

**Connectivité locale et recrutement en Méditerranée :
Importance pour les octocoralliaires dans un contexte de changement global**

Contexte de la recherche :

Comme son nom l'indique, le changement global affecte tous les écosystèmes. Considéré comme l'intégration des effets des différentes pressions anthropiques (y compris le changement climatique) il influence déjà profondément le fonctionnement et l'évolution des populations naturelles. En Méditerranée, les effets du changement climatique se font déjà sentir, avec une augmentation de température de l'eau de mer de 0,8 à 1°C sur les trente dernières années (Lejeune et al., 2010). Ces effets s'ajoutent aux conséquences des destructions d'habitat, des introductions d'espèces ou de l'exploitation. Face au changement climatique la réponse des populations naturelles peut schématiquement se diviser en trois mécanismes : déplacement de l'aire de répartition, acclimatation individuelle (ou plasticité) et adaptation génétique au sens strict. Il est probable que ces trois processus vont interagir et qu'il faudra notamment tenir compte de la connectivité entre populations présentes dans différents contextes écologiques pour comprendre la réponse à l'échelle de l'espèce.

Les métazoaires marins sessiles en Méditerranée nord occidentale, et plus particulièrement les octocoralliaires, illustrent bien l'importance de ces phénomènes. Plusieurs espèces d'octocoralliaires ont en effet été affectées par des événements de mortalités massives liés à des anomalies thermiques positives. De tels événements risquent de se reproduire plus fréquemment dans le cadre du changement climatique en cours. Une variabilité de réponse a été observée entre différentes profondeurs d'un même site, en partie du fait de l'exposition à différents niveaux de stress thermique, mais aussi entre populations et individus situés à une même profondeur (Crisci et al., 2011). Le devenir de ces espèces dépendra des niveaux d'échanges entre populations plus ou moins affectées par de telles mortalités et notamment entre différentes profondeurs : ces échanges vont en effet influencer les capacités de récupération des populations au niveau de la démographie ou de la diversité génétique. D'autre part ces échanges vont interagir avec les processus de sélection locale dans différents régimes thermiques qui vont également déterminer les capacités d'adaptation aux niveaux local et général. Dans le cas des gorgones, de précédentes études de génétique des populations ont mis en évidence des flux de gènes réduits entre populations proches (quelques dizaines de mètres dans le cas du corail rouge) et entre différentes profondeurs pour un même site (Ledoux et al., 2010a ; Costantini et al., 2011 ; Mokhtar-Jamaï et al., 2011). Ces résultats indiquent que les flux de gènes entre populations sont réduits à court terme. Cependant plusieurs points restent à préciser :

- Quelles sont les possibilités de recolonisation et l'origine de ces événements de colonisation en fonction des populations voisines pour une même profondeur ou entre différentes profondeurs ?
- Comment les flux de gènes interagissent-ils avec les processus de sélection locale et notamment le régime thermique ?
- Quels sont les niveaux d'échange pour des marqueurs potentiellement liés à l'adaptation au régime thermique ?

Le but de ce projet est de préciser les échanges entre populations de gorgonaires présentes dans différents régimes thermiques par l'analyse génétique de nouvelles recrues. La comparaison des niveaux de différenciation entre nouvelles recrues et populations adultes, ainsi qu'entre marqueurs neutres et potentiellement adaptatifs, permettra de préciser l'importance des flux de gènes et de la sélection naturelle sur les possibilités de recolonisation de cette espèce. Le projet sera ciblé sur le corail rouge *Corallium rubrum*.

Objectifs de la demande :

Ce projet est basé sur trois volets : i) la mise en place d'un système expérimental de collecte de nouvelles recrues dans la nature ; ii) la recherche de nouveaux marqueurs pour des analyses de génétique des populations avec un grand nombre de locus ; et iii) le génotypage et l'analyse statistique des données pour détecter l'origine des recrues et rechercher des signaux d'adaptation locale à différents régimes thermiques.

Alors que les analyses de génétique des populations se sont focalisées sur l'analyse de colonies adultes, il s'agira ici d'étudier la composition génétique de nouvelles recrues. La comparaison de la composition génétique des groupes de recrues permettra d'une part de tenter de déterminer leur population d'origine et d'autre part de les comparer aux populations adultes. Il s'agira de tester si des échanges ont lieu entre différentes profondeurs qui pourraient ne pas avoir été repérés sur les colonies adultes du fait d'une mortalité différentielle sur les jeunes colonies. Par ailleurs, l'approche multilocus, envisagée ici permettra de rechercher des signes indirects d'adaptation locale au régime thermique au niveau de locus "déviants". Le suivi des variations de fréquence alléliques entre cohortes pour ces locus candidats pourrait indiquer aussi des effets sélectifs. Afin d'intégrer la stochasticité temporelle des échanges et pour augmenter la taille des échantillons analysés, l'étude sera faite à l'issue de trois saisons de reproduction. La recherche de marqueurs adaptatifs de type SNP sera effectuée au niveau du transcriptome ; cette stratégie permet d'augmenter la probabilité d'identifier des marqueurs liés à l'adaptation (Garvin et al., 2010).

Cette demande de financement va principalement concerner la récolte et le suivi des recrues et le développement des marqueurs. Le génotypage des nouvelles recrues interviendra dans un deuxième temps et d'autres demandes de financements (déjà déposés ou futures) sont envisagées pour cette partie. Le suivi des recrutements présente en soi un important intérêt écologique, d'autant plus qu'il est variable dans le temps et selon les régions (Santangelo et al., 2012). L'étude du transcriptome fournira également des marqueurs directement utilisables pour l'analyse de l'expression de gènes en situation de stress et pour l'étude de la phylogéographie de cette espèce. Les locus les plus intéressants (d'après leur fonction ou leur fréquence dans l'échantillon de départ) seront génotypés dans un premier temps sur des colonies adultes déjà échantillonnées afin de préciser leur niveau de structuration génétique. L'analyse de la variabilité du transcriptome sera également intéressante en soi pour étudier le niveau de diversité génétique de cette espèce à une échelle locale. L'étude du transcriptome sera aussi utile pour des analyses d'expression de gènes en situation expérimentale selon des protocoles déjà mis au point (Haguenaer et al., 2011). La présente demande de financement devrait donc déjà permettre d'obtenir des résultats intéressants, avant même la finalisation de l'ensemble du projet.

Choix de l'espèce modèle :

Le corail rouge est une espèce d'une grande importance écologique et économique en Méditerranée (Bruckner, 2009) et qui a été affectée par les événements de mortalités massives. Les précédentes études de génétique des populations ont montré l'importance des études à une échelle locale pour cette espèce (Ledoux et al., 2010b) et de la prise en compte de l'effet de la profondeur sur la structuration génétique (Ledoux et al., 2010a ; Costantini et al., 2011) et les processus adaptatifs (Ledoux, 2010 ; Haguenaer et al., 2011). Par ailleurs la mise en place de plaques vierges à proximité de populations de corail rouge a montré son efficacité pour suivre le recrutement chez cette espèce (Garrabou & Harmelin, 2002 ; Santangelo et al., 2012). Le schéma expérimental prévu (voir ci-dessous) devrait donc permettre d'obtenir un nombre suffisant de recrues pour ce projet. Enfin il s'agit d'une espèce pour lesquelles les protocoles d'analyses moléculaires sont déjà bien maîtrisés au sein de l'équipe DEDM de l'IMBE. Le cas échéant nous pourrions aussi étudier l'origine de recrues d'autres espèces actuellement étudiées au niveau génétique à l'IMBE comme les gorgones *Paramuricea clavata* ou *Eunicella cavolinii*.

Réalisations prévues

i. Collecte de nouvelles recrues : (objet de la demande)

Des plaques de calcaire seront fixées en milieu naturel à différentes distances de populations de corail rouge des Calanques déjà connues et analysées au niveau génétique (Ledoux et al., 2010a). Ces plaques seront fixées à deux profondeurs pour un même tombant : 20 m et 40 m, dans des conditions abritées favorables au développement du corail rouge. Pour chaque profondeur, les plaques seront fixées à 5, 20 et 100 m des populations connues, selon la direction des courants dominants (afin de maximiser le recrutement sur ces plaques). Ces distances sont cohérentes avec la faible distance moyenne de dispersion estimée pour le corail rouge (Ledoux et al., 2010b), les différentes distances permettront d'envisager la variabilité de cette dispersion. Pour chaque site, 8 plaques de calcaire de 20 x 20 cm² seront fixées, ce qui aboutira à $8 \times 3 \times 2 = 48$ plaques au final. L'utilisation de telles plaques a déjà montré son efficacité pour favoriser le recrutement de cette espèce (Garrabou & Harmelin, 2002 ; Santangelo et al., 2012). Les premières plaques seront posées en juin 2012 afin de permettre le développement d'un bio-film avant la période de dispersion des larves. Les plaques seront photographiées 2 fois par an afin de suivre l'installation des recrues et leur survie. Au bout de trois ans les plaques seront retirées et les recrues seront conservées dans l'alcool pour une analyse génétique.

ii. Développement de marqueurs : (objet de la demande)

Une approche de type "locus outlier" sera utilisée afin de rechercher d'éventuels marqueurs liés à l'adaptation locale à différents régimes thermiques. Il s'agira de séquencer le transcriptome d'individus issus de différentes profondeurs afin de rechercher des marqueurs SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide) dans des régions codantes. Afin de limiter les biais d'identification de tels marqueurs, nous grouperons 6 individus issus de 20 m de profondeur et 6 individus issus de 40 m, et ceci pour deux sites éloignés de la zone des calanques. Les transcriptomes seront séquencés par séquençage Illumina. L'analyse bio-informatique des données permettra d'assembler les séquences, de rechercher la fonction des gènes ainsi identifiés et d'identifier les marqueurs de type SNP. L'annotation se fera sous l'égide de TOWER (Tools Operating With Evolutionary Resources) qui est une plateforme d'annotation utilisée en routine dans l'équipe EBM et en collaborations avec différents laboratoires (dont le Centre Scientifique de Monaco qui séquence actuellement le transcriptome du corail rouge). Une base de données sera mise en place et pourra être visionnée sur le modèle de la Chordate Evolutionary Data base (<http://ioda.univ-provence.fr>).

Les locus intéressants seront séquencés pour une première analyse populationnelle et pour préciser la structure génétique de ces marqueurs entre différentes populations.

iii. Génotypages et analyses statistiques : (suite du projet)

Les marqueurs SNP préalablement identifiés seront génotypés sur des échantillons de colonies adultes de corail rouge déjà disponibles pour la zone étudiée. La recherche de « locus outlier » sera basée sur la comparaison des niveaux de différenciation entre locus SNP et entre locus SNP et locus microsatellites selon diverses approches statistiques (Beaumont & Balding 2004; Coop et al. 2010; Excoffier et al. 2009; Foll & Gaggiotti 2008). Après récupération des plaques les recrues seront génotypées à l'aide des mêmes marqueurs SNP et de locus microsatellites (Ledoux et al., 2010a). Le but sera d'abord d'identifier précisément l'origine de ces larves (Piry et al., 2004) et de la relier à la distance et au régime thermique des populations d'origine. D'autre part nous testerons si les allèles potentiellement impliqués dans l'adaptation sont échangés d'une population à une autre au niveau des recrues. La comparaison des fréquences alléliques entre recrues et adultes pour les locus adaptatifs permettra aussi d'étudier l'existence d'éventuels effets sélectifs entre l'étape de recrutement et les stades ultérieurs.

L'ensemble de ces résultats fournira une image intégrée de la connectivité et des processus adaptatifs à une échelle locale qui est importante pour cette espèce (Ledoux et al., 2010b).

Plan financier :

Demandes de financement dans le cadre de l'appel d'offre interne Eccorev :

- Mise en place de plaques; achat de matériel pour les fixer et le suivi photographique : 400 €
- Séquençage du transcriptome par Illumina HiSeq 2000 pour 24 individus groupés à 12 par "lane" : deux "lanes" soit $2 \times 2\,500 = 5\,000$ € au total (plateforme GenomiX de Montpellier)
- Séquences pour l'analyse de la variabilité de locus candidats: deux plaques de séquençage Sanger avec 96 échantillons par plaques: 2×299 € (société Macrogen)
- **Total demandé pour l'appel d'offre interne Eccorev: 5 998 € HT**

Autres demandes de financement en cours sur le projet :

- **Projet ANR Bioadapt ADACNI** (Processus adaptatifs chez les cnidaires; déposé en octobre 2011) ; porteur : Didier AURELLE (IMBE). Ce projet est axé sur l'étude des processus adaptatifs pour deux espèces de cnidaires dont le corail rouge. L'approche expérimentale *in situ* prévue ici complèterait ce projet ANR par l'étude du recrutement. Inversement les coûts de génotypage nécessaires à l'analyse des recrues pourraient être pris en charge par ce projet ANR (qui vise entre autres à chercher des locus impliqués dans l'adaptation) ou par de futures candidatures du même type.
- **Réponse à l'appel d'offre ouvert régional** déposé en février 2012; porteur : Pierre PONTAROTTI (LATP). Ce projet est centré sur l'étude du transcriptome du corail rouge. Les résultats obtenus par ce projet permettraient d'avancer rapidement sur le développement de nouveaux marqueurs et la recherche de la fonction des gènes candidats. Une bourse régionale (PACA) a également été demandée, elle permettrait d'aller au bout de ce projet.

Bilan des financements demandés:

| Objet | Source de financement | Montant en € HT | Acquis / demandé |
|--|-----------------------|-----------------|------------------|
| Mise en place des plaques de recrutement | Eccorev | 400 | demandé |
| Découverte de SNPs | Eccorev | 5000 | demandé |
| Séquençage / vérification SNPs | Eccorev | 598 | demandé |
| Génotypages 384 SNPs sur 480 individus | ANR - Bioadapt | 13030 | demandé |
| Bourse doctorale | Région | 85350,96 | demandé |
| Matériel: lames | Région | 7400 | demandé |

Interactions prévues entre les équipes :

- Mise en place des plaques : choix des sites et de la disposition : IMBE et service plongée de Pythéas.
- Suivis photographiques : service plongée de Pythéas
- Développements de marqueurs SNP : préparation des échantillons : IMBE, analyses bio-informatiques : EBM et IMBE
- Analyses génétiques des populations : IMBE et EBM

Proposition de recherche : appel d'offre interne Eccorev

Description du consortium :

Le consortium est basé sur trois composantes : le laboratoire IMBE (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale), l'équipe EBM (Evolution Biologique et Modélisation) du laboratoire LATP (Laboratoire d'Analyse, de Topologie et de Probabilités), et l'Unité Mixte de Services (UMS) de l'Institut Pythéas. L'équipe DEDM (Diversité, Evolution et Diversification en Méditerranée) étudie entre autres la génétique des populations et l'évolution (y compris l'évolution moléculaire) de diverses espèces marines. Didier Aurelle y étudie la diversité génétique du corail rouge et d'autres gorgonaires depuis plusieurs années. Cette équipe dispose des compétences (notamment en termes d'analyses de données) nécessaires à l'étude de génétique des populations de cette espèce.

L'équipe EBM est spécialisée dans l'étude des processus évolutifs avec l'apport des outils bio-informatiques et de la modélisation mathématique. Elle a une longue expérience d'analyse des données transcriptomiques et génomiques.

Le service plongée de l'UMS Pythéas a une longue expérience des études de terrain des populations marines et notamment du corail rouge. Il a déjà participé à la mise en place de plaques pour l'étude du recrutement du corail rouge et au suivi des populations de cette espèce et d'autres octocoralliaires.

Une bourse de thèse a été demandée à la région PACA, cependant la réalisation de la première partie du projet prévue ici peut se faire sans aide extérieure, avec le soutien du personnel technique de l'IMBE notamment pour les analyses moléculaires.

Liste des participants :

| Nom Prénom | Statut | Unité | % d'implication en temps de recherche | Courriel |
|------------------------------------|--------|-------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| AURELLE Didier (porteur) | MC | IMBE (DEDM) | 25 % | didier.aurelle@imbe.fr |
| PONTAROTTI Pierre | DR | LATP - EBM | 10 % | Pierre.pontarotti@univ-provence.fr |
| CHABROL Olivier | IGR | LATP EBM | 10 % | Olivier.chabrol@univ-provence.fr |
| FREDERIC Zuberer | AI | UMS Pythéas | 5 % | Frederic.zuberer@univ-amu.fr |

CV du porteur du projet :

AURELLE Didier

Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale Né le 04/10/1972
(UMR 7263). Equipe : Diversité, Evolution et Diversification en Méditerranée
Institut Pythéas, Station Marine d'Endoume
Chemin de la batterie des Lions, 13007 Marseille
Téléphone 04 91 04 16 18
Fax 04 91 04 16 35
Courriel didier.aurelle@imbe.fr

Education

2009: HDR, Aix-Marseille Université
1999 : doctorat Université Montpellier II
1995: agrégation sciences de la vie et de la terre
1992-1996: Ecole Normale Supérieure

Carrière

Depuis 2012 : Maître de Conférence ; Institut Pythéas, UMR IMBE, Aix-Marseille Université ;
responsable de l'équipe « Diversité, Evolution et Diversification en Méditerranée »
2002-2011: Maître de Conférence; Centre d'Océanologie de Marseille, UMR 6540 DIMAR,
Université de la Méditerranée – Aix Marseille II
2000-2002 : Professeur en collège, Vertus and Fère-Champenoise (France)
2000 : Post-Doc Universidade do Algarve (Faro, Portugal)
1996-1999 : Doctorat; directeur: Dr Patrick Berrebi (Génome et Populations, Montpellier, France).
Titre : “*Contacts secondaires naturels et artificiels chez la truite commune (Salmo trutta, L.) des Pyrénées occidentales françaises: utilisation de marqueurs microsatellites pour la distinction de taxons faiblement différenciés*”.

Trois publications récentes:

AURELLE D., LEDOUX J.-B., ROCHER C., BORSA P., CHENUIL A., FÉRAL J.-P.
(2011) Phylogeography of the red coral (*Corallium rubrum*): inferences on the evolutionary history of a temperate gorgonian. **Genetica**, 139(7), 855-869.
MOKHTAR-JAMAÏ K., PASCUAL M., LEDOUX J.-B., COMA R., FÉRAL J.-P., GARRABOU J.,
AURELLE D. (2011) Genetic structuring in the red gorgonian *Paramuricea clavata* across the
Mediterranean Sea: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal.
Molecular Ecology, 20, 3291-3305.
LEDOUX J.-B., MOKHTAR-JAMAÏ K., ROBY C., FÉRAL J.-P., GARRABOU J., AURELLE D.
(2010) Genetic survey of shallow populations of the Mediterranean red coral (*Corallium rubrum*
(Linnaeus, 1758)): new insights into evolutionary processes shaping current nuclear diversity
and implications for conservation. **Molecular Ecology**, 19, 675–690.

Liste complète des travaux :

<https://sites.google.com/site/aurelledidier/>

Annexe : bibliographie (en gras, les publications des porteurs du projet) :

- Beaumont M, Balding D (2004) Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Mol. Ecol.*, 13, 969 - 980.
- Bruckner A (2009) Rate and extent of decline in *Corallium* (pink and red coral) populations: existing data meet the requirements for a CITES Appendix II listing. *MEPS*, 397, 319-332.
- Coop G, Witonsky D, Di Rienzo A, et al. (2010) Using environmental correlations to identify loci underlying local adaptation. *Genetics*, 185, 1411-23.
- Costantini F, Rossi S, Pintus E, et al. (2011) Low connectivity and declining genetic variability along a depth gradient in *Corallium rubrum* populations. *Coral Reefs*, 1-13.
- Crisci C, Bensoussan N, Romano J-C, et al. (2011) Temperature Anomalies and Mortality Events in Marine Communities: Insights on Factors behind Differential Mortality Impacts in the NW Mediterranean. *PLoS ONE* 6, e23814.
- Excoffier L, Hofer T, Foll M (2009) Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity*, 103, 285-98.
- Garrabou J., Harmelin J.G. (2002) A 20-year study on life-history traits of a harvested long-lived temperate coral in the NW Mediterranean: insights into conservation and management needs. *J. Animal. Ecol.*, 71, 966–978.
- Foll M, Gaggiotti O (2008) A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics*, 180, 977-93.
- Garvin MR, Saitoh K, Gharrett AJ (2010) Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Mol. Ecol. Resour.*, 10, 915-34.
- Haguenauer A, Zuberer F, Aurelle D (2011) Mediterranean red coral facing climate change: focus on heat shock molecular response, plasticity and local adaptation. Short oral and poster at the 15th Evolutionary biology meeting, Marseille, France, 27-30 septembre 2011.**
- Ledoux J-B, Mokhtar-Jamaï K, Roby C, et al. (2010a) Genetic survey of shallow populations of the Mediterranean red coral [*Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758)]: new insights into evolutionary processes shaping nuclear diversity and implications for conservation. *Mol. Ecol.*, 19, 675-690.**
- Ledoux J-B, Garrabou J, Bianchimani O, et al. (2010b) Fine-scale genetic structure and inferences on population biology in the threatened Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*. *Mol. Ecol.*, 19, 4204-4216.**
- Lejeusne C, Chevaldonné P, Pergent-Martini C, et al. (2010) Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *TREE*, 25, 250-60.
- Mokhtar-Jamaï K., Pascual M., Ledoux J.-B., Coma R., Féral J.-P., Garrabou J., Aurelle D. (2011) Genetic structuring in the red gorgonian *Paramuricea clavata* across the Mediterranean Sea: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Mol. Ecol.*, 20, 3291-3305.**
- 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. *J. Heredity*, 95, 536-539.
- Santangelo G., Bramanti L., Rossi S., Tsounis G., Vielmini I., Lott C., Gili J.M. (2012) Patterns of variation in recruitment and post-recruitment processes of the Mediterranean precious gorgonian coral *Corallium rubrum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 411(0), 7–13.