée à Roscoff. Deux hypothèses sont alors envisageables : (i) cette présence larvaire correspond au maximum annuel et il existerait donc un décalage temporel de la maturité gonadique entre Manche et Mer d'Irlande (ii) cette présence correspond à une ponte secondaire et la population de Lyna's Point pourrait présenter un fonctionnement semblable à celui de Wimereux avec plusieurs événements de recrutement consécutifs par année. Compte tenu du fait que la maturité gonadique et la ponte sont reconnues pour être dépendantes de la température du milieu (Giese & Pearse, 1974), il semble peu vraisemblable que celles-ci aient lieu deux mois plus tôt en Mer d'Irlande alors que les températures sont, en mai, deux à trois degrés inférieures à celles de la Manche. L'hypothèse d'une ponte secondaire, comme à Wimereux, est donc plus probable. Le fonctionnement démographique observé à Wimereux pourrait alors se retrouver dans d'autres sites.

Au final, au moins deux types de fonctionnement démographique semblent exister au sein de l'espèce *O. fragilis* : des populations avec plusieurs recrutements dans l'année, dont au moins un de très forte importance, comme à Wimereux et peut-être Lyna's Point, et des populations avec des recrutements de faible ampleur, dont le renouvellement se ferait beaucoup plus lentement ou en fonction d'événements reproductifs plus chaotiques, comme à Roscoff ou Paluel. Cependant, la stabilité de ces deux types de populations semble pouvoir être assurée par l'autorecrutement (Ellien, 2001). Les phénomènes de régulation de la densité sont sans doute propre à chaque population, en accord avec le modèle de Carroll (Figure III.30; Carroll, 1996). Quand les apports larvaires sont faibles (Roscoff ou Paluel), la

mortalité des recrues ne dépendrait pas de leur densité et la taille de la population adulte reflèterait quasi-intégralement les schémas de recrutement: il y aurait une relation linéaire entre la densité des recrues et la densité des adultes. A l'inverse, quand les apports larvaires sont forts et saturent la capacité de charge du milieu, la mortalité des recrues deviendrait densité-dépendante et, dans ce cas, la densité des géniteurs résulterait de mécanismes postérieurs au recrutement.

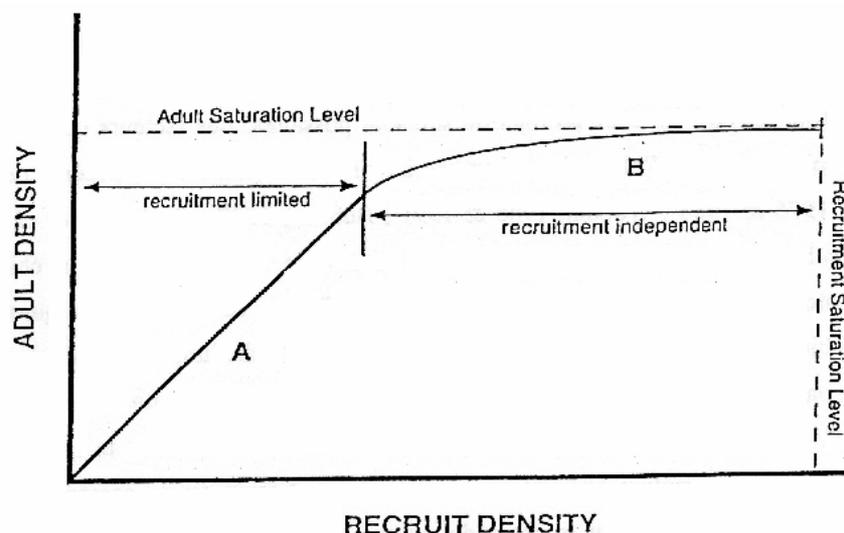


Figure III.30. Modèle descriptif montrant la relation idéale entre le recrutement et la densité des adultes pour une espèce à cycle benthopélagique. La partie A de la courbe reflète le cas où les apports larvaires sont faibles et conditionnent la taille de la population adulte. La partie B illustre le cas où les apports larvaires sont forts et saturent la capacité de charge du milieu; dans ce cas, la densité des adultes résulte de mécanismes postérieurs au recrutement (Carroll, 1996).

Enfin, des prélèvements planctoniques ont été effectués en 2004 au milieu de la Manche (front d'Ouessant) et de la Mer d'Irlande (front Celtique) et révèlent des densités de 10 larves.m⁻² (Sagarduy Casal & Comtet, 2006). La présence de ces larves dans ces zones éloignées des populations denses témoigne de la connectivité potentielle entre populations assurée par la phase larvaire, même si cette proportion est faible. Le suivi de la succession des stades larvaires suggère que les larves ont des origines spatio-temporelles différentes. En effet, l'apparition de larves à six et huit bras en juillet 2005 à Roscoff, de même qu'à Wimereux en 1996 (Lefebvre & Davoult, 2000), sans observation de larves à deux ou quatre bras précédemment, laisse supposer l'existence d'apports larvaires allochtones. Ainsi, si les résultats de modélisation (Ellien, 2001) laissent supposer que l'autorecruement peut être le procédé majeur du renouvellement des populations d'*O. fragilis*, des apports extérieurs participent vraisemblablement à la composition globale de chaque population, ce qui confirme les suppositions faites à partir des résultats génétiques.

Chapitre III.4. Variabilité génétique des cohortes d'*O. fragilis* au sein de deux populations

Même si ce n'est pas la règle, il semble que la différenciation génétique locale des populations d'invertébrés marins soit plus répandue que ce que leur forte capacité de dispersion laisse généralement supposer (Palumbi, 2003). Les variations génétiques à fine échelle spatiale chez des espèces présentant un important potentiel dispersif peuvent s'expliquer par des comportements actifs de rétention des larves (Kordos & Burton, 1993; Todd *et al.*, 1998). Certaines études révèlent aussi des hétérogénéités dans la composition génétique des recrues (Johnson & Black, 1984; Hedgecock, 1994; David *et al.*, 1997; Palumbi, 2003).

Les résultats génétiques obtenus à grande échelle spatiale laissent supposer que des mécanismes de structuration locale pourraient exister chez *O. fragilis*. Une étude portant sur la différenciation génétique des cohortes a donc été effectuée pour les populations de Roscoff et de Wimereux. Lors du suivi démographique, de jeunes recrues et des larves ont été mises de côté et séquencées afin de préciser la composition génétique de ces différents stades. Les effectifs d'individus séquencés pour les différentes cohortes sont présentés dans le tableau III.18.

Tableau III.18. Echantillons de larves, de juvéniles et d'adultes d'*O. fragilis*, récoltés au cours du suivi temporel des populations de Roscoff et Wimereux.

	Stade	Année	Code	n		Stade	Année	Code	n
Roscoff	Adulte	2004	AR04	33	Wimereux	Adulte	2004	AW04	28
	Juvenile	2004	JR04	7		Juvenile	2004	JW04	13
	Juvenile	2005	JR05	12		Juvenile	2005	JW05	15
	Larve	2005	LR05	53		Juvenile	2006	JW06	9

1. Résultats

Les diversités haplotypiques et nucléotidiques sont du même ordre de grandeur entre les huit échantillons ($0,993 < Hd < 1$; $0,009 < \pi < 0,013$) et proches de celles trouvées sur l'ensemble des échantillons d'*O. fragilis* analysés durant cette étude.

Les résultats de l'AMOVA effectuée pour tester l'effet cohorte sont présentés dans le Tableau III.19. Bien que plus de 90% de la variance génétique soit associé au niveau intracohorte, la part de la variance associée à la subdivision en cohortes est significative, avec une valeur d'indice de fixation assez conséquente ($\Phi_{SC} = 0,047$).

Tableau III.19. Analyse hiérarchique de la variance génétique mitochondriale basé sur l'indice de fixation ϕ_{st} à partir d'une subdivision des populations en cohortes (Amova réalisée avec le logiciel Arlequin).

	Degré de liberté	Somme des carrés	% de variance totale	Indices de fixation	p-value
Effet cohorte					
Entre populations	1	13,02	1,75	0,017	0,16
Entre cohortes d'une même population	6	39,38	4,65	0,047	<0,001
Au sein d'une cohorte	164	552,79	93,6	0,064	<0,001

Les valeurs de différenciation génétique par paire de populations ϕ_{st} estimées entre les différentes cohortes de Roscoff d'une part, et de Wimereux d'autre part sont présentées dans le Tableau III.20. A Roscoff, seule une valeur de ϕ_{st} est significative. A l'inverse, quatre de ces six valeurs sont hautement significatives à Wimereux.

Tableau III.20. Valeurs de différenciation génétique par paire ϕ_{st} obtenues sur les données de séquençage entre les différentes cohortes à Roscoff et Wimereux.

*p < 0,05 ; ***p < 0,001

Roscoff		JR04	LR05	JR05
	LR05	0.034*		
	JR05	0.026	0.003	
	AR04	0.001	0.011	-0.014
Wimereux		JW04	JW05	JW06
	JW05	-0.010		
	JW06	0.127*	0.077***	
	AW04	0.159***	0.103***	0.027

Les résultats des tests sont renforcés par les observations de la Figure III.31. Elle représente la contribution relative des trois groupes d'haplotypes (A, B et C) identifiés sur l'arbre de NJ, réalisé sur l'ensemble des individus puis condensé (Figure III.30), en fonction des différentes cohortes pour Roscoff et Wimereux. Les différences dans les proportions de ces trois groupes sont nettement plus prononcées entre cohortes qu'elles ne l'étaient entre les groupes géographiques.

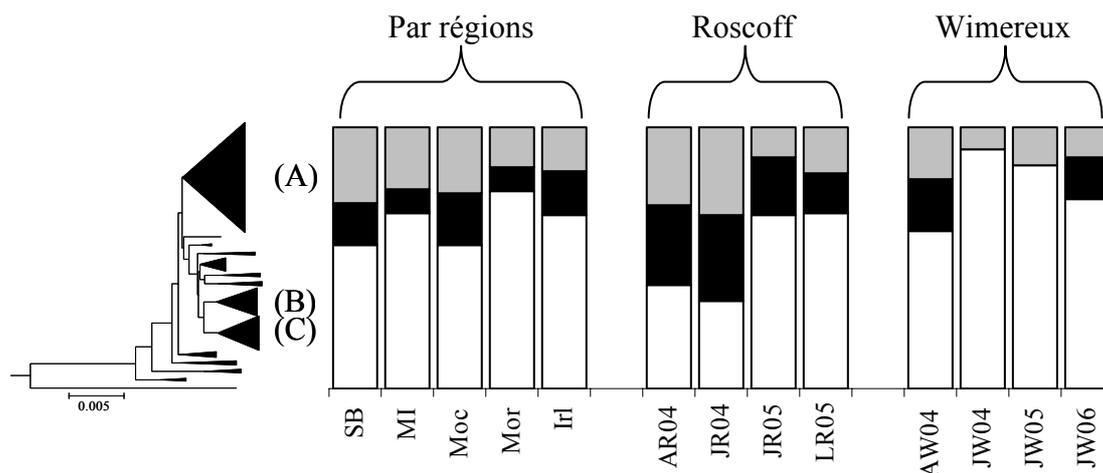
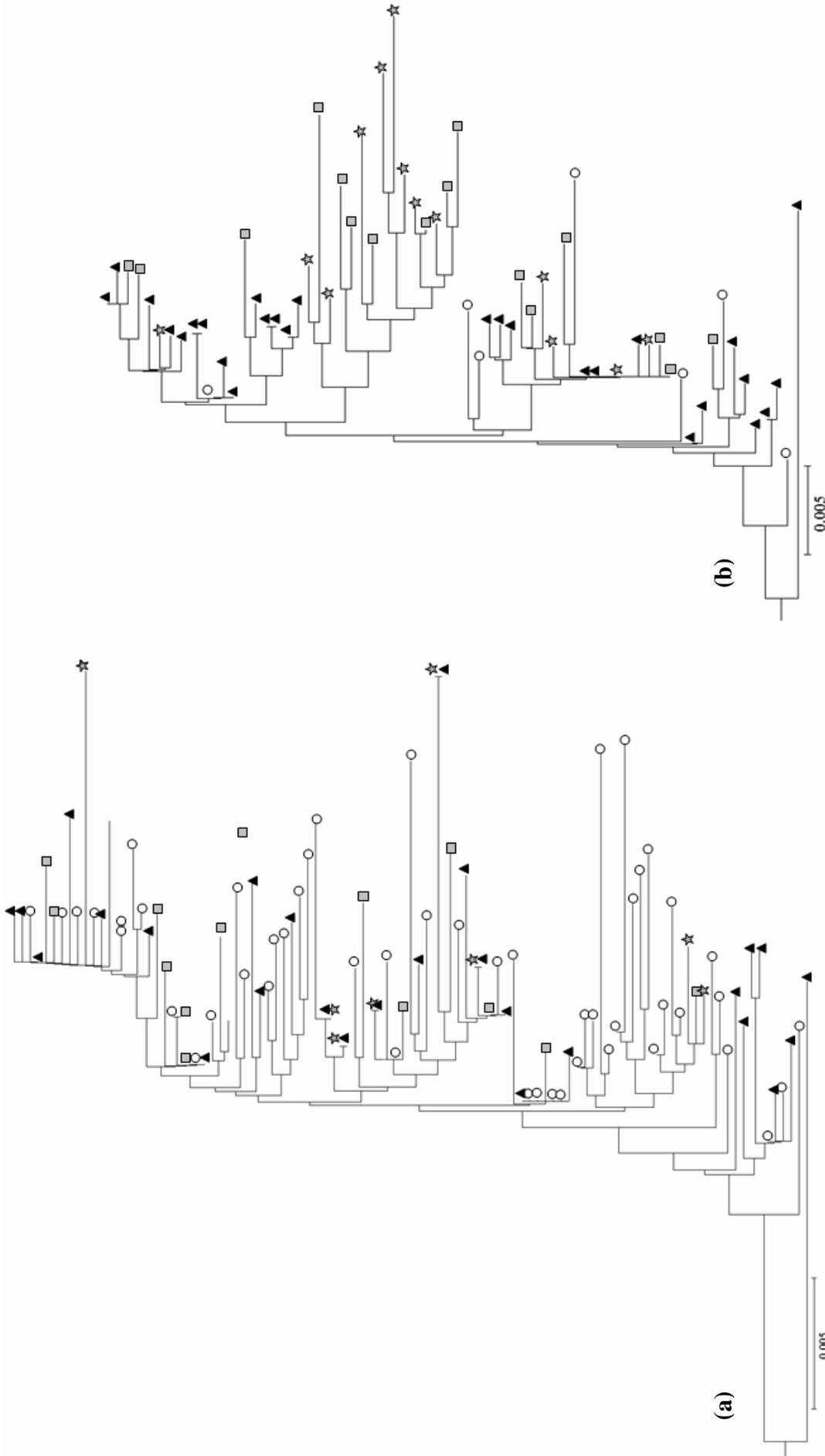


Figure III.31. Les trois principaux groupes identifiés suite à la compression du NJ basé sur les distances entre individus (Figure III.13, rappelé en miniature ci-dessus) sont quantifiés par groupes et indiqués pour les différentes régions géographiques (rappel de la Figure III.14, à titre de comparaison) et pour les différentes cohortes (groupe A en blanc, B en noir et C en gris)

Les relations entre les haplotypes échantillonnés dans les différentes cohortes sont représentées par des arbres NJ (Figure III.32). Les différentes lignées mitochondriales apparaissent beaucoup plus mélangées entre les différentes cohortes (larves, juvéniles & adultes) à Roscoff qu'à Wimereux suggérant que les individus recrutés puissent avoir des origines diverses selon la période de recrutement.



Figures III.32. Arbres NJ basés sur les distances par paire entre haplotypes pour les différentes cohortes d'*O. fragilis* à Roscoff (a) et Wimereux (b). Les arbres sont enracinés par un haplotype de Méditerranée. Les triangles noirs symbolisent les échantillons d'adultes de 2004 pour les deux sites. A Roscoff, les cercles blancs symbolisent les larves d'août 2005, les étoiles et les carrés gris les juvéniles de 2004 et 2005 respectivement. Pour Wimereux, les étoiles grises, les carrés gris et les cercles blancs symbolisent les juvéniles de 2004, 2005 et 2006 respectivement.

2. Discussion

Au vu de ces résultats, l'hypothèse d'un effet Wahlund temporel semble pouvoir justifier une part importante de la structure génétique observée au sein des populations d'*O. fragilis*. L'AMOVA qui teste l'effet temporel montre qu'une part significative de la variance génétique est associée aux différences qui existent entre cohortes au sein d'une même population. Compte tenu du peu de valeurs de différenciation significatives entre paire de populations géographiques sur la base des données mitochondriales, ces cinq valeurs significatives entre cohortes témoignent vraisemblablement que le phénomène est non négligeable. Ces différences génétiques entre cohortes apparaissent néanmoins moins marquées à Roscoff qu'à Wimereux. Ainsi seule une sur six des valeurs ϕ_{st} de différenciation génétique par paire de populations est significative à Roscoff contre quatre à Wimereux. Cette variabilité dans la composition génétique des cohortes peut avoir des origines diverses. L'une des principales hypothèses retenues pour expliquer la structuration génétique locale des populations est celle d'une sélection qui s'exercerait durant les premiers stades de vie et qui diminuerait la diversité génétique des larves et des recrues au cours du temps du fait de survies différentielles entre génotypes (Johnson & Black, 1982; Johnson & Black, 1984; Watts *et al.*, 1990; Moberg & Burton, 2000). L'absence d'individus de la lignée (B) parmi les juvéniles de Wimereux en 2004 et 2005 alors que celle-ci est représentée chez les adultes de 2004 pourrait appuyer cette hypothèse d'une sélection différentielle pendant les premiers instants de vie pélagique et/ou benthique. Néanmoins, les diversités haplotypiques des juvéniles et des adultes sont du même ordre, minimisant ainsi l'hypothèse d'une sélection. L'absence de la lignée (B) peut également être le témoin d'un effet de dérive génétique, en accord avec l'hypothèse de Hedgecock (1994) : seule une fraction de la population adulte constituerait le groupe de reproducteurs efficaces, ce qui induirait un biais d'échantillonnage aléatoire dans le lot de gènes transmis à la génération suivante et serait donc responsable des différences entre les cohortes. Une étude récente tend néanmoins à modérer cette hypothèse à cause de l'absence de mise en évidence d'un tel biais d'échantillonnage au sein des adultes reproducteurs en milieu naturel (Flowers *et al.*, 2002).

Une autre hypothèse pour expliquer cette structuration locale repose sur l'origine des larves. Les apports allochtones sont fonction de la direction et de l'intensité des courants ; une signature génétique variable entre cohortes pourrait alors simplement être la signature d'une disparité géographique des larves. Néanmoins, les modélisations de dispersion larvaire (Ellien, 2001) tendent à soutenir l'hypothèse que l'autorecrutement serait la principale source de renouvellement des populations. Ainsi, même si des apports allochtones de provenances

diverses contribuent aux différences génétiques, ce n'est sans doute qu'un mécanisme secondaire dans la mise en place d'une structure intrapopulation. En fait, au vu des récents développements de modèles concernant les attendus génétiques pour une métapopulation, ce n'est pas tant l'origine des migrants qui semble avoir une importance sur la structure génétique mais la vitesse et la stochasticité des mécanismes de renouvellement des populations (Pannell & Charlesworth, 2000). Des renouvellements importants et conséquents entraîneraient en fait une diminution importante de la taille efficace des reproducteurs et donc une augmentation des effets de dérive génétique au sein de chaque population, rejoignant par là les attendus de l'hypothèse d'Hedgcock (1994). Ainsi les différences entre cohortes, plus prononcées à Wimereux qu'à Roscoff, pourraient très bien s'expliquer par le fonctionnement démographique. Comme le renouvellement des populations est très rapide à Wimereux (en moins de deux ans, vraisemblablement), il n'y a peut-être pas assez de temps pour homogénéiser le pool d'adultes matures entre deux années successives, induisant ainsi des variabilités entre cohortes successives. En effet, les adultes d'*Ophiothrix* sont matures à partir de 5 mm de diamètre de disque (Lefebvre, 1999), soit dans le courant de leur seconde année ; les croisements inter-cohortes à Wimereux doivent donc être assez limités. A Roscoff, le renouvellement de la population étant plus lent, les adultes contribuent probablement à plusieurs événements de reproduction et vont ainsi contribuer à l'homogénéisation de la composition génétique des cohortes. Ainsi les variations spatiales du fonctionnement démographique semblent avoir une incidence sur la signature génétique locale. Enfin, un schéma d'isolement par le temps (Hendry & Day, 2005) est envisageable, surtout pour une population d'*O. fragilis* comme celle de Wimereux où des événements de ponte secondaire sont observés (Lefebvre, 1999). L'héritabilité des périodes de reproduction permettrait d'expliquer l'effet Wahlund observé ainsi que son maintien dans le temps.

Au final, les événements de recrutement constituent vraisemblablement une phase clé dans la structuration génétique des populations d'*O. fragilis*. La variance génétique due aux différences entre cohortes semble suffisante pour masquer la part de la structure génétique liée aux événements de migration. Ainsi, malgré une capacité de dispersion importante, il semble que la migration longue distance ne soit pas nécessairement réalisée ; l'homogénéisation spatiale à grande échelle ne serait donc pas aussi effective que précédemment pensée.

Synthèse

L'espèce *O. fragilis* présente une phase dispersive longue et vit sur des fonds caillouteux qui forment un quasi-continuum d'habitats favorables sur les côtes de l'Atlantique Nord Est. De ce fait, les flux de migrants étaient supposés suffisamment nombreux et efficaces pour pouvoir homogénéiser la structure génétique de l'espèce sur une grande échelle spatiale. Des degrés de structure génétique importants ont, à l'inverse, été mis en évidence. L'existence de lignées cryptiques au sein de l'espèce, révélée par les travaux de Baric & Sturmbauer (1999), est ainsi appuyée par les présents résultats ; les limites de la répartition géographique de ces lignées sont néanmoins modifiées. La lignée méditerranéenne se retrouve ainsi aussi sur les côtes de la péninsule ibérique; l'autre lignée est présente sur les côtes bretonnes et celles de la Manche. Cette seconde lignée est celle qui a fait l'objet de notre attention. L'histoire de la colonisation de la zone d'étude par cette lignée semble assez délicate à retracer mais la lignée semblerait avoir survécu au dernier maximum glaciaire au nord, dans une zone proche de la Manche. Cette lignée se subdivise en deux variétés écotypiques, l'une vraisemblablement adaptée à une vie subtidale grégaire et l'autre à des habitats intertidaux. L'existence de ces variétés induit donc un second niveau de structure génétique au sein de l'espèce, néanmoins relativement faible. Au final, le plus important degré de structure génétique semble être le reflet de processus locaux. En effet, malgré une phase larvaire longue et un continuum d'habitat favorable, une relation simple entre dispersion théorique et connectivité effective des populations ne semble pas applicable. Les profils d'isolement géographique semblent masqués par des processus locaux, tels que des effets Wahlund temporels. Le fonctionnement démographique d'*O. fragilis* montre d'importantes disparités entre sites. Si l'ensemble des populations semblent stables, il existe une importante variabilité dans leur fonctionnement démographique : certaines populations présentent des variations interannuelles importantes (avec un événement de recrutement conséquent et efficace seulement tous les deux ou trois ans) alors que d'autres populations, plus rares, montrent un renouvellement rapide et conséquent chaque année. Ces différences de fonctionnement démographique semblent jouer un rôle dans les différenciations génétiques observées entre populations, justifiant en partie le schéma global observé de structure génétique chaotique en agrégats.



L'objectif premier de cette thèse était de développer une approche comparative entre deux espèces d'ophiures aux caractéristiques biologiques contrastées, afin de mieux comprendre certains des mécanismes qui définissent et maintiennent l'organisation spatiale des populations. Le faible pouvoir de dispersion d'*Acrocnida brachiata* laissait supposer un modèle d'isolement par la distance assez prononcé tandis que la capacité de dispersion et de colonisation d'*Ophiothrix fragilis*, supposée importante, laissait envisager un modèle en îles. Les attendus de départ concernant la structure génétique de ces deux espèces étaient suffisamment tranchés pour nous permettre, qu'ils soient observés ou non, d'apprécier un tant soit peu le rôle de l'habitat et/ou de la phase larvaire sur la structure des populations. Dans cette discussion générale, nous tâcherons donc de voir en quoi, en terme de comparaisons inter-spécifiques, les résultats diffèrent et en quoi ils se rejoignent.

1. Notion d'espèce

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse sont une illustration supplémentaire de la difficulté de définir une espèce. Si la définition typologique est privilégiée, l'espèce *A. brachiata* constitue une espèce vraie où l'homogénéité morphologique n'est remise en cause que pour les individus de Méditerranée (Massé, 1971; Picard, 1986). La découverte de lignées cryptiques force par contre à reconsidérer le statut biologique de cette espèce. La présence d'hybrides indique que l'isolement reproducteur entre lignées n'est pas complet, mais les croisements sont rares et/ou fortement contre-sélectionnés et ne se font clairement pas de façon aléatoire entre les deux lignées. Le terme le plus approprié est alors celui de semi-espèces ou complexe d'espèces cryptiques.

A l'inverse, l'espèce *O. fragilis* est polytypique, avec une telle diversité de formes et de couleurs qu'elle pourrait constituer un complexe d'espèces morphologiques. Au vu de l'absence de différenciation génétique mitochondriale, les individus de toutes les populations semblent pouvoir se reproduire entre eux sans barrière particulière validant ainsi le statut d'espèce biologique. Certaines caractéristiques morphologiques d'*O. fragilis* peuvent apparaître comme des adaptations. Ainsi, les individus sombres aux bras courts semblent mieux adaptés au camouflage, ce qui leur permet de vivre isolés et dans des habitats plus éclairés. Au contraire, les individus colorés, aux bras longs et graciles, semblent mieux adaptés à une vie en bancs denses et en profondeur. Dans ce cas, le concept écologique (Van Valen, 1976) pourrait prendre tout son sens, avec des variétés qui constitueraient des écotypes présentant des allèles mieux adaptés à certains locus.

2. Histoire évolutive des espèces

2.1. L'histoire évolutive de ces espèces à la transition Mio-Pliocène

L'analyse de la variabilité mitochondriale chez ces deux espèces a mis en évidence des profondes divergences, de l'ordre de 19,6% et 18,6% respectivement chez *A. brachiata* et *O. fragilis*. L'existence d'une telle divergence avait été envisagée au vu des résultats obtenus chez d'autres espèces du même peuplement (Rigal, 2005; Jolly *et al.*, 2006) dans le cas d'*A. brachiata* et, au vu des travaux de Baric & Sturmbauer (1999) dans le cas d'*O. fragilis*. De manière surprenante, l'ensemble de ces événements de spéciation ayant conduit à ces divergences semble s'être déroulé dans un intervalle de temps relativement similaire, aux environs de la transition Mio-Pliocène. Du fait de la complexité et de l'ancienneté des mécanismes, il n'est certes pas possible d'établir un scénario précis, de même que l'approximation des datations ne permet pas de statuer sur le fait que ces divergences puissent être réellement synchrones (à quelques milliers d'années près) ou non. La transition Mio-Pliocène correspond néanmoins à une période géologique connue comme une période de bouleversements majeurs de la morphologie des continents, du niveau des océans et du régime climatique, en Europe de l'Ouest (Haq *et al.*, 1987; Meulenkamp & Sissingh, 2003; Brault *et al.*, 2004) mais également au niveau de la jonction Atlantique/Méditerranée, avec la crise Messinienne (Hsü *et al.*, 1973; Rouchya & Caruso, 2006). L'ensemble de ces perturbations a visiblement eu de nombreuses incidences sur les phénomènes de spéciation, aussi bien en milieu terrestre (Van der Made *et al.*, 2006) qu'en milieu dulçaquicoles (Doadrio & Perdices, 2005; Trontelj *et al.*, 2005). Il est donc probable que ce soit également le cas en milieu marin comme semblent le montrer nos données et d'autres études (Remerie *et al.*, 2006). Comme le souligne Knowlton (2000), le milieu marin regorge d'espèces cryptiques, principalement du fait de problèmes d'identification. Il est envisageable que les divergences inter-espèces diagnostiquées en milieu terrestre datant d'environ cinq millions d'années puissent être retrouvées par la suite en milieu marin au niveau intra-spécifique, renforçant ainsi l'idée que les importants bouleversements géologiques à la transition Mio-Pliocène ont eu une incidence vaste sur le vivant. Cette influence semble se confirmer à travers les résultats obtenus pour ce qui est des peuplements de sables fins, mais ne se limiterait pas à cet habitat et engloberait une bonne partie du milieu marin. Dans le cas de certaines espèces des peuplements de sable-fins, des mécanismes de spécialisation écologique ont vraisemblablement renforcé l'isolement allopatrique : les lignées d'*A. brachiata*, celles d'*Owenia fusiformis* (Jolly *et al.*, 2006) et les deux espèces de *Sabellaria* (Rigal, 2005)

présentent en effet un étagement bathymétrique différent. La remise en contact secondaire des lignées, après la divergence allopatrique initiale, aurait probablement pu avoir pour effet de placer chaque lignée dans un habitat différent, habitat auquel les lignées étaient plus ou moins adaptées en fonction de la zone où elles ont vécu durant le laps de temps nécessaire à la spéciation (par exemple, un développement initial de certaines lignées dans un environnement saumâtre pourrait faciliter par la suite leur survie en milieu intertidal). De tels événements de spécialisation à l'habitat pourraient néanmoins être beaucoup plus récents.

2.2. L'histoire évolutive de ces espèces depuis le dernier maximum glaciaire

Les derniers événements glaciaires semblent avoir eu une incidence sur la distribution actuelle de ces deux espèces. La présence d'une calotte glaciaire jusqu'au sud des îles britanniques durant le dernier maximum glaciaire (LGM) a vraisemblablement contraint les distributions selon deux stratégies : (1) un déplacement de l'aire de distribution de l'espèce dans une zone plus au sud, là où les conditions correspondent le mieux à son optimum écologique ou (2) une survie dans un refuge péri-glaciaire, petite partie de l'aire d'origine, dépourvue de glace, où les conditions sont plus clémentes (Stewart & Lister, 2001). Tandis que la lignée S d'*A. brachiata* semble avoir persisté au sud, le scénario le plus probable retenu pour la lignée I et pour l'espèce *O. fragilis* consiste en une survie dans un refuge périglaciaire. De la même manière, l'étude sur *P. koreni* et *O. fusiformis* révèle des stratégies différentes pour chaque lignée, avec une lignée ayant survécu dans un refuge au sud et l'autre lignée en zone périglaciaire (Jolly *et al.*, 2006). L'habitat n'apparaît donc pas comme un facteur très influant dans l'histoire glaciaire de ces espèces, puisque des espèces et même des lignées d'une même espèce, partageant le même habitat présentent des stratégies différentes. En fait, comme le suggèrent Hickerson & Cunningham (2006), la survie d'espèces tempérées dans des refuges au nord ne dépend pas tant de la nature du substrat sur/dans lequel elles vivent mais de leur capacité à s'adapter à un autre environnement. Ainsi des espèces généralistes en terme d'habitats auraient plus de chances de survivre à proximité de leur aire géographique d'origine. Le cas d'*O. fragilis* pourrait être une bonne illustration puisque cette espèce est effectivement présente sur des fonds à cailloutis, mais aussi des fonds de maërl, de coquillages et dans les infractuosités des roches. Une autre hypothèse pourrait être que les espèces plus tolérantes seraient plus à même de survivre dans un refuge au nord. Cette hypothèse pourrait partiellement expliquer les nombreux exemples de refuge au nord chez les espèces intertidales et permettrait même d'expliquer la mise en place d'un étagement bathymétrique des lignées, avec par exemple : la lignée I d'*A. brachiata* ainsi que les algues

Palmaria palmata (Provan *et al.*, 2005) et *Fucus serratus* (Coyer *et al.*, 2003), dont le refuge potentiel durant le LGM se situerait à l'extrémité occidentale de la Manche, le polychète *Sabellaria alveolata* semblant plutôt avoir trouvé refuge en Mer d'Irlande (Rigal, 2005). A l'inverse, les espèces subtidales, souvent moins tolérantes aux stress salins et thermiques (stress d'importance à proximité d'une calotte glaciaire), présenteraient un déplacement vers le sud. Ces hypothèses nécessitent des jeux de données beaucoup plus conséquents pour être validées mais constituent des pistes intéressantes pour mieux cerner les facteurs déterminants dans la répartition biogéographique des espèces (Hickerson & Cunningham, 2006).

2.3. Est-il possible de discerner processus historiques et processus contemporains ?

Les analyses génétiques conduites sur chacune des deux espèces fournissent, pour les deux, des valeurs de différenciation génétique opposées entre marqueurs allozymiques et marqueur mitochondrial. Il en résulte donc que, quel que soit le type d'habitat et le mode de dispersion larvaire, une seule et même structure est observée : pas de différenciation sur le mitochondrial et une différenciation marquée, mais chaotique, sur les allozymes. Les deux types de marqueur génétique ne tracent certes pas les mêmes types de processus (Parker *et al.*, 1998). Chez les deux espèces, la différenciation mitochondriale est essentiellement basée sur l'accumulation de mutations dans les populations (nombreuses différences nucléotidiques entre variants, induisant une forte diversité haplotypique, proche de 1) alors que la différenciation allozymique est fondée sur des différences dans les fréquences. Dès lors, l'important écart qui se retrouve chez les deux espèces dans les valeurs de différenciation calculées sur les deux types de marqueurs s'explique assez bien. Les valeurs de différenciation mitochondriale basée sur l'équilibre mutation/dérive, nulles pour la plupart, retrace l'histoire de colonisation relativement récente de la zone d'étude. L'expansion de ces espèces depuis leur refuge glaciaire vers des niches vides n'a pu se faire que depuis la fin du dernier maximum glaciaire (18000 ans) et probablement qu'une fois la Manche complètement ouverte (Smith, 1989). Celle-ci a sans doute été plus efficace après que les importants courants marins en Manche se soient mis en place, soit il y a moins de 7000 ans (Lambeck, 1997). L'histoire de la colonisation semble donc suffisamment récente pour que les accumulations de variants au sein des populations ne soient pas assez nombreuses pour entraîner des différenciations significatives entre les populations. A l'inverse, les valeurs de différenciation allozymique basées sur l'équilibre migration/dérive sont quasiment toutes significatives, et ce quelle que soit l'espèce. Un ensemble de facteurs contemporains semblent

interagir pour donner ces valeurs de différenciations fortes : les flux de gènes orientés, les phénomènes d'extinction/recolonisation, les effets Wahlund temporel et les événements d'hybridation sont autant de processus qui contribuent à cette forte structuration des populations. De la même manière, Addison & Hart (2004; 2005) décèlent d'importantes disparités entre les données de différenciation génétique sur un marqueur nucléaire et un marqueur mitochondrial chez l'oursin *Strongylocentrotus droebachiensis*, qu'ils expliquent par le cumul au niveau des marqueurs de l'histoire de la colonisation de l'Atlantique Nord et des phénomènes d'hybridation interspécifique. Ces auteurs insistent sur le fait que les deux types de marqueurs ne sont pas sensibles de la même manière aux processus historiques et contemporains, et que l'utilisation conjointe de deux marqueurs est essentielle pour pouvoir mieux faire la part des choses.

3. Connectivité des populations

Les flux de migrants s'interprètent différemment en terme de génétique des populations et en terme de dynamique des populations (Palumbi, 2003). Même des flux importants de migrants, au regard de la génétique, ne représentent qu'une très faible fraction de ce que doivent être les apports pour qu'une population se maintienne en terme de démographie. Théoriquement, l'existence d'un unique migrant par génération qui recrute dans une population et participe à la reproduction de celle-ci suffit à contrebalancer l'effet de dérive (Slatkin, 1987) ; en aucun cas, ce migrant ne peut cependant suffire à la pérennité de la population. Ces deux aspects de la connectivité entre populations seront donc abordés dans ce paragraphe et mis en relation avec la durée de phase larvaire.

3.1. Effet des flux larvaires sur la structure génétique des populations

Les valeurs de différenciation basées sur les données allozymiques sont quasiment toutes significatives, quelle que soit l'espèce. L'hypothèse de flux réduits entre populations d'*A. brachiata* semble assez vraisemblable du fait d'une phase larvaire brève ; par contre, cette hypothèse paraît beaucoup moins probable pour *O. fragilis* qui présente une phase larvaire de plus de trois semaines (McBride, 1907; Morgan & Jangoux, 2002). Le schéma d'une métapopulation unique à l'échelle de la Manche avec un renouvellement important des populations chaque année a été celui proposé par Ellien (2001) dans le cas d'*O. fragilis*. Compte tenu de l'importance et de la diversité des échanges au sein d'une métapopulation, le niveau de différenciation entre les populations devrait être faible (Harrison & Hastings, 1996). Néanmoins, quand le renouvellement des populations est important, les effets de dérive

génétique s'accélèrent, augmentant ainsi la différenciation génétique par rapport à un modèle en îles (Pannell & Charlesworth, 2000). D'autres espèces à phase larvaire longue dont la génétique des populations a été étudiée dans cette zone d'étude présente d'ailleurs une différenciation génétique plus faible à l'échelle de la Manche, suggérant une connectivité entre populations supérieure ou des efforts démographiques moindres : c'est le cas de *P. koreni* (Jolly *et al.*, 2003) et de *Crepidula fornicata* (Dupont *et al.*, 2003). Le niveau conséquent d'isolement entre certaines populations d'*O. fragilis* est donc contraire aux attendus et contraire à ce qui peut être observé chez d'autres espèces. Ces fortes valeurs de différenciation semblent devoir s'expliquer par des phénomènes de structuration temporelle des populations, avec des importantes différences génétiques entre cohortes, qui seraient potentiellement maintenues au sein des populations par des mécanismes d'isolement par le temps (Hendry & Day, 2005), comme il semble que ce soit le cas chez l'anguille (Maes *et al.*, 2006).

Outre les niveaux de différenciation forts rencontrés, malgré des durées de vie larvaire très différentes, les deux espèces présentent une même absence de profil d'isolement par la distance. L'absence de structure géographique chez *O. fragilis* souligne la puissance des phénomènes de structuration intrapopulation. En outre, les phénomènes d'isolement géographique ne s'observeraient qu'à partir de distances de deux à cinq fois supérieures, au moins, à la distance de dispersion de l'espèce (Palumbi, 2003) ; la Manche constituerait donc une échelle d'observation trop petite pour une espèce dont les larves peuvent théoriquement disperser sur 200 km. A l'inverse, Miller (1997) observe, chez une espèce de coraux, *Antipathes fiordensis*, avec un faible pouvoir dispersif et présentant une différenciation génétique marquée, une absence de profil d'isolement par la distance, qu'il explique par l'importance des phénomènes d'hybridation et de reproduction asexuée. De la même manière, la présence d'événements d'hybridation expliquerait pourquoi le facteur d'éloignement géographique est masqué chez *A. brachiata*. Au final, il apparaît que, dans le cas des deux espèces d'ophiures étudiées, les mécanismes de structuration intrapopulation sont suffisamment forts pour masquer l'effet de la durée de phase larvaire.

3.2. Structure démographique des populations

Les populations des deux espèces apparaissent, pour la plupart, démographiquement stables et ce, en dépit d'une importante variabilité interannuelle dans l'intensité du recrutement. En effet, un événement de recrutement conséquent seulement tous les deux ou trois ans semble suffisamment efficace pour assurer la pérennité des populations. Comme

l'ont montré les résultats de modélisation du transport larvaire (Lefebvre *et al.*, 2003), malgré une forte dispersion des larves, les concentrations retenues au dessus des populations d'*O. fragilis* sont suffisantes pour assurer la pérennité des populations en Manche, selon un schéma de populations fonctionnant majoritairement, mais pas exclusivement, grâce à l'autorecrutement. Les flux de migrants apparaissent donc secondaires pour assurer le fonctionnement démographique des populations d'*O. fragilis* et probablement encore plus pour une espèce présentant une faible durée de vie larvaire telle qu'*A. brachiata*. En outre, la régulation de la densité des populations semble en accord avec le modèle de Carroll (1996) : la densité des adultes dépendrait directement des apports larvaires quand ceux-ci sont faibles et résulterait de mécanismes de régulation densité-dépendante, postérieurs au recrutement (Gosselin & Qian, 1997), quand les apports larvaires sont importants (saturation de la capacité de charge du milieu). Le fonctionnement démographique des populations des deux espèces d'ophiures semble en accord avec celui de la plupart des espèces d'invertébrés benthiques (Rougharden *et al.*, 1988; Underwood & Fairweather, 1989) et ce, indépendamment de la durée de la phase larvaire (Eckert, 2003).

3.3. Fonctionnement global des populations

La majorité des populations semble pouvoir fonctionner grâce à l'autorecrutement (Ellien, 2001), avec un événement de recrutement efficace seulement tous les trois ou quatre ans. Compte tenu de la régulation intrinsèque de la population et de l'influence des paramètres extérieurs, la probabilité que les événements de recrutement soient synchrones entre populations est assez faible, renforçant ainsi l'idée qu'une partie non négligeable de la structure génétique puisse s'expliquer par la juxtaposition de cohortes génétiquement différenciées et être renforcée par des phénomènes de structuration temporelle des populations (Hendry & Day, 2005).

De plus, certaines populations présenteraient un recrutement conséquent chaque année, suffisant pour atteindre la capacité de saturation du milieu : au vu de nos observations, c'est le cas uniquement pour la population de Wimereux. Dans ce cas, les effets de dérive génétique sont extrêmement limités. A l'inverse, les importantes mortalités des larves (Rumrill, 1990) et celles associées aux mécanismes de régulation densité-dépendante des juvéniles (Gosselin & Qian, 1997) induiraient d'importantes pressions de sélection et prendraient toute leur importance dans la structuration des populations (Johnson & Black, 1984; Piertney & Carvalho, 1995). Au final, la durée de la phase larvaire ne semble pas être le facteur le plus

explicatif de la structure des populations observée, aussi bien en terme de génétique qu'en terme de dynamique, les mécanismes de structuration intrapopulation semblant prépondérants.

Contrairement aux définitions classiques de métapopulation qui insistent sur les phénomènes de renouvellement des populations (Smedbol *et al.*, 2002), Kritzer & Sale (2003) précisent que la définition d'une métapopulation ne doit pas uniquement dépendre de ce paramètre, notamment en milieu marin. Ils privilégient le fait que les populations locales doivent présenter des processus démographiques qui leur sont propres, indépendamment des autres populations, mais doivent également être démographiquement influencées, et ce de façon non triviale, par les apports extérieurs ; ils rejoignent en ce sens la définition initiale de Levins (1969). Les structures génétiques et démographique observées chez *O. fragilis* tendent à montrer que les populations de Manche se comportent comme une métapopulation au sens de Kritzer & Sale (2003), et non pas comme une métapopulation source-puits classique ; à l'inverse, un réseau de populations isolées chez *A. brachiata* rend plus cohérent les profils de structure observés.

Malgré des caractéristiques biologiques contrastées en terme d'habitat et de durée de vie larvaire, les deux espèces étudiées présentent, contre les attendus, d'importantes similitudes, soulignant ainsi le rôle crucial que joue à la fois les dynamiques locales et l'histoire des populations sur les schémas de structure observés à plus grande échelle, spatiale et temporelle.

4. Perspectives

4.1. Phylogéographie comparée

Les scénarii d'événements vicariants suspectés au sein des peuplements de sables fins par Jolly (2005) semblent se confirmer au vu de nos résultats sur *A. brachiata*. Des approches de phylogéographie comparée telles que décrits par Bermingham & Moritz (1998) constituent un outil pertinent pour mieux identifier les événements de vicariance et ainsi appréhender l'histoire, plus ou moins ancienne, des espèces et son rôle dans la structure actuelle des populations. Dans le cas d'*A. brachiata*, l'échantillonnage s'avère un facteur limitant dans l'interprétation des patrons de colonisation. Les scénarii proposés sont renforcés du fait qu'ils sont partagés par plusieurs espèces du même peuplement mais cela ne saurait néanmoins suffire. C'est pourquoi il paraît important de maintenir l'effort d'échantillonnage. Certaines zones paraissent de premier intérêt, afin de voir si le parallélisme entre profils de colonisation des différentes espèces est maintenu. Chez *P. koreni*, la colonisation de la Mer du Nord s'est

faite par la lignée qui a survécu dans un refuge périglaciaire (Jolly *et al.*, 2006). Si le même scénario se retrouve chez *A. brachiata*, alors la lignée I devrait être celle qui aurait pu recoloniser la Mer du Nord, ce qui serait assez surprenant puisque, en Mer du Nord, *A. brachiata* n'est présente qu'en milieu subtidal (Ursin, 1960). Les individus subtidaux du Dogger Bank sont-ils de la lignée I comme pousse à l'imaginer une histoire de colonisation cohérente entre taxons ou de la lignée S comme le laisserait supposer l'habitat et une spécialisation potentielle des lignées vis-à-vis de leur habitat respectif ? A l'autre extrémité de l'Europe, un échantillonnage plus conséquent des côtes de la péninsule ibérique et du Golfe de Gascogne serait aussi très intéressant. Les deux échantillons des côtes portugaises obtenus indiquent qu'ils sont de la lignée I : est-ce qu'il y a pu avoir une expansion géographique de la lignée I vers le sud après le LGM, ou est-ce que le refuge glaciaire se trouvait plus au sud qu'actuellement proposé ? Les côtes portugaises semblent d'ailleurs être le siège d'un mélange entre lignées pour les espèces du peuplement de sables fins : un mélange des deux clades de *P. koreni* est en effet présent sur les côtes portugaises alors que le clade 1 n'est pas présent au Sud de la Bretagne (Jolly *et al.*, 2006). Dans l'optique d'une phylogéographie comparée des espèces des sables fins, il paraît donc important de maintenir l'effort d'échantillonnage d'*A. brachiata* mais également des diverses espèces de Polychètes, *P. koreni* et *O. fusiformis*, étudiées par Jolly *et al.* (2006) et d'analyser celles d'autres espèces, notamment les principaux bivalves des peuplements de sables fins en Manche, les genres *Abra* et *Cutellus*. L'histoire évolutive post-LGM a également pu être retracée par l'étude du gène mitochondrial pour l'espèce *Sabellaria alveolata* à partir de populations allant des côtes marocaines aux côtes anglaises (Rigal, 2005) ; un échantillonnage parallèle de son espèce proche *S. spinulosa*, divergente de 20,6% et vivant en milieu subtidal, serait d'un grand intérêt en comparaison aux résultats obtenus sur *A. brachiata*, puisque ces espèces cumulent divergence et spécialisation bathymétrique. En parallèle à une augmentation du nombre d'échantillons et d'espèces, l'utilisation conjointe de plusieurs marqueurs génétiques nucléaires paraît également importante de même que celle des méthodes d'analyses nouvellement développées (Hickerson *et al.*, 2006).

4.2. Adaptation à l'habitat, selon les lignées ou les variétés

Sur l'ensemble des résultats, la relation la plus forte qui semble exister entre structure des populations et habitat n'est pas tant fonction des deux espèces, mais au sein de chaque espèce, entre lignées ou entre variétés. Ainsi, les deux lignées d'*A. brachiata* présentent une forte inféodation à l'habitat, avec une des deux lignées principalement présente dans le

domaine intertidal tandis que l'autre lignée occupe l'habitat subtidal. Les mécanismes qui ont permis l'émergence de ces deux lignées semblent de type allopatrique ; la spécialisation à l'habitat, dans la mesure où elle existe, serait donc postérieure à la séparation des lignées. Des expériences écophysiologiques telles que celles effectuées par Gardner & Thompson (2001) ou Edmands & Deimler (2004) seraient nécessaires pour déterminer si le maintien des lignées écotypiques d'*A. brachiata* est favorisé par des conditions environnementales contrastées et ainsi de mettre en évidence les adaptations de chaque lignée à son environnement. Une autre approche serait d'étudier le polymorphisme de gènes nucléaires impliqués dans la réponse aux stress.

De façon parallèle, les deux variétés d'*O. fragilis* présentent une préférence nette pour un type d'habitat. La variété *pentaphyllum* correspond aux populations denses du subtidal tandis que la variété *echinata* se retrouve préférentiellement dans des habitats intertidaux ou quand elle est présente en milieu subtidal, dans des habitats plus propices au camouflage. Une approche expérimentale en mésocosme pourrait là aussi permettre d'affiner notre compréhension des processus d'adaptation à l'habitat : de simples tests de survie des deux variétés, en aquarium, face à la dessiccation, aux variations de salinité et de température (principaux stress liés à l'émersion) ou à l'exposition à la lumière, donneraient des indications intéressantes sur la force de l'inféodation de chaque variété à un habitat. En outre, des expériences pourraient être menées sur le comportement d'agrégation des ophiures en fonction des variétés, à la manière de ce que Morgan & Jangoux (2004) ont mis en place sur les relations entre juvéniles et adultes.

4.3. Etude approfondie de la phase larvaire

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ne semblent pas vraiment en accord avec le postulat simple d'une phase larvaire longue suffisante pour assurer la connectivité entre populations et d'une phase larvaire courte suffisante pour l'empêcher. L'hétérogénéité temporelle des nuages larvaires d'une part, et les migrations d'adultes, d'autre part, jouent visiblement un rôle non négligeable dans la structure des populations. Il n'en reste pas moins que la phase larvaire constitue une étape clé dans les processus d'échanges entre populations qu'il serait intéressant d'étudier par divers approches :

*L'étude approfondie des larves d'*A. brachiata**

En fait, il s'agirait de réitérer les manipulations entreprises courant 2006 : stimulation de la ponte, croisement intra- et inter-lignée. Ceci permettrait de pouvoir estimer la durée de

vie larvaire de la lignée S. Les observations de développement larvaire effectuées par F. Gentil (présenté dans Muths *et al.*, 2006) l'ont effectivement été sur des pontes d'individus intertidaux, donc probablement de la lignée I. Des différences pourraient exister entre les deux lignées. Ces croisements permettraient, en outre, de chercher à savoir si il existe des phénomènes de fécondation préférentielle intra-lignée et de contre-sélection des hybrides. Le génotypage, en parallèle, de recrues échantillonnées *in situ* permettrait d'avoir une vue globale des processus de sélection qui pourraient s'effectuer sur les larves intra- et inter-lignées.

Le typage moléculaire des larves d'O. fragilis

Sur la base des haplotypes mitochondriaux, des différences génétiques existent entre les cohortes qui arrivent dans une population d'*O. fragilis*. Or, ce marqueur n'est pas forcément le mieux adapté pour étudier les flux entre populations ou entre générations. Développer de nouveaux marqueurs nucléaires présentant un polymorphisme intronique de longueur serait une approche intéressante pour étudier la structure à micro-échelle d'une population d'*O. fragilis*. Une comparaison de la diversité génétique du 'pool' larvaire local avec le 'pool' de recrues et d'adultes en place permettrait d'analyser plus finement les effets de dérive génétique et/ou de sélection sur la composition et l'évolution des populations. Les densités de larves d'*O. fragilis* observées certaines années sont très importantes (environ 500 fois supérieur à la densité d'adultes au sol; Lefebvre & Davoult, 2000), de même que les densités de recrues (jusqu'à 20 juvéniles observés sur un même adulte, en juin 2005, à Wimereux); les réductions conséquentes d'effectif à chaque niveau entraînent vraisemblablement des effets de sélection dont l'importance pourrait être primordiale dans l'organisation génétique intra-population. En outre, ces marqueurs introniques permettraient peut-être de détecter des signatures populationnelles plus marquées et donc, par des tests d'assignation, d'identifier l'origine des larves observées au-dessus des populations denses d'adultes et à l'extérieur également loin de celles-ci. Ce dernier point permettrait donc de valider, ou non, les hypothèses d'autorecrutement comme mécanismes majoritaires de renouvellement démographique, échafaudées à partir des résultats de modélisation.

D'une manière générale, une étude plus détaillée des mécanismes qui gouvernent la diversité génétique au moment du recrutement, avec un suivi temporel de ces mécanismes, permettrait d'appréhender beaucoup mieux la complexité du fonctionnement populationnel, que ce travail de thèse tentait d'aborder par une approche comparative.



A

- Addison JA & Hart MW (2004) Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) using microsatellites, *Marine Biology* 144: 243-251.
- Addison JA & Hart MW (2005) Colonization, dispersal, and hybridization influence phylogeography of North Atlantic sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*), *Evolution* 59: 532-543.
- Allain JY (1974) Ecologie des bancs d'*Ophiothrix fragilis* (Abildgaard) (Echinodermata, Ophiuroidea) dans le golfe normano-breton, *Cahiers de biologie marine* 15: 255-273.
- Arbogast BS & Kenagy GJ (2001) Comparative phylogeography as an integrative approach in biogeography, *Journal of Biogeography* 28: 819-825.
- Arndt A & Smith MJ (1998) Genetic diversity and population structure in two species of sea cucumber: differing patterns according to mode of development, *Molecular Ecology* 7: 1053-1064.
- Asmussen MA & Basten CJ (1994) Sampling theory for cytonuclear disequilibria, *Genetics* 138: 1351-1363.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*, Cambridge: Harvard university press.
- Avise JC, Nelson W, Arnold J, Koehn R & Williams G (1990) The evolutionary genetic status of Icelandic eels, *Evolution* 44: 1254-1262.
- Awadalla P, Eyre-Walker A & Smith JM (1999) Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA, *Science* 286: 2524-2525.

B

- Baer CF (1999) Among-locus variation in Fst: fish, allozymes and the Lewontin-Krakauer test revisited, *Genetics* 152: 653-659.
- Balch T & Scheibling RE (2000) Temporal and spatial variability in settlement and recruitment of echinoderms in kelp beds and barrens in Nova Scotia, *Marine Ecology Progress Series* 205: 139-154.
- Bandelt HJ, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies, *Molecular Biological Evolution* 16: 37-48.
- Baric S & Sturmbauer C (1999) Ecological parallelism and cryptic species in the genus *Ophiothrix* derived from mitochondrial DNA sequences, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 157-162.
- Barraclough Fell H (1966) The Ecology of Ophiuroids. Chapter 6. In: *Physiology of Echinodermata* (ed. Boolootian RAE), pp. 129-143. Wiley Interscience Publishers, New York.
- Battacharya CG (1967) A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components, *Biometrika* 23: 115-135.
- Bazin E, Glemin S & Galtier N (2006) Populations size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals, *Science* 312: 570-572.
- Berli P & Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in subpopulations using a coalescent approach, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 4563-4568.
- Belkhir k, Borsa P, Goudet J, Chikki L & Bonhomme F (2000) GENETIX 4.02, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bensch S, Irwin DE, Irwin JH, Kvist L & Akesson S (2006) Conflicting patterns of mitochondrial and nuclear DNA diversity in *Phylloscopus* warblers, *Molecular Ecology* 15: 161-171.

- Bermingham E & Lessios HA (1993) Rate variation of protein and mitochondrial DNA evolution as revealed by sea urchins separated by the Isthmus of Panama, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 2734-2738.
- Bermingham E & Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications, *Molecular Ecology* 7: 367-369.
- Bernardi G (2005) Phylogeography and demography of sympatric sister surfperch species, *Embiotoca jacksoni* and *E. lateralis* along the California coast: historical versus ecological factors, *Evolution* 59: 386-394.
- Bierne N (2001) *Barrières au flux génique en milieu marin : Sélection et dispersion larvaire dans la zone hybride des moules côtières Mytilus edulis et M. galloprovincialis*, Université de Montpellier II, 167.
- Bierne N, Bonhomme F & David P (2003) Habitat preference and the marine-speciation paradox, *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 1399-1406.
- Blanchet A, Chevalier C, Gaffet JD & Hamon D (2004) Bionomie benthique subtidale en Baie de Douarnenez, p. 51. Ifremer, Brest.
- Blondel J (1995) *Biogéographie : Approche écologique et évolutive*, Paris: Masson.
- Borsa P, Jousselin Y & Delay B (1992) Relationships between allozymic heterozygosity, body size, and survival to natural anoxic stress in the palourde *Ruditapes decussatus* L. (Bivalvia: Veneridae), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 155: 169-181.
- Bourgoin A (1987) *Ecologie et démographie d'Acrocnida brachiata (Montagu) (Echinodermata : Ophiuroidea) en baie de Douarnenez (Bretagne)* These 3eme cycle, Océanographie, Université de Bretagne occidentale, 146.
- Bourgoin A & Guillou M (1994) Arm regeneration in two populations of *Acrocnida brachiata* (Montagu) (Echinodermata: Ophiuroidea) in Douarnenez Bay, (Brittany: France): an ecological significance, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 184: 123-139.
- Braatz BV & Aubrey DG (1987) Recent relative sea-level change in eastern North America. In: *Sea-level fluctuation and coastal evolution* (ed. Nummedal D PO, Howard, JD), pp. 29-46. SEPM (Society for Sedimentary geology) Special publication n°41, Tulsa, Oklahoma.
- Brault N, Bourquin S, Guillocheau F, Dabard MP, Bonnet S, Courville P, Estéoule-Choux J & Stepanoff F (2004) Mio-Pliocene to Pleistocene paleotopographic evolution of Brittany (France) from a sequence stratigraphic analysis: relative influence of tectonics and climate, *Sedimentary Geology* 163: 175-210.
- Briggs J (1995) Global biogeography. In: *Developments in paleontology and stratigraphy*, p. 452. Elsevier, Amsterdam.
- Broom DM (1975) Aggregation behaviour of the brittle-star *Ophiothrix fragilis*, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 55: 191-197.
- Brun E (1969) Aggregation of *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard)(Echinodermata: Ophiuroidea), *Nytt Magasin for Zoologi (Norwegian Journal of Zoology)* 17: 153-160.
- Brylinski J, Dagault F, Davoult D, Lampert L, Meirland A, Delpech J, Maheux F & Vincent D (2006) Surveillance écologique et halieutique du site Electronucléaire de Paluel - Année 2005, p. 196. Ifremer.

C

- Cabioch L (1967) Résultats obtenus par l'emploi de la photographie sous-marine sur les fonds du large de Roscoff, *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 15: 361-370.
- Cabioch L (1968) Contribution à la connaissance des peuplements benthiques de la Manche Occidentale, *Cahiers de Biologie Marine* 9: 493-720.
- Cabioch L, Gentil F, Glaçon R & Retiere C (1977) Le Macrobenthos des fonds meubles de la Manche : distribution générale et écologie. In: *Biolog of benthic organisms* (ed. Keegan BF, O'Ceidigh P., Boaden, P.J.S.), pp. p 115-128. Pergamon press, Oxford.
- Caley M, Carr M, Hixon M, Hughes T, Jones G & Menge B (1996) Recruitment and the local dynamics of open marine populations, *Annual Review of Ecological System* 27: 477-500.

- Carroll ML (1996) Barnacle population dynamics and recruitment regulation in the southcentral Alaska, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 199: 285-302.
- Chassé CJM (1972) *Economie sédimentaire et biologique des estrans meubles des côtes de Bretagne*, Université Paris VI, 293.
- Chenuil A & Féral JP (2003) Sequences of mitochondrial DNA suggest that *Echinocardium cordatum* is a complex of several sympatric or hybridizing species : a pilot study. In: *Echinoderm research 2001* (ed. David F), pp. 15-21. Swets & Zeitlinger, Lisse.
- Connell J (1975) Some mechanisms producing structure in natural communities : a model and evidences from field experiments. In: *Ecology and evolution of communities*, pp. 460-490. Harvard University Press, Cambridge.
- Cowen RK, Lwiza KM, Sponaugle S, Paris CB & Olson DB (2000) Connectivity of marine populations: open or closed?, *Science* 287: 857-859.
- Cox BC & Moore PD (2000) *Biogeography : An ecological and evolutionnary approach*, (6th edition edn.), London: Blackwell Scientific Publications.
- Coyer JA, Peters AF, Stam WT & Olsen JL (2003) Post-ice age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Phaeophyceae; Fucaeeae) populations in Northern Europe, *Molecular Ecology* 12: 1817-1829.
- Cracraft J (1983) Species concept and speciation analysis. In: *Current ornithology* (ed. Johnston RF), pp. 159-187. Plenum press, New York.
- Cruz R, Carballo M, Conde-Padin P & Rolan-Alvarez E (2004) Testing alternative models for sexual isolation in natural populations of *Littorina saxatilis*: indirect support for by-product ecological speciation?, *Journal of Evolutionary Biology* 17: 288-293.
- Cunningham C & Collins T (1998) Beyond area relationships : extinction and recolonization in molecular marine biogeography. In: *Molecular approaches to ecology and evolution* (ed. DeSalle R SB), pp. 297-322. Birkhäuser Verlag, Basel.

D

- David P, Perdieu M, Pernot A & Jarne P (1997) Fine-grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*, *Evolution* 51: 1318-1322.
- Davoult D (1988) *Etude du peuplement des cailloutis à épibiose sessile et de la population d' Ophiothrix fragilis (Abildgaard) du détroit du Pas-de-Calais (France)* Thèse de doctorat, U.S.T. Lille Flandres Artois, 213 p.
- Davoult D, Gounin F & Richard A (1990a) Ecologie des bancs d' *Ophiothrix fragilis (Abildgaard) var. pentaphyllum* du détroit du Pas-de-Calais (Manche orientale). In: *Echinoderm research* (ed. De Ridder D, Lahaye & Jangoux), pp. 159-164. Balkema, Rotterdam.
- Davoult D, Gounin F & Richard A (1990b) Population dynamics and reproduction of *Ophiothrix fragilis (Abildgaard)* in the strait of Dover (English Channel), *Journal of experimental marine Biology and Ecology* 138: 201-216.
- DeWitt T, Sih A & Sloan Wilson D (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity, *Trends in Ecology & Evolution* 13: 77-81.
- Dinter WP (2001) *Biogeography of the OSPAR maritime area*, Bonn, Germany: Federal agency for nature conservation.
- Doadrio I & Perdices A (2005) Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (Cobitis, cobitidae) based on cytochrome b sequence data *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 484-493.
- Dufresne F, Bourget E & Bernatchez L (2002) Differential patterns of spatial divergence in microsatellite and allozyme alleles: further evidence for locus-specific selection in the acorn barnacle, *Semibalanus balanoides?*, *Molecular Ecology* 11: 113-123.
- Dupont L, Jollivet D & Viard F (2003) High genetic diversity and ephemeral drift effects in a recent and successful introduced mollusc (*Crepidula fornicata* : Gastropoda), *Marine Ecology Progress Series* 253: 183-195.

E

- Eckert GL (2003) Effects of the planktonic period on marine population fluctuations, *Ecology* 84: 372-383.
- Edmands S & Deimler JK (2004) Local adaptation, intrinsic coadaptation and the effects of environmental stress on interpopulation hybrids in the copepod *Tigriopus californicus*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 303: 183-196.
- Ellien C (2001) *Modélisation du transport larvaire en Manche et conséquences sur le recrutement d'invertébrés à cycle benthopélagique. Importance relative des processus biologiques et hydrodynamiques*, Université Paris VI, 179.
- Ellien C, Thiébaud E, Barnay AS, Dauvin JC, Gentil F & Salomon JC (2000) The influence of variability in larval dispersal on the dynamics of a marine metapopulation in the eastern Channel, *Oceanologica Acta* 23: 423-442.
- Ellis JR & Rogers SI (2000) The distribution, relative abundance and diversity of echinoderms in the eastern English Channel, Bristol Channel and Irish Sea, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 80: 127-138.
- Emson RH & Wilkie IC (1980) Fission and autotomy in Echinoderms, *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 18: 155-250.
- Eyre-Walker A (2006) Evolution. Size does not matter for mitochondrial DNA, *Science* 312: 537-538.

F

- Farke H & Berghuis EM (1979) Spawning, larval development and migration behaviour of *Arenicola marina* under field conditions in the western Wadden Sea, *Netherlands Journal of Sea Research* 13: 529-535.
- Féral JP, Poulin E, Derelle E, Gallardo S & Chambon C (1995) Genetic differentiation of *Echinocardium cordatum* as revealed by allozymes and RNA sequencing. In: *Echinoderm research 1995* (ed. Emson SC), pp. 41-42. Balkema, Rotterdam.
- Flowers JM, Schroeter SC & Burton RS (2002) The recruitment sweepstakes has many winners: genetic evidence from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*, *Evolution* 56: 1445-1453.
- Fourgon D (2006) *Etude intégrée (écologique, éthologique et morphologique) d'une symbiose interophiuridéenne dans l'écosystème corallien à Madagascar*, Université Libre de Bruxelles, 158 p.
- Fu YX & Arnold J (1992) Dynamics of cytonuclear disequilibria in finite populations and comparison with a two-locus nuclear system, *Theoretical Population Biology* 41: 1-25.

G

- Gage JD (1990) Skeletal growth bands in brittle stars: microstructure and significance as age markers, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 70: 209-224.
- Gaines SD & Bertness MD (1992) Dispersal of juveniles and variable recruitment in sessile marine species, *Nature* 360: 579-580.
- Gardner JPA & Thompson RJ (2001) The effects of coastal and estuarine conditions on the physiology and survivorship of the mussels *Mytilus edulis*, *M. trossulus* and their hybrids, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 265: 119-140.
- Geiger SR (1964) Echinodermata : larvae - Classes : Ophiuroidea et Echinoidea, *Conseil international pour l'exploration de la Mer Zooplankton*: 105.
- Gentil F (1976) *Distribution des peuplements benthiques en Baie de Seine* Thèse de 3ème cycle, Paris VI, 70 p.
- Gentil F, Irlinger JP, Elkaim B & Proniewski F (1986) Premières données sur la dynamique du peuplement macrobenthique des sables fins envasés à *Abra alba* de la baie de Seine orientale. *Actes de Colloques IFREMER* 4, 409-420.

- Gentil F & Zakardjian B (1990) Reproductive cycle of the ophiuroid *Acrocnida brachiata* (Montagu) in the Bay of Seine (English Channel). In: *Echinoderm Research* (ed. De Ridder C. DP, Lahaye M.C. & Jangoux M.), pp. 83-89. Balkema, Rotterdam.
- Giese A & Pearse J (1974) Introduction : general principles. In: *Reproduction of marine invertebrates* (ed. Pearse ACGJS), pp. 1-49. Academic press, New York.
- Gilpin M (1991) The genetic effective size of a metapopulation, *Botanical Journal of the Linnean society* 42: 165-175.
- Glémarec M (1969) *Les peuplements benthiques du plateau continental Nord-Gascogne* Thèse de doctorat, Paris, 167.
- Glémarec M & Menesguen A (1979) Functioning of a muddy sand ecosystem : seasonal fluctuations of different trophic levels and difficulties in estimating production of the dominant macrofauna species In: *Benthic Dynamics Symposium*, Savannah, Georgia.
- Goodacre SL (2006) Marathon mollusc migrations, *Heredity* 97: 1.
- Gosselin L & Qian P (1997) Juvenile mortality in benthic marine invertebrates, *Marine Ecology Progress Series* 146: 265-282.
- Goudet J (1995) FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics., *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- Goudet J (1999) PCA-Gene 1.2. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm>, Institute of Ecology, University of Lausanne.
- Grant J, Turner S, Legendre P, Hume T & Bell R (1997) Patterns of sediment reworking and transport over small spatial scales on an intertidal sandflat, Manujau Harbour, New Zealand, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 216: 33-50.
- Guille A (1964) Contribution à l'étude de la systématique et de l'écologie d'*Ophiothrix quinquemaculata* *Vie et Milieu* 15: 243-309.
- Guillou J (1980) *Les peuplements de sables fins du littoral Nord-Gascogne*, Université de Bretagne Occidentale, 209.
- Gysels ES, Hellemans B, Pampoulie C & Volckaert FAM (2004) Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea, *Molecular Ecology* 13: 403-417.

H

- Hall TA (1999) BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acid Symposium Series* 41: 95-98.
- Haq BU, Hardenbol J & Vail PR (1987) Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic, *Science* 235: 1156-1166.
- Harlay J, Gentil F & Davoult D (en prep.) Calcium carbonate and organic production of a dense population of the brittle star *Acrocnida brachiata* (Montagu): biogeochemical implications in a temperate coastal ecosystem.
- Harrison S & Hastings A (1996) Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure, *Trends in Ecology & Evolution* 11: 180-183.
- Hart MW, Byrne M & Johnson SL (2003) *Patiriella pseudoexigua* (Asteroidea : Asterinidae) : a cryptic species complex revealed by molecular and embryological analyses, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83: 1109-1116.
- Hart MW & Podolsky RD (2004) Mitochondrial phylogeny and rates of larval evolution in *Macrophiothrix* brittlestars, *Molecular and Phylogenetics Evolution* 34: 438-447.
- Hedgecock D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (ed. Beaumont (Ed.) CH), pp. 122-134, London.
- Hedrick PWH (1986) Genetic polymorphism in heterogeneous environments: a decade later, *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 17: 535-566.
- Hendler G, Baldwin CC, Smith DG & Thacker CE (1999) Planktonic dispersal of juvenile brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea) on a caribbean reef, *Bulletin of Marine Science* 65: 283-288.

-
- Hendler G & Miller JE (1991) Swimming ophiuroids - Real and imagined (Yanagisawa Y, Oguro, Suzuki & Motokawa) Balkema, Rotterdam.
- Hendler GL (2005) Two new brittle star species of the genus *Ophiothrix* (Echinodermata: Ophiuroidea: Ophiotrichidae) from coral reefs in the southern Caribbean Sea, with notes on their biology, *Caribbean Journal of Science* 41: 583-599.
- Hendry AP & Day T (2005) Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time, *Molecular Ecology* 14: 901-916.
- Hewitt G (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation, *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages, *Nature* 405: 907-913.
- Hickerson MJ & Cunningham CW (2005) Contrasting quaternary histories in an ecologically divergent sister pair of low-dispersing intertidal fish (*Xiphister*) revealed by multilocus DNA analysis, *Evolution* 59: 344-360.
- Hickerson MJ & Cunningham CW (2006) Nearshore fish (*Pholis gunnellus*) persists across the North Atlantic through multiple glacial episodes, *Molecular Ecology* en ligne.
- Hickerson MJ, Dolman G & Moritz C (2006) Comparative phylogeographic summary statistics for testing simultaneous vicariance, *Molecular Ecology* 15: 209-223.
- Holland PWH, Hacker AM & Williams NA (1991) A molecular analysis of the phylogenetic affinities of *Saccoglossus cambrensis* Brambell & Cole (Hemichordata), *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 332: 185-189.
- Hoskin MG (1997) Effects of contrasting modes of larval development on the genetic structures of populations of three species of prosobranch gastropods, *Marine Biology* 127: 647-656.
- Hsü KJ, Cita MB & Ryan WBF (1973) *The origin of the Mediterranean evaporites*, Washington, DC U.S. Govt. Printing Office.
- Hughes T, Baird A, Dinsdale E, Moltschanivskyj N, Pratchett M, Tanner J & Willis B (1999) Patterns of recruitment and abundance of corals along the Great Barrier Reef, *Nature* 397: 59-63.

I

- Innan H & Nordborg M (2002) Recombination or mutational hot spots in human mtDNA?, *Molecular Biological Evolution* 19: 1122-1127.

J

- Jarman SN, Ward RD & Elliott NG (2002) Oligonucleotide primers for PCR amplification of coelomate introns, *Marine Biotechnology* 4: 347-355.
- Jarnes P & Lagoda P (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back, *Trends in Ecology & Evolution* 11: 424-429.
- Johannesson K (2001) Parallel speciation: a key to sympatric divergence, *Trends in Ecology & Evolution* 16: 148-153.
- Johannesson K (2003) Evolution in *Littorina*: ecology matters, *Journal of Sea Research* 49: 107-117.
- Johnsen S (1997) Identification and localization of a Possible Rhodopsin in the Echinoderms *Asterias forbesi* (Asteroidea) and *Ophioderma brevispinum* (Ophiuroidea), *Biology Bulletin* 193: 97-105.
- Johnson MS & Black KD (1984) Pattern beneath chaos: the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet, *Evolution* 38: 1371-1383.
- Johnson MS & Black R (1982) Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria* sp., *Marine Biology* 70: 157-164.
- Jolly MT (2005) *Structures génétiques et histoires évolutives de polychètes inféodés aux sédiments fins envasés dans l'Atlantique Nord Est : les genres Pectinaria sp. et Owenis sp.*, Université Paris VI, 206.
- Jolly MT, Jollivet D, Gentil F, Thiébaud E & Viard F (2005) Sharp genetic break between Atlantic and English Channel populations of the polychaete *Pectinaria koreni*, along the north coast of Brittany, France, *Heredity* 94: 23-32.

- Jolly MT, Viard F, Gentil F, Thiebaut E & Jollivet D (2006) Comparative phylogeography of two coastal polychaete tubeworms in the North East Atlantic supports shared history and vicariant events, *Molecular Ecology* 15: 1841-1855.
- Jolly MT, Viard F, Weinmayr G, Gentil F, Thiebaut E & Jollivet D (2003) Does the genetic structure of *Pectinaria koreni* (Polychaeta : Pectinariidae) conform to a source-sink metapopulation model at the scale of the Baie de Seine?, *Helgoland Marine Research* 56: 238-246.

K

- Karl SA & Avise JC (1992) Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs, *Science* 256: 100-102.
- Keegan BF & Mercer JP (1986) An oceanographical survey of Killary Harbour on the West coast of Ireland, *Proceedings of the Royal Irish Academy* 86: 91-99.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kingman JF (2000) Origins of the coalescent. 1974-1982, *Genetics* 156: 1461-1463.
- Kinlan BP, Gaines SD & Lester SE (2005) Propagule dispersal and the scales of marine community processes, *Diversity and Distributions* 11: 139-148.
- Kirby RR, Berry RJ & Powers DA (1997) Variation in mitochondrial DNA in a cline of allele frequencies and shell phenotype in the dog-whelk *Nucella lapillus* (L.), *Biological Journal of the Linnean Society* 62: 299-312.
- Knott KE & Hopkins TS (1998) Morphological and biochemical variation in two color morphs of *Luidia clathrata*. In: *Echinoderms : San francisco* (ed. Telford M), pp. 253-257. Balkema, Rotterdam.
- Knowlton N (1993) Sibling species in the sea, *Annual Review of Ecological System* 24: 186-216.
- Knowlton N (2000) Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea, *Hydrobiologia* 420: 73-90.
- Koehler R (1921) *Faune de France - Echinodermes*, Paris.
- Kordos L & Burton R (1993) Genetic differentiation of Texas Gulf coasts populations of the Blue crab *Callinectes sapidus*, *Marine Biology* 117: 227-233.
- Kritzer JP & Sale P (2003) Metapopulation ecology in the sea : from Levin's model to marine and fisheries science, *Fish and fisheries* 4: 1-10.
- Kruse I & Reise K (2003) Reproductive isolation between intertidal and subtidal *Scoloplos armiger* (Polychaeta, Orbiniidae) indicates sibling species in the North Sea, *Marine Biology* 143: 511-517.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen I & Nei M (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software., *Bioinformatics* 17: 1244-1245.

L

- Lamare MD (1998) Origine and transport of larvae of the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata : Echinoidea) in a New Zealand fjord, *Marine Ecology Progress Series* 174: 107-121.
- Lambeck K (1997) Sea-level change along the French Atlantic and Channel coasts since the time of the Last Glacial Maximum, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 129: 1-22.
- Lambeck K & Chappell J (2001) Sea level change through the last glacial cycle, *Science* 292: 679-686.
- Larsonneur C, Bouysse P & Auffret J (1982) The superficial sediments of the English Channel and its western approaches, *Sedimentology* 29: 851-864.
- Lefebvre A (1999) *Reproduction d' une espece benthique a phase larvaire planctonique, l' ophiure Ophiothrix fragilis (Echinoderme), dans un systeme cotier a fort hydrodynamisme (etroit du Pas de Calais) : interactions physique-biologie et implications dans le fonctionnement global de l' ecosysteme*, University of Lille, 303.

- Lefebvre A & Davoult D (1998) Vertical distribution of the ophioplutei of *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata : Ophiuroidea) in the Dover Strait (Eastern English Channel). In: *Echinoderm research* (ed. Bonasoro C), pp. 505-509. Balkelma, Rotterdam.
- Lefebvre A & Davoult D (2000) Larval distribution of *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata: Ophiuroidea) in a macrotidal area, the Dover Strait (eastern English Channel, France), *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 80: 567-568.
- Lefebvre A, Davoult D, Gentil F & Janquin MA (1999) Spatio-temporal variability in the gonad growth of *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata : Ophiuroidea) in the English Channel and estimation of carbon and nitrogen outputs towards the pelagic system, *Hydrobiologia* 414: 25-34.
- Lefebvre A, Ellien C, Davoult D, Thiébaud E & Salomon JC (2003) Pelagic dispersal of the brittle-star *Ophiothrix fragilis* larvae in a megatidal area (English Channel, France) using an advection/diffusion model, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57: 421-433.
- Lemaire C, Allegrucci G, Naciri M, Bahri-Sfar L, Kara H & Bonhomme F (2000) Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)?, *Molecular Ecology* 9: 457.
- Levins R (1969) Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control, *Bulletin of the entomological society of America* 15: 237-240.
- Levitan DR (2002) The relationship between conspecific fertilization success and reproductive isolation among three congeneric sea urchins, *Evolution* 56: 1599-1609.
- Levitan DR, Fukami H, Jara J, Kline D, McGovern TM, McGhee KE, Swanson CA & Knowlton N (2004) Mechanisms of reproductive isolation among sympatric broadcast-spawning corals of the *Montastraea annularis* species complex, *Evolution* 58: 308-323.
- Lopez-Legentil S & Turon X (2004) How do morphotypes and chemotypes relate to genotypes? The colonial ascidian *Cystodytes* (Polycitoridae), *Zoologica Scripta* 34: 3-14.
- Luttikhuisen PC, Drent J & Baker AJ (2003) Disjunct distribution of highly diverged mitochondrial lineage clade and population subdivision in a marine bivalve with pelagic larval dispersal, *Molecular Ecology* 12: 2215-2229.
- Lyman T (1876) Report on the Ophiuroidea, *Challenger expedition* 5: 213-228.

M

- Maes GE, Pujolar JM, Hellemans B & Volckaert FA (2006) Evidence for isolation by time in the European eel (*Anguilla anguilla* L.), *Molecular Ecology* 15: 2095-2107.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome, *Trends in Ecology & Evolution* 20: 231-237.
- Manchenko GP & Kulikova VI (1996) Allozyme and colour differences between two sibling species of the heteronemertean *Lineus torquatus* from the Sea of Japan, *Marine biology* 125: 687-691.
- Manchenko GP & Yakovlev SN (2001) Genetic divergence between three sea urchin species of the genus *Strongylocentrotus* from the Sea of Japan, *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 31-44.
- Marincovich L & Gladenkov A (1999) Evidence for an early opening of the Bering Strait, *Nature* 397: 149-151.
- Massé H (1971) *Contribution à l'étude quantitative et dynamique de la macrofaune de peuplements des sables fins intralittoraux des côtes de Provence*, Aix Marseille, 310.
- Matsuoka N & Asano H (2003) Genetic Variation in Northern Japanese Populations of the Starfish *Asterina pectinifera*, *Zoological Science* 20: 985-988.
- Matsuoka N & Hatanaka T (1991) Molecular evidence for the existence of four sibling species within the sea-urchin, *Echinometra mathaei* in Japanese waters and their evolutionary relationships, *Zoological Science* 8: 121-133.
- Mauro A, Arculeo M & Parinello N (2003) Morphological and molecular tools in identifying the Mediterranean limpets *Patella caerulea*, *Patella aspera* and *Patella rustica*, *Journal of experimental marine biology and ecology* 295: 131-143.
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species.*, New York: Columbia University Press.
- Mayr E (1948) The bearing of the new systematics on genetical problems. The nature of species, *Advances in Genetics* 2: 205-237.

- McBride CW (1907) The development of *Ophiothrix fragilis*, *Quarterly Journal of Microscopical Science* 51: 557-606.
- McDonald JH & Kreitman M (1991) Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*, *Nature* 351: 652-654.
- McKenzie JA (1999) From desert to deluge in the Mediterranean, *Nature* 400: 613-614.
- McMillan WO, Raff RA & Palumbi SR (1992) Population genetic consequences of developmental evolution in sea urchins (genus *Heliocidaris*), *Evolution* 46: 1299-1312.
- McMullin E, Hourdez S, Schaeffer S & Fisher C (2003) Phylogenetics and biogeography of deep-sea vestimentiferan tubeworms and their bacterial symbionts, *Symbiosis* 34: 1-41.
- Menesguen A (1999) L'utilisation de modèles écologiques dans la lutte contre l'eutrophisation des eaux côtières françaises (Ifremer) Ifremer, 1-17.
- Meulenkamp JE & Sissingh W (2003) Tertiary palaeogeography and tectonostratigraphic evolution of the Northern and Southern Peri-Tethys platforms and the intermediate domains of the African-Eurasian convergent plate boundary zone, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 196: 209-228.
- Michanek G (1979) Phytogeographic provinces and seaweed distribution, *Botanica marina* 22: 375-391.
- Miller JE (1997) Genetic structure of black corals populations in New Zealand's fjords, *Marine Ecology Progress Series* 161: 123-132.
- Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, Brandon M, Easley K, Chen E, Brown MD, Sukernik RI, Olckers A & Wallace DC (2003) Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100: 171-176.
- Mladenov PV, Allibone RM & Wallis GP (1997) Genetic differentiation in the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata: Echinoidea), *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 31: 261-269.
- Moberg PE & Burton RS (2000) Genetic heterogeneity among adult and recruit red sea urchins, *Strongylocentrotus franciscanus*, *Marine Biology* 136: 773-784.
- Morgan R (2004) *Reproduction, larval development, juvenile biology and population dynamics of the gregarious ophiuroid Ophiothrix fragilis (Abildgaard, 1789) in the English Channel-North Sea region*, université libre de Bruxelles.
- Morgan R & Jangoux M (2002) Reproductive cycle and spawning induction in the gregarious brittle star *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata) in the Oosterschelde (Netherlands). *Invertebrate Reproduction and Development* 42: 145-155.
- Morgan R & Jangoux M (2004) Juvenile-adult relationship in the gregarious ophiuroid *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata): a behavioral and morphological study, *Marine Biology* 145: 265-276.
- Morgan R & Jangoux M (2005) Larval morphometrics and influence of adults on settlement in the gregarious ophiuroid *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata), *Biology Bulletin* 208: 92-99.
- Moyse J & Tyler PA (1995) Sea Urchins, Starfish, and sea cucumbers (Phylum Echinodermata). In: *Handbook of the Marine Fauna of North-West Europe* (ed. J.S. HPJaR), pp. 662-686. Oxford University Press, Oxford.
- Muths D, Davoult D, Gentil F & Jollivet D (2006) Incomplete cryptic speciation between intertidal and subtidal morphs of *Acrocnida brachiata* (Echinoderm : Ophiuroidea) in the North East Atlantic, *Molecular Ecology* 15: 3303-3318.

N

- Naciri M, Lemaire C, Borsa P & Bonhomme F (1999) Genetic study of the Atlantic-Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Journal of Heredity* 90: 591-596.
- Nataf G (1954) Les *Ophiothrix fragilis* (Echinodermes) de Roscoff, *Bulletin du Muséum, 2e série* XXVI: 632-637.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*, New York: Columbia University Press.

Nichols D & Barker MF (1984) A comparative study of reproductive and nutritional periodicities in two populations of *Asterias rubens* (Echinodermata : Asteroidea) from the English Channel, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 64: 471-484.

O

Odum EP (1983) *Basic ecology*, Philadelphia: Holt Saunders International editions.

Ogden R & Thorpe RS (2002) Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 13612-13615.

Olmi EJ (1994) Vertical migration of blue crab (*Callinectes sapidus*) megalopae: implications for transport in estuaries, *Marine Ecology Progress Series* 113: 1-2.

Orr MR & Smith TB (1998) Ecology and speciation, *Trends in Ecology & Evolution* 13: 502-506.

P

Paetkau D, Slade R, Burden M & Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power, *Molecular Ecology* 13: 55-65.

Palumbi SR (1992) Marine speciation on a small planet, *Trends in Ecology & Evolution* 7: 114-118.

Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation, *Annual Review of Ecological System* 25: 547-572.

Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity and the design of marine protected areas, *Ecological Applications* 13: 146-158.

Pannell JR & Charlesworth B (2000) Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 355: 1851-1864.

Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC & Fuerst PA (1998) What can molecules tell us about populations : choosing and using a molecular marker, *Ecology* 79: 361-382.

Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J & Britton-Davidan J (1987) *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*, Paris.

Pechenik JA (1999) On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles, *Marine Ecology Progress Series* 177: 269-297.

Peterson KJ, Lyons JB, Nowak KS, Takacs CM, Wargo MJ & McPeck MA (2004) Estimating metazoan divergence times with a molecular clock, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 6536-6541.

Picard J (1986) *Recherches qualitatives sur les biocénoses marines des substrats meubles dragables de la région marseillaise* Thèse d'état, Université Aix-Marseille, 160.

Piertney S & Carvalho G (1995) Microgeographic genetic differentiation in the intertidal isopod *Jaera alazjkons* Leach. II. Temporal variation in allele frequencies, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 188: 277-288.

Pigliucci M (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now?, *Trends in Ecology & Evolution* 20: 481-486.

Pirazzoli P (1998) Sur la vitesse des variations du niveau de la mer, *Annales de Géographie* 600: 220-232.

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.

Poulin E & Féral JP (1994) The fiction and the facts of Antarctic brood protecting : population genetics and evolution of schizasterid echinoids. In: *Echinoderms through Time* (ed. David G, Féral & Roux), pp. 837-844. Balkema, Rotterdam.

Provan J, Wattier RA & Maggs CA (2005) Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmaria palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel, *Molecular Ecology* 14: 793-803.

R

- Rand DM (1994) Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA, *Trends in Ecology & Evolution* 9: 125-131.
- Raymond M & Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism, *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Reeb C & Avise J (1990) A genetic discontinuity in a continuously distributed species: Mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*, *Genetics* 124: 397-406.
- Remerie T, Bourgois T, Peelaers D, Vierstraete A, Vanfleteren J & Vanreusel A (2006) Phylogeographic patterns of the mysid *Mesodopsis slabberi* (Crustacea, Mysida) in Western Europe : evidence for high molecular diversity and cryptic speciation, *Marine Biology* DOI 10.1007/s00227-005-0235-7.
- Renssen H & Vandenberghe J (2003) Investigation of the relationship between permafrost distribution in the NW Europe and extensive winter sea-ice cover in the North Atlantic Ocean during the cold phases of the Last Glaciation, *Quaternary Science Review* 22: 209-223.
- Retière C (1979) *Contribution à la connaissance des peuplements benthiques du golfe Normano-breton* Thèse d'état, Rennes 1, 431.
- Rigal F (2005) *Barrières biogéographiques et processus historiques chez les invertébrés marins : Définition des unités taxonomiques et populationnelles chez Sabellaria alveolata* Mémoire de Master II, Université Paris11, 45.
- Roman J & Palumbi SR (2004) A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe, *Molecular Ecology* 13: 2891-2898.
- Rouchya JM & Caruso A (2006) The Messinian salinity crisis in the Mediterranean basin: A reassessment of the data and an integrated scenario *Sedimentary geology* 188-189: 35-67.
- Rougharden J, Gains S & Possingham H (1988) Recruitment dynamics in complex life cycles, *Science* 241: 1460-1466.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X & Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods., *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rumrill SS (1990) Natural mortality of marine invertebrate larvae, *Ophelia* 32: 163-198.

S

- Saavedra C & Pena J (2005) Nucleotide diversity and Pleistocene population expansion in Atlantic and Mediterranean scallops (*Pecten maximus* and *P. jacobaeus*) as revealed by the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 323: 138-150.
- Sabbadin A (1982) Formal genetics of ascidians, *American zoologist* 22: 765-773.
- Sagarduy Casal J & Comtet T (2006) *Distribution spatiale du méroplancton à l'entrée de la Manche et de la Mer d'Irlande*, Programme européen de Mobilité Leonardo de Vinci, 20.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biological Evolution* 4: 406-425.
- Salomon JC (1990) Role of instantaneous and long-term water movements on the recruitment and life of benthic fauna in the English Channel, *La mer* 28: 211-217.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd edn*, New York: Cold Spring Harbor.
- Schemske DG (2000) Understanding the origin of species, *Evolution* 54: 1069-1073.
- Schluter D (2001) Ecology and the origin of species, *Trends in Ecology & Evolution* 16: 372-380.
- Schmidt PS, Bertness MD & Rand DM (2000) Environmental heterogeneity and balancing selection in the acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*, *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 379-384.
- Schmidt PS & Rand DM (2001) Adaptive maintenance of genetic polymorphism in an intertidal barnacle: habitat- and life-stage-specific survivorship of Mpi genotypes, *Evolution* 55: 1336-1344.
- Schneider S, Roessli D & Excoffier L (2001) Arlequin (v 2.000) : Software for population Genetics Dtat Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Departement of Anthropology, University of Geneva, Geneva.

-
- Servedio MR & Noor MAF (2003) The role of reinforcement in speciation : Theory and data, *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 339-364.
- Sewell M & Watson JC (1993) A source for asteroid larva? Recruitment for *Pisaster ochraceus*, *Pycnopodia helianthoides* and *Dermasterias imbricata* in Nootka Sound, British Columbia, *Marine Biology* 117: 397-398.
- Shackleton N & Opdyke N (1977) Oxygen isotope and paleomagnetic evidence for early Northern Hemisphere glaciation, *Nature* 270: 216-219.
- Shanks A, Grantham B & Carr M (2003) Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves, *Ecological Applications* 13: 159-169.
- Shanks AL & Brink L (2005) Upwelling, downwelling, and cross-shelf transport of bivalve larvae: test of a hypothesis, *Marine Ecology Progress Series* 302: 1-12.
- Siegel D, Kinlan B, Gaylord B & Gaines S (2003) Lagrangian descriptions of marine larval dispersion, *Marine Ecology Progress Series* 260: 83-96.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations, *Science* 236: 787-792.
- Smedbol KR, McPherson A, Hansen MM & Kenchington E (2002) Myths and moderation in marine 'metapopulations'?, *Fish and fisheries* 3: 20-35.
- Smith AJ (1989) The English Channel - by geological design or catastrophic accident?, *Proceedings of the Geological Association* 100: 325-337.
- Smith JM & Smith NH (2002) Recombination in animal mitochondrial DNA, *Molecular Biological Evolution* 19: 2330-2333.
- Sponaugle S, Cowen RK, Shanks A, Morgan SG, Leis JM, Pineda J, Boehlert GW, Kingsford MJ, Lindeman KC, Grimes C & Munro JL (2002) Predicting self-recruitment in marine populations : biophysical correlates and mechanisms, *Bulletin of Marine Science* 70: 341-375.
- Stehli F & Webb S (1985) A kaleidoscope of plates, faunal and floral dispersals, and sea level changes. In: *The great American biotic interchange* (ed. Stehli FW, SD), pp. 3-16. Plenum press, New York.
- Stewart JR & Lister AM (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota, *Trends in Ecology & Evolution* 16: 608-613.
- Swearer SE, Shima J, Hellberg ME, Thorrold SR, Jones G, Ross Robertson D, Morgan S, Selkoe K, Ruiz G & Warner R (2002) Evidence of self-recruitment in demersal marine populations, *Bulletin of Marine Science* 70: 251-271.

T

- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A-G & Cossons J-F (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe, *Molecular Ecology* 7: 453-464.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations, *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism, *Genetics* 123: 585-595.
- Tamaki A (1987) Comparison of resistivity to transport by wave action in several polychaete species on an intertidal sand flat, *Marine Ecology Progress Series* 37: 181-189.
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall KA, Pascual M & Turon X (2004) Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*, *Molecular Ecology* 13: 3125-3136.
- Templeton AR (1989) The meaning of species and speciation, a genetic perspective. In: *Speciation and its consequences* (ed. Endler O), pp. 3-27. Sinauer Ass. Inc., Massachusetts.
- Thiébaud E, Dauvin JC & Wang Z (1996) Tidal transport of *Pectinaria koreni* postlarvae (Annelida: Polychaeta) in the Bay of Seine (eastern English Channel), *Marine Ecology Progress Series* 138: 63-70.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

- Todd CT, Lambert WJ & Thorpe JP (1998) The genetic structure of intertidal populations of two species of nudibranch molluscs with planktotrophic and pelagic lecithotrophic larval stages : are pelagic larvae "for" dispersal?, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 228: 1-28.
- Tomas F, Romero J & Turon X (2004) Settlement and recruitment of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in two contrasting habitats in the Mediterranean, *Marine Ecology Progress Series* 282: 173-184.
- Tomlinson PK (1970) Program Normsep (Fortran IV). Dept Fish and Game, The resources agency of California.
- Toonen RJ & Grosberg RK (sous presse) Effects of coastal upwelling on genetic structure in an intertidal crab with planktonic larvae, *Evolution*.
- Trontelj P, Machinob Y & Sket B (2005) Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 212-226.
- Turelli M, Barton NH & Coyne JA (2001) Theory and speciation, *Trends in Ecology & Evolution* 16: 330-343.
- Turon X, Codina M, Tarjuelo I, Uriz MJ & Becerro MA (2000) Mass recruitment of *Ophiothrix fragilis* (Ophiuroidea) on sponges : settlement patterns and post-settlement dynamics, *Marine ecology Progress series* 200: 201-212.
- Tyler PA & Banner FT (1977) The effect of coastal hydrodynamics on the Echinoderm distribution in the sublittoral of Oxwich Bay, Bristol Channel, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 5: 293-308.

U

- Underwood AJ & Fairweather PG (1989) Supply-side ecology and benthic marine assemblages, *Trends in Ecology & Evolution* 4: 16-20.
- Ursin E (1960) A quantitative investigation of the Echinoderm fauna of the central North Sea, *Meddelser fra Danmarks Fiskeri -og Havundersogelser* 2: 1-204.
- Uthicke S, Benzie JAH & Ballment E (1998) Genetic structure of fissiparous populations of *Holothuria (Halodeima) atra* on the Great Barrier Reef, *Marine Biology* 132: 141-151.

V

- Van der Made J, Moralesa J & Montoyab P (2006) Late Miocene turnover in the Spanish mammal record in relation to palaeoclimate and the Messinian Salinity Crisis, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 238: 228-246.
- Van Oosterhout C, Van Heuven MK & Brakefield PM (2004) On the neutrality of molecular genetic markers: pedigree analysis of genetic variation in fragmented populations, *Molecular Ecology* 13: 1025-1034.
- Van Valen LM (1976) Ecological species, multispecies and oaks, *Taxon* 25: 233-239.
- Veliz D, Bourget E & Bernatchez L (2004) Regional variation in the spatial scale of selection at MPI* and GPI* in the acorn barnacle *Semibalanus balanoides* (Crustacea), *Journal of Evolutionary Biology* 17: 953-966.
- Vermeij G (1991) Anatomy of an invasion: the trans-Arctic interchange, *Paleobiology* 17: 281-307.
- Via S (2001) Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up, *Trends in Ecology & Evolution* 16: 381-390.

W

- Wada H, Kobayashi M, Sato R, Satoh N, Miyasaka H & Shirayama Y (2002) Dynamic insertion-deletion of introns in deuterostome EF-1alpha genes, *Journal of Molecular Evolution* 54: 118-128.
- Wares JP, Barber PH, Ross-Ibarra J, Sotka E & Toonen R (en prep.) Comments to Bazin *et al.*'s paper.
- Warner GF (1971) On the ecology of a dense bed of the brittle-star *Ophiothrix fragilis*, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51: 267-282.

-
- Watts RJ, Johnson MS & Black KD (1990) Effects of recruitment on genetic patchiness in the sea urchin *Echinometra mathaei* in Western Australia, *Marine Biology* 105: 145-151.
- Weir BS & Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wiens JJ (2004) Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species, *Evolution* 58: 193-197.
- Wiens JJ & Donoghue MJ (2004) Historical biogeography, ecology and species richness, *Trends in Ecology & Evolution* 19: 639-644.
- Wiens JJ & Graham CH (2005) Niche conservatism: Integrating evolution, ecology and conservation biology, *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 36: 519-539.
- Williams NA, Dixon DR, Southward EC & Holland PWH (1993) Molecular evolution and diversification of the vestimentiferan tube worms, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 73: 437-452.
- Willig MR, Kaufman DM & Stevens RD (2003) Latitudinal gradients of Biodiversity : Pattern, process, scale and synthesis, *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 273-309.
- Willis KJ & Whittaker RJ (2000) The Refugial Debate, *Science* 287: 1406-1407.
- Wilson RA (1999) *Species. New interdisciplinary essays*, Cambridge, MA: MIT Press.
- Wright F (1969) Theory of gene frequencies. In: *Evolution and the genetics of population*. Chicago Press Chicago.

Z

- Zühlke R & Reise K (1994) Response of macrofauna to drifting tidal sediments, *Helgöland Marine Research* 48: 277-328.

Annexes 1

- Protocole d'extraction CTAB
- Exemples de séquences du gène mitochondrial de la COI pour *A. brachiata*
- Exemples de séquences du gène ribosomique ITS2 pour *A. brachiata*
- Exemples de séquences du gène mitochondrial de la COI pour *O. fragilis*

▪ **PROTOCOLE EXTRACTION D'ADN AU CTAB (selon Jolly *et al.*, 1993)**

- Préchauffer la solution CTAB à 60°C pendant 1h
- Mettre le morceau de tissu dans 600µl de solution chauffée, avec 1 µl de protéinase K et laisser incuber pendant, au moins, 1h
- Ajouter 540 µl de Chloroforme Isoamyle alcool 24 :1) – mélanger délicatement par retournements - centrifuger 10 min à 15000g
- Ajouter 330 µl isopropanol froid et placer à précipiter 1h au froid
- Culotter l'ADN par centrifugation (10 min à 15000g)
- Rincer le culot avec 500 µl d'éthanol 70% froid puis centrifuger (10 min à 15000g)
- Sécher le culot au Speed Vac (5 min)
- Reprendre le culot dans 75 µl de tampon d'élution (TE)

▪ **Tampon CTAB (pH 8) :**

CTAB 2%
NaCl 1,4 M
β-Mercaptoéthanol 0,2 %
EDTA 50 mM
Tris HCl pH8 100mM
Protéinase K 0,1 mg.ml⁻¹
H₂O

Exemples de séquences mitochondriales d'un fragment du gène Cytochrome oxydase I d'individus des lignées I et S de l'espèce *A. brachiata* et de deux individus d'*Amphiura filiformis*. L'ensemble des séquences utilisés dans le Chapitre II.1 est publié sous GenBank (numéro d'accès : DQ507450-507799).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Lignée S      TCCCCCTTCTTTATGCTTCTAATGACCTCCGCTGGGACAGAAAGAGGAGCCGGAACAGGTTGAACGTGTTTACCCCCCT
Lignée S      TTCCCCCTTCTTTATGCTTCTAATGACCTCCGCTGGGACAGAAAGAGGAGCCGGAACAGGTTGAACGTGTTTACCCCCCT
Lignée I      TCCCCCTTCTTTATGCTTCTGATGACCTCCGCGGAAACAGAGAGAGGAGCTGGAACAGGTTGAACGTGTTTACCCCCCT
Lignée I      TCCCCCTTCTTTATGCTTCTGATGACCTCCGCGGAAACAGAGAGAGGAGCTGGAACAGGTTGAACGTGTTTACCCCCCT
Amphiura filiformis TCCCCCTTCTTTATGCTTCTTTAACCTCTGCCGGAAATGAAAGCGGAGTAGGAACCTGGGTGAACAGTATACCCCCC
Amphiura filiformis TCCCCCTTCTTTATGCTTCTTTAACCTCTGCCGGAAATGAAAGCGGAGTAGGAACCTGGGTGAACAGTATACCCCCC

      90      100     110     120     130     140     150     160
Lignée S      TTATCGGGCCGACAGCTCACAGAGGAGCATCAGTAGACCTAACTATCTTCTCCCTCCATCTAGCTGGTGCCTTCGTTCAAT
Lignée S      TTATCGGGCCGACAGCTCACAGAGGAGCATCAGTAGACCTAACTATCTTCTCCCTCCATCTAGCTGGTGCCTTCGTTCAAT
Lignée I      TTATCGGGCCGACGGCCATAGAGGAGCGTACAGTAGACCTCGTCATTTTCTCCCTACATCTAGCCGGAGCCTCCTCAAT
Lignée I      TTATCGGGCCGACGGCCATAGAGGAGCGTACAGTAGACCTCGTCATTTTCTCCCTACATCTAGCCGGAGCCTCCTCAAT
Amphiura filiformis TTTTCTGGCCCTGTGGCCACGAGGGGGCTGCGTAGACCTAGCAATTTTTTCTCTTCACTAGCCGGGGCATCTTCAAT
Amphiura filiformis TTTTCTGGCCCTGTGGCCACGAGGGGGCTGCGTAGACCTAGCAATTTTTTCTCTTCACTAGCCGGGGCATCTTCAAT

      170     180     190     200     210     220     230     240
Lignée S      AATGGCCTCCATTAATTTTATACCACAATAAATAATATCGGAAGTTCTGGTATGACAAATGGACCGTACACCTTTATTTG
Lignée S      AATGGCCTCCATTAATTTTATACCACAATAAATAATATCGGAAGTTCTGGTATGACAAATGGACCGTACACCTTTATTTG
Lignée I      TATGGCCTCAATTAACTTTATCACCACAATTAATAACATCGGAAGCTCTGGTATGACAAATGGACCGAACCCCCATTCCG
Lignée I      TATGGCCTCAATTAACTTTATCACCACAATTAATAACATCGGAAGCTCTGGTATGACAAATGGACCGAACCCCCATTCCG
Amphiura filiformis CATGGCCTCCATAAACTTCAATTAACGATAAATAATATCGGTGCGCCAGGAATGACAAATGGACCGAACCCCCACTTTTGT
Amphiura filiformis CATGGCCTCCATAAACTTCAATTAACGATAAATAATATCGGTGCGCCAGGAATGACAAATGGACCGAACCCCCACTTTTGT

      250     260     270     280     290     300     310     320
Lignée S      TATGATCAATTCCTTAACTCGATTCCTTCTTCTCCCTCCAGTCTTAGCCGGAGCCATTACTATGCTTCTTACT
Lignée S      TATGATCAATTCCTTAACTCGATTCCTTCTTCTCCCTCCAGTCTTAGCCGGAGCCATTACTATGCTTCTTACT
Lignée I      TATGATCAATCTTACTAACCTCAATTTCTTCTTCTTATCCTTACCAGTTCAGCTGGAGCCATAACAATGTTATTGACA
Lignée I      TATGATCAATCTTACTAACCTCAATTTCTTCTTCTTATCCTTACCAGTTCAGCTGGAGCCATAACAATGTTATTGACA
Amphiura filiformis TTTGATCTATTCTTTTAAACCATAATTTACTTCTTCTTCTTCTTCCGCTTAGCTGGAGCTATTACGATGTTACTTACA
Amphiura filiformis TTTGATCTATTCTTTTAAACCATAATTTACTTCTTCTTCTTCTTCCGCTTAGCTGGAGCTATTACGATGTTACTTACA

      330     340     350     360     370     380     390     400
Lignée S      GACCGAAAAATTAACCCAGATTCTTCGACCCCGAGGGTGGAGGAGATCCCATACTTTACCAACACTTATTTTGAATTCCT
Lignée S      GACCGAAAAATTAACCCAGATTCTTCGACCCCGAGGGTGGAGGAGATCCCATACTTTACCAACACTTATTTTGAATTCCT
Lignée I      GACCGAAAAATTAACCCAGGTTCTTTGACCCCGAAGGGGGAGGAGACCCCATACCTTTACCAACACTTATTTTGAATTCCT
Lignée I      GACCGAAAAATTAACCCAGGTTCTTTGACCCCGAAGGGGGAGGAGACCCCATACCTTTACCAACACTTATTTTGAATTCCT
Amphiura filiformis GACCGTAAAAATTAATACTACCTTTTTTGAACCCACCGGGGTGGAGACCCCTATTCTTACCAACACCTTCTGATTCCT
Amphiura filiformis GACCGTAAAAATTAATACTACCTTTTTTGAACCCACCGGGGTGGAGACCCCTATTCTTACCAACACCTTCTGATTCCT

      410     420     430     440     450     460     470     480
Lignée S      TGGTCACCCCGAAGTTTATATATTAATTTTACCAGGGTTGGGATAATTTACACGTCGTCGCATCCCGCACAGGAAAGC
Lignée S      TGGTCACCCCGAAGTTTATATATTAATTTTACCAGGGTTGGGATAATTTACACGTCGTCGCATCCCGCACAGGAAAGC
Lignée I      CGGCCACCCCGAAGTTTACATCTTGATACCTTCGGGGTTCCGGGATTAATCTCACATGTTGTCGCGTCTCGAACAGGAAAGC
Lignée I      CGGCCACCCCGAAGTTTACATCTTGATACCTTCGGGGTTCCGGGATTAATCTCACATGTTGTCGCGTCTCGAACAGGAAAGC
Amphiura filiformis TGGACACCCCGAAGTTTATATTTATTCTACCAGGATTTGGAATCATCTCTCATATTGTTACACCCGAACAGGAAAGC
Amphiura filiformis TGGACACCCCGAAGTTTATATTTATTCTACCAGGATTTGGAATCATCTCTCATATTGTTACACCCGAACAGGAAAGC

      490     500     510     520     530
Lignée S      AACAACTTTTGGTTATTTAGGAATGGTATACGCAATGGTATCTATAGGGAFACT
Lignée S      AACAACTTTTGGTTATTTAGGAATGGTATACGCAATGGTATCTATAGGGAFACT
Lignée I      AACAGCCCTTCGGCTACCTAGGAATGGTCTATGCTATGGTATCCATAGGAAFACT
Lignée I      AACAGCCCTTCGGCTACCTAGGAATGGTCTATGCTATGGTATCCATAGGAAFACT
Amphiura filiformis AACAACTTTTGGCTATCTTGGTATGATGTACGCTATGATATCTATTGGAACTCT
Amphiura filiformis AACAACTTTTGGCTATCTTGGTATGATGTACGCTATGATATCTATTGGAACTCT

```


- Schéma de restriction des enzymes, qui permettent la diagnose des hybrides entre lignée S et lignée I de l'espèce *A. brachiata* (Chapitre II.2)

Enzyme	Sml I	Eco 88	Xho I
	5'...C [▼] TYRAG...3' 3'...GARYT [▲] C...5'	5'...C [▼] YCGRG...3' 3'...GRGCY [▲] C...5'	5'...C [▼] TCGAG...3' 3'...GAGCT [▲] C...5'

Annexes 2

- Tampon d'extraction des allozymes d'après Pasteur *et al.* (1987)
- Techniques de révélation des marqueurs allozymiques d'après Pasteur *et al.* (1987)
- Fréquences alléliques au sein des populations de chaque espèce

▪ **Tampon Extraction (pH 6,8)**

Tris	10 mM
EDTA	2 mM
β- Mercaptoéthanol	0,05%
PMSF	0,1 mM
Sucrose	0,25 M

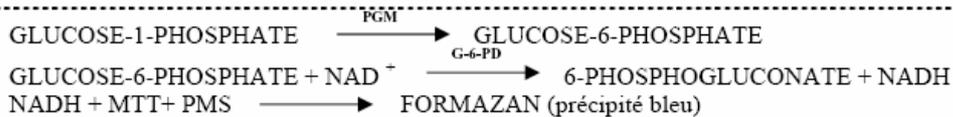
Malate-déshydrogénase – NAD dépendante



- Tampon Tris A 10ml
 - Acide Malique 2M (pH7) 5ml
 - MgCl₂ (0,5M) 1ml
 - NAD 1% H₂O 1ml
- Avant emploi ajouter :
- NBT 1% H₂O 1ml
 - PMS 1% H₂O 0,5ml
 - MTT 1% H₂O 1ml
 - Agarose 1,5% Tris A 10m

Incuber 30-60min à 37°C à l'obscurité

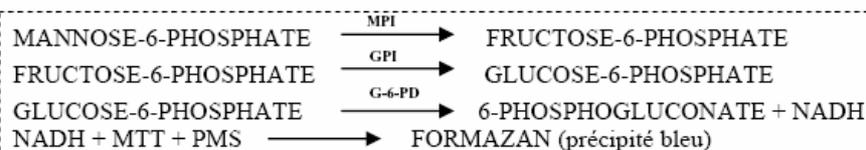
Phosphoglucomutase



- Tampon Tris A 10ml
 - MgCl₂ (0,5M) 1ml
 - Glucose-1-phosphate 300mg
 - NAD 1% H₂O 1ml
- Avant emploi ajouter :
- Glucose-6-phosphate-déshydrogénase (17UI) 6µl
 - PMS 1% H₂O 0,5ml
 - PMS 1% H₂O 0,5ml
 - MTT 1% H₂O 0,5ml
 - Agarose 1,5% Tris A 10ml

Incuber 30-60min à 37°C à l'obscurité

Mannose-Phosphate-Isomérase



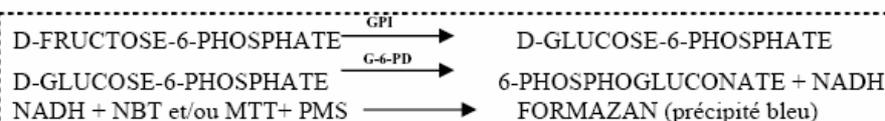
- | | |
|----------------------------|-------|
| - Tampon Tris A | 10ml |
| - D-mannose-6-phosphate | 20mg |
| - Pyruvate | 20mg |
| - NAD 1% H ₂ O | 1ml |
| - NADP 1% H ₂ O | 0,5ml |

Avant emploi ajouter :

- | | |
|---|--------|
| - Glucose-phosphate-isomérase (10 UI) | 6µl |
| - Glucose-6-phosphate-déshydrogénase (17UI) | 6µl |
| - MTT 1% H ₂ O | 1ml |
| - PMS 1% H ₂ O | 0,25ml |
| - Agarose 1,5% Tris A | 10ml |

Incuber 30-60min à 37°C à l'obscurité

Phosphogluco-isomérase



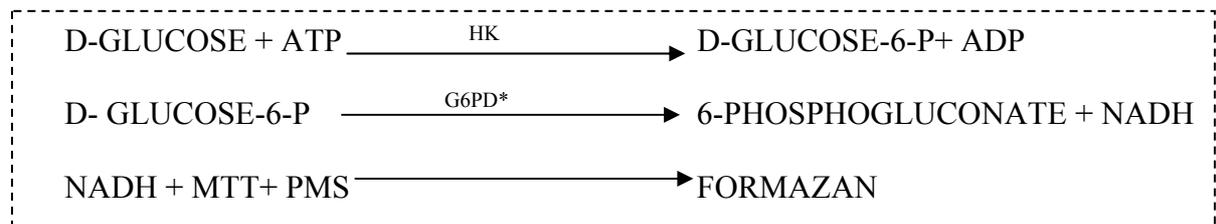
- | | |
|----------------------------|-------|
| - Tampon Tris A | 10ml |
| - MgCl ₂ (0,5M) | 1ml |
| - Fructose-6-phosphate | 10mg |
| - NAD 1% H ₂ O | 1ml |
| - NADP 1% H ₂ O | 0,5ml |

Avant emploi ajouter :

- | | |
|---|-------|
| - Glucose-6-phosphate-déshydrogénase (17UI) | 6µl |
| - PMS 1% H ₂ O | 0,5ml |
| - PMS 1% H ₂ O | 0,5ml |
| - MTT 1% H ₂ O | 0,5ml |
| - Agarose 1,5% Tris A | 10ml |

Incuber 30-60min à 37°C à l'obscurité

Hexo Kinase



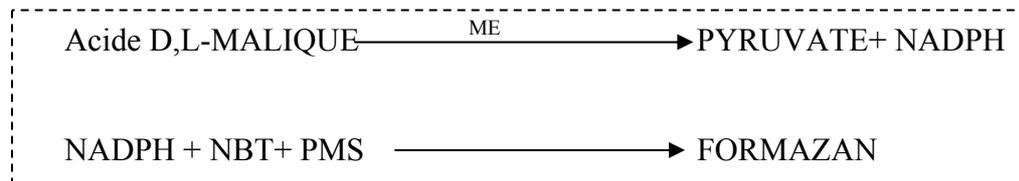
Tampon TrisA	35 ml
Alpha-d+-guucose	500 mg
ATP	60 mg
NAD, 1%	1 ml
MgCl ₂	0,6 ml
NADP, 1%	0,5 ml

Avant emploi ajouter:

Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase	6 µl
NBT, 1%	1 ml
PMS, 1%	0,5 ml
Agarose 1,5% Tris A	10 ml

Incuber 2h à 37°C à l'obscurité

Malico Enzyme



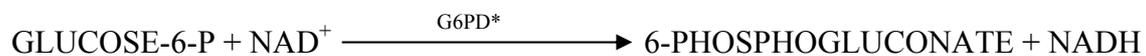
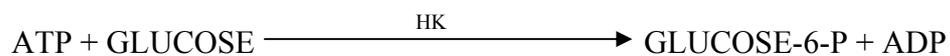
Tampon TrisA	35 ml
MgCl ₂	1,5 ml
Acide Malique 2M (pH7)	1 ml
ATP	60 mg
NADP, 1%	0,1 ml

Avant emploi ajouter:

NBT, 1%	0,4 ml
PMS, 1%	0,2 ml
MTT, 1%	0,4 ml
Agarose 1,5% Tris A	10 ml

Incuber 1h à 37°C à l'obscurité

 Pyruvate Kinase



Phosphoenol-pyruvate	30 mg
ADP	60 mg
Fructose 1,6 diPhosphate	30 mg
Alpha-d-gucose	400 mg

Avant emploi ajouter:

Tampon TrisB modifié	10 ml
NAD, 1%	1 ml
NADP, 1%	0,5 ml
Hexokinase	6 µl
Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase	6 µl
MTT, 1%	0,5 ml
PMS, 1%	0,5 ml
Agarose 1,5% Tris A	10 ml

Incuber 2h à 37°C à l'obscurité

■ Fréquences alléliques des diverses populations d'*A. brachiata* (Chapitre II.1)

	(N)	PO	SF	LS	BV	BS	CB	RB	Co	BF	Mo	PA	LI	SB	UB
		26	38	11	48	35	35	48	20	47	35	48	47	48	48
HK	80	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042	0,011	0,021	0,021
	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,571	0,594	0,553	0,365	0,656
	95	0,000	0,040	0,000	0,031	0,000	0,043	0,042	0,000	0,053	0,371	0,365	0,372	0,531	0,323
	100	0,423	0,263	0,364	0,313	0,400	0,486	0,438	0,650	0,500	0,029	0,000	0,064	0,083	0,000
	105	0,577	0,671	0,636	0,635	0,600	0,471	0,521	0,350	0,415	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000
	110	0,000	0,026	0,000	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PGM	80	0,000	0,000	0,000	0,031	0,014	0,000	0,021	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000
	90	0,000	0,000	0,046	0,021	0,014	0,014	0,010	0,100	0,010	0,000	0,073	0,011	0,000	0,000
	96	0,000	0,079	0,091	0,104	0,043	0,043	0,083	0,275	0,094	0,000	0,031	0,064	0,075	0,031
	100	0,558	0,461	0,364	0,396	0,486	0,314	0,479	0,325	0,604	0,771	0,854	0,670	0,787	0,854
	104	0,385	0,421	0,500	0,344	0,443	0,486	0,333	0,225	0,260	0,171	0,042	0,245	0,138	0,104
	110	0,058	0,040	0,000	0,094	0,000	0,057	0,063	0,075	0,031	0,029	0,000	0,011	0,000	0,010
PGI	116	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,086	0,010	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000
	90	0,096	0,079	0,000	0,125	0,129	0,143	0,146	0,100	0,021	0,029	0,000	0,000	0,032	0,052
	95	0,019	0,053	0,000	0,000	0,000	0,043	0,000	0,000	0,094	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000
	100	0,519	0,461	0,455	0,469	0,386	0,414	0,448	0,500	0,615	0,571	0,958	0,766	0,564	0,740
	104	0,019	0,092	0,182	0,000	0,100	0,086	0,000	0,125	0,250	0,000	0,000	0,096	0,362	0,208
	108	0,327	0,290	0,318	0,375	0,300	0,300	0,385	0,275	0,021	0,343	0,042	0,138	0,011	0,000
ME	112	0,019	0,026	0,046	0,000	0,086	0,014	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	116	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,057	0,000	0,000	0,000	0,000
	90	0,000	0,000	0,000	0,052	0,257	0,029	0,229	0,000	0,000	0,029	0,125	0,000	0,083	0,250
	100	1,000	1,000	1,000	0,938	0,743	0,886	0,719	0,825	0,844	0,900	0,865	0,798	0,917	0,677
	110	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,086	0,052	0,175	0,156	0,071	0,010	0,202	0,000	0,073
	70	0,058	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,043	0,031	0,085	0,042	0,031
MPI	90	0,462	0,382	0,182	0,000	0,000	0,243	0,292	0,025	0,094	0,043	0,292	0,383	0,156	0,156
	100	0,404	0,605	0,818	1,000	1,000	0,757	0,708	0,850	0,771	0,914	0,615	0,511	0,625	0,750
	110	0,077	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,135	0,000	0,063	0,021	0,177	0,063

Annexes 3

- ‘Incomplete cryptic speciation between intertidal and subtidal morphs of *Amphiura brachiata* (Echinodermata : Ophiuroidea) in the North East Atlantic (Muths D., Davoult D., Gentil F. & Jollivet D.)’ : *Molecular Ecology*, 2006, 15, 3303-318
- ‘Do long-term dispersal and recruitment heterogeneity explain large-scale chaotic genetic patchiness in the brittle-star *Ophiothrix fragilis* (Abilgaard, 1789) in the North East Atlantic?’ Muths D., Davoult D., Gentil F. & Jollivet D., à soumettre à *Marine Biology* (en préparation)
- ‘Variability in population dynamics of the common brittle-star *Ophiothrix fragilis* in three sites of the English Channel’, D. Muths, D. Jollivet & D. Davoult, soumis, dans les actes du colloque International Echinoderm Research 2006

Incomplete cryptic speciation between intertidal and subtidal morphs of *Acrocnida brachiata* (Echinodermata: Ophiuroidea) in the Northeast Atlantic

D. MUTHS,*† D. DAVOULT,* F. GENTIL* and D. JOLLIVET†

**Ecologie Benthique, UMR7144, CNRS-UPMC, B.P.74, 29682 Roscoff, France*, †*Evolution & Génétique des Populations Marines, UMR7144, CNRS-UPMC, B.P.74, 29682 Roscoff, France*

Abstract

The brittle-star *Acrocnida brachiata* (Montagu) lives in sandy-bottom habitat of both intertidal and subtidal zones along the coasts of the northwestern Europe. An allozyme frequency-based survey (five enzyme loci) was combined with a mitochondrial (mt) COI haplotype analysis (598-bp sequences) on 17 populations to trace back past colonization pathways from the actual population structure of the species. Both genetic markers display a sharp genetic break between intertidal (clade I) and subtidal populations (clade S). This break corresponds to an allele frequency inversion at three enzyme loci (*Hk*, *Pgm* and *Pgi*) and a deep divergence of about 20% in mtCOI sequences between most of the intertidal populations and other samples. The geographic distribution of clade I seems to be more restricted than clade S as it is absent from the intertidal of the eastern English Channel and North Sea and may be replaced by clade S in south Brittany. Applying previously published rates of mutation, divergence between the two clades is estimated to pre-date 5 million years ago and may be due to allopatric speciation processes at the Mio–Pliocene transition. The occurrence of putative hybrids in a few localities, however, suggests incomplete cryptic speciation with secondary contact zones. The relative importance of colonization history vs. habitat specialization are discussed in the light of neutral evolution as tested from mtCOI gene sequences. While differential selection seems to have contributed little to the separation of the lineages, it may have played a role in the emergence of adaptive polymorphisms in the hybrid zone. Furthermore, congruent spatial patterns of differentiation were observed in both clades suggesting a recent increase in population size. These findings are in agreement with a recent expansion of the populations during or after the formation of the English Channel, from a southern refuge for the subtidal clade whereas the intertidal clade may have persisted further north. As previously suspected for a species with a very short pelagic larval phase, contemporary gene flow between distant or adjacent populations appears to be extremely reduced or even absent.

Keywords: allopatric speciation, allozyme, ecotypic specialization, hybridization, mtCOI

Received 13 December 2005; revision received 21 April 2006; accepted 1 May 2006

Introduction

Understanding by which processes and mechanisms speciation operates is of paramount importance and remains a major challenge facing evolutionists. Although there is still an open debate about the definition of a species

(Wilson 1999) and on the relative contributions of allopatry (Mayr 1942; Turelli *et al.* 2001) and sympatry (Johannesson 2001; Via 2001) on speciation processes, only few studies have attempted to infer probability and time to speciate (Gavrilets 2003). It appears that the time to speciate, which is driven by mutation and drift, is typically very long while the speciation transition is relatively short. When changes affect genes underlying speciation, species' isolation occurs very rapidly. If selection contributes to speciation, time to

Correspondence: Delphine Muths, Fax: (33) 2 98 29 23 24; E-mail: muths@sb-roscoff.fr

speciate decreases significantly (Gavrilets 2003). An increasing number of authors appear to agree on the importance of fluctuating environmental conditions in triggering sympatric isolation (and maybe speciation) over very small spatial scales (Wiens 2004). Data sets on the Caribbean lizard, *Anolis roquet* (Ogden & Thorpe 2002), or the rough periwinkle, *Littorina saxatilis* (Cruz *et al.* 2004), support local adaptation as the major evolutionary force acting on population divergence and fit with previously proposed ecological models of speciation (Orr & Smith 1998; Schluter 2001). In such cases, adaptation and ecological specialization may prevent gene flow (via differential mortality) between lineages that inhabit adjacent but contrasted microenvironments, thereby driving ecological speciation through the fixation of advantageous alleles (Bierne *et al.* 2003). Environmental selection is, however, not the only force facilitating speciation. Selective processes associated with local hybridization due to secondary contact zones are also known to prevent neutral gene flow between previously isolated demes. Reinforcement has thus often been proposed to be another major evolutionary mechanism in the maintenance of discrete breeding units during the time of speciation, leading to stable clines of allele frequencies at loci directly involved in reproductive isolation (Barton & Hewitt 1989). The way ecological factors may impact speciation mechanisms is thus a multifaceted question implying genes involved in either pre- or postzygotic processes of reproductive isolation (Palumbi 1992; Johannesson 2001).

The existence of sibling species provides means of understanding how speciation may work. Recent advances in development of the genetic markers help identify cryptic species and may lead to understanding the relative contributions of evolutionary forces promoting towards. Many sibling species have been discovered within all major marine taxa (Knowlton 2000). Genetic studies have investigated possible causes of speciation in the case of marine crypticism (Knowlton 1993). Recently, a study on the polychaete *Pectinaria koreni* revealed the existence of monophyletic lineages along the north coast of France (Jolly *et al.* 2005) involving allopatric processes. Likewise, Kruse & Reise (2003) revealed that the polychaete *Scoloplos armiger* in the Wadden Sea was actually composed of two sibling species living in distinct intertidal and subtidal areas. The genetic break between populations of *P. koreni* matches with the biogeographic boundary between Lusitanian and Boreal provinces whereas the distribution of sibling lineages in *S. armiger* coincides with a bathymetric preference. The occurrence of two opposing reproductive strategies (brooding vs. pelagic larvae) in this latter species has reinforced the lineages divergence, supporting the idea of an environmental role in speciation processes (Kruse *et al.* 2004).

In marine habitats, recently colonized areas can also be very informative in terms of mechanisms whereby a species expands and competes for space and thus to test

whether crypticism is reflecting overlapping ranges or habitat specialization. Indeed colonization mainly depends on factors such as the dispersal ability of species (Goldson *et al.* 2001), local hydrodynamic regimes (Wares *et al.* 2001; Waters & Roy 2004) and ecological preferences (Wiens 2004). The English Channel is a relatively young geographic area, which was only completely open as a channel some 10 000–8000 years ago (Smith 1989; Lambeck 1997). Since the last glacial maximum (18 000–24 000 years), many ecological niches became available for native species from both the Atlantic Ocean and the North Sea. Moreover, the western entrance of the English Channel is a well-known biogeographic limit between the Lusitanian and the Boreal provinces (Cabiocch *et al.* 1977; see Dinter 2001 and cited references) and thus an interesting area to explore when considering vicariance or ecotypic differentiation. The goal of this study is to examine how each of these processes may have influenced speciation in invertebrates associated with highly fragmented habitats such as the sandy-bottom habitat.

Sibling species have been massively reported within the echinoderm group (Matsuoka & Hatanaka 1991; Baric & Sturmbauer 1999) and even observed for a sea urchin species inhabiting sandy sediments along the coasts of north-western Europe (Chenuil & Féral 2003). Sibling species have also been observed in polychaete species of the *Abra alba*–*Pectinaria koreni* community (Jolly *et al.* 2006). These latter findings allowed us to focus on the most commonly found echinoderm in these sandy-bottom habitat community, the brittle-star *Acrocnida brachiata* (Montagu) (Gentil *et al.* 1986), which can be suspected to also hide cryptic species. It is widely distributed at the subtidal level in the Northeast Atlantic, from the Mediterranean to the British Isles and to the North Sea, but is never encountered above 56°N (Koehler 1921). This brittle star is often observed as densely populated aggregates in sandy-bottom habitat in subtidal (i.e. 1000 individuals per m² in Ireland, Keegan & Konnecker 1979; 900 individuals per m² on the coasts of Normandy, Gentil & Zakardjian 1989). Its presence at the intertidal level seems much more restricted, to the Irish and Brittany areas where populations are sparsely distributed (less than 100 individuals per m² on the coasts of Brittany, Bourgoin 1987; D. Muths, personal observation). Unlike the polychaete species *Pectinaria koreni* and *Owenia fusiformis* studied by Jolly *et al.* (2005, 2006), with which it co-occurs, *A. brachiata* is suspected to have poor dispersal capacities. *A. brachiata* therefore constitutes an ideal candidate to investigate whether taxa exhibiting different life-history traits but the same habitat share a vicariant history and possibly, to evaluate whether local adaptation (intertidal vs. subtidal habitats) or local hybridization could interfere with these historical patterns.

This study was conducted on 17 populations of *A. brachiata* sampled among subtidal and intertidal areas along the

Table 1 Geographic position and habitat of *Acrocnida brachiata* samples and sample sizes used in the allozymes and mitochondrial surveys

Population	Label	Habitat	Latitude	Longitude	N allozymes	N COI
Pouldu	PO	Subtidal	47°44.06'N	4°31.91'W	26	18
Concarneau	CC	Subtidal	47°51.50'N	3°57.50'W	—	7
Bay Forest	BF†	Intertidal	47°53.42'N	3°57.48'W	48	25
Sub Forest	SF	Subtidal	47°52.30'N	3°58.12'W	36	12
Morgat	Mo†	Intertidal	48°13.54'N	4°30.30'W	35	26
Aber	PA†	Intertidal	48°13.661'N	4°25.891'W	48	20
Lannion-I	LI†	Intertidal	48°40.75'N	3°36.41'W	47	27
Lannion-S	LS	Subtidal	48°44.95'N	3°36.50'W	11	9
Saint Brieu	SB†	Intertidal	48°33.08'N	02°41.24'W	48	15
Baie des Veys	BV	Subtidal	49°32.00'N	1°15.50'W	48	26
Utah Beach	UB†	Intertidal	49°25.04'N	1°10.32'W	48	23
Baie de Seine	BS	Subtidal	49°28.30'N	0°02.28'E	35	31
Cardigan Bay	CB	Subtidal	52°51.23'N	4°11.42'W	35	21
Redwharf Bay	RB	Subtidal	53°20.10'N	4°07.13'W	48	39
Colwyn Bay	Co	Subtidal	53°25.75'N	3°30.06'W	20	19
Rye Bay	RY	Subtidal	50°53.44'N	0°53.45'E	—	19
St Austell Bay	SA	Subtidal	50°18.97'N	4°44.94'W	—	21

† indicates that populations were collected in the intertidal zone.

coasts of Brittany, the English Channel and the Irish sea using five polymorphic enzyme loci and a 598-bp portion of the mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene.

Materials and methods

Larval development of *Acrocnida brachiata*

To have a rough idea of real dispersal capacities, observations of larval development in *Acrocnida brachiata* have been performed. They were made under a light microscope by F. Gentil in July 1993. Larvae were obtained in aquaria after a spontaneous spawning of adults collected at low tide on the shore of Morgat Bay (see Table 1 for site information). Larvae were regularly sampled from water collection during 4 days to follow larval development until subsequent metamorphosis.

Sampling sites

Subtidal samples of *A. brachiata* were obtained by sampling the top 10 cm of sediment with a 0.25 m² Hamon grab. Populations from the English Channel, the Irish Sea and South Brittany were sampled during the PECTGENE 2000, the PECTIRL 2004, and the OPHIROIS 2005 cruises, respectively. All six intertidal populations were collected along Brittany and Normandy coasts at low tide in 2004 or 2005. Geographic coordinates, sample labels and sizes are given in Table 1 and reported in Fig. 1. Individuals were frozen in liquid nitrogen, except samples from southern England and Concarneau, which were stored at -32 °C.

Enzyme electrophoresis

Each individual was divided into two parts: the disk-shaped body for enzyme electrophoresis and arms for DNA extraction. Electrophoresis procedures were performed according to the methods described by Pasteur *et al.* (1987). Frozen samples of the body were homogenized using a potter with 250 µL of grinding buffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0.05% β-mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF, 0.25 mM sucrose; pH 6.8), prior to centrifugation at 6500 g for 12 min. The supernatant was stored at -80 °C until electrophoresis. Horizontal enzyme electrophoresis was conducted on 12% starch gels for the five enzyme systems that were found polymorphic using the following buffers: (1) Tris-Borate-EDTA, pH 8.6 for the glucose phosphate isomerase (*PGI*, E.C. 5.3.1.9), mannose phosphate isomerase (*MPI*, E.C. 5.3.1.8) and malic enzyme (*ME*, E.C. 1.1.1.40), and (2) Tris-HCl, pH 8.5 for the phosphoglucosmutase (*PGM*, E.C. 5.4.2.2) and hexokinase (*HK*, E.C. 2.7.1.1). Buffer systems were run at constant amperage, during 5 h [160 V, 35 mA for system (1) and at 150 V, 40 mA, for system (2)]. The most frequent allele was called '100' and other alleles were labelled according to their relative mobility from allele 100.

Mitochondrial COI sequencing

Total genomic DNA was extracted according to the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) extraction protocol as described in Jolly *et al.* (2003). Specific polymerase chain reaction (PCR) primers (Ab-COI_f: 5'-ATTTGGAAACTG-ACTYGTCC-3' and Ab-COI_r: 5'-GTYGCTGCTGTRAAR-TAGG-3') were designed from conserved regions of

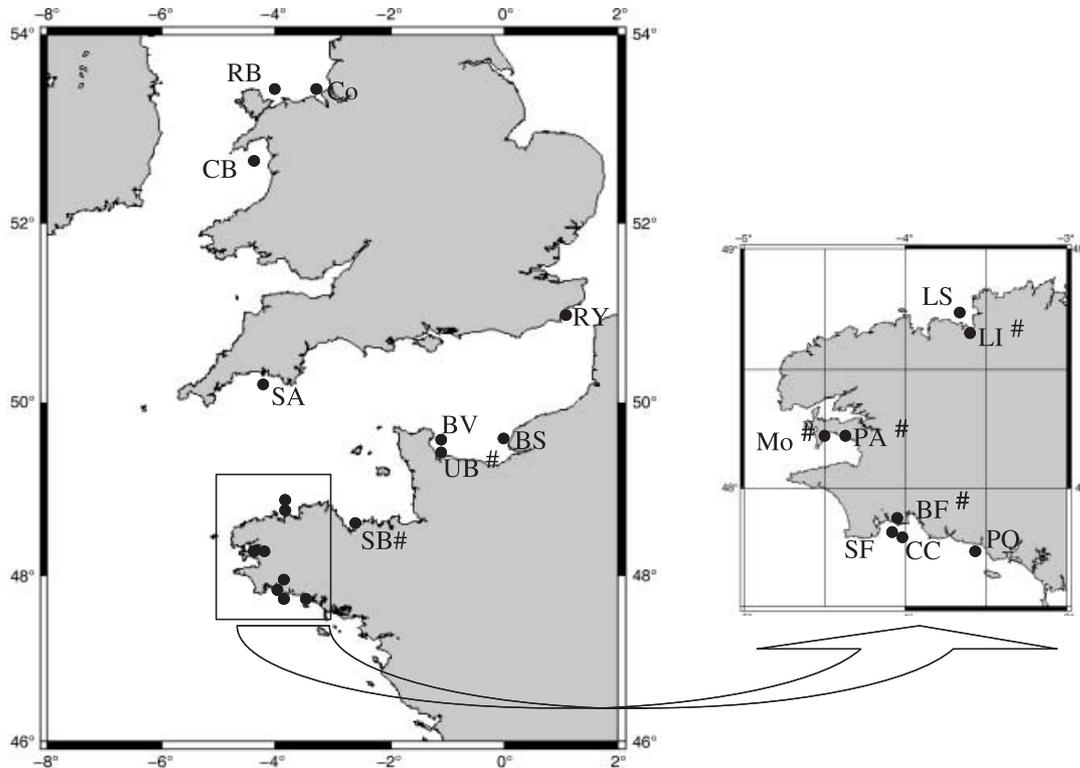


Fig. 1 Geographic location of *Acrocnida brachiata* populations used in the study. Population labels are presented in Table 1. # indicates that populations were collected in the intertidal.

sequences of the whole cytochrome oxidase I (COI) gene previously obtained from 10 specimens of ophiuroids using primers based on COI regions conserved in invertebrates (McMullin *et al.* 2003). Ab-COI_f and Ab-COI_r amplify a 598-bp fragment of the COI gene. Reactions were performed in 27 μ L containing 1 \times PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 25 μ M of each dNTP, 0.2 μ M of each primer, 0.5 U of Thermoprime Plus *Taq* polymerase (Abgene), 25 ng CTAB-extracted genomic DNA. Cycling parameters were 94 $^{\circ}$ C for 5 min, followed by 40 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 45 s, 54 $^{\circ}$ C for 60 s, and 72 $^{\circ}$ C for 70 s and a final elongation at 72 $^{\circ}$ C for 7 min. PCR products were purified before sequencing using BigDye terminator chemistry (PerkinElmer) on an ABI 3100 sequencer, following the manufacturer's protocol. Sequences were run in both directions. They were checked and edited using CHROMAS version 1.6 (McCarthy 1997) and aligned using CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) in BIOEDIT Sequence Alignment Editor (Hall 1999). Sequences were submitted to GenBank (Accession nos DQ507450–507799).

Data analyses

Allozymes. For each population, allele frequencies, the average number of alleles per population (N_{all}), the observed (H_{O}) and expected (H_{nb}) heterozygosities were

estimated using GENEPOP 3.3 software (Raymond & Rousset 1995) whereas allelic richness (R_s) was estimated with FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995). The null hypothesis of independence of loci was tested within each sample based on a statistical genotypic disequilibrium analysis across loci using GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995). An UPGMA-based tree was constructed with POPULATION 1.2.28 software (Langella 2002) using Reynolds's distance (Reynolds *et al.* 1983). Homogeneity of allele distributions across samples was examined using exact tests using GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995). Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were tested in each population, at each locus, by calculating Wright's fixation index F_{IS} as estimated by Weir & Cockerham (1984) and a Fisher's exact test was also calculated with this software. The pairwise level of genetic differentiation was analysed by calculating the estimator θ of Weir & Cockerham (1984) for each locus. An F_{ST} -based hierarchical analysis was used to determine the hierarchical relative part of the genetic variance using ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2001). Partition was made between 'among groups' (Φ_{SC} fixation index), 'among populations within groups' (Φ_{CT}) and 'within populations' (Φ_{ST}). Groups were defined according to geography: South Brittany (Po, BF, SF, PA), English Channel (LS, BV, BS) and Irish Sea (CB, RB, Co). Isolation by

distance was tested using a Mantel test with GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995). Geographic distances between localities were estimated by calculating linear distances along the coastline using Great Circle Calculator (available at www.gb3piorg.uk/great.html). Geographic distances were plotted against $\theta/(1 - \theta)$ estimates to test for a linear relationship following the recommendations of Rousset (1997).

Mitochondrial COI sequences. For each population, haplotype (H_{e-hap}) and nucleotide (π) diversities were estimated with DNASP 4.0 (Rozas *et al.* 2003). A neighbour-joining tree, based on Kimura 2-parameter distance was constructed using MEGA 2.1 (Kumar *et al.* 2001), and *Amphiura filiformis*, its nearest related species, as the outgroup. Relative constancy rate of a molecular clock was tested and average pairwise distances between populations were estimated using the same software. Pairwise values of genetic differentiation (Φ_{ST}) were calculated with ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2001). This latter software was also used to perform an analysis of molecular variance (AMOVA) on populations. Partition of the data set was similar to that performed for allozymes with the St Austell Bay population added to the Irish Sea group and the Rye Bay one added to the English Channel group. Median-joining networks (Bandelt *et al.* 1999) were constructed using NETWORK 4.1.0.7 (available at www.fluxus-technology.com/).

Asymmetric gene flow and migration patterns among populations were estimated using the coalescent approach as implemented in the software package MIGRATE-N (Beerli & Felsenstein 2001). Past gene flow was obtained from a n -island migration model using 10 short chains with 500 steps and 3 long chains with 5000 steps, with 10 000 non-retained genealogies sampled at the beginning of each chain. A first run was made with our theta estimates (i.e. π values). A 10-replicate run was then conducted using results of the first run with random tree as data type option. Runs were compared until results became convergent.

Tajima's (1989) D statistic was calculated as an index of departure from population equilibrium using DNASP 4.0 (Rozas *et al.* 2003). Mismatch curves were created with the same software package. A sliding-window analysis was conducted along sequences to further examine the distri-

bution of nucleotide diversity (π) and Tajima's D statistic over the sequences in order to localize local departures from neutrality. Departure from neutral evolution was examined using a McDonald & Kreitman (1991) test, using DNASP 4.0 (Rozas *et al.* 2003). This method compares the distribution of synonymous and nonsynonymous differences that have been fixed between two taxa (K_N/K_S ratio) and the distribution of synonymous and nonsynonymous polymorphic sites accumulated within each species (θ_N/θ_S ratio). If K_N/K_S is significantly greater than θ_N/θ_S then at least one lineage may have evolved under positive Darwinian selection whereas, in the opposite case, it may indicate either the selective maintenance of ancestral polymorphism between species or the emergence of an adaptive polymorphism in one species.

Genetic markers were also used to perform assignment tests in order to detect potential hybridization in *A. brachiata*. Assignment tests were done with the software GENECLASS version 2 (Piry *et al.* 2004) using Rannala & Mountain's criterion (1997) and Paetkau *et al.*'s simulation algorithm (2004) with 10 000 simulated individuals. First, partition of the data set was made on the basis of mtCOI signature (two groups defined; see Results) and then assignment tests were performed on multilocus allozyme data. At the end of the first simulation, misassigned individuals (i.e. individuals displaying a mitochondrial signature characteristic from one group and a nuclear genotype typical of the other group) were removed from the data set and additional simulations were carried out until all individuals were successfully assigned.

Results

Larval development of *Acrocnicida brachiata*

Observations of larval development of *Acrocnicida brachiata* are presented in Fig. 2. The two-arm pluteus stage was reached after only 6 h. The length of the arms rapidly increased then and was followed by the growth of the body until metamorphose. Because of abbreviated development, changes in the pluteus shape are very limited, e.g. post-erodorsal arms are absent, in comparison with other echinoderms. Complete development occurred in 4 days

Table 2 Allozyme diversities in populations of *Acrocnicida brachiata*. N_{all} , number of alleles per locus; H_O , observed heterozygosity; H_{nb} , unbiased heterozygosity (Nei 1987); R_s , allelic richness estimated from a minimal sample size of 10 individuals

	PO	SF	LS	BV	BS	CB	RB	Co	BF+	Mo+	PA+	LI+	SB+	UB+
N	26	38	11	48	35	35	48	20	47	35	48	47	48	48
N_{all}	3.2	3.6	2.6	3.8	3	4	4	3.2	3.8	3.8	3.2	3.6	3.6	3.4
H_{nb}	0.460	0.457	0.425	0.393	0.437	0.502	0.536	0.494	0.470	0.366	0.328	0.471	0.442	0.407
H_O	0.423	0.4847	0.382	0.383	0.406	0.406	0.421	0.320	0.327	0.383	0.300	0.447	0.367	0.400
R_s	2.7	3.0	2.6	2.9	2.6	3.3	3.1	3.1	3.1	2.9	2.6	2.9	3.0	2.8

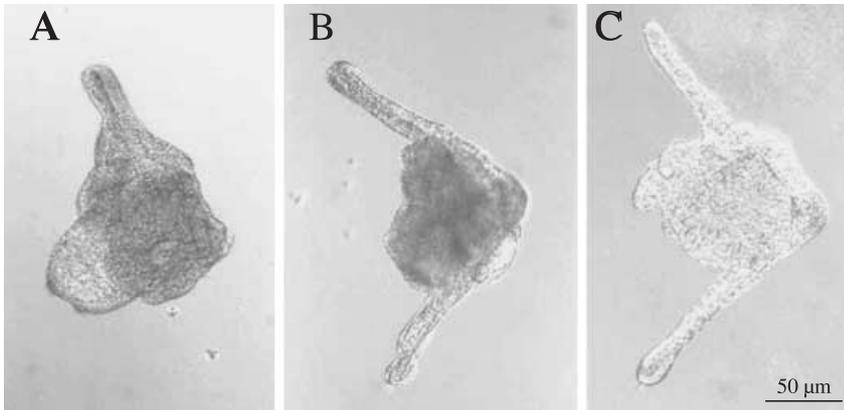


Fig. 2 Photographs depicting the larval development of intertidal specimens of *A. brachiata* made under light microscope. Less than three days separate the 1st from the 3rd picture: (A) 6-h-old larva; (B) 36-h endotrophic pluteus with two arm; and (C) 60-h-old pluteus, metamorphosis started and the juvenile skeletal architecture is appearing.

in aquaria under *in situ* conditions (i.e. aquaria were directly supplemented with nonfiltered open sea water) and is thus thought to be very reduced in natural conditions. This coincides with the type II of ophiuroid developmental mode with a short-lived lecithotrophic larva (Mortensen 1921).

Allozymes

Five polymorphic enzyme loci were screened during this study. The number of alleles varied from 3 to 7 (see Table 2), with an average of 5.4 (± 1.8). Allelic richness was quite similar between populations. Allele frequencies (f) highlight the occurrence of a marked genetic structure for at least three out of five loci (*Hk*, *Pgm*, *Pgi*) and for two to four alleles per locus (Fig. 2). While five of the six intertidal populations (all except Bay Forest) were characterized by high frequencies of alleles *Hk-90* and *Hk-95* ($f > 0.95$), the most frequent alleles in the subtidal populations were *Hk-100* and *Hk-105* ($f > 0.95$). Although alleles *Hk-95*, *Hk-100* and *Hk-105* appeared in nearly all populations, *Hk-80* and *Hk-90* were exclusive of intertidal populations whereas *Hk-110* was only found in subtidal ones. The *Pgm* and *Pgi* loci show similar, but less pronounced, patterns of frequency inversions (see Fig. 3). Moreover, allele frequencies of Lannion-intertidal vs. Lannion-subtidal samples or Utah Beach vs. Baie des Veys samples clearly showed an allozyme profile that was less similar between two close populations inhabiting different bathymetric levels than between two populations of similar depth but distant by thousands of kilometres. This important allele-frequency break between intertidal and subtidal populations suggests the existence of two distinct genetic groups that does not correspond to the geographic position of samples but to their bathymetry over the shore. However, unlike the other intertidal populations, population from Bay Forest showed an allozyme frequency profile similar to that of the subtidal populations, which contrasted with the other intertidal populations.

The UPGMA tree obtained using Reynolds distances highlights a major genetic split between intertidal and

subtidal populations (Fig. 4), with the exception of the intertidal population from Bay Forest grouping within the clade S with subtidal populations. However most bootstrap values were weak. The position of Bay Forest inside the subtidal clade may be indicative of a range limit of the intertidal clade in the Atlantic (one clade being replaced by the other in this context). A hierarchical analysis of variance was used to test the significance of the clustering by partitioning the genetic variance between and within these two clades. Although most of the genetic variation was explained by population heterogeneity (76.02% of the total variation: $\Phi_{ST} = 0.24$; $P < 0.01$), variations between clades (18.90%) or between populations within clades (5.08%) were also significant ($\Phi_{CT} = 0.19$ and $\Phi_{SC} = 0.06$; $P < 0.01$).

Genotypic disequilibrium was not detected across loci when calculated within each clade ($P > 0.05$), indicating that loci give independent information. Association among loci was, however, detected at some subtidal populations located in the Irish Sea and some intertidal populations along the Brittany coastline: *Me-Mpi* in Colwyn Bay, Cardigan Bay and Redwharf Bay populations ($P < 0.05$), for *Hk-Pgi* at Redwharf Bay ($P < 0.05$), for *Pgm-Pgi* at Morgat ($P < 0.01$) and *Pgi-Me* at Lannion-I ($P < 0.01$). Monolocus and multilocus F_{IS} values are presented separately for each clade in Table 3 (A, B). Heterozygote deficiencies were observed in all populations. These departures from Hardy–Weinberg proportions were highly significant for six out of the nine populations of clade S and four out of five populations of clade I. Values in clade S ranged from -0.048 for Sub Forest to 0.416 for Colwyn Bay. The three Irish Sea populations together with Bay Forest displayed the highest F_{IS} values compared to the five other populations. Values in clade I ranged from -0.003 for Utah Beach to 0.241 for Saint Brieuc and were highest along the Brittany coast.

Using Weir & Cockerham's (1984) estimator θ , pairwise genetic differentiation was calculated separately for each clade; values are presented in Table 4 (A, B). All pairwise θ values were significantly different from zero in clade I

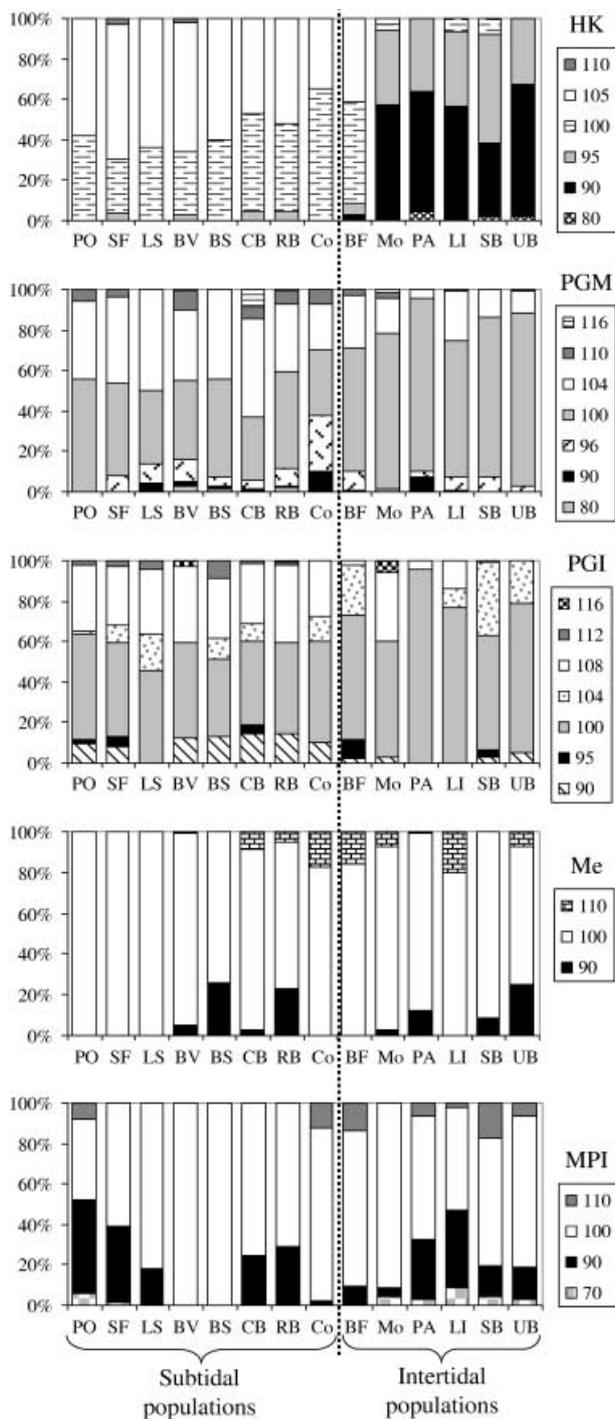


Fig. 3 Allele frequencies at the five enzyme loci in populations of *Acrocnida brachiata* sampled in subtidal and in intertidal habitats.

($0.04 < \theta < 0.11$; all $P < 0.01$) whereas several were not in clade S ($0 < \theta < 0.13$; see P values in Table 4A). The overall multilocus θ estimate was lower for clade S than for clade I (0.051 and 0.071, respectively). An AMOVA based on geography was performed for clade S but was not significant

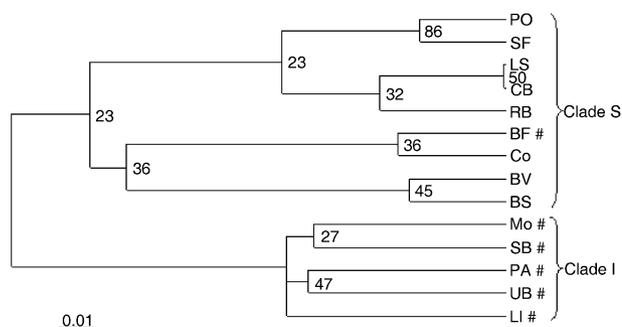


Fig. 4 UPGMA tree showing the genetic relationship between populations of *Acrocnida brachiata* using allozyme data and Reynold *et al.*'s (1983) distance. The number above branches indicates bootstrap confidence values, with 1000 resampling of the data set.

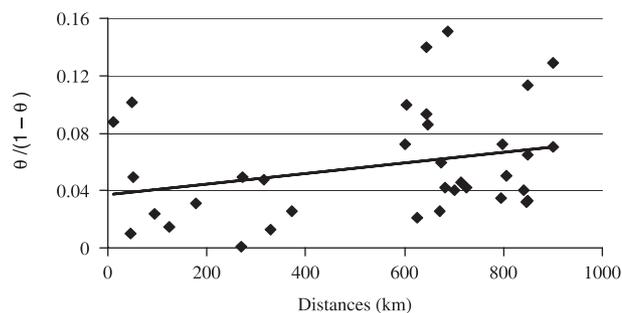


Fig. 5 Isolation-by-distance graph showing pairwise genetic distance $\theta/(1 - \theta)$ plotted against geographical distances for populations of clade S of *Acrocnida brachiata* (test Mantel, $P = 0.06$)

across the three main geographic groups ($\Phi_{CT} = 0.02$; $P > 0.05$). More variance was found 'within populations' than 'among populations' (93.8% and 4.3%, respectively). Values of fixation indices were weak ($\Phi_{SC} = 0.04$ and $\Phi_{ST} = 0.06$). Although marginally significant, a pattern of isolation by distance was observed in clade S ($P = 0.06$, Mantel test; see Fig. 5), but not in clade I ($P = 0.94$).

Mitochondrial COI

The sequencing of the 598-bp mtCOI gene revealed a high level of nucleotide and haplotype polymorphism. Sequence analysis indicated the occurrence of 168 polymorphic sites, from which 151 different haplotypes could be detected. From this data set, 77.9% of the sites were parsimoniously informative and 22.1% were singletons. A neighbour-joining tree based on average pairwise distances between mtCOI sequences across populations is presented in Fig. 6 and shows a deep nucleotide divergence (19.6%) between intertidal populations (with the exception of Bay Forest) and subtidal populations. The Aber population was split into two subpopulations, each within one clade (PA-a in

Table 3 Mono- and multilocus estimates of the fixation index F_{IS} within each population of (A) the subtidal clade of *Acrocrida brachiata* and (B) the intertidal clade. Test of significance were performed with GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

A	PO	SF	LS	BV	BS	CB	RB	Co	BF†
<i>Hk</i>	-0.084	-0.143	-0.538	-0.121	0.299	0.273	0.193	-0.073	0.269***
<i>Pgm</i>	0.232	0.053	-0.000	0.182*	0.004	0.269***	0.270*	0.358	0.188
<i>Pgi</i>	0.016	-0.138	0.484	-0.093	0.032*	-0.074*	0.150	0.329*	0.290***
<i>Me</i>	—	—	—	0.305	-0.033	0.460*	0.377**	0.835**	0.299
<i>Mpi</i>	0.143**	-0.012	0.429			0.314	0.103	0.633*	0.567***
<i>Multilocus average</i>	0.061*	-0.048	0.075	0.055*	0.060	0.248***	0.219**	0.416***	0.323***

B	Mo†	PA†	LI†	SB†	UB†
<i>Hk</i>	-0.002	0.035	-0.032*	0.252*	-0.021
<i>Pgm</i>	0.022	-0.101	0.267*	0.053	-0.118
<i>Pgi</i>	-0.386**	-0.033	-0.205	-0.386***	-0.167
<i>Me</i>	0.238	0.567***	0.284	0.732***	0.350**
<i>Mpi</i>	0.477**	0.032	-0.008*	0.554***	-0.061
<i>Multilocus average</i>	0.070**	0.100*	0.061***	0.241***	-0.003

Table 4 Pairwise values of genetic differentiation of *Acrocrida brachiata* clade S (A) and of clade I (B). Multilocus Weir & Cockerham's (1984) θ values obtained from the enzyme data set are in bold, below the diagonal with test of significance performed with GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995) Pairwise ϕ_{ST} values obtained from the mtCOI sequences data set are above the diagonal with test of significance performed with ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2001). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (— indicates unavailable values)

A	PO	CC	BF4	SF	LS	BV	BS	CB	RB	Co	SA	RY
PO		0.000	0.000	0.017	0.000	0.007	0.011	0.000	0.009	0.000	0.029	0.003
CC			0.005	0.048	0.003	0.000	0.009	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000
BF #	0.092***	—		0.002	0.000	0.021	0.019*	0.006	0.016	0.004	0.046*	0.009
SF	0.010	—	0.081***		0.101**	0.140**	0.113**	0.100	0.082*	0.132	0.203*	0.106*
LS	0.045*	—	0.047***	0.001		0.013	0.000	0.000	0.001	0.002	0.045	0.001
BV	0.123***	—	0.091***	0.067***	0.013		0.018	0.000	0.011	0.000	0.000	0.004
BS	0.131***	—	0.079***	0.085***	0.025*	0.023***		0.000	0.000	0.002	0.042**	0.014
CB	0.044***	—	0.056***	0.025***	-0.010	0.040***	0.040***		0.000	0.000	0.016	0.003
RB	0.039***	—	0.067***	0.034***	0.021	0.048***	0.031***	0.014*		0.002	0.043	0.006
Co	0.114***	—	0.032*	0.102***	0.039	0.061***	0.066***	0.030***	0.047***		0.000	0.000
SA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.027

B	Mo†	PA-b†	LI†	SB†	UB†
Mo #			0.100*	0.019	0.078*
PA-b #	0.105***			0.036	0.066
LI #	0.080***	0.043***			0.029
SB 9	0.090***	0.092***	0.065***		0.005
UB 9	0.074***	0.043***	0.057***	0.060***	0.011

clade S and PA-b in clade I). This deep divergence contrasted greatly with the average pairwise distances: within each clade, populations showed less than 1% of divergence. Relative constancy rate of a molecular clock was not rejected ($P > 0.05$) when considering the neighbour-joining tree, allowing us to estimate the time elapsed since the divergence of the two clades. Applying the substitution rate previously published by Bermingham & Lessios (1993)

for sea urchins (i.e. 2% substitutions per million years), a value commonly used for animals (Rand 1994), divergence of 19.6% corresponds to a divergence time of about 5 million years. As a comparison, divergence between *A. brachiata* and *Amphiura filiformis* (the outgroup), its nearest related species, was about 29.8%.

Since divergence between groups was very deep, each clade was analysed separately. Levels of genetic diversities

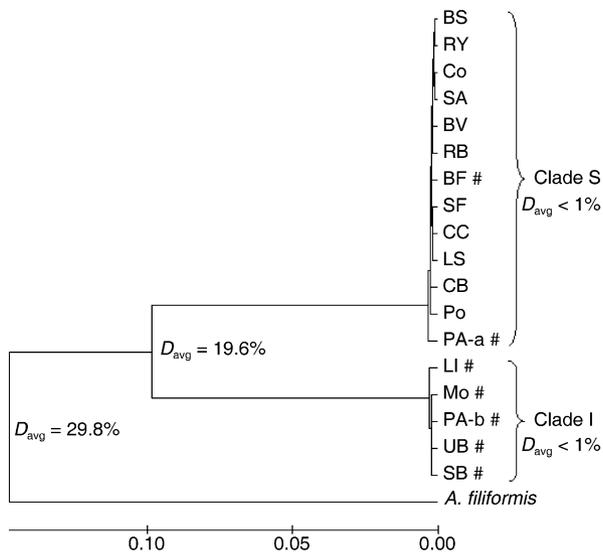


Fig. 6 Neighbour-joining tree of *Acrocnida brachiata* populations based on average pairwise distances between mtCOI sequences of *A. brachiata* individuals across populations using Kimura 2-parameter distance method (Kimura 1980). D_{avg} is the average divergence between the two clades using the same distance method.

within populations of each clade are provided in Table 5A (clade S) and Table 5B (clade I). For both clades, the mean haplotype diversity (H_{e-hap}) and mean nucleotide diversity (π) were of the same order of magnitude, approximately 0.92 and 0.005, respectively.

The haplotype distribution for each clade over the sampling area is shown in Fig. 7(A, B). Populations of clade S only shared 20 haplotypes out of 104 although at very different frequencies. The proportion of ‘private’ haplotypes varied from 35% to 63% with smaller values in the Irish Sea populations and higher values in South Brittany populations. Populations from clade I shared 6 haplotypes out of 47. Pairwise Φ_{ST} estimates obtained from mtCOI sequences

are presented in Table 4 (A, B). Most Φ_{ST} values were weak and nonsignificant in both clades. Sub Forest appeared very different from other subtidal populations, mainly due to a haplotype (HS1) for which the frequency was twice as low as in the other populations. An AMOVA was also performed according to geography within clade S. Even if most of the variance (69%) was still associated with the ‘within population’ level ($\Phi_{ST} = 0.31, P < 0.01$), differentiation was also significant across geographic groups ($\Phi_{CT} = 0.15, P < 0.05$).

Estimated gene flows between the three geographic regions were very asymmetric (Table 6). Most migrants originated from South Brittany with more individuals colonizing the Irish Sea than the English Channel. Although slight, migrations appeared also asymmetric between the Irish Sea and the English Channel with gene flow orientated towards the English Channel by one order of magnitude.

Haplotype networks are presented in Fig. 8. The network drawn for the clade S revealed a ‘star-like distribution’ with one common haplotype (HS1), found in all populations (Fig. 8A). Most divergent haplotypes directly originated from this haplotype with a maximum divergent branch length of nine mutational steps. Nonsynonymous substitutions were homogeneously distributed over the network. The network drawn for clade I revealed a more complex structure (Fig. 8B). The five intertidal populations shared four main haplotypes plus a highly divergent branch made of eight haplotypes presenting a maximum length of 14 mutational steps from haplotype HI1 that only occurred in Lannion-I specimens. As opposed to clade S, nonsynonymous mutations were mostly found around haplotype HI2.

Mismatch distributions created for each clade are presented in Fig. 9(A, B). Distributions were unimodal with negative and significant Tajima’s D values ($D = -2.455, P < 0.001$ for clade S, and $D = -1.956, P < 0.05$ for clade I). These negative values indicated an excess of low frequency variants that could be due to either a selective sweep or a population size expansion.

Table 5 Mitochondrial COI gene diversities for the 13 populations of *Acrocnida brachiata* of clade S (A) and of clade I (B) (PA-a and PA-b corresponds to individuals of the population from Aber that display, respectively, a subtidal or an intertidal mtCOI signature). N , number of sequences; h , number of haplotypes by populations; H_{e-hap} , haplotype diversity; π , nucleotide diversity

A	PO	CC	BF+	SF	PA-a+	LS	BV	BS	CB	RB	Co	RY	SA	clade S
N	18	7	25	12	4	9	26	31	21	39	19	19	21	243
h	15	5	20	11	3	7	14	18	14	21	13	9	13	104
H_{e-hap}	0.961	0.857	0.973	0.985	0.833	0.944	0.874	0.916	0.938	0.938	0.906	0.778	0.929	0.927
π	0.0064	0.0038	0.0060	0.0064	0.0047	0.0046	0.0054	0.0047	0.0068	0.0060	0.0041	0.0033	0.0015	0.0054
B	Mo+		PA-b+			LI+		SB+		UB+		clade I		
N	26		16			27		15		23		107		
h	15		11			18		9		10		47		
H_{e-hap}	0.898		0.933			0.960		0.914		0.885		0.923		
π	0.0052		0.0047			0.0072		0.0051		0.0048		0.0058		

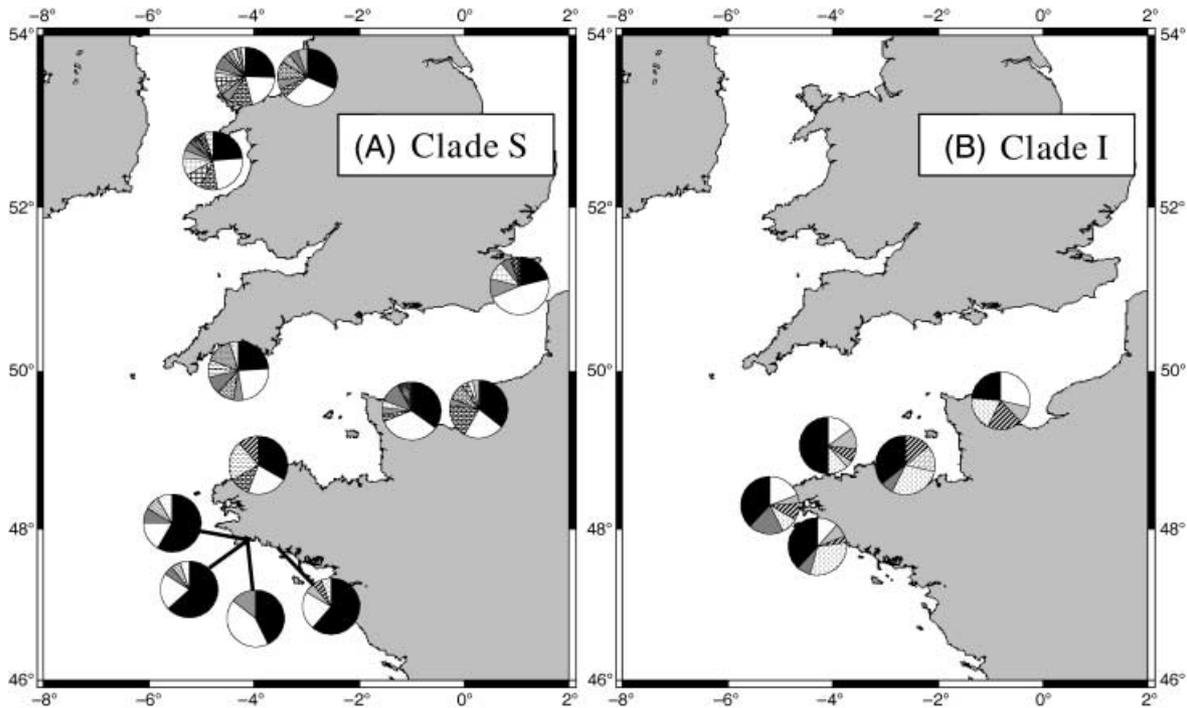


Fig. 7 Map showing the distribution of mtCOI haplotypes among populations of *Acrocnida brachiata* that belong to clade S (A) and clade I (B). Black slice symbolizes private haplotype and other slices represent shared haplotypes between populations within each clade.

Table 6 Gene flow estimates (Nm) between main geographic regions obtained by MIGRATE-N simulations for clade S of *Acrocnida brachiata*. Donating populations are in columns (with estimates of Θ , the parameter representing the effective population size) and receiving populations are in rows

	South Brittany (0.0858)	English Channel (0.0014)	Irish Sea (0.0062)
South Brittany	*	0.03	0.58
English Channel	525.82	*	207.94
Irish Sea	1432.83	19.13	*

Nearly all substitutions (89.4%) occurred on the third codon position but 22 were found to be nonsynonymous. Because only two nonsynonymous mutations were fixed between clades, a search for a positive selective effect within clades was performed along sequences. No significant variation was observed either in the distribution of the nucleotide diversity (π) or in the Tajima's D statistic along sequences. However, nonsynonymous/synonymous substitution ratios deviated significantly from neutral expectations (McDonald's G -statistic, $G = 7.017$; $P < 0.01$) with $\theta_N/\theta_S \gg K_N/K_S$ suggesting that positive selection may have occurred at the 'within-clade' level. The mean value of θ_N/θ_S ratio at the intraclade level was of 0.02 for both clades indicating the emergence of adaptive polymorphisms in both lineages.

Search for hybrids between the clades

Sixteen individuals (c. 3% of the all sample) appeared to be misassigned across the two clades. These individuals were all sampled in the intertidal. Out of these 16 brittle-stars, eight individuals [four from Aber (PA-a) and four from Bay Forest (BF)] displayed a subtidal haplotype but presented an intertidal-like nuclear background. On the contrary, eight individuals from Morgat (2), Lannion-I (3) and Saint Briec (3) possessed an intertidal haplotype but were assigned to the subtidal clade based on their allozyme genotype.

Discussion

Emergence of ecotypes in *Acrocnida brachiata*

Both allozymes and mtCOI sequences suggest the existence of a marked habitat-dependent genetic break in the brittle-star *Acrocnida brachiata* along the coasts of northwestern Europe. Inversion of allele frequencies occurred at three enzyme loci, segregating most of the intertidal populations (except the Bay Forest population) from subtidal ones. Mitochondrial COI sequences were clustered into two deeply divergent lineages (c. 20% of divergence), which differentiates the same populations, intertidal vs. subtidal. Although morphologically *A. brachiata* is an easily identifiable

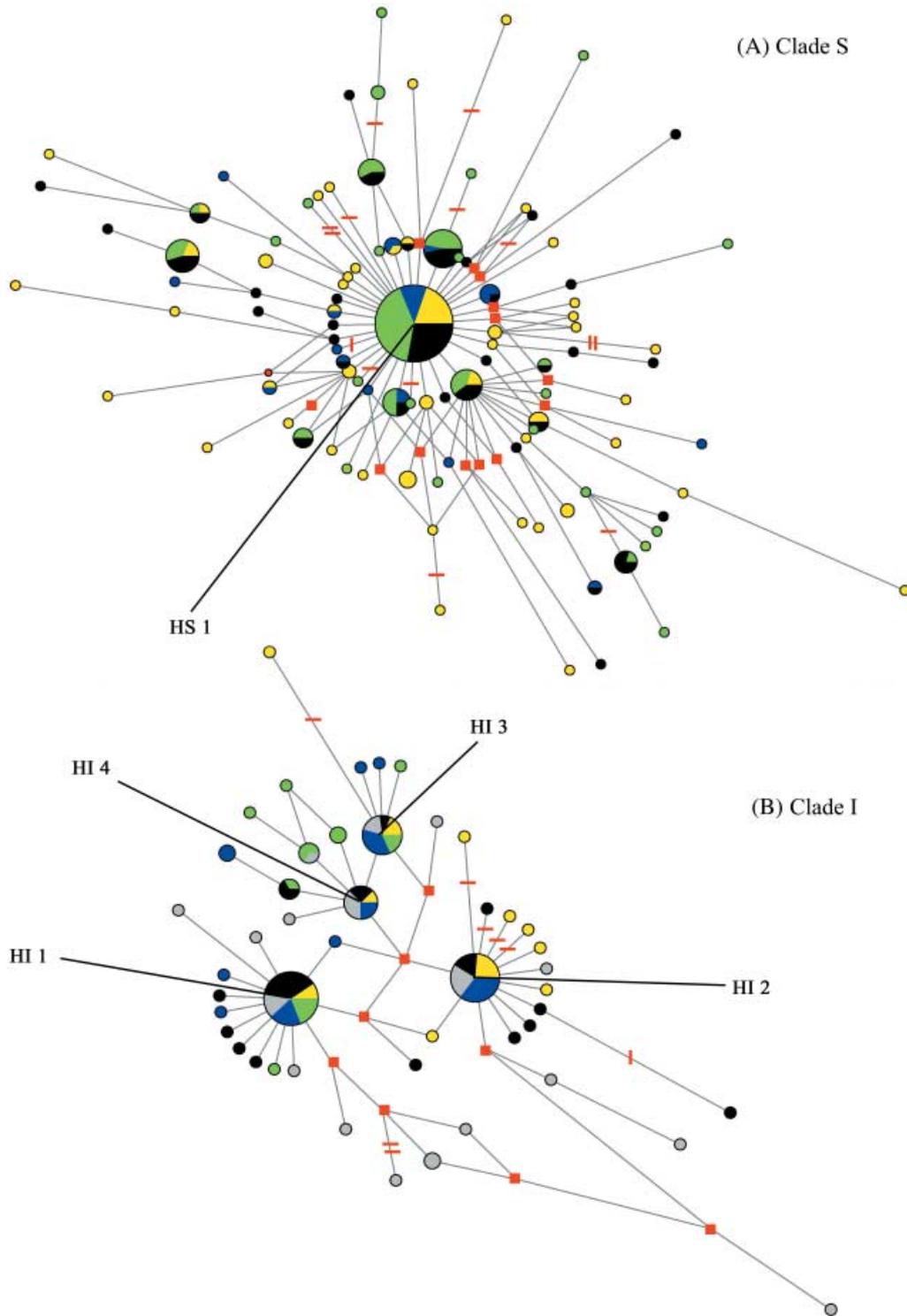


Fig. 8 Haplotype networks representing the evolutionary relationships between mitochondrial haplotypes within clade S (A) and clade I (B). Connecting lines correspond to the number of mutational steps between haplotypes. Red square represents hypothetical haplotype not detected in the study. Red bar indicates a nonsynonymous mutation. Names of the most common haplotypes are indicated. The size of a circle is proportional to the number of individuals observed for a given haplotype and the colour of pie charts represents the regional origin of the haplotype. For clade S, black corresponds to Irish populations (CB, Co, RB), yellow to South Brittany populations (Po, CC, SF, BF), blue to Eastern English Channel populations (BV, BS, RY), green to Western English Channel (SA, LS). For clade I, black corresponds to Morgat, yellow to Aber, blue to Utah Beach, grey to Lannion and green to Saint Brieuc.

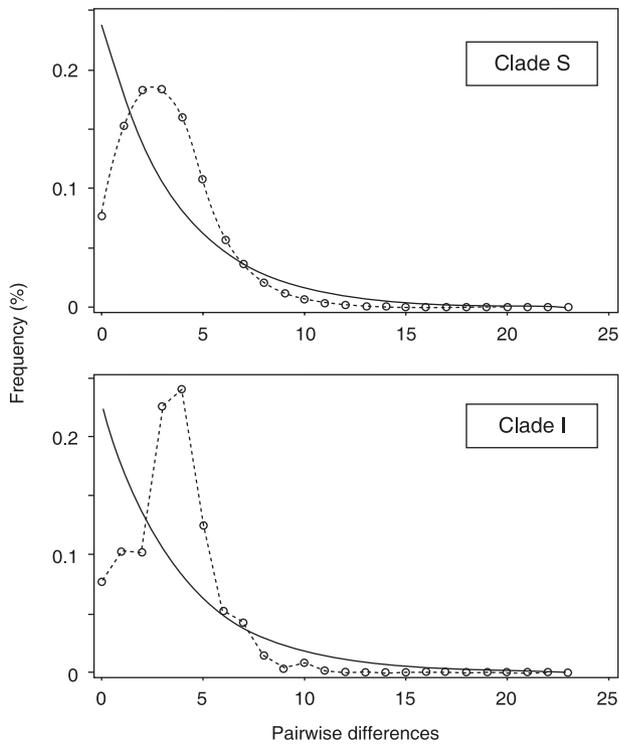


Fig. 9 Mismatch curves obtained for the two clades of *Acrocnida brachiata*. Expected curve under a constant population size is represented by a continuous line and the observed one by a dotted line.

species (Koehler 1921), with no reported plasticity, it is now clear that this echinoderm species should not be regarded as a unique species but as a complex of two old 'sibling' lineages. The average level of genetic differentiation between two populations from the same clade but from different localities is three to five times lower than that found between two populations of the same locality but inhabiting different bathymetric levels (e.g. $\theta = 0.22$ between Lannion-S and Lannion-I whereas $\theta = 0.02$ and 0.06 between Lannion and other populations of clade S and I, respectively). The same level of divergence was encountered across the whole sampling area. Hence, the divergence between these two lineages is probably due to an ancient unique speciation event followed by expansion rather than the result of local selective pressures acting independently within each locality. This poses the intriguing question about speciation mechanisms leading to the emergence of these two lineages. Did populations separate geographically (i.e. allopatric speciation followed by secondary contacts), or did they progressively diverge from a single ancestral area (i.e. sympatric speciation) in which contrasted habitats have favoured reduced gene flow and local adaptation?

Based on previous published substitution rates in echinoderms (Bermingham & Lessios 1993), the level of divergence found between the two clades was estimated to date

back to c. 5 million years ago (divergence of 20% with a mutation rate of 2% per million years), approximately at the time of the Mio–Pliocene transition. This period was characterized by a continentalization of Western Europe (Meulenkamp & Sissingh 2003) as well as major climatic and tectonic changes (Brault *et al.* 2004). During this period, no marine corridors existed between the Atlantic Ocean and the North Sea with the exception of a passage towards the North of the British Isles. Haq *et al.* (1987) showed numerous sea level changes during this period with dramatic increases possibly reaching 100 m in amplitude, 6–5 and 4–3 million years ago, with a period of low levels in between. As a consequence, exchanges were temporarily reduced between the North Sea and the Atlantic Ocean and may have greatly affected migration patterns of marine invertebrates. Continental uplift and decreases in sea level may have influenced processes of differentiation between the two *A. brachiata* clades. One possible scenario is that genetic isolation started during a period of decreasing sea level: one group may have been isolated under colder conditions whereas the other group took refuge in warmer waters (i.e. in different latitudes or different depths). Secondary contacts between the two groups may have then been possible owing to an increase in sea level, the opening of the North Sea Basin and/or the opening of the English Channel (10 000–8000 years). In this case, the introduction of each group to the other group's habitat would have led to local maladaptation, thus reinforcing each clade at a given depth.

Polychaete genera associated with sandy-bottom habitat of Northeastern Atlantic exhibit a similar deep genetic break of about 20% either between closely related species of *Pectinaria* or between the subtidal and intertidal clades of *Owenia fusiformis* (25.9% and 19.2%, respectively; Jolly *et al.* 2006). At present, *A. brachiata* clade I and *O. fusiformis* clade 3 seem to share the same geographic distribution, restricted in the intertidal (Jolly *et al.* 2006). Moreover, divergence of 20.6% was found between two well-identified tubeworm polychaete species from the genus *Sabellaria* that live separately in the subtidal or the intertidal area (F. Rigal, unpublished). The similar level of divergence encountered within several species complexes of the sandy-bottom habitat suggests the occurrence of vicariant events. These species seem to share a similar history at the Mio–Pliocene transition, suggesting allopatric processes through an ancestral separation of the sandy-bottom habitat communities into two distinct refuges, one being probably shallower than the other.

While the Mio–Pliocene transition may have played an important role in allopatric speciation, sympatric differential selective pressures could have contributed to the splitting of *A. brachiata* lineages. Long-term adaptation of brittle stars to different environments may be associated with contrasting levels of physiological tolerance to desiccation,

temperature, or hypoxia, as it is the case for the polychaete *S. armiger* (Kruse *et al.* 2004) and thus may reinforce habitat segregation. However, the sympatric hypotheses could be considered if regarding only the allozyme data but not in the light of our results on mitochondrial sequences. First, the McDonald and Kreitman test was significant but nonsynonymous substitutions accumulated within each lineage, not between them. Second, no variation in the distribution of the nucleotide diversity and of the Tajima's *D*-statistic was detected along sequences. While both findings invalidate (1) the possibilities of ecotypic specialization hypotheses and (2) the maintenance of ancestral polymorphism, they strengthen the supposition of the emergence of adaptive polymorphisms within each lineage after the splitting of the ancestral species. As a consequence, speciation in *A. brachiata* does not seem to have been driven by diversifying selective processes on ecological interactions but is likely the reflection of allopatric events at the Mio–Pliocene transition.

Nonetheless, ecological interactions were probably of crucial importance in the reinforcement and in the bathymetric positioning of the two lineages after they separated. Even if not directly implicated in the emergence of the two lineages, ecological interactions may explain their co-occurrence and relative differentiation within a given locality. A few studies have already shown the influence of bathymetry on the spatial distribution of enzyme alleles (Kirby *et al.* 1994; Schmidt & Rand 2001; Veliz *et al.* 2004). Moreover, postzygotic selection by the way of local retention of pre-adapted larvae or young settlers and selective elimination of nonadapted ones may reinforce the maintenance of the two clades (Bierne *et al.* 2003). A previous fine-scale survey of population dynamics in the Bay of Morgat revealed subtle differences in recruitment periods and gamete maturation between intertidal and subtidal populations (Bourgoin *et al.* 1991). Thus, mismatch in reproductive periods may also contribute to preferential reproduction within lineages and to the continuing isolation of the divergent lineages within a locality. However, ecophysiological experiments are necessary to determine whether the maintenance of *A. brachiata* ecotypes is favoured by differing environmental conditions (e.g. Gardner & Thompson 2001; Edmands & Deimler 2004).

In the present case, hybridization followed by selection against hybrids could also explain the maintenance of both clades at different bathymetric levels after secondary contact. Differences in allele frequencies between intertidal and subtidal ecotypes were quite modest for four allozyme loci (compared to locus *Hk*), possibly reflecting hybridization and different levels of introgression between lineages depending on localities. Moreover, the occurrence of 16 individuals displaying a haplotype from one clade but a nuclear background from the other clade strongly suggests that the splitting of the two lineages is incomplete. Varying

degrees of introgression may explain the observed genotypic disequilibria and high heterozygote deficiencies that were found locally, especially in the Irish Sea (subtidal clade) and in South Brittany (intertidal clade). Furthermore, the level of gene introgression may also alter the patterns of nuclear vs. cytoplasmic differentiation, possibly explaining the greater pairwise population differentiation for allozymes compared to the mitochondrial gene and the lack of clear evidence for an isolation-by-distance pattern in either clade. In any case, the occurrence of hybridization strengthens our scenario of ancestral separation of two ecotypic lineages due to allopatry and reinforcement after secondary contact — as it is the case for other hybrid zones (Kirby *et al.* 1997) — rather than to sympatric differential selection.

Additional studies based on larger sample sizes at a microspatial scale (e.g. in the Bay of Douarnenez) as well as reproductive compatibility trials between the two lineages are now needed to evaluate the level of both hybridization and environmental selection in the positioning of the clades.

Substantial geographic isolation of populations of both ecotypes since their recent range expansion

Analyses of allozyme and mtCOI polymorphisms provided interesting information about the genetic structure and geographic expansion within each clade. High percentage of singletons, low level of intraclade divergence among and within populations (< 1%) and, as previously described, negative significant Tajima's *D* values characterized each clade. Under neutral hypotheses, these characteristics suggest a recent increase in population sizes. The star-like distribution of subtidal haplotypes with a few mutation steps suggests that DNA sequences have diverged little over the Quaternary ice ages, and that the observed mutations are mostly due to postglacial diversification (Hewitt 2000). Demographic explosion could be due to the recent formation of the English Channel and to the colonization of new territories. The catastrophic opening of the Dover Strait with a great volume of water spilled out of the North Sea (Smith 1989) could have promoted the spread of both *A. brachiata* lineages and their admixture over the whole or part of the study area. Water originating from melting ice did not enter directly into the ocean but was accumulated over continental masses and released precipitously into marine habitat (Pirazzoli 1998), driving important sediment movements and the reorganization of communities. However, the two lineages show different colonization patterns, with a more restricted expansion for the clade I. Tajima's *D* value is lower for clade S than for clade I (−2.46 and −1.96, respectively). Accordingly, clade I appears to have a more limited range and may be restricted, in fact, to the western approach of the English Channel and possibly the Irish Sea. Indeed, *A. brachiata* has never been observed in the intertidal area in the Eastern English Channel

and the North Sea (Ursin 1960). Furthermore, the intertidal population from Bay Forest displayed a subtidal genetic signature, which may suggest the replacement of clade I by clade S further south. In addition, because of its limited range, it might be possible that the actual distribution of the lineage also includes its initial location. The occurrence of a large brackish lake (i.e. the Solent lake) prior to the opening of the English Channel could have played the role of such a glacial refuge, as it has been proposed for other intertidal species in the English Channel (Gysels *et al.* 2004; Provan *et al.* 2005). Conversely, the high proportions of 'private' haplotypes in the subtidal populations from South Brittany are concordant with the patterns of asymmetric gene flow estimated using MIGRATE-N towards the English Channel (Table 6): both indicate the occurrence of a massive colonization event of both the Irish Sea and the English Channel from the south, suggesting that clade S may come from a more southern glacial refuge. This scenario fits the one revealed by the work of Jolly *et al.* (2006) where *P. koreni* clade 2 and *O. fusiformis* clade 1 may have persisted in a southern glacial refuge during the last glacial maximum.

Most pairwise enzyme θ values between populations within clade S or within clade I were significantly different from zero, with a high overall level of genetic differentiation. Even in light of some level of hybridization, genetic structure of both clades strongly supports the fact that *A. brachiata* populations are geographically isolated from each other. Despite the lack of isolation-by-distance pattern in clade I, there is a trend towards isolation by distance in clade S. Moreover, hierarchical analyses of differentiation clearly indicate that populations from the Irish Sea, the Atlantic Ocean and the English Channel are significantly isolated from each other ($\Phi_{CT} = 0.15$, $P < 0.05$). The high proportions of 'private' haplotypes in all populations of both clades are congruent with a high degree of isolation between populations. Isolation may be promoted by weak dispersal capacities. Indeed, larval observations in aquaria indicate the occurrence of a very short pelagic developmental stage in *A. brachiata*, at least for clade I. Moreover, *A. brachiata* larvae are absent from plankton and previous studies document low fecundities and large yolky eggs in the species adults for both habitats (Webb & Tyler 1985; Bourgoin 1987; Gentil & Zakardjian 1990). All these observations highlight the very restricted dispersal abilities of this brittle star, for both clade. The influence of the larval planktonic phase on population structuring is increasingly documented (e.g. Siegel *et al.* 2003). Many studies have emphasized the relationship between larval pelagic phase, effective dispersal and population structure (McMillan *et al.* 1992; Hoskin 1997; Arndt & Smith 1998; Goldson *et al.* 2001), even if some short-developing species present considerable levels of gene flow that contradicts such a dogma (Colson & Hughes 2004). As a short pelagic larval phase is commonly known in gregarious species to represent an

advantage for not dispersing away from favourable habitats (Pechenik 1999), it could minimize the risk that numerous *A. brachiata* populations become rapidly extinct as sandy-bottom habitat are highly fragmented and scattered along the European coastlines.

In *A. brachiata*, past glacial history, ecological selection and dispersal capacities have together produced a very contrasted and complex population structure. This study poses intriguing questions about the origin of speciation for the shallow-water endobenthic fauna in Europe during the last glacial episodes. As stated by Bermingham & Moritz (1998), comparative approaches using species sharing the same kind of habitat but presenting contrasted life history traits should be a valuable tool to better understand the relative importance of vicariance and local selection in shaping populations.

Acknowledgements

We are very grateful to people who helped us in the collection of samples, mainly the crew of the N/O Mysis, and to B. Sylvand and J. Grall for precious information on the location of intertidal populations. Special thanks to M. T. Jolly for his technical help in the early stages of this work and, together with M. C. LeGoff-Vitry and C. Engel, for the improvement of the English of this manuscript. A tremendous thank you to anonymous reviewer #2, F. Viard and T. Comtet for their constructive remarks on the first version of the manuscript. Thanks to people of the Génomole Ouest/Genomer sequencing platform. This work was mainly financed by PNEC-AT (Programme National d'Environnement Côtier) and the NoE 'Marine genomics' WP11 and supported by a PhD grant from the French Ministry of Research.

References

- Arndt A, Smith MJ (1998) Genetic diversity and population structure in two species of sea cucumber: differing patterns according to mode of development. *Molecular Ecology*, **7**, 1053–1064.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biological Evolution*, **16**, 37–48.
- Baric S, Sturmbauer C (1999) Ecological parallelism and cryptic species in the genus *Ophiothrix* derived from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **11**, 157–162.
- Barton NH, Hewitt GM (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, **341**, 497–503.
- Beeerli P, Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in subpopulations using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **98**, 4563–4568.
- Bermingham E, Lessios HA (1993) Rate variation of protein and mitochondrial DNA evolution as revealed by sea urchins separated by the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **90**, 2734–2738.
- Bermingham E, Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, **7**, 367–369.
- Bierne N, Bonhomme F, David P (2003) Habitat preference and the marine-speciation paradox. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **270**, 1399–1406.

- Bourgoin A (1987) Ecologie et démographie d'*Acrocnida brachiata* (Montagu) (Echinodermata: Ophiuroidea) en baie de Douarnenez (Bretagne) Thesis, University of Occidental Brittany, Brest (France).
- Bourgoin A, Guillou M, Glémarec M (1991) Environmental instability and demographic variability in *Acrocnida brachiata* (Echinodermata: Ophiuroidea) in Douarnenez Bay (Brittany: France). *Marine Ecology*, **12**, 89–104.
- Brault N, Bourquin S, Guillocheau F *et al.* (2004) Mio–Pliocene to Pleistocene paleotopographic evolution of Brittany (France) from a sequence stratigraphic analysis: relative influence of tectonics and climate. *Sedimentary Geology*, **163**, 175–210.
- Cabioch L, Gentil F, Glaçon R, Retière C (1977) Le Macrobenthos des fonds meubles de la Manche: distribution générale et écologie. In: *Biology of Benthic Organisms* (eds Keegan BF, O’Cedigh P, Boaden PJS), pp. 115–128. Pergamon Press, Oxford.
- Chenuil A, Féral JP (2003) Sequences of mitochondrial DNA suggest that *Echinocardium cordatum* is a complex of several sympatric or hybridizing species: a pilot study. In: *Echinoderms Research 2001* (eds Féral JP, David P), pp. 15–21. Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands.
- Colson I, Hughes RN (2004) Rapid recovery of genetic diversity of dogwhelk (*Nucella lapillus* L.) populations after local extinction and recolonization contradicts predictions from life-history characteristics. *Molecular Ecology*, **13**, 2223–2233.
- Cruz R, Carballo M, Conde-Padin P, Rolan-Alvarez E (2004) Testing alternative models for sexual isolation in natural populations of *Littorina saxatilis*: indirect support for by-product ecological speciation? *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 288–293.
- Dinter WP (2001) *Biogeography of the OSPAR Maritime Area*. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany.
- Edmands S, Deimler JK (2004) Local adaptation, intrinsic coadaptation and the effects of environmental stress on interpopulation hybrids in the copepod *Tigriopus californicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **303**, 183–196.
- Gardner JPA, Thompson RJ (2001) The effects of coastal and estuarine conditions on the physiology and survivorship of the mussels *Mytilus edulis*, *M. trossulus* and their hybrids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **265**, 119–140.
- Gavrilets S (2003) Models of speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution*, **57**, 2197–2215.
- Gentil F, Zakardjian B (1989) Premières données sur la dynamique de population d'*Acrocnida brachiata* (Montagu) en Baie de Seine orientale. *Vie marine HS*, **10**, 148.
- Gentil F, Zakardjian B (1990) Reproductive cycle of the ophiuroid *Acrocnida brachiata* (Montagu) in the Bay of Seine (English Channel). In: *Echinoderms Research* (eds De Ridder C, Dubois P, Lahaye MC, Jangoux M), pp. 83–89. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
- Gentil F, Irlinger JP, Elkaim B, Proniewski F (1986) Premières données sur la dynamique du peuplement macrobenthique des sables fins envasés à *Abra alba* de la baie de Seine orientale. *Actes de Colloques IFREMER*, **4**, 409–420.
- Goldson AJ, Hughes RN, Gliddon CJ (2001) Population genetic consequences of larval dispersal mode and hydrography: a case study with bryozoans. *Marine Biology*, **138**, 1037–1042.
- Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Gysels ES, Hellemans B, Pampoulie C, Volckaert FAM (2004) Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Molecular Ecology*, **13**, 403–417.
- Hall TA (1999) BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Haq BU, Hardenbol J, Vail PR (1987) Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science*, **235**, 1156–1166.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hoskin MG (1997) Effects of contrasting modes of larval development on the genetic structures of populations of three species of prosobranch gastropods. *Marine Biology*, **127**, 647–656.
- Johannesson K (2001) Parallel speciation: a key to sympatric divergence. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 148–153.
- Jolly MT, Viard F, Weinmayr G *et al.* (2003) Does the genetic structure of *Pectinaria koreni* (Polychaeta: Pectinariidae) conform to a source-sink metapopulation model at the scale of the Baie de Seine? *Helgoland Marine Research*, **56**, 238–246.
- Jolly MT, Jollivet D, Gentil F, Thiébaud E, Viard F (2005) Sharp genetic break between Atlantic and English Channel populations of the polychaete *Pectinaria koreni*, along the north coast of Brittany, France. *Heredity*, **94**, 23–32.
- Jolly MT, Viard F, Gentil F, Thiébaud E, Jollivet D (2006) Comparative phylogeography of two coastal polychaete tubeworms in the North East Atlantic supports shared history and vicariant events. *Molecular Ecology*, **15**, 1841–1855.
- Keegan BF, Konnecker G (1979) Aggregation in echinoderms on the West coast of Ireland. An ecological perspective. *Proceedings of the Royal Irish Academy*, **86B**, 199.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111–120.
- Kirby RR, Bayne BL, Berry RJ (1994) Phenotypic variation along a cline in allozyme and karyotype frequencies, and its relationship with habitat, in the dog-whelk *Nucella lapillus* L. *Biological Journal of the Linnean Society*, **53**, 255–275.
- Kirby RR, Berry RJ, Powers DA (1997) Variation in mitochondrial DNA in a cline of allele frequencies and shell phenotype in the dog-whelk *Nucella lapillus* (L.). *Biological Journal of the Linnean Society*, **62**, 299–312.
- Knowlton N (1993) Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecological System*, **24**, 186–216.
- Knowlton N (2000) Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia*, **420**, 73–90.
- Koehler R (1921) Echinodermes. *Faune de France*, **1**, 1–210.
- Kruse I, Reise K (2003) Reproductive isolation between intertidal and subtidal *Scoloplos armiger* (Polychaeta, Orbiniidae) indicates sibling species in the North Sea. *Marine Biology*, **143**, 511–517.
- Kruse I, Strasser M, Thiermann F (2004) The role of ecological divergence in speciation between intertidal and subtidal *Scoloplos armiger* (Polychaeta, Orbiniidae). *Journal of Sea Research*, **51**, 53–62.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen I, Nei M (2001) MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, **17**, 1244–1245.
- Lambeck K (1997) Sea-level change along the French Atlantic and Channel coasts since the time of the Last Glacial Maximum. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **129**, 1–22.
- Langella O (2002) POPULATION 1.2.28. Logiciel de génétique des populations. Laboratoire Populations, génétique et évolution, CNRS UPR 9034, Gif sur Yvette, <http://www.cnrs-gif.fr/page/>.
- Matsuoka N, Hatanaka T (1991) Molecular evidence for the existence of four sibling species within the sea-urchin, *Echinometra mathaei* in Japanese waters and their evolutionary relationships. *Zoological Science*, **8**, 121–133.
- Mayr E (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.

- McCarthy C (1997) *Chromas*, Version 1.41. Griffith University, Brisbane, Queensland.
- McDonald JH, Kreitman M (1991) Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature*, **351**, 652–654.
- McMillan WO, Raff RA, Palumbi SR (1992) Population genetic consequences of developmental evolution in sea urchins (genus *Heliocidaris*). *Evolution*, **46**, 1299–1312.
- McMullin ER, Hourdez S, Schaeffer SW, Fisher CR (2003) Phylogenetics and biogeography of deep-sea vestimentiferan tubeworms and their bacterial symbionts. *Symbiosis*, **34**, 1–41.
- Meulenkamp JE, Sissingh W (2003) Tertiary palaeogeography and tectonostratigraphic Evolution of the Northern and Southern Peri-Tethys platforms and the intermediate domains of the African–Eurasian convergent plate boundary zone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **196**, 209–228.
- Mortensen T (1921) *Studies of the Development and Larval Forms of Echinoderms*. Gotlieb Ernst Clausen Gad Publishers, Copenhagen.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Ogden R, Thorpe RS (2002) Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **99**, 13612–13615.
- Orr MR, Smith TB (1998) Ecology and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **13**, 502–506.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, **13**, 55–65.
- Palumbi SR (1992) Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology & Evolution*, **7**, 114–118.
- Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J, Britton-Davidan J (1987) *Manuel Technique de Génétique par Électrophorèse des Protéines*. Lavoisier, Paris.
- Pechenik JA (1999) On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology Progress Series*, **177**, 269–297.
- Pirazzoli P (1998) Sur la vitesse des variations du niveau de la mer. *Annales de Géographie*, **600**, 220–232.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M *et al.* (2004) GENECLASS 2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, **95**, 536–539.
- Provan J, Wattier RA, Maggs CA (2005) Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmaria palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Molecular Ecology*, **14**, 793–803.
- Rand DM (1994) Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends in Ecology & Evolution*, **9**, 125–131.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **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.
- Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, **105**, 767–779.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219–1228.
- Rozas J, Sanchez-DeL, Barrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496–2497.
- Schluter D (2001) Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 372–380.
- Schmidt PS, Rand DM (2001) Adaptive maintenance of genetic polymorphism in an intertidal barnacle: habitat- and life-stage-specific survivorship of *Mpi* genotypes. *Evolution*, **55**, 1336–1344.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2001) *ARLEQUIN (version 2.0): A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Siegel D, Kinlan B, Gaylord B, Gaines S (2003) Lagrangian descriptions of marine larval dispersion. *Marine Ecology Progress Series*, **260**, 83–96.
- Smith AJ (1989) The English Channel – by geological design or catastrophic accident? *Proceedings of the Geological Association*, **100**, 325–337.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673–4680.
- Turelli M, Barton NH, Coyne JA (2001) Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 330–343.
- Ursin E (1960) A quantitative investigation of the Echinoderm fauna of the central North Sea. *Meddelelser fra Danmarks Fiskeri-og Havundersogelser*, **2**, 1–204.
- Veliz D, Bourget E, Bernatchez L (2004) Regional variation in the spatial scale of selection at *MPI** and *GPI** in the acorn barnacle *Semibalanus balanoides* (Crustacea). *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 953–966.
- Via S (2001) Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 381–390.
- Wares JP, Gaines SD, Cunningham CW (2001) A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution*, **55**, 295–306.
- Waters JM, Roy MS (2004) Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? *Molecular Ecology*, **13**, 2797–2806.
- Webb CM, Tyler PM (1985) Post-larval development of the common north-west European brittle-star *Ophiura ophiura*, *O. Albida* and *A. Brachiata* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Marine Biology*, **89**, 281–292.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Wiens JJ (2004) Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution*, **58**, 193–197.
- Wilson RA (1999) *Species. New Interdisciplinary Essays*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

This work is part of D. Muths's doctoral research on population structure of two brittle-star species, *A. brachiata* and *O. fragilis*. Her research involves the use of various genetic markers to study processes acting at different scales, from evolutionary history to fine scale spatio-temporal genetic structure, as well as demographic survey of several populations. This work was co-directed by Dr D. Jollivet and Pr D. Davoult, from the 'EGPM' and the 'Benthic Ecology' teams respectively at the Station Biologique de Roscoff (www.sb-roscoff.fr). This teams carry out wide ranging and interconnected projects on coastal marine algae and invertebrates as well as hydrothermal vent fauna.

Population dynamics disparities of the common brittle-star *Ophiothrix fragilis* between three localities of the English Channel

D. Muths, D. Jollivet & D. Davoult

Station biologique de Roscoff, UMR7144-AD2M, CNRS, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Roscoff, France

ABSTRACT: Demographic functioning of the brittle-star *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard) has been surveyed in parallel at three subtidal localities of the English Channel, from South-West to North-East. Population dynamics survey of dense beds of *O. fragilis* shows important demographic discrepancies between localities across the English Channel with a great heterogeneity in recruitment, both in space and time. At least, two major types of populations seem to exist, those having an important annual recruitment with post-settlement density regulation and, those with slower population replenishment due to a limiting amount of settlers. Whatever the dynamics is, stability of populations is ensured over time.

1 INTRODUCTION

Because of suspension-feeding activity, dense beds of millions of brittle-stars play an important role in the coupling of benthic and pelagic systems, and especially may act as an eutrophication regulator. Therefore, understanding processes that ensure sustainability of such dense aggregates appears crucial to develop the grounds of conservation biology in coastal environments. The gregarious brittle-star *Ophiothrix fragilis* (variety *pentaphyllum*) is widely distributed in the North-Eastern Atlantic region (Brun, 1969; Broom, 1975; Davoult & Gounin, 1995) where it forms dense beds (densities up to 1500 individuals.m⁻² often encountered). These beds are considered to be stable both in time and space (Cabioch, 1968; Davoult *et al.*, 1990; Brylinski *et al.*, 2006). This suggests that larval arrivals via self-recruitment and/or efficient exchanges across localities must be large enough to secure population sizes.

This species displays a high fecundity with a long larval lifespan, estimated between 21 days (Morgan & Jangoux, 2002) and 26 days (McBride, 1907). Important release of long-living larvae, coupled with strong easterly currents of the English Channel (Salomon, 1990), was supposed to ensure connectivity between distant populations in this area and thus part of the population sustainability. Dispersal modelling suggested however an important level of larval retention at most locations in the English Channel (Lefebvre *et al.*, 2003).

Population replenishment may therefore be ensured preponderantly by self-recruitment. The importance of self-recruitment in stabilizing adult populations has already been reported for other echinoderms such as the asteroid *Pisaster ochraceus* (Sewell & Watson, 1993) and the echinoid *Evechinus chloroticus* (Lamare, 1998).

A demographic survey previously conducted at Wimereux (near Dover Strait, France), in the eastern part of the English Channel (Davoult *et al.*, 1990), showed a rapid turn-over of the population each year resulting from the occurrence of four distinct recruitment events. On the opposite, a northerner population of *O. fragilis* (in Belgium) displayed a population dynamics with a slower annual level of population replenishment due to a unique and weak recruitment event (Morgan, 2004), with a suspected important inter-annual variability in recruitment. The very high level of population turn-over in Wimereux was also suggested by studies of gonad growth which is three times higher in Wimereux than in a westerner locality, Roscoff (Lefebvre *et al.*, 1999). The present study focused on the temporal and spatial variability of population dynamics in the brittle-star *O. fragilis* (variety *pentaphyllum*). Surveys have been made in parallel at three subtidal localities of the English Channel (North East Atlantic) in the aim of understanding whether population replenishment reflects local processes or a large-scale metapopulation effect.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Sampling sites

Ophiothrix fragilis samples have been collected every two months during two consecutive years, between October 2003 and October 2005 at three localities: Roscoff (tip of Brittany; 48°47'N-3°59'W), Paluel (Normandy; 49°53'N-0°35'E) and Wimereux (Dover Strait; 50°55'N-1°35'E). Subtidal samples have been obtained by dredging on hard sediment with a "Rallier du Baty" device thanks to the use of the R/V Mysis (Roscoff) and Sepia II (Wimereux). Larvae have also been trapped in August 2005 above Roscoff populations with a 200 µm plankton-net, during a bi-monthly sampling collection that occurred between May and October 2005. Localities position in the English Channel are reported in Figure 1.

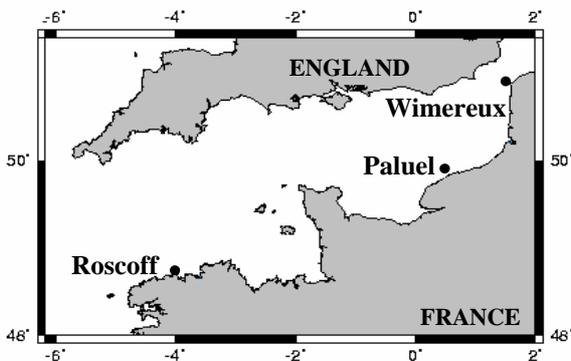


Figure 1. Location of sampling sites of *O. fragilis* in the English Channel

2.2 Biometry and demographic analyses

The internal diameter of the disc was chosen as a relevant biometrical variable to perform size-frequency histograms as it represents the best descriptor of the brittle-star individual growth (Guille, 1964). It is defined as the distance between the distal extremities of a pair of radial shields and the middle of the line joining the base of the two diametrically opposite shields (Guille, 1964). It was measured under a binocular microscope with a micrometer at 12x magnification to the nearest 0.02 mm. About two hundreds of brittle stars from each of the three sites were measured every three months in average. Individuals were grouped into 1 mm size classes for the analysis in order to minimize null classes but maximize the number of size classes. The Normsep program of Tomlinson (1970) adapted by Glémarec and Menesguen (1979) was used in order to identify modal components out of size frequency histograms using a likelihood method that fits the observed distribution to a set of normal rules. Demographic data were also explored by the way of a Factorial Correspondence Analysis (FCA) performed with Statbox v6.6©.

3 RESULTS

Size-frequency histograms and modal decomposition are presented in Figure 2 for the three sites. At Roscoff, samples from October of both successive years are made of two groups of individuals: small size individuals with a modal length of c.a. 6 mm and large size individuals with a modal length of 9 mm corresponding to adults of one and two years old, respectively. Additional peaks appeared between May and July both years, and correspond to arrivals of new recruits in the population (about 20% of new settlers are observed in the population). At Paluel, more than 80% of the population is made of a unique group of 2-year old adults (modal length of 10 mm) from January to May. Recruitment events seemed to occur several times a year but by pulses of small numbers of settlers. In this case, recruits contributed to less than 10% of the whole sample size. At Wimereux, size-frequency histograms are clearly polymodal with two to four modal components. Recruitment events are frequent occurrences with large numbers of recruits throughout the year. Two recruitment events have been indeed depicted in 2004 with a maximum in October (settlers represent 40% of the whole sample) and four recruitment events in 2005 with a maximum in June (settlers represent 80% of the sample). Because adults (around 9 mm) dominated the population only during a short period of time (from December 2003 to May 2004), it seems that population turn-over is more rapid and chaotic at Wimereux when compared to Roscoff and Paluel.

Factorial Correspondence Analysis of modal components according to localities and sampling dates is illustrated in Figure 3. Factorial axes 1 and 2 represent 43 and 29% of total sampling variance, respectively. The analysis showed a marked Guttman effect, indicating that the two axes synthesize the same information. First axes is strongly structured according to decreasing size classes (left to right) over space whatever sampling date. In other words, samples are grouped according to size classes that typify localities all over the year. Thus Paluel samples are grouped together near large size classes (10-12 mm), showing the predominance and maintenance of large individuals throughout the year. On the opposite, most of the Wimereux samples are grouped together near the smallest size classes, indicating that recruitment events occur several times per year. Roscoff samples present an in-between state with average size classes (5-10 mm) and, distributions similar to those from Wimereux in November 2003 and March 2004. Demographic structure appeared site-dependant more than date-dependant. More pronounced temporal variations however appeared in Wimereux.

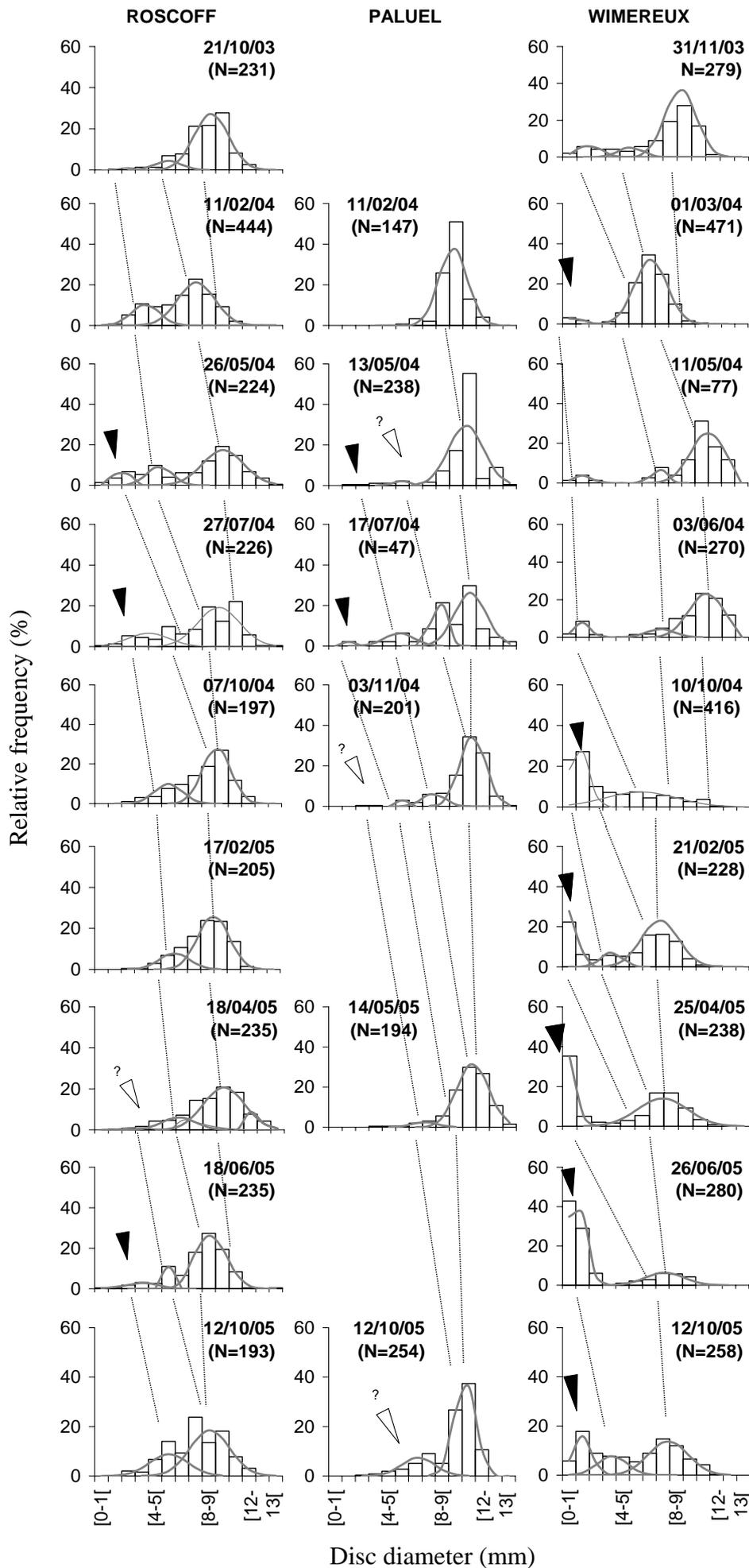


Figure 2. Size-frequency histograms and modal decomposition of the three demographic surveys of *O. fragilis*. Sampling dates noted on each graph are followed by sample sizes (in brackets). Black triangles indicate observed recruitment events and white triangle hypothetical ones (for clarity, graphs are not shown when sampling was only performed at one site but these data have been taken into account for interpretation)

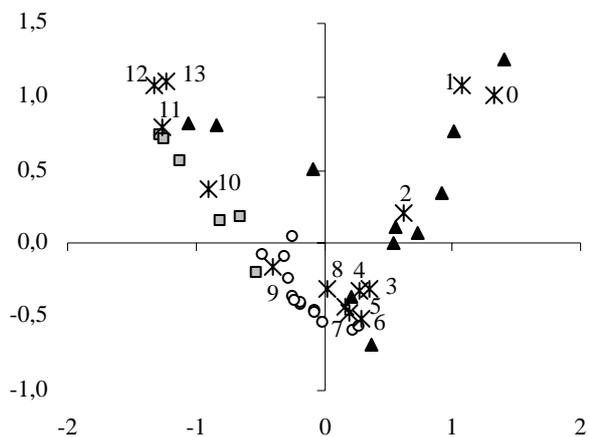


Figure 3. FCA performed using size classes according to locality and sampling date. The percentage of variance explained by axes 1 and 2 is of 43% and 29%, respectively. Asterisks indicate size classes (each number indicating the lower limit of the class). Other symbols represent sampling locations: white circle for Roscoff, grey squares for Paluel and black triangles for Wimereux.

Temporal changes in *O. fragilis* larval abundance at Roscoff are presented on Figure 4. Larvae are observed from July to September in 2005, with the highest density (150 ind.m⁻²) in August. Peak of maximum intensity occurred during less than 15 days. Ophioplutei development has been well described and is punctuated by the appearance of arms (2, 4, 6 and finally 8 arms), corresponding to four successive developmental stages. The developmental stage distribution is presented on Figure 5. Larvae observed in August are mainly 2-arm and 4-arm larvae. However, before the peak of maximum intensity, 6-arm and 8-arm larvae have been already observed. In September, freshly spawned 2-arm larvae were observed again indicating that spawning is not highly synchronized.

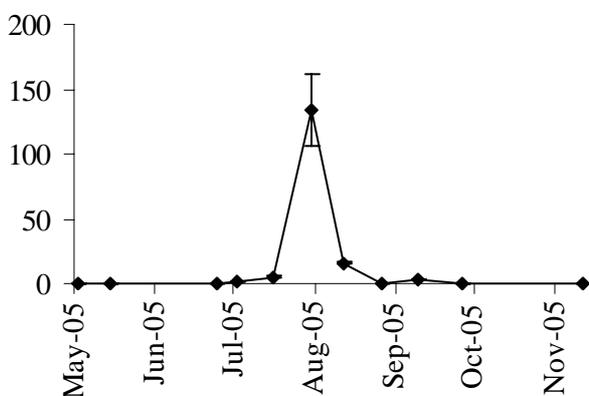


Figure 4. *O. fragilis* larval density (ind.m⁻²) in the water column above the Roscoff population.

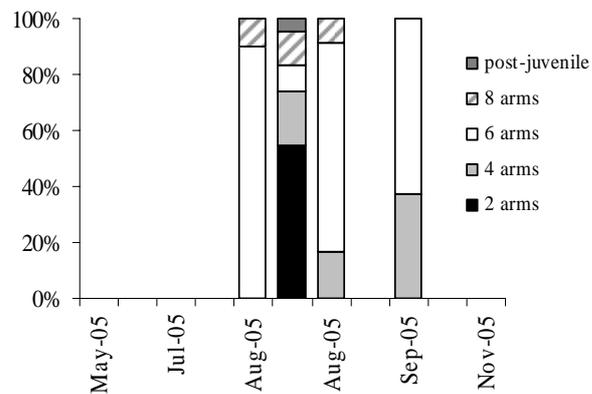


Figure 5. Spatio-temporal changes in the relative abundance of the different larval stages in *O. fragilis* in 2005

4 DISCUSSION

Parallel population dynamics surveys of *O. fragilis* pointed out important discrepancies in the demographic functioning over time and space. When the major recruitment event corresponded to more than 40% of the whole population size every year at Wimereux, it only corresponded to 20% and 10% at Roscoff and Paluel, respectively. In fact, at Wimereux, secondary recruitment events are more frequent and important than those observed in the two other sites. Present observations seem to confirm results obtained 20 years ago by Davoult *et al.* (1990), indicating that such a demographic process is stable over time. Population turn over is therefore very rapid at Wimereux as compared to Roscoff and Paluel. Moreover, in contradiction to what has been observed at Wimereux, recruitments seem to have been more intense during 2004 at Roscoff and Paluel than during 2005. *Ophiothrix* life span as first estimated by population turn-over at Wimereux (Davoult *et al.*, 1990) was around two years. Based on skeletal growth bands on Scottish ophiuroids, this estimation increases to ten years (Gage, 1990) leading to the possibility of a density-dependant regulation of adults at some locations. This second life span estimate allows us to understand better how replenishment of populations can occur at western sites. In these latter sites, the level of recruitment is low and may strongly vary from year to year. However, it may be compensated by a lower mortality rate on adults. Thus, the replenishment of populations may be slower and, due to more chaotic events, more consequent some years. This hypothesis was also proposed by Morgan (2004) who observed that the studied North Sea population may be slowly renewed in a way similar to those observed at Roscoff and Paluel.

A previous study based on gonad growth showed that sexual maturity is likely to occur in June-July at both Roscoff and Wimereux. But the gonadic index was three times higher at Wimereux than at Roscoff (Lefebvre *et al.*, 1999). This could explain why such

great differences could be observed in the larval densities between these two localities. In 2004, larval densities were around 150 larvae.m⁻² at Roscoff whereas they reached at Wimereux more than 2500 larvae.m⁻² in 1995 and 480000 larvae.m⁻² in 1996 (Lefebvre & Davoult, 2000). On the other hand, modelling of larval dispersal suggested that larval retention is different from site to site and can compensate differences in the reproductive effort of populations. A population like Wimereux, even with a low retention level (< 1% with wind enforcement and > 6% without wind), could subsist thanks to self-recruitment ; a higher level of larval retention at Roscoff (greater than 10%) should probably be sufficient to compensate a reproductive effort three to four times lower and thus and to ensure population stability (Lefebvre *et al.*, 2003). If larval retention may partly compensate for spatial variations in the level of offspring release, recruits densities observed at Roscoff remain greatly lower than values found at Wimereux. So, even if a low turnover population like the one in Roscoff may subsist thanks to self-recruitment, such amounts of settlers would be critical for the maintenance of a rapid turnover population like Wimereux. Chaotic changes in the reproductive effort may also partly compensate various levels of larval production and retention. Moreover, the evolution of the gonadic index at Wimereux indicated that punctual release of gametes may have occurred before the main reproductive episode (Lefebvre *et al.*, 1999). These secondary releases are of same intensity as those found at Roscoff, underlying again differences in demographic functioning between Roscoff and Wimereux.

Planktonic samples made above the population of Lyna's Point, in the Irish Sea at the end of May 2004 reveal densities of 255 larvae.m⁻² (Sagarduy Casal & Comtet, 2006). These densities are close to that observed at Roscoff, leading to the following questions: (1) does larval densities at Lyna's point reflect a maximum in 2004? If yes, it should correspond to a temporal shift in the sexual maturation of *O. fragilis* between the English Channel and the Irish Sea. Or, (2) does larval densities at Lyna's Point reflect secondary spawning events? If yes, the population of Lyna's Point should display a demographic functioning similar to that of Wimereux with several recruitment events per year. Gametogenesis and spawning are often considered to be temperature-dependant (Giese & Pearse, 1974). Because temperature is two to three degrees lower in the Irish Sea than in the English Channel during Spring, a two-month shift in the release of offspring should represent a less likely explanation and this larvae observations may be the evidence of a secondary spawning. Presently, two kinds of demographic functioning seem to occur in *O. fragilis*: (1) populations with several recruitment

events each year, with a massive one at the beginning of the Summer period (Wimereux and maybe Lyna's Point), and (2) populations with a unique and weak recruitment event that slows down population replenishment and could be more sensitive to chaotic events (Roscoff or Paluel). In agreement with Carroll's model (1996), regulation patterns that trigger demography must be different between these two dynamics. When larvae are abundant, settlement may be rapidly saturated (Wimereux), juvenile mortality should be thus density-dependant and, in this case, density of adults could be shaped by post-recruitment processes such competition for food and/or predation. On the contrary, when larval supply is low (Roscoff or Paluel), recruit mortality must not depend on juvenile density and so population size should vary according to larval availability. Such systems, which consider the larval phase as preponderant to explain density variations of benthic populations, are in agreement with the model of 'supply-side ecology' (Rougharden *et al.*, 1988; Underwood & Fairweather, 1989). In this case, adult-larval interactions appeared really crucial to limit larval losses and to increase self-recruitment efficiency as previously been suggested for echinoderms (Thorson, 1966; Warner, 1971). Such interactions seem to be greatly favoured by juvenile-adult behavioural and morphological relationship in *O. fragilis* (Morgan & Jangoux, 2004).

Finally, larval samples made in May 2004 over oceanic fronts in the middle of the English Channel (Hushant front) and the Irish Sea (Celtic front) showed densities around 10 larvae.m⁻² (Sagarduy Casal & Comtet, 2006). Occurrences of *O. fragilis* larvae far from dense populations give evidence for potential larval connectivity between well-separated populations, even if larval densities are very low. External larval supplies are also well supported by the recurrent arrivals of newly hatched developmental stages over the population of Roscoff prior and after the main offspring release. Occurrences of 6-arm and 8-arm larvae at Roscoff in July 2005 and Wimereux in 1996 (Lefebvre & Davoult, 2000), without observations of 2-arm and 4-arm larvae before, let suppose about the existence of allochthonous larvae. If allochthonous supplies may be secondary in terms of population replenishment, they might participate to the global shaping of the next generation and may be crucial for the genetic homogenisation of populations and thus, the integrity of the species (Slatkin, 1987). Genetic studies represent another way to validate hypotheses about the relative parts of larval retention and migration to population replenishment. Preliminary works about larval genotyping appear to provide new insights towards differences between the population functioning of Wimereux and Roscoff (Muths *et al.*, in prep.).

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to people who help us in collecting samples, in particular the Mysis and Sepia II captains and crews for samples and C. Hubas for ensuring the brittle-star trip between Roscoff and Wimereux. Special thanks for E. Boissin and K. Gérard for bringing the poster to the IEC.

REFERENCES

- Broom DM (1975) Aggregation behaviour of the brittle-star *Ophiothrix fragilis*, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 55: 191-197.
- Brun E (1969) Aggregation of *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard)(Echinodermata: Ophiuroidea), *Nytt Magazin for Zoologi (Norwegian Journal of Zoology)* 17: 153-160.
- Brylinski J, Dagault F, Davoult D, Lampert L, Meirland A, Delpech J, Maheux F, Vincent D (2006) Surveillance écologique et halieutique du site Electronucléaire de Paluel - Année 2005, p. 196. Ifremer.
- Cabioch L (1968) Contribution à la connaissance des peuplements benthiques de la Manche Occidentale, *Cahiers de Biologie Marine* 9: 493-720.
- Davoult D, Gounin F (1995) Suspension-feeding activity of a dense *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard) population at the water-sediment interface : time coupling of food availability and feeding behaviour of the species, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 41: 567-577.
- Davoult D, Gounin F, Richard A (1990) Population dynamics and reproduction of *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard) in the strait of Dover (English Channel), *Journal of experimental marine Biology and Ecology* 138: 201-216.
- Gage JD (1990) Skeletal growth bands in brittle stars: microstructure and significance as age markers, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 70: 209-224.
- Giese A, Pearse J (1974) Introduction : general principles. In: *Reproduction of marine invertebrates* (ed. Pearse ACGJS), pp. 1-49. Academic press, New York.
- Glémarec M, Menesguen A (1979) Fonctionning of a muddy sand ecosystem : seasonal fluctuations of different trophic levels and difficulties in estimating production of the dominant macrofauna species In: *Benthic Dynamics Symposium*, Savannah, Georgia.
- Guille A (1964) Contribution à l'étude de la systématique et de l'écologie d'*Ophiothrix quinque maculata* Vie et Milieu 15: 243-309.
- Lamare MD (1998) Origine and transport of larvae of the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata : Echinoidea) in a New Zealand fjord, *Marine Ecology Progress Series* 174: 107-121.
- Lefebvre A, Davoult D (2000) Larval distribution of *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata: Ophiuroidea) in a macrotidal area, the Dover Strait (eastern English Channel, France), *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 80: 567-568.
- Lefebvre A, Davoult D, Gentil F, Janquin MA (1999) Spatio-temporal variability in the gonad growth of *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata : Ophiuroidea) in the English Channel and estimation of carbon and nitrogen outputs towards the pelagic system, *Hydrobiologia* 414: 25-34.
- Lefebvre A, Ellien C, Davoult D, Thiébaud E, Salomon JC (2003) Pelagic dispersal of the brittle-star *Ophiothrix fragilis* larvae in a megatidal area (English Channel, France) using an advection/diffusion model., *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57: 421-433.
- McBride CW (1907) The development of *Ophiothrix fragilis*, *Quarterly Journal of Microscopical Science* 51: 557-606.
- Morgan R (2004) *Reproduction, larval development, juvenile biology and population dynamics of the gregarious ophiuroid Ophiothrix fragilis* (Abildgaard, 1789) in the English Channel-North Sea region, université libre de Bruxelles.
- Morgan R, Jangoux M (2002) Reproductive cycle and spawning induction in the gregarious brittle star *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata) in the Oosterschelde (Netherlands). *Invertebrate Reproduction and Development* 42: 145-155.
- Morgan R, Jangoux M (2004) Juvenile-adult relationship in the gregarious ophiuroid *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata): a behavioral and morphological study, *Marine Biology* 145: 265-276.
- Rougharden J, Gains S, Possingham H (1988) Recruitment dynamics in complex life cycles, *Science* 241: 1460-1466.
- Sagarduy Casal J, Comtet T (2006) *Distribution spatiale du méroplancton à l'entrée de la Manche et de la Mer d'Irlande*, Programme européen de Mobilité Leonardo de Vinci.
- Salomon JC (1990) Role of instantaneous and long-term water movements on the recruitment and life of benthic fauna in the English Channel, *La mer* 28: 211-217.
- Sewell M, Watson JC (1993) A source for asteroid larvae? Recruitment for *Pisaster ochraceus*, *Pycnopodia helianthoides* and *Dermasterias imbricata* in Nootka Sound, British Columbia, *Marine Biology* 117: 397-398.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations, *Science* 236: 787-792.
- Thorson G (1966) Some factors influencing the recruitment and establishment of marine benthic communities, *Netherlands Journal of Sea Research* 3: 267-293.
- Tomlinson PK (1970) Program Normsep (Fortran IV). Dept Fish and Game, The resources agency of California.
- Underwood AJ, Fairweather PG (1989) Supply-side ecology and benthic marine assemblages, *Trends in Ecology & Evolution* 4: 16-20.
- Warner GF (1971) On the ecology of a dense bed of the brittle-star *Ophiothrix fragilis*, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51: 267-282.

(Version préliminaire qui sera modifiée au vu des résultats des analyses canoniques et soumise à Marine Biology)

Do long-term dispersal and recruitment heterogeneity explain large-scale chaotic genetic patchiness in the brittle-star *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard, 1789) in the North East Atlantic?

Muths D., Jollivet D., Gentil F. and Davoult D.

Abstract

Genetic variation of the brittle-star *O. fragilis* has been estimated from 22 intertidal and subtidal localities of the North East Atlantic within and between populations. Polymorphisms obtained from sequences of a portion (542-bp) the mitochondrial gene Cytochrome c oxydase (COI) and 7 enzyme loci pointed out the occurrence of an intertwined genetic structure within and between populations with no geographic pattern of differentiation. Despite a long larval phase, neighbouring populations were often more genetically differentiated one from each other than distant populations. In fact, most genetic variance was associated with the intra-population level. Such an observation was mostly the reflection of the high level of genetic diversity of the species and potentially admixtures of distant populations. This latter assumption is strengthened by the finding of significant genetic differences between cohorts, which fits well the dispersal ability of larvae. Larval pools from different origins are therefore likely to shape local structures and to induce chaotic genetic patchiness at a global scale. A population dynamics survey was made in parallel at three distinct localities in the English Channel. This study shows important demographic discrepancies between populations across the English Channel with a great heterogeneity in recruitment. Disjunction in recruitment and variation in the number of settlement events may thus reinforce the idea of genetic patchiness at a global scale.

Introduction

Most marine species present a life history, which includes at least one potential highly dispersive stage. For benthic-pelagic invertebrates, this is typically ensured by the larval stage wherein the larvae are supposed to allow connectivity between disjunct local populations. Marine populations have been therefore widely regarded as open systems, with a high flow of migrants over large spatial scales. Comparative studies on population connectivity have previously used genetic approaches to reveal population structure in agreement with larval development and, so, with the dispersal ability of the larva (McMillan *et al.* 1992; Mladenov *et al.* 1997; Arndt and Smith 1998). Reverse situations are however also encountered. Species with a long planktonic phase could indeed present a very pronounced genetic structure (Todd *et al.* 1998). Both extremes and many intermediate situations have been depicted in marine invertebrates, but in general, populations appeared more isolated than previously thought, disparaging the old paradigm in which long planktonic stages always favour long-distance dispersal and extensive levels of gene flow between populations. Moreover, considering dispersal, two aspects have been frequently confounded (Kinlan *et al.* 2005): the maximal dispersal range of a species, which is important for range expansion and the colonisation of new areas but relatively rare events, is often used instead of the currently-achieved dispersal which ensure population replenishment. In the last case, dispersal ability is clearly restricted by external factors such as habitat fragmentation, in situ larval mortalities and/or local hydrodynamism. For example, the irregular nature of coastlines greatly modifies coastal larval transport over time and space (Gaines and Bertness 1992). Recent development in larval modelling has emphasized the importance of hydrodynamism in the local retention of larvae suggesting that self-recruitment is more often found in marine populations than previously thought (Cowen *et al.* 2000; Ellien *et al.* 2000; Sponaugle *et al.* 2002). When self-recruitment takes a great part in population replenishment, genetic structure is mostly associated to genetic drift according to the effective population size of each local population, even for a species with a long dispersal phase. As consequence, genetic differentiation increases between populations but its geographic nature may be masked by the arrival of larval pools differing from their origin at a given locality. Alternance of self-recruitment phases with the arrival of allochthonous sets of larvae have been thus proposed to explain microgeographical genetic heterogeneities in large “panmictic” populations.

This pattern called ‘chaotic genetic patchiness’ (Johnson and Black 1982) has been explained by genetic differences between the succeeding settler cohorts entering a population (Hedgecock 1994b; Moberg and Burton 2000; Hellberg *et al.* 2002). The initial step of differentiation associated with cohorts admixture is however often diluted towards homogenisation via adult movements, differential mortalities or backcrosses (Planes and Lenfant 2002).

The gregarious brittle-star *O. fragilis* is widely distributed in the North-Eastern Atlantic region (Brun 1969; Broom 1975; Davoult and Gounin 1995) where it forms dense beds (densities up to 1500 individuals.m⁻² often encountered), considered to be stable both in time and space. This species displays a high fecundity with a long larval lifespan, estimated between 21 days (Morgan and Jangoux 2002) and 26 days (McBride 1907). This long larval stage, coupled with strong easterly currents of the English Channel (Salomon 1990), was supposed to ensure connectivity between distant populations in this area. Dispersal modelling suggested however an important level of larval retention at some locations in the English Channel favouring self-recruitment (Lefebvre *et al.* 2003). As self-recruitment is supposed to be preponderant, most dispersing larvae may be lost in the dispersal process and connectivity between populations is therefore challenged. On the opposite, demographic surveys previously conducted at Wimereux, in the eastern part of the English Channel (Davoult *et al.* 1990) showed the occurrence of four distinct recruitment events and thus the possibility for cohort admixture in this region with an important turn-over of the population each year. From these previous works, two alternative hypotheses could be tested if self-recruitment is preponderant: 1) all females and males are not mature at the same time and thus distinct recruitments reflect a spawning heterogeneity, 2) males and females are highly synchronized in spawning and thus distinct recruitments only reflect differences in the origin of the settlers. In both cases, a Wahlund effect could be expected in populations. The aim of the present study is to evaluate, by the mean of a genetic approach, the level of connectivity between populations of *O. fragilis*. The genetic variability of the species was thus investigated from 22 populations in the North East Atlantic by sequencing a portion of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene (542-bp) and by genotyping 7 polymorphic enzyme loci. In addition, because population dynamics could greatly modify the genetic signature locally, demography of *O. fragilis* has been followed in parallel at three distinct localities of the English Channel.

Material and Methods

Sampling sites

Most *Ophiothrix fragilis* samples have been collected in the subtidal on long-standing beds of brittle-stars (i.e. > 1000 individuals.m⁻²). The remaining subtidal samples represent probably sink populations made of scattered individuals living in maerl bed or on rocky bottom. Subtidal samples have been obtained by digging on hard sediment with a “Rallier du Baty” dredge. Populations from the Irish Sea were sampled during the Pectirl 2004 cruise, populations from Southern Brittany during the Ophirois 2005 cruises and populations from English Channel thanks to the use of the ship La Mysis (Roscoff) and Le Sepia (Le Havre) in 2004. Intertidal populations were sampled by collecting dotted individuals on the rocky shore at low tide in 2005. Individuals from the Western and Eastern coasts of Spain, the Southern Europe, and from Norway and Sweden were kindly provided by European marine stations on our demand. Individuals were frozen in liquid nitrogen until molecular analysis. Geographical coordinates and depth of the population, sample labels, sample sizes and habitat are given in Table 1 and reported in Figure 1.

Samples dedicated to the demography have been made every two months during two consecutive years, between October 2003 and October 2005 at three localities: Roscoff (tip of Brittany), Wimereux (Dover strait) and Paluel (Seine estuary). Larvae have been also trapped in August 2005 above Roscoff populations with a 200µm plankton-net during a search that occurred between May and October 2005. Each individual was divided in two pieces: arms for mitochondrial analyses and the body for starch-gel electrophoreses of allozymes.

mtCOI PCR product direct sequencing

Total genomic DNA was extracted according to the CTAB extraction protocol as described in Jolly *et al.* (2003). Species-specific primers for PCR (OF-COIF: 5'CCCATAATGATAGGAGGATT-3'; OF-COIR: 5'-TTGTASYGGCGGTGAAGW- 3') were designed from conserved regions of the whole Cytochrome Oxidase I gene obtained from ten specimens of ophiuroids using primers based on regions conserved in invertebrates (McMullin *et al.* 2003). Reactions were performed in 27µl containing 1 x PCR buffer (supplied with polymerase enzyme), 2mM MgCl₂, 25µM of each dNTPs, 0.2µM of each primer, 0.5U of Thermoprime Plus *Taq* polymerase (Abgene), 25ng CTAB-extracted genomic DNA. Cycling parameters were 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of 94°C for 45 s, 54°C for 60 s, and 72°C for 70 s and a final elongation at 72°C for 7 min. PCR products were purified before sequencing using BigDye terminator chemistry (PerkinElmer) on an ABI 3100 sequencer, following the manufacturer's protocol. Sequences were run in both directions. They were checked and edited using Chromas version 1.6 (McCarthy 1997) and edited using ClustalW (Thompson *et al.* 1994) in BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999).

Isozyme electrophoresis

Electrophoretic procedures were performed according to the methods of Pasteur *et al.* (1987). The frozen body of each *O. fragilis* was homogenized in 250µl of grinding buffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0.05% β-mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF, 0.25mM sucrose; pH 6.8), prior to centrifugation at 15000 rpm for 12 min. The supernatant was stored at - 80°C until subjected to electrophoresis. Horizontal enzyme electrophoresis was conducted on 12% starch gels for 7 enzyme systems using the following buffers: (1) Tris-Citrate, pH 8 for Phosphoglucosomerase (*Pgi*, E.C. 5.3.1.9), Phosphoglucosomutase (*Pgm*, E.C. 5.4.2.2), Malate Dehydrogenase (*Mdh*, E.C. 1.1.1.37), Malic Enzyme (*Me*, E.C. 1.1.1.40) and (2) Tris-Borate-EDTA, pH 8.5 for Pyruvate Kinase (*Pk*, E.C.2.7.1.40) and Hexokinase (*Hk* E.C. 2.7.1.1) and Mannose phosphate isomerase (*Mpi*, E.C. 5.3.1.8). The most frequent allele was called '100' and other alleles were labelled according to their relative mobility to allele 100.

Genetic data analyses

Genetic structure based on mitochondrial sequences was estimated as follow: for each population, haplotype diversity (*He*) and nucleotide diversity (π) were examined with DNAsp 4.00 (Rozas *et al.* 2003). Neighbour-joining trees, based on Kimura-2 parameter method (Kimura 1980), were constructed with Mega 2.1 (Kumar *et al.* 2001), with 1000 bootstraps. The same software was used to compress the tree to concentrate the tree topology on the main nodes. Pairwise genetic distances (ϕ_{st}) were estimated between samples using Arlequin 2.000 (Schneider *et al.* 2001). Isolation-by-distance was tested with a Mantel test using Genepop 3.4 (Raymond and Rousset 1999). Geographic distances were estimated by calculations of linear distances along coastline between 2 points using Great Circle Calculator (available at <http://www.gb3pi.org.uk/great.html>). An AMOVA (Analysis of molecular variance) was performed using Arlequin 2.000 (Schneider *et al.* 2001). The AMOVA analysis was successively conducted with a subdivision of populations into geographic groups, color morphs, habitat types and size groups (see Table 1). Five geographic groups were defined: South Brittany, Iroise Sea, Western English Channel, Eastern English Channel and Irish Sea (see Figure 1). Color morphs were determined for few individuals for which both the color of the arms and the body were uniform and representative of specific populations (red for Roscoff, Wimereux and Antifer, blue for Wimereux and Paluel, and black for Restran and Ile Segal). Size groups correspond to distinct cohorts deduced from the time-series of size-frequency histograms made in Roscoff and Wimereux (juveniles from May 2004, June 2005 and larvae from August 2005 for Roscoff and juveniles from October 2004, 2005 and 2006 for Wimereux, and adults from 2004 for both sites). Pairwise ϕ_{st} were calculated between these temporal sub-samples and a neighbour-joining tree was constructed using these distances. Gene flow and migration patterns among populations were estimated using the coalescent approach as implemented in the software package Migrate-n (Beerli and Felsenstein 2001). Past gene flow was obtained from a n-island migration model using 10 short chains with 500 steps and 3 long chains with 5000 steps, with 10 000 non-retained genealogies

sampled at the beginning of each chain. A 10-replicate run was conducted and assumed to be good if results became convergent.

Genetic diversity based on isozyme assays, differentiation and structure between populations were estimated for each population following classical population estimators. The null hypothesis of independence between loci was tested from statistical genotypic disequilibrium analysis. Allele frequencies, mean number of alleles per population (Nall), observed (Ho) and expected (Hnb) heterozygosities (Nei 1987) were estimated using Genepop 3.4 software (Raymond and Rousset 1999) whereas allelic richness (Rs) was estimated with Fstat 2.9.3.2 (Goudet 1995). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were examined for each population, at each locus, by calculating Wright's fixation index Fis as estimated by Weir and Cockerham (1984), which was then tested using exact tests. Overall levels of genetic differentiation was analyzed by calculating the estimator of Wright's Fst statistics for each locus, and tested using exact tests for the null hypothesis of identity of allelic distribution across populations. Isolation-by-distance analysis, decomposition of the molecular variance with geographic groups (Fst-based AMOVA) and estimations of migration patterns (with a 3-replicate run) were estimated as in the mtCOI analysis. A principal component analysis (PCA) was performed with PCA-Gene (Goudet 1999) to identify relationships between populations.

Biometry and demographic analyses

The internal diameter of the disc was chosen to perform size-frequency histograms as it represents the best descriptor of the growth of the brittle star (refs). It is defined as the distance between the distal extremities of a pair of radial shields and the middle of a line joining the base of the two pairs of adjoining, diametrically opposite shields (Guille 1964). It was measured under a binocular microscope with a micrometer at 12x magnification to the nearest 0.02 mm. Around two hundreds of brittle-stars from each of the three sites were measured every three months in average. Individuals were grouped into 1 mm size classes for the analysis in order to minimize null classes but maximize the number of size classes. The Normsep program of Tomlinson (1970) adapted by Glémarec and Menesguen (1979) was used in order to identify modal components out of size frequency histograms by an adjustment of the observed distribution to a set of normal rules.

Results

Nucleotidic polymorphism at the COI mitochondrial gene

A neighbour-joining tree based on average pairwise distances estimated from the 542-bp mtCOI sequences between populations is presented in Figure 2a. The topology of the tree indicates the occurrence of a large polytomy that groups together all the North Atlantic populations with no divergence among them (less than 1% of divergence). On the contrary, a deep nucleotide divergence (18.6%) exists between both the Mediterranean and the Galician samples and all other Atlantic populations. The Figure 2b shows a more accurate separation of individuals within the Atlantic lineage in which several clades can be distinguished but are shared by almost all populations. In this NJ tree, most individuals are grouped into clade A and the sibling clades B and C. The Figure 3 represents the relative contribution of these 3 groups (A, B and C) according to the geographical area they come from and the subsequent cohorts collected at Roscoff and Wimereux. Differences in the relative proportions of these three groups do not differ significantly between the 5 regions however, there is a more pronounced difference between the cohorts analysed with a lack of haplotypes typifying clade B in the case of Wimereux for settlers from 2004 and 2005.

Sequence analysis indicated the occurrence of 198 polymorphic sites, from which a tremendous number of 289 different haplotypes could be detected. From this dataset, 77.9% of the sites were parsimoniously informative and 22.1% were singletons. A similar high level of genetic diversity was encountered in each population (Table 2). Mean haplotype diversity (H_{e-HAP}) and mean nucleotide diversity (π) were of the same order of magnitude between populations, approximately 0.99 and 0.01 respectively. Proportion of 'private' haplotypes was very high and varied from 33 to 89% with a mean value of 67%. Pairwise F_{st} estimates between populations obtained from mtCOI sequences are presented in Table 3. Most of significant F_{st} values are found between the populations

Pentrez, Camaret, Paluel and Belgique and the remaining localities. However, they did not group with each other on to the neighbour-joining tree. Other F_{st} values were weak and non-significantly different from zero, whatever the geographical distance between pairs of populations, leading to a non-significant isolation-by-distance relationship (Figure 3).

Four AMOVA analyses were performed successively to test whether the geographic origin of brittle stars, their colour, the habitat or the time of settlement may have contributed to genetic differentiation; results are presented in Table 4. Whatever the parameter tested, more than 90% of the total variance was associated to the “within population” level ($0.020 < \Phi_{st} < 0.064$; all $p < 0.001$). Test on the brittle star pigmentation did not produce any hierarchical differentiation with a significant p-value only found at the “within population” level ($\Phi_{st} = 0.036$, $p < 0.001$). Differentiation among populations within geographic groups ($\Phi_{ct} = 0.023$, $p < 0.001$) or within habitat types ($\Phi_{ct} = 0.079$, $p < 0.001$) was significant but genetic variance associated with the subdivision of groups was not found significant for these two parameters. On the contrary, a non-negligible part of the total variance was found to be associated to the cohort subdivision, with significant fixation indices among cohorts within populations ($\Phi_{sc} = 0.079$, $p < 0.001$). This has reinforced observations made on Figure 3 suggesting genetic differences between cohorts but not between geographical groups. Pairwise F_{st} estimates obtained between the different cohorts collected both at Roscoff and Wimereux are presented in Table 5. At Roscoff, the only significant F_{st} value was found between larvae from 2005 and juveniles from 2004 whereas at Wimereux, four out of six F_{st} values were significant suggesting only a lack of differentiation between juveniles from 2004 and 2005. Similarities between cohorts are also represented using neighbour-joining trees for each locality (Figures 5a and 5b) and, suggested that self-recruitment takes a greater place at Roscoff than at Wimereux providing that exchanges do not expand over the range of the species.

Gene flow estimates across the five geographic regions as obtained by *Migrate_n*, were not equal one to each other, also not very asymmetrical (Table 6). The most donating populations seemed to be those from the Western English Channel, which, based on genetic diversities, are also those with the biggest theoretical effective population sizes.

Enzyme polymorphisms

Seven polymorphic enzyme loci were screened during this study. Genotypic disequilibrium was not detected across loci ($p > 0.05$) over the whole dataset, indicating that loci give independent information. The observed number of alleles is high and varies from 3 to 10, with an average of 5.6 (± 2.6). Allelic richness is similar between populations (Table 2). Heterozygote deficiencies are highly significant in all populations. Monolocus and multilocus F_{IS} values are presented in Table 7. Values ranged from 0.052 for Camaret to 0.397 for Portsall. Heterozygote deficiencies seem to be randomly distributed between loci in populations suggesting that this may be caused by either a spatial or a temporal Wahlund effect.

Pairwise multilocus F_{st} values, estimated according to Weir & Cockerham's (1984)'s F_{st} are presented in Table 3. Most pairwise values were significantly different from zero ($-0.001 < F_{st} < 0.171$; 96% of $p < 0.01$). However no pattern of isolation-by-distance was observed ($p = 0.65$, Mantel test; see Figure 3). Gene flow estimates across geographic regions are presented in Table 6. Using allozymes, gene flow estimates appears to be of one order of magnitude lower than those estimated from mitochondrial sequences (close to unity), and not very different from each other supporting the n-Island Model of dispersal with a limited amount of flow.

An AMOVA analysis based on geographic groups was performed (Table 4). Most of the genetic variation is explained by the individual genetic heterogeneity within populations (93.38%; $p < 0.01$). However, genetic variation between populations inside geographic groups was also significant (6.57%; $p < 0.01$) but not between groups. A Principal Component Analysis (PCA: Figure 6) was also performed using allele frequencies but do not give useful information on parameters that allow the grouping of *O. fragilis* populations. Although the two first axes are extracting about 50% of the total variance, no groups cannot be distinguished according to geographical coordinates or to habitat.

Demographic survey

Size-frequency histograms and modal decomposition are presented in Figure 7 for the three sites selected for the temporal survey. At Roscoff, for the two successive years, samples from October presented two groups of individuals: small-sized individuals with a modal length of c.a. 6 mm and large-sized individuals with a modal length of 9 mm corresponding to adults of one and 2 years-old, respectively. Additional peaks appeared between May and July, and represents arrivals of new recruits in the population (about 20% of renewal in the population). At Paluel, more than 80% of the population is made of an unique group of adults (modal length of 10 mm) from January to May. Recruitment events seemed to occur several times a year but by pulse of small numbers. In this case, recruits contributed to less than 10% of the whole sample size. At Wimereux, size-frequency histograms appeared polymodal with two to four modal components. Recruitment events are frequent occurrences with large numbers of recruits throughout the year. Three recruitment events have been indeed depicted in 2004 with a maximum in September (40% of renewal) and 4 recruitment events in 2005 with a maximum in June (80% of renewal). Because the adult mode (around 9 mm) was not always dominant, it seems that population turn-over is more drastic at Wimereux when compared to Roscoff and Paluel.

Discussion

***Ophiothrix fragilis*: a panmictic species in the North Atlantic?**

The taxonomic status of the species *Ophiothrix fragilis* has already be questioned by Baric and Sturmbauer (1999) a few years ago. They found two distinct lineages within the species' complex of Ophiotricidae, each lineage being isolated on one side of the Gibraltar strait. In this study, septentriennal lineages of *O. fragilis* and *O. quinquemaculata* are more genetically similar one to each other than they are similar to their oriental lineages, respectively. Our dataset confirmed the existence of these sibling lineages within *O. fragilis*, and, with 18.5% of divergence on the mtCOI between the two lineages, strengthened the hypothesis of vicariance previously proposed by Jolly et al. (2006) for coastal species living in the North Atlantic. However, in contrast to what was observed for *Pectinaria* and *Owenia*, the distribution of *O. fragilis* lineages do not seem to overlap at the entrance of the English Channel but are more likely separating along the coasts of Galicia. The repartition of the oriental (Mediterranean) lineage seemed indeed less restricted than previously thought and appears to expand further north along the Atlantic coasts of Spain and Portugal, where it interpenetrates populations of the septentrional lineage. Individuals collected from Galicia are closely related to those of Mediterranean rather than to those from Atlantic coasts.

In contrast to the potential lineage admixture along the Galician coasts, Atlantic populations are highly genetically homogeneous further North, around the British Isles and up to Norway with intra-lineage distances smaller than 1% and similar levels of genetic diversity in all populations. Past gene flow estimates seem to be quite similar between the main geographic regions investigated and, based on the mtCOI dataset, may indicate that most migrants originated from the Western English Channel. These results are in agreement with the hypothesis of a northern refuge near the English Channel entrance during the LGM (Jolly et al. 2006, Muths et al. 2006). Some algal species seem to share a similar pattern of expansion with a potential refuge along the southern coasts of the British Isles prior the opening of the English Channel, e.g. *Fucus serratus* (Coyer et al. 2003; unpublished data) and *Palmaria palmata* (Provan et al. 2005). Furthermore, a refuge in the Western English pre-Channel makes congruent potential colonisation pathways with actual residual currents in this region. Indeed, strong easterly currents should be able to ensure migration and colonisation towards the East whereas they may prevent nearly all the westward migration. This interpretation must however be taken with a great caution as most genetic diversities and numbers of "private" haplotypes are very similar among samples, and makes very difficult any localisation of a glacial refuge. A more intensive sampling effort along European coasts coupled with the development of highly polymorphic nuclear markers, may help to ascertain colonisation routes around the British Isles.

Great genetic heterogeneity within and between populations: a case of chaotic genetic patchiness?

Important and significant values of fixation indices, either within or between populations were found using allozymes and suggest that *O. fragilis* may not represent a panmictic species despite its long-span larval phase and the lack of geographic structure. On the contrary, mtCOI dataset has revealed a very high level of genetic diversity (nearly all individual display a distinct haplotype) but virtually no genetic differentiation at a large spatial scale, suggesting extensive levels of gene flow between populations. Both genetic markers therefore indicate a lack of spatial structure mainly caused by the fact that neighbouring populations were often as genetically differentiated as distant populations. For example, specimens from Hoedig and Houat, only 15 km apart, were leaving at the same depth and on the same substratum displayed the greatest values of pairwise F_{st} . Thus, there was no obvious evidence for either a geographic pattern of differentiation or habitat type specialisation. In fact, high levels of genetic differentiation should reflect the fact that all F_{is} values are highly significant, with no consistency across loci to explain the genetic variance. This is in agreement with the fact that most of the genetic variance is associated with the intra-population level. Such a genetic heterogeneity within populations can be due to the coexistence of, at least, two genetically different groups in *O. fragilis* (i.e. a Wahlund effect) and thus the reflection of either a spatial or a temporal admixture.

The genetic heterogeneity of *O. fragilis* can be first explained by the coexistence of chromatic varieties within the species with assorting mating inside each morph of the same colour, as it has been already shown for other species (Matsuoka and Hatanaka 1991; Manchenko and Kulikova 1996; Tarjuelo *et al.* 2004). Presently, there is a well-documented polychromatism in *O. fragilis* from yellow to red or blue to black coloured individuals (Koehler 1921; Allain 1974). However, most individuals possess an exclusive chromatic profile with all the intermediates between each other, leading to a real problem in identifying specific morphs. First results did not point out any relationship between genetic differentiation and colour morphs. (Mauro *et al.* 2003), polychromatism should be more the reflection of environmental factors rather than genetic ones, and especially depth, in the present case.

The second hypothesis, which can be invoked to explain chaotic genetic patchiness at such a scale, is the 'cohort effect'. In such a case, the very high level of genetic structuring within populations may be explained by genetic differences existing between successive cohorts. The AMOVA analysis performed across "cohort" showed that temporal effect takes a significant part of the genetic variance within a population. However genetic differences between recruits appeared less pronounced at Roscoff than at Wimereux. This is in agreement with our population dynamics survey, which points out a great heterogeneity in both the number of recruitments per year and their intensity in populations between these two sites. When recruitment events appear to occur throughout the year at Wimereux, it seems to be restricted during the Summer period at Roscoff. This could partly explain why the intrapopulation variance is more pronounced at Wimereux. Indeed, settlement turn-over is rapid at Wimereux, and is likely to generate an admixture of genetically-differentiated "cohorts" if larval pools entering the population come from different source populations. Moreover, mature adults may be shifted in their spawning periods over the year according to their settlement dates with the consequence of preventing any further genetic re-homogenisation of the population by self recruitment in a way already proposed by Hendry & Troy (2005). On the opposite, at Roscoff, population turn-over is much slower; adults are resulting from a single major recruitment event and thus are more likely to reproduce with each other during the following year. Spatial variability in population dynamics is therefore likely to impact genetic signature of populations either by attenuating or enhancing the "cohort" effect locally. Such a scenario has been already invoked to explain chaotic genetic differentiation at a local spatial scale in the bivalve *Spisula* (David *et al.* 1997) as well as patterns of temporal genetic heterogeneities for a variety of benthic marine invertebrates, first, on small spatial scales (Johnson and Black 1982; Johnson and Black 1984) and, latter, on a larger geographical range (Watts *et al.* 1990; Kordos and Burton 1993; Moberg and Burton 2000; Addison and Hart 2004). Variation in the genetic composition of cohorts may be attributable to: first, the origin of larvae - Larvae may come from various source populations, depending on the strength and direction of currents, and second, to differential selection on early life stages - differential mortalities may indeed decrease genetic diversity of larvae and recruits according to genotype. Finally, depending on environmental conditions, only a small fraction of adults could significantly contribute to the next generation and thus may lead to 'sweepstakes' in the gene pool of newly recruited individuals

(Hedgecock 1994a). A recent study tends however to moderate the importance of this last source for genetic differentiation as there is to date no evidence of such sweepstakes in empirical studies (Flowers *et al.* 2002). Whatever the hypothesis, genetic differences between cohorts are mostly the result of environmental fluctuations at local scales, leading to a paradox in which genetic heterogeneity among cohorts could be induced by environmental variations despite a constant population dynamics functioning. Indeed, Linström and Kokko (2002) have argued that chaotic environmental variation could induce in some cases, a stabilizing effect on population dynamics whereas stable conditions over several years for the same populations may generate an important stochasticity in recruitment. In the particular case of *O. fragilis*, populations are supposed to be stable over time and space with recurrent recruitments and high levels of gene flow for the last 16 years at Wimereux (Davoult *et al.* 1990; present data), but present a highly heterogeneous structure locally. Such patterns of chaotic genetic patchiness typifying *O. fragilis* both at Roscoff and Wimereux may be thus explained by the association of a long dispersal phase together with the co-occurrence of environmentally-dependant varieties. This could indeed lead to mosaics of temporally-isolated reproducers over a large spatial scale with a pronounced temporal Wahlund effect.

The present study does not allowed us to explain accurately actual patterns of differentiation in *O. fragilis* along North East Atlantic coast. Although the absence of geographic patterns is in agreement with the assumption of a broad dispersal and thus may fit an n-Island model, most differentiation occurs within and between neighbouring populations in a chaotic manner. This may be due to both the co-occurrence of distinct varieties (pentaphyllum vs echina: one being subtidal, the other intertidal) and admixtures of genetically-differentiated cohorts during the recruitment periods. This study therefore reinforces previous hypotheses about the role played by the recruitment heterogeneity in shaping the genetic signature of populations (see David *et al.* 1997). More detailed studies on genetic structure associated with size-stratified populations should be performed, in parallel to new approaches for identifying the origin of recruits (i.e. stable isotopes, like for fish (Charles *et al.* 2004)).

Acknowledgments

We are very grateful to people who help us in collecting samples, in particular the Mysis and Sepia captains and crews for samples dedicated to the demographic survey, J. Grall and C. Broudin for BZH samples, and C. Hubas for ensuring the star-trip between Roscoff and Wimereux. A special thanks to Pierre Legendre who help us in analysing the dataset and people who provide us more “exotic” samples: A. Carlier from Mediterranean, J. Murillo Prez from Galicia, L. Dupont from Plymouth, R. Morgan from Belgium, S. Stöhr from Sweden and T. Brattegard from Norway.

Bibliography

- Addison JA, Hart MW (2004) Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) using microsatellites. *Marine Biology* 144: 243-251
- Allain JY (1974) Ecologie des bancs d'*Ophiothrix fragilis* (Abilgaard) (Echinodermata, Ophiuroidea) dans le golfe normanno-breton. *Cahiers de biologie marine* 15: 255-273
- Arndt A, Smith MJ (1998) Genetic diversity and population structure in two species of sea cucumber : differing patterns according to mode of development. *Molecular Ecology* 7: 1053-1064
- Baric S, Sturmbauer C (1999) Ecological parallelism and cryptic species in the genus *Ophiothrix* derived from mitochondrial DNA sequences. *Molecular and Phylogenetics Evolution* 11: 157-162
- Berli P, Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in subpopulations using a coalescent approach. . *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 4563-4568
- Broom DM (1975) Aggregation behaviour of the brittle-star *Ophiothrix fragilis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 55: 191-197
- Brun E (1969) Aggregation of *Ophiothrix fragilis* (Abilgaard)(Echinodermata: Ophiuroidea). *Nytt Magazin for Zoologi* 17: 153-160
- Charles K, Roussel J-M, Cunjak RA (2004) Estimating the contribution of sympatric anadromous and freshwater resident brown trout to juvenile production. *Marine and Freshwater Research* 55: 185-191
- Cowen RK, Lwiza KM, Sponaugle S, Paris CB, Olson DB (2000) Connectivity of marine populations: open or closed? *Science* 287: 857-859
- Coyer JA, Peters AF, Stam WT, Olsen JL (2003) Post-ice age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Phaeophyceae; Fucaceae) populations in Northern Europe. *Molecular Ecology* 12: 1817-1829

- Davoult D, Gounin F (1995) Suspension-feeding activity of a dense *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard) population at the water-sediment interface : time coupling of food availability and feeding behaviour of the species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 41: 567-577
- Davoult D, Gounin F, Richard A (1990) Population dynamics and reproduction of *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard) in the strait of Dover (English Channel). *Journal of experimental marine Biology and Ecology* 138: 201-216
- Ellien C, Thiébaud E, Barnay AS, Dauvin JC, Gentil F, Salomon JC (2000) The influence of variability in larval dispersal on the dynamics of a marine metapopulation in the eastern Channel. *Oceanologica Acta* 23: 423-442
- Flowers JM, Schroeter SC, Burton RS (2002) The recruitment sweepstakes has many winners: genetic evidence from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Evolution* 56: 1445-1453
- Gaines SD, Bertness MD (1992) Dispersal of juveniles and variable recruitment in sessile marine species. *Nature* 360: 579-580
- Glémarec M, Menesguen A (1979) Fonctionnement of a muddy sand ecosystem : seasonal fluctuations of different trophic levels and difficulties in estimating production of the dominant macrofauna species Benthic Dynamics Symposium, Savannah, Georgia
- Goudet J (1995) FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486
- Goudet J (1999) PCA-Gene 1.2. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm>, Institute of Ecology, University of Lausanne
- Guille A (1964) Contribution à l'étude de la systématique et de l'écologie d'*Ophiothrix quinquemaculata* Vie et Milieu 15: 243-309
- Hall TA (1999) BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41: 95-98
- Hedgecock D (1994a) Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In: Beaumont (Ed.) CH (ed) *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, London, pp 122-134
- Hedgecock D (1994b) Temporal and spatial genetic structure of marine animal populations in the California currents. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations* 35: 73-81
- Hellberg ME, Burton RS, Neigel JE, Palumbi SR (2002) Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science* 70: 273-290
- Johnson MS, Black KD (1984) Pattern beneath chaos : the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet. *Evolution* 38: 1371-1383
- Johnson MS, Black R (1982) Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria* sp. *Marine Biology* 70: 157-164
- Jolly MT, Viard F, Weinmayr G, Gentil F, Thiébaud E, Jollivet D (2003) Does the genetic structure of *Pectinaria koreni* (Polychaeta : Pectinariidae) conform to a source-sink metapopulation model at the scale of the Baie de Seine? *Helgolander Marine Research* 56: 238-246
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120
- Kinlan BP, Gaines SD, Lester SE (2005) Propagule dispersal and the scales of marine community processes. *Diversity and Distributions* 11: 139-148
- Koehler R (1921) *Faune de France - Echinodermes*, Paris
- Kordos L, Burton R (1993) Genetic differentiation of Texas Gulf coasts populations of the Blue crab *Callinectes sapidus*. *Marine Biology* 117: 227-233
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen I, Nei M (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245
- Lefebvre A, Ellien C, Davoult D, Thiébaud E, Salomon JC (2003) Pelagic dispersal of the brittle-star *Ophiothrix fragilis* larvae in a megatidal area (English Channel, France) using an advection/diffusion model. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57: 421-433
- Lindström J, Kokko H (2002) Cohort effects and population dynamics. *Ecology letters* 5: 338-344
- Manchenko GP, Kulikova VI (1996) Allozyme and colour differences between two sibling species of the heteronemertean *Lineus torquatus* from the Sea of Japan. *Marine biology* 125: 687-691
- Matsuoka N, Hatanaka T (1991) Molecular evidence for the existence of four sibling species within the sea-urchin, *Echinometra mathaei* in Japanese waters and their evolutionary relationships. *Zoological Science* 8: 121-133
- Mauro A, Arculeo M, Parinello N (2003) Morphological and molecular tools in identifying the Mediterranean limpets *Patella caerulea*, *Patella aspera* and *Patella rustica*. *Journal of experimental marine biology and ecology* 295: 131-143
- McBride CW (1907) The development of *Ophiothrix fragilis*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 51: 557-606
- McCarthy C (1997) Chromas, Version 1.41. Griffith University, Brisbane
- McMillan WO, Raff RA, Palumbi SR (1992) Population genetic consequences of developmental evolution in sea urchins (genus *Heliocidaris*). *Evolution* 46: 1299-1312
- McMullin E, Hourdez S, Schaeffer S, Fisher C (2003) Phylogenetics and biogeography of deep-sea vestimentiferan tubeworms and their bacterial symbionts. *Symbiosis* 34: 1-41
- Mladenov PV, Allibone RM, Wallis GP (1997) Genetic differentiation in the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata: Echinoidea). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 31: 261-269
- Moberg PE, Burton RS (2000) Genetic heterogeneity among adult and recruit red sea urchins, *Strongylocentrotus franciscanus*. *Marine Biology* 136: 773-784
- Morgan R, Jangoux M (2002) Reproductive cycle and spawning induction in the gregarious brittle star *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata) in the Oosterschelde (Netherlands). *Invertebrate Reproduction and Development* 42: 145-155
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York
- Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F, Catalan J, Britton-Davidan J (1987) *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*, Paris

- Planes S, Lenfant P (2002) Temporal change in the genetic structure between and within cohorts of a marine fish, *Diplodus sargus*, induced by a large variance in individual reproductive success. *Molecular Ecology* 11: 1515-1524
- Provan J, Wattier RA, Maggs CA (2005) Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmaria palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Molecular Ecology* 14: 793-803
- Raymond M, Rousset F (1999) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497
- Salomon JC (1990) Role of instantaneous and long-term water movements on the recruitment and life of benthic fauna in the English Channel. *La mer* 28: 211-217
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2001) Arlequin (v 2.000) : Software for population Genetics Dtat Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Departement of Anthropology, University of Geneva, Geneva
- Sponaugle S, Cowen RK, Shanks A, Morgan SG, Leis JM, Pineda J, Boehlert GW, Kingsford MJ, Lindeman KC, Grimes C, Munro JL (2002) Predicting self-recruitment in marine populations : biophysical correlates and mechanisms. *Bulletin of Marine Science* 70: 341-375
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall KA, Pascual M, Turon X (2004) Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. *Molecular Ecology* 13: 3125-3136
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680
- Todd CT, Lambert WJ, Thorpe JP (1998) The genetic structure of intertidal populations of two species of nudibranch molluscs with planktotrophic and pelagic lecithotrophic larval stages : are pelagic larvae "for" dispersal? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 228: 1-28
- Tomlinson PK (1970) Program Normsep (Fortran IV). Dept Fish and Game, The resources agency of California
- Watts RJ, Johnson MS, Black KD (1990) Effects of recruitment on genetic patchiness in the sea urchin *Echinometra mathaei* in Western Australia. *Marine Biology* 105: 145-151
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370

Table 1. Geographic position of *O. fragilis* populations and sample sizes used in the mitochondrial (N_{coi}) and allozymes (N_{all}) surveys. The most common habitat type is dense bed of ophiuroids (DBO) but there are also Maerl bed with some rare ophiuroids (MBO), rare ophiuroids sampled on the rocky intertidal (RI), rare ophiuroids sampled in the subtidal area (RS). For Roscoff and Wimereux samples, the N_{coi} in brackets corresponded to temporal samples.

	Population	Label	Figure 1 legends	Depth	Latitude	Longitude	Habitat types	N_{coi}	N_{all}
South Brittany	Hoedig	Dig	1	11 m	47°21,75'N	2°49,35'W	DBO	14	48
	Houat	Ho	2	13 m	47°24,54'N	2°58,31'W	DBO	14	48
	Trevignon	Tre	3	15 m	47°52,15'N	3°58,05'W	MBO	11	34
Iroise Sea	Pentrez	Pen	4	15 m	48°10,32'N	4°19,55'W	MBO	3	45
	Morgat	Mo	5	0 m	48°13,54'N	4°29,50'W	RI	3	-
	Cap Chevre	CCh	6	27 m	48°09,02'N	4°29,02'W	DBO	12	48
	Camaret	Cam	7	22 m	48°18,04'N	4°37,02'W	DBO	15	48
	Rade Brest	RB	8	10 m	48°19,22'N	4°23,26'W	MBO	20	48
	Ile Segal	IS	9	0 m	48°26,29'N	4°46,94'W	RI	17	48
	Portsall	Por	10	94 m	48°36,2'N	4°49,40'W	RS	7	18
Western English Channel	Keremma	Ker	11	80 m	48°46,5'N	4°10,00'W	RS	10	32
	Roscoff	Ro	12	71 m	48°47,42'N	3°58,79'W	DBO	33 (+72)	50
	Restran	Rest	13	0 m	48°43,70'N	3°58,02'W	RI	13	23
Eastern English Channel	Antifer	Ant	14	30 m	49°58,24'N	0°14,41'E	DBO	9	-
	Paluel	Pal	15	30 m	49°53,10'N	0°35,10'E	DBO	21	38
	Wimereux	Wx	16	31 m	50°55,00'N	1°35,00'E	DBO	28 (+38)	60
	Belgique	Be	17	25 m	51°31,00'N	4°00,00'E	DBO	16	48
	Plymouth	Ply	18	2 m	50°21,16'N	4°07,52'W	RS	10	36
Irish Sea	Cardigan Bay	CB	19	53 m	52°51,08'N	4°47,48'W	DBO	14	52
	West Anglesey	WA	20	54 m	53°22,95'N	4°59,77'W	DBO	15	48
	Lyna's point	Ly	21	31 m	53°25,46'N	4°13,13'W	DBO	16	48
	Ile Mann est	IE	22	42 m	54°01,23'N	4°17,55'W	DBO	15	48
	Mediterranea	Med	-	20 m	42°29,23'N	3°09,15'E	RS	3	-
	Galicia	Gal	-	0 m	42°46,20'N	8°59,57'W	RI	3	-
	Norway	Nor	-	0 m	60°20,00'N	5°12,00'E	RI	3	-
	Sweden	Swed	-	46 m	58°15,00'N	11°24,00'E	RS	3	-

Table 2. Genetic diversities for populations of *O. fragilis* : for mtCOI (N_{coi} = number of sequences ; h = number of haplotypes by populations ; Hd = haplotype diversity ; π = nucleotide diversity) and for allozymes (N_{all} = number of individuals; R_s = allelic richness estimated from a minimal sample size of 16 individuals; H_{obs} = observed heterozygosity ; H_{nb} = unbiased heterozygosity (Nei, 1987)).

	Mitochondrial diversity					Allozymic diversity				
	N_{coi}	h	Hd	π	% Private haplotype	N_{all}	R_s	H_{nb}	H_{obs}	
South Brittany	Hoedig	14	13	0.989	0.0135	0.62	48	3.055	0.464	0.409
	Houat	14	14	1	0.0131	0.53	48	3.073	0.467	0.399
	Trevignon	11	10	0.982	0.0113	0.64	34	3.070	0.455	0.408
Iroise Sea	Pentrez	3	3	1	0.0086	0.33	45	3.308	0.477	0.398
	Morgat	3	3	1	0.0090	0.67	-	-	-	-
	CapChevre	12	11	0.985	0.0101	0.75	48	3.128	0.421	0.282
	Camaret	15	12	0.978	0.0106	0.50	48	3.312	0.499	0.473
	Rade de Brest	20	20	1	0.0107	0.65	48	3.549	0.529	0.475
Western English Channel	Ile Segal	17	17	1	0.0122	0.76	48	3.361	0.521	0.452
	Portsaill	7	7	1	0.0079	0.71	18	2.714	0.403	0.246
Eastern English Channel	Keremma	10	10	1	0.0096	0.40	32	2.805	0.397	0.312
	Roscoff	33	27	0.997	0.0126	0.78	50	3.924	0.565	0.463
	Restran	13	12	0.987	0.0120	0.83	23	3.805	0.553	0.397
Irish Sea	Antifer	9	9	1	0.0150	0.89	-	-	-	-
	Paluel	21	21	1	0.0105	0.83	38	3.781	0.540	0.479
	Wimereux	28	25	0.992	0.0105	0.67	60	3.693	0.552	0.443
Irish Sea	Belgique	16	15	0.992	0.0097	0.62	48	3.668	0.533	0.541
	Plymouth	10	10	0.933	0.0113	0.75	36	3.392	0.444	0.365
Irish Sea	Cardigan Bay	14	11	1	0.0111	0.71	52	3.681	0.442	0.343
	West Anglesey	15	9	0.964	0.0114	0.71	48	3.551	0.499	0.423
	Lynna's point	16	15	0.992	0.0121	0.75	48	3.729	0.571	0.503
Irish Sea	Ile Mann est	15	15	1	0.0011	0.67	48	3.468	0.501	0.448

Table 3. Pairwise values of genetic differentiation of *O. fragilis*. Multilocus Weir and Cockerham's (1984) θ values obtained from the enzyme dataset are below the diagonal with test of significance performed with Genepop 3.3 (Raymond and Rousset, 1995). Pairwise ϕ_{st} values obtained from the mtCOI sequences dataset are in bold, above the diagonal with test of significance performed with Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2001). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

	Dig	Ho	Tre	Pen	CCh	Cam	RB	IS	Por	Ker	Ro	Rest	Pal	Wx	Be	Ply	CB	WA	Ly	IE
Dig	-0.008	0.009	0.073*	-0.083	0.032*	0.008	0.013	-0.032	0.031	-0.001	-0.016	0.027	0.015	0.031	0.023	0.004	0.005	0.004	0.016	
Ho	0.147***	-0.020	0.051*	-0.062	0.013	-0.013	-0.025	-0.015	0.002	-0.020	-0.019	0.007	-0.015	0.036	0.012	-0.010	0.004	0.004	-0.016	0.002
Tre	0.078***	0.096***	0.119***	-0.022	-0.022	-0.025	-0.024	0.012	0.021	-0.025	-0.002	-0.012	-0.011	0.079*	-0.005	0.008	0.004	0.004	-0.002	0.030
Pen	0.105***	0.068***	0.085***	-0.143	-0.041	-0.054	-0.067	-0.071	0.013	-0.080	-0.078	-0.082	-0.053	0.027	-0.061	-0.028	-0.052	-0.056	-0.013	-0.013
CCh	0.063***	0.166***	0.103***	0.106***	-0.036	-0.022	-0.026	-0.032	0.048	-0.061	-0.032	-0.018	-0.031	0.080	-0.040	0.014	0.026	-0.006	0.018	0.018
Cam	0.077***	0.074***	0.081***	0.046***	0.041***	0.010	0.012	0.043	0.097	0.008	0.033	0.022	0.025	0.138***	0.020	0.061*	0.050*	0.043*	0.079*	0.079*
RB	0.054***	0.072***	0.083***	0.076***	0.072***	0.042***	-0.025	-0.014	0.013	-0.007	-0.007	-0.006	-0.006	0.044*	-0.001	-0.010	0.008	0.004	0.004	0.005
IS	0.075***	0.054***	0.073***	0.050***	0.057***	0.009***	0.034***	-0.009	-0.008	-0.009	-0.006	-0.010	-0.009	0.040*	0.022	-0.005	0.001	-0.015	-0.015	0.011
Por	0.076***	0.171***	0.100***	0.098***	0.004	0.049***	0.089***	0.070***	-0.001	-0.012	-0.008	-0.008	-0.011	0.017	0.065	-0.026	-0.030	0.005	0.002	0.002
Ker	0.091***	0.166***	0.102***	0.094***	-0.001	0.041***	0.091***	0.061***	-0.018	0.003	0.021	0.024	0.008	0.019	0.094***	-0.019	0.005	-0.002	-0.002	-0.005
Ro	0.060***	0.056***	0.069***	0.025***	0.097***	0.042***	0.042***	0.101***	0.105***	-0.005	0.006	0.006	-0.008	0.048*	0.016	-0.003	0.002	0.001	0.019	0.019
Rest	0.099***	0.133***	0.079***	0.106***	0.088***	0.091***	0.065***	0.072***	0.116***	0.054***	0.032*	0.032*	0.005	0.003	-0.007	-0.024	0.002	-0.026	-0.014	-0.014
Pal	0.032***	0.074***	0.050***	0.044***	0.064***	0.019***	0.032***	0.024***	0.069***	0.010	0.070***	0.061***	0.007	0.003***	0.076*	0.039	0.023	0.007	0.029*	0.039**
Wx	0.039***	0.058***	0.066***	0.025***	0.063***	0.028***	0.039***	0.024***	0.074***	0.007	0.061***	0.007	0.049	0.049	0.036	0.001	0.004	0.004	0.007	0.021
Be	0.035***	0.115***	0.120***	0.100***	0.069***	0.052***	0.029***	0.036***	0.094***	0.098***	0.052***	0.081***	0.037***	0.033***	0.085***	0.091	-0.014	0.020	-0.006	-0.017
Ply	0.100***	0.123***	0.081***	0.051***	0.031***	0.019***	0.075***	0.031***	0.017	0.009	0.078***	0.111***	0.050***	0.056***	0.085***	0.040	0.070*	0.022	0.028	0.028
CB	0.079***	0.098***	0.042***	0.050***	0.049***	0.045***	0.056***	0.057***	0.048***	0.039***	0.049***	0.067***	0.041***	0.053***	0.093***	0.033***	-0.016	-0.021	-0.029	-0.029
WA	0.097***	0.083***	0.092***	0.110***	0.082***	0.060***	0.041***	0.069***	0.095***	0.070***	0.084***	0.061***	0.072***	0.079***	0.096***	0.054***	0.001	0.005	0.001	0.005
Ly	0.056***	0.057***	0.083***	0.059***	0.123***	0.061***	0.033***	0.049***	0.127***	0.019***	0.073***	0.028***	0.021***	0.039***	0.113***	0.089***	0.074***	0.001	0.001	0.001
IE	0.051***	0.110***	0.042***	0.088***	0.064***	0.056***	0.035***	0.061***	0.089***	0.043***	0.033***	0.026***	0.045***	0.059***	0.076***	0.031***	0.039***	0.061***	0.061***	-0.013

Table 4. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) based on pairwise genetic distance (ϕ_{st} for mtCOI, Fst for allozyme)

	Degrees of freedom	Sum of squares	% of total variance	Fixation indices	p-value
Geographical effect (mtCOI)					
Among geographical groups	5	18.54	0.00	-0.003	0.58
Among populations within groups	16	64.84	2.34	0.023	<0.001
Within populations	288	882.48	97.66	0.020	<0.001
Geographical effect (Allozyme)					
Among geographical groups	5	61.99	0.05	0.001	0.42
Among populations within groups	14	169.46	6.57	0.066	<0.001
Within populations	1692	2926.89	93.38	0.066	<0.001
Color effect (mtCOI)					
Among color groups	2	9.55	0.87	0.009	0.417
Among populations within color groups	2	9.14	2.75	0.028	0.083
Within populations	50	169.87	96.38	0.036	<0.001
Habitat effect (mtCOI)					
Among habitat groups	3	8.14	-0.92	-0.029	1.00
Among populations within habitat groups	18	75.24	2.55	0.079	<0.001
Within populations	288	882.48	98.36	3.064	<0.001
Cohort effect (mtCOI)					
Among populations	1	13.02	1.75	0.017	0.16
Among cohorts within populations	6	39.38	4.65	0.047	<0.001
Within cohorts	164	552.79	93.60	0.064	<0.001

Table 5. Pairwise ϕ_{st} values obtained from the mtCOI sequences dataset obtained from different cohorts in Roscoff and Wimereux. Samples were in Roscoff : adults from 2004 (AR04), juveniles from May 2004 (JR04), June 2005 (JR05) and larvae from August 2005 (LR05); and in Wimereux : juveniles from October 2004 (JW04), 2005 (JW05) and 2006 (JW06) and adults from 2004. Tests of significance were performed with Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2001). *p < 0.05 ; **p < 0.01 ; ***p < 0.001

		JR04	LR05	JR05
Roscoff	LR05	0.034*		
	JR05	0.026	0.003	
	AR04	0.001	0.011	-0.014
		JW04	JW05	JW06
Wimereux	JW05	-0.010		
	JW06	0.127*	0.077***	
	AW04	0.159***	0.103***	0.027

Table 6. Gene flow estimates (Nm) between main geographic regions obtained by Migrate-n simulations for *O. fragilis*. Donating populations are in columns (with estimates of Θ , the parameter representing the effective population size) and receiving populations are in rows. First estimation are based on mitochondrial data whereas second one is based on allozymes.

	South Brittany	Iroise Sea	Western English Channel (WEC)	Eastern English Channel (EEC)	Irish Sea
<i>MtCOI</i>	(0.0492)	(0.2086)	(0.3516)	(0.1021)	(0.1587)
South Brittany	*	25.775	41.964	12.484	21.190
Iroise Sea	6.997	*	298.765	34.699	83.725
WEC	49.768	75.886	*	14.613	21.551
EEC	73.049	77.584	69.555	*	95.684
Irish Sea	46.912	91.616	334.727	83.864	*
<i>Allozyme</i>	(0.3502)	(0.4534)	(0.3539)	(0.2376)	(0.6915)
South Brittany	*	3.770	1.737	1.587	4.300
Iroise Sea	1.780	*	1.133	1.592	3.616
WEC	1.630	4.165	*	2.988	8.238
EEC	3.373	7.074	3.351	*	5.973
Irish Sea	1.970	3.134	1.472	0.810	*

Table 7. Mono - and multilocus estimates of the fixation index F_{is} within each population of *O. fragilis*. Tests of significance were performed with Genepop 3.3 (Raymond and Rousset, 1995), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (– indicates unavailable values)

	Dig	Ho	Tre	Pen	CCh	Cam	RB	IS	Por	Ker	Ro	Rest	Pal	Wx	Be	Ply	CB	WA	Ly	IE
<i>PGI</i>	0.125*	0.166	0.209***	0.226	0.045	0.053	0.320***	-0.010	0.274	0.045	0.063	0.148	0.055	0.254	0.100	-0.051	0.222***	0.147**	-0.003	0.234*
<i>PGM</i>	0.170	0.471***	0.229***	0.369**	0.164	0.030	0.301***	0.174***	0.491***	0.344**	0.367***	0.254	0.375***	0.127***	-0.002	0.094	0.243***	0.262***	0.298**	0.121
<i>MDH</i>	-0.046	0.396*	0.245*	0.407**	-0.035	0.068	-0.051	-0.110	0.671**	0.142	0.234	0.495	-0.093	0.503***	-0.065	0.339	-0.064	0.090	0.068	-0.113
<i>ME</i>	0.284***	0.118	0.011	0.263	0.201	0.299***	0.080	0.293	0.521*	0.162	0.197*	0.410	0.138	0.381***	-0.049	0.340**	0.370***	0.103	-0.043	-0.047
<i>HK</i>	0.446*	0.052	-0.099	0.402**	0.192	-0.083	0.007	-0.001***	-0.097	-0.125	0.452***	-0.122	0.040	0.230***	0.014	0.184	0.046	0.135*	0.200***	0.107
<i>MPI</i>	-0.095	0.115*	0.050	0.438***	0.378**	0.252***	0.081*	0.206*	0.292	0.488***	0.161***	0.697***	0.190	0.263***	-0.043	0.279**	0.328*	0.307**	0.363***	0.380***
<i>PK</i>	-0.306	-0.324	-0.000	0.184	-0.105	-0.382	-0.277	0.218	-	-	-0.354*	-0.143	-0.281	-0.203	-0.083	-	-0.063	-0.001	-0.242	-0.126
<i>Multiloci average</i>	0.120***	0.147***	0.105***	0.168***	0.332***	0.052	0.104***	0.133***	0.397***	0.216***	0.182***	0.286***	0.115***	0.201***	0.015	0.179***	0.225***	0.155***	0.121***	0.107***

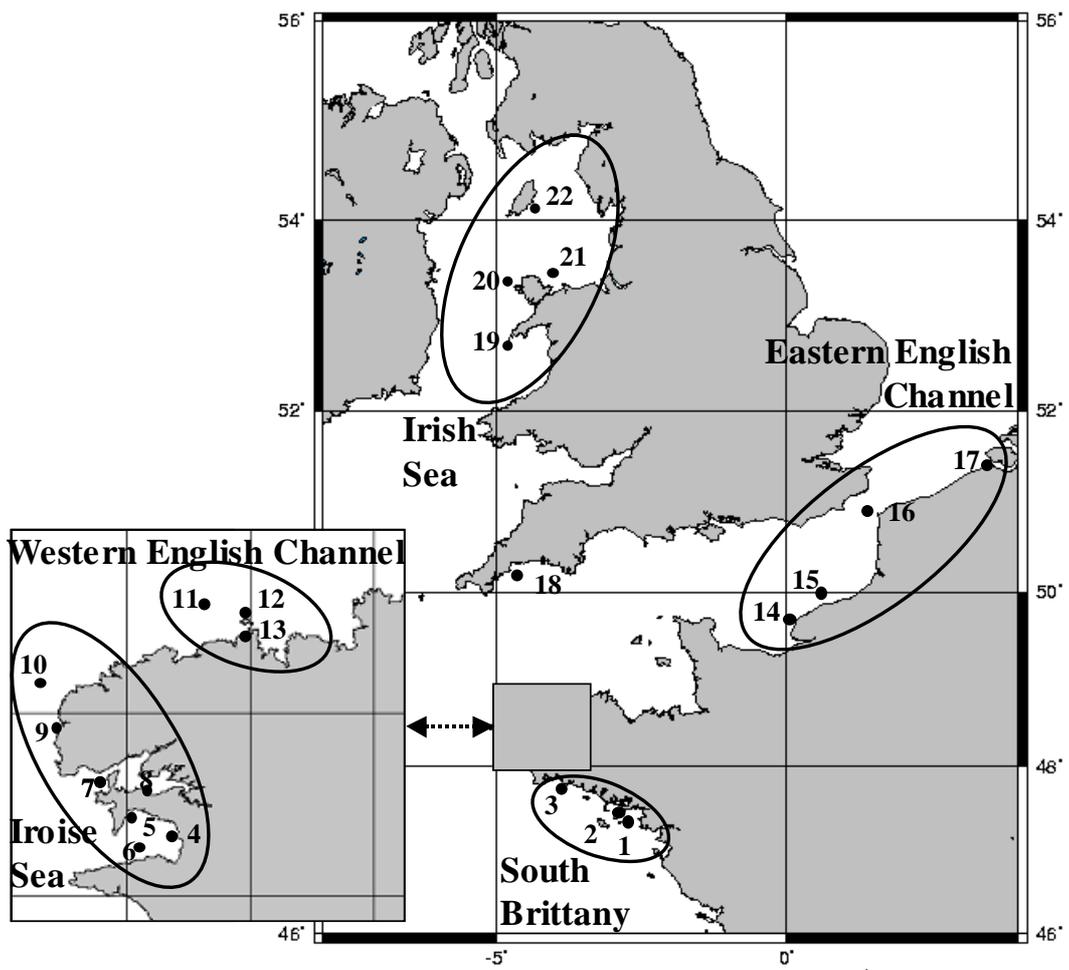


Figure 1. Geographic location of *O. fragilis* populations used in the study. Population labels are presented in Table 1.

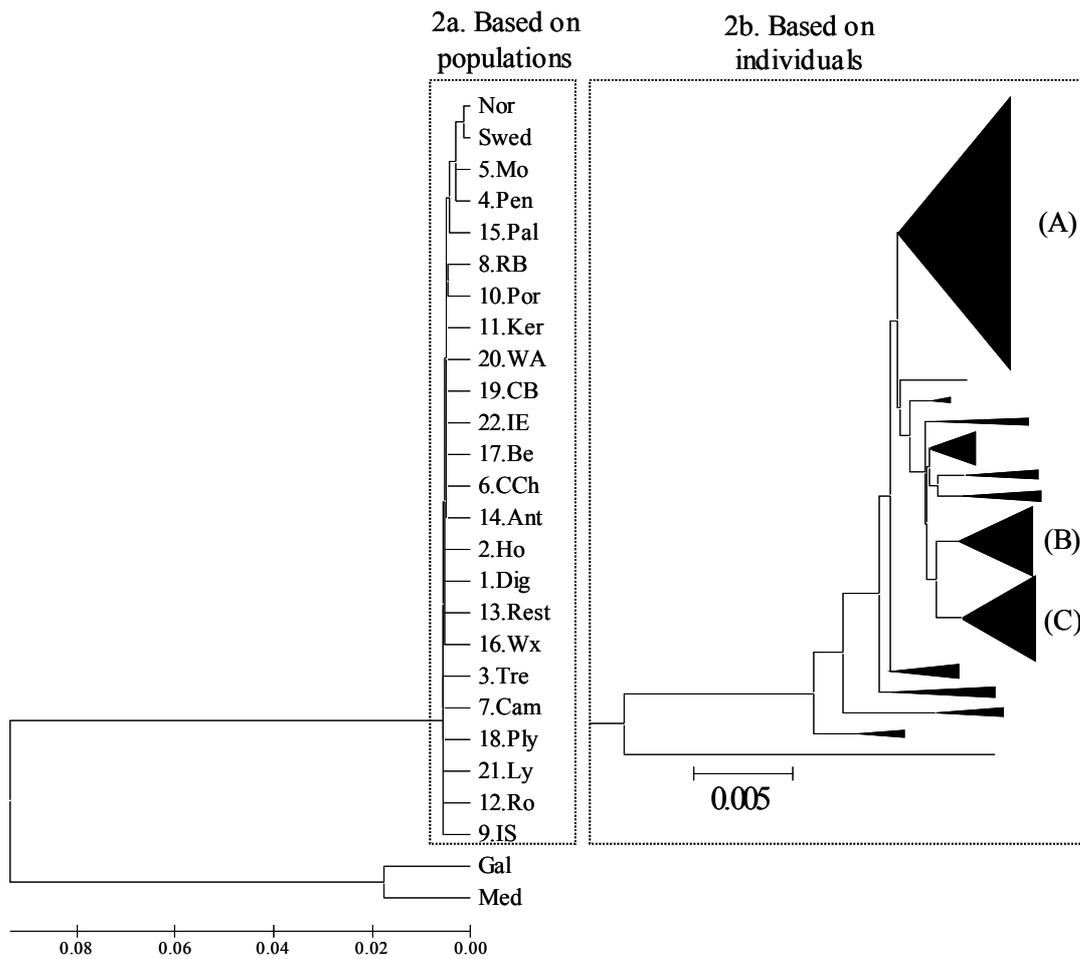


Figure 2. Neighbour-joining trees based on average pairwise distances between mtCOI sequences of *O. fragilis*, using Kimura-2 parameter distance method (Kimura, 1980) between populations (2a). Internal topology of the principal lineage is showed for the tree based on distances between individuals after compression (2b). After grouping, three main groups can be identified (A,B and C) and nine other secondary groups. Triangle thickness was proportional to the number of individuals condensed.

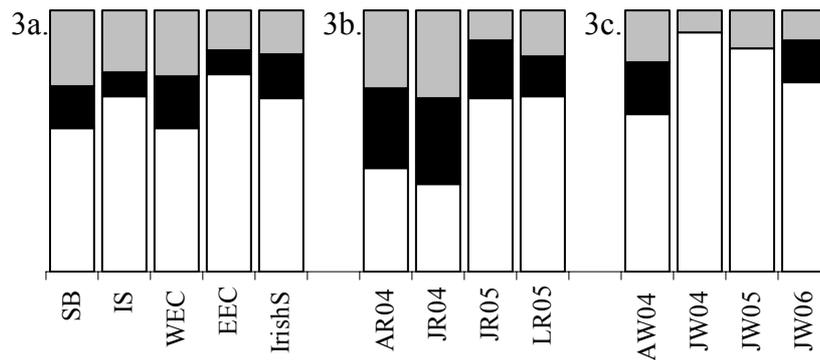


Figure 3. The three main groups identified in the principal lineage of the neighbour-joining tree (Figure 2b) were quantified in each samples and plotted depending of the: (3a) geographical origin of samples, (3b) cohorts in Roscoff and (3c) cohorts in Wimereux. (group A in white, B in black and C in grey)

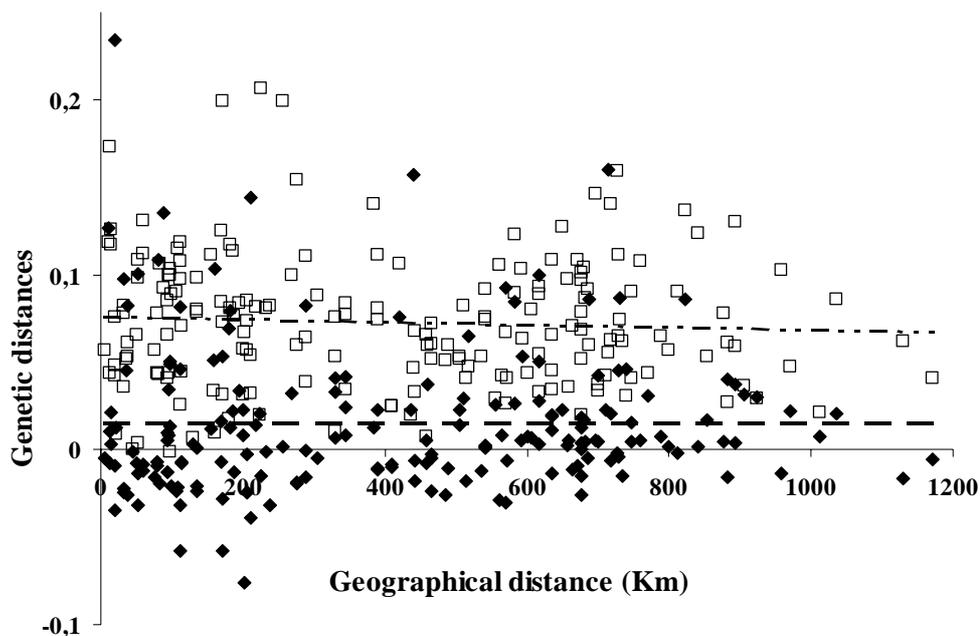


Figure 4. Isolation by distance graph showing corrected pairwise genetic distances (i.e. $\phi_{st}/(1-\phi_{st})$ for mtCOI and $\theta/(1-\theta)$ for allozymes) plotted as a function of geographic distances for populations of *O. fragilis*. Black rhomb correspond to mitochondrial data and white squares to allozymes data (test Mantel, $p = 0.41$ for mtCOI ; $p = 0.65$ for allozyme)



Figures 5. Neighbour-joining trees based on pairwise distances between mtCOI sequences of *O. fragilis* individuals grouped by cohorts in Roscoff (5a) and in Wimereux (5b). Trees were rooted by the Galician and Mediterranean samples. Black triangle symbolized adults sampled in 2004 in both sites. For Roscoff, white circles symbolized larvae from August 2005, grey stars and squares, juveniles from 2004 and 2005 respectively. For Wimereux, grey stars, grey squares and white circles symbolized juveniles from 2004, 2005 and 2006 respectively.

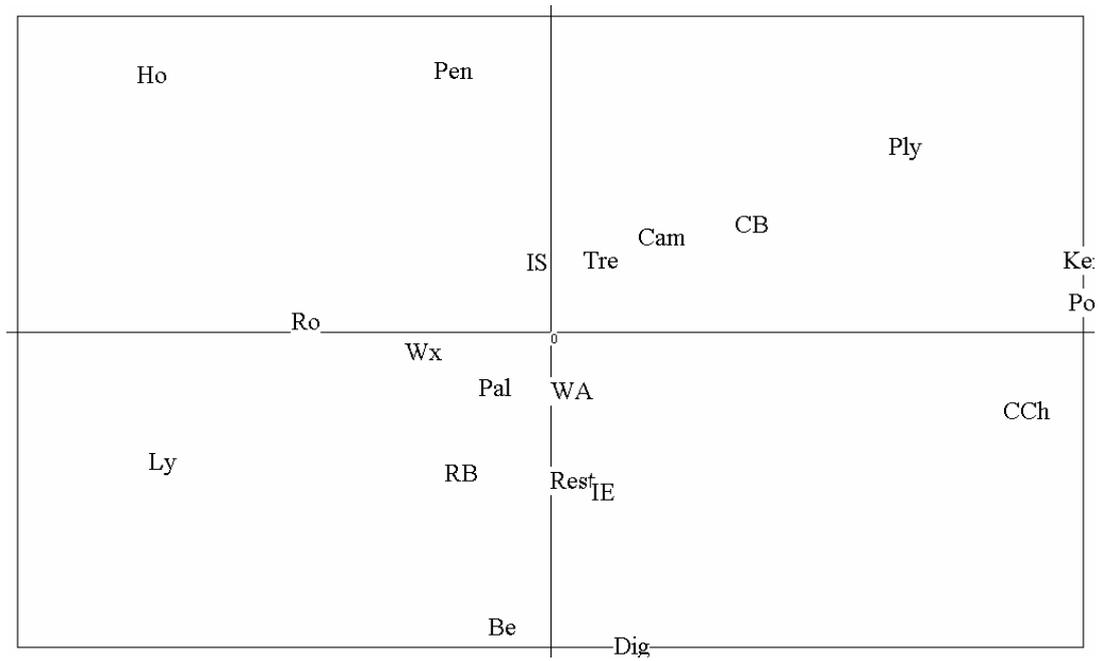


Figure 6. PCA of genetic differentiation generated on allozymic data for the 20 samples of *O. fragilis*. Axis PC1 and PC2 are explaining respectively 28.7% and 18.7% of the variance (both $p < 0.05$).

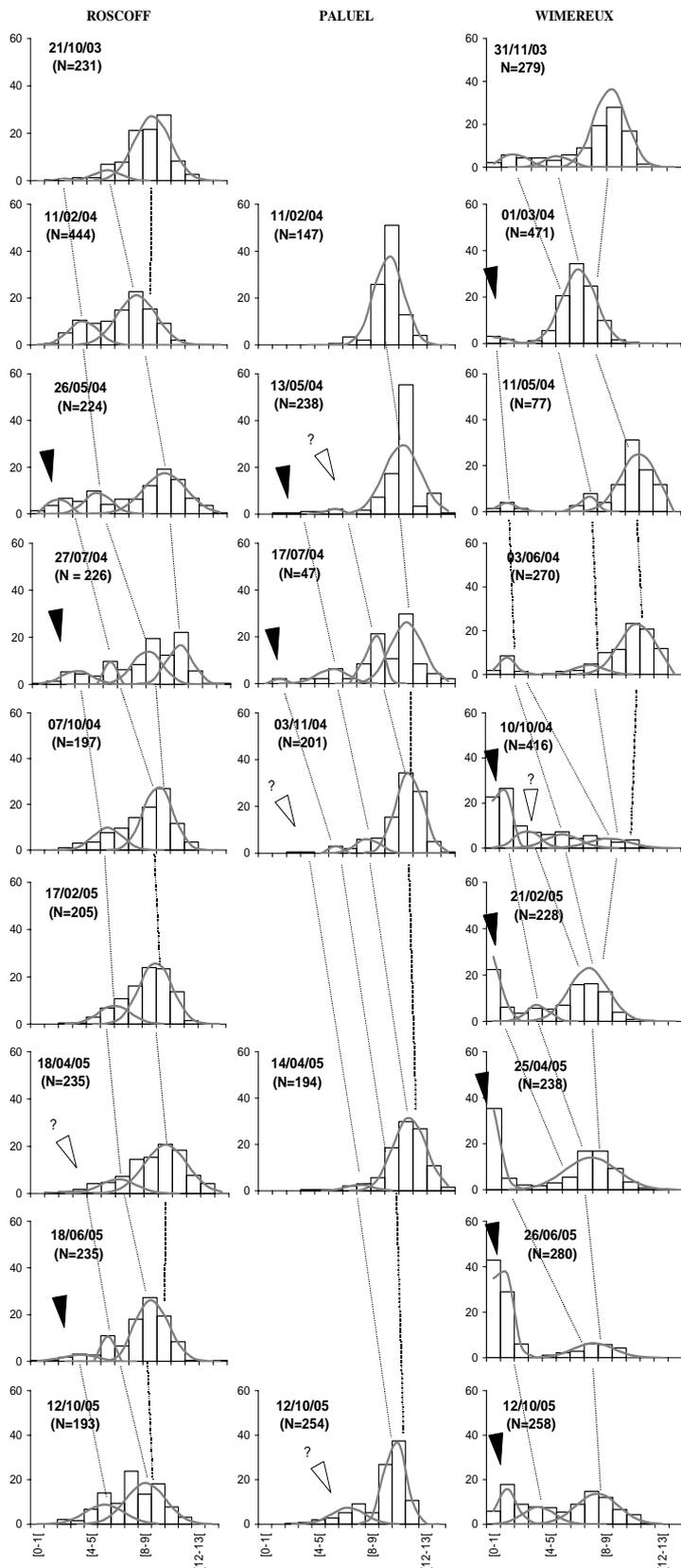


Figure 7. Size-frequency histograms and modal decomposition of the three populations of the demographic survey of *O. fragilis*. Sampling dates noted on each graph are followed by the number of measured individuals (in brackets). Black triangles indicate observed recruitment events and white triangle hypothetical ones. (for clarity, graphs are not shown when only one site could have been sampled but data have been taken into account in the interpretations).