

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE

Centre d'Océanologie de Marseille
École doctorale Sciences de l'Environnement

présentée par

Jean-Baptiste Ledoux

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de la Méditerranée

Biologie de la conservation du corail rouge, *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758): Impact du changement global sur l'évolution des populations infralittorales en Méditerranée Nord-Occidentale

Devant le jury composé de:

Frédérique Viard, Directrice de recherche, CNRS

Marco Abbiati, Professeur, Università di Bologna

Ophélie Ronce, Chargée de recherche, CNRS

Jean-Christophe Poggiale, Professeur, Université de la Méditerranée

Didier Aurelle, Maître de conférences, Université de la Méditerranée

Joaquim Garrabou, Directeur de recherche, CSIC

Jean-Pierre Féral, Directeur de recherche, CNRS

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

co-Directeur

co-Directeur

Directeur

"Il s'enveloppa les épaules dans le sac et bloqua le gouvernail dans la direction voulue. La barque était bien légère maintenant, et le vieux n'avait plus ni sentiments ni pensées. Il était au-delà de tout; il ne songeait plus qu'à ramener sa barque au port, aussi bien, aussi intelligemment que possible"

Ernest Hemingway, 1952, *Le vieil homme et la mer*.

"As a complement to Dobzhansky's famous quote "nothing in biology makes sense except in the light of evolution" (Dobzhansky 1964), we therefore suggest that nothing in evolution or ecology makes sense except in the light of the other."

Pelletier F. Farant D. et Hendry AP, 2009, *Phil. Trans. R. Soc. B*.

A Camille, Alain et Catherine

Remerciements

1h24 du matin, jeudi 2 septembre 2010... ça y est tout seul face à la page blanche avec pour mission de n'oublier personne et pour envie de ne pas sombrer dans une simple liste de noms.

Au commencement était Jean-Pierre Féral, jeune (dans le sens de nouveau) directeur de l'UMR-DIMAR en plein cœur de Marseille. Jean-Pierre, tu m'as accueilli lors de mon stage de DEA en 2003 après avoir bien vérifié, auprès de mon responsable de formation, que je ne serai pas désavantagé par le parfum iodé qui flottait autour du sujet de recherche que tu proposais. Je t'en remercie, je te remercie aussi d'avoir su pendant ces premiers mois insuffler un peu d'oxygène à l'insulaire en exil que j'étais (et suis toujours) et qui se retrouvait au milieu de cette grande ville. Je te remercie d'avoir pensé à moi lorsque cette bourse de thèse s'est débloquée. Je te remercie de m'avoir autorisé à postuler sur ce cours de génétique de la conservation à Oahu, île qui me trottait en tête depuis l'enfance et de m'avoir embarqué dans la délégation pour Venise. Merci d'avoir su prendre certaines décisions lors de moments clés et de m'avoir fait confiance lorsque je venais te voir pour dépenser de l'argent en PCR. Je te remercie enfin de ces anecdotes polaires que tu m'as faites partager, je n'ai jamais vu Kerguelen et pourtant j'ai l'impression d'y avoir posé le pied. Et surtout, merci de m'avoir permis d'être ici ce soir, face à mon ordi, à écrire ces remerciements.

Dans l'ordre des directeurs de thèse, vient ensuite Didier Aurelle. Didier, je te remercie d'avoir su mettre à l'épreuve, et finalement renforcer ma motivation.

Pour finir last but not least, Joaquim Garrabou... Quim, pas facile d'exprimer ce que je ressens après toutes ces années. Ce qui me vient à l'esprit en premier, c'est la confiance que tu as eu dans mon travail à partir d'une certaine période et qui n'a jamais faibli depuis. Ce fut un moteur puissant lors des moments de doute. Ensuite, le gamin que j'étais et qui s'extasiait devant Cousteau te remercie de l'avoir emmené en mission ici ou là et de lui avoir fait vivre un rêve éveillé notamment lors de certaines plongées dans la réserve intégrale de Scandola. Ce fut un privilège immense et encore plus avec toi pour guide (te souviens tu de cette sortie du port encadrée par les rorquals ?). Tu m'auras permis d'ouvrir un peu plus les yeux sous l'eau tout en me formant au travail de terrain, de me recadrer lorsque mes raisonnements te semblaient trop tordus, et tu m'auras toujours aiguillé efficacement lorsque j'étais dans le flou. Tu m'auras aussi démontré que l'ouverture d'esprit et l'échange sont des forces majeures dans notre métier. Merci aussi pour ces moments partagés dans ta famille à Marseille ou pour cette matinée de balade à Barcelone avec tes enfants. Sois sûr que j'emporte avec moi de nombreuses choses de ton enseignement en tant que scientifique et de ton exemple en tant qu'homme.

Il est temps de passer aux collègues ! et y'a pas à dire mais quand je parle de mes années à la station marine d'Endoume, le premier prénom qui vient c'est le tien Karin. Oup Karin Gérard (aka Mad'moizelle Géraard) collègue de bureau, fournisseuse officielle d'*Abatus cordatus*, compagne de craquage de 17h et bien plus encore. Le quotidien

n'était pas toujours facile pour toi comme pour moi, mais qu'est ce que c'était bon de te savoir pas loin dans les moments creux. Ouais je n'imagine pas vraiment toutes ces années sans toi à côté. C'était chouette et c'était riche Karin... et quel bonheur de te savoir maintenant dans un endroit qui te plaît avec ton homme et ton bébé.

Merci à Emilie Egea à qui je dois beaucoup ces derniers temps, merci Emilie pour ton soutien et pour ton énergie quoiqu'il arrive et ta disponibilité enthousiaste lorsque j'en ai eu besoin. Je remercie aussi Eve Gazave, Pascal Lapébie, Gwilherm Pénant pour ces années, les quelques sorties ici ou là et les nombreux déjeuners ici. Une pensée particulière à Marie La Rivière, Julijana Ivanisevic, Pierre-Alexandre Rastorgueff et Kenza Mokhtar-Jamaï (à toi qui a essuyé les plâtres de mon premier encadrement pendant ton M2.. et vive le pop corn !) derniers embarqués et aussi à Emilie Boissin (et Thierry Hoarau), Christophe Lejeusne (encore l'impression que tu as oublié le chemin de mon bureau) et Oriol Torrents déjà arrivés à bon port. Comment finir le tour des thésards sans remercier Ferdinand Marlétaz pour avoir aidé à de nombreuses reprises le non-Geek que je suis avec une patience remarquable, mais aussi pour ces longues discussions scientifiques (ou pas). Ferdi je te dis merci ! Enfin merci aux post-doctorants croisés par ici et plus particulièrement Nuria Teixido et Jan Dierking, merci pour votre amitié ; Jan merci de m'avoir aiguillé lors de mon séjour hawaïen et surtout de m'avoir fait l'honneur de m'inviter à ton mariage avec Katia.

Pour poursuivre la déambulation dans les couloirs de la station, je tiens à remercier Christian Marschal pour son efficacité sous l'eau et son coup de main précieux lors des mesures de croissance des colonies, ainsi que Frédéric Zuberer, Bernard de Ligondes et Roland Graille pour avoir encadré l'ensemble des plongées effectuées au cours de cette thèse. Merci aussi à Caroline Rocher pour sa gestion efficace de la biologie moléculaire. Pendant que je suis sur la lancée des personnes ayant directement contribué à la réalisation de ce travail, je n'oublie pas Pierre Drap et Olivier Bianchimani sans qui le chapitre 4 de ce manuscrit ne serait pas, Charlotte Roby pour son coup de main de début de thèse et Nathaniel Bensoussan pour son aide concernant notamment l'analyse des séries de températures du chapitre 5!

Changement de bâtiment... et direction l'étage de Nicole Boury-Esnault (tu m'avais dit que tu serais là le jour de la soutenance, je l'espère toujours !), Jean Vacelet (« chauffeur » occasionnel dans la descente de la rue d'Endoume !), Jean-Georges et Mireille Harmelin (merci pour vos encouragements, merci plus particulièrement Jo d'avoir partagé tes contacts et connaissances sur la biologie du corail rouge en répondant avec précision à mes questions de néophyte), Pierre Chevaldonné et Thierry Perez (merci entre autres pour les échantillons de corail venus d'Afrique), Marc Bally, Carole Borchiellini et Emmanuelle Renard (merci aussi à vous pour votre soutien amical)... un remerciement particulier aussi à Helmuth Zibrowius qui m'aura permis d'ajouter quelques point sur la carte des sites couverts par cette étude. Merci à Anne Chenuil responsable d'équipe et co-encadrante lors de mon stage de DEA. Et enfin merci à Joëlle Massei et Serge Rodriguez voisins de palier... merci Joëlle pour ta bonne humeur et tes encouragements constants.

Il est temps de sortir de la station, pour remonter sur la corniche prendre à gauche longer la mer, redescendre dans le port du Vallon des Auffes (sas de décompression de luxe de jour comme de nuit sous le soleil ou sous la pluie) remonter la rue du Vallon et finir par gravir les escaliers de ma traverse... enfin quand je dis ma, je devrais dire notre : une pensée émue et reconnaissante pour ce voisinage de classe mondiale...

Marianne et ses petits plats apportés au thésard en mode coupé du monde que j'étais ces derniers temps, la famille blonde pour leur accent et pour les histoires de pêche dans la rade à une époque où la Méditerranée était autre, Isabelle, Fatima et Nadia pour ces soirées d'été dans leur jardin et puis Abdel, Daliouch'et Mina, merci Mina pour les soirées marocaines, pour le poulet aux dattes, les plateaux repas, la découverte des poètes et des musiciens arabes, les thés à la menthe du dimanche après-midi à refaire le monde et puis pour ta compassion, ex-thésarde que tu es... j'aurai pu ainsi goûter à la vie de traverse à Marseille tout en me sachant entouré de façon sincère, merci à vous. Merci à toi Sarah, pour m'avoir, entre autres choses, fait sortir de ma caverne et embarqué dans cette aventure de traverse.

Dernière étape marseillaise et pas des moindres : une pensée pleine de respect et d'admiration pour cette ville authentique et insoumise... si cela s'avère un peu déstabilisant au début surtout lorsque l'on sort d'un village au bout de monde de 1000 habitants, c'est aussi la garantie d'un spectacle vivant permanent et qui ne lasse jamais pour peu que l'on sache se mettre à son rythme. Que serait Marseille sans sa fenêtre ouverte sur la Méditerranée... venant de l'Atlantique le choc a été brutal, une mer présente 24h sur 24, des périodes de houles de 4 à 6 secondes au grand maximum (gasp !!) mais finalement quelle personnalité et quelle force. Une présence cruciale dans l'accomplissement de ce travail, que ce soit par un échange de regard depuis la fenêtre de mon bureau ou de l'appartement ou lors de ces longues séances de nage et même ces quelques (trop peu nombreuses) sessions vers Sausset ou la Ciotat. J'ai découvert une nouvelle façon d'envisager le contact avec le milieu marin et ça, ça n'a pas de prix.

Je décolle d'ici pour atterrir là-bas... Je pense que c'est le moment de remercier Clément Gilbert, mon pote, rencontré en cette année de licence à l'Université de Poitiers. Mon Clément, les mots ne sont pas faciles à trouver pour exprimer toute ma reconnaissance. Tu fais parti des rares personnes qui n'ont jamais douté de moi et de ma capacité à mener à bien ce travail. Tu as su trouver les mots justes lorsque le doute était écrasant, tu as su être à mes cotés de façon critique et productive lorsqu'il s'agissait de science, et comme soutien ou comme oreille attentive lorsqu'il s'agissait du reste. En partant à l'université, je me disais bêtement que les amitiés d'une vie ne pouvaient se créer que lors de l'enfance ou de l'adolescence, tu m'as prouvé le contraire. Merci vieux, cette thèse est aussi la tienne. Toujours en rapport avec mes années poitevines et avec les amitiés qui marquent une vie, voilà Antoine Fouquet compagnon d'exil marseillais, soutien de tous les instants, naturaliste et herpétologue passionné, tu as poussé ta confiance en moi jusqu'à m'inviter sur un de tes papiers... tu n'imagines pas l'impact de cette proposition sur ma psyché à l'époque. Je te remercie intensément pour ça et pour les «gloubi» multiples et variés. Merci Toinio, cette thèse est aussi la tienne. Pour finir avec le groupe poitevin, je me dois d'embrasser chaleureusement Claire Loiseau, Nicolas Giret, Jean Charry, Maylis Clauss, Sylvain Brimaud, Julien Montépin... il est des rencontres qui furent cruciales pour leur influence sur ma façon d'appréhender les choses, vous êtes de celles ci.

Et puisque je suis à Poitiers, je remercie l'ensemble de l'équipe d'enseignant-chercheurs de l'UMR 6556 qui ont su développer une atmosphère parmi les plus saines qu'il m'ait été donné de rencontrer dans un laboratoire. Je finirai cette parenthèse poitevine en

remerciant celui qui m'a initié à la recherche lors de mon stage de maîtrise, le Dr. Serge Poulet de la station biologique de Roscoff. Serge vous avez su captiver et encadrer avec brio le petit étudiant que j'étais à l'époque. Je vous en remercie et vous remercie aussi de m'avoir fait partager votre passion pour le milieu planctonique, encore une grande leçon de Nature.

Je crois que cette fois c'est le moment de quitter le « continent » et de traverser le pont. Habiter dans une île laisse une empreinte particulière... Mon île d'Oléron. J'ai une pensée sincère pour l'ensemble de mes potos de la-bas Toma, Idrey, Erwin, Ashel, Bud, Ted, Boosh, Fafa, Nico, Nicou, Ben, Prunish, Julie (j'accouche avant toi !) et Steph, Yannou, Lilian et tous les autres copains de surfing, de soirée, de 400 coups ou d'Indonésie qui ont marqué mon enfance et adolescence de façon indélébile. Un mot en particulier pour toi Romain, pour ton «Glass Love spirit» et pour la lueur que tu fais naître dans les yeux de ma soeur. La transition est toute trouvée pour faire le lien entre poto et famille biologique, cette transition c'est toi mon Rudy. Dans la même classe de la petite section de maternelle jusqu'à la terminale jamais bien loin de l'autre, un frère. Plus le temps passe et plus je me rends compte de l'influence que tu as eu sur mon développement. Rudy tu m'as accordé une confiance sans limite depuis des années, tu as été un immense soutien au cours de cette thèse pendant nos longues discussions. Ton calme, ton sérieux, ta droiture, ta détermination et cette façon toute personnelle d'appréhender la vie ont été, sont et seront une source d'inspiration inépuisable. Je parlais de famille puisqu'il y a deux ans tu as concrétisé les choses en me proposant de devenir le parrain de ta fille. Il est des étapes qui marquent dans la vie et celle ci en est une. Je me souviendrai toujours de cette conversation téléphonique alors que je sortais juste de la station, pendant laquelle tu m'as fait cette proposition. Je me souviendrai aussi de ces mercredis après-midi d'hiver pendant les années de lycée où nous sortions de l'eau transis avant d'enfourcher les mobylettes pour rentrer se faire remonter les bretelles par des parents inquiets de ne voir personne arriver alors que la nuit tombait et qu'ils nous savaient « à la vague ». Tu me manques mec. Te voilà à nouveau papa, installé avec ta femme dans cette maison que tu as construite de tes mains. Tu es un exemple au quotidien. Je serai en bas de la falaise le jour de Noël en espérant que la marée soit bonne et que tu sois là. Cette thèse est aussi la tienne.

Voilà je suis remonté de Marseille vers Oléron, pour descendre tranquillement des feuilles vers la souche. Il est temps de parler des racines biologiques et physiques. A cette famille Ledoux au sens large pour son amour commun de la contemplation et son intérêt pour les bricoles de la Nature. Grandir au milieu de ces jardins soignés avec passion, de ces parties de pêches à pied et de surfing (un bécot à toi mon Brubru pour m'avoir accompagné pendant ces années) a forcément modelé mon envie de chercher à comprendre et à décrire ce décor. Ajoutez à cela, la volonté de deux personnes il y a quelques 33 ans de venir s'offrir un cocon loin des turpitudes de la vie afin d'y fonder leur famille et vous aurez atteint les racines. Oléron ou plutôt le nord d'Oléron, mon île avec ce coin de dunes grises et ses orchidées derrière les Huttes, Chassiron et la Negrit', les anciens marais salants, le pertuis pour voir entrer les grosses houles d'hiver. Mon triangle magique, parcouru de long en large, observé sous toutes les coutures par tous les temps à toutes les saisons et pourtant toujours aussi essentiel... à toi Alain mon père pour m'avoir appris à apprécier cet environnement, à toi qui me prenais par

la main le samedi midi quand tu entrais dans le week end pour m'emmener faire le tour de cette pointe sur fond de Pink Floyd, Supertramp, Bashung et autre Dire Strait, me faire découvrir Antioche dans la tempête, la rue du Port Calédonia en hiver, cette maison sur la falaise, m'apprendre le nom des écluses et des crabes et autres crevettes que l'on y trouve, m'apprendre à regarder la mer comme il se doit, descendre les dunes en courant le plus vite possible, faire le tour des spots, me mettre debout sur l'eau et toujours, toujours adopter une approche contemplative, profonde et intellectuelle. A toi qui rentres dans une église et es capable de décrire les symboles cachés derrière telle ou telle représentation, à toi qui t'intéresses aussi bien à la dégénérescence cérébrale qu'aux noms des rochers qui parsèment notre côte. A toi exemple de et pour toujours. Papa cette thèse est aussi la tienne. Que serais-tu (et que serais-je) sans Catherine, ta femme et ma mère. Maman... les mots me manquent. Ta détermination, ta force et ta capacité à maintenir le cap dans la tempête me laissent sans voix. Force de la nature, roc puissant et serein irradiant ton entourage de ce regard positif et altruiste. Tu as su m'insuffler cette force qui m'a permis de tenir aux cours de ces années, tu as su trouver les mots justes pour me redonner du souffle lorsque je suffoquais et toujours, tu as cru en moi. A toi qui as laissé tomber ta robe d'avocate et la vie citadine qui va avec pour venir t'installer dans ce bout du monde et donner à tes enfants un environnement optimal, à toi qui as fait que depuis tout petit je ne suis environné que d'amour et de compassion dans cette maison qui est la nôtre. A toi pour les rapports hebdomadaires de l'avancement de ton jardin, de l'épanouissement de tes rosiers et de nos plantes grasses. A toi pour m'avoir offert ces moments d'ouverture contemplative... A toi exemple de toujours et pour toujours. Maman cette thèse est aussi la tienne. Merci à vous de m'avoir permis de grandes découvertes comme lors de mes voyages en solitaire en Indonésie. Merci à vous d'avoir suppléé à mes besoins affectifs, intellectuels et aussi, il faut le dire, matériels, au cours de ces années... sans votre certitude dans ma réussite je n'écrierais pas ces lignes. Enfin pour finir... celle par qui j'ai pris conscience de la dimension que pouvait prendre une relation humaine, Camille. Macam... là encore les mots vont être difficiles à sortir. De petite sœur, tu deviens femme tranquillement et sereinement. Te regarder évoluer ces dernières années est une vraie source de bonheur et encore une fois d'inspiration... simplement la joie de pouvoir me dire que je suis ton frère. Sentir cette énergie presque palpable que tu cherchais à m'insuffler lors de nos rendez-vous téléphoniques et ton attitude positive toujours et malgré tout. A toi pour le calme et la sérénité que tu diffuses à ton entourage, pour ton regard sur la vie et pour tout ce que tu m'as enseigné. A toi pour ton courage et ta confiance sans limite, pour ce grain de folie qui surgit dont ne sait où lorsqu'on ne l'attend pas. A toi exemple de toujours et pour toujours. Ma sœur cette thèse est aussi la tienne. Merci à vous trois, ce travail vous est dédié.

Voilà... un petit tour en quatre pages...désolé si certains trouvent ça déplacé ou trop long mais vu la place qu'a pris ce travail dans ma vie, je m'autorise ces quelques mots en espérant qu'ils n'altéreront pas le message scientifique de ce manuscrit.

Forward.

jeanba

Les photos de ce manuscrit sont de Olivier Bianchimani, Roland Graille et Frédérique Zuberer. (Tous droits réservés – CNRS)

Résumé : Les pressions anthropiques agissent en synergie du gène à l'écosystème, des régions polaires aux régions tropicales, et induisent une érosion biologique telle, qu'elle est qualifiée de sixième extinction de masse. Ce constat pose la question de l'évolution de la biodiversité face aux changements environnementaux en cours. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse focalisé sur les populations de surface (5 - 60 m) de corail rouge, *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758), en Méditerranée Nord-Occidentale.

Le corail rouge (Octocorallia, Coralliidae) est une espèce sessile à phase larvaire caractérisée par sa longévité importante, sa dynamique de population lente et son rôle structurant au sein des communautés de substrats durs de Méditerranée. Soumis à une importante pression de récolte, *Corallium rubrum* a récemment subi deux événements de mortalité massive concordant avec des anomalies thermiques positives, potentiellement liées au réchauffement climatique. La combinaison de ces deux pressions environnementales est donc susceptible d'affecter fortement l'évolution des populations de surface de cette espèce. Basé sur une approche intégrant génétique des populations et écologie de terrain, ce travail a pour objectif principal d'étudier les processus microévolutifs en jeu chez le corail rouge, de l'inter- à l'intra-populationnel, afin de contribuer à l'amélioration de nos connaissances sur la biologie de cette espèce dans le contexte environnemental actuel.

En préambule, *Corallium rubrum* et huit autres espèces de gorgonaires ont été replacés au sein de la phylogénie des octocoralliaires grâce à deux locus mitochondriaux (*ND2-ND6*), qui sont aussi évalués comme code barre génétique. Basée sur un échantillonnage de 40 populations et 10 locus microsattellites, la problématique microévolutive débute avec la confirmation de déficits en hétérozygotes systématiques et d'une structuration génétique généralisée, respectivement dans et entre les populations de corail rouge. Une structuration de type isolement par la distance est mise en évidence au niveau du bassin Méditerranéen Nord-Occidental, mais aussi dans deux des trois groupes régionaux étudiés. En parallèle, la répartition de la diversité génétique est décrite de l'échelle régionale à l'échelle populationnelle, soulignant notamment la diversité significativement supérieure des échantillons provenant des Baléares. Un scénario évolutif est proposé pour expliquer ces patterns de structuration et de diversité génétiques. La suite de ce travail porte sur l'impact de la phase larvaire et du mode de reproduction sur la biologie des populations de corail rouge. Grâce à l'utilisation de la photogrammétrie et de la génétique des populations, l'existence d'une structure génétique spatiale et temporelle est démontrée entre 75 colonies réparties sur un demi-mètre carré. Ces résultats permettent de quantifier la dispersion efficace au sein des populations (22,6 à 32,1 cm) et de définir les relations de parenté entre individus dans l'unité de reproduction étudiée. Ils suggèrent aussi l'absence de consanguinité à cette échelle et l'existence d'un effet de dérive génétique entre les trois classes d'âge analysées. Pour clore ce travail, une étude des interactions entre les populations de corail rouge et leur environnement est réalisée. Des transplantations réciproques combinées à des comparaisons $P_{ST}-F_{ST}$ suggèrent, dans certains cas, l'existence d'une adaptation locale. En parallèle, une expérimentation de jardin commun dans un habitat stressant du point de vue thermique, démontre *in situ* l'existence de capacités d'acclimations différentielles entre populations issues de différentes profondeurs. Discutés à la lumière des connaissances précédemment acquises sur l'écologie et la génétique des populations de l'espèce, ces résultats autorisent une première description de la dynamique éco-évolutive des populations de corail rouge face aux perturbations environnementales d'origine thermique.

Ce travail de thèse élargit le champ de connaissances relatif à l'écologie de *Corallium rubrum* et fournit un ensemble d'outils et de données pour sa conservation face aux perturbations environnementales en cours. Il contribue, par la même occasion, à une avancée significative dans la compréhension de la biologie des organismes marins sessiles à phase larvaire. Il illustre notamment la pertinence d'approches mises en place à des échelles spatiales réduites, pour répondre à des questions fondamentales sur l'évolution de ces organismes, souvent clés au sein de communautés sous pression.

Mots-clés : *Corallium rubrum*, biologie de la conservation, microsattellites, équilibre migration-dérive, diversité génétique, structure génétique spatiale, unité de reproduction, transplantation réciproque, adaptation locale, plasticité phénotypique, dynamique éco-évolutive.

Abstract: Anthropogenic pressures act synergistically from gene to ecosystems and from polar to tropical regions, inducing a strong biological loss, which is considered by many as the sixth mass extinction. The evolution of biodiversity facing the ongoing global change is thus an open question.

The present study is focused on the shallow populations (5 - 60 m) of *Corallium rubrum* (Octocorallia, Coralliidae) in the North Western Mediterranean Sea. The red coral is a sessile and long-lived species with a larval phase, a slow population dynamics and an important structuring role in the Mediterranean hard substrates communities. This species faces a strong harvesting pressure, and recently underwent two mass mortality events linked to positive thermal anomalies putatively due to ongoing climate change. These two pressures may have deep implications on the evolution of the shallow populations of this species. Using population genetics and field ecology, the main objective of this study was to analyse microevolutionary processes acting between and within red coral populations, to enhance our knowledge on the biology of this species facing the ongoing environmental pressures.

As a starting point, *Corallium rubrum* and eight other gorgonians species are positioned in the phylogeny of the octocorals, using two mitochondrial markers (*ND2-ND6*), which were also evaluated as a genetic barcode. Based on 40 populations and 10 microsatellite loci, the microevolutionary study begins with the corroboration of generalized heterozygote deficiencies and genetic differentiations within and between populations, respectively. Isolation by distance is revealed over the North-Western Mediterranean basin and also within two of the three studied regional clusters. The repartition of the genetic diversity is described at the regional and population levels, demonstrating especially the highest diversity of the samples from the Balearic Islands. An evolutionary scenario is proposed to explain the observed structure and diversity patterns. The following part of this work is focused on the impact of the larval phase and the mode of reproduction on the population biology of the red coral. Based on photogrammetry and population genetics, a spatial and temporal genetic structure between 75 colonies dwelling on half a square meter is uncovered. These results allow for the quantification of the efficient dispersal within populations (22.6 to 32.1 cm) and for the definition of the kinship patterns within the studied reproductive unit. They also suggest a lack of inbreeding at the studied scale and the occurrence of a small drift effect between the three stage-classes. Interactions between red coral populations and their environment are studied in the last part of this work. Reciprocal transplant experiments combined with $P_{ST}-F_{ST}$ comparisons suggest that local adaptation occurs in some cases. In addition, *in situ* common garden experiment performed in a warm habitat to simulate a thermal stress, highlights the differential acclimatization capacities of red coral populations. Discussed in the light of our current knowledge on the ecology and population genetics of the species, these results shed light on the eco-evolutionary dynamics of the red coral facing environmental disturbances.

This work extends our knowledge concerning the ecology of *Corallium rubrum*, and provides new tools and data for its conservation in the context of the ongoing global change. Moreover, this work improves our understanding in the biology of sessile marine organisms with a larval phase. It illustrates for example the relevance of approaches conducted at fine geographical scales to answer questions concerning the evolution of these organisms, which are often key species in threatened communities.

Keywords: *Corallium rubrum*, conservation biology, microsatellites, migration-drift balance, genetic diversity, spatial genetic structure, reproduction unit, reciprocal transplant, local adaptation, phenotypic plasticity, eco-evolutionary dynamics.

Chapitre 1 - Introduction générale: Biodiversité, biologie évolutive de la conservation et présentation du modèle corail rouge.....	p. 1
I - De la biodiversité à la biologie évolutive de la conservation.....	p. 2
1) Aspects qualitatifs et quantitatifs de la biodiversité.....	p. 2
1-1) Définition de la biodiversité	
1-2) Quantifier la biodiversité : utilisation et limitation de l'espèce comme unité de mesure	
1-3) Evolution de la biodiversité et extinctions massives	
2) Vers une sixième extinction de masse : déroulement, quantification et caractéristiques.....	p. 6
2-1) <i>Historique de la sixième extinction de masse et impact sur la biodiversité</i>	
2-2) <i>Quelques caractéristiques remarquables</i>	
2-3) <i>Biodiversité marine: une érosion généralisée</i>	
2-4) <i>L'exemple de la Mer Méditerranée : une grande diversité mais subissant d'importantes pressions environnementales</i>	
2-5) <i>Impact du changement global en Méditerranée : les évènements de mortalité massive</i>	
3) Réponse de l'homme à un problème d'origine anthropique : la biologie de la conservation pour faire face aux changements globaux.....	p. 12
3-1) <i>Biologie de la conservation et évolution contemporaine</i>	
3-2) <i>Vers une biologie évolutive de la conservation: composante génétique et dynamique éco-évolutive</i>	
II - Le corail rouge, <i>Corallium rubrum</i>, un modèle atypique en biologie de la conservation.....	p. 16
1) Des octocoralliaires aux <i>Corallidae</i>	p. 16
2) Le corail rouge, <i>Corallium rubrum</i> (Linnaeus, 1758).....	p. 17
2-1) <i>Corallium rubrum : du « lithodendron » à la « petite Ortie ou Poulpe »</i>	
2-2) <i>Quelques éléments d'écologie générale, d'anatomie et d'histologie</i>	
2-3) <i>Description du processus de squelettogenèse et méthode de détermination de l'âge</i>	
2-4) <i>Un organisme sessile et longévif caractérisé par une dynamique de population lente</i>	
3) La corail rouge face au changement global : coraillage et évènements de mortalité massive.....	p. 24
3-1) <i>Coraillage et impact sur la structure de taille du corail rouge</i>	
3-2) <i>Impact des évènements de mortalité massive sur le corail rouge</i>	
3-3) <i>Conséquences potentielles de ces pressions environnementales sur les populations de surface : dynamique de populations et modélisation</i>	
III – Problématique, objectifs et organisation de la thèse.....	p. 29

Chapitre 2 - De la phylogénie au *barcoding*: Données mitochondriales et conservation des octocoralliaires..... p. 33

I - Phylogénie moléculaire des octocoralliaires à partir des marqueurs mitochondriaux ND2 et ND6..... p. 36

1) Introduction..... p. 36

2) Matériel et méthodes..... p. 38

2-1) Echantillonnage

2-2) Extraction d'ADN, amplification par PCR et séquençage

2-3) Analyse des données de séquence

3) Résultats..... p. 40

3-1) Obtention des séquences par PCR

3-2) Jeux de données pour la phylogénie

3-3) Analyses phylogénétiques

Des sous-ordres aux genres

Support phylogénétique des genres

4) Discussion..... p. 46

4-1) Support phylogénétique des sous-ordres

4-2) Monophylie des familles

4-3) Support phylogénétique des genres

4-4) Conclusion

II - *Barcoding* chez les octocoralliaires : apport des marqueurs mitochondriaux ND2 et ND6..... p. 51

1) Introduction..... p. 51

2) Matériel et méthodes..... p. 52

2-1) Variation intra-spécifique

*2-2) Divergence inter-spécifique et *barcoding**

3) Résultats..... p. 55

3-1) Variation intra-spécifique

3-2) Divergence inter-spécifique et code barre ND2-ND6

4) Discussion..... p. 58

4-1) Evaluation du code barre ND2-ND6

4-2) Longueur du fragment, standardisation et information phylogénétique du code barre

*4-3) Divergence et *barcoding gap* chez les octocoralliaires*

4-4) Evolution du génome mitochondrial chez les anthozoaires

4-5) Utilisation du code barre ND2-ND6 et futurs développements pour une meilleure estimation de la diversité biologique des octocoralliaires

III - Contribution à la remise en cause d'une approche purement phylogénétique de la conservation..... p. 63

Chapitre 3 - Structuration et diversité génétique des populations de surface de corail rouge à l'échelle de la Méditerranée Nord-Occidentale..... p. 67

1) Introduction.....	p. 68
2) Materials and methods.....	p. 69
2-1) <i>Sampling and DNA extraction</i>	
2-2) <i>Microsatellite analysis</i>	
2-3) <i>Microsatellite characteristics</i>	
2-4) <i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>	
2-5) <i>Interpopulation differentiations and isolation by distance</i>	
2-6) <i>Clustering analyses</i>	
2-7) <i>Estimation and distribution of genetic diversity</i>	
3) Results.....	p. 75
3-1) <i>Loci characteristics</i>	
3-2) <i>Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium</i>	
3-3) <i>Population structure analysis</i>	
<i>F_{ST} IBD and AMOVA</i>	
<i>Clustering with STRUCTURE</i>	
3-4) <i>Genetic diversity analysis</i>	
4) Discussion.....	p. 81
4-1) <i>Distribution of genetic diversity from global to sample scale with a focus on the Balearic region</i>	
4-2) <i>Population relationships</i>	
4-3) <i>Evolutionary hypothesis and consequences for conservation and management plans</i>	
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	p. 86
S1) Development of microsatellite loci	
S2) Impact of heterozygote deficiency on STRUCTURE outputs	
S2-1) Simulated dataset	
S2-2) Results	

Chapitre 4 - Structure génétique à petite échelle géographique et inférences sur la biologie des populations du corail rouge..... p. 97

1) Introduction.....	p. 98
2) Material and methods.....	p. 100
2-1) <i>Sampling and photogrammetric methods</i>	
2-2) <i>Reproductive status and stage-classes assignment</i>	
2-3) <i>Microsatellite genotyping</i>	
2-4) <i>Identification of multi-sampled individuals</i>	
2-5) <i>Locus characteristics and Hardy-Weinberg equilibrium</i>	
2-6) <i>Genetic homogeneity of the sample</i>	
2-7) <i>Spatial genetic structure and demographic parameters</i>	
<i>Spatial autocorrelation</i>	
<i>Demographic parameters: "neighborhood size" and gene dispersal estimates</i>	
2-7) <i>Kinship structure</i>	

3) Results.....	p. 105
3-1) <i>Identification of multi-sampled individuals</i>	
3-2) <i>Reproductive status and stage-class assignment</i>	
3-3) <i>Locus characteristics and Hardy-Weinberg equilibrium</i>	
3-4) <i>Genetic homogeneity of the sample</i>	
3-5) <i>Spatial genetic structure and demographic parameters</i>	
3-6) <i>Kinship structure</i>	
4) Discussion.....	p. 109
4-1) <i>Spatial genetic structure and gene dispersal</i>	
4-2) <i>Local pedigree, mating system and recruitment</i>	
4-3) <i>Implications for conservation and future directions</i>	
4-4) <i>Conclusion</i>	
Chapitre 5 - Acclimatation différentielle et adaptation locale chez <i>Corallium rubrum</i>, une espèce sessile et longévive subissant les changements climatiques.....	p. 115
1) Introduction.....	p. 116
2) Material and methods.....	p. 118
2-1) <i>Field experiments</i>	
<i>Reciprocal transplant experiment</i>	
<i>Common garden experiment</i>	
2-2) <i>Environmental component: Contrasted thermal features</i>	
2-3) <i>Genetic component: Microsatellite genotyping</i>	
2-4) <i>Phenotypic response characterization</i>	
<i>Response variables</i>	
2-5) <i>Statistical analyses</i>	
<i>Field experiments</i>	
<i>Population genetic analyses</i>	
<i>Divergence in phenotypic trait and P_{ST} - F_{ST} comparisons</i>	
3) Results.....	p. 122
3-1) <i>Reciprocal transplant experiments</i>	
3-2) <i>Common garden experiment</i>	
3-3) <i>Population genetic analyses</i>	
3-4) <i>Divergence in phenotypic trait and P_{ST} - F_{ST} comparisons</i>	
4) Discussion.....	p. 129
4-1) <i>Genotype by environment interactions for fitness and occurrence of local adaptation in red coral populations</i>	
4-2) <i>Differential acclimatization capacities in red coral populations facing a thermal stress</i>	
4-3) <i>Impact of the predicted warming on population-environment interactions in the red coral: integrating evolutionary and ecological processes</i>	
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	p. 133
S1) <i>Characterization of the thermal environments for Riou and Scandola</i>	
S2) <i>Experimental plates and calcein labeling</i>	
S3) <i>Growth rate analysis</i>	

Chapitre 6 - Conclusion générale: Synthèse et implications des résultats pour la conservation de <i>Corallium rubrum</i>.....	p. 139
1) Synthèse des principaux résultats.....	p. 140
2) Scénario évolutif et dynamique éco-évolutive.....	p. 143
3) Implications pour la conservation et la gestion du corail rouge.....	p. 145
4) Perspectives.....	p. 146
Références bibliographiques.....	p. 150
ANNEXE 1 - Protocole d'extraction de l'ADN.....	p. 187
ANNEXE 2 - Mise au point des marqueurs moléculaires.....	p. 188
ANNEXE 3 - Taux d'erreur, homogénéité génétique des colonies, génotypes multilocus répétés et analyse factorielle des correspondances.....	p. 197
ANNEXE 4 - Genetic survey of shallow populations of the Mediterranean red coral (<i>Corallium rubrum</i> (Linnaeus, 1758)): new insights into evolutionary processes shaping nuclear diversity and implications for conservation.....	p. 201
ANNEXE 5 - Fine-scale genetic structure and inferences on population biology in the threatened Mediterranean red coral, <i>Corallium rubrum</i>.....	p. 218
ANNEXE 6 - Phylogeography of the red coral (<i>Corallium rubrum</i>), a temperate gorgonian: inferences on evolutionary history and consequences of past climatic fluctuations.....	p. 232
ANNEXE 7 - Intra-individual variability of ITS in the red coral <i>Corallium rubrum</i>.....	p. 265

Chapitre 1

Introduction générale: Biodiversité, biologie évolutive de la conservation et présentation du modèle corail rouge



I - De la biodiversité à la biologie évolutive de la conservation

1) Aspects qualitatifs et quantitatifs de la biodiversité

1-1) Définition de la biodiversité

La BIODIVERSITÉ a inspiré et inspire aussi bien la curiosité scientifique, la réflexion philosophique que la création artistique. Au delà de ces considérations fondamentales et essentielles mais parfois abstraites, elle est un aussi réservoir de biens et de services pour l'homme (Reiss *et al.* 2009). Elle représente, par exemple, une source d'approvisionnement (nourriture, bois), une source de régulation (pollinisation, régulation climatique), une source de culture (spirituelle, récréative). Elle est en interaction avec les composantes physico-chimiques terrestres (rôle dans le cycle des nutriments, la formation des sols) (d'après Pereira & Cooper 2006). Bien que cela soit controversé, il est difficile dans un travail sur le corail rouge de ne pas mentionner l'aspect économique lié à certains de ces biens et services naturels. La biodiversité est, en effet, une source potentielle de revenus directs (tout ce qui découle des récoltes) ou indirects (éco-tourisme) (Costanza *et al.* 1997 ; Balmford *et al.* 2002). Le terme biodiversité fut probablement inventé par Walter G. Rosen en 1985 lors de la préparation du Forum National sur la Diversité Biologique de 1986 organisé aux Etats-Unis par le Conseil National de la Recherche (« *National Research Council* »). Il fut adopté par la communauté scientifique grâce aux actes de congrès qui ont suivi (Biodiversity ; Wilson & Peter 1988). La définition usuelle de la diversité biologique a été proposée par la Convention sur la Diversité Biologique de Rio du 5 juin 1992 tenue sous l'égide de l'ONU. Elle désigne : « *la variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entres autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie ; cela comprend la diversité au sein des espèces, entre espèces ainsi que celles des écosystèmes* » (<http://www.cbd.int/convention/convention.shtml>). Je propose de mettre l'accent sur l'aspect évolutif inhérent à la diversité biologique en prenant en compte l'importance des interactions entre ses différentes composantes et en ajoutant une dimension temporelle explicite à ce concept. Dans le travail qui suit, la biodiversité regroupe donc l'ensemble des formes de vie sur Terre : des entités biologiques qui les composent (gènes) à celles qu'elles forment (populations, espèces, écosystèmes). Par entités biologiques j'entends des « objets réels qui ont un emplacement défini dans l'espace et le temps (...) et qui sont susceptibles d'évoluer » (*sensu* Ghiselin 1997 d'après Hey *et al.* 2003 voir aussi Purvis & Hector 2000). Ces entités intrinsèquement en évolution sont donc distinctes des taxons qui correspondent à des catégories définies par des caractéristiques propres (Hey *et al.* 2003). Le terme biodiversité fait aussi référence aux relations entre ces gènes, espèces et écosystèmes ainsi qu'à leurs interactions avec l'environnement. Ce concept intègre donc à la fois l'histoire mais aussi le potentiel évolutif des formes de vie (d'après Crandall *et al.* 2000 ; Purvis & Hector 2000 ; Ferrière *et al.* 2004 ; Hendry *et al.* 2010).

1-2) Quantifier la biodiversité : utilisation et limitation de l'espèce comme unité de mesure

Au delà des aspects qualitatifs précédemment cités, la question de la quantification de la biodiversité se pose depuis l'origine du terme (Ehrlich 1985). La biodiversité ayant par essence des composantes diverses en interaction (gènes, organismes, populations, espèces, communautés, écosystèmes) impliquant différentes échelles spatiales (du local au global) et temporelles (passée, actuelle et en devenir), c'est un concept à dimensions multiples qui ne peut être résumé en un seul chiffre, compliquant donc toute tentative de quantification (Charles *et al.* 2001). Différentes méthodes ont ainsi vu le jour en fonction des critères considérés en priorité (e.g. nombre, répartition ou différence de la composante choisie à l'échelle spatio-temporelle considérée ; voir Purvis & Hector 2000). Parmi ces méthodes, le nombre d'espèces (ou richesse spécifique) est le plus communément quantifié notamment dans un cadre appliqué lors de la mise en place de politique de conservation, l'espèce étant probablement la composante la plus intuitive de la diversité biologique (voir ci-dessous). Des estimations de la richesse spécifique globale ont été menées à partir d'extrapolations qui tiennent compte notamment de la relation espèce-surface (relation entre la taille de la zone étudiée et le nombre d'espèces identifiées ; voir Lewis 2006) et du taux de découverte d'espèces nouvelles (13000 nouvelles espèces animales sont décrites chaque années Hammond 1995). Ainsi sur l'ensemble de la biosphère, 1,5 (May 2000) à 1,75 (Hammond 1995) millions d'espèces eucaryotes ont été décrites ce qui ne représenterait que 10% du nombre total d'espèces actuelles (Purvis & Hector 2000). La majorité de ces espèces décrites seraient des métazoaires et 85% terrestres (Pimm & Raven 2000). Certains auteurs proposent la fourchette de 5 à 15 millions (e.g. Hammond 1995 ; Dirzo & Raven 2003) d'espèces eucaryotes vivant actuellement dans la biosphère. Leur répartition n'est pas uniforme et suit globalement un gradient latitudinal (Gaston 2000 mais voir Hughes *et al.* 2002 pour une remise en cause de cette hypothèse pour la biodiversité marine). Plusieurs hypothèses comme l'hétérogénéité de l'habitat, le niveau d'énergie ou la surface disponible ont été émises pour expliquer cet accroissement de la richesse spécifique terrestre des pôles vers l'équateur (Chown & Gaston 2000). Enfin, cette diversité spécifique représenterait moins de 2 à 3% du nombre total d'espèces depuis les débuts de la vie sur Terre (Dirzo & Raven 2003).

Comme souligné précédemment, de par la nature même de la biodiversité, l'utilisation de l'espèce comme unité élémentaire a plusieurs limites. La première découle du nombre important de concepts d'espèces (concept phylogénétique ou biologique d'espèce pour ne citer que les deux plus connus voir Hey 2001) qui rendent hétérogènes les critères de définition de cette entité biologique. L'adoption relativement récente et quasi généralisée du concept phylogénétique d'espèce (une espèce correspond au plus petit groupe d'organismes liés entre eux par des relations de parenté de type ancêtres / descendants (Cracraft 1983)) n'a pas simplifié les choses. De nombreuses sous-espèces ont en effet été reclassées au rang d'espèce produisant une « *inflation taxonomique* » (Patterson 1999).

Selon certains auteurs, cette inflation s'est traduite par une surestimation de la richesse spécifique puisque le nombre total d'espèces a été augmenté de façon artificielle (Isaac *et al.* 2004 mais voir Agapow & Sluys 2005) sans que le niveau de complexité décrit change significativement (Purvis & Hector 2000). Elle a donc eu des implications négatives notamment pour la gestion de la biodiversité avec, par exemple, une division artificielle des programmes de conservation généralement focalisés sur l'espèce (voir Agapow *et al.* 2004 ; Padial & De La Riva 2006 pour détails). Enfin, quelque soit le concept utilisé, l'espèce peut être une entité inadéquate du point de vue biologique dans de nombreux cas (e.g. Hexacoralliaires) brouillant un peu plus les tentatives de quantification (Hey *et al.* 2003 ; voir aussi la conclusion du Chapitre 2 pour une discussion sur l'impact de ce dernier point en biologie de la conservation). L'ensemble de ces remarques ne tient pas compte des entités telles que les archae- et eubactéries, les virus ou les éléments transposables inclassables à partir de l'unité espèce malgré leur appartenance à la diversité biologique (Purvis & Hector 2000) et leur influence sur l'évolution des Eucaryotes (voir Gilbert *et al.* 2010 pour un exemple de l'influence potentielle des éléments transposables). Malgré ces imperfections, l'utilisation de la richesse spécifique a permis de nombreuses avancées tant du point de vue de la gestion de la biodiversité (i.e. moyen de cibler, quantifier les entités biologiques nécessitant des mesures de protection) que de sa caractérisation (e.g. richesse, complexité, répartition). Certaines de ces caractéristiques ont pu être vérifiées par la suite sur d'autres entités biologiques. Le gradient latitudinal est, par exemple, aussi observé au niveau des familles (Williams *et al.* 1997) et de la diversité génétique (Hughes *et al.* 1997 ; Levin 2001).

1-3) Evolution de la biodiversité et extinctions massives

Cette description instantanée de la biodiversité ne doit pas faire oublier son caractère dynamique du point de vue temporel : la biodiversité évolue. Au niveau de la biosphère, cette évolution est principalement dépendante des événements de spéciation et d'extinction (Charles *et al.* 2001). A partir de données fossiles, la durée de vie d'une espèce a été estimée entre un et dix millions d'années. Malgré les variations temporelles de ce taux (Alroy 2008), un taux d'extinction normal (« *background extinction rate* ») de 1 à 0,1 extinction par million d'espèces par an a donc été proposé (Pimm *et al.* 1995). Les relations entre extinction et spéciation sont encore floues bien que l'existence d'un équilibre dynamique ait été suggéré (Alroy 2008) : leur impact respectif sur le nombre actuel d'espèces reste donc mal connu (voir Alroy 2008 pour discussion). Quelque soit leur nature, l'analyse des données fossiles révèle que ces relations ont été ponctuées par cinq extinctions de masses (mais voir Alroy 2008 pour une remise en question du chiffre cinq) au cours des 600 derniers millions d'années (période Phanérozoïque) c'est à dire depuis l'apparition des premiers métazoaires (Fig. 1-1). Ces événements, bien que différents du point de vue de leur impact (Erwin 2008) et probablement de leur cause (Fig. 1-1), sont rares et caractérisés par un déclin important et rapide de la diversité biologique globale à

cause d'une perturbation d'origine abiotique (McElwain & Punyasena 2007). Ils se sont donc traduits par un taux d'extinction significativement supérieur au taux normal et ont ainsi mis fin aux trajectoires évolutives de nombreuses entités et ceci de façon ciblée. Ce ciblage sous-entend que les organismes touchés ne sont pas représentatifs d'un échantillonnage au hasard de la diversité biologique avant extinction (Raup 1986), entraînant des réorganisations profondes de la biodiversité (Gould 1994). La phase de récupération est très hétérogène en fonction de l'évènement et de l'échelle spatiale considérée. Au niveau régional par exemple, elle se traduit par des phénomènes de colonisation et de diversification biologiques (Jablonski 2008). Du point de vue temporel, sur ces cinq extinctions un minimum de 10 millions d'années a été nécessaire pour recouvrer des niveaux de diversité comparables à ceux qui existaient antérieurement (Alroy 2008).

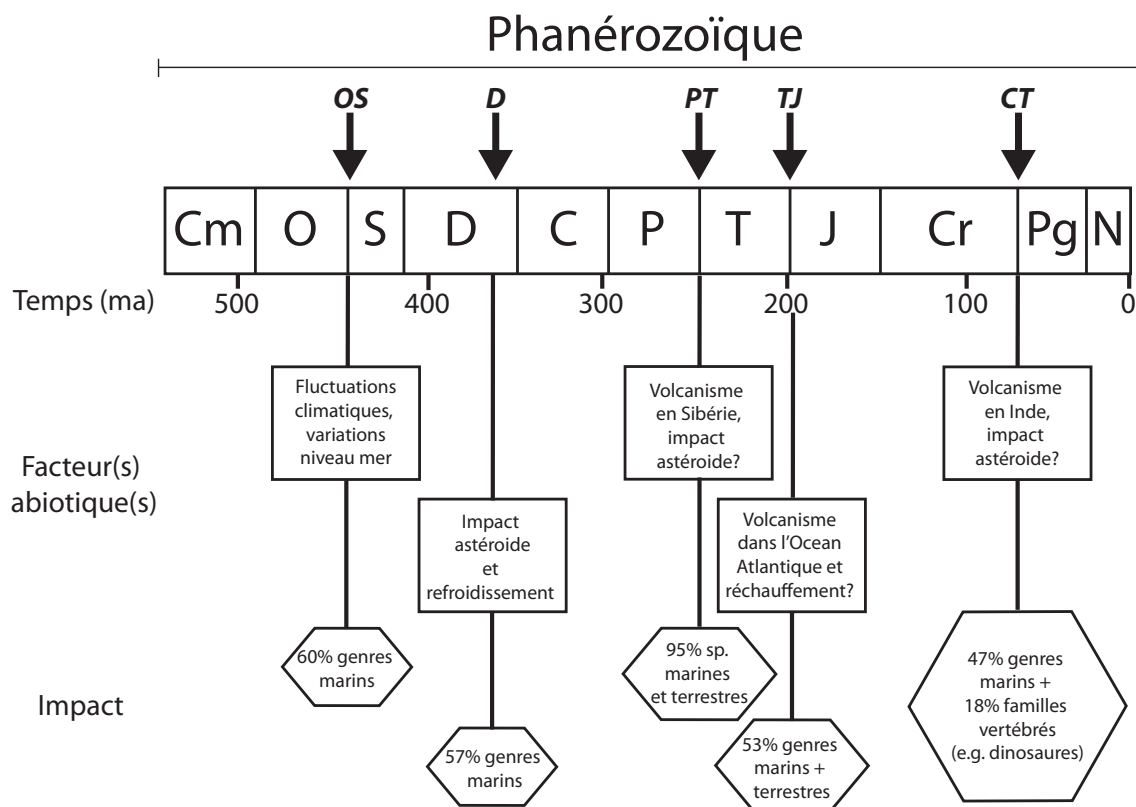


Figure 1-1 : Echelle des temps géologiques replaçant les cinq extinctions de masses survenues au cours des 600 millions d'années de l'éon Phanérozoïque. Les différentes périodes de cet éon sont les suivantes : le Cambrien (Cm) ; l'Ordovicien (O) ; le Silurien (S) ; le Dévonien (D) ; le Carbonifère (C) ; le Permien (P) ; le Trias (T) ; le Jurassique (J) ; le Crétacé (Cr) ; le Paléogène (Pg) ; le Néogène (N) (ma = millions d'années). Les cinq extinctions de masses sont indiquées par une flèche : Ordovicien/Silurien (OS ; \approx - 439 millions d'années) ; Dévonien (D ; \approx - 364 millions d'années) ; Permien/ Triasique (PT ; \approx - 251 millions d'années) ; Triasique/Jurassique (TJ ; \approx - 200 millions d'années) ; Crétacé/Tertiaire (CT ; \approx - 65 millions d'années). Le facteur abiotique et l'impact sur la biodiversité sont présentés dans les boîtes correspondantes à chacun de ces 5 évènements (d'après Alroy 2008 ; Wake & Vredenburg 2008 ; voir McElwain & Punyasena 2007 pour une étude portant spécifiquement sur l'impact des extinctions de masses sur les plantes.)

2) Vers une sixième extinction de masse : déroulement, quantification et caractéristiques

2-1) *Historique de la sixième extinction de masse et impact sur la biodiversité*

C'est en se basant sur cette augmentation significative du taux d'extinction par rapport à la normale que l'idée d'une sixième extinction de masse a été proposée (Leakey & Lewin 1995) pour qualifier l'érosion actuelle de la biodiversité. La première phase de cette crise biologique débute il y a 50 à 100 000 ans lorsque les premiers hommes se dispersent sur la planète. Elle est suivie par une seconde phase qui commence il y a 10 000 ans avec une augmentation de la taille des populations humaines et le développement de l'agriculture. La chasse aurait par exemple entraîné la disparition des deux tiers de la mégafaune (ayant une masse corporelle supérieure à 44 kg) des Amériques et de 19 espèces de marsupiaux en Australie (Levin 2001). Les exemples de ce type sont nombreux notamment pour toutes les régions isolées et colonisées tardivement par l'homme. Cette colonisation aurait ainsi entraîné la disparition de 50 à 90 % des espèces d'oiseaux insulaires ou encore celle de 17 genres de primates à Madagascar (voir Dirzo & Raven 2003 pour des détails sur ces « *extinctions suivant le premier contact* »). La troisième et dernière phase commence avec la révolution industrielle (Avisé *et al.* 2008 voir Wake & Vredenburg 2008 pour un scénario plus mesuré). Elle a en effet entraîné une altération de l'atmosphère, de l'eau et des sols au point de modifier les cycles biogéochimiques et le climat global (Western 2001). Selon l'Union International pour la Conservation de la Nature (IUCN), mille deux cents espèces ont officiellement disparu depuis l'an 1600, c'est à dire qu'aucun individu de l'espèce en question n'a été observé depuis 50 ans (IUCN 2009). Différentes méthodes basées sur des données empiriques, des extrapolations à partir de modèles sur le changement climatique ou sur les listes rouges de l'IUCN, ont été proposées pour estimer le taux d'extinction actuel (Stork 2010). Selon la relation espèce-surface, 17500 d'espèces disparaîtraient annuellement soit environ 2500 extinctions par million d'espèces par an si l'on considère 7 millions d'espèces au total (Wilson 1989). D'autres estimations modèrent ces chiffres avec une fourchette de 20 à 200 extinctions par million d'espèces par an (Pimm *et al.* 1995) soit environ un millier d'extinctions chaque année (Pimm & Raven 2000). Bien que l'évolution à long terme de ce taux d'extinction (accélération versus ralentissement) soit sujette à discussion (Laurance 2006 ; Wright & Muller-Landau 2006), 17315 espèces sont actuellement classées vulnérables, en danger ou en danger critique d'extinction (IUCN 2009).

2-2) *Quelques caractéristiques remarquables*

Plusieurs caractéristiques de cette extinction de masse doivent être soulignées. Le taux de disparition actuel est ainsi plusieurs centaines, voire milliers de fois supérieur au taux normal (Pimm & Brook 2000) et probablement aussi aux taux estimés pour les extinctions de masses précédentes (Stockwell *et al.* 2003). Considérant le faible nombre d'es-

pèces connues, une part importante de ces extinctions concerne donc paradoxalement des taxons qui n'ont pas été décrits. Comme les événements précédents, cette sixième extinction de masse est hautement sélective (McKinney 1997) touchant préférentiellement des entités à faible diversité spécifique (Russell *et al.* 1997). Un habitat souvent isolé et réduit comme une île et, qui plus est, colonisé tardivement par l'homme semble être un critère majeur dans la probabilité d'extinction d'une espèce (Russell *et al.* 1998 mais voir Purvis *et al.* 2000c). Chez les mammifères, la taille de l'organisme semble aussi jouer un rôle dans la potentialité d'extinction (Cardillo *et al.* 2005). Ainsi la probabilité de disparition d'une entité n'est pas due au hasard mais bien à des caractéristiques évolutives ou écologiques (isolement, aire de répartition réduite, spécialisation écologique) et/ou des « *traits d'histoires de vie compromettants* » (comestibilité, abondance, intérêt ornemental) souvent partagés par des entités phylogénétiquement proches (e.g. le genre *Corallium* voir ci-dessous) (Fisher & Owen 2004). Comparé à des extinctions au hasard, cet aspect sélectif a pour effet d'accélérer l'érosion de la biodiversité (McKinney 1997). Comme nous l'avons vu précédemment, la biodiversité est en effet caractérisée par sa dimension évolutive. Chaque extinction se traduit donc par la disparition d'une lignée évolutive au sein de la phylogénie (Erwin 2008). L'organisation des relations phylogénétiques sous forme hiérarchisée induit que les extinctions sélectives, c'est à dire de plusieurs entités phylogénétiquement proches, entraînent la disparition de clades entiers (branches terminales et internes), là où une extinction au hasard ne ferait disparaître que des branches terminales de l'arbre phylogénétique (Purvis *et al.* 2000b). Enfin, comme cela a été sous-entendu précédemment, la dernière caractéristique de cette sixième extinction de masse est son lien avec l'homme faisant d'elle probablement la seule extinction de masse induite par une perturbation biotique (Avisé *et al.* 2008). En effet cinq causes majeures découlant directement ou indirectement des activités humaines sont responsables de cette extinction. Le « *quartet diabolique* » surexploitation, introduction de nouvelles espèces, destruction des habitats et extinction en cascades a été identifié dès la fin des années 80 comme la principale cause de ces extinctions (Diamond 1989). A ces perturbations s'ajoute le changement climatique en cours dont l'impact sur la biodiversité pourrait croître (Thomas *et al.* 2004). Ces cinq perturbations regroupées sous le terme de changement global agissent de façon synergique précipitant par la même la dynamique d'extinction (Brook *et al.* 2008). La nature de ces perturbations et l'échelle spatiale concernée induisent d'une part une « *homogénéisation biotique globale* », c'est à dire le remplacement d'espèces endémiques par d'autres à large distribution généralement introduites par l'homme (McKinney & Lockwood 1999), et d'autre part une influence de l'homme sur tous les écosystèmes terrestres allant même jusqu'à une domination directe sur nombre d'entre eux (« *human dominated ecosystems* » Vitousek *et al.* 1997).

2-3) Biodiversité marine: une érosion généralisée*

Le milieu marin a servi de support à l'émergence de la vie il y a 3,5 milliards d'années (Brierley & Kingsford 2009). La composante marine de la biodiversité est donc plus âgée que son homologue terrestre et encore largement méconnue (Webb 2009 mais voir Malakoff 2003). Elle est aussi très diversifiée, reflétant la variété des écosystèmes formant ce milieu allant des récifs coralliens aux sources hydrothermales. Selon certaines estimations, un quart de la biodiversité marine européenne reste à découvrir (Wilson & Costello 2005) ; dans certaines régions du globe, ce chiffre pourrait aller jusqu'à 90% (Webb 2009). En plus de l'incroyable diversité des récifs coralliens, la récente découverte en Méditerranée d'une espèce de Loricifère vivant à 3000 m de fond en totale anoxie et donc sans mitochondrie est un exemple de l'extraordinaire richesse biologique du milieu marin (Danovaro *et al.* 2010).

Les océans couvrent les trois-quarts de la surface du globe ce qui, jusqu'à récemment, était utilisé pour arguer de la capacité de résistance supérieure de ces écosystèmes face aux changements globaux. Depuis la fin des années 90, l'impact des pressions d'origine anthropique a cependant été démontré des estuaires (Lotze *et al.* 2006) aux écosystèmes pélagiques (Worm *et al.* 2006) en passant par les récifs coralliens (Hughes *et al.* 2003), les écosystèmes côtiers (Jackson *et al.* 2001 ; Harley *et al.* 2006), les plateaux continentaux (Auster 1998) et les écosystèmes abyssaux (Koslow 2007) (voir aussi Jackson 2008). Les causes sont diverses, qu'elles proviennent directement (introduction d'espèces, pollution, surpêche, destruction des habitats par dragage ou chalutage) ou indirectement (changement climatique, eutrophisation, acidification de l'océan) des activités humaines (Jackson 2008). L'avenir de la biodiversité marine est donc préoccupant. Deux chiffres clés résumant les enjeux actuels : 1) 37% de la population mondiale vit à moins de 100km des côtes et cette tendance s'amplifie, ce qui sous-entend une augmentation des pressions anthropiques directes (Gattuso *et al.* 1998), 2) la température de la surface des océans a augmenté de 0,13 °C par décennie depuis 1979 alors que sa température interne a augmenté de plus de 0,1°C depuis 1969 entraînant un changement de sa structuration verticale, des cycles biogéochimiques ainsi que des courants et une augmentation de la fréquence et de la puissance des tempêtes (IPCC 2007 ; Brierley & Kingsford 2009).

* N.B.: Depuis l'écriture de ce texte un numéro spécial de Plos One 5 (8), 2010 rapporte les principaux résultats du programme Census of Marine Life actualisant certains chiffres donnés dans ce paragraphe. Voir aussi Tittensor *et al.* 2010 Nature 466 1023-1148.

2-4) L'exemple de la Mer Méditerranée : une grande diversité mais subissant d'importantes pressions environnementales*²

Le cas de la Mer Méditerranée illustre parfaitement l'impact du changement global sur le milieu marin. Environ 12000 espèces de macro-organismes y ont été décrites (Bianchi 2007) soit 4 à 18% de la biodiversité marine mondiale pour une surface qui ne correspond qu'à 0,82% de la surface couverte par l'ensemble des océans (Bianchi & Morris 2000). Cette diversité biologique remarquable s'explique à la fois par une histoire géolo-

gique complexe (Crise Messénienne à entre -5,6 et -5,3 millions d'années ayant entraîné un assèchement partiel du bassin suivi d'une recolonisation par l'Atlantique) et par des caractéristiques climatiques et hydrologiques singulières qui induisent l'existence d'habitats tempérés et subtropicaux (Bianchi & Morris 2000 ; Lejeusne *et al.* 2010).



Figure 1-2 : Illustration de la pression démographique sur les côtes méditerranéennes : image satellite nocturne du bassin méditerranéen (juin 2006 © NASA).

Comme l'illustre la figure 1-2, cette mer est en « état de siège » (Lejeusne *et al.* 2010) de part l'importante population humaine vivant sur ses côtes. Le « quartet diabolique » y est donc logiquement déjà à l'œuvre : plus de 573 espèces y ont été introduites notamment suite à l'ouverture du Canal de Suez en 1869 (« *invasions lessepsiennes* » Galil 2009) ; les cas du thon rouge (*Thunnus thynnus*) (MacKenzie *et al.* 2009) et du corail rouge (*Corallium rubrum*) (Bruckner 2009 et voir en suivant) illustrent l'impact de la surpêche ; le coralligène, l'un des habitats les plus riches de Méditerranée regroupant plus de 1600 espèces, est menacé par l'action combinée de la pollution et de la sédimentation (Ballesteros 2006) ; enfin la dégradation généralisée des réseaux trophiques en Méditerranée (Coll *et al.* 2008) et la raréfaction des prédateurs supérieurs (cf. thon rouge) soulignent la possibilité d'extinctions en cascades (Brook *et al.* 2008). Cette région du globe est parallèlement impactée par les changements climatiques en cours qui ont induit une augmentation de la température de l'eau en surface (+ 0,66°C au cours des dernières décennies Romano & Lugrezzi 2007) et en profondeur (+ 0,12°C depuis 1959 Bethoux *et al.* 1990). Ce dernier point est préoccupant pour une partie importante de la diversité biologique méditerranéenne et notamment pour le coralligène et les espèces benthiques de substrat dur en général.

*2 N.B.: voir Coll *et al.* 2010 Plos One 5 (8) pour une mise à jour sur la biodiversité marine Méditerranéenne découlant du programme Census of Marine Life.

2-5) Impact du changement global en Méditerranée : les évènements de mortalité massive

Deux événements de mortalité massive (MME) à grande échelle ont eu lieu en 1999 et 2003 (Garrabou *et al.* 2009). Des mortalités massives ont déjà été rapportées en Méditerranée (Lejeusne *et al.* 2010). Cependant ces deux évènements sont remarquables par leur lien avec une anomalie positive du régime thermique, l'aire géographique concernée et le nombre d'espèces impactées. Malgré des différences dans les régimes thermiques se traduisant par une variation de la gamme de profondeur touchées (jusqu'à 40m en 1999 contre 25m en 2003 pour la région provençale), ces deux mortalités coïncident en effet avec une température de l'eau anormalement élevée (+ 2 à 3°C dans les couches d'eau intermédiaires en 1999 Romano *et al.* 2000 ; + 1 à 3°C par rapport à la température de surface moyenne en 2003 Garrabou *et al.* 2009). D'autre part, elles ont été observées sur plusieurs milliers de kilomètres de côtes du bassin Nord-Occidental allant des Baléares à la Ligurie en passant par la Sardaigne, la Corse et la Catalogne (Fig. 1-3a) (Perez *et al.* 2000 ; Garrabou *et al.* 2009). Enfin, une trentaine d'espèces de macro-invertébrés benthiques ont été touchées. Ces espèces sont notamment des spongiaires et des gorgonaires endémiques de Méditerranée (Fig. 1-3b) qui ont souvent des rôles clés au sein des communautés de substrats durs et du coralligène, l'une des communautés les plus riches de Méditerranée (Ballesteros 2006). Chez les gorgonaires, les MMEs se sont traduits par une nécrose totale ou partielle des tissus entraînant donc des pertes importantes de biomasse pouvant aller jusqu'à la mort de la colonie. Cette nécrose pourrait être induite directement par la température suite à un dysfonctionnement métabolique (Torrents *et al.* 2008), potentiellement lié à un stress nutritif induit par un faible niveau de nourriture pendant la période estivale (Coma *et al.* 2009). Une action indirecte de la température a aussi été envisagée suite à l'identification d'une bactérie pathogène thermodépendante sur des colonies de *Paramuricea clavata* nécrosées (*Vibrio coralliilyticus* Bally & Garrabou 2007). Quelque soit le mode d'action de la température sur les gorgonaires, cette nécrose peut toucher tout ou partie de la colonie et varie de façon significative d'un individu à l'autre au sein d'un même site. Cette variabilité d'atteinte s'observe aussi au niveau populationnel, les mortalités massives ayant touché différentes populations d'une même espèce de façon différentielle (Perez *et al.* 2000 ; Garrabou *et al.* 2009). En tenant compte du fait que la plupart des espèces impactées, et notamment les gorgonaires, sont des espèces longévives à dynamiques de populations lentes (e.g. *Paramuricea clavata*, *Corallium rubrum* Linares *et al.* 2010a, b) possédant, a priori, des capacités de récupérations modérées à court terme, ces évènements de mortalité massive et leur possible intensification si l'on en croit les projections climatiques (IPCC 2007), nous interrogent sur le futur de ces communautés benthiques (Garrabou *et al.* 2009).

a)



b)

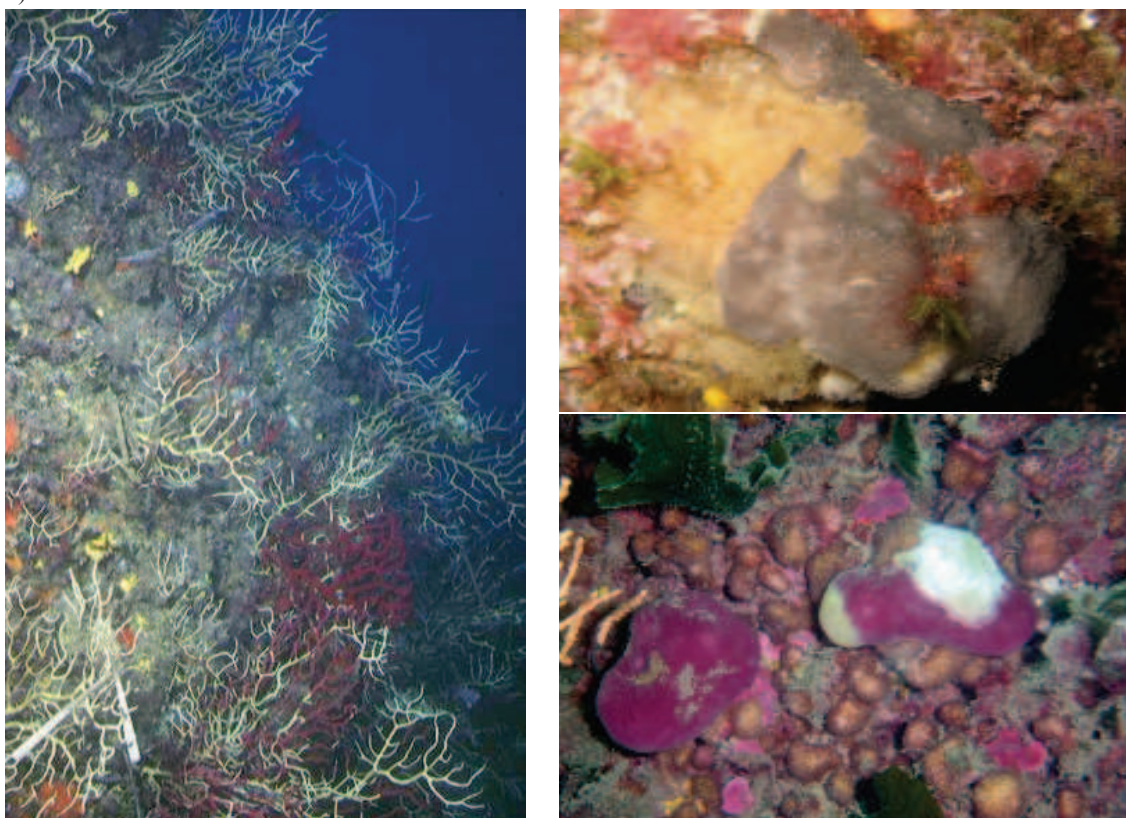


Figure 1-3 : Évènements de mortalités massives en Méditerranée Nord-Occidentale : a) plusieurs milliers de kilomètres de côtes ont été touchés (en bleu) ; b) une trentaine d'espèces de macro-invertébrés benthiques a été impactée : les gorgonaires, comme *Paramuricea clavata* (à gauche, les axes blancs correspondent à des colonies mortes), et les spongiaires, comme *Spongia officinalis* (en haut à droite, la nécrose correspond aux parties marrons claires) ou *Petrosia ficiformis* (en bas à droite, la nécrose correspond à la partie blanche), ont été les principales victimes de ces mortalités.

3) Réponse de l'homme à un problème d'origine anthropique : la biologie de la conservation pour faire face aux changements globaux

3-1) *Biologie de la conservation et évolution contemporaine*

La biologie de la conservation s'est développée de façon urgente au cours des dernières décennies afin de faire face à cette sixième extinction de masse (Hedrick 2001). Elle est interdisciplinaire et intègre donc des techniques et des méthodes appartenant à de nombreuses disciplines (physiologie, sciences sociales, biologie des populations, biogéographie, économie) (Soulé 1985). En tant que « *discipline de crise* », le but de la biologie de la conservation est de proposer « *des principes et des outils afin de préserver la diversité biologique* » (Soulé 1985). La question de l'évolution de la biodiversité face aux changements globaux en cours est donc centrale. L'influence anthropique est, en effet, devenue une force évolutive majeure qui, au delà des extinctions brutales, entraîne dans certains cas des changements évolutifs importants (Palumbi 2001). Les mécanismes fondamentaux de l'évolution biologique correspondent à des changements de fréquence génétique au sein des populations suite aux interactions entre les organismes et leur environnement (Guinand *et al.* 2004). Les exemples empiriques d'évolution induite par la pression anthropique sont de plus en plus nombreux (Hendry & Kinnison 1999). Les variations de la taille du corps, de la taille et de la forme du bec chez deux espèces de pinsons (*Geospiza fortis* et *Geospiza scandens*) des Iles Galápagos sur une période de 30 années ont, par exemple, été liées aux effets des altérations climatiques (i.e. sécheresse intense) sur la nourriture disponible (Grant & Grant 2002). Ces cas d'« *évolution contemporaine* » (Stockwell *et al.* 2003) sont caractérisés par leur rapidité, les changements biologiques induits par l'environnement se déroulant en quelques générations seulement. Ils remettent ainsi en cause la vision prônée par Darwin lui-même (1859) qui veut que « *natural selection will always act very slowly, often only at long intervals of time, and generally on only a very few of the inhabitants of the same region at the same time* » et nous questionnent sur le rôle de ce phénomène dans le devenir de la biodiversité.

3-2) *Vers une biologie évolutive de la conservation: composante génétique et dynamique éco-évolutive*

Les processus microévolutifs (agissant au niveau infraspécifique) sont aussi d'une importance majeure dans la résilience des écosystèmes soumis à des perturbations et ce, sur une large gamme spatiale et temporelle (Ferrière *et al.* 2004). Un exemple de cette relation est la corrélation positive existant entre la diversité génétique à l'intérieur des populations (donc sous l'influence directe des processus microévolutifs) d'une plante *Oenothera biennis* et la richesse spécifique et l'abondance des arthropodes associés (Johnson *et al.* 2009). Ces interactions entre processus écologiques et évolutifs à l'échelle contemporaine créent une « *dynamique éco-évolutive* » (Hendry *et al.* 2010) ou « *boucle de rétroaction environnementale* » (Ferrière *et al.* 2004) illustrée par la figure 1-4.

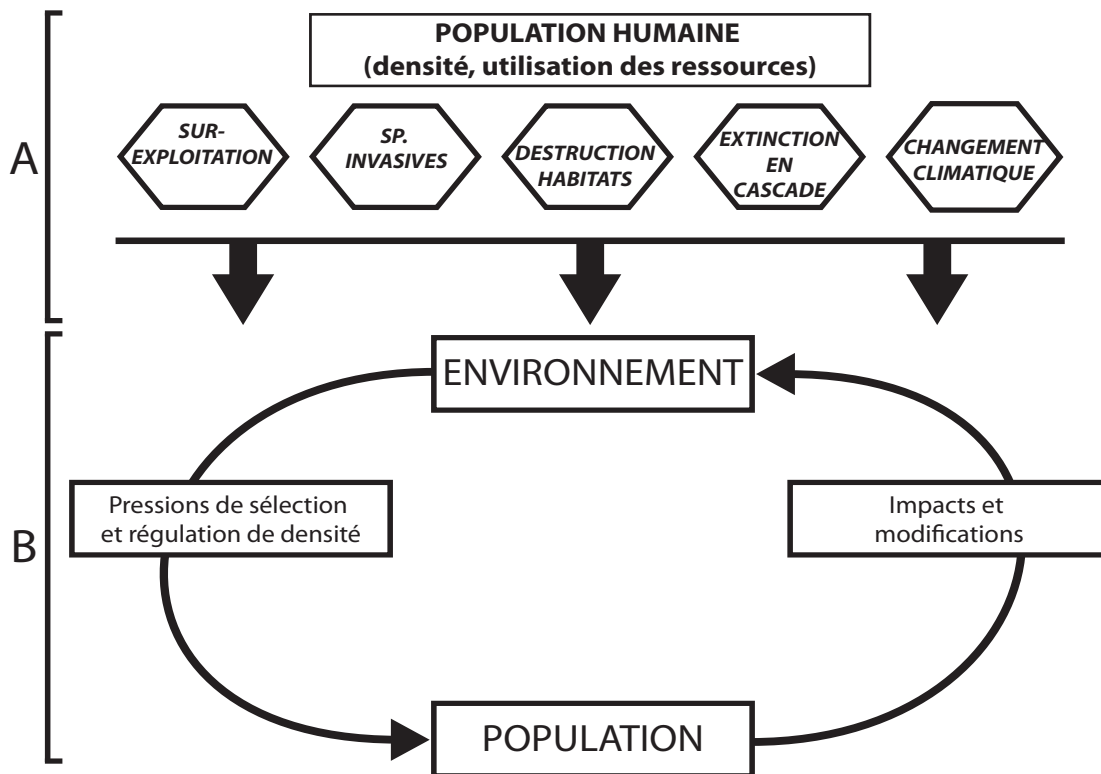


Figure 1-4 : Vers une biologie évolutive de la conservation. Comprendre l'évolution de la biodiversité dans le contexte des changements environnementaux nécessite notamment d'évaluer les capacités d'adaptation du vivant. La boucle de rétroaction environnementale (B) modélise les interactions entre population et environnement. Une population agit sur son environnement. Elle entraîne donc des modifications des caractéristiques environnementales qui vont en retour influencer sur la démographie de la population. L'impact des changements globaux d'origine anthropique (A) sur cette boucle de rétroaction et leur intégration en temps que force évolutive majeure sont indispensables pour une biologie évolutive de la conservation (d'après Visoutek *et al.* 1997 ; Crandall *et al.* 2000 ; Ferrière *et al.* 2004 ; Brook *et al.* 2008 ; Hendry *et al.* 2010).

La boucle de rétroaction environnementale place l'entité population et ses interactions avec le milieu au centre du raisonnement de conservation. Une population d'organismes agit directement sur son environnement en fonction de ses caractéristiques propres (densité, diversité génétique et phénotypique). Cette action va faire évoluer l'environnement en modifiant ses propriétés comme par exemple la densité des ressources. Ces variations environnementales influencent en retour la démographie et les traits d'histoire de vie de la population considérée. L'action du rétrocontrôle environnemental se traduit par exemple par des variations du taux de croissance, de fécondité ou de mortalité des organismes considérés en fonction des contraintes imposées au niveau génomique (Hoffman & Willi 2008). Comprendre les implications évolutives du changement global passe donc par l'étude des interactions entre phénomènes écologiques et évolutifs à l'échelle populationnelle. Cette perspective contraste à la fois avec les méthodes de quantification de la biodiversité, menées principalement au niveau de l'espèce, et avec les théories sur les phénomènes d'extinction généralement focalisées sur des assemblages d'espèces. Elle

a été suggérée dès la fin des années 80, même si l'impact de la composante génétique était alors sous estimé (Landé 1988). Le rôle de cette composante génétique notamment dans le cas des populations ayant subi une réduction de taille importante a, depuis, été reconsidéré (Spielman *et al.* 2004 ; Willi *et al.* 2006). Ces populations sont en effet plus sujettes à une diminution de leur valeur sélective moyenne (« *mean fitness* ») suite à la fixation d'allèles délétères (fardeau génétique). Dans le même temps, elles peuvent subir une dépression de consanguinité se traduisant par une diminution de la valeur sélective des individus d'une génération à l'autre (Hedrick 2001). D'autre part, la petite taille des populations s'accompagne d'une forte dérive génétique et donc d'une perte de diversité. Les potentialités évolutives de l'entité considérée étant liées à son niveau de variabilité génétique, une population de petite taille aura donc moins de chance de s'adapter face à une nouvelle perturbation environnementale (Frankham 2005 ; mais voir Stockwell *et al.* 2003 ; Kohn *et al.* 2007 pour discussion). La prise en compte de la dynamique éco-évolutive est ainsi de plus en plus généralisée à la fois pour la gestion de la crise de biodiversité (Crandall *et al.* 2000 ; Western 2001 ; voir aussi la conclusion du Chapitre 2) que pour sa compréhension (Ferrière *et al.* 2004 ; Hendry *et al.* 2010).

*Le nombre moyen de populations par espèces animales est estimé à 220. Considérant un nombre total d'espèces de 7 millions, il y aurait donc 1,5 milliards d'entités populations sur Terre, ce qui représente une richesse biologique et un réseau d'interactions prodigieux. Sur ce milliard et demi de populations, plusieurs millions, représentant entièrement ou non une entité espèce, disparaîtraient chaque année (d'après Hughes et al. 1997). Dans le contexte de la dynamique éco-évolutive, ces estimations soulignent l'impact profond et la perte phénoménale associés à l'extinction de masse en cours. Ces chiffres renforcent, si besoin est, le caractère indispensable d'une action de conservation intégrée et à la mesure de cet enjeu. C'est dans cette perspective que se situe ce travail de thèse. Il est focalisé sur l'étude de l'impact des changements globaux en Mer Méditerranée et plus particulièrement sur l'étude des événements de mortalité massive ayant touché les espèces des communautés de substrat dur. La mise en perspective de ces événements avec l'augmentation de 3,1°C de la température de surface d'ici 2099 suggérée par certains auteurs (Somot et al. 2006) et donc l'augmentation de la fréquence des événements thermiques extrêmes comme ceux de 1999 et 2003 (IPCC 2007), pose sans ambiguïté la question du futur de ces communautés. Ce travail de thèse, intégré dans un programme de recherche multidisciplinaire (ANR-Medchange, 2006-2008), s'attache à l'étude d'une partie processus microévolutifs en jeu chez *Corallium rubrum*, une espèce emblématique de Méditerranée récoltée depuis l'Antiquité et dont les populations de surface ont subi de plein fouet les événements de mortalité massive probablement liés au changement climatique (Garrabou et al. 2001).*

II - Le corail rouge, *Corallium rubrum*, un modèle atypique en biologie de la conservation

1) Des octocoralliaires aux *Corallidae*

Les octocoralliaires (*Cnidaria*, *Anthozoa*) sont des organismes coloniaux modulaires, c'est à dire formés par la juxtaposition de modules (Harper & White 1974) avec cependant une exception, *Taiaroa tauhou* qui est un polype solitaire (Bayer & Muzik 1976). Le module ou unité fonctionnelle chez ces organismes correspond au polype qui réalise l'ensemble des fonctions physiologiques (alimentation, reproduction, excrétion) (Sanchez & Lasker 2003). Du point de vue morphologique, les 8 tentacules souvent pennés et les 8 mésentères de ces polypes constituent une synapomorphie diagnostique de ce groupe (Daly *et al.* 2007). Du point de vue moléculaire, ils sont les seuls métazoaires à posséder le gène *msh1* dans leur génome mitochondrial (voir Chapitre 2). Bien que sa monophylie soit robuste, les relations phylogénétiques à l'intérieur de ce groupe sont toujours problématiques (voir Chapitre 2).

La famille des *Coralliidae* à laquelle appartient *Corallium rubrum* (Linné, 1758) modèle biologique principal de ce travail, ne fait pas exception. Cette famille regrouperait trois genres selon la classification actuelle (Williams & Cairn 2009): *Paracorallium* (Bayer & Cairn 2003), *Pleurocoralloïdes* (Moroff 1902) et *Corallium* (Cuvier 1798). L'appartenance du genre *Pleurocoralloïdes* étant sujette à discussion (Bayer & Cairns 2003) et n'ayant jamais été testée au niveau moléculaire, je ne me focaliserai que sur les deux genres restant pour la suite de cette discussion. Le genre *Paracorallium* regrouperait 7 espèces alors que 19 ont été décrites au sein du genre *Corallium* portant donc à 26 le nombre total d'espèces au sein de ce clade (Bayer & Cairns 2003 ; CITES 2007 ; Tableau 1-1). Ces espèces sont trouvées dans la plupart des mers du globe, des régions tempérées aux régions tropicales. Hormis *Corallium rubrum* qui peut s'observer près de la surface, toutes ces espèces se rencontrent principalement à partir d'une centaine de mètres de profondeur et jusqu'à plus de 1500m. La distribution de ces espèces doit cependant encore être précisée comme le démontrent les récentes publications rapportant l'observation d'espèces dans de nouvelles régions (e.g. *Corallium niobe* et *Corallium tricolore* autour des Açores ; Sampaio *et al.* 2009) ou à de nouvelles profondeurs (e.g. *Corallium rubrum* à 800m de fond ; Costantini *et al.* 2010). Cette famille d'organismes est caractérisée par un axe calcaire massif et non flexible fait principalement de calcite (Carpine & Grasshoff, 1975) et dont la couleur varie en fonction des espèces (rose peau d'ange pour *C. secundum* ou blanc pour *C. konojoi*). Ils font partie d'un groupe appelé communément coraux précieux, certaines espèces étant récoltées de façon intensive notamment pour un usage en bijouterie.

Tableau 1-1 : Espèces de la famille des Coralliidae. Le tableau présente pour chaque espèce l'océan ou la région ainsi que la profondeur où elle a été décrite. Les espèces en gras sont les espèces à valeur commerciale. * désigne les espèces ayant été regroupées dans le genre *Paracorallium* (voir Chapitre 2 Partie I) (tableau simplifié de CITES 2007).

Espèces	Répartition	Profondeur (m)	Citation
<i>C. abyssale</i>	Pacifique		Bayer 1956
<i>C. borneense</i>	Pacifique		Bayer 1950
<i>C. ducale</i>	Pacifique		Bayer 1955
<i>C. elatius</i>	Pacifique / Indien	150-330	Ridley 1982
<i>C. halmaheirensis</i>	Indonésie		Hickson 1907
<i>C. imperiale</i>	Pacifique	600	Bayer 1955
<i>C. inutile</i> *	Pacifique	100-350	Kishinouye 1903
<i>C. japonicum</i> *	Pacifique	80-450	Kishinouye 1903
<i>C. johnsoni</i>	Atlantique		Gray 1860
<i>C. kishinouyei</i>	Pacifique		Bayer 1996
<i>C. konjoi</i>	Pacifique	50-400	Kishinouye 1903
<i>C. lauuense</i> / (<i>C. regale</i>)	Pacifique	390-500	Bayer 1956
<i>C. maderense</i>	Atlantique		Johnson 1898
<i>C. medea</i>	Atlantique	380-500	Bayer 1964 / Castro et al 2003
<i>C. niobe</i>	Atlantique		Bayer 1964
<i>C. nix</i> *	Pacifique	240	Bayer 1996
<i>C. reginae</i>	Indonésie		Hickson 1905
<i>C. rubrum</i>	Méditerranée / Atlantique	5-800	Linnaeus 1758
<i>C. salomonense</i> *	Indien	200	Bayer 1993
<i>C. secundum</i>	Pacifique	200-500	Dana 1846
<i>C. stylasteroides</i> *	Pacifique / Indien	130-360	Ridley 1882
<i>C. sulcatum</i>	Pacifique		Kishinouye 1903
<i>C. thrinax</i> *	Pacifique	240	Bayer & Stefani 1996
<i>C. tortuosum</i> *	Pacifique	153-325	Bayer 1956
<i>C. tricolor</i>	Atlantique		Johnson 1898
<i>C. sp. nov.</i>	Pacifique	700-1500	Grigg 1982

2) Le corail rouge, *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758)

2-1) *Corallium rubrum* : du « lithodendron » à la « petite Ortie ou Poulpe »

Ces espèces sont généralement mal connues, exception faite, dans une certaine mesure, de *Corallium rubrum* utilisé par l'homme depuis plus de 25000 ans, des fragments ayant été retrouvés dans des restes Paléolithiques (Tescione 1965). Au delà des légendes sur ses pouvoirs magiques, cet organisme a donc intrigué de nombreuses générations de naturalistes dès les grecs anciens qui le définissaient comme un « lithodendron » (i.e. arbre de pierre), c'est à dire un végétal durcissant au contact de l'air. C'est au XVIII^{ème} siècle qu'un italien, Luigi-Fernandino de Marsigli, le classe parmi les végétaux après avoir

observé l'ouverture des polypes dans un récipient contenant une branche de corail vivante fraîchement pêchée. Jean-André Peyssonel, un marseillais ayant aussi assisté à l'épanouissement de ces fleurs blanches à 8 pétales avec de Marsigli, répéta l'expérimentation entre 1723 et 1725 et acquit la certitude de la nature animale du corail rouge. Il écrivit à l'époque : «*Je fis fleurir le corail dans des vases pleins d'eau de mer, et j'observai que ce que nous croyons être la fleur de cette prétendue plante n'était au vrai, qu'un insecte semblable à une petite Ortie ou Poulpe. J'avais le plaisir de voir remuer les pattes, ou pieds, de cette Ortie, et ayant mis le vase plein d'eau ou le corail était à une douce chaleur auprès du feu, tous les petits insectes s'épanouirent. L'Ortie sortie étend les pieds, et forme ce que M. de Marsigli et moi avons pris pour les pétales de la fleur. Le calice de cette prétendue fleur est le corps même de l'animal avance et sorti hors de la cellule.*» Cette découverte controversée sera censurée par Réaumur en 1727 avant d'être finalement validée par Bernard de Jussieu en 1742 puis par l'ensemble de la communauté scientifique (Jean-Georges Harmelin com. pers.).

2-2) Quelques éléments d'écologie générale, d'anatomie et d'histologie

Selon Carpine & Grasshoff (1975), le corail rouge se distingue par sa ramification importante non disposée dans un plan (Fig. 1-5c). Les calices ou anthostèles c'est à dire les tubes à la base du polype qui forment une saillie permanente dans le coenenchyme, sont bas et placés autour des branches de la colonie ou rameaux (Fig. 1-5b et Fig. 1-7). Les sclérites corticaux communément appelés « *cabestan* » sont à symétrie radiale uniquement (Fig. 1-5a) et composés de carbonate de calcium (CaCO_3) cristallisé sous forme de calcite magnésienne (Mateu *et al.* 1986 ; Vielzeuf *et al.* 2008, 2010). Cette espèce est enfin caractérisée par sa couleur rouge unique qui peut cependant tirer sur le rouge pâle et même aller jusqu'au blanc (Bayer 1964). Bien qu'ayant inspiré son nom au coralligène, l'appartenance du corail rouge à cette communauté parmi les plus riches de Méditerranée est âprement discutée. C'est un organisme sciaphile qui, dans la zone bathymétrique superficielle de son aire de distribution, est associé aux habitats semi obscurs tels que les entrées de grottes, les cavités, les surplombs et les tombants principalement dominés par des éponges encroutantes (Fig. 1-5d ; Ballesteros 2006). *Corallium rubrum* se rencontre principalement dans le bassin Occidental de la Méditerranée mais a aussi été décrit dans sa partie Orientale et sur la côte Atlantique (Zibrowius *et al.* 1984 ; Chintiroglou *et al.* 1989) (Fig. 1-6). Il possède enfin une distribution bathymétrique atypique en comparaison du reste des *Coralliidae* puisqu'il a été observé de 5 à 800 m de profondeur (Costantini *et al.* 2010).



Figure 1-5 : Le corail rouge, *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758) : a) sclérites à symétrie radiale isolés de la mésogée, la barre d'échelle équivaut à 50 μm (d'après Grillo *et al.* 1993) ; b) détail de l'extrémité terminale d'une branche permettant d'observer les anthostèles et les polypes à l'extrémité desquels on distingue les 8 tentacules pennés caractéristiques des octocorallaires; c) colonie caractérisée par une ramification importante et non disposée dans un plan ; d) population de corail rouge située sur un surplomb au large de Marseille.

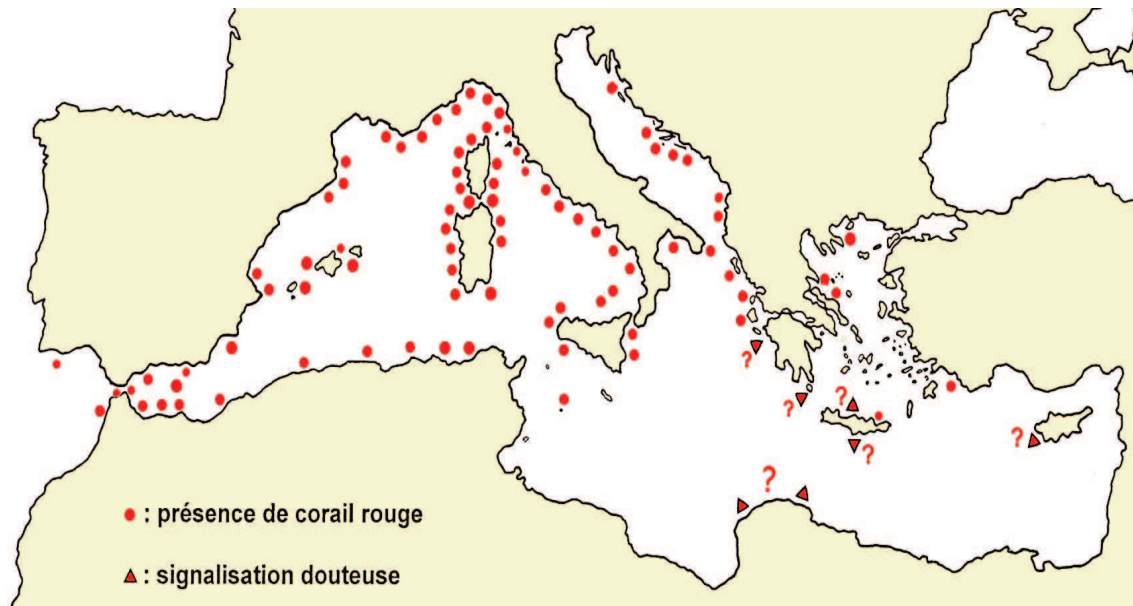


Figure 1-6 : Aire de répartition du corail rouge (d'après Zibrowius *et al.* 1984 ; Chintiroglou *et al.* 1989 ; Harmelin com. pers.)

C'est Lacaze-Duthier (1864) qui initia les études anatomiques et histologiques sur cette espèce dont les résultats furent précisés un peu plus d'un siècle plus tard (Grillo *et al.* 1993 ; Allemand 1993). Les polypes sont composés d'un corps cylindrique en forme de sac, d'un disque basal ou aboral fixé sur l'axe squelettique et d'un disque oral portant la bouche et les tentacules. Cette partie regroupant bouche et tentacules est appelée anthocodia. Les polypes sont inclus dans le coenenchyme ou cortex comprenant notamment cnidocytes et nématocytes. Il est formé de deux épithéliums : l'épiderme, externe, et le gastroderme, interne. Ils dérivent respectivement de l'ectoderme et de l'endoderme embryonnaire et sont séparés par une mésoglée. La mésoglée est une épaisseur de collagène dans laquelle on trouve des sclérites libres sécrétés par les scléroblastes présents dans sa portion supérieure (en contact avec l'épiderme). Elle est aussi traversée par un lacis de petits canaux ou solenia d'origine endodermique et dont la fonction est encore mal connue. Ces petits canaux communiquent avec des canaux gastrovasculaires plus importants et circulant parallèlement à l'axe squelettique pour déboucher dans les cavités gastrovasculaires des polypes. Enfin, formant un feuillet le long de l'axe se trouve l'épithélium axial qui est une fine couche de scléroblastes dérivant donc de l'ectoderme et de nature identique à ceux trouvés dans la mésoglée (Fig. 1-7). Cet épithélium axial joue un rôle clé dans la squelettogenèse.

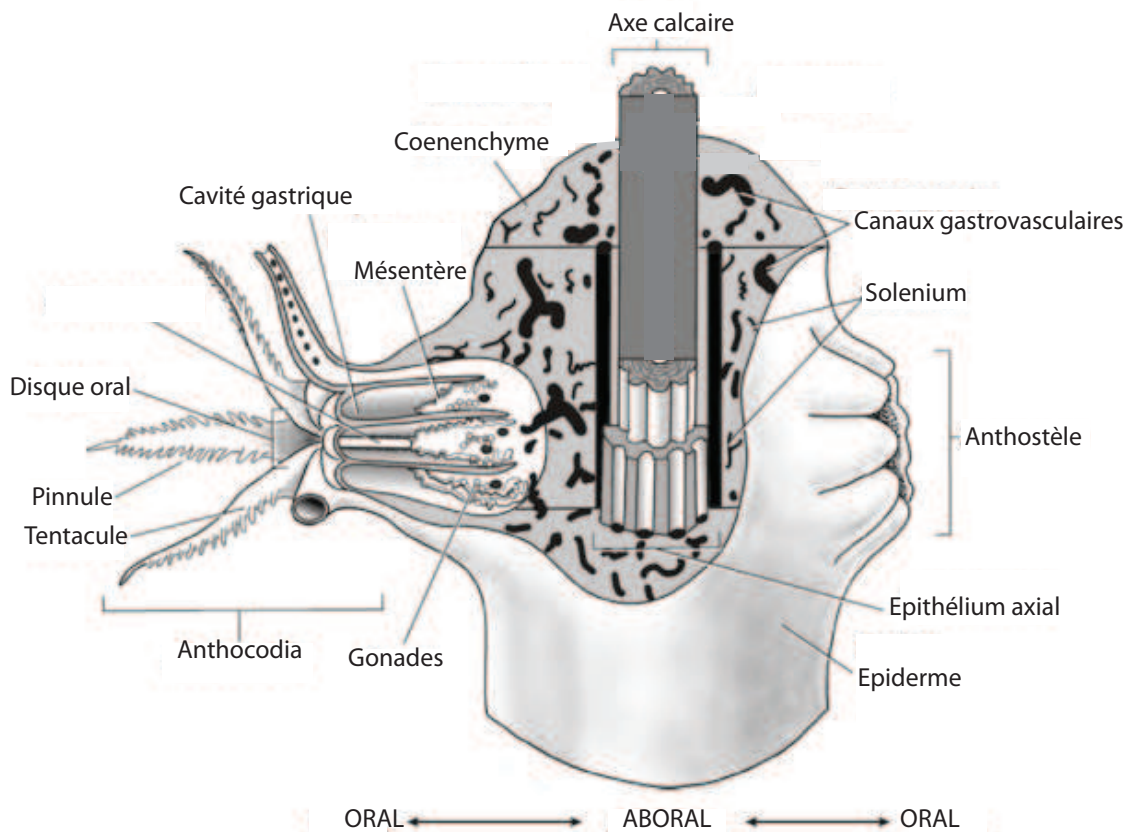


Figure 1-7 : Anatomie d'une colonie de corail rouge (d'après Galway *et al.* 2006 et Harmelin com. pers.). Solenium et canaux gastrovasculaires sont insérés dans la mésoglée.

2-3) Description du processus de squelettogenèse et méthode de détermination de l'âge

Chez le corail rouge, la squelettogenèse est un processus complexe qui se déroule en deux étapes (Grillo *et al.* 1993). Lors de la première étape, les sclérites sont accumulés et cimentés à l'apex des branches pour former le cœur de l'axe et permettre ainsi la croissance en hauteur des colonies. La croissance en diamètre de l'axe se déroule lors d'une seconde phase et serait due à une activité sécrétrice de l'épithélium axial. L'axe du corail rouge est formé de calcite magnésienne mais aussi d'une matrice organique. Cette matrice organique composée principalement de glycosaminoglycanes (GAG) et de protéines ne représente que 1,2 % de la masse totale de l'axe (Allemand *et al.* 1994 voir Dauphin 2006 pour détails). Bien qu'elle soit aussi présente dans les spicules (Allemand *et al.* 1994), que les différentes étapes de la calcification soient globalement cernées (Allemand & Grillo 1992 ; Allemand & Benazet-Tambuté 1996) et que l'architecture du squelette ait été récemment étudiée (Vielzeuf *et al.* 2008, 2010), le rôle de la matrice organique dans le processus de biominéralisation est toujours peu clair. Cvejic *et al.* (2007) ont récemment démontré son implication dans la coloration rouge du squelette. Même si l'origine de cette pigmentation est toujours débattue (voir Cvejic *et al.* 2008 ; Fritsch & Karampelas

2008), des caroténoïdes de types canthaxanthines provenant probablement de l'alimentation du corail ont en effet été isolés au sein de cette matrice. D'autre part, la découverte de stries de croissance annuelle à l'intérieur de cette matrice a entraîné la mise au point d'une méthode d'estimation de l'âge permettant une avancée importante dans la connaissance de la biologie du corail rouge. L'existence de ces stries de croissances avait été décrite dès les travaux de Lacaze-Duthiers (1864) et confirmée par Dantan (1928). Cette méthode a notamment entraîné une réévaluation du taux de croissance et de l'âge de la maturité sexuelle de cette espèce (Marschal *et al.* 2004).

2-4) Un organisme sessile et longévif caractérisé par une dynamique de population lente

Comme le reste des octocorallaires, le corail rouge est une espèce benthique suspensivore passive qui se nourrit de particules organiques détritiques en suspension, de copépodes, d'œufs d'invertébrés, de phytoplancton (Tsounis *et al.* 2006) et de nano- et pico- plancton (Picciano & Ferrière-Pages 2007). C'est un organisme à croissance lente avec une croissance en diamètre de 0,20 mm / an environ (Garrabou & Harmelin 2002, Marschal *et al.* 2004, Torrents 2007, Linares *et al.* 2010). Ce taux basé sur la méthode d'ageage présentée précédemment (Marschal *et al.* 2004) est 4 à 5 fois plus faible que les valeurs des études précédentes (Garcia-Rodriguez & Masso 1986; Santangelo *et al.* 1993; Santangelo *et al.* 1997). Ce résultat a donc entraîné un réajustement de la longévité potentielle de cet organisme dont les colonies peuvent atteindre 5 cm de diamètre (soit plusieurs centaines d'années Joaquim Garrabou com. pers.) mais aussi et surtout de l'âge de la maturité sexuelle (7 à 10 ans en moyenne pour Torrents *et al.* 2005 contre 2 à 4 ans pour Santangelo *et al.* 2003). Malgré un nombre d'étude plus restreint, la croissance en hauteur a quant à elle été estimée à $1,78 \pm 0,7$ mm / an (Garrabou & Harmelin 2002). Enfin, un suivi *in situ* a montré que la formation de nouvelles branches sur une colonie existante est très rare avec seulement 3,4 nouvelles branches par colonies sur une période de 22 ans (Garrabou & Harmelin 2002).

Le cycle de vie est illustré par les travaux de Lacaze-Duthiers (1864) en figure 1-8. Sa biologie de la reproduction est présentée en détail dans le chapitre 4. Soulignons malgré tout qu'au delà d'une maturité sexuelle tardive, le corail rouge est une espèce gonochorique et incubante (Lacaze-Duthiers 1864) avec un cycle de reproduction annuel (Vighi 1970,1972 ; Santangelo *et al.* 2003 ; Torrent 2007). La durée de phase larvaire (DLP) est courte puisqu'elle dure entre 4 et 12 jours en aquarium (Weinberg 1979; Grillo & Chessa 1992) ce qui sous entend une potentialité de dispersion et donc de recolonisation limitée chez cet organisme. Harmelin (1985) remarque d'ailleurs que les colonies de corail rouge sont souvent agglomérées dans l'espace dans ce que je désignerai par site ou population dans la suite de ce travail (voir Chapitre 4).



Figure 1-8 : Représentation du cycle de vie du corail rouge à partir des illustrations de Lacaze-Duthiers (1864) qui fut l'un des initiateurs des travaux sur la biologie de cette espèce. Le corail rouge est une espèce gonochorique qui possède une larve de type planula (Oriol Torrents com. pers. pour l'ensemble du travail graphique).

Les modalités de recrutement chez cette espèce sont variables d'un site à l'autre (Bramanti *et al.* 2007) allant d'un recrutement par pulse, donc très aléatoire d'une année sur l'autre (Garrabou *et al.* 2001 ; Garrabou & Harmelin 2002) à un recrutement régulier de 5 à 10 colonies / an / dm² (Bramanti *et al.* 2005). Le taux de mortalité de ces recrues, résultant notamment de la compétition pour l'espace avec les autres organismes sessiles en présence, est élevé (jusqu'à 50 % des colonies de moins de 3 ans Garrabou & Harmelin 2002) puis décroît progressivement jusqu'à une valeur de 1 % environ pour les colonies âgées de plus de 15 ans (Garrabou & Harmelin 2002). Différents traits d'histoire de vie et notamment la survie importante des colonies adultes, le recrutement aléatoire et la forte mortalité post-recrutement ont conduit certains auteurs (Garrabou & Harmelin 2002; Linares *et al.* 2007, 2008a) à suggérer que le corail rouge, comme d'autres gorgonaires méditerranéens, suivait une stratégie de compromis ou de répartition des risques (« *bet-hedging* »). Lorsque le recrutement est aléatoire, cette stratégie prédit un compromis (« *trade-off* ») entre la durée pendant laquelle les organismes sont capables de se reproduire et l'efficacité de la reproduction (Stearns 1992).

3) La corail rouge face au changement global : corailage et événements de mortalité massive

3-1) Corailage et impact sur la structure de taille du corail rouge

Je viens donc de rappeler que le corail rouge est une espèce méditerranéenne, longévive, caractérisée par une croissance lente, un recrutement globalement bas et une capacité de dispersion donc de recolonisation potentiellement faible. Se pose maintenant la question de ses interactions avec le milieu environnant. De par sa structure tridimensionnelle souvent complexe, *Corallium rubrum* joue un rôle structurant important au sein de communautés sciaphiles de substrats durs en Méditerranée (Gili & Coma 1998). Plusieurs décapodes y sont, par exemple, associés (Manconi & Mori 1992 ; obs. pers.). *Corallium rubrum* connaît peu de prédateurs hormis quelques espèces d'éponges perforantes notamment de la famille des *Clionaidae* connues pour s'attaquer à son squelette (Calcinai *et al.* 2002 voir aussi Bavestrello *et al.* 1996) ou encore le gastéropode *Pseudosimnia carnea* qui se nourrit de son coenenchyme (Jean-George Harmelin com. pers.).

La pression induite par une récolte intensive notamment pour un usage en bijouterie était donc, jusqu'à peu, la source de perturbation majeure pour cet organisme. La production totale de corail rouge a été de 1250 tonnes entre 1976 et 2006 avec 97 tonnes récoltées en Europe en 1976 (FAO 2008). Les quantités pêchées ont significativement diminué avec environ 12 tonnes pêchées en 1992 pour cette même région traduisant la surexploitation de la ressource (Santangelo & Abbiati 2001 ; Tsounis *et al.* 2007) et soulignant une exploitation de type emballement-effondrement (« *boom and bust cycle* ») pour la plupart de ces pêcheries (Bruckner 2009). La production est comprise depuis entre 12 à 26 tonnes par an

(Bruckner 2009) avec une légère augmentation ces dernières années suite à la découverte de nouveaux sites (côtes Africaines ou sites profonds). Plusieurs conventions communautaires ou internationales ont été mises en place (Annexe V de la Directive Habitat-Faune-Flore; Annexe III de la Convention de Barcelone ; Annexe III de la Convention de Bern) même si ce sont les états qui doivent eux mêmes réglementer le corailage. En France par exemple, les affaires maritimes délivrent chaque année des autorisations pour pêcher le corail rouge sur la façade méditerranéenne (Corse exclue). Ces autorisations (17 en 2010) ne sont pas limitées en nombre, leur délivrance ne dépendant que d'un certains nombre de conditions devant être remplies par le demandeur (plongeur classe II, bateau avec oxygénothérapie etc.). Devant le manque d'efficacité des réglementations nationales pour assurer une gestion durable des populations de corail rouge, des initiatives ont été menées pour classer *Corallium rubrum* à l'annexe II de la convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (CITES). Ce classement qui vient une nouvelle fois d'être rejeté (mars 2010), permettrait donc une régulation du commerce de cette espèce au niveau international.

Cette surexploitation a de nombreuses conséquences sur le corail rouge, notamment du point de vue démographique. Des analyses comparatives entre sites protégés de l'exploitation car situés en aire marine protégée (« *marine protected area* » MPA voir Tsounis *et al.* 2010 ; Linares *et al.* 2010a) ou à grande profondeur (entre 50 et 230 m de fond Rossi *et al.* 2008) et sites exploités ont confirmé le changement radical de la structure de taille des sites de surface (Santangelo *et al.* 1993a ; Garrabou & Harmelin 2002 ; Tsounis *et al.* 2007). En effet, ces sites sont généralement caractérisés par des colonies de petite taille aussi bien du point de vue de leur diamètre ($3,6 \pm 1,4$ mm) que de leur hauteur ($23,5 \pm 11,5$ mm) et de fortes densités en comparaison des sites protégés ou non exploités ($6,9 \pm 4,6$ mm pour le diamètre et $61,6 \pm 44,5$ mm pour la hauteur) (Bianchimani 2005 ; Garrabou & Harmelin 2002 ; Linares *et al.* 2010). D'autre part et malgré ces différences marquées, les structures de taille des sites en réserve depuis 20 à 30 ans (Zone Marine Protégée de Carry-le-Rouet, Réserve Naturelle de Scandola et Réserve Naturelle de Cerbères-Banyuls) ne sont toujours pas comparables à ce qui pouvait être observé au début des années 60, au début de la pêche en scaphandre autonome (Linares *et al.* 2010) (Fig. 1-9a). Comme le laissent supposer les traits d'histoire de vie de cette espèce, la capacité de résilience des populations de corail rouge doit donc être envisagée sur le long terme (plusieurs décennies).

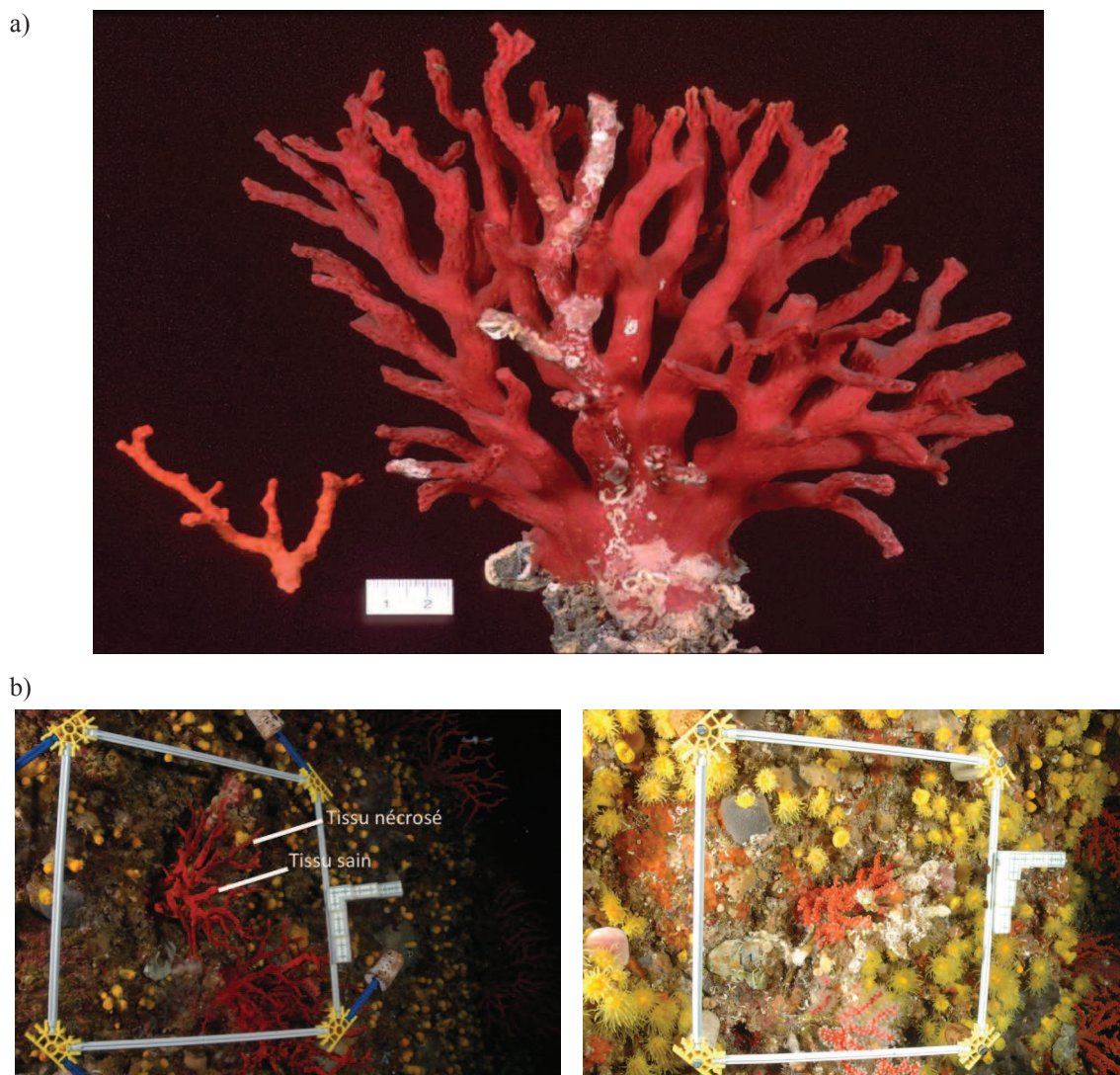


Figure 1-9 : Les populations de surface de corail rouge subissent l'effet combiné de la surpêche et des récents événements de mortalités massives. L'impact de chacun d'entre eux est illustré ici. a) La surpêche a entraîné une réduction significative de la structure de taille des populations. La colonie de gauche est représentative des colonies de surface actuelles et est âgée d'une vingtaine d'années. Celle de droite, dont l'âge est indéterminé, est représentative des colonies telles que l'on devait les trouver lorsque la pression de pêche était plus faible ; b) Suite à l'anomalie thermique positive de 2003, le coenenchyme de certaines colonies de la réserve naturelle de Scandola s'est nécrosé (photo de gauche). La photo de droite montre la même colonie 3 ans plus tard, l'ensemble des parties nécrosées a disparu démontrant la perte de biomasse importante associée à ces événements.

3-2) Impact des événements de mortalité massive sur le corail rouge

En plus de cette pression de pêche, les événements de mortalité massive (MME) de 1999 et 2003 précédemment décrits (voir partie A), ont profondément impacté les populations de corail rouge de Méditerranée Nord-Occidentale entre 5 et 40 m de profondeur. Chez le corail rouge, ces événements potentiellement liés à des anomalies thermiques (Romano *et al.* 2000 ; Garrabou *et al.* 2009), se sont donc traduits par l'apparition soudaine de nécrose partielle ou totale du coenenchyme pouvant donc aller jusqu'à la mort de la colonie (Fig.

1-9b). En fonction des sites, 5 à 80 % des colonies de corail ont montré des signes de nécrose lors de l'évènement de 1999 (Garrabou *et al.* 2001). Cet aspect différentiel des mortalités bien que moins marqué fut aussi observé lors de l'évènement de 2003 (Garrabou *et al.* 2009). Des hypothèses impliquant des facteurs génétiques, physiologiques ou environnementaux ont été émises sans qu'aucune puisse être validée pour expliquer cette hétérogénéité entre site illustrée par la figure 1-10 (Garrabou *et al.* 2001, 2009). Afin de mieux cerner le rôle de la température dans les mortalités de corail rouge, des expérimentations de thermotolérance en aquarium ont été menées. Elles ont permis de définir la température de 25°C comme le seuil au delà duquel on observait l'apparition de nécrose, tout en confirmant l'existence d'une sensibilité différentielle des populations de corail rouge notamment en fonction de la profondeur de l'habitat d'origine. Les colonies venant d'un site situé à 40m de profondeur sont apparues moins thermorésistantes que les colonies provenant d'un site situé au dessus de 20m de profondeur (Torrents *et al.* 2008). Bien que de nombreuses questions autour de ces évènements restent encore sans réponse, on peut dire que la perte de tissu et les mortalités engendrées ont, tout comme le corailage, un impact à la fois sur la croissance et sur la reproduction des colonies et donc sur le devenir des populations de surface de corail rouge (Garrabou *et al.* 2001 ; Torrents 2007).

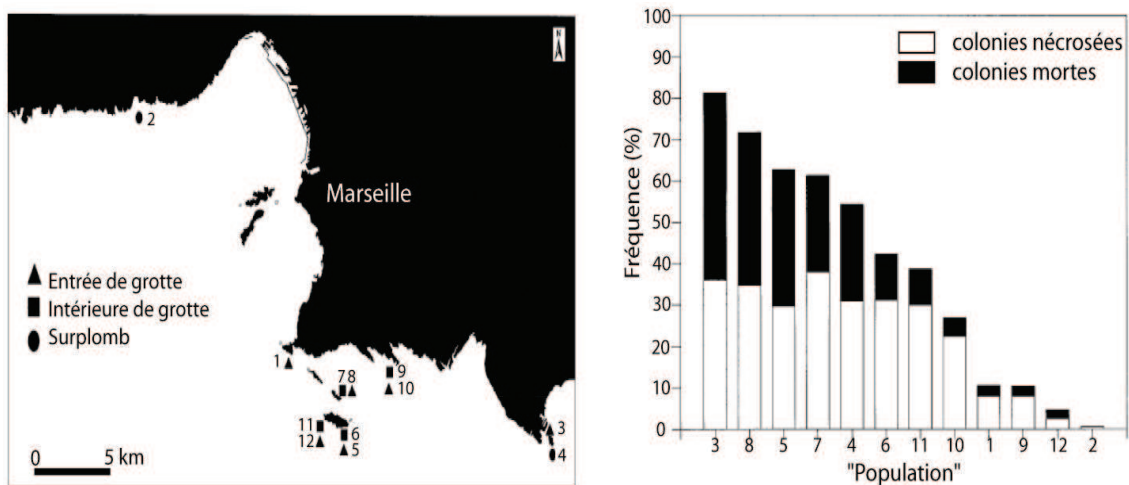


Figure 1-10 : Exemple de l'impact différentiel de l'évènement de mortalité massive de 1999 sur les colonies de corail rouge de la région de Marseille. Les fréquences de colonies partiellement ou totalement nécrosées sont rapportées pour chacune des 12 populations étudiées (d'après Garrabou *et al.* 2001).

3-3) Conséquences potentielles de ces pressions environnementales sur les populations de surface : dynamique de populations et modélisation

C'est en tenant compte de ce contexte de surpêche et d'évènements de mortalité massive que plusieurs études de modélisation ont été menées afin de mieux cerner la dynamique de ces populations et de tester l'impact de différents scénarios environnementaux sur leur maintien (Santangelo *et al.* 2007 ; Jabin *et al.* 2008 ; Bramanti *et al.* 2009). Dans leurs

travaux, Santangelo *et al.* (2007) et Bramanti *et al.* (2009) considèrent que la maturité sexuelle est atteinte à 2 ans (contre 7 à 10 ans selon Torrents *et al.* 2005) surestimant probablement les taux de renouvellement des populations. Malgré cela, ces travaux s'accordent sur la vulnérabilité actuelle des populations de surface face à l'action combinée des deux perturbations. Le potentiel reproducteur des organismes modulaires est, en effet, lié aux nombres de modules et donc à la taille globale de l'organisme (Hall & Hughes 1996). Si la réduction de biomasse uniquement due à une pêche ciblée sur les colonies de grande taille semblait supportable dans une certaine mesure, elle devient trop importante pour que les populations se maintiennent lorsque les mortalités massives sont prises en compte (Santangelo *et al.* 2007 ; Bramanti *et al.* 2009). La combinaison de ces deux perturbations pose donc la question de la conservation des sites de surface de corail rouge en de nouveaux termes.

III – Problématique, objectifs et organisation de la thèse

Comme pour de nombreuses espèces benthiques, l'existence d'une phase larvaire dans le cycle de vie du corail rouge induit la persistance de zones d'ombres dans son écologie. En effet, malgré la littérature très riche portant sur sa démographie ou certains de ses traits d'histoire de vie, de nombreux mécanismes biologiques en jeu, aussi bien entre, qu'au sein des populations de corail rouge, sont toujours mal définis. Par exemple, hormis l'existence d'une phase larvaire de courte durée, les capacités de dispersion et donc le potentiel de recolonisation de cette espèce sont méconnus. D'autre part, la répartition de la diversité génétique est mal cernée et le type d'interaction entre ces organismes et leur environnement reste totalement inexplorés et ce, malgré leur importance face aux changements environnementaux en cours. Le développement d'une approche de génétique des populations focalisée sur le polymorphisme neutre apparaît donc incontournable afin, par exemple, de quantifier la diversité génétique et les niveaux de divergence entre populations ou encore d'estimer certains paramètres biologiques (dispersion, recrutement). Malgré une première publication dès 1993 (Abbiati *et al.* 1993), peu d'études de ce type ont été menées sur le corail rouge. L'ensemble de ces études étant présenté en introduction du chapitre 3, je ne m'attacherai ici qu'aux résultats majeurs. Grâce à l'utilisation de marqueurs allozymiques, Abbiati *et al.* (1993) démontrent l'existence d'une structuration significative entre deux sites séparés d'une dizaine de kilomètres couplée à un écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg se traduisant par un déficit en hétérozygotes pour chacun de ces sites. Ces déficits en hétérozygotes ont été généralisés par la suite à l'ensemble des échantillons testés alors que l'échelle différenciation génétique a été réduite à une dizaine de mètre grâce à l'utilisation de marqueurs microsatellites (Costantini *et al.* 2007a, b). Ces résultats ont notamment permis de suggérer une certaine hétérogénéité génétique et l'existence de flux de gènes réduits chez le corail rouge.

Les buts principaux de cette thèse sont, d'une part, d'étendre et d'affiner les connaissances fondamentales sur la biologie de *Corallium rubrum* et, d'autre part, de préciser les implications évolutives des changements environnementaux actuels sur les populations de cette espèce. Ce travail de thèse est donc focalisé sur la caractérisation des processus microévolutifs en jeu chez le corail rouge à différentes échelles géographiques, et cible les populations infra- et ciralittorales de cette espèce (5 – 60 m; désignées comme populations de surface dans la suite de ce manuscrit) soumises à la fois à une forte pression de récolte et aux impacts potentiels du changement climatique. Afin de prendre en compte ce contexte environnemental, j'ai volontairement choisi de l'aborder sous l'angle de la biologie de la conservation tout en développant une approche intégrant génétique des populations (focalisée a priori sur le polymorphisme neutre) et écologie de terrain (expérimentations *in situ*). Trois questions majeures ont ainsi été abordées et font, chacune, l'objet d'un chapitre particulier :

- 1. Quels sont les patterns de structuration et de répartition de la diversité génétique au sein des populations de surface de *Corallium rubrum* à l'échelle du bassin Méditerranéen Nord-Occidental ?** Lors de ce troisième chapitre, je définis les niveaux de structuration génétique entre populations ainsi que le modèle de flux de gènes associé, je cartographie la diversité génétique neutre à l'échelle du bassin Méditerranéen Nord-Occidental et propose un scénario concernant l'histoire évolutive de ces populations ;
- 2. Quelle est l'étendue d'une population chez *Corallium rubrum* et quels sont les impacts respectifs de la phase larvaire et du mode de reproduction sur son fonctionnement ?** Ce quatrième chapitre porte sur la caractérisation des processus microévolutifs dans les populations de corail rouge avec une attention particulière sur la dispersion efficace et la dérive, ce qui me permet de faire des inférences sur la biologie des populations de cette espèce ;
- 3. Quels sont les liens existants entre les populations de *Corallium rubrum* et leur habitat et comment ces liens peuvent influencer le devenir de ces populations face aux changements environnementaux ?** Dans ce cinquième chapitre, j'étudie les interactions génotype-environnement au sein de populations dans leur habitat d'origine et dans un environnement stressant du point de vue thermique, ce qui autorise une première réflexion sur la dynamique éco-évolutive du corail rouge dans le contexte des changements environnementaux en cours.

En prologue de cette problématique, mon travail a consisté, dans un premier temps, à développer et mettre en place une utilisation en routine de différents types de marqueurs moléculaires (nucléaires et mitochondriaux) chez le corail rouge et d'autres espèces de gorgonaires (cf. Annexe 2). Dans un second temps, j'ai évalué l'apport des marqueurs mitochondriaux à la conservation des octocoralliaires. Ce travail développé dans un cadre phylogénétique fait l'objet du chapitre 2 intitulé « *De la phylogénie au barcoding : Données mitochondriales et conservation des octocoralliaires* » et est divisé en deux parties. Dans la première partie de ce chapitre, je replace le corail rouge et huit autres espèces de gorgonaires méditerranéens ou appartenant au genre *Corallium* à l'intérieur de la phylogénie de cette sous-classe. Dans la seconde partie, j'évalue l'utilisation de deux marqueurs mitochondriaux en tant que système de code barre pour ces organismes. Considérant le faible niveau de variabilité observé pour l'ADN mitochondrial, l'implication de ces résultats pour la conservation de ces espèces est discutée.

La problématique microévolutive à proprement parler débute avec le troisième chapitre intitulé « *Structuration et diversité génétique des populations de surface de corail rouge à l'échelle de la Méditerranée Nord-Occidentale* » qui a fait l'objet d'une publication dans *Molecular Ecology* (Annexe 4). Ce chapitre est focalisé sur la description de la structure génétique de populations de surface échantillonnées entre 14 et 60 m de profon-

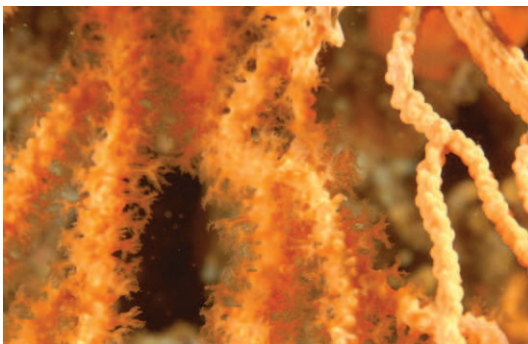
deur des Baléares à la côte Liguro-Provençale et de la Catalogne à la Corse. Le quatrième chapitre intitulé « *Structure génétique à petite échelle géographique et inférences sur la biologie des populations du corail rouge* », accepté dans *Molecular Ecology* (Annexe 5), est centré sur la caractérisation des processus biologiques en jeu à l'intérieur d'un site de corail rouge. Pour finir, le cinquième chapitre « *Acclimatation différentielle et adaptation locale chez *Corallium rubrum*, une espèce sessile et longévive subissant les changements climatiques* » est une première définition des interactions génotype-environnement chez le corail rouge tout en poursuivant la caractérisation des réponses différentielles observées lors d'un stress thermique.

En se focalisant ainsi sur les processus microévolutifs en jeu à différentes échelles spatio-temporelles, ce travail doit permettre une avancée significative dans la compréhension de la biologie de *Corallium rubrum*, et donc de l'impact des changements environnementaux en cours sur cette espèce. Cela implique, dans le même temps, le développement et la production d'un ensemble d'outils et de données indispensables pour la gestion des populations de surface de corail rouge. D'une façon plus générale, cette étude participe à la compréhension de la biologie et des mécanismes évolutifs chez les organismes marins sessiles et longévifs possédant une phase larvaire.

Chapitre 2

De la phylogénie au barcoding: Données mitochondriales et conservation des octocoralliaires

« Où il est question d'octocoralliaires et donc d'une part méconnue de la biodiversité marine, de phylogénie moléculaire et de remise en cause de la classification usuelle, de code barre génétique au sens large, d'évolution moléculaire atypique du génome mitochondrial et d'un gène de réparation de l'ADN, mais aussi de biologie de la conservation, de concept d'espèce et d'unité évolutivement significative. »



Les analyses phylogénétiques permettent d'appréhender la diversité biologique. Elles ont en effet pour objet de reconstruire les relations d'apparentement entre taxons, donc de révéler leur histoire évolutive, mais aussi d'étudier les processus sous-jacents (Philippe & Telford 2006). Cela sous-entend l'existence d'un référentiel commun (théorie de l'évolution biologique) et l'utilisation de critères de classement théoriquement définis (notion de caractères dérivés partagés ou synapomorphie). Malgré l'existence de désaccords fondamentaux entre les différentes écoles de la systématique (Darlu & Tassy 1993), la phylogénie permet un classement rationnel de la diversité biologique.

Reposant à l'origine sur l'utilisation de caractères morphologiques, l'étude des relations d'apparentement entre taxons a progressé avec, dans un premier temps, l'essor de la réaction de polymérisation en chaîne (« *polymerase chain reaction* » PCR) et plus récemment, celui de la génomique. Cette phylogénie dite moléculaire utilise donc le polymorphisme de séquence pour retracer l'histoire évolutive des taxons. Découlant directement de la dimension moléculaire de la phylogénie, des méthodes d'identification taxonomique rapides des espèces à partir de leur séquence ADN à un locus précis (généralement celui de la cytochrome oxydase 1 *COI* situé dans le génome mitochondrial), se sont développées avec plus ou moins de succès en fonction des taxons (« *barcoding* » Hebert *et al.* 2003a, b).

Dans une perspective de biologie de la conservation, la phylogénie moléculaire est une étape fondamentale. En effet comment « protéger » un taxon soumis à de fortes pressions anthropiques si on ne peut clairement l'identifier ? Elle permet donc, en théorie, de cibler le sujet d'étude en définissant les limites taxonomiques du groupe d'organismes considérés. Elle a, en outre, des applications directes pour la gestion de la biodiversité. Puisqu'il est illusoire de vouloir tout protéger, la question fondamentale est de savoir comment choisir les zones d'intérêts majeurs ? La phylogénie moléculaire a ainsi été utilisée pour définir un outil de conservation primordial, bien que toujours ardemment discuté : l'unité d'évolution significative (« *evolutionarily significant unit* » ESU Moritz 1994). Le *barcoding* peut aussi être utilisé dans le cadre d'analyses légales pour lutter contre le braconnage d'espèces ayant une valeur commerciale directe (Dawney *et al.* 2007).

Les études de phylogénie moléculaire chez les octocoralliaires et donc la connaissance de ces organismes sont relativement limitées en comparaison de ce qui a pu se faire sur d'autres groupes de métazoaires. Deux facteurs ont probablement contribué à ralentir le développement de la phylogénie moléculaire chez ces organismes: 1) cette classe est composée d'un grand nombre d'espèces rendant l'échantillonnage complexe ; 2) bien que n'étant pas le seul marqueur moléculaire utilisable en phylogénie, le génome mitochondrial de ces organismes présente globalement un très faible polymorphisme (e.g. France & Hoover 2001). Du point de vue de l'application des marqueurs mitochondriaux et des méthodes phylogénétiques dans une optique de conservation, ces deux facteurs :

1. soulignent la nécessité de compléter la phylogénie existante,
2. imposent l'évaluation au cas par cas du niveau de polymorphisme des marqueurs

mitochondriaux,

3. remettent potentiellement en cause l'application directe des méthodes de *barcoding*,

4. questionnent la validité des notions d'ESU chez les octocoralliaires.

Les deux premiers points seront abordés dans la partie I de ce chapitre alors que le troisième fait l'objet de la partie II. La validité des notions d'ESU chez ces espèces sera discutée brièvement en conclusion de ce chapitre.

I - Phylogénie moléculaire des octocoralliaires à partir des marqueurs mitochondriaux ND2 et ND6

1) Introduction

La phylogénie des métazoaires reste partiellement irrésolue et notamment pour les organismes peu ou pas étudiés tels que les octocoralliaires, ce qui peut donc s'avérer problématique pour leur conservation (Bickford *et al.* 2007). La sous-classe des octocoralliaires, regroupe des organismes coloniaux dont les polypes (unité fonctionnelle) présentent huit tentacules généralement pennés (Daly *et al.* 2007). Au-delà du chauvinisme taxonomique rapporté en écologie (Bonnet *et al.* 2002), mais tout aussi applicable aussi au niveau moléculaire (Fig. 2-1), plusieurs points peuvent expliquer cette connaissance partielle des relations entre les taxons de la sous-classe des octocoralliaires. Tout d'abord, le manque de caractères morphologiques informatifs, le fort niveau d'homoplasie entre ces caractères, la grande diversité morphologique au niveau intra-spécifique liée à une plasticité phénotypique importante (e.g. croissance des colonies) (McFadden *et al.* 2006), combinée à la quasi absence de données fossiles (mais voir Vertino *et al.* 2010 pour le corail rouge) ont fortement compliqué la tâche des taxonomistes. Ensuite, environ 3200 espèces réparties dans 340 genres vivant dans des types d'habitats très hétérogènes (de la surface des mers aux habitats profonds et des tropiques aux pôles) constituent cette classe (Daly *et al.* 2007 ; Williams & Cairns 2009). Le développement des techniques d'exploration sous-marine à partir de la seconde moitié du XX^{ème} siècle a permis la découverte d'espèces profondes et a remis en question les classifications précédentes (Bayer & Stefani 1987 ; France 2007). Sans tenir compte du fait que de nombreuses espèces restent à décrire, un échantillonnage exhaustif au niveau générique semble donc relativement irréaliste. Les espèces méditerranéennes n'ont ainsi jamais été prises en compte dans les quelques études moléculaires à large couverture taxonomique qui ont pu être menées (Berntson *et al.* 2001 ; McFadden *et al.* 2006) bien que l'étude de ces gorgonaires ait débuté dès le XVIII^{ème} siècle avec Linné (Carpine & Grasshoff 1975). Enfin l'évolution atypique du génome mitochondrial ainsi que des espaceurs internes transcrits (« *internal transcribed spacer* » *ITS*) de ces organismes ont compliqué la tâche des phylogénéticiens moléculaires (voir ci-dessous). Malgré tout, l'approche moléculaire basée sur l'analyse de marqueurs nucléaires (*ARNr 18S* Berntson *et al.* 1999, 2001) mitochondriaux (*ND2 msh1* McFadden *et al.* 2006) ou la combinaison des deux (*ARNr 18S* et *ARNr 16S* Sanchez *et al.* 2003) a permis de contourner certains problèmes liés à l'étude des caractères morphologiques. Ces études ont notamment confirmé la monophylie de la sous-classe des Octocoralliaires (Berntson *et al.* 2001) tout en remettant en cause la classification existante. Elles ont proposé une classification alternative basée sur l'existence de 3 clades principaux (*Holaxonia-Alcyoniina* ; *Calcaxonia-Pennatulacea* et *Anthomastus-Coral-*

lium). Parallèlement aux travaux utilisant ces deux types de marqueurs, des phylogénies ont été reconstruites à partir des *ITS* (McFadden & Hutchinson 2001 ; McFadden & Hutchinson 2004 ; Aguilar & Sanchez 2007 ; Herrera *et al.* 2010). Cependant les mécanismes d'évolution de ces locus multi-copies (absence d'évolution concertée) et donc leur utilité en tant que marqueur moléculaire chez les anthozoaires sont toujours sujets à discussion (Vollmer & Palumbi 2004 ; Calderón *et al.* 2006 ; Aurelle *et al.* soumis). De plus, cette catégorie de phylogénies basée sur les *ITS* porte, sur un nombre restreint d'espèces ; elle ne sera donc pas considérée dans la suite de ce chapitre.

L'objectif principal de cette première partie est donc de placer le corail rouge, *Corallium rubrum*, modèle biologique de cette thèse au sein de la phylogénie des octocoralliaires. Nous avons parallèlement cherché à accroître les connaissances phylogénétiques chez ces organismes en ajoutant 3 espèces du genre *Corallium* et 5 espèces méditerranéennes ayant des aires de répartition ou des habitats proches de ceux du corail rouge. Les relations de parenté entre ces 9 « nouveaux » taxons et ceux présents dans les banques de gènes ont ainsi été reconstruites à l'aide de deux marqueurs mitochondriaux concaténés (*ND2* et *ND6*) précédemment utilisés pour le même type de problématique (e.g. McFadden *et al.* 2004, 2006).

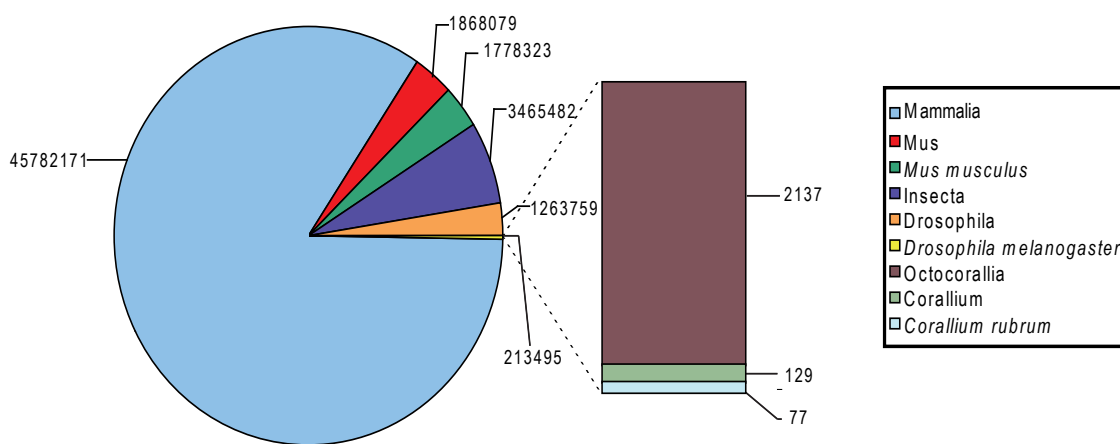


Figure 2-1: Comparaison du nombre de séquences nucléotidiques recensées par GenBank pour différents taxons (mai 2010) : trois classes (Mammalia, Insecta et Octocorallia), un genre appartenant à chacune de ces classes (*Mus*, *Drosophila* et *Corallium*) et une espèce appartenant à chacun des trois genres (*Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Corallium rubrum*)

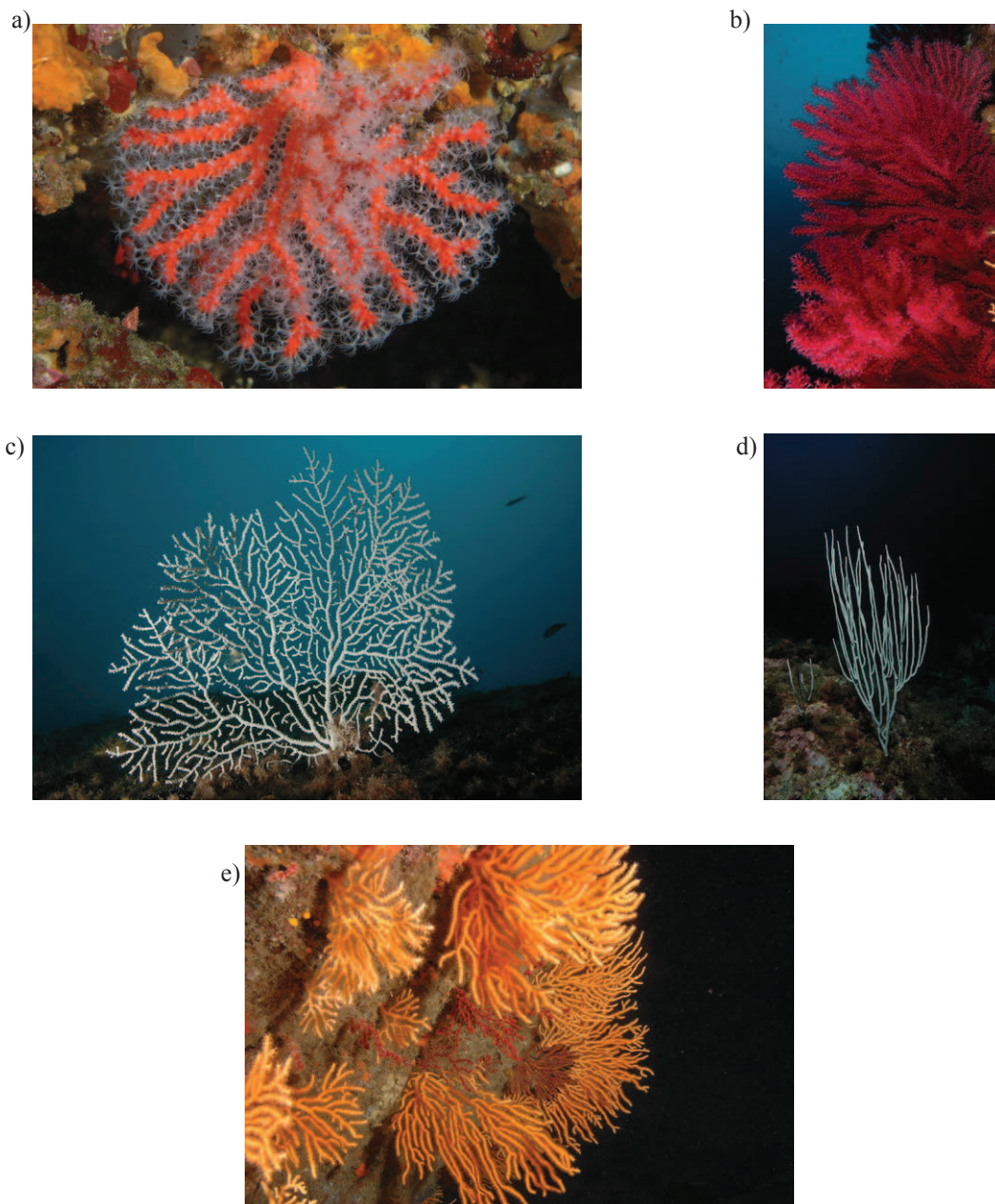


Figure 2-2: *Corallium rubrum* (Linné 1758) (a), *Paramuricea clavata* (Risso 1826) (b), *Eunicella verrucosa* (Pallas 1766) (c), *Eunicella singularis* (Esper 1791) (d) et *Eunicella cavolini* (Koch 1887) (e) dans leur milieu naturel.

2) Matériel et méthodes

2-1) Echantillonnage

En plus des espèces dont les séquences étaient présentes dans les banques, 9 nouvelles

espèces ont été échantillonnées lors de collectes menées par le laboratoire ou grâce à deux collaborations. Parmi les 21 espèces nominales de gorgonaires recensées en Méditerranée par Carpine & Grasshoff (1975), des échantillons de 6 d'entre elles correspondant à 3 genres ont ainsi été obtenus. Le genre *Paramuricea* est représenté par les 2 espèces décrites en Méditerranée (*Paramuricea clavata* (Risso 1826) et *Paramuricea macropsina* (Koch 1882); cette dernière a été échantillonnée par David Diaz de l'université de Barcelone, Espagne), le genre *Eunicella* par 3 espèces (*Eunicella verrucosa* (Pallas 1766), *Eunicella cavolini* (Koch 1887) et *Eunicella singularis* (Esper 1791)) sur les 4 recensées (+ *Eunicella filiformis* (Studer 1878)) auxquelles s'ajoute l'unique espèce du genre *Corallium* présente en Méditerranée (*Corallium rubrum* (Linné 1758)) (Fig. 2-2). Parallèlement, des échantillons de 3 autres espèces de *Corallium* inféodées au milieu profond Atlantique ou Pacifique (*Corallium niobe*, *Corallium regale* et *Corallium sp.*) ont été obtenus grâce à une collaboration avec Scott C. France (Université de Louisiane à Lafayette, Etats-Unis). Ces échantillons ont été conservés dans de l'éthanol à 95% et à -80°C jusqu'à la phase d'extraction de l'ADN.

2-2) Extraction d'ADN, amplification par PCR et séquençage

L'ADN génomique total a été extrait à partir de 5 à 10 polypes ou de petits morceaux de coenenchyme chez plusieurs individus pour chacune des 9 espèces. Une digestion protéinase K/SDS standard suivie d'une extraction phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 :24 :1) (Sambrook *et al.* 2001) ont ensuite été réalisées (Annexe 1). Deux marqueurs mitochondriaux ont été amplifiés : 1) l'extrémité 5' du gène de la sous-unité 2 de la NADH-déshydrogénase (*ND2*) ; 2) l'extrémité 3' du gène de la sous unité 6 de la NADH-déshydrogénase (*ND6*). Les paires d'amorces pour ces locus ont été dessinées par McFadden *et al.* 2004 (Fig. 2-3 et Annexe 2).

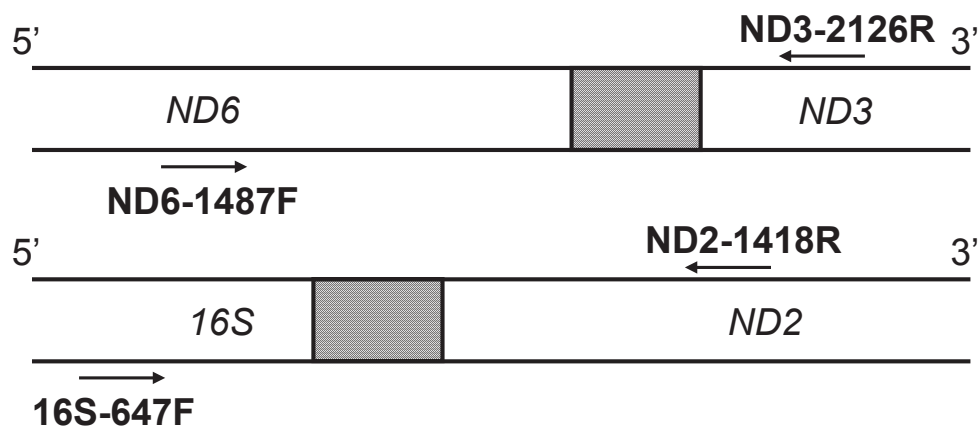


Figure 2-3: Représentation schématique de la position des amorces utilisées pour l'amplification des deux locus *ND2* et *ND6* utilisés dans cette étude. Les régions noircies correspondent à des espaces intergénomiques non-codants (IGR).

Chaque PCR a été effectuée dans un volume final de 30 μL contenant 3 μL d'ADN, 3 μL de tampon 10X, 8 μL de dNTP à 1,25 mM, 3 μL de chacune des amorces à 10 μM , 0,15 μL de Taq Polymérase à 0,25 U/ μL et 9,85 μL d'eau. Les PCR ont été réalisées sur des thermocycleurs de type PTC 100 et PTC 200 avec les programmes suivants: une phase de dénaturation de 5' 94°C ; 35 cycles composés d'une phase de dénaturation de 1 min à 94°C, une phase d'appariement des amorces de 1 min à température d'appariement (T_a = 59°C pour *ND2* et 50°C pour *ND6*), une phase d'élongation de 2 min à 72°C ; une phase d'élongation finale de 5' à 72°C. Les produits de PCR ont été visualisés sur gel d'agarose 2% chargé de 2,5 μL de bromure d'éthidium (BET) (1,2 g d'agarose dilués dans 60ml de TAE ; 2,5 μL de BET ; 3 μL de produit de PCR dilué dans 3 μL de bleu de charge et 3 μL de marqueur de taille 200 pb) avant d'être séquencés par la plate forme de séquençage du Genomer (Roscoff, France) ou par la compagnie Genome Express®.

2-3) Analyse des données de séquence

Les séquences nucléotidiques de chacun des marqueurs ont été traduites en acides aminés (aa) et alignées séparément avec CLUSTALW implémenté dans le logiciel BIOEDIT 7.0.5.3 (Hall, 1999) puis ajustées à l'œil. Les insertion/délétions (indel) ont été codées comme des caractères manquants et les zones ambiguës supprimées. Les séquences des deux marqueurs (*ND2* et *ND6*) ont ensuite été concaténées. Les analyses phylogénétiques ont été effectuées en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance (ML) implémentée dans PHYML v.3.0 (Guindon & Gascuel 2003a; <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). La robustesse des nœuds a été évaluée par bootstrap (rééchantillonnage avec remise), avec 1000 pseudoréplicats. Le modèle d'évolution des séquences expliquant le mieux les données a été sélectionné en utilisant le critère d'information d'Akaike (AIC) implémentée dans jModelTest 0.1 (Posada 2008; <http://darwin.uvigo.es/software/jmodeltest.html>). Il n'a pas été possible d'aligner de façon satisfaisante les séquences provenant de groupes externes comme les Hexacoralliaires, Hydraires ou Porifères. *Briareum asbestinum* est donc utilisé pour raciner la phylogénie conformément à sa position dans la phylogénie de Berntson *et al.* (2001) obtenue à partir de l'*ARN18S* et racinée sur différents groupes externes (Porifères, Cténophores, Placozoaires et Cnidaires).

3) Résultats

3-1) Obtention des séquences par PCR

Pour le locus *ND2*, deux types de séquences ont été obtenus pour les 9 espèces amplifiées ; les 4 espèces du genre *Corallium* présentant une séquence de taille légèrement supérieure (742 pb) aux 3 espèces du genre *Eunicella* et aux 2 espèces du genre *Paramuricea* (734 pb). La différence est due principalement à une insertion dans la partie 3' du gène de la sous unité 16S de l'ARN ribosomique. En ce qui concerne le locus *ND6*,

nous avons aussi obtenu deux types de séquences sur les 9 espèces amplifiées : avec, entre autre, une insertion de 9 pb dans la séquence IGR chez les *Eunicella* et *Paramuricea* (573 pb) qui n'est pas présente chez les *Corallium* (562 pb).

3-2) Jeux de données pour la phylogénie

Le tableau 2-1 récapitule l'ensemble du jeu de données. Nous avons privilégié le nombre d'espèces plutôt que la taille des séquences analysées afin d'avoir la couverture la plus large possible de la diversité spécifique au sein de la sous-classe des octocoralliaires. Ceci explique que la taille des marqueurs ait été réduite pour l'analyse phylogénétique par rapport à ce que nous avons obtenu par PCR.

Les séquences de *ND2* et *ND6* ont été obtenues sur les 9 espèces échantillonnées lors de cette thèse qui s'ajoutent ainsi aux 58 espèces déjà présentes dans les banques aboutissant à un jeu de données de 67 espèces réparties sur 31 genres soit à peine 10% des genres de cette classe. La longueur de la séquence concaténée varie entre 795 et 846 pb. L'alignement ainsi obtenu contient 341 sites variables (40%) dont 246 sites informatifs en parcimonie (29%).

3-3) Analyses phylogénétiques

Des sous-ordres aux genres

Le modèle d'évolution de séquence utilisé pour la reconstruction phylogénétique à partir du marqueur *ND2-ND6* est le modèle GTR+I+G. Les fréquences correspondantes pour chaque type de base sont les suivantes : freqA = 0.2876, freqC = 0.1742, freqG = 0.1851, freqT = 0.3531. L'arbre obtenu en maximum de vraisemblance ($-lnL = 5148.72$) est présenté en figure 2-4. Trois clades majeurs (1, 2, 3) sont présents et fortement soutenus avec des valeurs de bootstrap supérieures à 98 dans les 3 cas. Le clade 1 inclus des taxons appartenant aux sous-ordres des Alcyoniina (e.g. *Alcyonium glomeratum*) et des Holaxonia (e.g. *Plexaura flexuosa*). La monophylie de ces deux sous-ordres ne peut être discutée. Au niveau des familles, Gorgoniidae et Plexauridae sont polyphylétiques. Seule la famille des Xenidae représentée par deux taxons (*Xenia sp.* et *Asterospicularia randalli*) est soutenue avec une valeur de bootstrap égale à 100. La famille des Alcyoniidae ne paraît pas monophylétique. Ce résultat reste à confirmer car les nœuds internes sont peu soutenus ce qui ne permet pas de tirer une conclusion claire sur la position relative des genres composant cette famille (*Alcyonium*, *Cladiella*, *Klyxum*, *Sarcophyton*, *Lobophytum*, *Sinularia*). Concernant les trois sous-familles analysées appartenant au clade 1, Alcyoniinae et Plexauriinae sont paraphylétiques alors que la sous-famille des Stenogorgiinae qui ne regroupe que deux espèces du même genre est monophylétique. Le clade 2 n'inclut que deux taxons (*Keratoisidinae sp.* et *Acanella eburnea*) appartenant au sous-ordre des Calcaxonia tous les deux de la famille des Iisididae, sous-famille des Keratoisidinae. Enfin le clade 3, regroupe quinze taxons du sous-ordre des Sleroxonia qui apparaît monophylétique (valeur de bootstrap = 989). Ces quinze taxons appartiennent à

deux familles : Coralliidae et Paragorgiidae. L'autre taxon représentant de ce sous-ordre, *Briareum asbestinum* (famille des Briaridae), racine la phylogénie. Ainsi parmi les neuf familles et quatre sous familles analysées, respectivement trois familles (Corallidae, Isididae et Xenidae) et une sous-famille (Stenogorginae) sont donc monophylétiques.

Tableau 2-1: Liste des 67 espèces utilisées pour reconstruire la phylogénie des Octocoralliaires. Le nombre de sous-ordres, familles, sous-familles représentés par notre échantillonnage couvrant 31 genres apparaît entre parenthèses en tête de colonnes (selon Williams & Cairns 2009). Les neuf espèces ajoutées aux séquences disponibles dans les banques apparaissent en gras (Accession Genbank : numéros d'accèsion des locus ND2 et ND6 ou du génome mitochondrial complet).

	Ordre	Sous-Ordre (n=4)	Famille (n=9)	Sous-Famille (n=4)	Accession Genbank
<i>Acanella eburnea</i>	Alcyonacea	Calcaxonia	Isididae		NC011016
<i>Alaskagorgia sp.</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	GQ293337/GQ293318
<i>Alcyonium coralloides</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae	Alcyoniinae	AF530484/AF530500
<i>Alcyonium digitatum</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae	Alcyoniinae	AF530482/AF530498
<i>Alcyonium glomeratum</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae	Alcyoniinae	AF530501/AF530502
<i>Alcyonium rudyi</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae	Alcyoniinae	AF530488/AF530505
<i>Alcyonium sp.</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae	Alcyoniinae	AF530489/AF530506
<i>Alcyonium variabile</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae	Alcyoniinae	AF530487/AF530504
<i>Asterospicularia randalli</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Xeniidae		AF530497/AF530513
<i>Briareum asbestinum</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Briaridae		NC008073
<i>Cladiella sp.</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae		AF530491/AF530508
<i>Corallium kishinouyei</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Coralliidae		GQ293319/GQ293338
Corallium niobe	Alcyonacea	Scleraxonia	Coralliidae		
Corallium regale	Alcyonacea	Scleraxonia	Coralliidae		
Corallium rubrum	Alcyonacea	Scleraxonia	Coralliidae		
<i>Corallium secundum</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Coralliidae		GQ293322/GQ293341
Corallium sp.	Alcyonacea	Scleraxonia	Coralliidae		
<i>Dendronephthya gigantea</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Nephteidae		NC013573
<i>Eunicea fusca</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126379/AY126351
<i>Eunicea knighti</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126376/AY126348
<i>Eunicea sp.</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126377/AY126349
<i>Eunicea tourneforti</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126378/AY126350
Eunicella cavolini	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		
Eunicella singularis	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		
Eunicella verrucosa	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		
<i>Gorgonia flabellum</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126399/AY126368
<i>Gorgonia mariae</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126398/AY126367
<i>Gorgonia ventalina</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126397/AY126366
<i>Keratoisidinae sp.</i>	Alcyonacea	Calcaxonia	Isididae	Keratoisidinae	NC010764
<i>Klyxum simplex</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae		AF530490/AF530507
<i>Leptogorgia virgulata</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126390/AY126370
<i>Lobophytum pauciflorum</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae		AF530495/AF530511
<i>Muricea muricata</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126380/AY126352
<i>Muricea pinnata</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126381/AY126353
<i>Muricea purpurea</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	GQ293323/GQ293342
<i>Muriceopsis bayeri</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126389/AY126360
<i>Muriceopsis flavida</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126388/AY126371
<i>Pacifigorgia elegans</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126391/AY126361
<i>Pacifigorgia stenobrochis</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126392/AY126362
<i>Paracorallium sp.</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Coralliidae		GQ293325/GQ293344

Tableau 2-1 (suite):

	Ordre	Sous-Ordre (n=4)	Famille (n=9)	Sous-Famille (n=4)	Accession Genbank
<i>Paragorgia aotearoa</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Paragorgiidae		GQ293324/GQ293343
<i>Paragorgia arborea</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Paragorgiidae		GQ293331/GQ293349
<i>Paragorgia kaupeka</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Paragorgiidae		GQ293332/GQ293351
<i>Paragorgia regalis</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Paragorgiidae		GQ293326/GQ293345
<i>Paragorgia wahine</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Paragorgiidae		GQ293333/GQ293352
<i>Paragorgia yutlinux</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Paragorgiidae		GQ293334/GQ293353
Paramuricea clavata	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Stenogorgiinae	
Paramuricea macrospina	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Stenogorgiinae	
<i>Phyllogorgia dilatata</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126400/AY126369
<i>Plexaura flexuosa</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126383/AY126355
<i>Plexaura homomalla</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126382/AY126354
<i>Plexaura kuna</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126384/AY126356
<i>Plexaurella dichotoma</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126386/AY126358
<i>Plexaurella grisea</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126385/AY126357
<i>Plexaurella nutans</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126387/AY126359
<i>Pseudoplexaura crucis</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Plexauridae	Plexaurinae	AY126373/AY126345
<i>Pseudopterogorgia acherosa</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126393/AY126372
<i>Pseudopterogorgia americana</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126395/AY126364
<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		NC008157
<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126394/AY126363
<i>Pterogorgia anceps</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126375/AY126347
<i>Pterogorgia citrina</i>	Alcyonacea	Holaxonia	Gorgoniidae		AY126374/AY126346
<i>Sarcophyton trocheliophorum</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae		AF530494/AF530510
<i>Sibogorgia cauliflora</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Paragorgiidae		GQ293336/GQ293355
<i>Sibogorgia dennisgordoni</i>	Alcyonacea	Scleraxonia	Paragorgiidae		GQ293335/GQ293354
<i>Simularia gaweli</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Alcyoniidae	Alcyoniinae	AF530493/AF530509
<i>Xenia sp.</i>	Alcyonacea	Alcyoniina	Xeniidae		AF530512/AY758429

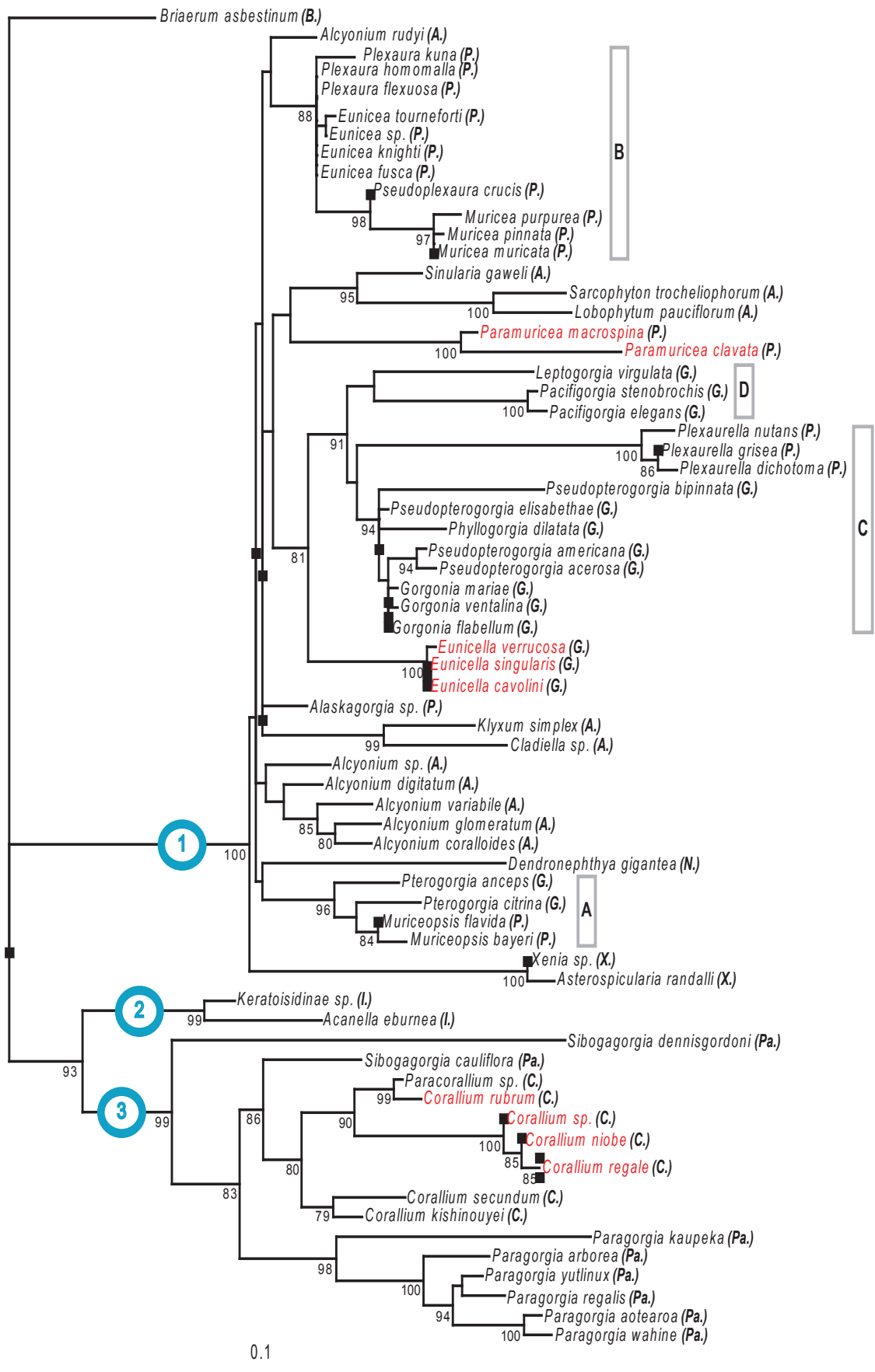
Support phylogénétique des genres

Le genre *Sibogorgia* est paraphylétique alors que *Muricea*, *Paramuricea*, *Pacifigorgia*, *Plexaurella*, *Eunicella*, *Muriceopsis* et *Paragorgia* sont monophylétiques. L'information disponible ne nous permet pas de commenter la monophylie des genres *Pterogorgia*, *Plexaura*, *Eunicea*, *Pseudopterogorgia*, *Gorgonia* et *Alcyonium*. Concernant plus particulièrement les trois genres ciblés dans cette étude, la monophylie des 2 genres *Paramuricea* et *Eunicella* est soutenue avec des valeurs de bootstrap égales à 100. La position du genre *Paramuricea* au sein du clade 1 est irrésolue alors que celle du genre *Eunicella* est bien définie. Il appartient à un clade supporté par une valeur de bootstrap de 81 et regroupant 6 autres genres : *Pacifigorgia*, *Leptogorgia*, *Plexaurella*, *Pseudopterogorgia*, *Phyllogorgia*, *Gorgonia*. Le clade *Eunicella* apparaît comme groupe frère du clade regroupant les six genres précédemment décrits.

Le résultat le plus marquant porte sur le positionnement des sept espèces du genre *Corallium*. En effet, le genre *Corallium* est paraphylétique puisqu'un clade regroupant les sept espèces de *Corallium* analysées et le seul représentant du genre *Paracorallium* est mis en

évidence tout en étant soutenu (valeur de bootstrap = 80). Au sein de ce clade, *Corallium regale* (*C. lauunse*) forme un clade avec *Corallium niobe* (valeur de bootstrap = 85). Ces 2 espèces forment elles-mêmes un clade avec *Corallium sp.* (valeur de bootstrap = 100). Ce clade est groupe frère (valeur de bootstrap = 90) d'un clade formé par *Corallium rubrum* et *Paracorallium sp.*. Pour finir, ces 5 espèces décrites comme appartenant à deux genres différents forment elles-mêmes un clade frère du clade regroupant *Corallium secundum* et *Corallium kishinouyei* (valeur de bootstrap = 79). Ces résultats remettent donc en cause la validité du genre *Paracorallium*.

Figure 2-4: Phylogramme des relations entre 68 espèces d'octocoralliaires inférées à partir d'une analyse en maximum de vraisemblance (-lnL = 5148.72) des séquences mitochondriales *ND2* et *ND6* concaténées. Les chiffres dans les cercles correspondent aux trois clades majeurs (1 = *Holaxonia-Alcyoniina* ; 2 = *Calcaxonia-Pennatulacea* et 3 = *Anthomastus-Corallium*). Les valeurs de bootstrap (N= 1000) sont données en pourcentage. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 70 sont indiquées. Les 9 espèces ajoutées aux séquences disponibles dans les banques sont indiquées en rouge. Chaque nom d'espèce est suivi par l'abréviation de sa famille d'appartenance telle que décrit dans la phylogénie actuelle (Williams & Cairns 2009) de ce groupe (A. : Alcyoniidae ; B. : Briareidae ; C. : Coralliidae ; G. : Gorgoniidae ; I. : Isididae ; N. : Nephtidae ; P. : Plexauridae ; Pa. : Paragorgiidae ; X. : Xenidae). Les lettres insérées dans les cadres gris renvoient au paragraphe de la discussion concernant la monophylie des familles.



4) Discussion

La phylogénie présentée dans cette étude est concordante sur plusieurs points avec les travaux précédents et ce, malgré l'utilisation de locus (*ND2-ND6*) et d'un échantillonnage différents. Elle confirme la division de l'ordre des Octocorallia en trois clades majeurs. Ces trois clades majeurs correspondent à ceux définis par McFadden *et al.* (2006) (1 = *Holaxonia-Alcyoniina* ; 2 = *Calcaxonia-Pennatulacea* et 3 = *Anthomastus-Corallium*) et sont aussi bien, voire plus fortement, soutenus.

4-1) Support phylogénétique des sous-ordres

Au niveau sub-ordinal, quatre clades ont été échantillonnés. Les données obtenues ne permettent pas de commenter la monophylie de deux de ces sous-ordres : *Holaxonia* et *Alcyoniina*. La monophylie du sous-ordre des *Holaxonia* est discutée dans la littérature. Les données moléculaires n'ont en effet pas permis de rejeter avec certitude cette monophylie (McFadden *et al.* 2006). Parallèlement, des critères morphologiques (i.e. axe squelettique creux formé de chambres cloisonnées contenant une grande quantité de gorgonine (protéine) et peu ou pas de carbonate de calcium) soutiennent cette monophylie (Bayer 1961 ; Williams & Cairn 2009). D'autres données de séquences sont donc nécessaires pour tester cette hypothèse plus en profondeur. Le sous-ordre des *Alcyoniina* est, quant à lui, paraphylétique dans les différentes phylogénies moléculaires publiées (Berntson *et al.* 2001 ; McFadden *et al.* 2006). La discordance entre nos résultats et les précédentes publications s'explique probablement par une résolution plus faible de nos marqueurs mais surtout par l'absence de certains genres dans notre jeu de données qui s'insèrent au sein du clade 3 dans les phylogénies précédentes (*Anthomastus* ; *Paraminabea* ; *Notodysiferus*). La monophylie du sous-ordre des *Calcaxonia* rapportée ici est concordante avec les études précédentes aux niveaux moléculaires (McFadden *et al.* 2006) et morphologiques (i.e. axe squelettique plein formé d'un noyau de gorgonine et d'une grande quantité de carbonate de calcium) (Williams & Cairn 2009). Enfin la monophylie apparente des *Scleraxonia* n'est pas soutenue par l'analyse de Mc Fadden *et al.* (2006). Il semble là encore probable que l'échantillonnage plus restreint de notre étude explique cette discordance. En effet les genres *Iciligorgia* ou *Anthothela* qui s'insèrent dans le clade *Holaxonia-Alcyoniina* chez McFadden *et al.* (2006) sont absents du jeu de données que nous avons utilisé.

4-2) Monophylie des familles

Neuf familles différentes ont été analysées. Cependant, deux d'entre elles (*Briariidae* ; *Nephteidae*) ne sont représentées que par une seule espèce. Parmi les sept familles restantes, nous confirmons les résultats précédemment obtenus sur la paraphylie des familles *Gorgoniidae* et *Plexauriidae*. Bien que sa position ne soit pas soutenue, le genre *Muriceopsis* (*Plexauriidae*) forme un clade (A) avec les *Pterogorgia spp.* (*Gorgoniidae*).

Plexaura spp., *Eunicea* spp., *Pseudoplexaura crucis*, et *Muricea* spp. (clade B) appartiennent toutes aux *Plexauriidae*. Le genre *Plexaurella* (*Plexauriidae*) forme un clade (valeur de bootstrap = 60) avec *Pseudopterogorgia* spp., *Phyllogorgia dilatata* et *Gorgonia* spp. (C) trois genres traditionnellement classés chez les *Gorgoniidae*. Ce rapprochement entre *Plexaurella* spp. et *Gorgoniidae* avait été proposé par Gerhart (1983) qui se basait alors sur l'occurrence de terpénoïdes dans les deux groupes. *Pacifigorgia* spp. et *Leptogorgia virgulata* (*Gorgoniidae*) sont en position de groupe frère (D) des deux clades précédents. Enfin un dernier clade dont la position n'est cependant pas résolue est formé par les *Paramuricea* spp. (*Plexauridae*). Ces résultats sont globalement congruents avec deux phylogénies centrées exclusivement sur ces deux familles de gorgonaires (*msh1* ND2 Wirshing *et al.* 2005 ; *msh1* ND2 ND6 Sanchez *et al.* 2003b). En complément, nous avons inclus, pour la première fois, 3 espèces du genre *Eunicella* (*Eunicella singularis*, *Eunicella verrucosa* et *Eunicella cavolini*). Ce genre appartenant traditionnellement à la famille des *Gorgoniidae*, se retrouve en position de groupe frère des clades C et D complétant ainsi les conclusions des études précédentes sur le nombre de clades distincts à l'intérieur de ces deux « familles » et sur la nécessité de reconsidérer la taxonomie à ce niveau.

Il n'est pas possible de statuer sur la monophylie de la famille des *Alcyoniidae*. Les différents représentants de cette famille sont en effet dispersés à l'intérieur du clade des *Holaxonia-Alcyoniina* sans que leur position soit soutenue dans la plupart des cas. Ceci peut éventuellement s'expliquer par un manque d'information des locus utilisés. En effet, le locus *msh1* utilisé par McFadden *et al.* (2006) possède le taux de variabilité le plus important au niveau mitochondrial (e.g. France & Hoover 2001 mais voir Van Der Ham *et al.* 2009) et a permis de démontrer la paraphylie de cette famille. A priori aucune analyse n'a été conduite sur cette famille en particulier. Les familles *Xeniidae*, et *Isididae* apparaissent quant à elles comme des groupes monophylétiques. Dans le cas des *Xeniidae*, nos résultats contrastent avec ceux publiés par McFadden *et al.* (2006) qui démontraient que les *Xeniidae* étaient un groupe polyphylétique. Cette incongruence est probablement le résultat de notre échantillonnage. Nous n'avons, en effet, pas inclus les séquences de *Anthelia* sp., l'espèce qui conduisait les auteurs à conclure à la polyphylie de la famille. Dans le cas des *Isididae*, comme précédemment pour McFadden *et al.* (2006), notre échantillonnage ne couvre qu'une des quatre (*Keratoisiniidae*) sous-familles, ce qui conduit à considérer ces résultats avec précaution. Un effort d'échantillonnage supplémentaire est donc indispensable pour pouvoir se prononcer sur le statut de cette famille. Enfin nous confirmons la monophylie du clade *Coralliidae* et la paraphylie des *Paragorgiidae* au sein du clade *Anthomastus-Corallium*. Les résultats concernant ces deux familles complètent la phylogénie de McFadden *et al.* (2006). Ils concordent avec ceux de Herrera *et al.* (2010) basés sur les marqueurs mitochondriaux *msh1*, *ND2*, *16S* et focalisés uniquement sur ces deux familles d'organismes qui vivent principalement à grande profondeur. Le rapprochement entre *Coralliidae* et *Paragorgiidae* a été précédemment démontré grâce à l'*ARNr 18S*

(Berntson *et al.* 2001) et en utilisant des critères morphologiques (i.e. forme des sclérites) (Sanchez 2005). Notre étude permet de replacer ces différents clades au sein de la phylogénie mitochondriale des Octocoralliaires.

4-3) Support phylogénétique des genres

Bien que la résolution des marqueurs mitochondriaux soit variable d'un genre à l'autre chez les octocoralliaires et que certains genres ne soient représentés que par deux espèces dans notre étude, nous avons pu confirmer, parmi les 15 genres étudiés, la paraphylie du genre *Sibogorgia* et remettre en cause l'existence du genre *Paracorallium* (N.B. 16 genres supplémentaires ne sont représentés que par une espèce). En ce qui concerne le « genre » *Sibogorgia*, Herrera *et al.* (2010) rapportent cette paraphylie à partir de leurs données moléculaires mais concluent, qu'étant donné le faible échantillonnage de ce genre et l'existence de caractères morphologiques communs (e.g. présence de canaux dans l'axe squelettique, forme des sclérites), un échantillonnage plus important est nécessaire pour statuer définitivement sur ce genre. Considérant le fort soutien observé pour les nœuds en question dans notre phylogénie (e.g. 99, 83 et 86) ainsi que la distance mesurée entre *Sibogorgia dennisgordoni* et *Sibogorgia cauliflora*, ce genre semble bien être paraphylétique. Le genre *Paracorallium* a, quant à lui, été proposé récemment sur la base de critères morphologiques (i.e. creux longitudinaux entouré de bords perlés sur le squelette Bayer & Cairns 2003). Bayer & Cairns (2003) suggèrent de placer sept espèces appartenant traditionnellement au genre *Corallium* au sein de ce nouveau genre. Son existence a été remise en question au niveau moléculaire (Herrera *et al.* 2010). L'utilisation d'un grand nombre d'espèces (4 pour Herrera *et al.* 2010 vs. 7 dans le cas présent) confirme ce résultat et nous permet d'affiner la phylogénie du genre *Corallium* en suggérant notamment l'existence de trois groupes principaux (*C. secundum* / *C. kishinouyei* vs. *C. sp.* / *C. niobe* / *C. regale* vs. *C. rubrum* / *Paracorallium sp.*). Parmi les treize genres restants, sept sont monophylétiques (*Muricea*, *Paramuricea*, *Pacifigorgia*, *Plexaurella*, *Eunicella*, *Muriceopsis* et *Paragorgia*). Ces résultats confirment dans le cas de *Pacifigorgia*, *Muriceopsis* (Sanchez *et al.* 2003 voir aussi Aguilar & Sanchez 2007), *Plexaurella* (Wirshing *et al.* 2005) et *Paragorgia* (Herrera *et al.* 2010) ou étendent des résultats déjà publiés (*Muricea* ; Sanchez *et al.* 2003). Enfin, ils sont originaux dans le cas de *Paramuricea* et d'*Eunicella*. Nos résultats ne nous permettent pas de nous prononcer sur la monophylie de six genres (*Pterogorgia*, *Plexaura*, *Eunicea*, *Pseudopterogorgia*, *Gorgonia* et *Alcyonium*). Différentes phylogénies moléculaires ont montré qu'ils étaient paraphylétiques (*Pseudopterogorgia*, *Gorgonia* Sanchez *et al.* 2003 ; *Alcyonium* McFadden *et al.* 2001, 2004 ; *Eunicea* Sanchez *et al.* 2003, Wirshing *et al.* 2005 et *Plexaura* Sanchez *et al.* 2003) ou monophylétiques (*Pterogorgia* ; Sanchez *et al.* 2003, Wirshing *et al.* 2005). Ces différences s'expliquent encore une fois très probablement par une plus faible résolution des deux marqueurs utilisés en comparaison du locus *msh1* intégré dans la plupart des études citées.

4-4) Conclusion

Cette nouvelle phylogénie conforte donc les résultats acquis sur d'autres marqueurs moléculaires (*18S* Berntson *et al.* 1999, 2001 ; *18S-16S* Sanchez *et al.* 2003 ; *ND2-msh1* McFadden *et al.* 2006). L'*ARNr 18S* et l'ADN mitochondrial n'ont pas permis de résoudre les relations profondes à l'intérieur de la phylogénie des octocoralliaires et, à l'opposé sur l'échelle taxonomique, manquaient de résolution pour aborder le niveau péri-spécifique (voir partie II). L'absence de support pour les nœuds les plus profonds de ces phylogénies a conduit McFadden *et al.* (2006) à proposer une radiation rapide des octocoralliaires. Le manque de résolution au niveau péri-spécifique a, quant à lui, démontré le faible niveau de variabilité du génome mitochondrial des octocoralliaires : certaines espèces d'un même genre ayant des séquences mitochondriales totalement identiques (voir partie II). Nous complétons cependant ces données grâce à l'ajout du genre *Eunicella* et à l'échantillonnage plus important des *Corallidae* et *Paragorgidae* renforçant par la même les conclusions quant au caractère paraphylétique du genre *Sibogorgia* et à la validité du genre *Paracorallium*. L'ensemble de ces résultats plaide donc en faveur d'une reconsidération de la taxonomie des Octocoralliaires notamment au niveau supra-genre (Berntson *et al.* 2001 ; McFadden *et al.* 2006). Ils soulignent le fait que, malgré tout, certains caractères morphologiques, comme par exemple la forme des sclérites et le mode de formation de l'axe, peuvent être informatifs pour distinguer les taxons au niveau du genre, voire de la famille (e.g. *Holaxonia* et *Calcaxonia*). Ainsi les phylogénies moléculaires pourraient être utilisées pour chercher et définir de nouveaux caractères morphologiques informatifs. La confrontation de nos résultats avec les phylogénies moléculaires antérieures illustre parallèlement l'impact de l'échantillonnage tant au niveau taxonomique (i.e. représentation des taxons) que moléculaire (i.e. couverture des génomes) sur les reconstructions phylogénétiques. Cette dernière remarque, bien qu'évidente, est particulièrement valable dans le cas des octocoralliaires. En effet, ce taxon à très large répartition regroupe des espèces clés dans de nombreuses communautés marines des récifs coralliens tropicaux (Sanchez *et al.* 1997) aux milieux profonds (Watling & Auster 2005). Obtenir un échantillonnage exhaustif notamment pour ces espèces profondes demandera encore de gros efforts logistiques et donc financiers (voir par exemple la campagne de caractérisation des marges océaniques en Europe HERMES) illustrant ainsi l'un des paradoxes dans la crise actuelle de la biodiversité. La phylogénie de ce groupe est en effet loin d'être résolue (découverte d'un nouveau genre *Acanthoaxis*, Van Ofwegen & McFadden 2010), de nouvelles espèces sont constamment décrites (sept occurrences selon ISIWEB OF KNOWLEDGE pour 2010 pour les mots « *new species* » et « *octocorallia* ») et certaines espèces disparaîtront probablement avant même d'avoir pu être observées. En complément de cet effort de terrain et considérant le faible polymorphisme observé au niveau mitochondrial et l'évolution particulière des *ITS* chez ces espèces, la résolution de cette phylogénie passera nécessairement par une approche phylogénomique (e.g. Marletaz *et al.* 2006) permettant d'accroître le niveau de couverture des génomes analysés et donc la

quantité d'informations disponibles.

II - Barcoding chez les octocoralliaires : apport des marqueurs mitochondriaux ND2 et ND6

1) Introduction

L'idée de lier identification taxonomique et outils moléculaires a vu le jour dès le début des années 1980 (Kangethe *et al.* 1982). Désignée sous le terme de *barcoding*, cette approche a connu un regain d'intérêt au début des années 2000 (Hebert *et al.* 2003a, b) comme l'illustre le « Consortium for Barcode of Life » (CBOL <http://barcoding.si.edu>) créée en 2004. Ce renouveau s'explique notamment par l'accessibilité toujours plus grande des méthodes de séquençages. Le *barcoding* désigne donc l'ensemble des méthodes d'identification taxonomique rapides d'espèces à partir de leur séquence ADN à un locus précis. Au delà de ses deux applications originelles (i.e. assignation d'un spécimen à une espèce connue et définition d'espèces nouvelles ; Hebert *et al.* 2003a), le *barcoding* a permis la mise en évidence d'espèces cryptiques (e.g. Smith *et al.* 2006), invasives (e.g. Siddall & Budinoff 2005) mais aussi l'évaluation des niveaux de biodiversité à partir d'échantillons environnementaux (e.g. Rusch *et al.* 2007) ou encore l'amélioration des connaissances des régimes alimentaires animaux (e.g. Valentini *et al.* 2008). Son champ d'application s'est donc élargi à mesure de son développement avec, par exemple, des utilisations pour les analyses légales (e.g. Dawnay *et al.* 2007).

Chez les métazoaires, 658 pb du gène de la cytochrome oxydase 1 (*COI*) ont été proposées comme code barre universel (Hebert *et al.* 2003a). L'utilisation de ce marqueur repose sur l'existence d'un écart ou gap (i.e. « *barcoding gap* ») entre le niveau de variation intra-spécifique (généralement inférieur à 1% Avise 2000) et le niveau de divergence inter-spécifique (généralement supérieur à 2% Hebert *et al.* 2003b). Ce gap est donc théoriquement suffisamment marqué pour permettre de définir une valeur seuil d'appartenance taxonomique (i.e. même espèce vs. espèces différentes mais voir Austerlitz *et al.* 2009) et permettre ainsi l'identification d'espèces nouvelles (Meyer & Paulay 2005). La variabilité du mode d'évolution de la *COI* à l'échelle des eucaryotes fait que ce seuil n'est pas toujours clairement défini (Hebert *et al.* 2003a). Il en résulte donc une variation de notre capacité à délimiter et identifier les espèces en fonction des taxons considérés (Meyer & Paulay 2005). C'est le cas chez les plantes, ce qui a conduit au développement de stratégies différentes basées sur l'utilisation de l'ADN chloroplastique ou sur la combinaison de plusieurs régions génomiques (e.g. Kress *et al.* 2005 ; Lahaye *et al.* 2008). Cela se vérifie aussi chez de nombreux cnidaires (Hebert *et al.* 2003a) et notamment chez les octocoralliaires (Van der Ham *et al.* 2009). En effet le génome mitochondrial de ces organismes possède un taux d'évolution très faible qui rend la *COI* peu informative (France *et al.* 1996 ; France & Hoover 2002) allant jusqu'à des taux de divergences nuls entre espèces congénériques (e.g. McFadden *et al.* 2004 ; Calderón *et al.* 2006). De

par l'existence de ces exceptions et des techniques qui en ont découlé, Valentini *et al.* (2008) différencient le *barcoding stricto sensu* reposant sur l'utilisation standardisée d'un unique marqueur moléculaire (i.e. *COI*) et permettant une identification au niveau spécifique, du *barcoding lato sensu* qui regroupe l'ensemble des techniques d'identification de n'importe quel niveau taxonomique à partir de n'importe quelle séquence d'ADN. Le but de cette seconde partie est d'évaluer l'intérêt des deux marqueurs mitochondriaux utilisés dans la partie I, à savoir *ND2-ND6*, en tant que code barre. Ces deux marqueurs présentent en effet des niveaux de variabilité plus importants que la *COI* chez les octocoralliaires (McFadden *et al.* 2004) et nous ont permis de reconstruire une phylogénie relativement robuste sur plusieurs niveaux taxonomiques.

Le développement d'un système d'identification simple des espèces d'octocoralliaires est important pour plusieurs raisons. D'une part, comme expliqué dans la partie précédente, la difficulté de définir des critères morphologiques informatifs et l'existence d'une grande plasticité phénotypique (e.g. forme des colonies) compliquent la tâche des taxonomistes. D'autre part, cette méthode permet en théorie une identification à n'importe quel stade du cycle de vie de l'organisme considéré, ce qui peut être particulièrement utile dans le cas des octocoralliaires qui possèdent une phase larvaire. Enfin, plusieurs espèces sont pêchées pour être commercialisées. Cette pêche étant réglementée (e.g. par la Direction Régionale des Affaires Maritime pour le corail rouge en France), les restrictions qui en découlent ont fait naître un marché noir important (Bruckner 2009). L'utilisation du barcoding dans ce cadre est donc évidente. Cependant son efficacité n'a jamais été formellement évaluée. Les résultats de la partie précédente et des études déjà publiées sur les octocoralliaires (e.g. McFadden *et al.* 2004, van der Ham *et al.* 2009) nous permettent de supposer un faible niveau de variabilité intra-spécifique, combiné, dans certains genres, à une divergence inter-spécifique nulle. Ce dernier résultat souligne la nécessité d'une estimation au cas par cas des taux de divergences. Nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur l'évaluation du niveau de diversité mitochondriale intra-spécifique au sein des trois genres *Paramuricea*, *Corallium* et *Eunicella*. Puis nous avons cherché à évaluer l'apport de *ND2-ND6* au barcoding des octocoralliaires. Pour cela nous avons estimé les taux de divergences à différents niveaux taxonomiques afin de déterminer les gammes de variations en présence et de définir le cas échéant des valeurs seuils pertinentes pour ces organismes.

2) Matériel et méthodes

2-1) Variation intra-spécifique

La provenance des échantillons et les méthodes d'extractions d'ADN sont présentées dans la partie I de ce chapitre et en annexe 1. Nous avons, dans un premier temps, cherché à estimer la diversité intra-spécifique de plusieurs espèces au sein des genres *Coral-*

lium, *Eunicella* et *Paramuricea* et ce, à différents locus mitochondriaux. Afin d'avoir la couverture la plus large possible du génome mitochondrial, nous avons ainsi amplifié et séquencé deux marqueurs mitochondriaux supplémentaires (Fig. 2-5) chez plusieurs individus de différentes espèces (Tableau 2-2): 1) l'extrémité 5' du gène *msh1*; 2) une portion du gène de la *COI*. La paire d'amorces pour le premier locus a été dessinée par McFadden *et al.* 2004; celle pour la *COI* par Calderón *et al.* 2006 (Annexe 2). Mis à part les températures d'hybridation ($T_a = 60$ °C pour les deux marqueurs), les conditions de PCR ainsi que les méthodes de séquençage sont identiques à celles de la partie précédente. Les séquences nucléotidiques de chacun des marqueurs ont été traduites en acides aminés (aa) et alignées séparément avec CLUSTALW implémenté dans le logiciel BIOEDIT 7.0.5.3 (Hall 1999) puis ajustées à l'œil.

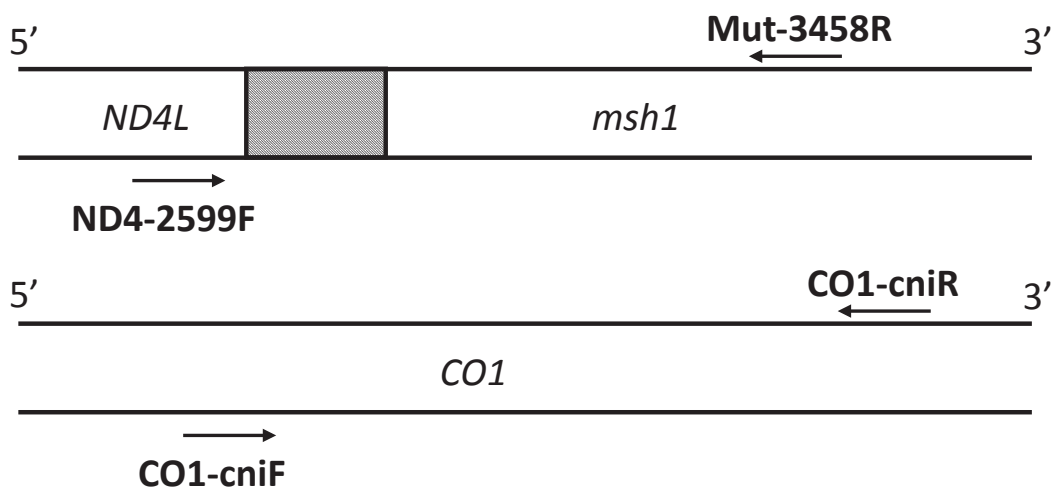


Figure 2-5: Représentation schématique de la position des amorces utilisées pour l'amplification des deux locus *msh1* et *COI* utilisés dans cette étude. La région en noir correspond à un espaceur intergénique non-codants (IGR).

2-2) Divergence inter-spécifique et barcoding

La distance génétique entre taxons à différents niveaux de l'échelle taxonomique a été évaluée grâce à la *p-distance* qui mesure la proportion de sites nucléotidiques qui diffèrent entre les deux séquences comparées (Nei & Kumar 2000). Nous nous sommes basés sur la phylogénie présentée au chapitre précédent ainsi que sur les résultats publiés (McFadden *et al.* 2006) pour définir les genres et clades majeurs. Les mesures de distances ont été réalisées à partir de la séquence *ND2-ND6* concaténée sur les 67 espèces (cf. Tableau 2-1). Nous avons calculé la valeur moyenne de la *p-distance* et son écart-type (1000 bootstrap) sur l'ensemble du jeu de données. Les comparaisons par paires ont ensuite été menées entre espèces avec une attention particulière sur les trois genres *Paramuricea*, *Eunicella* et *Corallium* (*Corallium* spp. + *Paracorallium* sp.). Ces traitements par paires d'espèces ont été affinés en calculant, dans un premier temps, les valeurs entre

espèces congénériques et entre espèces appartenant à des genres différents. Seuls les neuf genres monophylétiques possédant au moins deux représentants (*Eunicella*, *Muriceopsis*, *Muricea*, *Pacifigorgia*, *Plexaurella*, *Pterogorgia*, *Paramuricea*, *Paragorgia* et clade *Corallium spp.* / *Paracorallium sp.* cf. discussion partie I) ont été considérés. Dans un second temps, nous avons comparé les distances entre espèces de ces genres monophylétiques avec celles entre espèces appartenant aux six genres dont le soutien a été remis en cause par la phylogénie moléculaire. Nous avons effectué des comparaisons entre ces espèces en tenant compte de leur appartenance aux 3 grands clades majeurs identifiés (*Holaxonia-Alcyoniina* ; *Calcaxonia-Pennatulacea* et *Anthomastus-Corallium* cf. partie I). Pour finir, les distances entre paires d'espèces pour chacun de ces 3 clades majeurs et entre chacun des 3 clades ont été calculées. L'ensemble de ces calculs a été réalisé grâce au logiciel MEGA v.3.1 (Kumar *et al.* 2004). Un test de Kruskal-Wallis (H_0 = moyennes des rangs identiques entre les deux échantillons) a été mené pour comparer les distances entre espèces appartenant aux genres monophylétiques et espèces appartenant aux six genres paraphylétiques ainsi que pour comparer les distances entre espèces appartenant au même clade majeur et espèces appartenant à deux clades majeurs différents.

Tableau 2-2: Echantillonnage utilisé pour tester la variabilité intra-spécifique sur 4 marqueurs mitochondriaux chez sept espèces de gorgonaires provenant de 3 genres différents appartenant eux-mêmes aux clades des *Holaxonia-Alcyoniina* et des *Anthomastus-Corallium*. Pour chaque espèce et chaque marqueur, le nombre de populations et les distances géographiques entre ces populations sont donnés.

	COI	provenance	<i>msh1</i>	provenance	ND2	provenance	ND6	provenance
<i>Corallium niobe</i>					2	2 populations (km)	2	2 populations (km)
<i>Corallium regale</i>	2	2 populations (10 km)			3	3 populations (10 km)	3	3 populations (10 km)
<i>Corallium rubrum</i>	18	12 populations (1000 km)	9	9 populations (1000 km)	3	3 populations (1000 km)	3	3 populations (1000 km)
<i>Eunicella cavolini</i>	6	5 populations (100 km)	5	5 populations (100 km)	2	1 population	1	1 population
<i>Eunicella singularis</i>	6	4 populations (100 km)	3	3 populations (100 km)				
<i>Paramuricea clavata</i>	3	2 populations (100 km)						
<i>Paramuricea macrospina</i>					2	1 population	2	1 population

3) Résultats

3-1) Variation intra-spécifique

La taille du locus *COI* est assez homogène aux alentours de 560 pb pour les 5 espèces nouvellement amplifiées. Les séquences du locus *msh1* ont été obtenues chez *Corallium rubrum* (810 pb) et pour *Eunicella singularis* et *Eunicella cavolini* (790 pb). La différence de taille s'explique principalement par deux insertions dans la séquence du gène *msh1* chez le corail rouge. Aucune variation n'est observée pour différents individus appartenant à une même espèce. Cette absence de polymorphisme va même jusqu'à l'obtention de séquences totalement identiques entre individus appartenant à différentes espèces ayant, par exemple, des aires de répartition contrastées (*Eunicella singularis* / *Eunicella cavolini*).

3-2) Divergence inter-spécifique et code barre ND2-ND6

Bien que la phylogénie des genres *Paramuricea*, *Eunicella* et *Corallium* ait été présentée dans le chapitre précédent, nous reprenons ici ces résultats en les commentant du point de vue des distances génétiques. Le polymorphisme observé au sein de ces trois genres sur ND2-ND6 et donc les distances mesurées sont globalement faibles. Aucune différence n'est observée entre *Eunicella singularis* et *Eunicella cavolini* alors qu'*Eunicella verrucosa* diverge de 0.1 % des deux autres espèces, ce qui correspond à 1 position différente sur les 813 pb. Au sein du genre *Paramuricea*, on observe 2,3 % de divergence entre les deux espèces correspondant à 19 positions différentes sur les 813 pb analysées. Enfin au sein du genre *Corallium* le taux de divergence moyen est de 2,3 %. La séquence de *Corallium regale* (*C. lauunse*) se différencie par 2 mutations de celle de *Corallium niobe* (0,2 %). La séquence de *Corallium sp.* présente 4 (0,5 %) et 2 (0,2 %) mutations avec le clade *Corallium regale* et *Corallium niobe*. *Corallium rubrum* et *Paracorallium sp.* sont différenciées l'un par rapport à l'autre par 4 mutations (0,5 %). Pour finir, *Corallium secundum* et *Corallium kishinouyei* qui forment un clade distinct ont des séquences séparées par 11 mutations (1,3 %).

La *p-distance* globale moyenne pour le marqueur ND2-ND6 est de 5,7 +/- 0,4 % avec des valeurs de divergence entre espèces allant de 0 à 12,6 %. Concernant les 9 genres dont l'existence est soutenue, les valeurs de divergences entre espèces à l'intérieur de ces genres varient de 0 à 5,5 % (valeur moyenne : 2 +/- 1,5 %), alors qu'elles varient de 1,1 à 12,5 % (valeur moyenne : 7,4 +/- 2,3 %) lorsque les comparaisons sont effectuées entre espèces de genres différents (Fig. 2-6). La valeur moyenne de divergence pour ces 9 genres s'échelonne de 0,1 +/- 0,1 % pour le genre *Eunicella* à 2,7 +/- 0,3 % pour le genre *Paragorgia* (valeur moyenne : 1,1 +/- 1 %) alors que dans le cas des 6 « genres » paraphylétiques, elle varie entre 0,2 +/- 0,1 % pour *Eunicea* et 6,4 +/- 0,8 % pour *Sibogorgia* (valeur moyenne : 1,7 +/- 2,4 %) (Fig. 2-7). Le test de Kruskal-Wallis n'a pas permis de rejeter l'hypothèse nulle ($H(1; 15) = 0,06$; $p = 0,82$).

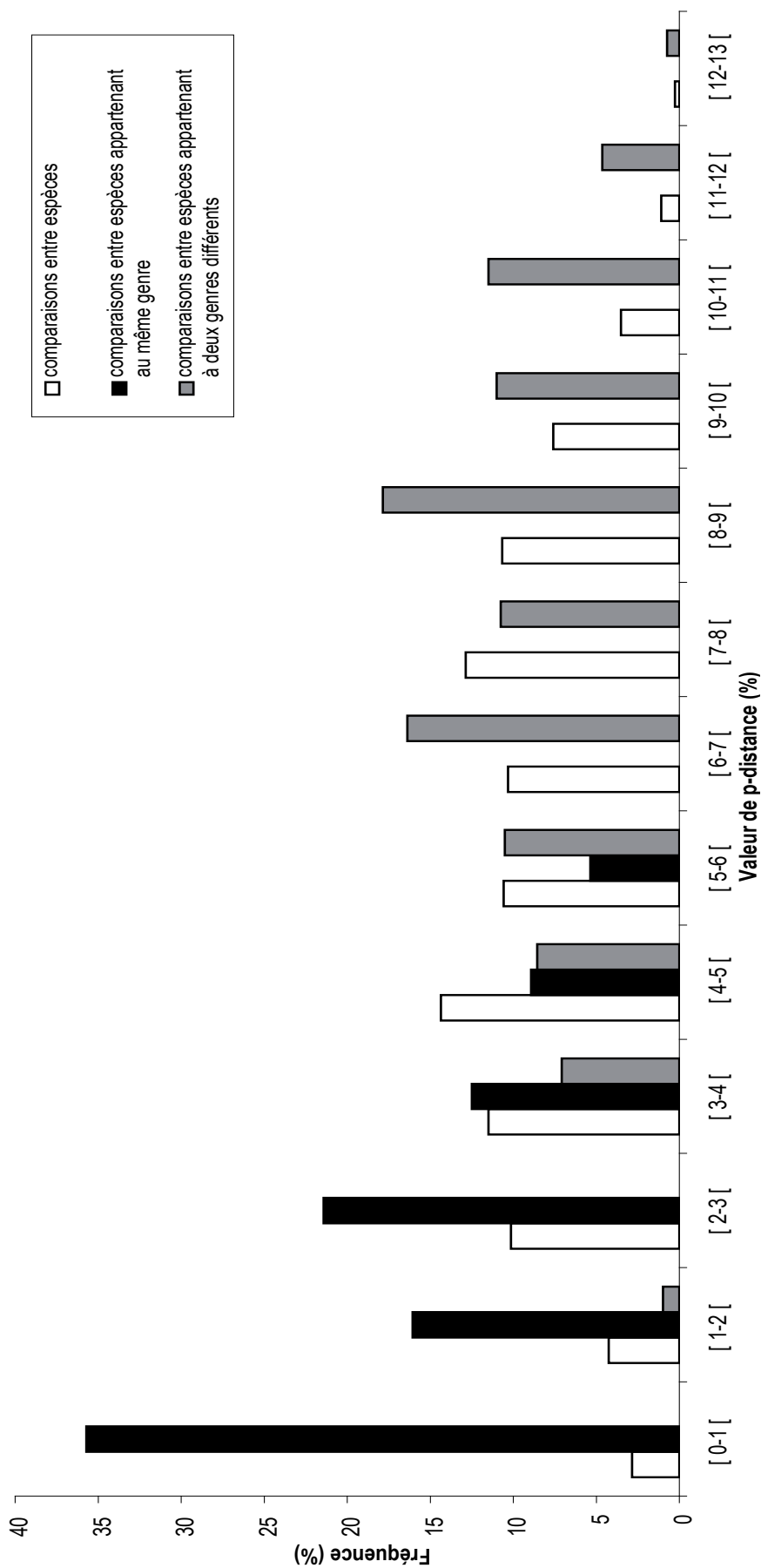


Figure 2-6: Distribution des *p-distances* obtenues lors des comparaisons entre espèces. Les comparaisons entre espèces appartenant au même genre ou à deux genres différents ne prennent en compte que les 8 genres phylogénétiquement soutenus et le clade *Corallium* (i.e. *Corallium spp.* + *Paracorallium sp.*).

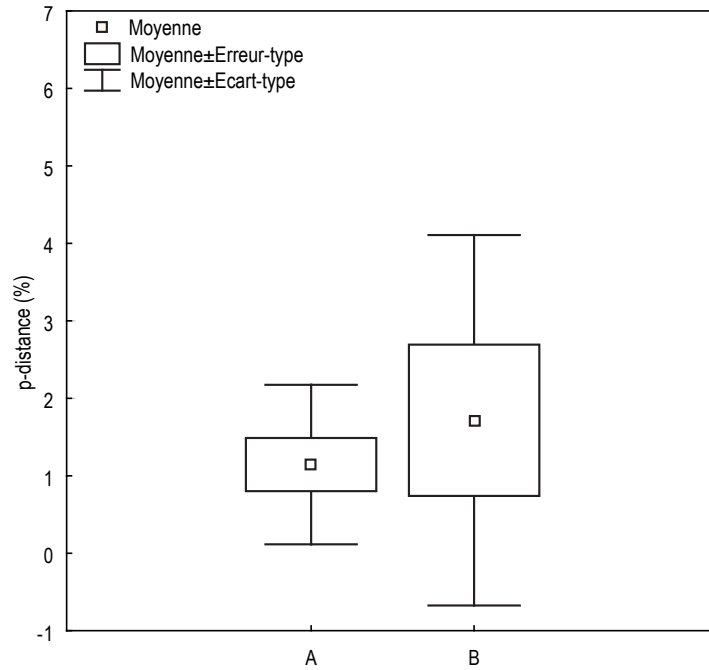


Figure 2-7: Valeur moyennes des *p-distances* observées entre les neuf genres monophylétiques (A) et les six « genres » paraphylétiques (B) d'après la phylogénie de la partie I (test de Kruskal-Wallis : ddl = 1 ; H = 0.06 ; P = 0.82).

Les divergences entre espèces appartenant au même clade majeur varient quant à elles de 0 à 8,9 % (moyenne : 4 +/- 1,7 %). Lorsque l'on compare des espèces appartenant à des clades différents, ces valeurs augmentent, allant de 4,1 à 11,6 % (moyenne : 8,2 +/- 1,5 %) (Fig. 2-8). Le test de Kruskal-Wallis est significatif (H (1 ; 2211) = 1423,3 ; $p < 0,01$). Au niveau des clades, les pourcentages de divergence entre espèces sont de 1,7 +/- 0,4 % pour le clade 2, 3,7 +/- 0,3 % pour le clade 1 et 5,5 +/- 0,4 % pour le clade 3. Les comparaisons entre clades montrent des valeurs plus élevées (clade 1 vs. clade 2 : 6,9 +/- 0,7 % ; clade 1 vs. clade 3 : 8,1 +/- 0,6 % et clade 2 vs. clade 3 : 6,9 +/- 0,6 %).

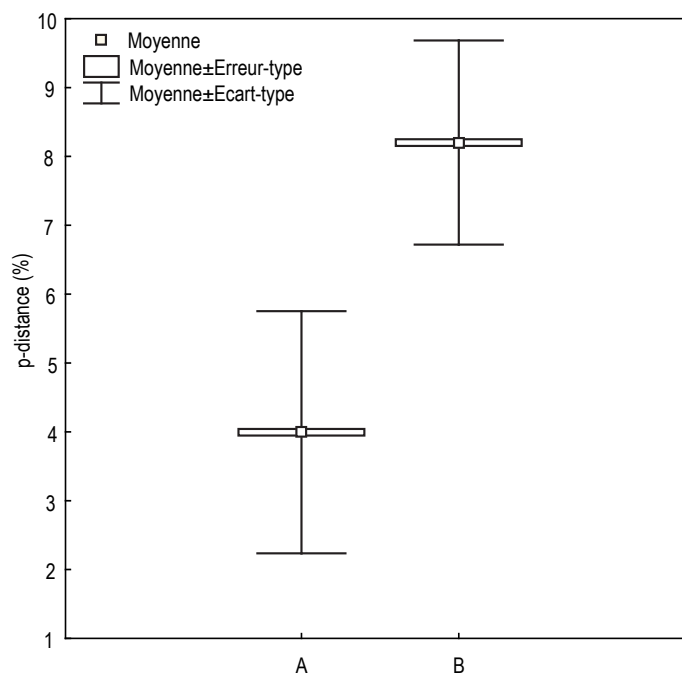


Figure 2-8: Valeur moyennes des p-distances observées entre les espèces appartenant (A) ou non (B) au même clade majeur (test de Kruskal-Wallis : ddl = 1 ; H = 1423.3 ; $P < 0.01$).

4) Discussion

4-1) Evaluation du code barre ND2-ND6

L'objectif de notre étude est d'évaluer le code barre *ND2-ND6* chez les octocoralliaires. Cinq critères permettent de juger de l'efficacité d'un système de *barcoding* (Valentini *et al.* 2008) : La longueur du fragment amplifiée doit être courte afin de permettre l'amplification à partir d'ADN dégradé (critère 1). Les sites d'hybridation des amorces doivent être hautement conservés pour permettre une amplification et un séquençage fiable de n'importe quel spécimen du taxon considéré (critère 2). Ce code barre doit donc être standardisé c'est à dire que le locus amplifié doit être le même pour l'ensemble des taxons analysés (critère 3). Cette région doit contenir assez d'information phylogénétique pour permettre à la fois l'assignation de spécimens inconnus et la définition de nouveaux taxons (critère 4). Le dernier critère repose sur l'existence d'un barcoding gap correspondant à une rupture dans la distribution des distances génétiques de niveaux taxonomiques successifs (e.g. intra vs. interspécifique). L'existence de ce gap doit permettre en théorie de définir une valeur de distance seuil en fonction de laquelle les séquences comparées appartiennent ou non à la même espèce (Hebert *et al.* 2003a). En d'autres termes, la région séquencée doit être quasiment identique entre individus d'une même espèce et différente entre espèces (critère 5).

4-2) Longueur du fragment, standardisation et information phylogénétique du code barre

L'importance relative de ces critères est ajustée en fonction de la question abordée et donc de la nature du *barcoding* (*stricto sensu* ou *lato sensu*). Il est donc nécessaire d'évaluer la validité de chacun de ces critères dans un cadre réaliste, c'est à dire tenant compte à la fois des buts de notre étude mais aussi des connaissances actuelles concernant la phylogénie des Octocoralliaires. Le critère 1 est par exemple primordial pour une étude portant sur les régimes alimentaires qui utilisera de l'ADN dégradé (ex : provenant de fèces) mais est secondaire pour dans une étude de taxonomie, comme la notre basée sur des échantillons de tissus frais ou bien conservés. L'amplification des régions *ND2* et *ND6* repose sur l'utilisation de deux couples d'amorces (*ND6-1487F/ND3-2126R* et *16S-647F/ND2-2148R* McFadden *et al.* 2004). Ces amorces ont été utilisées (*ND2* McFadden *et al.* 2006) ou semblent être potentiellement utilisables avec succès chez les espèces de la famille des *Isididae* comme le suggère l'alignement entre les génomes mitochondriaux de deux espèces appartenant à cette famille (*Acanella eburnea* et *Keratoisina sp.*) et *ND6-1487F/ND3-2126R* (résultats non montrés). Les *Isididae* sont en effet caractérisées par un génome mitochondrial atypique par rapport aux octocoralliaires étudiés jusqu'à présent, un fragment de 5 gènes (*msh1*, *16S*, *ND2*, *ND5*, *ND4*) étant inversé (Brugler & France 2008). Cette inversion est problématique pour l'amplification du fragment *ND4L-msh1* région la plus variable du génome des octocoralliaires (France & Hoover 2001 ; Brugler & France 2008). Dans le cas des locus *ND2* et *ND6* utilisés dans notre étude, les sites d'hybridation des amorces ainsi que leurs orientations sont conservés permettant donc amplification et séquençage chez l'ensemble des taxons de la classe des octocoralliaires validant ainsi les critères 2 et 3. L'apport phylogénétique de ces marqueurs a été développé dans la partie précédente. La phylogénie est bien résolue avec des valeurs de bootstrap élevées au niveau des 3 clades majeurs (*Holaxonia-Alcyoniina* ; *Calcaxonia-Pennatulacea* et *Anthomastus-Corallium*). Au niveau taxonomique suivant, le support phylogénétique varie d'un clade à l'autre. La phylogénie est globalement résolue au sein du clade *Anthomastus-Corallium* avec des valeurs de bootstrap supérieures à 75 dans tous les cas hormis entre *Paragorgia arborea* et *Paragorgia yutlinux*. Les résultats sont plus contrastés pour le clade *Holaxonia-Alcyoniina* puisque la monophylie et le positionnement de nombreux genres ne peuvent être discutés. L'information phylogénétique des marqueurs est donc dépendante à la fois du niveau taxonomique et du clade considérés rendant la validation du critère 4 circonstancielle.

4-3) Divergence et barcoding gap chez les octocoralliaires

Le taux de substitution élevé au sein des génomes mitochondriaux induit dans certains cas un chevauchement entre les niveaux de variations intra- et inter-spécifiques (e.g. Remigio & Hebert 2003 chez les gastéropodes ; Vences *et al.* 2005 chez les amphibiens ; Whithworth *et al.* 2007 chez les diptères). Ce chevauchement serait d'autant plus important

que les taxons considérés sont phylogénétiquement proches (Moritz & Cicero 2004). La validité du barcoding gap ainsi que l'utilisation d'un seuil de distance notamment pour distinguer les espèces nouvelles ont donc été remis en cause à de nombreuses reprises (voir aussi Meyer & Paulay 2005 pour un exemple chez les Cypraeidae). Théoriquement, l'absence de polymorphisme intra-spécifique observé sur 4 régions mitochondriales pour les espèces testées dans cette étude, sous-entend l'existence du barcoding gap dans le cas des octocoralliaires, puisque nous devrions observer une signature moléculaire unique pour chaque espèce considérée. L'absence de variabilité entre certaines espèces congénériques (cf. *Eunicella singularis* / *Eunicella cavolini*) infirme cet attendu, tout en confirmant les résultats précédemment observés chez d'autres genres d'octocoralliaires à partir des mêmes (*ND2*, *ND6* McFadden *et al.* 2004) ou d'autres locus mitochondriaux utilisés séparément (*ANRr 16S* France *et al.* 1996 ; *ND3*, *ND4L*, *msh1* France & Hoover 2001 ; *COI* Calderón *et al.* 2006). Cela induit donc un chevauchement entre les gammes de variation intra- et inter-spécifiques qui ne nous permet pas de valider le critère 5.

Les valeurs de divergence inter-spécifiques rapportées par notre étude sont inférieures aux valeurs moyennes de la littérature. La divergence moyenne est de 11,3% entre espèces congénériques appartenant à 11 phylums de Bilatériens (Hebert *et al.* 2003b) contre 5,7% sur l'ensemble du jeu de données dans notre cas. Le polymorphisme observé semble malgré tout supérieur à celui observé chez les Hexacoralliaires à partir de la *COI* (i.e. 50% des 4005 comparaisons entre espèces ont une distance inférieure à 3% Shearer & Coffroth 2008 contre 17 % des 2211 comparaisons de la présente étude). L'absence de variabilité entre espèces congénériques a aussi été rapportée à un degré plus important chez les Hexacoralliaires. En effet, 40 % des espèces congénériques analysées ont une distance égale à 0% (Shearer & Coffroth 2008) contre 3 % dans notre cas, en ne prenant en compte que les genres phylogénétiquement robustes. Cette comparaison, difficilement interprétable puisque ne portant pas sur les même locus (*COI* vs. *ND2-ND6*), nous interroge cependant sur les mécanismes impliqués dans l'évolution du génome mitochondrial de ces espèces.

4-4) Evolution du génome mitochondrial chez les anthozoaires

Ce faible polymorphisme mitochondrial est connu pour de nombreux taxons de métazoaires non bilatériens de façon générale (e.g. anthozoaires Shearer *et al.* 2002 ; spongiaires Lavrov *et al.* 2005), tout en étant particulièrement marqué chez les octocoralliaires (France & Hoover 1996 ; McFadden *et al.* 2004) mais aussi chez certaines plantes (Wolfe *et al.* 1987). La vitesse d'évolution des séquences mitochondriales chez les anthozoaires est en effet 50 à 100 fois plus lente que pour le reste des métazoaires (Shearer *et al.* 2002) alors que les valeurs observées pour les génomes nucléaires sont comparables avec le reste des métazoaires (Hellberg 2006). L'hypothèse la plus parcimonieuse pour expliquer ce résultat, suggère une accélération de la vitesse d'évolution des séquences mitochondriales à proximité de l'origine des bilatériens (Shearer *et al.* 2002 ; Hellberg 2006 ;

Huang *et al.* 2008). Les processus évolutifs expliquant ces observations restent globalement flous. Malgré tout, Galtier *et al.* (2009) proposent un lien direct entre ces variations de niveau de polymorphisme et la longévité des organismes. Bien que les mécanismes ne soient pas expliqués, un faible taux d'évolution mitochondriale serait sélectionné chez les espèces longévives. Ceci est illustré chez les cnidaires, par l'existence d'un taux d'évolution mitochondriale rapide chez les Médusozoaires (groupe frère des Anthozoaires au sein des Cnidaires) ayant une durée de vie réduite comparée aux Anthozoaires (Galtier *et al.* 2009). Dans le cas des octocoralliaires, la présence du gène *msh1* dans le génome mitochondrial a aussi été avancée comme un des facteurs contribuant à ce faible polymorphisme (e.g. France & Hoover 2001). Ce gène est en effet homologue du gène *MutS* présent dans le système de réparation de l'ADN bactérien *MSLH* (Pont-Kingdon *et al.* 1995, 1998). Des études chez les plantes ont cependant remis en cause son implication réelle dans le faible polymorphisme observé (Abdelnoor *et al.* 2006).

4-5) Utilisation du code barre ND2-ND6 et futurs développements pour une meilleure estimation de la diversité biologique des octocoralliaires

Comme notre travail sur ND2-ND6 l'illustre, un code barre *stricto sensu* chez les octocoralliaires ne semble pas envisageable. Bien que ND2-ND6 ne puisse servir à différencier les « genres » paraphylétiques actuels des genres monophylétiques (Fig. 2-7), nous avons pu suggérer son utilité dans certains cas bien précis, notamment au sein du clade *Anthomastus-Corallium* où les pourcentages de divergence entre espèces sont relativement élevés en comparaison du clade *Holaxonia-Alcyoniina*. Même si l'absence de polymorphisme intra-spécifique est à confirmer sur un plus grand nombre d'espèces, nos résultats suggèrent aussi que toute nouvelle séquence obtenue sur ce marqueur peut être considérée comme appartenant à une nouvelle espèce. Etant plus variable que la *COI* (McFadden *et al.* 2004), *a priori* plus facilement amplifiable que *msh1* (Brugler & France 2008) et présentant un polymorphisme constant contrairement à l'*IGR-4* qui n'est utilisable que chez les *Isididae* (van der Ham *et al.* 2009), ND2-ND6 peut donc être utilisé dans un premier temps pour savoir si le spécimen récolté est répertorié. Il pourra être assigné à l'un des trois clades majeurs en utilisant par exemple une méthode phylogénétique (voir Austerlitz *et al.* 2009 pour discussion). Cette étape qui peut paraître triviale est, malgré tout importante, considérant la révision nécessaire de la phylogénie actuelle (McFadden *et al.* 2006). L'utilisation de marqueurs complémentaires tel que l'*IGR-4* (van der Ham *et al.* 2009) dans le cas des *Isididae* ou *msh1* pour le reste des espèces permettra de préciser la position au sein de ce clade majeur.

Le développement des marqueurs nucléaires afin de mettre en place un barcoding multi-locus sur les deux génomes est cependant incontournable et ce, afin d'éluder le problème des séquences mitochondriales partagées entre espèces et donc d'aller plus avant dans l'estimation de la diversité biologique de ce groupe. L'évaluation de la diversité biologique et donc la délimitation des espèces à partir d'approches moléculaires sont sou-

vent problématiques (voir Funk & Omland 2003 pour une revue bibliographique démontrant que 23% des espèces de leur étude sont potentiellement para- ou poly-phylétiques) notamment chez les cnidaires (VanOppen *et al.* 2001 ; VanOppen & Gathes 2006). Funk & Omland (2003) identifient différents facteurs expliquant leur résultat dont deux, l'hybridation et la séparation incomplète des lignées (« *incomplete lineage sorting* »), sont particulièrement importants chez les cnidaires (Willis *et al.* 2006). Ces phénomènes ont été principalement étudiés chez les Hexacoralliaires et restent à être caractérisés chez les Octocoralliaires. Cependant les séquences d'*ITS* partagées entre *Eunicella singularis* et *Eunicella cavolini* (Calderón *et al.* 2006) sous entendent que ces processus pourraient aussi exister chez ces organismes. Le gène de la cyclooxygénase isolé lors de cette thèse, dont le polymorphisme chez le corail rouge est trop restreint pour une étude de phylogéographie (Annexe 2), ou encore le gène *EFI* (Aurelle *et al.* soumis ; voir Elias *et al.* 2007 pour un exemple combinant marqueurs mitochondriaux et *EFI* chez les Lépidoptères), peuvent potentiellement fournir des compléments d'information dans ce cadre. Pour conclure, bien que ce travail soit focalisé sur la dimension moléculaire de la diversité biologique, il ne doit pas dissimuler l'importance des approches complémentaires. En effet, l'efficacité du barcoding dépend aussi de la connaissance globale du clade étudié (Meyer & Paulay 2005).

III - Contribution à la remise en cause d'une approche purement phylogénétique de la conservation

L'étude de la biologie de la conservation nécessite, dans l'absolu, d'avoir une connaissance préalable des groupes d'organismes étudiés et notamment de leurs limites taxonomiques ainsi que des relations de parenté les unissant au reste du vivant. Cela permet à la fois de focaliser le travail de recherche sur le « bon » taxon et, de façon plus globale, cela contribue à une meilleure définition quantitative et qualitative de la diversité biologique globale. Une délimitation taxonomique au niveau spécifique n'est cependant pas toujours accessible avec les marqueurs moléculaires classiques, soit à cause d'un manque de résolution de ceux-ci, soit parce qu'elle n'existe pas d'un point de vue biologique. L'importance majeure donnée au concept phylogénétique d'espèce (Cracraft 1983 voir aussi Agapow *et al.* 2004) en conservation dans les années 90, a donc du être reconsidérée.

Au cours de ce premier chapitre, j'ai replacé neuf espèces au sein de la phylogénie des octocoralliaires en utilisant les séquences de deux locus mitochondriaux concaténés *ND2* et *ND6* soit environ 800 paires de bases. Parmi ces neuf espèces, cinq sont des gorgonaires dont l'aire de distribution inclut ou se limite à la Méditerranée. A priori, aucune espèce de cette région biogéographique n'avait jusqu'alors été utilisée dans une phylogénie moléculaire. Les quatre espèces restantes appartiennent au genre *Corallium*, faisant de mon échantillonnage de ce genre, le plus exhaustif utilisé jusqu'à présent pour une phylogénie moléculaire. Les résultats obtenus confirment que la phylogénie actuelle des octocoralliaires doit être largement révisée suggérant, par conséquent, que les caractères morphologiques utilisés jusqu'alors ne sont pas des synapomorphies et doivent être redéfinis (voir aussi Berntson *et al.* 2001 ; McFadden *et al.* 2006). Cette étude réaffirme la présence des trois clades majeurs (*Holaxonia-Alcyoniina* ; *Calcaxonia-Pennatulacea* et *Anthomastus-Corallium*) au sein de l'ordre des octocoralliaires, dont l'existence avait été mise en évidence par Berntson *et al.* (2001) à partir de marqueurs nucléaires et confirmée par McFadden *et al.* (2006) avec des marqueurs mitochondriaux. Alors que le positionnement du genre *Paramuricea* au sein du clade *Holaxonia-Alcyoniina* n'est pas soutenu, les positionnements du genre *Eunicella* au sein du même clade et du genre *Corallium* au sein du clade *Anthomastus-Corallium* le sont. La monophylie des genres *Paramuricea* et *Eunicella* est démontrée, alors que le genre *Paracorallium* n'est pas soutenu, confirmant la monophylie du genre *Corallium*. D'autre part, le genre *Sibogorgia* est aussi paraphylétique confirmant les travaux d'Herrera *et al.* (2010). Cette première partie aura ainsi permis de replacer le modèle biologique de cette thèse (*Corallium rubrum*) au sein de la phylogénie des octocoralliaires.

Dans la seconde partie, j'ai évalué *ND2-ND6* en tant que code barre chez les octocoralliaires. La mise en place d'un système de code barre *stricto sensu* représente un apport important du point de vue de la conservation. Cette taxonomie moléculaire participe en

effet à la quantification de la biodiversité (Blaxter & Floyd 2003). Les résultats de cette seconde partie démontrent cependant qu'un système uniquement basé sur *ND2-ND6* n'est pas optimal. En effet, le mode d'évolution atypique de leur génome mitochondrial induit dans certains cas une divergence nulle entre espèces congénériques, ce qui entraîne un chevauchement des gammes de variations intra- et inter-spécifiques. Je suggère malgré tout que cette séquence soit utilisée pour assigner une espèce à l'un des trois clades majeurs. D'autre part, l'absence de polymorphisme intra-spécifique observé au sein de sept espèces sur quatre locus mitochondriaux induit que toute séquence non répertoriée dans les banques de gènes appartient potentiellement à une nouvelle espèce permettant d'orienter le travail des taxonomistes. Ainsi en tenant compte du manque de connaissance sur ce clade par rapport au nombre probablement important d'espèces restant à caractériser, mais aussi par rapport à la révision nécessaire de sa phylogénie, un mode opératoire pour l'utilisation du code barre *ND2-ND6* est proposé. Cet outil peut donc permettre des apports significatifs à la connaissance de la diversité biologique des octocoralliaires.

Les résultats de ces deux parties et notamment l'absence de variabilité intra-spécifique couplée dans certains cas à une divergence nulle entre espèces congénériques ont d'importantes implications quant à la conservation de ces organismes. Ils nous interrogent en effet sur le concept phylogénétique d'espèce et donc sur notre capacité à définir des unités évolutives significatives (« *evolutionarily significant unit* » ESU) chez ces organismes pourtant soumis à de fortes pressions anthropiques. Les ESU sont un outil majeur en matière de gestion de la biodiversité et représentent l'un des apports principaux de la phylogénie moléculaire à la biologie de la conservation (Hedrick 2001). Ce concept permet de cibler les entités (*sensu* Hey *et al.* 2003) à conserver en priorité (Ryder 1986) orientant donc les efforts de conservation de façon rationnelle. Basée à la fois sur un isolement reproducteur et historique ainsi que sur des potentialités adaptatives différentes par rapport aux autres entités de la même espèce (Ryder 1986 ; Waples 1991), la définition de ces unités s'est, par la suite, focalisée sur l'existence d'une monophylie réciproque au niveau mitochondrial couplée à une structuration significative au niveau nucléaire (Moritz 1994). Le potentiel adaptatif de l'entité biologique considérée a donc été relégué au second plan. La monophylie réciproque de la mitochondrie au niveau intra-spécifique est un critère pertinent chez la plupart des métazoaires. Il l'est, par contre, beaucoup moins chez les plantes (Crandall *et al.* 2000) et donc, comme nous venons de le démontrer, chez de nombreux cnidaires. Chez ces derniers les séquences mitochondriales et/ou nucléaires partagées entre espèces congénériques (e.g. *Eunicella spp.* Calderón *et al.* 2006 ; *Acropora spp.* VanOppen *et al.* 2001 voir McFadden *et al.* 2010 pour discussion chez les octocoralliaires) ajoutent une autre difficulté. En effet comment définir une ESU basée sur l'existence d'entités phylogénétiquement distinctes lorsque cette distinction n'est, par nature, pas appropriée au cas considéré? La difficulté à délimiter les espèces pour de nombreux groupes dits taxonomiquement complexes (Ennos *et al.* 2005) est un fait maintenant connu dont les causes (ex : hybridation, reproduction uniparentale, poly-

ploïdie) et l'impact en biologie de la conservation, notamment lorsqu'il s'agit de définir les ESUs, ont été largement discutés (voir Crandall *et al.* 2000 ; Hedrick 2001 ; Moritz 2002 ; Hey *et al.* 2003 ; Agapow *et al.* 2004 ; Ennos *et al.* 2005 ; Hendry *et al.* 2010). Dans une volonté de s'affranchir du concept d'espèce, de nombreux auteurs ont donc suggéré d'évoluer de l'approche usuelle centrée sur les espèces, vers une approche centrée sur les facteurs évolutifs sous jacents (Crandall *et al.* 2000 ; Moritz 2002 ; Ennos *et al.* 2005 ; voir Introduction). Ce changement de focus des patterns de biodiversité vers les processus évolutifs contribuant à ces patterns, permet à la fois d'appréhender la diversité biologique de façon plus globale (i.e. quelques soient les modes de reproduction) mais aussi de garantir un équilibre dans la prise en compte des critères d'isolement génétique et de diversité adaptative. C'est dans cette optique que la suite de ce travail de thèse a été pensée. Je me suis en effet concentré sur la définition des processus microévolutifs à l'origine de la diversité actuelle de *Corallium rubrum* et qui doivent être pris en compte afin de définir une politique de conservation optimale.

Chapitre 3

Structuration et diversité génétique des populations de surface de corail rouge à l'échelle de la Méditerranée Nord-Occidentale

« Où il est question de populations de corail rouge en Méditerranée Nord-Occidentale, de microsatellites, de déficit en hétérozygotes et de structure génétique significative même à courte distance, de méthode bayésienne de regroupement et de groupes régionaux, de corrélation positive entre distances génétique et géographique donc d'isolement par la distance et d'équilibre migration-dérive, d'une forte diversité génétique et de sa répartition hétérogène, de scénario évolutif et encore de conservation. »



1) Introduction

Coastal marine ecosystems are important from socio-economic and ecological points of view (Costanza *et al.* 1997; Harley *et al.* 2006). These ecosystems are subjected to the direct and indirect effects of human activities, resulting in local and global pressures. In many areas, coastal ecosystems are critically endangered by severe dysfunctions, including extinction of species (Jackson 2008; Halpern *et al.* 2008). The effects of climate change are the most recent source of strong disturbance pressures in these ecosystems worldwide (Harley *et al.* 2006).

This study is focused on the Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*, a species that is typically associated with the coralligenous assemblage, one of the richest biodiversity habitats in the Mediterranean Sea (Ballesteros 2006; Airoidi & Beck 2007). The red coral is an aposymbiotic octocorallian with a highly fragmented distribution which centers mainly around the western Mediterranean and the neighboring Atlantic Ocean (Zibrowius *et al.* 1984). It inhabits semi-dark to dim-light rocky benthic habitats such as caves and coralligenous overhangs between 5 and 600 m in depth (Laborel & Vacelet 1961; Zibrowius *et al.* 1984; Zibrowius pers. com.). It is a long-lived species (more than 50 years) with a short larval phase, estimated from 4 to 12 days *in aquaria* (Vighi 1972; Weinberg 1979), displaying slow population dynamics with very low growth and mortality rates (Garrabou & Harmelin 2002; Marschal *et al.* 2004; Torrents 2007; Santangelo *et al.* 2004, 2007), and showing recruitment by pulses (Garrabou & Harmelin 2002).

The red coral species has a high socio-economical value. It has been intensively harvested since antiquity for its use in jewelry. This important fishing pressure resulted in profound changes in the species range (Santangelo & Abbiati 2001) and in the size structure of the shallow populations, preventing the colonies from reaching their potential maximum size (Garrabou & Harmelin 2002). Moreover, in 1999 and 2003, the red coral was amongst 30 species affected by two large-scale mass mortality events (MME), which were linked to positive thermal anomalies that were potentially associated with the warming trend currently detected in this area (Perez *et al.* 2000; Romano *et al.* 2000; Garrabou *et al.* 2001; Garrabou *et al.* 2009). MMEs have differentially impacted red coral populations. In some sites, approximately 80% of the colonies were affected, while in others only 5% of colonies showed some mortality (Garrabou *et al.* 2001). The red coral was included in several international conservation conventions to protect the species and control its harvest. However, these management measures do not take into account the distribution of genetic diversity, the connectivity between populations and the new climatic threat and its impact on shallow populations (5-60 m).

Previous genetic studies investigated effective larval dispersal as well as the spatial genetic structure of red coral populations; these studies used nuclear markers because of the lack of polymorphisms in mitochondrial markers (Calderón *et al.* 2006) putatively linked to the presence of the *msh1* gene (Pont-Kingdon *et al.* 1995; McFadden *et al.*

2006; Ledoux *et al.* unpublished). Based on use of allozymes, significant differentiation was observed between samples separated by ten kilometers (Abbiatti *et al.* 1993). Del Gaudio *et al.* (2004) used AFLP profiles to distinguish four population samples separated by tens to hundreds of kilometers. These patterns of differentiation were refined by analysis of four microsatellites among eight samples derived from two locations. This analysis revealed strong genetic structuring at distances of tens of meters (Costantini *et al.* 2007a). Finally, a large-scale study of eleven samples scattered around the northwestern Mediterranean basin, using ITS-1 sequences and five microsatellites confirmed this high level of differentiation between populations. However, a clear genetic structure could not be established at long distances despite generalized differentiation between the samples (Costantini *et al.* 2007b). Moreover, the ITS-1 signal might be affected by a lack of concerted evolution (Calderón *et al.* 2006).

The major goals of this study were to analyze the link between geographical distance and genetic structure, and to gain insight into the distribution of genetic diversity. Using ten microsatellite loci and a sampling of forty shallow populations separated by a range from tens of m to hundreds of km and dwelling in different environments, three main objectives were addressed: 1) to thoroughly define the population structure and relationships with particular emphasis on dispersal patterns over the whole area and within each regional-cluster; 2) to conduct the first analysis of the patterns of genetic diversity using comparative approaches; and 3) to test for deviation from mutation-drift equilibrium impacting the genetic diversity of the study samples. The results, discussed in light of the species' life history traits, should further our understanding of the evolutionary history of the shallow red coral populations. In particular, we show for the first time that isolation by distance (IBD) occurs at different spatial scales in this species. Moreover, we reveal contrasting patterns of genetic structure among the analyzed regional-clusters. We also demonstrate a strong heterogeneity in the distribution of genetic diversity, and we highlight the particular status of the Balearic cluster. These results constitute valuable data for conservation of red coral populations, and could also be useful for other species with similar life-history traits belonging to the threatened Mediterranean rocky benthic community. Finally, this study is necessary for exploration of the adaptive capacity of red coral populations facing the ongoing shifts in environmental conditions (Ferrière *et al.* 2004).

2) Materials and methods

2-1) Sampling and DNA extraction

Corallium rubrum colonies were sampled by scuba diving at 40 sites corresponding to different habitats (overhangs, caves and interior of caves), and located at the upper limit (between 14 and 60 m in depth) of the bathymetric distribution of the species between the

years 2003 and 2006. Two to twenty-two sites were thus sampled in four geographically distinct parts of the species range: the northwestern part of Corsica, Catalonia, the northern part of the Balearic Islands and the Liguro-Provençal region (Fig. 3-1; Table 3-1). These regions are well separated based on their insular position or due to the lack of continuous shallow rocky habitats between them (such as between Catalonia and the Liguro-Provençal region). One apical fragment measuring 2 to 3 cm, from around 30 colonies per site (from 21 to 50; mean 30.5 +/- 5.2), was hand-collected randomly to cover the area of each study site. The resulting 1222 red coral fragments were preserved in 95% ethanol and stored at -80°C until DNA extraction. Total genomic DNA was extracted from 5 to 10 polyps using standard proteinase K / SDS digestion followed by phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) extraction (Sambrook *et al.* 2001).

2-2) Microsatellite analysis

All individuals were genotyped using 10 microsatellite loci (Table 3-2) from three different sources: Ecogenics GmbH (Zurich, Switzerland), Bioprofiles LTD (Newcastle University) and Costantini & Abbiati (2006) (see supplementary material). PCR amplifications were realized in a final reaction volume of 10 µL containing 1 µL of DNA, 2 µL of 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega), 0.2 mM of dNTPs, 0.25 U of GoTaq DNA Polymerase (Promega), 3 mM of MgCl₂ and 1 µM of each primer. The forward primer was fluorescently labeled. The PCR reactions were done as follows for all loci, except *COR9bis* and *COR46bis*: 95°C for 2 min followed by 25 cycles of 94°C for 30 s and annealing temperature for 30 s without elongation; the final step was 72°C for 20 min (C. Hubert Functional Genomic Bordeaux pers. com.). Amplifications of the two remaining loci were done following Costantini & Abbiati (2006), but with a last extension step at 72°C for 20 min.

Electrophoresis of the amplification products was conducted on an ABI3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) by multiplexing PCR products (*Mic13/Mic22/Mic24/Mic27, Mic23/Mic25/Mic26* and *COR9bis/Mic20/COR46bis*) and using an internal size standard for sizing (Genescan 600 LIZ, Applied Biosystems). Three reference individuals were included in each migration. Electropherograms were analyzed with Genemapper version 3.0 (Applied Biosystems).

2-3) Microsatellite characteristics

MICROCHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) was used to test for large allele dropout and scoring errors due to stutters. Frequencies of null alleles were estimated for each sample and locus by the expectation maximization algorithm (Dempster *et al.* 1977) implemented in FREENA (Chapuis & Estoup 2007). Repeatability tests based on extraction and genotyping replicates were performed to control the genotyping procedure. The results obtained suggested that PCR reactions and genotyping were repeatable (data not shown).

The total number of alleles, size range, observed (H_o) and unbiased heterozygosity (H_e Nei 1973) were calculated for each locus using FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2001).

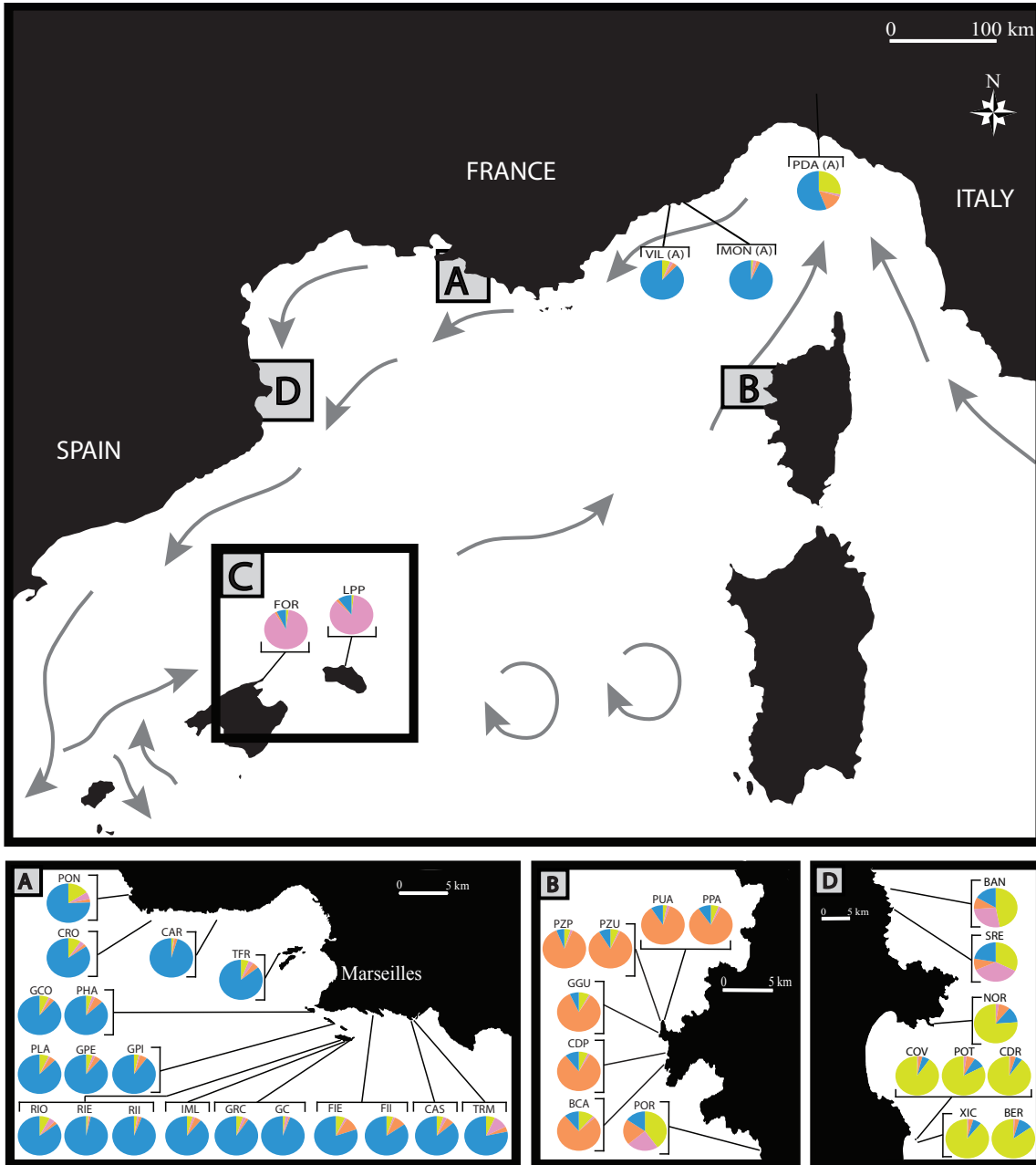


Figure 3-1: Location of 40 sites distributed among the 4 regions (A-Provenço-Liguria, B-Corsica, C-Balea-ric Islands, D-Catalonia) in the present study. Correspondences between sample names and locations are shown in Table 3-1. Grey arrows represent the predominant sea surface currents as defined in Millot (1999). Circles correspond to assignment results for each sample obtained with STRUCTURE for K=4.

2-4) Hardy-Weinberg equilibrium

GENETIX v.4.05 (Belkhir *et al.* 2004) was used to test the null hypothesis of linkage equilibrium for each pair of loci in each sample with a permutation procedure (N=1000).

Departure from panmixia was tested for each sample using the score test for heterozygote deficiency in GENEPOP 4.0 (Rousset 2008). Significance was addressed by a Markov Chain (MC) algorithm (Guo & Thompson 1992; Raymond & Rousset 1995), with default parameters. The f estimator of F_{IS} (Weir & Cockerham 1984) was computed for each sample using GENETIX.

Table 3-1: *Corallium rubrum* samples collected for the study. Habitat numbers correspond respectively to 1=overhang; 2=cave entrance; 3=inside cave. N: number of colonies sampled at each site.

Geographic region	Sample location	Label	Latitude (North)	Longitude (East)	Depth (m)	Habitat	N
Provenço-Liguria	Punta dell'Altare	PDA	44.3055°	9.21481°	35	2	29
Provenço-Liguria	Monaco	MON	43.7349°	7.43342°	35	2	21
Provenço-Liguria	Villefranche	VIL	43.6896°	7.34897°	22	1	36
Provenço-Liguria	Grotte Tremies	TRM	43.2012°	5.51339°	14	3	26
Provenço-Liguria	Castelvieil	CAS	43.1976°	5.49875°	16	2	30
Provenço-Liguria	Figuier extérieur	FIE	43.205°	5.44723°	20	2	29
Provenço-Liguria	Figuier intérieur	FII	43.205°	5.44736°	20	3	27
Provenço-Liguria	Grand Congloué	GC	43.1759°	5.40185°	40	1	30
Provenço-Liguria	Grand Congloué	GRC	43.1754°	5.40097°	52	2	29
Provenço-Liguria	Impériales du large	IML	43.1698°	5.39435°	60	2	23
Provenço-Liguria	Riou Sud	RIO	43.1728°	5.3886°	40	2	29
Provenço-Liguria	Riou Sud Extérieur	RIE	43.1728°	5.38942°	20	2	25
Provenço-Liguria	Riou Sud Intérieur	RII	43.1729°	5.38941°	20	3	33
Provenço-Liguria	Plane	PLA	43.1869°	5.39117°	38	2	29
Provenço-Liguria	Grotte à Péres entrée	GPE	43.1869°	5.39029°	20	2	50
Provenço-Liguria	Grotte à Péres intérieur	GPI	43.1868°	5.39029°	20	3	28
Provenço-Liguria	Pharillons de Maïre	PHA	43.2074°	5.3382°	39	1	32
Provenço-Liguria	Tiboulou du Frioul	TFR	43.28°	5.2876°	38	1	38
Provenço-Liguria	Grotte à corail	GCO	43.2102°	5.33273°	20	3	29
Provenço-Liguria	Carry le Rouet	CAR	43.3226°	5.162°	20	1	35
Provenço-Liguria	Carro	CRO	43.3151°	5.06052°	21	1	32
Provenço-Liguria	Ponteau / Lavera	PON	43.3643°	4.99941°	21	1	28
N-W Corsica	Grotte Palazzinu	PUA	42.3798°	8.55009°	40	2	32
N-W Corsica	Passe Palazzu	PPA	42.3799°	8.54758°	27	1	29
N-W Corsica	Palazzu (grotte à corail)	PZU	42.3802°	8.54635°	22	2	34
N-W Corsica	Palazzu	PZP	42.3802°	8.54575°	40	2	28
N-W Corsica	Garganellu	GGU	42.3726°	8.5369°	43	2	32
N-W Corsica	Cala di Ponte	CDP	42.3546°	8.55209°	26	1	30
N-W Corsica	Baja casju	BCA	42.3496°	8.55095°	30	1	28
N-W Corsica	Porto	POR	42.2725°	8.68812°	24	1	29
Catalonia	Cap de l'Abeille	BAN	42.475°	3.16192°	25	1	21
Catalonia	Sec Rederis	SRE	42.4641°	3.16658°	23	2	27
Catalonia	Cap de Norfeu	NOR	42.2443°	3.26684°	24	1	30
Catalonia	Pota del Lop	POT	42.0497°	3.2254°	35	2	35
Catalonia	Cova de la Reina	CDR	42.0461°	3.22477°	14	1	38
Catalonia	Cova de la vaca SE	COV	42.0472°	3.22583°	18	1	39
Catalonia	Carall Bernat	BER	42.0422°	3.22816°	18	1	27
Catalonia	Meda xica tunel dofi SE	XIC	42.0436°	3.22644°	35	1	34
Balearic Islands	Cap Formentor	FOR	39.9964°	3.21188°	36	1	32
Balearic Islands	Llosa des Patro Pere	LPP	40.0726°	4.1075°	34	1	29

2-5) Interpopulation differentiations and isolation by distance

Global and pairwise differentiations between samples were quantified using Weir and Cockerham's (1984) estimator of F_{ST} (θ) in GENETIX. Genotypic differentiation between samples was tested using an exact test based on the MC algorithm (Guo & Thompson 1992) with default parameters in GENEPOP.

Pattern of isolation by distance was analyzed following Rousset's method (1997). Geographic distances were measured using GOOGLE EARTH v.5.0 (<http://earth.google.fr/>), using Euclidian distance or taking into account the minimum downstream distances between regions along the path of the predominant surface current as defined in Millot (1999) (Fig. 3-1 and Tables 3-S3). Slatkin's linear F_{ST} ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) was regressed on the logarithm of the distance ($\ln(d)$), as recommended for a two-dimensions model of IBD (Rousset 1997) using GENEPOP. The significance of the correlation between the two distance matrices was tested thanks to a Mantel test (1967) (N=2000) using GENEPOP. IBD was also assessed independently over each of the 3 clusters (Liguro-Provençal, Corsican and Catalanian) for which the number of available samples was sufficient.

Hierarchical analyses of molecular variance (AMOVA) were conducted in ARLEQUIN v.3.10 (Excoffier *et al.* 2005) in order to quantify genetic variation among populations (F_{ST}), among populations within a group (F_{SC}) and among groups (F_{CT}). Significance of F-statistics was achieved using 1000 permutations. AMOVA tests were performed first using the groups defined by STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al.* 2000) for K=4 (see below), and then within each of these groups, except for the Balearic cluster because of its low number of samples.

2-6) Clustering analyses

Simulated dataset: We used computer simulations to evaluate the effect of positive and significant F_{IS} on STRUCTURE, considering genetic parameters close to those observed for *C. rubrum*. The behavior of the model allowing for separate alpha values among clusters was also evaluated under the simulated scenarios.

The obtained results showed that the two models (admixture with correlated allele frequencies with the same alpha or with separated alphas) gave good results despite HW equilibrium not being met in all samples (see supplementary material).

Real dataset: The underlying population structure contained in the data was analyzed using the Bayesian approach implemented in STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003, 2007) that infers the number of genetic clusters K from the individual's genotype dataset. Ten different runs of 200000 burn-in followed by 500000 iterations were computed for each K value, with the model allowing for admixture and correlated allele frequencies between clusters, and using the recessive allele option to deal with null alleles (Falush *et al.* 2007). Alpha, the degree of admixture between the K clusters, was evaluated separately for each cluster. Following the recommendations of Rosenberg *et al.* (2002) and Jakobsson *et al.* (2008) for cases of large datasets, we first studied the

behavior of STRUCTURE at several small values of K during a first round of analysis, and then we looked for additional substructure on partitioned datasets during a second round. For the first round, the whole dataset (1222 individuals) was used. K was set to vary between 1 and 8 and only the smallest values were discussed (from $K=2$ to $K=4$). The clustering solution given for $K=4$ was then used to divide the whole dataset into four partitioned datasets that were subsequently analyzed in a second round of STRUCTURE with K varying between 1 and 23 (i.e., the total number of samples plus one). A K value was then selected for each partitioned dataset based on the plot of $LnP(D)$ (the logarithm of the likelihood of observing the data) as a function of K (Pritchard *et al.* 2007; Waples & Gaggiotti 2006), and looking for the value that captured the major structure in the data (Pritchard *et al.* 2007). When only one clustering solution appeared for a selected K value, CLUMPP v.1.1 (Jakobsson & Rosenberg 2007) was used to average the assignment scores over the 10 runs. If several solutions were observed, the symmetric similarity coefficient (SSC) was used to pool runs belonging to the same mode (i.e., $SSC > 0.9$) (Jakobsson *et al.* 2008) and the mode with the highest likelihood was selected. Finally, DISTRUCT v.1.1 (Rosenberg 2004) was used for graphical display.

2-7) Estimation and distribution of genetic diversity

Genetic diversity analyses focused on gene diversity (H_e), allelic richness ($A_{r(g)}$) and private allelic richness ($A_{p(g)}$). A rarefaction method (Petit *et al.* 1998) was applied to obtain estimates of $A_{r(g)}$ and $A_{p(g)}$ independently of the sample size, with g representing the minimum number of genes observed at one locus in one of the samples (i.e. twice the number of genotypes). These computations were done for g equal to 22 (*Mic22* for MON) or 66 (*Mic22* for Catalonia), depending on whether the samples or the 4 regional clusters defined by STRUCTURE were considered.

The coefficient $A_{rST(g)}$ was computed for $g = 22$ to measure the partitioning of allelic richness among samples (Petit *et al.* 1998) using ADZE (Szpiech *et al.* 2008). ADZE was also used to compute $A_{r(22)}$ and $A_{p(22)}$ for each sample and $A_{r(66)}$ and $A_{p(66)}$ for each cluster. Computations of H_e were done with FSTAT. Comparisons of H_e and $A_{r(66)}$ values between each cluster were done using pair-group comparisons and the one-sided probability test implemented in FSTAT.

The occurrence of deviation from mutation-drift equilibrium linked to recent demographic events and affecting the genetic diversity within samples was tested using BOTTLENECK 1.2.02 (Piry *et al.* 1999). The expected heterozygosity under mutation-drift equilibrium was computed for each locus considering a two-phase model (TPM) (Di Rienzo *et al.* 1994), with 95% of the stepwise mutation model (SMM) and variance among multiple steps equal to 12 (Piry *et al.* 1999). The null hypothesis of “no significant difference between H_e and H_{eq} ” was then tested using the Wilcoxon’s signed rank-test.

For all analyses, significance levels were corrected using a false discovery rate (FDR)

correction for multiple tests (Benjamini & Hochberg 1995) when necessary.

3) Results

3-1) Loci characteristics

According to MICROCHECKER, no evidence of scoring errors due to stuttering or large allele dropouts was found in the whole data set. All loci were polymorphic in all populations. Total numbers of alleles ranged between 7 for *Mic13* and 67 for *Mic27*, with a mean of 35 alleles per locus. Observed heterozygosity varied from 0.18 for *Mic13* to 0.89 for *Mic26*. Unbiased heterozygosity ranged from 0.53 for *Mic13* to 0.94 for *Mic27*. Mean estimated null allele frequencies by locus varied from 0.01 for *Mic26* to 0.4 for *Mic23* and *COR9bis*, with a mean value of 0.21 per locus (Table 3-2). No global significant LD among loci was detected considering overall samples (all $P > 0.05$ after FDR correction).

3-2) Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium

Significant linkage disequilibrium (LD) among pairs of loci was observed in ten samples, implying different pairs of loci and different numbers of pairs of loci (from 1 for CAR to 4 for XIC). Significant heterozygote deficiencies were observed in all samples (Table 3-3). Multilocus values of the F_{IS} estimator (f) ranged between 0.2 for XIC and PDA and 0.47 for GRC with a mean value equal to 0.31. Considering each locus separately, f values ranged from -0.3 for *Mic20* for PDA to 1 for *Mic13* for PDA, MON and TRM and for *Mic25* for CDP. Significance of f values varied between loci and samples. Whereas all f values by sample were significant for *COR9bis*, *Mic26* showed no significant values by sample (Table 3-S2). Mean estimated null allele frequency (r) values over all loci by sample were scattered from 0.10 for PPA to 0.35 for PON, with a mean of 0.21. Wahlund effect and/or inbreeding could partially explain the significant heterozygote deficiencies and the LD reported in ten samples.

3-3) Population structure analysis

F_{ST}, IBD and AMOVA

Global F_{ST} was 0.097, and pairwise F_{ST} between all pairs of samples ranged from -0.001 between GPE and GPI to 0.212 between RIE and PZU. After the FDR correction, 779 among 780 pairwise comparisons appeared significant (Table 3-S3), suggesting a generalized differentiation between samples. F_{ST} were significant even for samples belonging to the same site and depth but to different environments, and separated by less than ten meters (e.g., RIE vs. RII; FIE vs. FII but GPE vs. GPI), indicating a short distance genetic differentiation. The non-significant comparison implied GPI and GPE that belong to the same site and depth but to different environments (interior cave vs. cave entrance).

Locus name	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Number of cycles	Ta (°C)	Size range (bp)	Number of alleles	H _o	H _e	f	r	Genbank accession number
<i>Mic13</i>	F: NED_CTTTGATTGGCCCTGATGTAA R: GCCAGGAAAGAAATGGGTATATTA	(AC) ₂ A (AC)G (AC) ₃ TA (AC) ₇	25	59	126-141	7	0.18	0.53	0.65***	0.24	GQ169280
<i>Mic20</i>	F: 6-FAM_CACGTGATTGACGAAAACATTTC R: TGTCGGGAAATTGTTCACTGTA	(CA) ₈	25	59	198-286	27	0.49	0.54	0.07***	0.07	GQ169281
<i>Mic22</i>	F: VIC_CGAGCGAGGGAAATTAATAGG R: GATGTAATTGTCGGCCATTG	(GT) ₁₆	25	56	153-190	18	0.3	0.64	0.49***	0.37	GQ169282
<i>Mic23</i>	F: VIC_GATCTCTGACTGAATGGTATTGG R: CCTGGCTACGTCCTGACT	(GT) ₁₄	25	56	93-143	23	0.35	0.71	0.47***	0.4	GQ169283
<i>Mic24</i>	F: NED_TCGAGCACTTCCTGGTAGC R: TGAATTCATACACCCACTGC	(CA) ₁₈	25	59	145-312	55	0.73	0.76	0.04***	0.02	GQ169284
<i>Mic25</i>	F: 6-FAM_GCAAAGGTAAAATGATGATCTGG R: GATCGCACTAAATCTTAATAGTGTTC	(GTTT) ₃ (GT) ₁₆	25	59	130-208	38	0.39	0.78	0.46***	0.38	GQ169285
<i>Mic26</i>	F: NED_AGGGAACAATCTTTGTTGTGC R: ATGTTTGGCGGACCTACACAG	(GT) ₂₄	25	59	126-200	30	0.89	0.89	-0.005	0.01	GQ169286
<i>Mic27</i>	F: 6-FAM_GATCTCTTCGCGGATAGTCTG R: GACGGTGGGACGAACAGG	(GT) ₃₀	25	59	140-536	67	0.74	0.94	0.19***	0.16	GQ169287
<i>COR9bis</i>	F: 6-FAM_GTTCCCTTGAA GCAI GTTGGATT R: CAGGAAC TCTGCCAGTACACA	(C) ₁₁ (CA) ₁₃	30	53	141-200	56	0.27	0.89	0.7***	0.4	AY726758
<i>COR46bis</i>	F: NED_TTGGGTACAAATCAAGCTACCA R: AGACCAGCGGCATCACTTT	(GT) ₁₅	28	53	172-243	36	0.72	0.76	0.04***	0.04	AY726761

Table 3-2: Primer sequences, PCR conditions and genetic characteristics of 10 polymorphic microsatellites in *Corallium rubrum*. H_o: observed heterozygosity; H_e: gene diversity (Nei 1973); f: Weir and Cockerham (1984) estimator of F_{IS}; r: null allele frequency. Presented values correspond to the mean value over all samples.

Table 3-3: Measures of genetic diversity for 40 shallow samples of *Corallium rubrum* based on 10 microsatellites loci. H_o : observed heterozygosity; H_e : gene diversity (Nei 1973); f : Weir and Cockerham (1984) estimator of F_{IS} ; $Ar_{(22)}$ and $Ap_{(22)}$: allelic and private allelic richness, respectively, with rarefaction for a corresponding sample size of 22; Pw10: p-values of the Wilcoxon test for differentiation between H_e and H_{eq} as implemented in BOTTLENECK using the 10 loci. Standard deviations are in brackets. Values in bold are significant at the 0.05 level after FDR correction.

	H_o	H_e	f	$Ar_{(22)}$	$Ap_{(22)}$	Pw10
PDA	0.54 (0.29)	0.68 (0.23)	0.2	6.47 (3.56)	0.19 (0.35)	0.1
MON	0.46 (0.3)	0.62 (0.25)	0.26	5.7 (3.62)	0.04 (0.13)	0.14
VIL	0.5 (0.29)	0.73 (0.16)	0.31	6.61 (3.03)	0.27 (0.42)	0.01
TRM	0.47 (0.34)	0.73 (0.16)	0.37	7.05 (3.78)	0.05 (0.1)	0.01
CAS	0.55 (0.26)	0.76 (0.16)	0.28	8.07 (3.35)	0.04 (0.08)	0.02
FIE	0.48 (0.24)	0.75 (0.13)	0.36	7.17 (2.88)	0.16 (0.41)	0.14
FII	0.43 (0.22)	0.72 (0.16)	0.41	6.98 (2.72)	0.12 (0.2)	0
GC	0.49 (0.28)	0.71 (0.18)	0.31	6.91 (3.33)	0.03 (0.05)	0.01
GRC	0.4 (0.29)	0.75 (0.19)	0.47	7.79 (3.53)	0.05 (0.09)	0.01
IML	0.48 (0.32)	0.77 (0.19)	0.38	8.31 (3.97)	0.13 (0.31)	0.31
RIO	0.5 (0.35)	0.83 (0.13)	0.41	9.16 (4.08)	0.17 (0.3)	0.25
RIE	0.53 (0.37)	0.67 (0.23)	0.21	6.13 (3.06)	0 (0)	0.02
RII	0.52 (0.29)	0.79 (0.13)	0.35	7.48 (3.54)	0.13 (0.28)	0.35
PLA	0.47 (0.3)	0.75 (0.13)	0.37	6.83 (3.03)	0.04 (0.09)	0.12
GPE	0.47 (0.32)	0.75 (0.18)	0.37	7.6 (3.22)	0.12 (0.3)	0
GPI	0.49 (0.26)	0.75 (0.17)	0.35	7.23 (3)	0.02 (0.03)	0.05
PHA	0.46 (0.33)	0.67 (0.27)	0.32	6.85 (4)	0.19 (0.31)	0.01
TFR	0.49 (0.33)	0.72 (0.19)	0.33	7.12 (4.1)	0.11 (0.18)	0.19
GCO	0.46 (0.34)	0.73 (0.14)	0.38	6.81 (3.51)	0.06 (0.13)	0.01
CAR	0.48 (0.34)	0.66 (0.19)	0.27	5.15 (2.76)	0.15 (0.3)	0.1
CRO	0.52 (0.32)	0.77 (0.16)	0.33	7.96 (3.68)	0.11 (0.24)	0.02
PON	0.43 (0.3)	0.76 (0.16)	0.44	7.78 (3.38)	0.04 (0.06)	0.1
PUA	0.57 (0.27)	0.75 (0.17)	0.25	7.86 (3.71)	0.24 (0.32)	0.01
PPA	0.55 (0.31)	0.72 (0.23)	0.23	7.23 (3.69)	0.16 (0.26)	0.1
PZU	0.46 (0.22)	0.7 (0.18)	0.34	6.2 (3.42)	0 (0.01)	0.19
PZP	0.57 (0.25)	0.72 (0.21)	0.21	6.85 (3.73)	0.09 (0.18)	0.25
GGU	0.52 (0.26)	0.74 (0.18)	0.3	6.7 (3.29)	0.11 (0.17)	0.25
CDP	0.46 (0.29)	0.72 (0.13)	0.37	6.24 (3.03)	0.03 (0.06)	0.14
BCA	0.6 (0.3)	0.8 (0.13)	0.25	8.34 (3.46)	0.12 (0.14)	0.12
POR	0.44 (0.25)	0.68 (0.21)	0.37	6.37 (3.17)	0.26 (0.37)	0.19
BAN	0.58 (0.28)	0.8 (0.1)	0.29	7.53 (3.23)	0.02 (0.05)	0.61
SRE	0.42 (0.28)	0.72 (0.2)	0.42	6.94 (2.58)	0.03 (0.06)	0.12
NOR	0.57 (0.34)	0.76 (0.17)	0.26	7.38 (3.61)	0.03 (0.06)	0.19
POT	0.54 (0.18)	0.76 (0.16)	0.3	8.14 (3.49)	0.06 (0.1)	0.01
CDR	0.5 (0.25)	0.68 (0.21)	0.28	6.98 (3.46)	0.04 (0.07)	0.01
COV	0.55 (0.26)	0.75 (0.16)	0.27	8.07 (3.67)	0.09 (0.13)	0.01
BER	0.56 (0.23)	0.76 (0.14)	0.27	7.94 (3.51)	0.05 (0.14)	0.05
XIC	0.56 (0.24)	0.74 (0.17)	0.2	7.66 (3.25)	0.1 (0.16)	0.01
FOR	0.62 (0.33)	0.78 (0.19)	0.22	9.48 (5.43)	1 (1.94)	0.08
LPP	0.57 (0.26)	0.82 (0.12)	0.31	9.08 (3.61)	0.55 (0.49)	0.053
Mean Value	0.51 (0.05)	0.74 (0.04)	0.32	7.3 (0.91)	0.13 (0.17)	

The correlation between $F_{ST}/(1-F_{ST})$ and $\text{Ln}(d)$ was significant using Euclidian distance ($r_{\text{Lnd}}=0.377$ $p < 0.001$) or taking into account major surface currents between regions ($r_{\text{Lnd}}=0.382$ $p < 0.001$), confirming the occurrence of an IBD model of gene flow (Fig. 3-2a). At the cluster scale, correlations were also significant for the Liguro-Provençal and the Catalonian clusters ($r_{\text{Lnd}} = 0.530$ $P < 0.05$; $r_{\text{Lnd}} = 0,864$ $P < 0.01$) but not for the Corsican cluster ($r_{\text{Lnd}} = 0.168$ $P = 0.39$) (Fig. 3-2b).

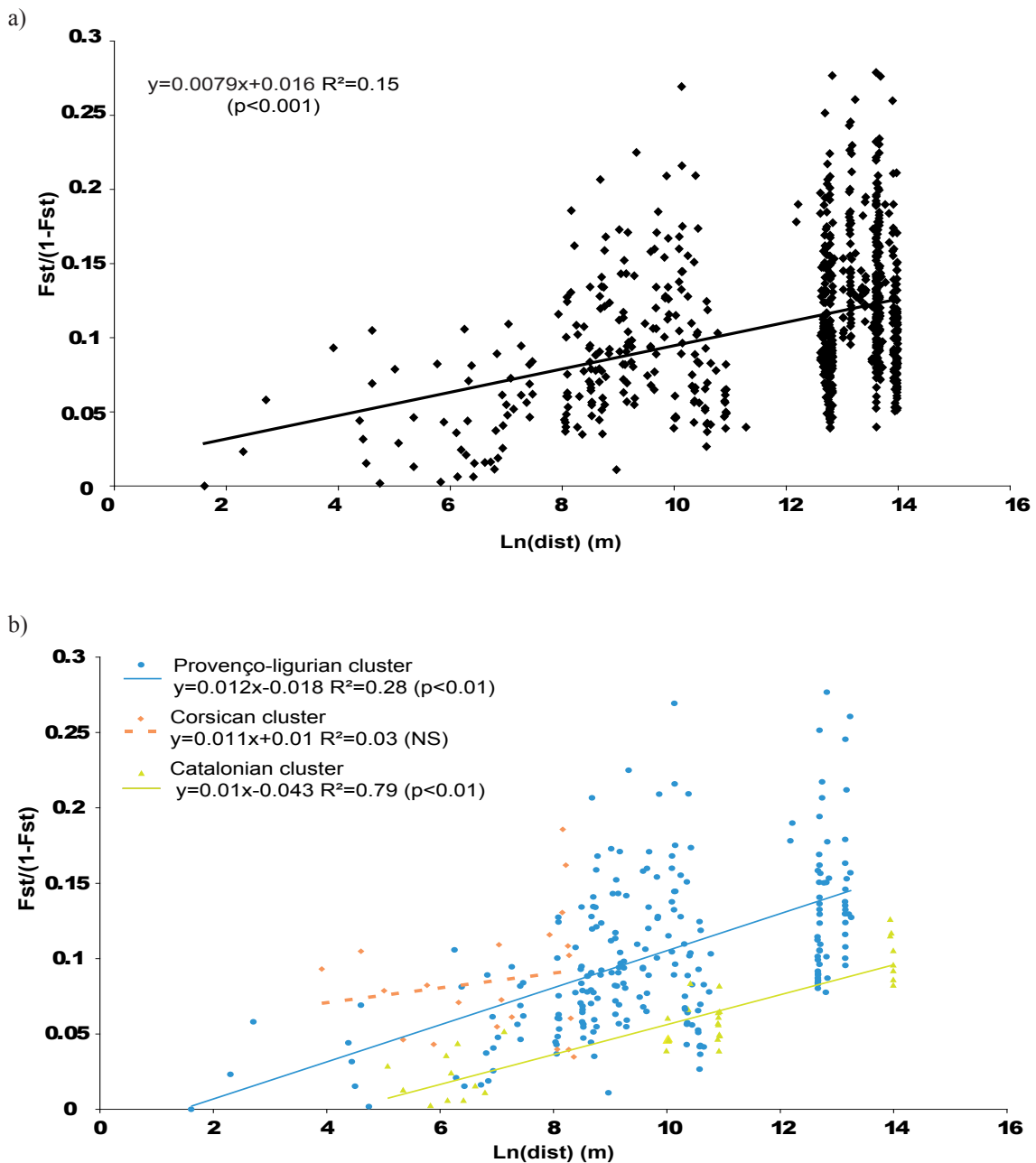


Figure 3-2: Isolation by distance pattern a) in the surveyed area, taking into account the minimum downstream distances between regions along the path of the predominant surface current and b) within each cluster. The two graphs show the linear regression of the genetic distance measured as $F_{st}/(1-F_{st})$ over logarithms of the geographic distance (m). Solid and dashed lines represent significant and non-significant regressions, respectively.

The AMOVA showed that differentiation among the 4 clusters and among samples within these clusters was highly significant. However, the percentage of total variation explained by grouping into clusters was around 3 times lower than the variation explained by the differences among samples within clusters (2.7 vs. 6.7 %, respectively). Within a cluster, 7.9, 7.8 and 4.2 % of the total variation was observed among samples whereas the variation within samples represented 92.1, 92.2 and 95.8 % for the Corsican, Liguro-Provençal and Catalanian clusters, respectively. In every case, the corresponding F-statistics were significant ($P < 0.001$) (Table 3-4).

Table 3-4: Results of the analysis of molecular variance (AMOVA):

a) on the whole dataset partitioning genetic variance among *Corallium rubrum* colonies, among samples within cluster and among clusters

b) within each identified cluster partitioning genetic variance among colonies and among samples.

Source of variation	Grouping based on Structure results for K=4			Liguro-Provençal cluster			Corsican cluster			Catalonian cluster		
	df	% of variance	P	df	% of variance	P	df	% of variance	P	DDL	% of variance	P
Among clusters	3	2.7	<0,01									
Among samples within cluster	36	6.7	<0,01	21	7.8	<0,01	6	7.9	<0,01	8	4.2	<0,01
Among individuals within samples	2404	90.6	<0,01	1314	92.2		419	92.1		551	95.8	

Clustering with STRUCTURE

During the first round of STRUCTURE, each new cluster appeared along plausible geographical boundaries for K ranging from 2 to 4 (Fig. 3-3). For $K=2$, a clear distinction was made between the 21 Liguro-Provençal samples (except PDA) and the remaining samples. For $K=3$, the N-W Corsica / Balearic samples were separated from the Catalanian ones. POR and PDA samples, which belonged to Corsican and Liguro-Provençal regions, respectively, were assigned in the cluster with Catalanian samples. For $K=4$, two different clustering solutions were observed. Based on likelihood criteria, the retained mode separated samples into four clusters that respected the four geographical regions, with the exception of POR (Corsica), which was pooled with the Catalanian samples. Samples with a mixed assignment among the four clusters (POR, PDA, BAN and SRE) were assigned to the cluster with the highest mean assignment scores. Each of these four clusters was then submitted to a second round of STRUCTURE (Fig. 3-3). For the Liguro-Provençal cluster, $K=5$ gave the solution that captured most of the structure in the data. Following geographical distribution, CAR, PDA and MON/VIL represented three clusters. The two remaining clusters were centered on RIE and PHA, and grouped quite

distant samples such as TRM and TFR. For the Corsican cluster, K=5 was selected. PUA, PZP and BCA belonged to one cluster, and each of the remaining samples represented their own group. For the Catalonian cluster, the retained solution was K=4. POR represented one cluster. BAN and SRE were grouped together. NOR was isolated in its own cluster, and POT, CDR, COV, XIC and BER belonged to the fourth one. This clustering followed the geographical partitioning of the samples. Finally, for the Balearic cluster, STRUCTURE failed to detect any structure. In every identified cluster, the mean value of alpha (admixture parameters) was relatively constant (variation of less than 0.2), confirming the existence of a real structure. This value was always inferior to 1 (mean +/- SD = 0.08 +/- 0.05 over the 2 rounds), implying that levels of admixture between identified clusters are very small.

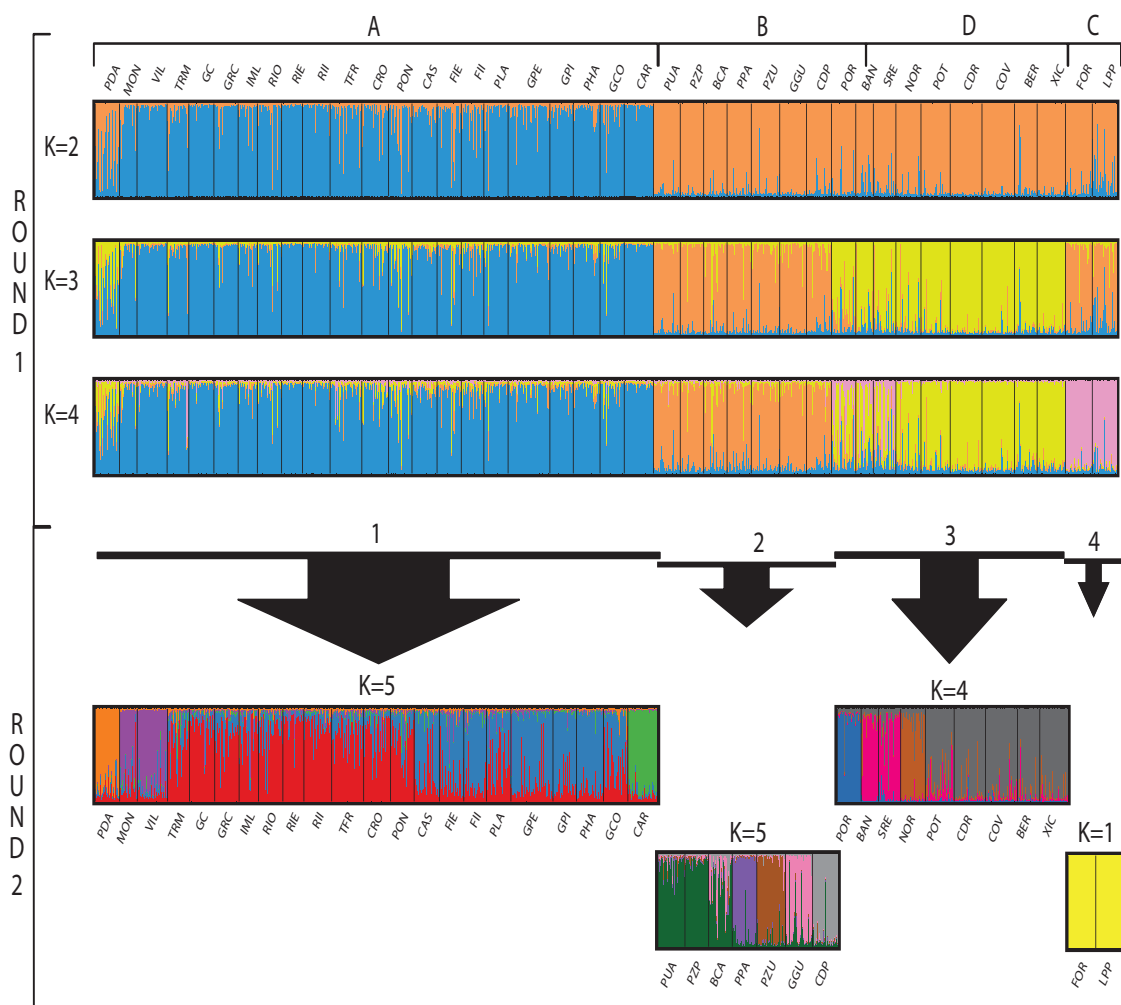


Figure 3-3: Population structure as inferred by 2 rounds of hierarchical STRUCTURE analysis. Each individual is represented by a vertical line partitioned into K-colored segments that represent the individual's membership fraction in K clusters. Each sample is delineated by black vertical lines and named as in Table 3-1. Letters correspond to the four sampled regions (A-Provenço-Liguria, B-NW Corsica, C- Balearic Islands, D- Catalonia). Numbers above the black arrows correspond to the four genetic clusters defined after the first round of STRUCTURE (1- Liguro-Provençal cluster, 2-Corsican cluster, 3-Catalonian cluster, 4-Balearic cluster).

3-4) Genetic diversity analysis

There were on average 7.4 alleles per polymorphic locus and per sample, considering 22 gene copies ($A_{rS(22)}$). At the global level, the mean $A_{rT(22)}$ was equal to 10.2 alleles per locus, resulting in a high $A_{rST(22)}$ equal to 0.3. This value was larger than the global F_{ST} value (0.097). Using the rarefaction method, 47.4 alleles (16.8%) were observed in all clusters. The Balearic cluster showed the most important private allelic richness ($A_{p(66)}$), with 41.5 alleles (14.7%) private to this cluster, followed by the Liguro-Provençal cluster with 22.2 (7.9%) and the Catalonian and Corsican clusters with 21.2 (7.5%) and 17.7 (6.3%), respectively. Values of $A_{r(66)}$ were equal to 7.1, 7.1, 7.5 and 9.3, whereas H_e values were equal to 0.74, 0.74, 0.75 and 0.81 for the Liguro-Provençal, the Corsican, the Catalonian and the Balearic cluster respectively. Only the pairwise comparisons involving the Balearic cluster were significant, indicating a higher level of genetic diversity for this cluster.

At the sample level, gene diversity ranged from 0.62 for MON to 0.83 for RIO. $A_{r(22)}$ and $A_{p(22)}$ values were scattered from 5.15 for CAR to 9.48 for FOR (Table 3-3) and from 0 for RIE and PZU to 1 for FOR. $A_{r(22)}$ was highly correlated with gene diversity (R-spearman: 0.86; df: 38; $P < 0.05$; $R^2 = 0.74$) but not with $A_{p(22)}$ (R-spearman: 0.23; df: 38; $P = 0.1426$; $R^2 = 0.05$).

Based on the Wilcoxon signed rank-test, recent changes in the effective population size were detected. Sixteen samples (Table 3-3) showed significant heterozygote deficiency compared to the mutation-drift equilibrium, revealing a putative population expansion (see discussion below).

4) Discussion

4-1) Distribution of genetic diversity from global to sample scale with a focus on the Balearic region

Genetic diversity was evaluated for the first time at three different levels: global, regional (corresponding to the four clusters defined with STRUCTURE) and sample levels. As a whole, the levels of gene diversity were high, and they were globally higher than those reported previously for the same species (Costantini *et al.* 2007b) (mean H_e by samples over loci: 0.77 vs. 0.50 and mean H_e by samples: 0.89 vs. 0.78). This discrepancy is probably due to differences in the number and identity of loci, since the two loci used in both studies show similar diversity levels. However, the present values still fall within the range of those previously reported for octocorallian species (e.g., *Corallium lauuiense*, H_e from 0.86 to 0.96 (Baco & Shank 2005)) or other cnidarian species (e.g., *Acropora palmata*, H_e from 0.58 to 0.85 (Baums *et al.* 2005)).

This high genetic diversity is not homogenously shared, since only 16.8% of alleles were found in the four clusters. This result was refined based on the large difference observed

between global $Ar_{ST(g)}$ and F_{ST} values, highlighting the fact that rare alleles tend to be clustered only in some samples (Comps *et al.* 2001). At the regional level, the particular status of the Balearic region previously suggested (Costantini *et al.* 2007b) was statistically confirmed with H_e and $Ar_{(66)}$ being significantly higher for this area. Moreover, $Ap_{(66)}$ was found to be two times higher for this cluster when compared to the other clusters. Based on these parameters, the three remaining regions (NW Corsica, Liguro-Provençal and Catalonia) were not found to be significantly different from each other. Interestingly, Rozenfeld *et al.* (2008) recently emphasized the importance of the Balearic populations of *Posidonia oceanica* as genetic suppliers for the surrounding populations. Two non-exclusive hypotheses can be formulated to explain the high genetic diversity observed for the Balearic populations of *P. oceanica* and *C. rubrum*, despite their divergent life history traits. The first hypothesis is based on contemporary oceanographic observations, by which the Balearic region is defined as a transition region between the Liguro-Provençal and the Algerian basin, each characterized by two contrasting dynamic regimes that induce highly variable hydrological conditions (García *et al.* 1994). These conditions could have led to the frequent mixing of different gene pools from the south and the north of the islands, contributing to the high level of observed genetic diversity (Rozenfeld *et al.* 2008). The second hypothesis is based on the observation that colonization processes are usually followed by an important decrease in genetic variability away from refugia (Hewitt 2000). Despite the absence of data concerning the past distribution of *C. rubrum* populations, we may hypothesize that the significantly higher genetic diversity observed for the Balearic cluster could result from the geographic proximity between the Balearic Islands and some putative glacial refugia, when compared to other regions under study. Heterogeneity in patterns of diversity is also reported at the sample level. This heterogeneity is not linked to depth or to the habitats of the samples, suggesting that these factors do not influence the levels of genetic diversity (data not shown). Although the allelic and private allelic richness are not correlated, the highest values were observed for two samples coming from the Balearic region. The independence between these two parameters underscores their complementarities and the necessity to estimate both of them. Moreover, focusing more precisely on these two parameters is essential to ensure that the widest range of existing alleles is available for future evolution (Bonin *et al.* 2007 and see below). Finally, the bottleneck analysis detected signs of population expansion (i.e. a population recovering from a past bottleneck) for sixteen samples. However, the Wahlund effect could mimic population expansion (Cornuet & Luikart 1996; Dupont *et al.* 2009). This confounding effect could therefore partially explain the observed results, since five of these sixteen samples (XIC, RIE, GCO, PUA and CRO) showed significant LD putatively linked to the Wahlund effect (Slatkin 2008). The absence of significant population reduction also needs to be treated with caution. Indeed, inertia in the loss of genetic diversity inducing inaccurate inference on recent demographic events has been observed in the case of long-lived species (Lippé *et al.* 2006; Kuo & Janzen 2004) or when IBD structure

occurred (Leblois *et al.* 2006).

4-2) Population relationships

The influence of geographical proximity on genetic relationships was demonstrated by the IBD observed over the surveyed area. This result refutes the hypothesis of an island model of dispersal previously proposed (Costantini *et al.* 2007b), and suggests the occurrence of migration-drift equilibrium among neighboring populations (Hutchison & Templeton 1999). However, despite this clinal genetic variation that could be problematic for STRUCTURE (Guillot & Santos 2009 also see Rosenberg *et al.* 2005; Chen *et al.* 2007), genetic discontinuities were revealed, putatively explaining the relatively low R^2 value (0.15) of the regression model. Indeed, the first round of clustering revealed a structure pattern that followed the geographical partitioning of the samples, and potentially also the distribution of suitable habitats (e.g. bathymetric barrier between Corsican and Balearic clusters or absence of rocky habitats between Catalanian and Liguro-Provencal clusters). The AMOVA results confirmed that the differentiation among-clusters was significant, but it was low compared to the differentiation among-samples within clusters. Two non-exclusive hypotheses could be proposed to explain this result. Microsatellites are susceptible to size homoplasy (SH) that could have consequences on inferred relationships among populations (Viard *et al.* 1998). Effective population size, mutation rates and model and divergence time between-populations, all affect SH, but most of these parameters are unknown. However, the impact of SH on assignment methods is negligible when the markers used show a high level of heterozygosity (Estoup *et al.* 2002), as observed with our dataset.

The weak regional genetic structure may also be explained by a putative inter-regional gene flow preventing divergence by genetic drift. However, this is unlikely considering the IBD revealed over the surveyed area. Alternatively, this structure could be due to the retention of an ancestral polymorphism that could be enhanced by longevity (Lippé *et al.* 2006). A shared ancestral polymorphism implies a recent split between regional clusters and/or large effective population sizes. High heterozygosity values and large amounts of null alleles could be interpreted as cues for a large effective population size (Hellberg 2007; Chapuis & Estoup 2007), but analyses of temporal samples are needed to confirm this parameter. Regarding the recent divergence hypothesis, the sea level was around 120 m lower than it is today during the last glacial maximum (LGM, 21000 BP) (Lambeck & Bard 2000). The recolonization of new habitats was mostly done gradually because of the observed IBD. *C. rubrum* is estimated to reach sexual maturity at approximately 10 years of age (Torrents *et al.* 2005). However, at least 20 years are needed to reach high reproductive potential (Garrabou & Harmelin 2002; Santangelo *et al.* 2003). These parameters therefore imply that the recolonization occurred within a maximum of 2000 generations, highlighting the relatively recent origin of these shallow populations, and potentially explaining the low genetic divergence observed between regional clusters.

The within cluster analysis emphasized the different structure patterns among the three studied regions. The subdivision of samples was indeed stronger for the Corsican than for the Liguro-Provençal and the Catalanian clusters, with, respectively, 7.9, 7.8 and 4.2% of the total genetic variation observed among samples. This is in agreement with the stronger mean assignment of individuals for the Corsican and the Liguro-Provençal clusters than for the Catalanian cluster during the first round of clustering analysis (data not shown). Based on the IBD results, these differences between the three clusters could be explained in terms of their concordance with the regional drift-gene flow equilibrium (Hutchinson & Templeton 1999). The absence of significant IBD in the Corsican cluster ($r = 0.168$; $P = 0.39$) and the wide range of the scatterplot observed for the regression model suggest a stronger impact of genetic drift in this cluster compared to the other ones, where IBD is observed putatively due to regional drift-gene flow equilibrium. As previously shown, despite these clinal variations, STRUCTURE results suggest a putative barrier to gene flow between the north and the south of the Cap de Creus in the Catalanian region. Regarding the Liguro-Provençal cluster, the eastern (PDA, MON/VIL) and CAR samples were isolated from the remaining ones, indicating putative barriers to gene flow.

4-3) Evolutionary hypothesis and consequences for conservation and management plans

The results presented above allow us to suggest an evolutionary scenario to explain the observed pattern of nuclear genetic diversity. Due to restricted dispersal abilities and IBD, we argue that recolonization from LGM refugia probably occurred mainly following a gradual process. Regarding the generation time of the species, this process is likely to have been recent, potentially inducing the retention of ancestral polymorphisms and the weak regional structure observed. At the same time, the differential reproductive success (Costantini *et al.* 2007a), combined with the localized dispersal, could induce small-scale genetic structure coupled with high heterogeneity in the distribution of nuclear genetic diversity. Small-scale studies with known spatial locations of individuals, designed to help define breeding units (e.g. Underwood *et al.* 2007) and specific samplings of cohorts to evaluate the effective size of red coral populations (e.g. Calderon *et al.* 2009) are needed to test these different hypotheses. Analyses of populations from the Algerian basin and from deep habitats, such as below sea level during the LGM, should also help to refine this evolutionary history.

The results of the present study provide information that could significantly enhance the management of shallow populations of *C. rubrum*. Because of their slow dynamics, the recovery of red coral populations from environmental disturbances should be measured in decades (Garrabou *et al.* 2001). As a complement, the strong genetic differentiation between nearby samples implies that this recovery should be mainly due to self-recruitment. The genetic diversity results obtained at different spatial scales correspond to a baseline for monitoring genetic consequences of actual global changes (Schwartz *et al.*

2007) on shallow populations of *C. rubrum*. They also represent a new step in the conservation of the red coral, since they allow the targeting of particular samples that need to be protected as putative genetic pool. In fact, despite the controversy about the role of genetic factors in species extinction (e.g. Lande 1988), genetic diversity is one of the three levels of biodiversity that need attention in regards to conservation (McNeely *et al.* 1990). Genetic diversity is indeed required for populations to evolve in response to environmental changes (Frankham 2005). Conservation of the putative adaptive diversity and evolutionary potential require preservation of the natural network of genetic connections existing between populations (Crandall *et al.* 2000). The combined action of climate changes and harvesting could induce selective genetic changes (Allendorf *et al.* 2008) and the extinction of local populations in the near future (Garrabou *et al.* 2009), resulting in the loss of genetic diversity and the isolation of populations by disrupting the IBD pattern. Protection and management plans for shallow red coral populations should therefore concomitantly address measures at local and global scales.

The first step should be the development of a marine reserve network based on the restricted dispersal abilities of the species (Palumbi 2004), and focused on areas with high density of populations or high genetic diversity, such as west of the Liguro-Provençal region, including RIO IML and CAS, or Balearic Islands, including LPP and FOR. Restoration programs could also be planned to help the recovery of local populations (Linares *et al.* 2008; Baums 2008). Bearing in mind the restricted dispersal ability of red coral, these restoration programs must consider putatively strong local adaptation (Lenormand 2002) to environmental parameters, such as depth or temperature (Torrents *et al.* 2008; Hughes *et al.* 2003). Resistance to increasing temperatures could be taken into account to choose source populations for restoration projects. Finally, scenarios available for the Mediterranean basin for the 21st century predict a dramatic increase in the frequency of heat waves (IPCC 2007; Diffenbaugh *et al.* 2007), which will particularly affect shallow populations of *Corallium rubrum*. Considering the ongoing warming, global conservation actions must be focused on the reduction of harvesting pressure. The necessity to promote large areas of harvesting exclusion on shallow habitats (0-60 m) must therefore be seriously considered through international concerted actions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The following issues are addressed:

- **Development of microsatellite loci.**
- **Impact of heterozygote deficiency on STRUCTURE outputs (Table 3-S1).**
- **Multilocus and monolocus values of Fis estimator (f) computed for each samples: Table 3-S2.**
- **Pairwise Fst values: Table 3-S3 a and b.**
- **STRUCTURE plots: Figure 3-S1.**

S1) Development of microsatellite loci

Six loci were isolated by Ecogenics GmbH (Zurich, Switzerland) from an enriched library. Size-selected genomic DNA was ligated into SAULA/SAULB-linker and enriched by magnetic bead selection with biotin-labeled (GT)₁₃ and (GATA)₈ oligonucleotide repeats (Gautschi *et al.* 2000a; Gautschi *et al.* 2000b). Of 948 recombinant colonies screened, 150 gave a positive signal after hybridization. Plasmids from 115 positive clones were sequenced and primers were designed for 22 microsatellite inserts. Of these, twelve were tested for polymorphisms and migration patterns. Finally six were retained: *Mic22*, *Mic23*, *Mic24*, *Mic25*, *Mic26* and *Mic27*. A second enriched library for the common repeat CA was purchased from Bioprofiles LTD (Newcastle University). Plasmids from 40 positive clones were sequenced. Specific primers were designed for 12 microsatellites using Primer3 v 0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000 at <http://frodo.wi.mit.edu/>). After tests of electrophoresis patterns and polymorphism levels of the 12 loci, only two were retained: *Mic13*, *Mic20*. Finally, we tested the five loci from Costantini & Abbiati (2006). Due to the high level of null alleles of these microsatellites (Costantini *et al.* 2007a, b), we designed new primer pairs using Primer3 v 0.4.0 for the 5 loci. After amplification tests, two new primer pairs were retained for population analysis: *COR9bis* and *COR46bis*, corresponding respectively to loci *COR9* and *COR46* of Costantini *et al.* (2007 a, b). Whereas no significant change was observed between results obtained using the two primer pairs for the *COR9* locus (r around 0.4 in both cases), the use of *COR46bis* resulted in an important decrease in null allele frequency (0.05 vs. 0.4). Ten new microsatellite loci (*Mic13*, *Mic20*, *Mic22*, *Mic23*, *Mic24*, *Mic25*, *Mic26*, *Mic27*, *COR9bis* and *COR46bis*) were therefore isolated

and used for population genetics analyses of *Corallium rubrum*.

S2) Impact of heterozygote deficiency on STRUCTURE outputs

S2-1) Simulated dataset

EASYPOP version 2.0.1 (Balloux 2001) was used to simulate datasets showing variable levels of heterozygosity deficiency. Four populations were simulated under hierarchical island models (2 archipelagos of 2 populations) with a combination of different levels of differentiation and inbreeding (Table 3-S1) leading to five different scenarios. For each scenario, five replicates were used. In every case, the number of individuals in each population was set to 1000, and ten loci were simulated with the uniform Kam model of evolution and a mutation rate equal to 0.0005 (Estoup & Angers 1998). As in our dataset, the total number of alleles was high (350), with maximal variability for the initial population. Five thousand generations were simulated to reach equilibrium between drift, gene flow and mutation. Finally, 30 individuals were sampled in each of the 4 populations. Levels of gene flow between populations that would result in differentiation between populations on the same order of magnitude as those observed in the real dataset were chosen (pairwise F_{ST} from 0.004 to 0.3). A combination of inbreeding and null alleles was used to simulate the origin of heterozygote deficiencies. Three different levels of selfing were used (0.1, 0.25 and 0.5) to simulate reproduction between relatives. Null alleles were simulated following Carlsson (2008). Two alleles by locus were randomly chosen and deleted from the dataset. Consequently, heterozygotes carrying the null allele became homozygotes for the alternative allele, and homozygotes for the null allele became null homozygotes. Null allele frequencies and F_{IS} values ranged from 0.02 to 0.24 and from 0.02 to 0.5, respectively, as in our dataset. STRUCTURE was run under admixture with or without separated alpha values between clusters and with the correlated allele frequency models. For each simulated dataset, a first round was conducted with five runs of 100000 burn-in followed by 250000 iterations for each K value. K was set to vary from 1 to 5. In cases where the solution of K=4 was not found, a second round of STRUCTURE was conducted on a partitioned dataset based on the most likely solution of the preceding round.

Simulated Datasets										Results	
Scenario	Selfing rate	Migration rate between archipelagos	Migration rate within archipelagos	Mean r	Mean f	Mean F_{ST} within archipelagos	Mean F_{ST} between archipelagos	Replicates	Admixture correlated same alpha	Admixture correlated separated alpha	
I		0.001	0.00001	0.16	0.21	0.1	0.22	1	2 (4)	2 (4)	
								2	2 (4)	2 (4)	
								3	2 (4)	2 (4)	
								4	4	4	
								5	2 (4)	2 (4)	
II	0.1	0.00005	0.00001	0.14	0.21	0.15	0.25	1	4	4	
								2	4	4	
								3	4	4	
								4	2 (4)	4	
								5	4	4	
III		0.001	0.00001	0.17	0.42	0.13	0.28	1	4	4	
								2	2 (4)	2 (4)	
								3	4	2 (4)	
								4	4	2 (4)	
								5	4	4	
IV	0.5	0.00005	0.00001	0.18	0.43	0.18	0.29	1	4	4	
								2	4	4	
								3	4	4	
								4	4	4	
								5	4	4	
V	0.25	0.00006	0.01	0.13	0.34	0.02	0.09	1	2	2	
								2	2	2	
								3	2	2	
								4	2	2	
								5	2	2	

Table 3-S1: STRUCTURE efficiency in cases of heterozygote deficiency: characteristics of the five simulated scenario and associated results. For each scenario, five replicate datasets were simulated using EASYPOP (I to V). r : null allele frequency; f : Weir and Cockerham (1984) estimator of F_{IS} . Final clustering results are shown for the two models: admixture with correlated allele frequency between clusters with the same or separated alphas among clusters. Each column indicates the number K of clusters obtained for a first round of analyses. The values in brackets indicate the number of clusters identified when a second round of analyses was performed.

S2-2) Results

Table 3-S1 summarizes results of the simulation study. Two models (admixture with correlated allele frequencies with the same alpha or with separated alphas) gave good results despite HW equilibrium not being met for all samples. In some cases and for both models, it was necessary to use a partitioned dataset obtained after the first round of STRUCTURE to reach a K value of 4. The first round distinguished between the two archipelagos, whereas the second round differentiated between the two populations inside each archipelago. For the 5th scenario, implying the smallest F_{ST} values (mean value over the 5 replicates $F_{ST} = 0.06$), none of the 2 models was able to find the solution $K=4$. Only the two archipelagos were identified in every case (mean F_{ST} values between archipelago = 0.08), whereas intra-archipelago clusters were not defined (mean F_{ST} value between population inside archipelagos = 0.01). Therefore, considering these results, a model with admixture allowing for separated alpha values between clusters and for correlated allele frequencies among them was chosen.

Table 3-S2: Multilocus and monolocus values of Fis estimator (f) computed for each samples. Values in bold are considered significant at a 0.05 level after FDR correction.

Samples Names	Multilocus f values	Monolocus f values									
		<i>Mic13</i>	<i>Mic20</i>	<i>Mic22</i>	<i>Mic23</i>	<i>Mic24</i>	<i>Mic25</i>	<i>Mic26</i>	<i>Mic27</i>	<i>COR9bis</i>	<i>COR46bis</i>
PDA	0.2	1	-0.3	-0.13	0.45	-0.07	0.4	-0.02	0.13	0.48	-0.1
MON	0.26	1	0.12	0.66	0.41	0.17	0.13	0.17	-0.02	0.57	0.04
VIL	0.31	0.75	0.02	0.49	0.56	0.05	0.66	0.02	0.07	0.65	0.11
TRM	0.37	1	0.13	0.54	0.73	-0.06	0.58	0.1	0.04	0.87	0.08
CAS	0.28	0.62	0.06	0.31	0.26	-0.13	0.57	0.03	0.19	0.79	0.2
FIE	0.36	0.43	-0.09	0.38	0.83	0.07	0.6	0.05	0.47	0.71	-0.02
FII	0.41	0.79	0.23	0.59	0.55	0	0.53	0.03	0.49	0.69	0.19
GC	0.31	0.92	0	0.55	0.72	-0.03	0.32	0.02	0.11	0.67	0.1
GRC	0.47	0.94	0.53	0.94	0.51	0.11	0.57	0.08	0.41	0.72	0.02
IML	0.38	0.91	0.1	0.66	0.82	0.11	0.51	0.01	0	0.73	0.05
RIO	0.41	0.84	0	0.8	0.93	0.08	0.6	-0.05	0.12	0.76	-0.01
RIE	0.21	0.92	-0.28	0.66	0.81	-0.24	0.51	-0.05	0.21	0.48	-0.12
RII	0.35	0.72	-0.11	0.76	0.71	0.09	0.5	-0.04	0.16	0.67	-0.01
PLA	0.37	0.82	0.13	0.51	0.72	-0.05	0.9	0	0.27	0.65	0.01
GPE	0.37	0.54	-0.1	0.71	0.83	0.05	0.8	-0.03	0.07	0.77	0.06
GPI	0.35	0.91	0.12	0.38	0.31	0.13	0.71	-0.08	0.47	0.68	0.06
PHA	0.32	0.88	0.24	0.41	0.8	0.09	0.72	-0.02	0.14	0.5	0.11
TFR	0.33	0.66	0	0.68	0.53	-0.05	0.8	-0.02	0.04	0.83	0.06
GCO	0.38	0.74	0.06	0.64	0.89	-0.03	0.62	-0.04	0.13	0.91	0.17
CAR	0.27	0.93	0.16	0.77	0.85	0.05	0.2	-0.04	0.08	0.49	-0.06
CRO	0.33	0.57	-0.05	0.88	0.54	0.32	0.54	-0.04	0.01	0.7	0.13
PON	0.44	0.69	0.46	0.81	0.61	-0.1	0.82	-0.05	0.55	0.62	0.29
PUA	0.25	0.59	-0.06	0.16	0.11	0.04	0.57	0.11	0.08	0.89	-0.06
PPA	0.23	0.93	0.09	0.23	-0.03	0.04	0.32	-0.02	0.16	0.68	0.05
PZU	0.35	0.48	0.2	0.1	0.26	0.09	0.48	0.05	0.66	0.88	0
PZP	0.21	0.57	-0.06	0.16	0.09	0.21	0.46	-0.06	-0.02	0.58	0.03
GGU	0.3	0.87	-0.19	0.16	0.59	0.07	0.4	0.02	0.05	0.71	0.06
CDP	0.38	0.19	0.63	0.67	0.27	0	1	0.05	0.17	0.68	0.31
BCA	0.25	0.59	-0.28	0.11	0.39	-0.02	0.63	0.03	0.02	0.92	0.04
POR	0.37	0.58	-0.07	0.93	0.09	0.07	0.58	0.03	0.25	0.79	-0.01
BAN	0.28	0.56	0.08	0.66	0.5	0.1	0.44	-0.09	0	0.71	-0.06
SRE	0.42	0.9	0.03	0.77	0.64	0.04	0.68	-0.09	0.62	0.56	0.1
NOR	0.26	0.77	0.01	0.79	0.11	0.03	0.39	-0.12	-0.02	0.8	0.07
POT	0.3	0.62	0.18	0.35	0.45	-0.07	0.24	0.14	0.38	0.59	0.07
CDR	0.28	0.64	0.26	0.2	0.66	0.13	0.1	-0.04	0.34	0.66	-0.05
COV	0.27	0.37	0.11	0.37	0.58	-0.04	0.05	-0.05	0.59	0.74	-0.05
BER	0.27	0.12	0.68	0.46	0.44	-0.06	0.2	-0.04	0.39	0.6	-0.06
XIC	0.2	0.31	0.06	0.35	0.4	-0.04	0.28	-0.06	0.33	0.57	-0.2
FOR	0.22	0.07	0.21	0.86	0.08	0.13	0.14	-0.03	0.03	0.85	-0.09
LPP	0.31	0.3	0.03	0.64	0.17	0.19	0.62	0.02	0.14	0.86	0.14

Table 3-S3a: Pairwise F_{ST} values, among which 789 are significant after FDR correction for multiple tests at 0.05 (bold = non-significant value) are shown above the diagonal. Pairwise Euclidian distances are shown below the diagonal (b). A-Provenço-ligurian region; B-Corsican region; C-Balearic Islands; D-Catalonian region.

Table 3-S3b: Pairwise F_{ST} values among which 789 are significant after FDR correction for multiple tests at 0.05 (bold = non-significant value) are shown above the diagonal. Pairwise geographical distance taking into account major surface current between regions are shown below the diagonal. A-Provenço-ligurian region; B-Corsican region; C-Balearic Islands; D-Catalonian region.

C

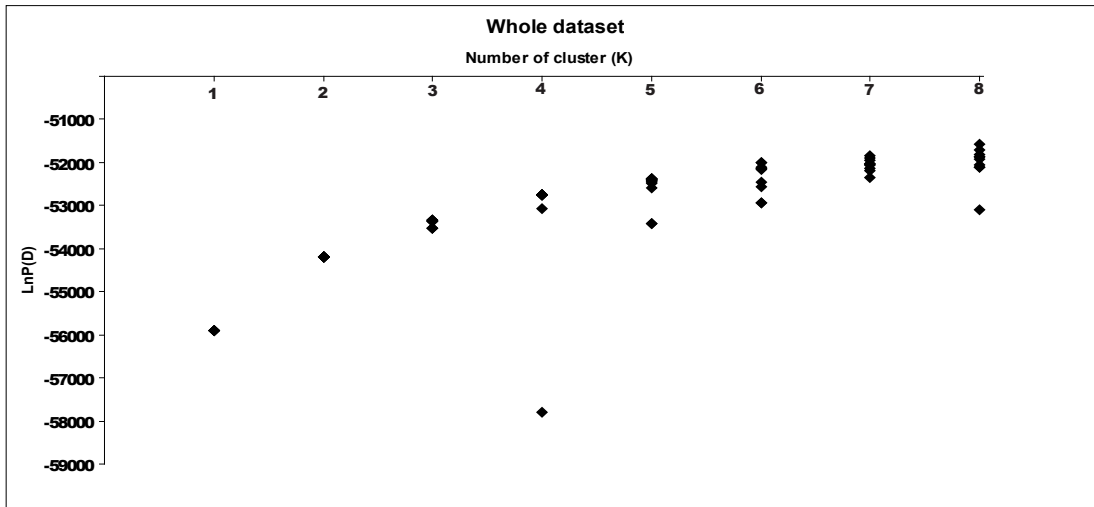
D

B

A

	VIL	MON	PDA	GC	GRC	GPE	GPI	PLA	PIO	RIO	RE	RII	FI	PHI	IML	TFR	CAS	CRO	CAR	PON	TRM	SCO	PZU	POR	CDP	PZP	BCA	PPA	PUA	GGU	NOR	XIC	POT	COV	CDR	BER	ISRED	BAN	FOR	LPP
	VIL	0.113	0.155	0.088	0.078	0.08	0.077	0.073	0.068	0.126	0.081	0.076	0.082	0.124	0.07	0.121	0.1	0.087	0.131	0.073	0.098	0.091	0.165	0.181	0.148	0.147	0.118	0.141	0.119	0.135	0.115	0.103	0.107	0.112	0.155	0.099	0.112	0.108	0.13	0.114
	MON	8.51	0.147	0.116	0.111	0.096	0.1	0.088	0.083	0.161	0.102	0.145	0.108	0.154	0.074	0.073	0.128	0.131	0.193	0.118	0.131	0.151	0.196	0.169	0.168	0.163	0.14	0.148	0.145	0.149	0.143	0.117	0.108	0.116	0.152	0.11	0.105	0.12	0.145	0.147
	PDA	166.38	158.53	0.151	0.12	0.128	0.116	0.107	0.087	0.193	0.098	0.139	0.09	0.175	0.101	0.112	0.115	0.128	0.196	0.113	0.116	0.127	0.132	0.151	0.16	0.092	0.099	0.129	0.092	0.098	0.119	0.09	0.087	0.087	0.138	0.077	0.134	0.093	0.134	0.148
	GC	198.16	206.67	357.72	0.015	0.076	0.063	0.051	0.044	0.061	0.037	0.084	0.077	0.136	0.026	0.109	0.101	0.071	0.171	0.059	0.093	0.108	0.189	0.147	0.162	0.161	0.119	0.157	0.126	0.148	0.126	0.111	0.096	0.109	0.138	0.094	0.134	0.114	0.135	0.115
	GRC	198.24	206.75	357.83	0.09	0.08	0.059	0.043	0.029	0.083	0.021	0.07	0.065	0.12	0.014	0.104	0.086	0.059	0.146	0.036	0.089	0.08	0.163	0.138	0.135	0.138	0.096	0.143	0.105	0.127	0.106	0.095	0.081	0.093	0.123	0.069	0.123	0.098	0.131	0.109
	GPE	199.58	208.09	359.11	1.66	1.75	-0.004	0.039	0.041	0.107	0.088	0.053	0.051	0.062	0.054	0.08	0.069	0.135	0.068	0.135	0.059	0.081	0.125	0.092	0.118	0.097	0.081	0.084	0.075	0.09	0.06	0.068	0.043	0.048	0.069	0.045	0.068	0.074	0.099	0.096
	GPI	199.59	208.1	359.12	1.67	1.76	0.005	0.029	0.034	0.105	0.085	0.053	0.044	0.049	0.045	0.079	0.06	0.118	0.061	0.118	0.047	0.078	0.122	0.101	0.113	0.095	0.075	0.078	0.071	0.089	0.063	0.059	0.043	0.048	0.074	0.038	0.073	0.073	0.103	0.1
	PLA	199.59	208.01	359.03	1.58	1.67	0.08	0.09	0.038	0.088	0.043	0.057	0.055	0.103	0.047	0.064	0.072	0.055	0.138	0.042	0.064	0.068	0.123	0.119	0.116	0.109	0.081	0.099	0.093	0.091	0.077	0.066	0.049	0.049	0.083	0.04	0.082	0.064	0.103	0.089
	PIO	197.53	206.04	358.61	1.12	1.03	3.15	3.16	3.1	0.066	0.005	0.051	0.036	0.07	0.017	0.056	0.055	0.041	0.111	0.026	0.052	0.046	0.102	0.086	0.091	0.073	0.039	0.072	0.062	0.069	0.048	0.046	0.045	0.049	0.075	0.037	0.073	0.053	0.075	0.066
	RIO	197.43	205.94	358.51	1.02	0.93	3.25	3.26	3.2	0.1	0.048	0.118	0.117	0.153	0.082	0.118	0.12	0.108	0.199	0.096	0.109	0.134	0.216	0.157	0.181	0.18	0.134	0.173	0.154	0.162	0.142	0.14	0.122	0.134	0.164	0.126	0.149	0.125	0.14	0.114
	RII	197.45	205.96	358.53	1.04	0.95	3.27	3.27	3.21	0.12	0.015	0.063	0.049	0.105	0.018	0.067	0.083	0.053	0.118	0.04	0.053	0.062	0.121	0.107	0.114	0.101	0.064	0.101	0.076	0.089	0.077	0.073	0.07	0.073	0.101	0.057	0.102	0.074	0.096	0.078
	FI	196.78	205.29	357.03	4.9	4.99	5.06	5.07	4.98	6.13	6.03	6.05	0.021	0.099	0.058	0.126	0.098	0.076	0.114	0.074	0.105	0.063	0.134	0.146	0.159	0.124	0.097	0.15	0.1	0.105	0.08	0.092	0.081	0.087	0.114	0.063	0.098	0.103	0.149	0.127
	FIE	196.77	205.28	357.02	4.89	4.98	5.05	5.06	4.97	6.12	6.02	6.04	0.01	0.097	0.042	0.085	0.074	0.055	0.134	0.044	0.077	0.081	0.099	0.106	0.119	0.081	0.057	0.082	0.05	0.079	0.061	0.068	0.051	0.059	0.085	0.045	0.069	0.076	0.109	0.1
	PHI	205.28	213.79	365.24	6.35	6.26	4.82	4.83	4.9	5.79	5.89	5.91	8.89	8.88	0.097	0.133	0.101	0.087	0.168	0.087	0.122	0.071	0.166	0.123	0.168	0.146	0.118	0.109	0.107	0.137	0.082	0.095	0.083	0.092	0.094	0.099	0.085	0.122	0.123	0.123
	IML	197.06	205.57	358.11	0.91	0.83	3.3	3.3	3.22	0.62	0.52	0.54	5.79	5.78	6.36	0.075	0.074	0.051	0.125	0.036	0.071	0.075	0.145	0.101	0.15	0.117	0.074	0.112	0.079	0.096	0.082	0.075	0.057	0.074	0.094	0.056	0.087	0.075	0.107	0.091
	TFR	214.8	223.31	375.51	15.97	15.88	14.45	14.46	14.53	15.41	15.51	15.63	18.51	18.5	9.62	15.98	0.101	0.103	0.17	0.092	0.084	0.114	0.141	0.124	0.149	0.101	0.081	0.093	0.094	0.084	0.099	0.077	0.08	0.083	0.11	0.072	0.09	0.074	0.106	0.107
	CAS	192.37	200.88	352.1	8.23	8.34	8.9	8.91	8.82	9.45	9.35	9.37	4.4	4.39	13.07	9.14	22.69	0.08	0.169	0.072	0.084	0.071	0.147	0.147	0.152	0.118	0.096	0.123	0.096	0.113	0.089	0.087	0.063	0.083	0.126	0.076	0.104	0.109	0.099	
	CRO	229.9	238.41	390.4	31.87	31.77	30.33	30.34	30.41	31.3	31.4	31.42	34.4	34.39	25.51	31.67	18.82	38.58	0.146	0.011	0.095	0.079	0.118	0.123	0.13	0.114	0.085	0.105	0.073	0.115	0.075	0.068	0.063	0.066	0.093	0.067	0.086	0.086	0.094	0.082
	CAR	224.08	232.59	384.61	25.29	25.5	24.06	24.07	24.14	25.03	25.13	25.15	28.13	28.12	19.24	25.6	11.23	32.31	8.26	0.145	0.134	0.102	0.185	0.206	0.183	0.176	0.147	0.146	0.162	0.148	0.135	0.16	0.166	0.157	0.179	0.13	0.156	0.151	0.183	0.164
	PON	238.12	246.63	398.23	39.76	39.67	38.23	38.24	38.31	39.2	39.3	39.32	42.3	42.29	33.41	39.77	29.98	46.48	7.86	16.12	0.084	0.084	0.125	0.126	0.109	0.102	0.07	0.108	0.07	0.107	0.066	0.066	0.054	0.066	0.092	0.054	0.079	0.079	0.094	0.089
	TRM	193.04	201.59	351.28	9.66	9.75	0.33	0.34	0.25	0.88	0.78	0.8	5.83	5.82	14.5	10.57	24.12	14.3	40.01	33.74	47.91	0.084	0.123	0.104	0.139	0.113	0.089	0.088	0.087	0.084	0.076	0.073	0.067	0.074	0.11	0.073	0.087	0.076	0.075	0.049
	SCO	205.88	214.39	365.74	6.94	6.85	5.41	5.42	5.49	6.38	6.48	6.5	9.48	9.47	0.59	6.95	9.03	13.66	24.98	18.74	32.81	15.09	0.131	0.149	0.16	0.124	0.096	0.107	0.106	0.1	0.074	0.091	0.082	0.089	0.12	0.069	0.116	0.105	0.131	0.11
	PZU	174.9	175.42	221.12	272.57	272.48	273.98	273.99	273.9	273.36	273.26	273.28	271.05	271.04	278.89	272.13	288.66	266.54	304.91	298.03	311.98	265.94	273.39	0.141	0.16	0.068	0.093	0.096	0.077	0.101	0.095	0.091	0.105	0.092	0.131	0.099	0.13	0.112	0.121	0.117
	POR	192.84	193.47	241.96	287.04	287.08	288.41	288.42	288.33	287.9	287.8	287.82	285.31	285.3	294.02	287.19	303.68	280.3	319.21	313.19	327	279.7	294.52	19.78	0.154	0.117	0.095	0.107	0.099	0.1	0.1	0.092	0.074	0.077	0.082	0.094	0.096	0.109	0.11	0.096
	CDP	177.9	178.2	224.75	273.78	273.69	275.22	275.23	275.14	274.59	274.49	274.51	272.49	272.48	280.28	273.55	290.03	266.53	305.59	299.41	313.36	280.78	3.51	16.53	0.18	0.067	0.14	0.101	0.107	0.119	0.121	0.104	0.104	0.147	0.105	0.13	0.113	0.138	0.129	
	PZP	174.95	178.5	221.04	272.82	272.83	273.93	273.94	273.85	273.31	273.23	271	270.99	278.84	272.08	288.61	266.49	304.76	297.98	311.93	265.89	273.34	0.05	19.73	3.49	0.038	0.073	0.041	0.063	0.073	0.041	0.063	0.067	0.079	0.072	0.102	0.07	0.113	0.1	0.102
	BCA	178.12	178.5	225.12	273.83	273.74	275.25	275.26	275.17	274.84	274.74	274.76	272.49	272.48	280.37	273.65	290.12	266.65	273.88	299.5	313.45	266.05	280.87	3.93	15.97	0.56	3.91	0.057												

A



B

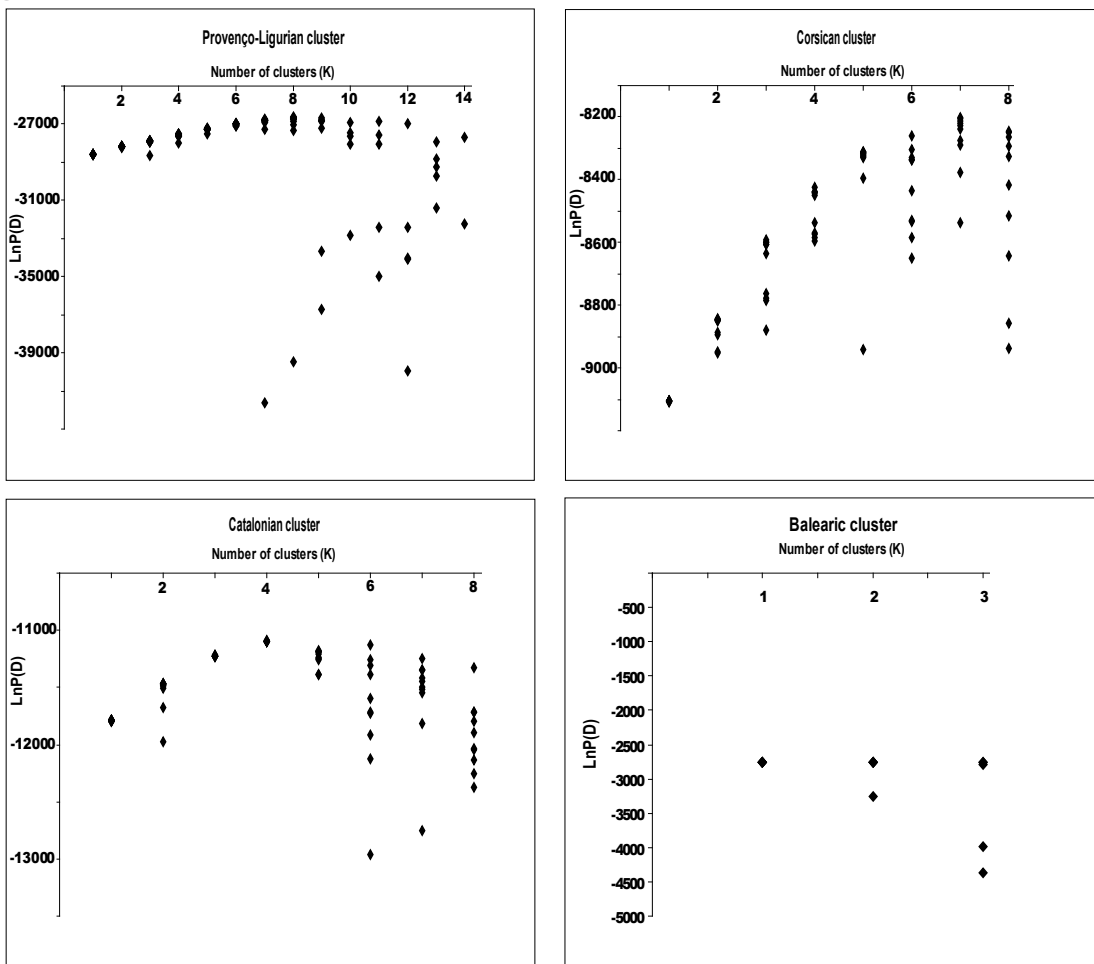
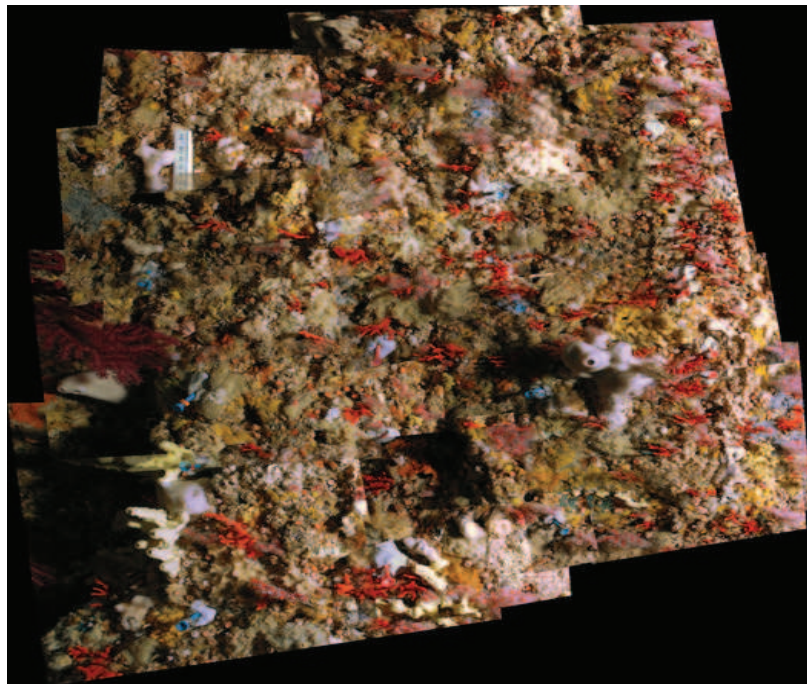


Figure 3-S1: Logarithm of the likelihood values as a function of the number of cluster K . Likelihood values are the result of 10 runs for each K value. A) Results from the first round (with whole dataset) of STRUCTURE are shown. B) Results from the second round of STRUCTURE using a partitioned dataset defined previously with $K=4$.

Chapitre 4

Structure génétique à petite échelle géographique et inférences sur la biologie des populations du corail rouge

« Où il est question de colonies de corail rouge, de photogrammétrie et de microsattellites, de structure génétique spatiale entre individus, de taille de voisinage et de dispersion efficace, d'unité de reproduction, de colonies sexuellement matures ou pas, de leur relation de parenté, de reproduction multiple, de consanguinité, de structure génétique temporelle et d'un effet de dérive génétique, de biologie des populations et bien entendu de conservation. »



1) Introduction

The *population* is a central concept in biology. However, the identification of population boundaries and, consequently, inferences on their biology are not straightforward and depend on whether the adopted paradigm is ecological (focused on demographic cohesion) or evolutionary (focused on reproductive cohesion) (see Waples & Gaggiotti 2006; Waples *et al.* 2008 for discussion). Defining population boundaries is particularly problematic in marine species (Tracey *et al.* 1975; Johnson & Black 1982; David *et al.* 1997; Whitaker 2004) and even more so in long-lived sessile species (Ayre & Hughes 2000; Underwood *et al.* 2007) in which heterozygote deficiencies at a small geographical scale challenge the evolutionary definition of populations that are usually based on panmixia (i.e. random union of gametes) and non-overlapping generations (Whitlock & McCauley 1990). Moreover, the larval phase and reproductive features in most of these species reduce the efficiency of traditional demographic approaches (Féral 2002). Therefore, despite their major theoretical implications (Palumbi 2004), questions related to the spatial and temporal continuity of populations are still debated in the marine realm, particularly from a conservation perspective (Palumbi 2003).

In this context, recent advances in methods for genetically based estimation of dispersal are promising (Broquet & Petit 2009). Dispersal plays a crucial role in the spread of populations and in their biology (Epperson 1995) because it has important consequences for reproductive strategies and on demographic interactions between individuals (Ronce 2007). Focusing on the isolation by distance (IBD) model (Wright 1943; Malécot 1950), Rousset (1997, 2000) demonstrates that the product of the dispersal rate and population density (so-called “neighborhood size” (Nb) see Rousset 1997, 2004 for discussion) can be accurately inferred from genetic data (see also Hardy & Vekemans 1999; Vekemans & Hardy 2004), which is consistent with more recent studies showing that genetic estimations of Nb are in good agreement with demographic ones (e.g. Broquet *et al.* 2006). This method has often been used in studies on terrestrial plant or tree species (e.g. Born *et al.* 2008) because it allows a determination of the strength of spatial genetic structure (SGS) and inference of the extent of the main genetic interactions between continuously distributed organisms. These studies have shown that SGS is significantly related to mating system, demonstrating that selfing species are characterized by higher SGS and, therefore, reduced dispersal compared to outcrossing species (Vekemans & Hardy 2004). In contrast, only a few studies of SGS have been conducted in the marine realm, and therefore, we still have little understanding of the scale at which SGS may occur in this environment (Palumbi 2004). Moreover, such studies have mainly focused on species with complex reproductive biology, including clonality (Calderon *et al.* 2007; Blanquer *et al.* 2009) or selfing (Underwood *et al.* 2007; Maier *et al.* 2009). The occurrence of SGS in strictly outcrossing species has not been investigated so far.

In addition to spatial spread, the temporal continuity of populations is also an open ques-

tion in the marine realm (e.g. Calderon *et al.* 2009). In long-lived species with overlapping generations, temporal fluctuations of allele frequencies are expected due to differential contributions of the distinct generations involved in a given reproductive event (Dupont *et al.* 2007). Studying these temporal genetic changes constitutes an important step towards characterizing recruitment variability (Selkoe *et al.* 2006) and evaluating the level of genetic drift (Planes & Lenfant 2002).

The red coral, *Corallium rubrum*, is a long-lived sessile octocorallian species with a fragmented distribution centered mainly in the western Mediterranean Sea. It inhabits semi-dark to dim light rocky benthic habitats such as caves and coralligenous overhangs between 5 and 800m in depth (Laborel & Vacelet 1961; Zibrowius *et al.* 1984; Costantini *et al.* 2010). It has been harvested since Antiquity for its use in jewelry, and its shallow populations (5-50m depths) were recently affected by mass mortality events putatively linked to positive thermal anomalies due to climate change (Garrabou *et al.* 2009). *Corallium rubrum* is a gonochoric (Lacaze-Duthiers 1864), brooding species with an annual reproductive cycle (Vighi 1970, 1972), a balanced sex-ratio (Tsounis *et al.* 2006; Torrents 2007) and limited capability for asexual reproduction (Garrabou *et al.* 2001). Sexual maturity is reached at approximately 10 years of age (Torrents *et al.* 2005), but it only reaches high reproductive potential after 20 years (Garrabou & Harmelin 2002; Santangelo *et al.* 2003). It is characterized by a promiscuous mating system (*sensu* Karl 2008) with internal fertilization. Spermatozoa released into the environment by sire colonies fertilize oocytes retained in the polyps of the female colonies (Vighi 1970, 1972). After approximately 30 days of development within the female polyps (Vighi 1970, 1972), a lecithotrophic planula larva is released. The following larval phase extends between 4 and 12 days *in aquaria* and probably less in the field (Weinberg 1979; Grillo & Chessa 1992). These restricted dispersal features are reflected in the frequent aggregative distribution of red coral colonies (Harmelin 1985), which are designated as “site” in the following text. These characteristics were formally demonstrated using genetic approaches that highlighted a strong pattern of differentiation between sites separated by ten meters (Costantini 2007a, b; Ledoux *et al.* 2010) with an IBD model of gene flow (Ledoux *et al.* 2010). In these studies overall, large deviations from panmixia leading to heterozygote deficiencies were observed within the sampled sites (Abbiati *et al.* 1993; Costantini *et al.* 2007a, b; Ledoux *et al.* 2010). Costantini *et al.* (2007a) suggested that the combination of null alleles, inbreeding and spatial or temporal Wahlund effects could be responsible for these heterozygote deficiencies, which are observed even within areas of one square meter. Nonetheless, an accurate characterization of the ecological and evolutionary forces acting at this scale is still lacking.

Therefore, the major goal of this study was to define the extent of a population of *Corallium rubrum*. We put particular emphasis on the characterization of local dispersal (i.e. acting within site) occurring during the gamete and larval phases. We conducted our study on an area of approximately half a square meter, a scale that has only rarely been investi-

gated previously (but see Grosberg 1991 for an example in the ascidian *Botryllus schlosseri*). We used an exhaustive and individual-based sampling scheme and 12 microsatellite loci to address four main objectives: 1) to thoroughly define the correlation between genetic and spatial distances at this spatial scale; 2) to characterize demographic parameters linked to local dispersal; 3) to test for the temporal stability of the studied gene pool; 4) to analyze the kin structure of the sample and, therefore, characterize some aspects of the reproductive biology of the red coral. Our results showed the occurrence of SGS over the small area investigated (i.e. $< 1 \text{ m}^2$) for the first time in the marine realm and allowed us to discuss a number of features of the population biology of *Corallium rubrum*. These results also have important implications for the evaluation of the capacity of the red coral to adapt to a changing environment (Bell & Gonzalez 2009).

2) Material and methods

2-1) Sampling and photogrammetric methods

We exhaustively sampled (see Ledoux *et al.* 2010 for details on sampling) and mapped 81 colonies dwelling at a depth of 15m in an area of approximately 0.5 m^2 ($70 \times 69 \text{ cm}$) in the Grotte Pérès ($43^\circ 11' 12.96'' \text{N}$, $5^\circ 23' 25.04'' \text{E}$; Fig. 4-1a). This cave is characteristic of disturbed and harvested shallow sites with a high density of small colonies (Linares *et al.* 2010) and a mean diameter and height equal to $3.7 \pm 1.6 \text{ mm}$ and $20.5 \pm 10.6 \text{ mm}$ (mean \pm SD here and in the following text), respectively (Bianchimani 2005). This site was chosen mainly considering the feasibility of sampling. To map the colonies, we used underwater high-resolution photographs obtained using a Nikon D70 camera with housing and two electronic strobes. Previously, 25 permanent marks placed every 15-20 cm were fixed into the rock at the site with epoxy putty, forming a grid on the sampling area. Photographs (each covering about 300 cm^2) were taken with a high degree of overlap to ensure that several photographs covered different areas but showed the same permanent marks. They were analyzed with photogrammetric methods, which allow for a precise acquisition of spatial data compared to classical *in situ* measurement methods (Bythell *et al.* 2001). We first created a composite image of the whole sampling area under the same reference system using the position of the permanent marks. Second, we determined the position of the 81 colonies within the sampling area (Fig. 4-1b), and we measured pairwise distances between colonies. We also measured the maximum diameter and height for each colony to define their reproductive status (i.e. mature vs. non-mature) and stage-class membership. These procedures were carried out with PHOTOMODELLER v.6 (Eos Systems Inc.).

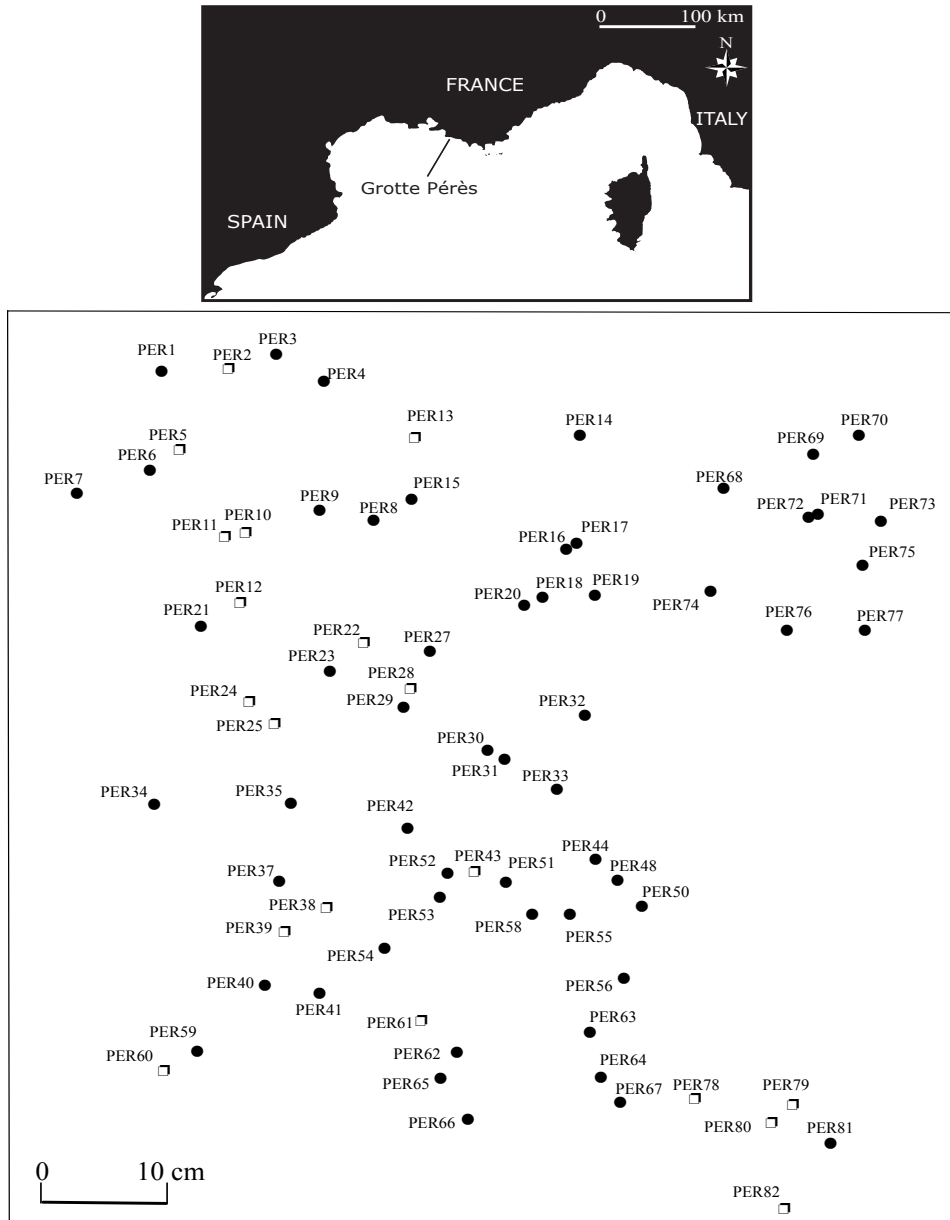


Figure 4-1: a) Location of the Grotte Pérès. b) Map of the sampled colonies of *Corallium rubrum* in the study area. Only the 75 genetically different individuals, corresponding to 19 non-mature (□) and 56 mature colonies (●), are shown.

2-2) Reproductive status and stage-classes assignment

The main issue of this assignment procedure was to define stage-classes that were likely linked by ancestor-descendant relationships to test kinship and temporal genetic structures (see below). To achieve this aim, we first defined the reproductive status of the colonies and then estimated ages of the mature ones. A colony was considered sexually mature if its diameter or height were greater than 3.6 mm and 24 mm, respectively, following Torrents *et al.* (2005). Unfortunately, we could not obtain measurements for

13 colonies (17%) due to their complex shapes, their position relative to other colonies or substrate ruggedness. In these cases, the reproductive status was, therefore, assessed visually relative to the measured colonies. In a second step, we estimated the age of the mature colonies that had unambiguous diameter measurements. This ageing technique was possible because a positive correlation exists between diameter and the age of the colonies (Marschal *et al.* 2004). We used the growth rate in the diameter of mature colonies at the study site ($0.22 \pm 0.07 \text{ mm} \times \text{year}^{-1}$) that was previously estimated (Torrents 2007) using the ageing method of Marschal *et al.* (2004). Once the ages of these mature colonies were determined, we divided them in two stage-classes based on two criteria: 1) age at first reproduction, defined at around 10 years (Torrents *et al.* 2005); and 2) age for high reproductive potential, reached at around 20 years (Garrabou & Harmelin 2002; Santangelo *et al.* 2003). Thus, in addition to stage-class 0 (C0), corresponding to non-mature colonies (i.e. 0 to 10 years old), stage-class 1 (C1) corresponded to recently mature colonies (i.e. 10 to 20 years old) and stage-class 2 (C2) to fully mature colonies (i.e. > 20 years old). Considering the differences in size between the three stage-classes defined here (see results), individuals from stage-class 1 were old enough to be considered as potential parents for class 0; and this was also the case for stage-class 2 compared to stage-classes 0 and 1.

2-3) Microsatellite genotyping

DNA extractions were carried out following Ledoux *et al.* (2010). We used 12 microsatellite loci. Ten of them were amplified and analyzed following Ledoux *et al.* (2010). The two remaining loci, *COR48* and *COR58* (Costantini & Abbiati 2006), were amplified following Costantini *et al.* (2007a) with an additional last extension step of 72°C for 20 min and were multiplexed before electrophoresis.

2-4) Identification of multi-sampled individuals

Because some colonies were closely related in space, inducing putative multiple sampling of the same individual, we first used GIMLET v.1.3.3 (Valière 2002) to define the number of different individuals or multilocus genotypes in our sample. We computed the unbiased probability of identity (P_{ID} , Kendall & Stewart 1977) that two individuals in the sample share the same multilocus genotype by chance and not by descent. Thus, the following analyses were conducted considering a final dataset of 75 different multilocus genotypes (see results).

2-5) Locus characteristics and Hardy-Weinberg equilibrium

Frequencies of null alleles (r) were estimated for each locus by the expectation maximization algorithm (Dempster *et al.* 1977) implemented in FREENA (Chapuis & Estoup 2007). The total number of alleles (N_a), observed (H_o) and unbiased expected heterozygosity (H_e , Nei 1973) were calculated for each locus using FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2001).

We tested the null hypothesis of linkage equilibrium for each pair of loci in the sample with an exact test. Departure from panmixia was tested for each locus and for the whole sample using the score test for heterozygote deficiency. Significance was addressed in the two cases using a Markov-chain (MC) algorithm (Guo & Thompson 1992; Raymond & Rousset 1995) with default parameters. The f estimator of F_{IS} (Weir & Cockerham 1984) was computed for each locus separately and for all loci. Computations were done using GENEPOP 4.0 (Rousset 2008).

2-6) Genetic homogeneity of the sample

We tested for the occurrence of major temporal or spatial genetic discontinuities in the sample using the Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), and we looked for putative first-generation migrants using a Bayesian assignment method (Rannala & Mountain 1997) implemented in GENECLASS2 (Piry *et al.* 2004).

We further looked for temporal structure by testing genotypic differentiation between the three stage-classes (C0, C1, C2) using an exact test in GENEPOP. Significance was addressed using an MC algorithm with default parameters. We then performed analyses of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) using GENALEX v.6.3 (Peakall & Smouse 2006) and including three hierarchical levels: within colonies (i.e. within individuals), among colonies within stage-classes (i.e. among individuals within groups) and among stage-classes (i.e. among groups). Significance was addressed using 9999 permutations of the original data.

2-7) Spatial genetic structure and demographic parameters

Spatial autocorrelation

The genetic distances between individuals were estimated using Rousset's genetic distance \hat{e} (Watts *et al.* 2007) with GENEPOP and regressed on the natural logarithm of the distance between colonies ($\ln(d)$). The 95% confidence interval (CI) of the regression slope ($b_{L(d)}$) was obtained using a non-parametric bootstrap procedure (DiCiccio & Efron 1996; Leblois *et al.* 2003), and its significance was tested using a Mantel test with 5000 permutations.

Following Castric & Bernatchez (2001), we highlighted the rise of the SGS by progressively including pairs of individuals separated by increasing distances, arbitrarily choosing a step size of 4 cm. We therefore performed 21 regression analyses for increasing distance classes ranging from 0-84 cm (i.e. the maximum distance value between individuals). We tested the significance of the slope for each regression using a permutation procedure equivalent to a Mantel test (Hardy & Vekemans 2002). For each regression, individual locations were, therefore, permuted (N=5000) using the resampling procedure implemented in POPTOOLS v.3.1.0 (Hoods 2000 www.cse.csiro.au/poptools/).

Demographic parameters: “neighborhood size” and gene dispersal estimates

In a two-dimensional model of IBD, Nb can be approximated as $Nb = 4\pi D_e \sigma_g^2$, where D_e is the effective density, and σ_g^2 is the mean square parent-offspring distance. It is also directly linked to the slope of regression between \hat{e} and $\ln(d)$ because $Nb = 1/b_{L(d)}$ (Watts *et al.* 2007). Despite the fact that our sampling scheme was not ideal in regard to theoretical assumptions (i.e. sampling over a $10\sigma_g \times 10\sigma_g$ area see Rousset 2000; Hardy & Vekemans 2004), Leblois & Rousset (2003, 2004) showed that σ_g is robust to departures from most of the model assumptions, such as the sampling scale or homogenous and constant effective density. Therefore, the regression based on the whole dataset was used to compute a moment estimate of σ_g . D_e was approximated based on the relationship $D_e = D \times N_e / N$ (Hardy & Vekemans 2004), where D is the census density of mature individuals, and N_e and N are the effective and the census population sizes, respectively. We sampled 75 different colonies on an area of 0.48 m^2 and, therefore, approximated the total density of the site at $160 \text{ colonies} \times \text{m}^{-2}$. Seventy-five percent of these colonies were considered as sexually mature (see Results), with a resulting density of around $120 \text{ mature colonies} \times \text{m}^{-2}$. Because N_e/N is unknown for *Corallium rubrum*, we adopted two different values considering that all or only 50% of the mature colonies were involved in the reproductive effort (i.e. $D_e = D = 120 \text{ colonies} \times \text{m}^{-2}$ or $D_e = 0.5 \times D = 60 \text{ colonies} \times \text{m}^{-2}$). Despite the fact that these values were probably overestimates at the species level, we considered that they were relevant at the studied scale.

2-7) Kinship structure

We analyzed the relationships between individuals and characterized some parameters of the mating system using the maximum likelihood approach implemented in COLONY v.2.0 (Wang 2004; Wang & Santure 2009), which assigned parentage and sibship from individual multilocus genotypes. Four categories of relationships were considered: unrelated, half-sibling, full-sibling and parent-offspring. The method uses a group-likelihood ratio to partition individuals into full- and half-sibling families accounting for genotyping errors. Because age estimates based on diameter size were not available for all colonies, the analysis focused on the colonies belonging to stage-class 0 and stage-class 1 during two different rounds of analyses. For the 19 colonies belonging to stage-class 0, we considered the remaining 56 mature colonies (i.e. C1 + C2 + unassigned but mature colonies) as candidate male and female parents, whereas for the 19 stage-class 1 colonies, the 37 remaining mature colonies (i.e. C2 + unassigned but mature colonies) were considered as candidate male and female parents. The locus-specific null allele rates computed with FREENA were used as the allelic dropout rate (Jones *et al.* 2010), and only the eight loci with null alleles frequencies less than 0.3 were retained (Wang 2004). The rate of other kinds of errors, such as miscalling or false alleles, was evaluated on a larger dataset based on extraction and genotyping replicates of 100 individuals (Ledoux *et al.* 2010). We assumed polygamous mating systems for both males and females and used the full-likelihood

method. The analysis was run five times with five different random seed numbers to check the robustness of our results. To ensure that convergence was obtained, only relationships with a probability higher than 0.9 over the five runs were considered.

We then compared the geographic distance for each category of relationship (parent-offspring, half-sib and unrelated) using a non-parametric Kruskal-Wallis test.

Significance levels were corrected using a false discovery rate (FDR) correction for multiple tests (Benjamini & Hochberg 1995) when necessary.

3) Results

3-1) Identification of multi-sampled individuals

Three multilocus genotypes were shared between eight colonies that were closely related in space. The probability of identity was 9.45×10^{-16} . Shared genotypes were considered as belonging to the same individual and included only once, resulting in a final dataset of 75 different multilocus genotypes.

3-2) Reproductive status and stage-class assignment

Of the 75 colonies, 19 (25%) were considered non-mature based on photogrammetric measures or visual assessments. Within the remaining 56 mature colonies, 30 diameter measures were considered accurate enough to assign the corresponding colony to a stage-class. Concerning the age estimation of these 30 colonies, 19 were assigned to C1 (mean diameter size = 3.6 ± 0.8 mm) and 11 to C2 (mean diameter size = 6.9 ± 2.1 mm).

3-3) Locus characteristics and Hardy-Weinberg equilibrium

Null allele frequencies ranged from 0 for *Mic26* and *Mic24* to 0.53 for *COR58*, with a mean value equal to 0.22. The occurrence of null alleles can bias our results because they generally induce an overestimation of genetic distance (Chapuis & Estoup 2007), and they can affect kin assignment (Dakin & Avise 2004). However, the following results were mostly consistent with those obtained when we used the INA dataset corrected for null alleles (Chapuis & Estoup 2007) or when only the six loci with lowest level of null alleles (i.e. $r < 0.15$ see Table 4-1) were considered (not shown).

All loci were polymorphic with a total number of alleles ranging from 3, for *Mic13*, to 28, for *Mic27*, with a mean value of 13 alleles per locus. The observed and unbiased expected heterozygosity varied respectively between 0.09, for *Mic13*, and 0.89, for *Mic26*, (mean value over loci = 0.50 ± 0.28) and between 0.47, for *Mic13*, and 0.93, for *Mic27*, (mean value over loci = 0.77 ± 0.15). One pair of loci (*Mic20-Mic22*) was in linkage disequilibrium after FDR correction. Locus values of the F_{IS} estimator varied between -0.09, for *Mic20*, to 0.80, for *Mic13*. Deviation from panmixia was observed for nine out of the

twelve loci (Table 4-1) after FDR correction. The multilocus value of the F_{IS} estimator was equal to 0.35, and the deviation from panmixia was significant ($P < 0.001$).

Table 4-1: Locus characteristics: N_a : number of alleles per locus; r : null allele frequency; H_o : observed heterozygosity; H_e : gene diversity (Nei 1967); f : Weir and Cockerham (1984) estimator of F_{IS} (*: significant deviation from panmixia after FDR correction at 0.05; ***: significant deviation from panmixia at 0.01).

	N_a	r	H_o	H_e	f
<i>Mic13</i>	3	0.27	0.09	0.47	0.80*
<i>Mic20</i>	7	0.02	0.57	0.52	-0.09
<i>Mic23</i>	10	0.49	0.21	0.69	0.70*
<i>Mic24</i>	13	0	0.69	0.71	0.03
<i>Mic22</i>	5	0.36	0.33	0.75	0.56*
<i>Cor46bis</i>	12	0.08	0.71	0.8	0.10*
<i>Mic25</i>	10	0.5	0.26	0.81	0.68*
<i>Cor48</i>	14	0.11	0.66	0.86	0.23*
<i>Cor58</i>	12	0.53	0.20	0.86	0.77*
<i>Cor9bis</i>	21	0.23	0.47	0.89	0.47*
<i>Mic26</i>	21	0	0.89	0.91	0.02
<i>Mic27</i>	28	0.02	0.88	0.93	0.05*
Mean value	13	0.22	0.5	0.77	0.35***

3-4) Genetic homogeneity of the sample

We assumed that there was no major genetic discontinuity in our sample because only one cluster was detected by STRUCTURE, and only one individual (PER9) was detected as a putative first-generation migrant (not shown). The following results did not change when PER9 was removed.

Pairwise genotypic differentiation tests between the three stage-classes were marginally (C0 vs. C2: $P = 0.06$) or highly significant (C0 vs. C1 and C1 vs. C2: $P < 0.05$) with low F_{ST} values (mean value = 0.012; Table 4-2a), putatively explaining why these genetic discontinuities were not detected with STRUCTURE. The AMOVA analysis showed that only 1% of variation was found between these stage-classes whereas 39.8% and 59.2% were found within colonies and among colonies within stage-classes, respectively. All values were significant ($P < 0.05$; Table 4-2b).

Table 4-2: Temporal genetic structure: a) Pairwise genotypic differentiation between the three stage-classes: F_{ST} and P values are shown below and above the diagonal line (*: significant at 0.05 after FDR correction); b) Results of the AMOVA partitioning genetic variance among the three stage-classes, among colonies within stage-classes and within colonies of *Corallium rubrum* (d.f.: degree of freedom; %: percentage of variance; P : P value; * significant at 0.05 after FDR correction).

a)

	C0	C1	C2
C0		0.004*	0.06
C1	0.018		0.004*
C2	0.001	0.018	

b)

Source	d.f.	%	P
Among stage-classes	2	1	0.017*
Among colonies within stage-classes	46	39.8	0.001*
Within colonies	49	59.2	0.001*

3-5) Spatial genetic structure and demographic parameters

The slope of the regression between genetic and geographical distances was equal to 0.013 (95% CI: 0.005-0.037) and significant ($P < 0.05$), showing the occurrence of IBD at the very small scale considered (Fig. 4-2; Table 4-3). Our restricted regression analysis demonstrated that this IBD arose from the distance of 24 cm. The slope values for the distance classes beyond the fifth one (0-20 cm) were significantly different from 0 after FDR correction.

Based on the whole dataset, the “neighborhood size” was estimated at 75 individuals (95% CI: 27-200 individuals), resulting in a σ_g of 22.6 cm (95% CI: 13.5-36.8 cm) and 32.1 cm (95% CI: 19.2-52.4 cm) for $D_e = D$ or $D_e = 0.5*D$, respectively (Table 4-3).

Table 4-3: Summary statistics for the linear regression analysis between geographic ($\ln(d)$) and genetic (\hat{e}) distances between pairs of colonies of *Corallium rubrum* and related demographic parameters with their 95% confidence interval (*: $P < 0.05$).

	Computed value	95% CI interval
Slope	0.013*	0.005-0.037
Intercept	0.041	
Nb (individuals)	75	27-200
σ_g (cm) for $D_e = 120$ colonies/m ²	22.6	13.5-36.8
σ_g (cm) for $D_e = 60$ colonies/m ²	32.1	19.2-52.4

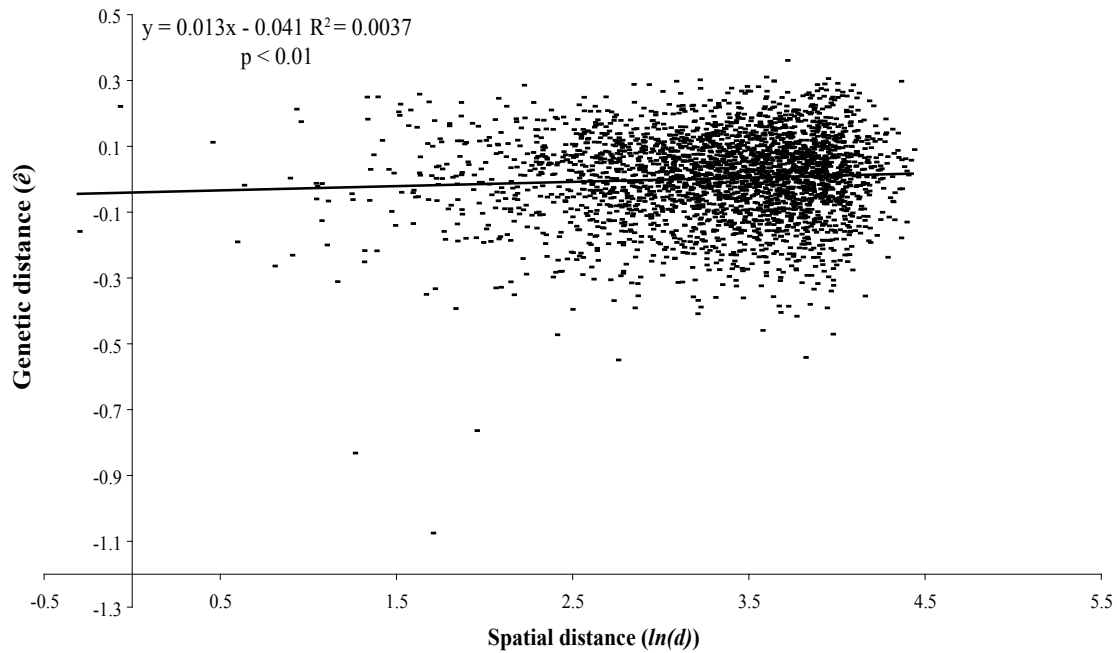


Figure 4-2: Linear regression between the geographic ($\ln(d)$) and the genetic (\hat{e}) distances between pairs of colonies of *Corallium rubrum*.

3-6) Kinship structure

Over the 171 dyads considered in each stage-class analyzed, bearing in mind that we only retained relationships with a probability > 0.9 over the five runs, we obtained 18 half-sib dyads (10.5%) for C0 and 16 half-sibs (9.4%) for C1. No full-sib relationship was observed. The resulting pedigrees showed that 15 and 16 colonies were kin-related, corresponding respectively to 78.9 % of the 19 colonies sampled for C0 and 84.2% of the 19 colonies sampled for C1. Moreover, 5 parent-offspring dyads involving 3 different candidate parents were inferred for C0, and 4 parent-offspring dyads involving 3 candidate parents were inferred for C1. These results demonstrated the occurrence of a half-sib family structure. Accordingly, each putative mother or father was assumed to have been involved in multiple mating events, producing 2.3 ± 0.8 offspring on average.

Geographic distances of the three relationship categories were significantly different (Kruskal-Wallis test: $H = 10.65$; d.f. = 2; $P < 0.05$), showing an increase in distance from parent-offspring (18.0 ± 17.9 cm) to half-sib (27.8 ± 16.4 cm) to unrelated (33.3 ± 16.2 cm) dyads (Fig. 4-3).

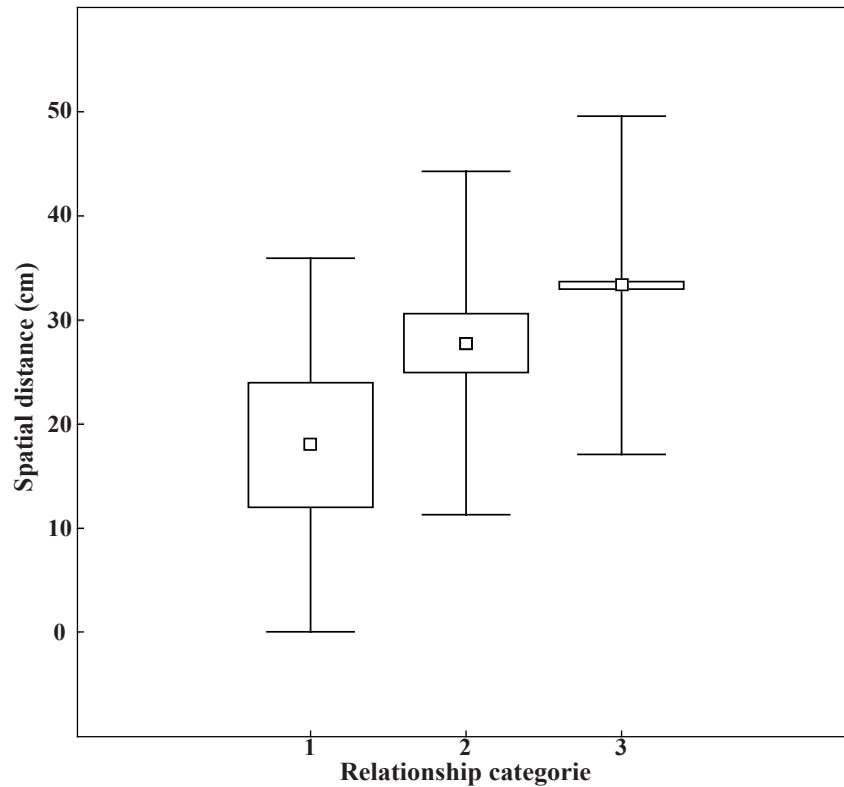


Figure 4-3: Mean values (\square) of distances separated pairs of parent-offspring (1), half-sib (2) or unrelated (3) colonies. Boxes and bars respectively represent standard error and standard deviation.

4) Discussion

The present study is the first to demonstrate the occurrence of significant spatial and temporal genetic structure between individuals over half a square meter in *Corallium rubrum*. At this fine scale, assuming that the markers used are neutral, the observed SGS likely results from “the formation of local pedigree structure as a result of limited gene dispersal and local random genetic drift, that is the “isolation-by-distance” process” (Wright 1943).

4-1) Spatial genetic structure and gene dispersal

We demonstrated that proximate colonies are more genetically alike than colonies further apart using two methods (regression-based and kin structure analyses). Isolation by distance within a site of sessile marine organisms has already been reported in a number of species (*Crambe crambe* Calderon *et al.* 2007; *Seriatopora hystrix* Underwood *et al.* 2007; *Scopalina lophyropoda* Blanquer *et al.* 2009). However, our results are original in this respect because they revealed the occurrence of IBD at a very fine scale in a gonochoric and strictly outcrossing species. Accordingly, this reinforces the view that restricted dispersal of larvae is more common than was previously thought based, for example, on the “collection of larvae of coastal species far out at sea” (Cowen & Sponaugle 2009).

A small “neighborhood size” of 75 individuals characterized this pattern of IBD. Based on this result, we analyzed the local dispersal of the red coral. The two considered values of D_e led to comparable estimates of the mean axial parent-offspring distance (σ_g), ranging between 22.6 cm and 32.1 cm. While there is no available direct estimate of the larval dispersal distance for the red coral, experiments *in aquaria* have suggested a low swimming capability and geonegative behavior that tend to confine larva in the vicinity of parental colonies (Weinberg 1979; Torrents pers. comm.). These dispersal estimates are also concordant with previous genetic studies that have suggested that most of the dispersal of the red coral takes place at less than ten meters (Costantini *et al.* 2007a; Ledoux *et al.* 2010). Such low values have already been reported in other marine invertebrates using direct or indirect approaches (e.g. *Balanophyllia elegans* $\sigma < 50$ cm (Gerrodette 1981); *Botryllus schlosseri* $\sigma_g = 17-24$ cm (Grosberg 1991); *Crambe crambe* $\sigma_g = 24-25$ cm (Calderon *et al.* 2007)) (see Shanks *et al.* 2003 and Kinlan & Gaines 2003 for reviews). However to our knowledge, this is the first time that such low dispersal abilities have been inferred using a genetic approach in a strictly outcrossing species. Interestingly, two complementary results strengthened the validity of this estimate. First, the mean geographical distance computed for the nine parent-offspring dyads identified was 18.0 ± 17.9 cm. Second, the IBD pattern became significant at 24 cm, as shown by the restricted regression analyses. Because this dispersal parameter encompasses dispersal of both the gamete and larval phases, we contend that breeding units of *Corallium rubrum* in the Grotte Pérès are highly restricted in space and approximately correspond to the sampled surface. Although a given value of σ^2 can correspond to different dispersal distributions (Leblois *et al.* 2003), these results imply that red coral sites are likely to be mainly closed (Cowen & Sponaugle 2009) and that local processes probably play a central role in their biology.

4-2) Local pedigree, mating system and recruitment

The occurrence of a unique breeding unit within our sample is in accord with the genetic homogeneity confirmed by the clustering and first-generation migrant analyses, which respectively, did not find major genetic discontinuity within the sample and identified only one putative migrant. As expected in the case of SGS, our results revealed the occurrence of a local pedigree. This breeding unit is composed of half-sib families, likely explaining the slight linkage disequilibrium observed in this sample (e.g. Hedgecock *et al.* 2007) and those observed for different pairs of loci at different sites (Ledoux *et al.* 2010). In addition to the nine parent-offspring dyads identified over the stage-classes 0 and 1, 81.5 % of the colonies were linked by half-sib relationships. Moreover, these two stage-classes were linked by second-degree relationships (i.e. 25% of alleles identical by descent, Blouin 2003), highlighting the complex level of relationships occurring in our sample (not shown). To our knowledge, this is the first time that such a high level of family structure has been characterized in a sessile marine species.

The half-sib family structure revealed by our analyses demonstrated the occurrence of multiple mating with each parental colony being involved in 2.3 ± 0.8 matings. In gorgonians, multiple mating combined with accumulation effects (i.e. long time-averaged exposure of egg to sperm) could enhance fertilization success (see Lasker 2006; Lasker *et al.* 2008 in *Pseudopterogorgia elisabethae*). The absence of mass spawning, the asynchronous fertilization and the release of larva over a six-week period (Torrents 2007) could be consistent with an accumulation effect in *Corallium rubrum*. Combined with the multiple mating demonstrated by our study, these life history traits could, thus, enhance fertilization success. Additional experiments, such as parentage analyses using aged and sexed individuals, are required to further test this hypothesis.

The observed kin structure also suggested the occurrence of biparental inbreeding (i.e. mating between genetically close relatives) in the study sample. Following Vekemans & Hardy (2004), comparison between the average Nason's estimators of kinship (Loiselle *et al.* 1995) between truly outcrossed mates ($F_x = 0.01 \pm 0.01$) and the Wright inbreeding coefficient ($F_{IS} = 0.35 \pm 0.09$) demonstrated that the level of biparental inbreeding is small within the studied "neighborhood". Thus, most matings likely occur between non-sib colonies. This is consistent with the interpretation of a "neighborhood area" as an area within which biparental inbreeding remains low (Fenster *et al.* 2003) and does not necessarily prevent its occurrence at a larger scale (Costantini *et al.* 2007a) as shown in Fenster *et al.* (2003).

Subtle genetic structure was observed between the analyzed stages-classes (mean $F_{ST} = 0.012$), suggesting that allele frequencies fluctuated over a short period of time, as expected in long-lived species with overlapping generations (Ryman 1997) such as the red coral. Nevertheless, the AMOVA suggested that the influence of this structure on the total genetic variation is low. Hedgecock *et al.* (2007) proposed that such "chaotic temporal genetic structure" results from a sweepstake effect (i.e. a random reduction of the effective population size), which promotes local genetic drift over short periods of time (Hedrick 2005). This is consistent with the recruitment by pulse combined with the high postrecruitment mortality observed in *Corallium rubrum* (Garrabou & Harmelin 2002). A sweepstake effect can, indeed, be explained by differential reproductive success between adults or by stochastic mortality during larval or postrecruitment phases (Hedgecock 2010). Analyses of well-defined cohorts covering several generations are needed to disentangle these factors and to allow accurate estimation of effective population size variation.

Considering the low level of biparental inbreeding and the low temporal Wahlund effect due to the temporal genetic structure, the high F_{IS} value observed in the sample can be explained mainly by the presence of null alleles. At larger sampling scales, in addition to previous hypotheses (Costantini *et al.* 2007a), we propose that a "family" Wahlund effect (Pudovkin *et al.* 1996) resulting from the presence of a limited number of families at each site also contributes to the heterozygote deficiencies reported for this species (Abbiati *et*

al. 1993; Costantini *et al.* 2007a, b; Ledoux *et al.* 2010).

4-3) Implications for conservation and future directions

Our results have important implications for the conservation of the red coral. The occurrence of nine parent-offspring dyads shows that self-recruitment appears to be crucial in the functioning of red coral populations. Moreover, considering σ_g^2 as a measure of the speed at which two lineages that derived from a common ancestor move away from each other generation after generation (Rousset 2004), we are now able to quantify the low power of recolonization of this species. These results complement the conservation advice proposed by Ledoux *et al.* (2010), and we further argue that conservation actions targeting the preservation of several small patches of colonies would improve site viability. In addition, restoration of disturbed sites should also be focused on the restoration of dense patches of colonies through transplantation to allow for local recolonization.

This study represents a first step towards a better understanding of the demographic and evolutionary processes acting within red coral sites and opens several perspectives for future studies. First, because local processes depend mostly on local density and local gene dispersal (Fenster *et al.* 2003), the self-recruitment and restricted dispersal highlighted in this study are likely to be supplemented by some long-distance dispersal as illustrated by the first-generation migrant (PER9) identified in our sample. The interaction of this long-distance dispersal with local processes highlighted in this study thus remains to be studied. Our study was conducted by pooling all sampled colonies. Therefore, further analyses of the evolution of SGS across age-classes will also help to refine our conclusions (e.g. Kalisz *et al.* 2001). Moreover, this study was focused on a single sample coming from a disturbed and harvested shallow cave so our results should be generalized with caution. Demographic characteristics of red coral sites, such as density and size structure, that respectively affect σ_g^2 (Rousset 2000) and the differential reproductive success of colonies (Hall & Hughes 1996), are thus spatially heterogeneous (Linares *et al.* 2010). Accordingly, the strength of local dispersal and genetic drift may be heterogeneous and should be evaluated at sites with different characteristics. Finally, because our study was focused on neutral variation, the impact of local environmental conditions on these closed systems remains to be studied.

4-4) Conclusion

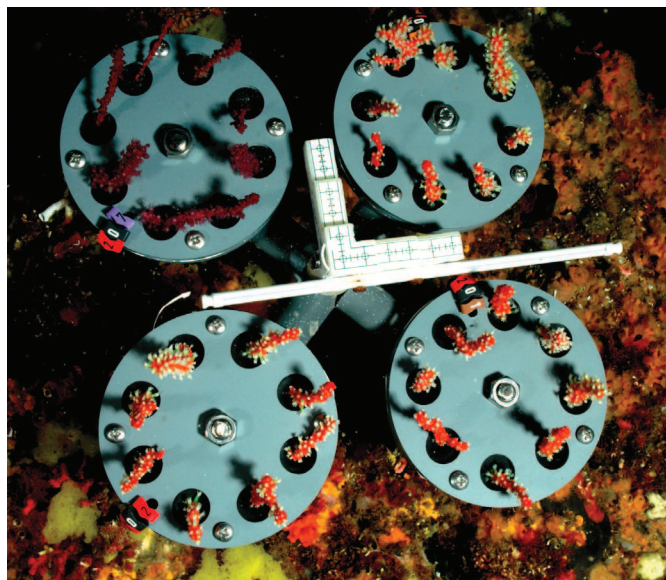
Though they represent data that are essential for management policies, basic features of the population biology of marine invertebrates with sedentary adult and planktonic larval phases, such as the definition and spread of breeding units, are still poorly understood (Palumbi 2004 but see Ayre & Miller 2006; Underwood *et al.* 2007). Thus, using an adapted sampling strategy and a combination of approaches including photogrammetry and population genetics, we showed that sites colonized by *Corallium rubrum* are likely composed of small breeding units composed of kin-related colonies that are spatially and

temporally structured due to restricted dispersal and low genetic drift. Therefore, our results provide new insights into the short-range differentiation and heterozygote deficiencies previously observed in this species (Abbiati *et al.* 1993; Costantini *et al.* 2007a, b; Ledoux *et al.* 2010). These results also contribute to a broader understanding of the microevolutionary processes impacting sessile marine invertebrates, which are often key species in biodiversity-rich, but threatened, communities.

Chapitre 5

Acclimatation différentielle et adaptation locale chez *Corallium rubrum*, une espèce sessile et longévive subissant les changements climatiques

« Où il est question d'interactions entre les populations de corail rouge et leur environnement, de transplantations réciproques, de calcéine et de croissance en diamètre, d'estimateurs de la différenciation génétique supposée neutre, d'estimateurs de la différenciation phénotypique et de la comparaison des deux, de sélection naturelle et d'adaptation locale, d'un jardin commun en pleine nature, d'un stress et même d'une anomalie thermique, de nécrose et de survie, d'acclimatation différentielle ou de plasticité phénotypique variable, de paramètres de diversité génétique, de dynamique éco-évolutive et donc très certainement de conservation. »



1) Introduction

Global change linked to anthropogenic activities impacts the entire biosphere and induces that Earth ecosystems are now human-dominated (Vitousek *et al.* 1997). Besides its direct role on biodiversity loss (1200 extinct species since 1600; IUCN 2009), human has become a major evolutionary force (Palumbi 2001). Recent empirical studies (e.g. Grant & Grant 2002; Conover & Munch 2002) uncovered interactions between ecological and evolutionary processes on short time frame (Ferrière *et al.* 2004; Carroll *et al.* 2007) and showed that anthropogenic selective forces can foster contemporary evolution, the evolution of heritable traits within populations over tens of generations (Hendry & Kinnison 1999). Together with contemporary evolution, acclimatization capacity (i.e. modification in physiological traits in response to changes in environmental variables; Wilson & Franklin 2002) and local adaptation are known to influence population dynamics and evolution (Osovitz & Hofmann 2007; Somero 2010). Local adaptation referred to the patterns and processes driven by divergent selection, leading the locally adapted genotypes to have on average higher relative fitness in their habitat than foreign genotypes (Williams 1966; Kawecki & Ebert 2004). Interestingly, the combination of these three processes (contemporary adaptation, local adaptation, acclimatization) will likely mitigate the impacts of global change and will therefore be determinant for the future of biodiversity (Skelly *et al.* 2007; Hendry *et al.* 2010). However because acclimatization is unlikely to provide long-term solutions, predicting how a species can cope with environmental changes requires disentangling phenotypic (plastic) and genetic (adaptive) responses to selective pressures (Gienapp *et al.* 2008). A complete understanding of the biodiversity crisis therefore cannot be reached without taking into account the bidirectional interactions between populations and their local environments, otherwise known as eco-evolutionary dynamics (Stockwell *et al.* 2003; Bailey *et al.* 2009; Pelletier *et al.* 2009; Post & Palkovacs 2009). Climate change, which induces oceans warming and acidification (IPCC 2007; Doney *et al.* 2009), is considered to be one of the major selective pressures currently affecting the marine biodiversity (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010). The Mediterranean Sea is already extensively affected by warming (Lejeusne *et al.* 2010) and also particularly subject to direct anthropogenic pressures due to its geographical enclosure (Coll *et al.* 2010). In addition to the establishment of tropical marine species (e.g. *Sphyraena viridensis*, *Siganus rivulatus*), two large-scale mass mortality events (MMEs) concordant with positive thermal anomalies (Romano *et al.* 2000; Perez *et al.* 2000; Garrabou *et al.* 2009; Bensoussan *et al.* 2010) were recorded in this “forthcoming tropical” sea (Bianchi 2007) in 1999 and 2003. These two events were particularly dramatic as they impacted hundreds of kilometres of coastal habitats over the north-western Mediterranean basin, and affected a high number of hard substrate dwellers species (around 30 species belonging to 4 different phyla Cnidaria, Porifera, Bryozoa and Molluscan; Perez *et al.* 2000; Garrabou *et al.* 2009). Gorgonians, which are prominent components of the biodiversity rich precoralligenous and coralli-

genous communities with important structuring roles (Ballesteros 2006), were amongst the most affected species. The tissue necroses observed in these long-lived and modular species during MMEs, were highly variable between individuals belonging to the same locality and also between localities. For example, during the 1999 event in the Marseilles region, up to 80% of the red coral colonies were affected in some sites, while in other, necrosis was observed for only 5 % of the colonies (Garrabou *et al.* 2001). The ongoing warming trend, which could result in an increase of the frequency of positive thermal anomalies (IPCC 2007), is thus a major concern for the future of these organisms (Garrabou *et al.* 2009) and underlines the need for conservation studies to investigate the population-environment interactions (Hendry *et al.* 2010).

The present study was focused on *Corallium rubrum*, an overharvested gorgonian (Bruckner 2009) impacted by MMEs (Garrabou *et al.* 2009). This is a long-lived species (Linares *et al.* 2010) characterized by restricted dispersal abilities resulting in low gene flow and significant genetic differentiation (expected to be neutral) at the scale of tens of meters (Ledoux *et al.* 2010). The red coral dwells in contrasted habitats as illustrated by its bathymetrical distribution (from 5 to more than 800 m depth; Costantini *et al.* 2010). In the surface layers, it is mainly found in dim-light environments such as caves or overhangs, which are characterized by contrasted thermal regimes (Bensoussan *et al.* 2010). Despite its crucial conservation implication (Crandall *et al.* 2000; Baums 2008; see Vollmer & Kline 2008 for an example in *Acropora cervicornis*), the impact of selective processes on the population structure of the red coral has never been investigated. Using field experiments combined with population genetic analysis based on microsatellite loci, we addressed two main issues in this study.

First, considering the contrasted environmental features of its habitat and its restricted dispersal abilities that could enhance the impact of divergent selection (Lenormand 2002), we investigate the population-environment interactions in *Corallium rubrum*, with particular emphasize on local adaptation. To achieve this aim, we performed reciprocal transplant experiments (RTE) between populations dwelling in contrasted environments especially considering their thermal regimes. We discuss the results of those field experiments in the light of F_{ST} - P_{ST} comparison. F_{ST} estimates neutral genetic differentiation between populations whereas P_{ST} , which is a phenotypic alternative for Q_{ST} (estimate of differentiation on quantitative traits; Spitze 1993), estimates phenotypic differentiation between populations. If the considered trait has evolved neutrally then the values of P_{ST} and F_{ST} should be similar. Occurrence of divergent selection between populations is suggested when P_{ST} significantly exceed F_{ST} whereas a F_{ST} greater than P_{ST} induces that stabilizing selection is involved in the evolution of the considered traits (see McKay & Latta 2002; Leinonen *et al.* 2008 for review). Caution is needed using P_{ST} instead of Q_{ST} because observed phenotypic differences may be the results of plastic responses to environmental conditions during organisms' development (Pujol *et al.* 2008). The environmental effects on the considered trait can thus under- or overestimate the true level of quantitative diver-

gence. However, in our study this comparison was not used by itself but to complement RTE results. Moreover, the impact of these biases on $P_{ST} - F_{ST}$ comparisons were questioned based on meta-analyses results that showed that studies using information from wild phenotypes do not tend to give higher estimates than Q_{ST} studies (Leinonen *et al.* 2008). The second issue addressed in this study is based on the differential impacts that the MMEs have had on red coral populations. These differential impacts suggest that these events may be modulated by physical (e.g. habitat features that could mitigate temperature impact; see Garrabou *et al.* 2001) and/or biological factors (e.g. genetic and physiological traits that could induce differential acclimatization capacities). Focusing on the putative biological factors, a thermotolerance experiment *in aquaria* demonstrated differential acclimatization capacities between two populations dwelling in shallow (10-12 m) and deep (40 m) habitats separated by around 6 km (Torrents *et al.* 2008), and suggested that 24 to 25 °C could be the upper thermal threshold for the red coral (Torrents *et al.* 2008). In the present study, we explored *in situ* the population-environment interactions in response to warming. To achieve this aim, we conducted *in situ* common garden experiment in a warm habitat to induce a thermal stress. We complemented this experiment by testing the link between the observed phenotypic responses and the level of genetic variation at the sample level.

Overall, we show that divergent selection could impact differentiation among red coral populations. We also demonstrated *in situ* differential thermal acclimatization capacities between populations, which resulted in some cases, in a significant decrease of population size. Integrating these results allow us to get a first insight in the eco-evolutionary dynamics in the red coral facing the on-going warming.

2) Material and methods

2-1) Field experiments

Reciprocal transplant experiment

We conducted two independent reciprocal transplant experiments between shallow (20 m) and deep (40 m) habitats inhabited by red coral at two localities: Riou Island near Marseilles (RIS and RID for shallow and deep populations) and Palazzu Island within the Scandola protected area in Corsica (PZS and PZD for shallow and deep populations) (Fig. 5-1a). Apical tips (i.e. 5-7 cm in length; hereafter colony) of 48 healthy red coral colonies were randomly sampled by scuba diving, in each site in early June 2006, and fixed on experimental plates. Each experiment included four different treatments corresponding to one control (colonies that were kept at the native depth) and one transplant (colonies that were transplanted at the foreign depth) per habitat, and two habitats (shallow and deep) per experiment (Fig. 5-1b). Each treatment included three plates and each plate carried eight colonies leading to 24 colonies per treatment. Overall, we used 192 colonies sha-

red among 24 plates. Colonies were labeled with calcein to quantify growth rate during the experiment period (see supplementary material for details). These experiments were performed during a 6 months period (from June to November 2006) encompassing the summer season, during which the thermal regimes of the different habitats are the most different (Bensoussan *et al.* 2010).

Common garden experiment:

A common garden experiment was also conducted in a dim-light overhang at five meters depth at Riou using colonies from RIS and RID (Fig. 5-1b). This experiment was conducted to simulate *in situ* a thermal stress (see below). We collected 24 additional colonies from each of these habitats. These colonies were distributed among six experimental plates (i.e. three per habitat) and labelled with calcein following the procedures described previously. They were individually identified to survey their levels of tissue necrosis and survival (see below) during the experiment period (from June to September 2006).

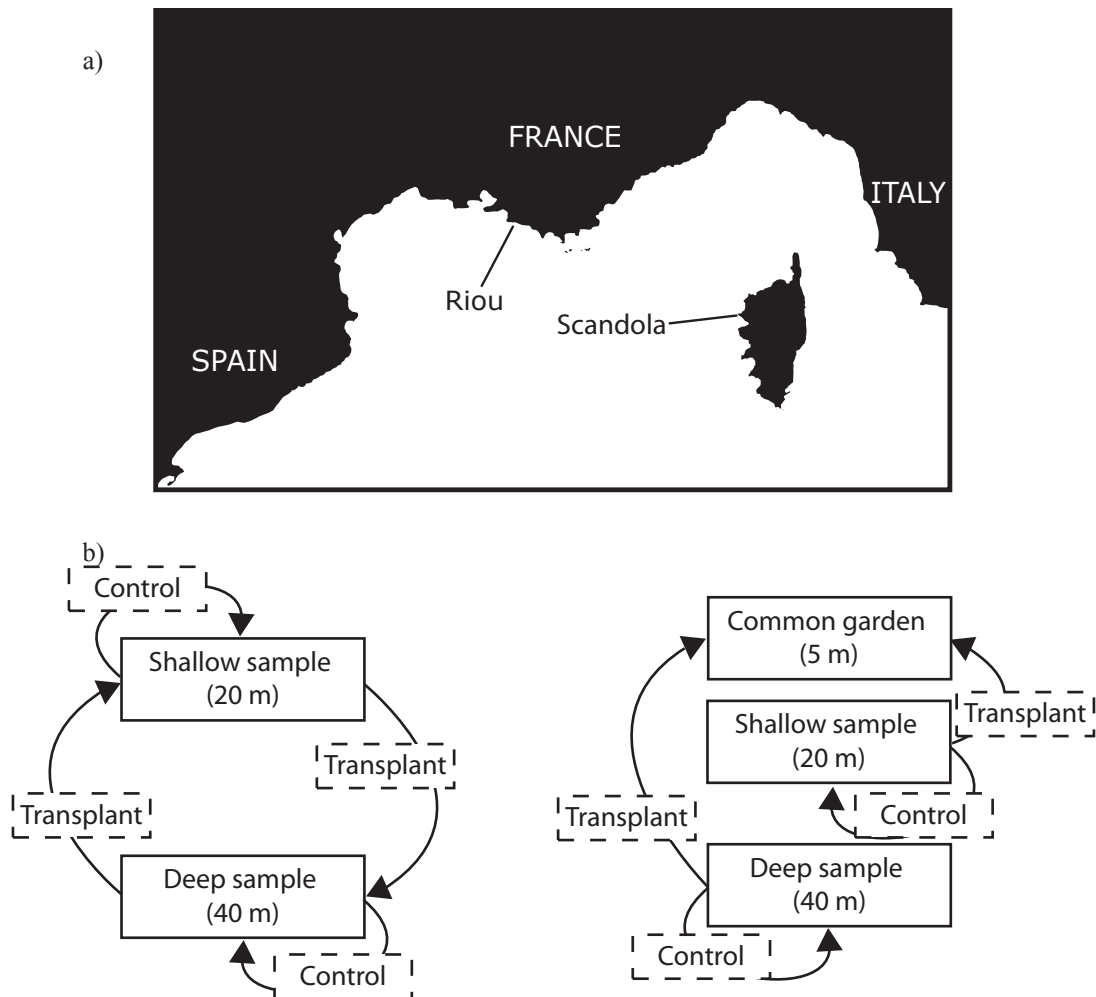


Figure 5-1: a) Location of the two reciprocal experiment localities: Riou and Scandola. b) Experimental protocols for the reciprocal transplants conducted in Riou and Scandola (on the left) and for the common garden conducted in Riou (on the right). Dashed and solid arrows represent control and transplant treatment respectively.

2-2) Environmental component: Contrasted thermal features

The two localities and sites within them were chosen based on their different thermal regimes, which were characterized using StowAway® TidbiTs™ autonomous sensors fixed every 5 m from 5 to 40 m depth. Scandola is characterized by a warmer regime than Riou (Table 5-S1; Bensoussan *et al.* 2010). Within each locality, deep sites are characterized by cooler and more stable temperatures compared to shallow ones (Table 5-S1; Bensoussan *et al.* 2010). Concerning the common garden experiment, the temperature over the experiment period (i.e. June to September 2006) corresponded by chance to a positive thermal anomaly (Bensoussan *et al.* 2010) inducing that the samples had to cope with strong thermal stress (i.e. $T > 25^{\circ}\text{C}$).

2-3) Genetic component: Microsatellite genotyping

Over the 192 individuals used in the reciprocal transplant, 180 (44, 47, 44 and 45 for PZS, PZD, RIS, RID respectively) were genotyped using 12 microsatellites loci. Some samples were missing because their small sizes do not allow conducting growth measurements and genetic analyses (see below) or because they were broken during the experiment period. DNA extractions and PCR amplifications were done following Ledoux *et al.* (2010; in press).

2-4) Phenotypic response characterization

Response variables

We analyzed three components of fitness: the growth rate in diameter (see supplementary material), the level of tissue necrosis (partial mortality) and the survivorship of colonies. We contend these traits are related to the fitness of transplanted colonies because the reproductive outputs are directly linked to size of colonies in clonal organisms (Hall & Hughes 1996). For the Scandola experiment, survivorships and rates of necrosis were measured at the end of the 6-month period. At Riou, we surveyed these two parameters two times a week by scuba diving for the two experiments (reciprocal transplant and common garden). At the end of the two reciprocal transplant experiments, each colony was labelled and divided: a sample was air-dried for the growth rate analysis and the rest of the colony was fixed in ethanol 95 for genotyping analysis. The colonies used for the common garden experiment, which suffered extensive partial or total mortality (see results), could be not used for growth or genetic analyses.

2-5) Statistical analyses

Field experiments

We carried out two different statistical tests to analyse the results of the field experiments. For the reciprocal transplants, we tested whether the local sample showed higher values for the components of fitness than foreign sample in each habitat, the so-called “local vs. foreign criterion” (Kawecki & Ebert 2004). Maximum growth rate values for each of the

5 to 10 colonies analyzed by treatments was considered as response variable used in the permutational univariate analyses. The data were considered to represent a fully two-way design of samples (replicates) with “sample origin” (two levels) and “treatment depth” (two levels) as fixed factors. Concerning the common garden experiment, the level of observed necrosis for each colony was the response variable analysed by a one-way PERMANOVA (McArdle & Anderson 2001; Anderson 2001) with “sample origin” as a fixed factor. These data were subjected to a two factorial and one-way univariate PERMANOVA, respectively, based on Euclidean distance. Although variables were univariate, a PERMANOVA has been employed because the null distribution of the test statistic in PERMANOVA is produced by permutation ($n = 9999$), thus avoiding the usual normality assumptions of ANOVA. These analyses were carried out using PRIMER v.6 (Clarke & Gorley 2006) with the Windows PERMANOVA+ module (Anderson *et al.* 2008).

Population genetic analyses

We estimated frequencies of null alleles (r) for each locus and sample by the expectation maximization algorithm (Dempster *et al.* 1977) implemented in FREENA (Chapuis & Estoup 2007). Null allele frequencies ranged from 0 for *Mic26*, *Mic24* and *COR46bis* to 0.62 for *COR58*, with a mean value equal to 0.24 ± 0.21 . To avoid bias due to null alleles, the following analyses were performed with 7 loci (*Mic13*, *Mic20*, *Mic22*, *Mic24*, *Mic26*, *Mic27*, *COR46bis*), for which the mean r was 0.09 (i.e. < 0.1 ; see Chapuis *et al.* 2008 for details).

Departure from panmixia was tested for each sample using the score test for heterozygote deficiency. Significance was addressed using a Markov-chain (MC) algorithm (Guo & Thompson 1992; Raymond & Rousset 1995) with default parameters. The f estimator of F_{IS} (Weir & Cockerham 1984) was computed for each sample. Computations were done using GENEPOP v.4.0 (Rousset 2008). We tested the null hypothesis of linkage equilibrium for each pair of loci in each sample using the permutation procedure ($n = 1000$) implemented in GENETIX v.4.05 (Belkhir *et al.* 2004). Observed heterozygosity (H_o), gene diversity (H_e), allelic ($Ar_{(g)}$) and private allelic richness ($Ap_{(g)}$) were computed for each sample using GENETIX and ADZE (Szpiech *et al.* 2008). A rarefaction method (Petit *et al.* 1998) was used to obtain estimates of $Ar_{(g)}$ and $Ap_{(g)}$ independent of the sample size. The parameter g corresponds to the minimum number of genes at one locus in one of the four samples (i.e. twice the number of genotypes) and was 66. Global and pairwise differentiations with or without ENA correction for null alleles (Chapuis & Estoup 2007) were computed using Weir and Cockerham’s (1984) estimator of F_{ST} (θ and θ_{ENA}) in FREENA. We tested for genotypic differentiation for all samples and for all pairs of samples using the original dataset and the INA dataset corrected for null alleles (Chapuis & Estoup 2007) with an exact test and MC algorithm with default parameters as implemented in GENEPOP.

Divergence in phenotypic trait and P_{ST} - F_{ST} comparisons

To get further insights in the results of the RTE, we computed phenotypic divergence between samples as P_{ST} . P_{ST} values were computed over the four samples and between each pair of samples. In each case, P_{ST} was estimated based on analyses of variance framework as recommended for comparison with Weir and Cockerham's (1984) estimator of $F_{ST}(\theta)$ (Whitlock 2008). We computed $P_{ST} = \sigma^2_{GB} / (\sigma^2_{GB} + 2 \sigma^2_{GW})$ where σ^2_{GB} is the among-samples and σ^2_{GW} the within-sample variance components for the growth rate of colonies in their habitat of origin. Different methods have been proposed to test the significance of the difference between F_{ST} and P_{ST} (O'Hara & Merilä 2005; Whitlock 2008; Whitlock & Guillaume 2009). However considering that our growth rate dataset was unbalanced and that the relevance of the Lewontin-Krakauer chi^2 distribution for P_{ST} has not been formally investigated (Whitlock 2008; Whitlock & Guillaume 2009), the significance of the difference between F_{ST} and P_{ST} was tested using 95% confidence intervals (95% CI) estimated with a non-parametric bootstrap procedure. We resampled 10000 times over individuals maximum growth rates values within each sample to characterize the distribution of P_{ST} values and to estimate the 95% CI. We conducted these simulations using the resampling procedure implemented in POPTOOLS v.3.1.0 (Hood 2008 www.cse.csiro.au/poptools/). The 95% CI of F_{ST} with or without ENA correction was computed using 10000 bootstraps over loci as implemented in FREENA.

3) Results***3-1) Reciprocal transplant experiments***

The observed values for growth rate in diameter over the six-month period of the experiment were concordant with those reported by Torrents (2007), validating the relevance of our results. RTEs showed contrasted results between the two localities. For the experiment conducted at Riou, the permutational univariate analysis demonstrated significant differences in growth rate in diameter considering the depth of the transplantation ($P < 0.01$) but not the origin of the sample the origin of the sample ($P = 0.19$). A highly significant interaction between these two factors ($P < 0.01$) was highlighted. The reaction norm showed that local genotypes had a significantly higher growth rate than foreign genotypes (Table 5-1a; Fig. 5-2a). Accordingly, the local vs. foreign criterion was validated, which suggested the occurrence of local adaptation at this location.

In Scandola, the growth rate was not significantly different when considering the origin of the sample ($P = 0.45$), the transplantation depth ($P = 0.4$) or the interaction between them ($P = 0.89$). We could therefore reject the local vs. foreign criterion at this location (Table 5-1a; Fig. 5-2b).

Table 5-1: a) Results of the permutational univariate analyses conducted for the two RTEs; b) Results of the PERMANOVA analysis conducted for the common garden experiment. (df: degree of freedom; MS: mean square; NS: non significant; ** P < 0.01).

a)

Source of variation	Riou			Scandola		
	df	MS	Pseudo-F	df	MS	Pseudo-F
Origin	1	0.73x10 ⁻³	1.81 (NS)	1	0.27	0.59 (NS)
Transplantation Habitat	1	7.46x10 ⁻³	18.4 **	1	0.32	0.72 (NS)
Origin X Transplantation Habitat	1	6.72x10 ⁻³	16.58 **	1	0.01	0.02 (NS)
Residual	34	0.41x10 ⁻³		24	0.44	
Total	37			27		

b)

Source of variation	df	MS	Pseudo-F
Origin	1	37501	25.10 **
Residual	44	1493.9	
Total	45		

3-2) Common garden experiment

The levels of necrosis between transplanted and control colonies were significantly different for the two samples demonstrating the impact of the common garden habitat (not shown). Colonies coming from the deep habitat showed necrosis earlier than those from the shallow habitat (Fig. 5-3). The first signs of necrosis were concordant with a rise of temperature beyond 24°C. At the end of the experiment, colonies from the two habitats suffered tissue necrosis. Nevertheless, deep colonies were significantly more affected than shallow ones (P < 0.01) (Table 5-1b). This result was reinforced by the difference observed in survival rates between the two samples. Indeed, 83.3 % (66.7 % did not show any necrosis) and only 16.6 % of the colonies from RIS and RID survived in the common garden habitat.

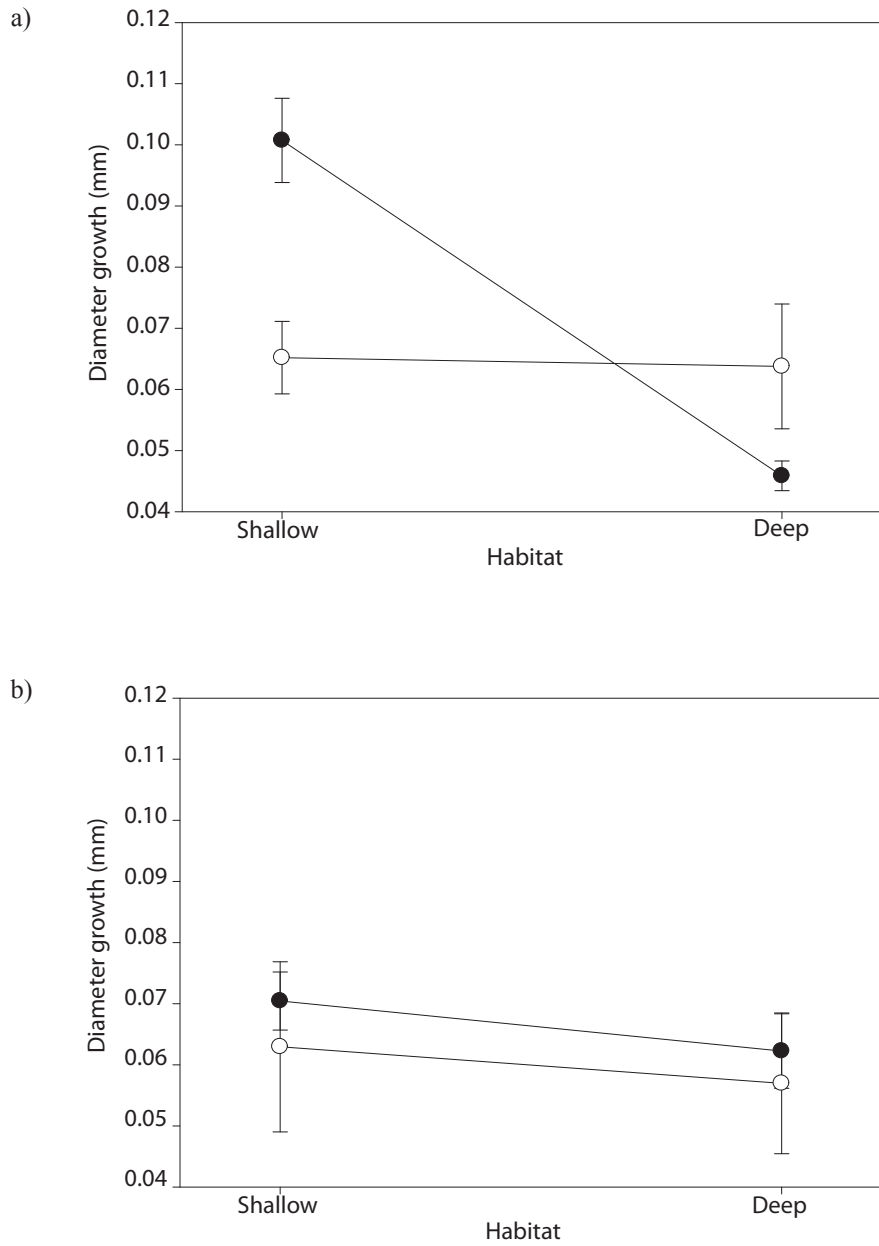


Figure 5-2: Results of the reciprocal transplant experiment conducted: a) in Riou: mean maximum growth in diameter for RIS (●) and RID (○) in the shallow and deep habitat; b) in Scandola: mean maximum growth in diameter for PZS (●) and PZD (○) in the shallow and deep habitat. Bars represent standard error.

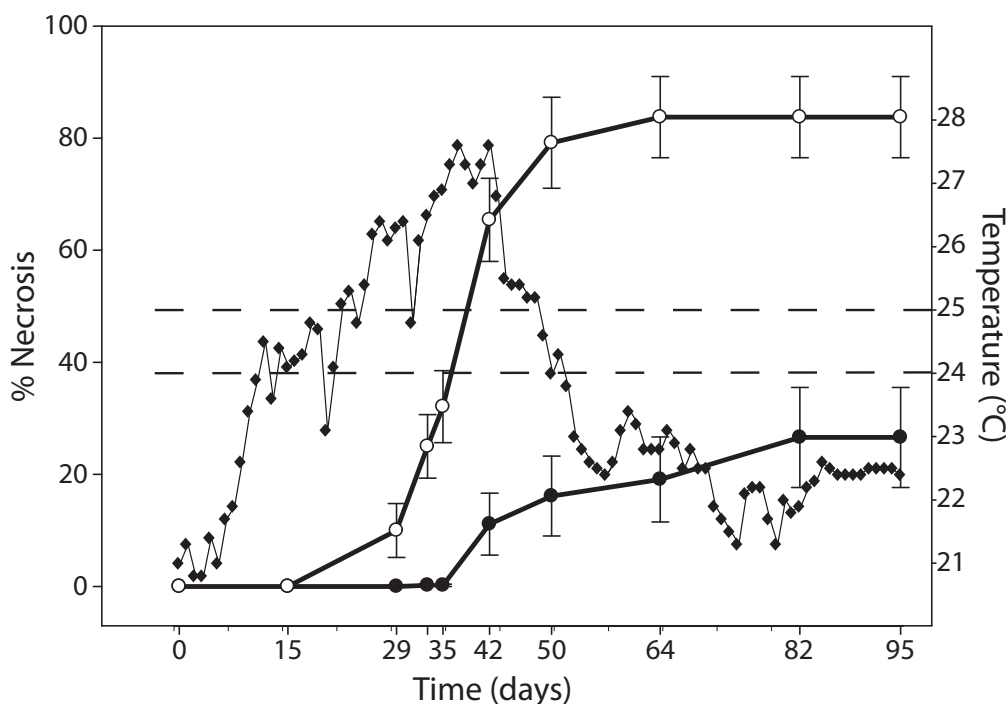


Figure 5-3: Results of the common garden experiment conducted in Riou: evolution of the mean percentage of tissue necrosis for colonies coming from RIS (●) and RID (○). Bars represent standard error. The mean temperature (°C) values for each day are shown (◆). Dashed lines represent the upper thermal thresholds (24 and 25 °C) proposed by Torrents et al. (2008).

3-3) Population genetic analyses

No significant linkage disequilibrium was detected among the seven retained loci when considering all samples (all $P > 0.05$ after FDR correction). Significant linkage disequilibrium was observed in PZD for one pair of loci (*Mic22-Mic26*) after FDR correction. Significant heterozygote deficiencies were observed in all samples except PZS. The f estimator of FIS computed over the seven loci ranged between 0.02 for PZS and 0.17 for RID with a mean value of 0.12 ± 0.07 . The mean observed heterozygosity over locus (H_o) varied between 0.61 ± 0.23 for PZD to 0.65 ± 0.22 for PZS, whereas the mean expected heterozygosity over locus (H_e) varied between 0.66 ± 0.21 for PZS to 0.76 ± 0.17 for RID. $Ar_{(66)}$ ranged between 9.4 ± 7.6 for PZS to 12.4 ± 9.2 for RID with a mean value over the four samples of 10.7 ± 1.3 . Concerning the private allelic richness, the minimum $Ap_{(66)}$ value was 1.12 ± 1.17 for RID whereas the maximum was observed for PZD with $Ap_{(66)}$ equal to 1.78 ± 1.44 . The mean $Ap_{(66)}$ value was 1.32 ± 0.3 (Table 5-2). The three estimates of genetic diversity (H_e , $Ar_{(66)}$, $Ap_{(66)}$) and the f estimator of FIS were not significantly different between the four samples (Fig. 5-S1).

The global θ and θ_{ENA} were 0.10 (95% CI: 0.06-0.15) and 0.10 (95% CI: 0.05-0.14). Values and 95% CI for θ for the pairwise comparisons are shown in table 5-3 and ranged

from 0.02 (95% CI: 0.01-0.05) for RIS-RID to 0.14 (95% CI: 0.06-0.21) for PZS-RID. The pairwise values and 95% CI for θ_{ENA} were slightly lower ranging from 0.02 (95% CI: 0.01-0.04) for RIS-RID to 0.13 (95% CI: 0.06-0.2) for PZS-RID. The exact tests for genotypic differentiation were significant at the global level and for the six pairwise comparisons using original and INA dataset corrected for null alleles (Table 5-3).

Table 5-2: Measures of genetic diversity for the four samples used for reciprocal transplant experiments. H_o : observed heterozygosity; H_e : gene diversity (Nei 1973); f : estimator of F_{IS} (Weir & Cockerham 1984) (** P < 0.01 and NS: non-significant); $Ar_{(66)}$ and $Ap_{(66)}$: allelic and private allelic richness with rarefaction method for a corresponding sample size of 66. Standard deviations are shown in brackets.

	H_o	H_e	f	$Ar_{(66)}$	$Ap_{(66)}$
RIS	0.63 (0.3)	0.75 (0.16)	0.16**	11.1 (7.5)	1.19 (1.21)
RID	0.64 (0.29)	0.76 (0.17)	0.17**	12.4 (9.2)	1.12 (1.17)
PZS	0.65 (0.23)	0.67 (0.21)	0.14**	9.4 (7.6)	1.20 (1.62)
PZD	0.61 (0.23)	0.71 (0.2)	0.02 NS	10 (6.6)	1.78 (1.44)
mean value	0.63 (0.02)	0.72 (0.04)	0.12**	10.7 (1.3)	1.32 (0.30)

3-4) Divergence in phenotypic trait and $P_{ST} - F_{ST}$ comparisons

The among-samples (σ^2_{GB}) and within-sample (σ^2_{GW}) variance components for the maximum growth rate values are shown in Table 5-3. The resulting global estimate of P_{ST} was 0.755 (95% CI: 0.592 - 0.909). The pairwise P_{ST} ranged between 0.084 (95% CI: 0.022 - 0.707) for RID-PZD and 0.867 (95% CI: 0.694 - 0.951) (Table 5-3). The comparison between global P_{ST} and global θ demonstrated that differentiation observed on the phenotypic trait was significantly higher than the differentiation under neutral evolution. Comparisons of pairwise P_{ST} and θ showed that the difference observed at the global scale was entirely driven by significant divergence between RIS and the 3 remaining samples (Fig. 5-4). The results were the same when using θ_{ENA} (not shown).

Computation level	Genetic differentiation			Phenotypic differentiation				
	θ	95% CI	θ_{ENA}	95% CI	σ^2_{GB}	σ^2_{GW}	P_{ST}	95% CI
Global	0.10**	[0.06 - 0.15]	0.09**	[0.05 - 0.14]	3.14×10^{-3}	0.51×10^{-3}	0.75	[0.59 - 0.91]
RIS vs. RID	0.02**	[0.01 - 0.05]	0.02**	[0.01 - 0.04]	6.07×10^{-3}	0.63×10^{-3}	0.83	[0.49 - 0.96]
RIS vs. PZS	0.14**	[0.06 - 0.22]	0.13**	[0.06 - 0.2]	4.59×10^{-3}	0.35×10^{-3}	0.87	[0.69 - 0.95]
RIS vs. PZD	0.12**	[0.06 - 0.18]	0.11**	[0.06 - 0.16]	6.39×10^{-3}	0.53×10^{-3}	0.86	[0.63 - 0.96]
RID vs. PZS	0.13**	[0.05 - 0.21]	0.12**	[0.05 - 0.2]	0.20×10^{-3}	0.49×10^{-3}	0.17	[0.01 - 0.88]
RID vs. PZD	0.11**	[0.05 - 0.18]	0.11**	[0.05 - 0.18]	0.14×10^{-3}	0.77×10^{-3}	0.08	[0.01 - 0.71]
PZS vs. PZD	0.08**	[0.04 - 0.15]	0.08**	[0.04 - 0.15]	0.61×10^{-3}	0.36×10^{-3}	0.45	[0.01 - 0.91]

Table 5-3: Measures of genetic diversity for the four samples used for reciprocal transplant experiments. Ho: observed heterozygosity; He: gene diversity (Nei 1973); f: estimator of FIS (Weir & Cockerham 1984) (** $P < 0.01$ and NS: non-significant); $A_{r(66)}$ and $A_{p(66)}$: allelic and private allelic richness with rarefaction method for a corresponding sample size of 66. Standard deviations are shown in brackets.

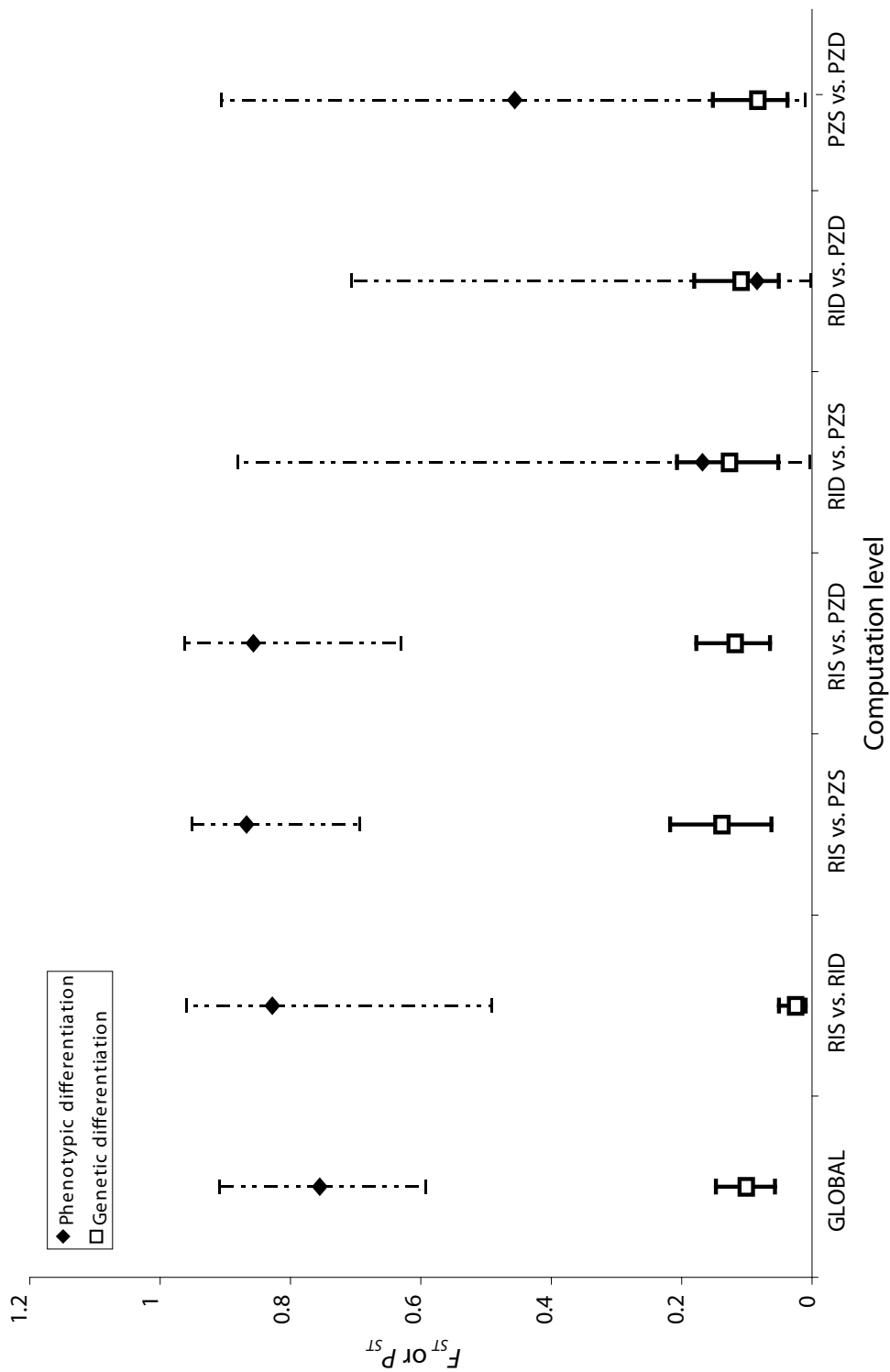


Figure 5-4: Global and pairwise comparisons for P_{ST} and F_{ST} . P_{ST} was computed using the growth rate in diameter observed for each sample in its local habitat during the 6 months of the reciprocal transplant experiment. F_{ST} was computed based on 7 microsatellite locus. Dashed and solid bars represent 95 % CI for P_{ST} and F_{ST} respectively.

4) Discussion

4-1) Genotype by environment interactions for fitness and occurrence of local adaptation in red coral populations

Using the maximum growth rate in diameter as a component of fitness, we showed that interactions between red coral populations and their local environments could vary. This result is supported by the two reciprocal transplant experiments that showed contrasted patterns. Despite growth rates in diameter were not significantly different between samples in Scandola whatever the considered environment, we reported a significantly higher growth rate of local compared to foreign genotypes in Riou. Combined with the pairwise genetic differentiation, these results suggest that, local adaptation should act within Riou populations whereas it is likely that growth rate in diameter evolved neutrally in Scandola. Further investigations are needed to explain these differences between the two localities, which could result for example, from differences in population size impacting the strength of genetic drift or differences in selective regimes.

Local adaptation results from divergent selection between habitats (Endler 1986). Nevertheless, the outcome of divergent selection is linked to other microevolutionary forces, especially gene flow and genetic drift (Kawecki & Ebert 2004). *Corallium rubrum* is characterized by a highly restricted gene flow (Ledoux *et al.* 2010), which facilitates the action of divergent selection (Lenormand 2002; Räsänen & Hendry 2008). Nevertheless, the drift effect, detected even at very small geographical scales in red coral populations (Ledoux *et al.* in press), could generate by chance a pattern of phenotypic divergence concordant with local adaptation (Kawecki & Ebert 2004). The results of the $F_{ST} - P_{ST}$ comparisons allow disentangling impacts of divergent selection and drift (Leinonen *et al.* 2008). The global P_{ST} estimate was significantly higher than the global F_{ST} estimate, suggesting that divergent selection should act on the diameter growth. The pairwise comparisons refined this result, as only comparisons involving RIS were significant. Despite the limitations induced by comparison based on the 95 % CI (O'Hara & Merila 2005), these results, addressed in the light of the transplant experiments, reinforced the statement that RIS was likely locally adapted to its habitat.

Identifying environmental factors driving local adaptation is an essential but difficult task especially when knowledge on environmental conditions is scarce (Kawecki & Ebert 2004). A previous study focused on growth rate variations among 12 populations of red coral dwelling in contrasted habitats, showed that growth rates were mostly similar across populations except for RIS that showed a significantly higher growth rate (Torrents 2007). None of the environmental factors tested (temperature, water flow and trophic content) impacted significantly this parameter (Torrents 2007). Common garden experiments *in aquaria* involving colonies from RIS and RID would thus be necessary to identify the agent(s) of selection. These results also suggested that diameter growth should be supplemented with other phenotypic trait, such as fecundity, to refine our understanding on the

impact of divergent selection in *Corallium rubrum*.

Adaptive divergence between populations was already reported in other marine species (e.g. *Fucus gardneri* Blanchette 1997; *Mytilus edulis* Yanick *et al.* 2003; *Salmo salar* Dionne *et al.* 2008). Our results contribute to the emerging view, which assumes local adaptation to be more frequent than previously thought in marine species (Conover *et al.* 2006; Baums 2008; Hauser & Carvalho 2008). Moreover the present study suggests that these adaptive divergences could occur at the scale of tens of meters in *Corallium rubrum* in accordance with theoretical predictions based on its life history traits (especially highly restricted gene flow Ledoux *et al.* 2010, in press) (see Baums 2008 for details). Such pattern of fine-scale local adaptation has already been demonstrated in other species. Nevertheless, most of these species (e.g. *Nucella lapillus* Hughes & Taylor 1997; *Littorina saxatilis* Johannesson *et al.* 1993) inhabited the intertidal zone, an environment with spatially and temporally highly contrasted physical characteristics (Rafaelli & Hawkins 1986), and / or were characterized by complex life cycles involving sexual and asexual reproduction (e.g. *Celleporella hyalina* Hughes 1992; *Actinia tenebrosa* Sherman & Ayre 2008); two features that reinforce local adaptation capacities (Williams 1975). To our knowledge, formal descriptions of patterns consistent with such fine-scale local adaptation in subtidal species are very scarce (e.g. another octocorallian *Eunicea flexuosa* Prada *et al.* 2008), reinforcing the value of our study.

4-2) Differential acclimatization capacities in red coral populations facing a thermal stress

The *in situ* common garden experiment demonstrated the occurrence of intense phenotypic changes across habitats for the two considered populations. Moreover, these two samples were differentially affected by the environmental conditions of the common garden habitat, as shown by the survey of tissues necrosis. Therefore, the two population-environment interactions at stake during the experiment were different, suggesting differential acclimatization capacities between the two populations.

The occurrence of differential acclimatization capacities was demonstrated between populations within few marine species facing different environmental stressors such as temperature or water flow (e.g. *Balanus glandula* Marchinko 2003; *Mytilus californicus* Place *et al.* 2008; *Nucella canaliculata* Kuo & Sanford 2009; *Porites lobata* Barshis *et al.* 2010). Acclimatization capacities are linked to the degree of phenotypic plasticity of populations (Somero 2010). Considering the long generation times of *Corallium rubrum* (Garrabou & Harmelin 2002) that limits the feasibility of experiments conducted over multiple generations, whether these differences in observed plasticity are adaptive (genetically based and driven by natural selection) or not needs the development of genomic approaches (e.g. Stillman & Tagmount 2009). However two statements should be mentioned. Concerning the heritability of the acclimatization potential, the two populations used in this experiment were genetically differentiated. The differential plasticity observed could thus get

a genetic basis despite some experimental artifacts (e.g. different sensitivity to handling) or environmental effects linked to the origin habitat (e.g. maternal effect) could not be totally ruled out (Pigliucci 2005). Then, phenotypic plasticity could be considered as an evolutionary answer to environmental heterogeneity (Via *et al.* 1995). The shallow habitat of RIS is characterized by contrasted thermal features especially during summer (period of the experiment) with strong thermal variation on short time interval compared to the deep habitat of RID that is more thermally stable (Bensoussan *et al.* 2010). A previous study *in aquaria*, demonstrated the greater thermotolerance of shallow compared to deep populations (Torrents *et al.* 2008). Because the temperature observed during our experiment were comparable with those leading to tissue necrosis in Torrents *et al.* (2008) and those reported during the mortality events (Garrabou *et al.* 2009), temperature is likely a major driver in the observed phenotypic responses. The higher acclimatization capacity of the population from RIS could thus be linked to adaptive evolution driven by the variable thermal conditions found in its habitat. This hypothesis is consistent with reported variations of thermotolerance within species, populations adapted to variable environments showing generally better acclimatization capacities than populations from stable environments (e.g. Deutsch *et al.* 2008; Barshis *et al.* 2010).

Despite a likely role of genetic determinant in the observed acclimatization potential, our study failed to demonstrate any association between estimates of inbreeding, genetic variation and the level of acclimatization. Whereas the difference between the phenotypic responses observed between the two samples was highly significant, the estimated parameters of inbreeding (F_{IS}) and genetic variation (H_e , A_r and A_p) were mostly similar. Considering that only two samples were analyzed, this result should be treated with caution. Investigation of the putative link between red coral neutral genetic diversity and acclimatization capacity should thus be conducted using a more extensive dataset (e.g. Johansson *et al.* 2007).

4-3) Impact of the predicted warming on population-environment interactions in the red coral: integrating evolutionary and ecological processes

The role of functional or developmental constraints (Futuyma 2010) on the evolution of thermotolerance of *Corallium rubrum* remains unknown. Nevertheless, our study combined with existing data allows getting first insights in the eco-evolutionary dynamics of red coral populations, and thus, in their potential evolutionary trends facing the ongoing environmental changes. Red coral populations are generally characterized by high levels of genetic diversity (Ledoux *et al.* 2010). Despite the link between neutral and adaptive genetic variations is generally weak (Reed & Frankham 2001, 2003), our results suggested that the levels of standing genetic variations in red coral populations were sufficient for selection to act upon (Bürger & Lynch 1995), allowing in some cases local adaptation. Red coral populations could therefore likely cope with selective environments. Accordingly, we showed that 66.7 % of individuals coming from RIS were not affected by the war-

mer common garden environment, likely due to their adaptive acclimatization capacities. The occurrence of these “thermo-resistant genotypes” could be considered as a signal for potential adaptation in front of the predicted warming, through an increase of their frequencies at the species level. However, a thorough discussion of these results needs to consider the putative interactions between ecological and evolutionary processes. First, the low population dynamics combined with the long generation times and low gene flow that characterize *Corallium rubrum* (Garrabou & Harmelin 2002; Santangelo *et al.* 2003; Ledoux *et al.* 2010), should limit the spread of the putatively adapted genotypes, as well as the inflow of new genetic variations through mutation, migration or recombination. These biological features could impact negatively the adaptive capacity of this species (Berteaux *et al.* 2004; Harley *et al.* 2006). At the same time, the selection linked to warming should induce environmentally forced reductions in population size as illustrated by our common garden experiment (only 16.6 % of the colonies from RID survived) and by the field surveys following MMEs (Garrabou *et al.* 2001, 2009). These drastic reductions in population size combined with restricted recolonisation capacity (Ledoux *et al.* in press) could enhance demographic stochasticity, leading putatively to local population extinction (Lande 1988). They should also increase, synergistically, genetic drift and inbreeding depression, limiting the potential for future adaptation by purging heritable character of ecological importance (Stockwell *et al.* 2003), and decreasing the progeny’s fitness (Hedrick 2001).

Our ability to refine this evolutionary scenario (e.g. evolutionary rescue or evolutionary trapping) relies upon acquisition of supplementary data, such as the evaluation of the impact of warming on reproductive outputs of colonies or mechanistic insights in the physiological and genetic determinants for thermal adaptation. Besides direct metabolic dysfunctions (Torrents *et al.* 2008) putatively combined with low level of food (Coma *et al.* 2009), the high temperatures may have produced indirect effects such as development of thermodependant pathogens (e.g. *Vibrio coralliilyticus* Bally & Garrabou 2007), which should be considered. Nevertheless, our study reinforces the view that red coral populations dwelling in the surface layers are undoubtedly threatened because of the rapid rate of climate change (Garrabou *et al.* 2009; Ledoux *et al.* 2010). Near their upper thermal limit, these populations are thus exquisitely sensitive to thermal increase (Torrents *et al.* 2008; Previati *et al.* 2010). Considering the envisioned environmental changes that would lead to strong demographic and genetic erosions, and the life history traits of *Corallium rubrum* that should not favor rapid evolution, we argue that extinction of these populations should be formally considered during the elaboration of management policies. Therefore, limiting the direct anthropic influences, and especially harvesting pressures, on populations directly threatened by warming, is, in our opinion, an urgent need.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The following issues are addressed:

- 1- **Characterization of the thermal environment for Riou and Scandola: Table 5-S1 and Figure 5-S1.**
- 2- **Experimental plates and calcein labeling.**
- 3- **Growth rate analysis.**
- 4- **Genetic parameters and level of inbreeding for each sample used for the field-experiments: Figure 5-S2.**

S1) Characterization of the thermal environments for Riou and Scandola

Table 5-S1: a) Mean temperature conditions from July 1st to September 30th: mean, coefficient of variation (CV) and percentage of time with T higher or equal to 20, 24 and 25 °C at 5, 20 and 40 m depth at Riou (Marseilles) and 20 and 40 m depth at Palazzu (Scandola). Means were computed over the summer periods of 2004 to 2006 for Riou 5 m, 2003 to 2006 for Riou 20 m, 2000-2006 for Riou 40m and 2004-2007 for both depths at Scandola. b) Mean and maximum temperature values and % of time with temperature higher or equal to 20, 24 and 25 °C at 5 m depth for the 2006 summer at Riou study site. The temperatures of 24-25°C were proposed by Torrents *et al.* (2008) as upper thermal threshold for *Corallium rubrum*.

a)

	Riou			Scandola	
	5 m (2004-2006)	20 m (2003-2006)	40 m (2000-2006)	20m (2004-2007)	40 m (2004-2007)
Mean T (°C)	20.3±0.6	18.3±0.4	15.7±0.3	21.0±0.6	16.4±1.2
Mean CV	17.7±0.6	16.3±2.2	12.1±2.3	9.1±2.4	7.7±0.9
Min	13.7	13.5	13.0	14.2	13.2
Max	26.5	25.4	23.6	25.9	23.0
% >20	60.7±4.7	33.9±8.6	5.6±4.1	68.1±17.1	3.1±4.4
% >24	15.6±6.7	1.0±1.5	0	3.8±5.6	0
% >25	6.4±6.7	0.1±0.2	0	0.5±0.9	0

b)

	Riou 5 m (2006)
Mean T (°C)	20.9±3.6
Min	13.7
Max	28.6
% >20	65.7
% >24	19.8
% >25	13.8

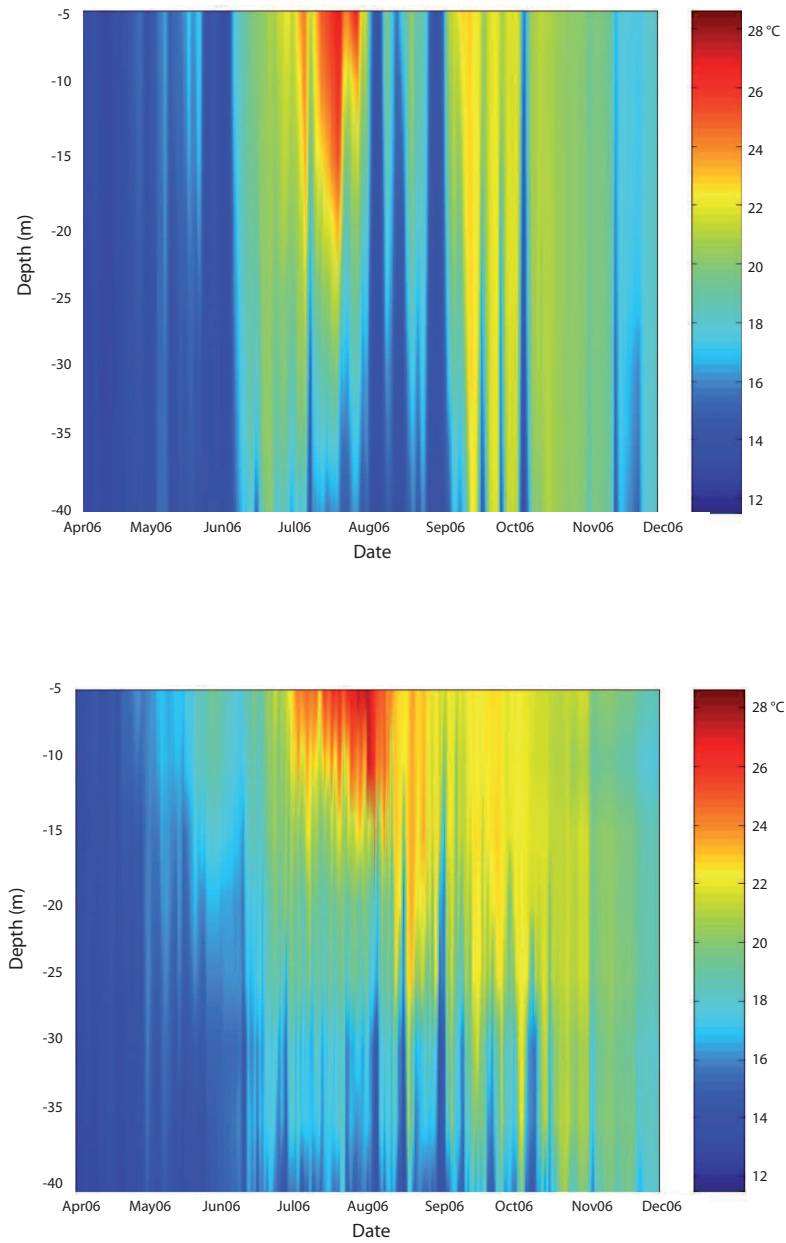


Figure 5-S1: Time series of daily mean temperature from April to December 2006 in Riou (a) and Scandola (b).

S2) Experimental plates and calcein labeling

Each colony was mounted in experimental plates. These plates were built up with three PVC disks (10 cm in diameter) and two rubber layers used to separate the disks. Each PVC disks had 8 holes (1 cm in diameter and one colony per hole). Plates and rubber layers were hold together with screws. The colonies were fixed randomly in the experimental plates without putty. They were hold mechanically thanks to the perpendicular cuts previously done in the rubber layers. All the plates were placed in the incubation chamber for the calcein labeling to quantify the growth rate during the experimentation period. This protocol was realized using scuba diving in less than one hour.

The experimental plates were thus placed in a 10 litres incubator with one gram of calcein (Sigma C-0875) for 24 hours. They were then placed at their final depth following the experimental design. The three plates corresponding to the same treatment were fixed together in a cross-like PVC structure that was screwed onto a metallic bar (10 cm in height) fixed to the rock. The two sets of plates corresponding to each treatment (i.e. control and transplant) were fixed in the same area (i.e. less than one meter square) to keep the colonies under the same environmental conditions.

S3) Growth rate analysis

Based on the protocol used for the growth rate analysis (Torrents 2007), the air-dried portion of 10 colonies per treatment was embedded in epoxy resin (Durcupan ACM FLUKA) following standard procedures and heated to 60 °C for 24 hours. One millimetre thick cross sections were then sliced from each colony with a diamond saw. The sections were glued (ESCIL D200 SF UV radiation polymerization) to a microscope slide, and polished to obtain 150 µm thick slabs. We took photos of the section for each of the 10 colonies per treatment under epifluorescence microscopy (excitation filter 340-380nm) with a stereomicroscope (Leica © MZ16) connected to a video camera 6 (Evolution™ LC Color – PLA662). However, because of labelling deficiencies for some treatments, only 5 colonies were available in some cases. The measurements were assessed by measuring the distance from the calcein labelling to the periphery of the section. To avoid problem due to growth variability within colonies (Torrents 2007), we used stereomicroscope images obtained from different areas of each section and calculated the mean of the 10 highest growth rates measured for each colony (maximum growth rate). This procedure avoids the problems linked to the differential quality of the labeling that could result in different number of growth measures per colony. The image analysis were carried out with Visilog© 6.0 – TNPC© 4.1 using appropriate calibration.

S4) Genetic diversity and structure for the samples sample used for the field-experiments

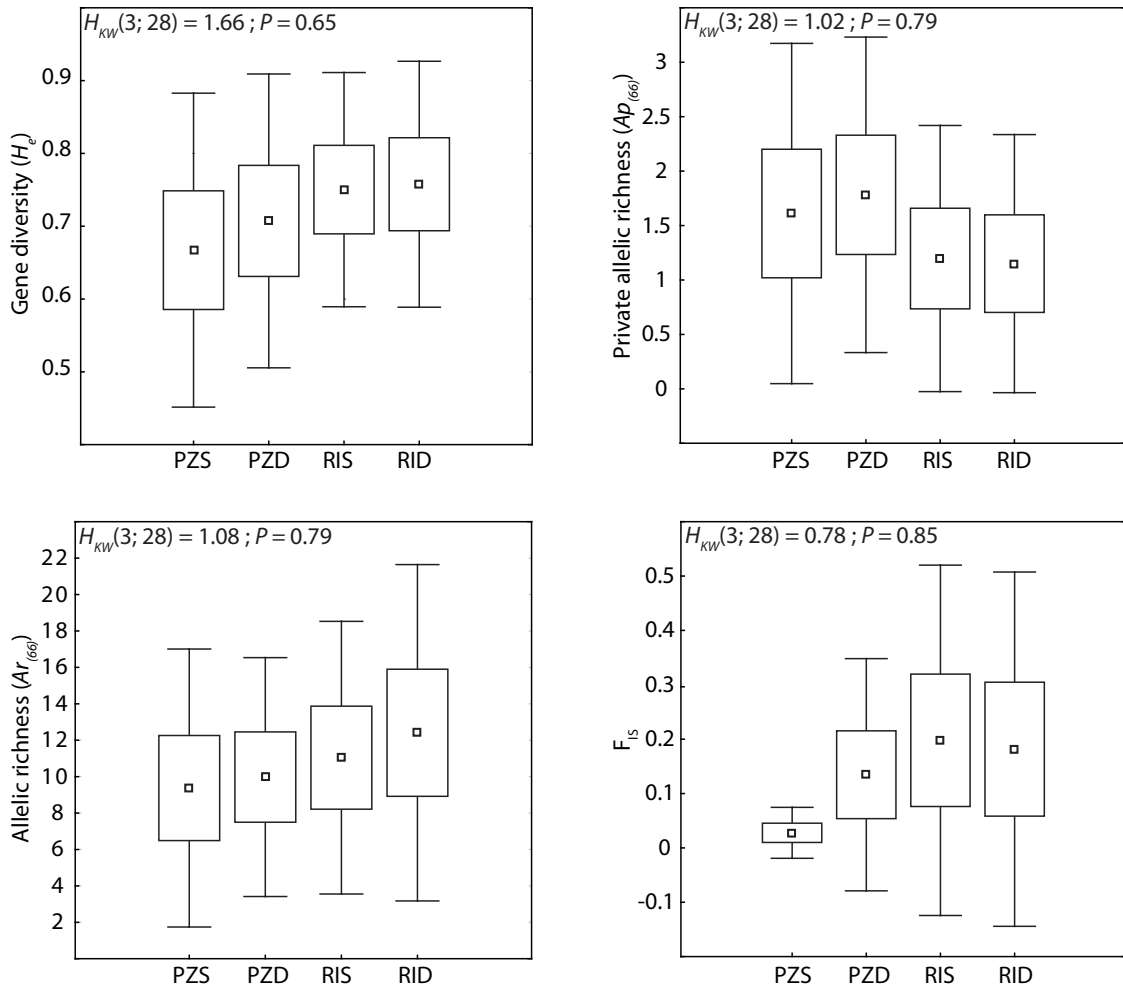
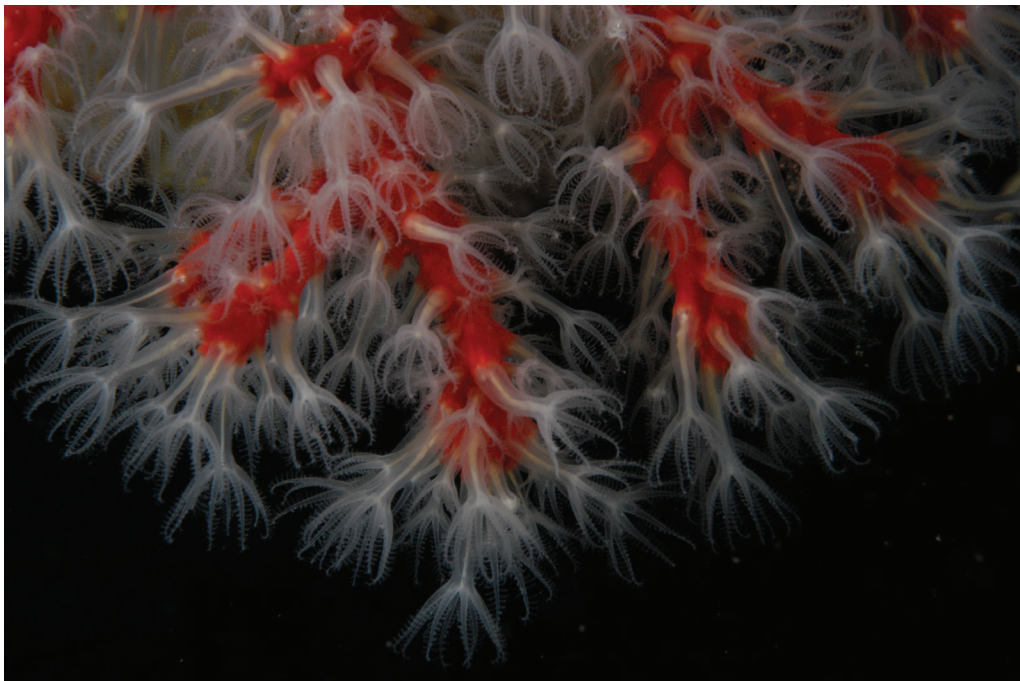


Figure 5-S2: Comparison based on Kruskal-Wallis tests of three genetic diversity parameters (H_e , $Ar_{(66)}$ and $Ap_{(66)}$) and level of inbreeding (F_{IS}) among the 4 samples (PZS, PZD, RIS, RID). The H and the corresponding P values are shown. The mean values for each parameter in each sample are represented by square (\square) whereas boxes and bars respectively represent standard errors and standard deviations.

Chapitre 6

**Conclusion générale:
Synthèse et implications
des résultats pour la conservation de
*Corallium rubrum***



Dans cette conclusion, je propose une synthèse de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail, puis je présente les inférences quant à l'histoire évolutive et à la dynamique éco-évolutive de *Corallium rubrum* dans le contexte des changements environnementaux. Je discute enfin leurs implications pour la gestion et la conservation des populations de surface de corail rouge (5 - 60 m), avant de proposer des directions pour les recherches à venir.

1) Synthèse des principaux résultats

Ce travail de thèse résolument ancré en biologie de la conservation, avait pour objectif principal de compléter et d'affiner nos connaissances sur la biologie du corail rouge, *Corallium rubrum*, et ce, dans le contexte actuel des fortes pressions environnementales subies par cette espèce. Afin de préciser certaines caractéristiques de son écologie et de sa diversité, d'étudier son histoire évolutive et de participer à la compréhension de l'impact des changements globaux sur cette espèce, j'ai donc développé une approche combinant génétique des populations et écologie de terrain. L'ensemble des résultats obtenus a, dans la mesure du possible, été discuté à la lumière des connaissances précédemment acquises sur les traits d'histoire de vie, la démographie ou encore la dynamique de populations de l'espèce et ce, dans le but de mener une réflexion en biologie de l'évolution.

Le corail rouge est un modèle biologique relativement atypique par son appartenance à la sous-classe des octocoralliaires, composée d'espèces peu étudiées malgré leur grande diversité, leur rôle écologique majeur au sein de diverses communautés marines et dans quelques cas leur exploitation par l'homme. Dans ce contexte, la première étape de mon travail a consisté à mettre au point et à développer l'utilisation en routine de différents types de marqueurs moléculaires nucléaires ou mitochondriaux. **Cette première phase aura permis l'acquisition d'un ensemble d'outils moléculaires applicables chez le corail rouge et dans certains cas, chez d'autres gorgonaires méditerranéens (Annexe 2). Ainsi, à partir des marqueurs mitochondriaux ND2 et ND6, je replace neuf espèces méditerranéennes ou appartenant au genre *Corallium*, dont le corail rouge, au sein d'une phylogénie de 67 espèces contribuant donc à une amélioration des connaissances de la diversité biologique et de l'évolution des octocoralliaires.** Malgré un manque de résolution à certains niveaux taxonomiques, cette phylogénie confirme l'existence de trois clades majeurs (*Holaxonia-Alcyoniina* ; *Calcaxonia-Pennatulacea* et *Anthomastus-Corallium*). Les genres *Paramuricea* et surtout *Eunicella* (ce dernier n'ayant jamais été intégré aux phylogénies moléculaires publiées) semblent monophylétiques. Enfin la division du genre *Corallium* en deux genres *Corallium* et *Paracorallium* récemment proposée sur des critères morphologiques n'est pas soutenue du point de vue moléculaire (Chapitre2-I). **Ce travail de phylogénie est complété par une évaluation des locus ND2-ND6 en tant que système de code barre chez les octocoralliaires. Même si ces locus ne peuvent être utilisés comme code barre *stricto sensu*, la révision**

nécessaire de la classification actuelle des octocoralliaires rend leur utilisation pertinente, notamment pour l'assignation de nouveaux taxons à l'un des trois clades majeurs (Chapitre2-II).

Une fois le corail rouge replacé au sein de la phylogénie des octocoralliaires et les outils moléculaires maîtrisés, j'ai donc abordé la problématique microévolutive, sujet principal de cette thèse. A partir d'un échantillonnage de 40 sites de surface correspondant à 1222 individus répartis au sein de quatre régions du bassin Méditerranéen Nord-Occidental (Baléares, Catalogne, Nord-Ouest de la Corse et région Liguro-Provençale) et de l'utilisation de 10 locus microsatellites, **je confirme l'existence d'un déficit en hétérozygotes au sein des populations de corail rouge et d'un niveau de structuration génétique généralisé entre ces populations, des sites séparés d'une dizaine de mètres étant significativement différenciés.** Cette différenciation entre populations s'accompagne d'une différenciation plus faible mais significative entre les quatre groupes régionaux mis en évidence par une méthode de regroupement basée sur les génotypes multilocus, qui correspondent donc globalement aux quatre régions géographiques échantillonnées. Ces patterns de structuration spatiale généralisée impliquent des flux de gènes restreints entre populations. **La corrélation positive entre distance génétique et distance géographique sur l'ensemble des populations analysées, démontre que ces flux de gènes de faible intensité suivent un modèle de type isolement par la distance.** Ce résultat, original chez un métazoaire marin possédant une phase larvaire, suggère par conséquent, que migration et dérive génétique sont à l'équilibre à l'échelle du bassin étudié. **Au niveau régional, cet isolement par la distance s'observe dans deux (régions Catalogne et Liguro-Provençale) des trois groupes régionaux au sein desquels l'analyse a pu être menée,** suggérant ainsi des variations dans l'impact respectif de la dérive et de la migration, et donc des histoires évolutives potentiellement différentes d'une région à l'autre. Le second volet de cette étude aura permis de cartographier la diversité génétique à l'échelle du bassin Méditerranéen Nord Occidental et de tester l'équilibre mutation-dérive au sein des populations, afin de mettre en évidence d'éventuelles variations démographiques. **Les valeurs élevées pour les trois paramètres testés (H_e , $Ar_{(g)}$ et $Ap_{(g)}$) traduisent une diversité génétique importante à l'échelle des groupes régionaux comme des populations. Cette diversité est répartie de façon hétérogène.** Les îles Baléares sont cependant significativement plus diversifiées que les trois autres groupes régionaux. Deux hypothèses non exclusives sont proposées pour expliquer ce résultat : l'une, contemporaine, place les Baléares à l'interface de deux pools génétiques différenciés (bassin Liguro-Provençal et bassin Algérien) ; l'autre, historique, propose que les sites de surfaces aux Baléares aient été recolonisés plus rapidement que ceux des trois autres régions, suite à leur plus grande proximité par rapport aux populations ancestrales, induisant donc une érosion génétique moindre. Enfin 16 des 40 populations montrent des signes d'expansion démographique avec un déficit d'hétérozygotie significatif par rapport à l'attendu, sous l'hypothèse de l'équilibre mutation-dérive. Ce résultat est à traiter avec prudence étant donné qu'il peut

aussi être dû à un effet Wahlund très probable dans le cas des échantillons analysés. Après avoir brossé ce portrait de la structuration génétique spatiale, des flux de gènes et de la répartition de la diversité génétique neutre à l'échelle du bassin Méditerranéen Nord Occidental, je me suis intéressé au fonctionnement des populations. Grâce à un échantillonnage exhaustif et individuel (75 colonies sur une surface de 0,5 m² environ), à la photogrammétrie et à l'analyse de 12 locus microsattellites, et notamment aux derniers développements théoriques concernant le modèle d'isolement par la distance, **je démontre l'existence d'une structuration spatiale entre individus au sein de la surface échantillonnée.** La méthode mise en place et l'échelle considérée rendent ce résultat particulièrement séduisant, d'autant plus dans le cas d'une espèce gonochorique à reproduction sexuée comme *Corallium rubrum*. A partir de cette structure génétique spatiale entre individus, différents paramètres démographiques sont estimés et notamment la distance axiale moyenne entre parents et descendants qui varie de 22,6 à 32,1 cm en fonction de la densité efficace considérée. Cette valeur de dispersion efficace intègre la dispersion par les gamètes et par les larves, ce qui sous-entend donc que le cadrat échantillonné correspond approximativement à une unité de reproduction. En plus des mesures de distances interindividuelles, l'utilisation de la photogrammétrie combinée aux données écologiques (taille et âge à la maturité sexuelle et croissance en diamètre) aura permis de définir trois classes d'âge et d'y assigner 49 colonies sur les 75 échantillonnées. **Une analyse de parenté entre ces différentes classes démontre l'existence d'un réseau complexe de relations au sein du cadrat étudié,** avec notamment plusieurs paires parent-descendant potentielles, ce qui renforce le caractère restreint de la dispersion efficace chez cette espèce. Cette analyse de parenté suggère aussi des événements de reproductions multiples au sein de cette espèce comme son mode de reproduction pouvait le laisser supposer. **En complément, la structuration génétique significative entre ces trois classes, atteste de l'existence d'une différenciation temporelle probablement expliquée par un effet de dérive génétique d'une génération à l'autre.** Les individus d'une génération ne correspondent donc pas à un échantillonnage représentatif des individus des générations précédentes. Ces résultats forment un ensemble cohérent qui participe à la compréhension de l'impact de la phase larvaire et du mode de reproduction sur la biologie des populations du corail rouge.

Grâce à ces travaux basés sur la diversité génétique neutre, j'ai donc pu définir l'impact de certaines forces microévolutives, principalement migration et dérive, sur la biologie de *Corallium rubrum* à différentes échelles spatiales, de l'inter- à l'intra-populationnel. L'acquisition de ces résultats cruciaux, aussi bien du point de vue de l'amélioration des connaissances fondamentales que de la gestion du corail rouge, est une étape indispensable pour pouvoir travailler sur les processus sélectifs « historiques » (ayant participé à la divergence entre populations) et « contemporains » (en jeu lors des perturbations environnementales récentes), et donc pour pouvoir envisager le futur des populations de surface de cette espèce. La suite de mon étude s'est donc focalisée sur la sélection

naturelle, son rôle dans la divergence entre populations et son impact potentiel sur leur devenir. Cette partie est abordée sous l'angle de la dynamique éco-évolutive présentée en introduction de ce manuscrit et résumée dans le cas du corail rouge en suivant, afin de pouvoir apporter une dimension « prédictive » à la discussion des résultats. Deux types d'expérimentations *in situ* ont été menés dans le but d'analyser les interactions entre les populations de corail rouge et leur environnement. Des transplantations réciproques entre populations originaires d'habitats contrastés, notamment du point de vue de leur régime thermique, ont été mises en place sur deux sites distincts (Riou près de Marseille et Scandola en Corse). Différents traits (croissance en diamètres, nécrose des tissus et survie) liés à la valeur sélective des individus ont été mesurés afin d'évaluer l'impact du changement d'habitat et donc les liens unissant ces populations et leur environnement d'origine. **Ces expérimentations démontrent que les interactions population-environnement pour la croissance en diamètre peuvent varier d'une population à l'autre.** Complétées par des comparaisons entre estimateurs de différenciation phénotypique (P_{ST}) et génétique (supposée neutre, F_{ST}), **ces résultats suggèrent que la sélection divergente peut, dans certains cas, agir sur la divergence observée entre populations de corail rouge, induisant de l'adaptation locale.** En parallèle, une expérimentation de jardin commun a été menée *in situ*. Des colonies provenant des deux populations de Riou utilisées lors des transplantations réciproques, ont été soumises à un habitat stressant, notamment du point de vue thermique. Grâce au suivi du taux de nécrose des colonies, **cette expérimentation démontre l'existence de capacités d'acclimatation (plasticité phénotypique) différentes entre les deux populations analysées.** La population soumise à un régime thermique variable dans son habitat d'origine est en effet moins impactée par le stress thermique que celle habituellement soumise à un régime thermique stable. Ajoutée à la différenciation génétique significative entre les deux échantillons, cette différence de capacité d'acclimatation pourrait donc avoir une origine adaptative.

2) Scénario évolutif et dynamique éco-évolutive

Une mise en perspective de ces résultats avec les fluctuations du niveau de la mer lors du dernier maximum glaciaire (21000 BP ; -120 m par rapport au niveau actuel) et les traits d'histoire de vie (âge à la maturité sexuelle aux alentours de 10 ans, potentiel reproducteur important à partir de 20 ans et stratégie de type répartition des risques), permet de proposer un scénario évolutif pour expliquer les patterns de structuration et de diversité observés. **Ainsi, la recolonisation des sites de surfaces serait récente (moins de 2000 générations) et aurait eu lieu, de proche en proche, à partir de populations ancestrales (situées actuellement sous la limite des 120 m) expliquant le maintien d'un équilibre migration-dérive à l'échelle du bassin Nord-Occidental.** Parallèlement, le flux de gènes limité entre populations combiné à la dispersion efficace réduite et l'effet dérive au sein des populations auraient entraîné la différenciation génétique et l'hété-

rogénéité observées entre les différents sites. Ce scénario a pu être en partie confirmé grâce à l'incorporation de populations d'Afrique du Nord et d'Adriatique (7 populations supplémentaires portant à 1378 le nombre d'individus génotypés) permettant notamment d'étendre le modèle d'isolement par la distance et donc l'équilibre migration-dérive à l'ensemble du bassin Occidental, et précisé grâce à l'utilisation du locus *EFI* qui a démontré l'absence de zones refuges lors des dernières glaciations.

Si les résultats de ce travail permettent des inférences historiques, ils participent aussi à la compréhension de la trajectoire évolutive des populations de *Corallium rubrum*, puisqu'ils rendent possible une première exploration de la dynamique éco-évolutive de cette espèce.

D'après les résultats des transplantations réciproques, le niveau de diversité génétique au sein des populations de corail rouge semble suffisant pour permettre à la sélection naturelle de s'exercer. D'autre part, un certain nombre de génotypes n'ont pas été particulièrement affectés par le stress thermique lors de l'expérimentation en jardin commun, suggérant donc qu'une adaptation à un régime thermique plus chaud pourrait être envisageable. Cependant, cette pression de sélection a entraîné des réductions de taille importantes au sein des deux échantillons. La faible dynamique de population du corail rouge et le flux de gènes restreint ne pourront compenser les pertes démographiques à court terme. Les érosions démographique et génétique induites par cette réduction de taille des populations pourraient renforcer l'impact de la stochasticité démographique et de la dérive génétique, et éventuellement entraîner une dépression de consanguinité. Cette dynamique éco-évolutive potentielle est résumée par la figure 6-1. Le devenir des populations de surface de cette espèce face à la rapidité et à l'intensité des changements environnementaux en cours semble donc compromis. Des travaux supplémentaires doivent cependant être menés afin de préciser certains points, comme par exemple, l'impact des anomalies thermiques sur le succès reproducteur des colonies survivantes ou celui d'une diminution de la densité des colonies de corail rouge sur les communautés dont elles font parties. Le rôle potentiel de la compétition interspécifique avec des espèces thermophiles ou l'apparition de nouveaux pathogènes thermodépendants devrait aussi être pris en compte.

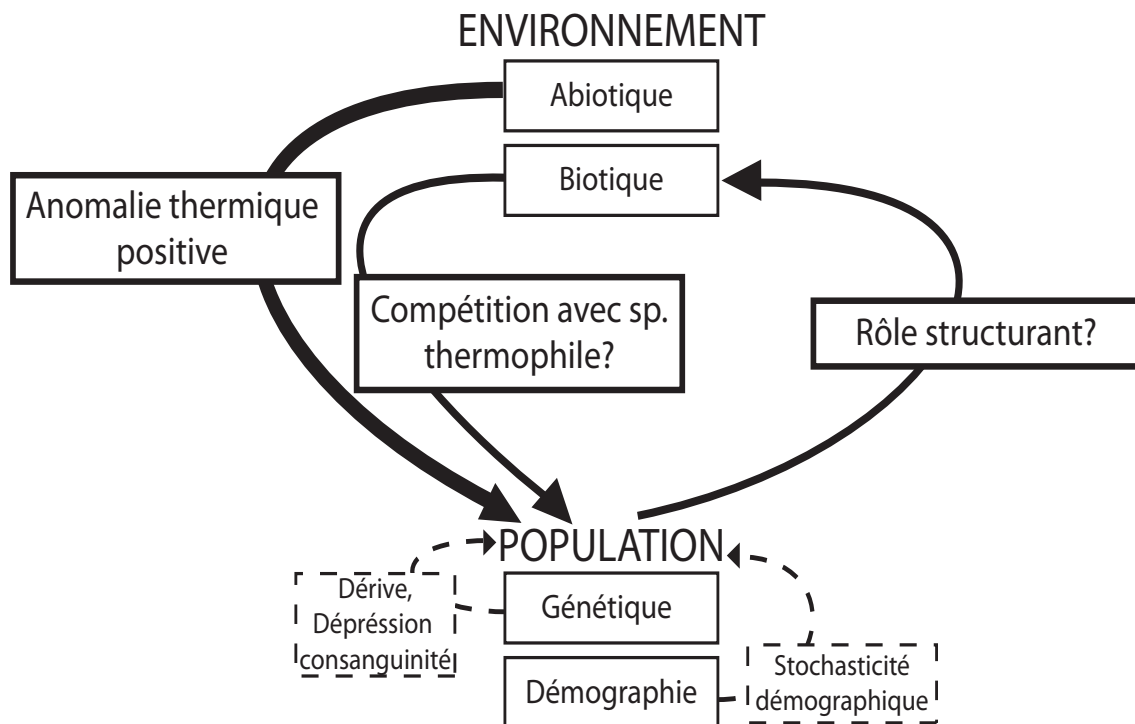


Figure 6-1 : Dynamique éco-évolutive pour le corail rouge dans le contexte des changements environnementaux en cours. Les anomalies thermiques induisent une diminution de la taille des populations (flèche pleine épaisse). Cette diminution de la taille des populations de corail rouge peut potentiellement augmenter l'impact de phénomènes populationnels (dérive et stochasticité démographique ; cadres et flèches en pointillé) tout en diminuant le rôle structurant de l'espèce sur les communautés. Parallèlement, d'autres pressions environnementales pourraient s'ajouter aux anomalies thermiques comme la compétition avec des espèces thermophiles ou l'action de pathogènes thermodépendants.

3) Implications pour la conservation et la gestion du corail rouge

A partir de cette étude et des travaux précédents, plusieurs propositions peuvent être faites pour améliorer la conservation et la restauration des populations de surface de *Corallium rubrum*. La première est triviale et contraste avec le mode de gestion usuel de la biodiversité souvent inscrit dans le court terme ; cependant devant la faiblesse des flux de gènes et de la dynamique de cette espèce, **la conservation du corail rouge doit se penser à l'échelle de plusieurs décennies et localement.**

Ce constat pris en compte, conserver la diversité adaptative et le potentiel évolutif des populations face aux changements environnementaux à venir, **nécessite de préserver le réseau de connections entre populations mis en évidence lors du chapitre 3, afin d'éviter une augmentation de leur isolement démographique et génétique. Un niveau de référence de la diversité génétique des populations a été défini au cours de ce même chapitre.** En tenant compte du modèle de flux de gènes, ces résultats peuvent donc être utilisés afin de développer de nouvelles aires marines protégées focalisées sur des populations d'intérêt. Le flux de gènes réduit entre populations et la dispersion efficace limitée en leur sein, sous-entendent que le corail rouge possède une faible capacité de recolo-

nisation à court terme. **Ainsi des actions de restauration devront probablement être envisagées dans un futur proche.** Deux points, qui méritent cependant d'être confirmés sur un plus grand nombre de populations, doivent être soulignés : Grâce aux éléments apportés par le chapitre 4 sur la biologie des populations de cette espèce, **la restauration d'un site devrait sans doute passer par la reconstitution de patches de taille réduite mais formés par un nombre élevé de colonies matures**, afin de recréer des unités de reproduction fonctionnelles et de permettre une recolonisation de proche en proche. Il faut toutefois mentionner que **ce type d'action nécessite une évaluation préalable du niveau d'adaptation locale des populations considérées**, puisque comme illustré lors du chapitre 5, la transplantation de colonies dans un nouvel habitat peut entraîner une diminution de leur valeur adaptative.

Etant donné l'impossibilité d'arrêter le réchauffement climatique en cours et les événements extrêmes qui devraient en découler, il est indispensable de limiter les pressions anthropiques directes sur cette espèce et ce, par une action concertée à l'échelle internationale. **Ainsi, en plus d'un classement à l'annexe II de la CITES afin de contrôler son commerce, l'interdiction définitive de la récolte du corail rouge dans les zones de surface soumises aux pressions environnementales, probablement induites par le changement climatique (0-50m), doit, à mon avis, être sérieusement considérée.**

Pour finir, la différenciation génétique significative entre populations et le pouvoir résolutif des microsatellites rendent ces marqueurs potentiellement utiles pour identifier précisément la provenance de colonies grâce aux méthodes d'assignation. Ceci est d'autant plus intéressant que j'ai pu démontrer que des PCR étaient possibles à partir de colonies sèches c'est à dire n'ayant pas subi de conditionnement dans l'alcool. L'évaluation précise du potentiel informatif des marqueurs et de la robustesse des amplifications à partir de colonies sèches sera menée, afin de proposer un outil utilisable dans le cadre d'analyse légale pour lutter contre le braconnage.

4) Perspectives

En plus de l'évaluation rigoureuse des microsatellites dans un cadre d'analyse légale, je vais développer deux points dans un futur proche à partir du jeu de données produit. Du point de vue de la gestion des populations de corail rouge, la régression entre distance génétique et distance géographique sera décomposée dans le but de définir l'implication relative de la migration et de la dérive sur les divergences observés entre les différentes populations étudiées (« *pairwise decomposed regression* » ; Koizumi *et al.* 2006). Cette décomposition du modèle d'isolement par la distance sera complétée par une évaluation de la dispersion (estimée de façon directe par une méthode d'assignation) afin d'estimer le lien entre démographie et divergence génétique chez le corail rouge, et donc d'apporter de nouveaux éléments pour la définition des unités de gestion. Parallèlement, concernant l'écologie de cette espèce, je préciserai les phénomènes en jeu lors de la phase de

recrutement grâce aux microcolonies (recrues de l'année) échantillonnées sur deux sites de la région de Marseille. L'origine de ces recrues et les variations génétiques entre le pool génétique qu'elles représentent et les colonies matures récoltées sur ces mêmes sites seront définies.

A l'avenir, les efforts de recherche sur l'écologie de *Corallium rubrum* peuvent être poursuivis dans différentes directions, dont certaines sont résumées ici sous la forme de 10 questions réparties autour de deux axes complémentaires :

1. Afin de préciser l'histoire évolutive du corail rouge :

- Quel a été l'impact des variations environnementales passées sur cette espèce ?
- Quels sont les liens évolutifs entre les pools génétiques Atlantique et Méditerranéen Occidental et Méditerranéen Oriental ?
- Au sein du bassin Occidental, quels sont les facteurs historiques expliquant l'absence d'un équilibre migration-dérive pour les populations de Corse, et comment expliquer la diversité génétique significativement supérieure observée aux Baléares ?
- Quels sont les niveaux de diversité des populations profondes ou situées dans des régions géographiques potentiellement moins impactées par l'activité humaine ?
- Quel est l'impact relatif de la structuration verticale (populations de surface vs. populations ancestrales) et de la structuration horizontale (entre populations de la même gamme de profondeur) sur le fonctionnement général de l'espèce ?

2. Afin de poursuivre la caractérisation de la diversité, de l'écologie et de la dynamique éco-évolutive du corail rouge :

- Quelle est l'influence des variations de la structure de tailles et de densité observées entre populations sur leur fonctionnement (dispersion efficace et recrutement) ?
- Quelle va être l'évolution de la diversité génétique neutre dans les années à venir (suivi temporel), et à quelle taille la viabilité d'une population est-elle compromise par les processus de stochasticité démographique et génétique (dérive) ?
- Existe-t-il un lien entre les caractéristiques génétiques neutres des populations et leur réponse aux événements de mortalité massive, et existe-t-il une relation hétérozygotie - valeur sélective des individus face au stress thermique ?
- Quels sont les déterminants génétiques influençant les capacités d'acclimatation et l'adaptation à la température chez cette espèce ?
- Quel sera l'impact d'une réduction des populations de corail rouge sur les communautés biologiques auxquelles il appartient ?

L'ensemble de ces questions représente donc une partie des perspectives pouvant être abordées grâce aux résultats de ce travail de thèse. D'autre part, le développement d'une approche comparative entre espèces de gorgonaires grâce, par exemple, aux différentes méthodes de standardisation de la différenciation génétique, devrait aussi être envisagé afin de préciser un peu plus l'impact des traits d'histoire de vie (reproduction, dispersion) sur la biologie et l'évolution de ces organismes.

“A major impediment to reducing biodiversity loss around the globe is our limited knowledge of the true extent of biodiversity, its evolutionary history, and the forces that shape responses to environmental change.” (Hendry et al. 2010).

La somme de résultats acquis lors de cette thèse et leur interprétation intégrant génétique des populations et écologie aura permis d’élargir le champ de connaissances relatif à l’écologie de *Corallium rubrum*, tout en proposant une première ébauche de son histoire évolutive et de sa dynamique éco-évolutive dans le contexte des fortes pressions environnementales en cours. De nombreuses questions portant à la fois sur l’impact relatif des forces microévolutives à différentes échelles spatiales, sur les niveaux de diversité intra-spécifique et sur les liens unissant populations et environnement chez *Corallium rubrum* ont ainsi été abordées. Parallèlement, diverses recommandations ont été proposées pour améliorer la conservation des populations de cette espèce, et différents outils de gestions de la biodiversité ont été développés (code barre *ND2-ND6* chez les octocoralliaires et microsatellites chez le corail rouge).

De façon plus générale, cette étude représente en termes de couverture géographique et de nombre de populations et de marqueurs analysés, l’une des plus conséquentes menée jusqu’à présent en Méditerranée, mais aussi plus généralement sur une espèce marine. Ce travail de thèse aura par ailleurs permis le développement d’une méthodologie originale et peu invasive (Chapitre 4) pour l’étude d’une question fondamentale en écologie marine à savoir : « comment délimiter une population chez une espèce sessile possédant une phase larvaire ? ». Il aura aussi permis, je l’espère, une avancée significative dans la compréhension de la biologie des organismes marins sessiles à phase larvaire. Par exemple, les résultats des chapitres 4 et 5 démontrent la pertinence d’approches mises en place à des échelles spatiales très réduites pour répondre à des questions fondamentales quant aux interactions de ces organismes avec le milieu environnant (individus conspécifiques ou habitat).

Son appartenance aux octocoralliaires fait du corail rouge un modèle original et complémentaire par rapport aux organismes marins sessiles à phase larvaire les plus couramment étudiés dans les problématiques sur les changements climatiques, tels que les hexacoralliaires tropicaux. Cette originalité et cette complémentarité sont renforcées par son aire de distribution et certains traits d’histoire de vie comme la gonochorie, la reproduction strictement sexuée, la faible dynamique de population et la dispersion très restreinte. Il subit aussi les changements globaux de façon particulière puisqu’il est soumis à la fois à une forte pression anthropique directe à cause de sa valeur marchande, tout en faisant partie de la trentaine d’espèce récemment impactées par des événements de mortalités-

massive, probablement liés au réchauffement climatique en cours. Ces caractéristiques, ajoutées à l'ensemble des connaissances acquises sur cette espèce au cours de ce travail ou des travaux précédents, font donc de *Corallium rubrum* un modèle d'étude pertinent et incontournable pour poursuivre l'analyse de l'impact des processus microévolutifs passés, en cours ou à venir sur la biodiversité.

Références bibliographiques

-A-

- Abbiati M, Santangelo G, Novelli S (1993) Genetic variation within and between two Tyrrhenian populations of the Mediterranean alcyonarian *Corallium rubrum*. Marine Ecological Progress Series 95, 245-250.
- Agapow P, Bininda-Emonds O, Crandall K, *et al.* (2004) The impact of species concept on biodiversity studies. *Quarterly Review of Biology* 79, 161-179.
- Agapow P, Sluys R (2005) The reality of taxonomic change. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 278-280.
- Aguilar C, Sanchez JA (2007) Phylogenetic hypotheses of gorgoniid octocorals according to ITS2 and their predicted RNA secondary structures. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43, 774-786.
- Airoldi L, Beck M (2007) Loss, status and trends for coastal marine habitats of Europe. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 45, 345-405.
- Allemand D (1993) The biology and skeletogenesis of the Mediterranean red coral. A review. *Precious Coral Octocoral Research* 2, 19-39.
- Allemand D, Benazet-Tambutté S (1996) Dynamics of calcification in the Mediterranean red coral, *Corallium rubrum* (Linnaeus) (Cnidaria, Octocorallia). *The Journal of Experimental Biology* 276, 270-278.
- Allemand D, Cuif J-P, Watabe N, Oishi M, Kawaguchi T (1994) The organic matrix of skeletal structures of the Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*. *International Symposium on Biomineralization, Monaco, 17-20 November 1993*, D. Allemand and J.-P. Cuif, eds. *Bull. Inst. Oceanogr. Monaco*, no. special 14,1, , 129-139.
- Allemand D, Grillo M (1992) Biocalcification mechanism in gorgonians Ca^{45} uptake and deposition by the mediterranean red coral *Corallium rubrum* *Journal of Experimental Zoology* 262, 237-246.
- Allendorf FW, England PR, Luikart G, Ritchie PA, Ryman N (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 327-337.
- Alroy J (2008) Dynamics of origination and extinction in the marine fossil record. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 S1, 11536-11542.

- Amos W, Wilmer JW, Fullard K, *et al.* (2001) The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268, 2021-2027.
- Anderson M (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance *Austral Ecology* 26, 32-46.
- Anderson M, Gorley R, Clarke K (2008) PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E, Plymouth, UK.
- Aurelle D, Ledoux J, Chenuil A, *et al.* Intra-individual variability of ITS in the red coral *Corallium rubrum*. *Soumis*.
- Aurelle D, Ledoux J, Chenuil A, *et al.* Phylogeography of the red coral (*Corallium rubrum*), a temperate gorgonian: inferences on evolutionary history and consequences of past climatic fluctuations. *Soumis*.
- Auster P (1998) A conceptual model of the impacts of fishing gear on the integrity of fish habitats. *Conservation Biology* 12, 1198-1203.
- Austerlitz F, David O, Schaeffer B, *et al.* (2009) DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinformatics* 10.
- Avise J (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press; Cambridge.
- Avise JC, Hubbell SP, Ayala FJ (2008) In the light of evolution II: Biodiversity and extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11453-11457.
- Ayre DJ, Hughes TP (2000) Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the great barrier reef, Australia. *Evolution*, 54, 1590-1605.
- Ayre DJ, Miller K (2006) Random mating in the brooding coral *Acropora palifera*. *Marine Ecology Progress Series*, 307, 155-160.

-B-

- Baco AR, Shank TM (2005) Population genetic structure of the Hawaiian precious coral *Corallium lauense* (Octocorallia: Coralliidae) using microsatellites, Springer-Verlag Berlin Heidelberg edn. Freiwald A, Roberts JM (eds).
- Bailey J, Hendry A, Kinnison M, *et al.* (2009) From genes to ecosystems: an emerging synthesis of eco-evolutionary dynamics. *New Phytologist* 184, 746-749.

Références bibliographiques

- Ballesteros E (2006) Mediterranean coralligenous assemblages: A synthesis of present knowledge. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 44, 123-195.
- Balloux F (2001) EASYPOP (version 1.7), a computer program for the simulation of population genetics. *Journal of Heredity* 92, 301-302
- Bally M, Garrabou J (2007) Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: a new case of emerging disease linked to climate change. *Global Change Biology* 13, 2078-2088.
- Balmford A, Bruner A, Cooper P, *et al.* (2002) Economic reasons for conserving wild nature. *Science* 297, 950-953.
- Barshis D, Stillman J, Gates R, *et al.* (2010) Protein expression and genetic structure of the coral *Porites lobata* in an environmentally extreme Samoan back reef: does host genotype limit phenotypic plasticity? *Molecular Ecology* 19, 1705-1720.
- Baums IB (2008) A restoration genetics guide for coral reef conservation. *Molecular Ecology* 17, 2796-2811.
- Baums IB, Miller MW, Hellberg ME (2005) Regionally isolated populations of an imperilled Caribbean coral, *Acropora palmata*. *Molecular Ecology* 14, 1377-1390.
- Bavestrello G, Calcinaï B, Sara M (1996) *Delectona ciconiae sp. nov.* (Porifera, Demospongiae) boring in the scleraxis of *Corallium rubrum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 76, 867-873.
- Bayer F (1961) The Shallow-Water Octocorallia of the West Indian Region: A Manual for Marine Biologists. *Studies on the Fauna of Curaçao and Other Caribbean Islands* 12, 1-373.
- Bayer F (1964) The genus *Corallium* (Gorgonacea: Scleraxonia) in the western North Atlantic. *Oceanography Bulletin Of Marine Science of the Gulf and Caribbean* 14, 465-478.
- Bayer F, Muzik K (1976) A new solitary octocoral, *Taiaroa tauhou gen. et sp. nov.* (Coelenterata: Protoalcyonaria) from New Zealand. *Journal of the Royal Society of New Zealand* 6, 499-515.
- Bayer F, Stefani J (1987) New and Previously Known Taxa of Isidid Octocorals (Coelenterata, Gorgonacea), Partly From Antarctic Waters. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 100, 937-991.
- Bayer FM, Cairns SD (2003) A new genus of the scleraxonian family Coralliidae (Octocorallia: Gorgonacea). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 116, 222-228.

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). .
- Bell G, Gonzalez A (2009) Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. *Ecology Letters*, 12, 942–948.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate - A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Serie B*, 57, 289-300.
- Bensoussan N, Romano J-C, Harmelin J-G, Garrabou J (2010) High resolution characterization of northwest Mediterranean coastal waters thermal regimes: To better understand responses of benthic communities to climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 87, 431-441.
- Berntson EA, Bayer FM, McArthur AG, S.C.France (2001) Phylogenetic relationships within the octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on nuclear 18S rRNA sequences. *Marine Biology* 138, 235-246.
- Berntson EA, France SC, Mullineaux LS (1999) Phylogenetic relationships within the class Anthozoa (Phylum Cnidaria) based on nuclear 18S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13, 417-433.
- Berteaux D, Réale D, Adam AGM, Boutin S (2004) Keeping pace with fast climate change: can Arctic life count on evolution? *Integrative and Comparative Biology* 44, 140-151.
- Bethoux J, Gentili B, Raunet J, Tailliez D (1990) Warming trend in the western Mediterranean deep-water. *Nature* 347, 660-662.
- Bianchi N (2007) Biodiversity issues for the forthcoming tropical Mediterranean Sea. *Hydrobiologia* 580, 7-21.
- Bianchi N, Morri C (2000) Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, problems and prospects for future research. *Marine Pollution Bulletin* 40, 367-376.
- Bianchimani O (2005) Evaluation des effets des aires marines protégées sur les populations de corail rouge (*Corallium rubrum*) : le cas des réserves marines françaises. DU d'Environnement et Pollution. Université de la Méditerranée. France.
- Bickford D, Lohman D, Sodhi N, *et al.* (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 148-155.

Références bibliographiques

- Blanchette C (1997) Size and survival of intertidal plants in response to wave action: A case study with *Fucus gardneri*. *Ecology* 78, 1563-1578.
- Blanquer A, Uriz M-J, Caujapé-Castells J (2009) Small-scale spatial genetic structure in *Scopalina lophyropoda*, an encrusting sponge with philopatric larval dispersal and frequent fission and fusion events. *Marine Ecological Progress Series* 380, 95-102.
- Blaxter M, Floyd R (2003) Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 268-269.
- Blouin MS (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 503-511.
- Bonin A, Nicole F, Pompanon F, Miaud C, Taberlet P (2007) Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. *Conservation Biology* 21, 697-708.
- Bonnet X, Shine R, Lourdais O (2002) Taxonomic chauvinism. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 1-3.
- Borchiellini C, Boury-Esnault N, Vacelet J, Parco YL (1998) Phylogenetic analysis of the Hsp70 sequences reveals the monophyly of metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Molecular Biology Evolution* 15, 647-655.
- Born C, Hardy OJ, Chevallier M-H, *et al.* (2008) Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. *Molecular Ecology* 17, 2041-2050.
- Bramanti L, M MI, Santangelo G (2009) Mathematical modelling for conservation and management of gorgonians corals: youngs and olds, could they coexist? *Ecological Modelling* 220, 2851-2856.
- Bramanti L, Rossi S, Tsounis G, Gili J, Santangelo G (2007) Settlement and early survival of red coral on artificial substrates in different geographic areas: some clues for demography and restoration. *Hydrobiologia* 580, 219-224.
- Brierley A, Kingsford M (2009) Impacts of climate change on marine organisms and ecosystems. *Current Biology* 19, 602-614.
- Brook BW, Sodhi NS, Bradshaw CJA (2008) Synergies among extinction drivers under global change. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 453-460.
- Broquet T, Johnson CA, Petit E, *et al.* (2006) Dispersal and genetic structure in the American marten, *Martes americana*. *Molecular Ecology* 15, 1689-1697.

- Broquet T, Menard N, Petit E (2007) Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics* 8, 249-260.
- Broquet T, Petit EJ (2009) Molecular estimation of dispersal for ecology and population genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40, 193-216.
- Bruckner AW (2009) Rate and extent of decline in *Corallium* (pink and red coral) populations: existing data meet the requirements for a CITES Appendix II listing. *Marine Ecological Progress Series* 397, 319-332.
- Brugler M, France S (2008) The mitochondrial genome of a deep-sea bamboo coral (Cnidaria, Anthozoa, Octocorallia, Isididae): Genome structure and putative origins of replication are not conserved among octocorals. *Journal of Molecular Evolution* 67, 125-136.
- Burger R, Lynch M (1995) Evolution and Extinction in a Changing Environment - A quantitative-Genetic Analysis. *Evolution* 49, 151-163.
- Bythell J, Pan P, Lee J (2001) Three-dimensional morphometric measurements of reef corals using underwater photogrammetry techniques. *Coral Reefs* 20, 193-199.

-C-

- CITES (2007) Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction. 23 p.
- Calcinai B, Cerrano C, Bavestrello G (2002) A new species of *Scantiletta* (Demospongiae, Clionaidae) from the Mediterranean precious red coral with some remarks on the genus. *Bulletin of Marine Science* 70, 919-926.
- Calderón I, Ortega N, Duran S, *et al.* (2007) Finding the relevant scale: clonality and genetic structure in a marine invertebrate (*Crambe crambe*, Porifera). *Molecular Ecology* 16, 1799-1810.
- Calderón I, Palacin C, Turon X (2009) Microsatellite markers reveal shallow genetic differentiation between cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in northwest Mediterranean. *Molecular Ecology* 18, 3036-3049.
- Calderón I, Garrabou J, Aurelle D (2006) Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 336, 184-197.
- Cardillo M, Mace GM, Jones KE, *et al.* (2005) Multiple causes of high extinction risk in large mammal species. *Science* 309, 1239-1241.

Références bibliographiques

- Carlsson J (2008) Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99, 616-623.
- Carpine C, Grasshoff M (1975) Les Gorgonaires de la Méditerranée. *Bulletin de l'Institut Océanographique Monaco* 71, 1-140.
- Carroll S, Hendry A, Reznick D, Fox C (2007) Evolution on ecological time-scales. *Functional Ecology* 21, 387-393.
- Castric V, Bernatchez L (2001) The rise and fall of isolation by distance in the anadromous brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). *Genetics* 163, 983-996.
- Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology Evolution* 24, 621-631.
- Chapuis M-P, Lecoq M, Michalakis Y, *et al.* (2008) Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Molecular Ecology* 17, 3640-3653.
- Charles H, Godfray J, Lawton JH (2001) Scale and species numbers. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 400-404.
- Chen C, Durand E, Forbes F, Francois O (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes* 7, 747-756.
- Chintiroglou H, Dounas C, Koukouras A (1989) The Presence of *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758) in the Eastern Mediterranean Sea. *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin. Zoologisches Museum und Institut für Spezielle Zoologie (Berlin)* 65, 145-149.
- Chown S, Gaston K (2000) Areas, cradles and museums: the latitudinal gradient in species richness. *Trends in Ecology & Evolution* 15, 311-315.
- Clarke K, Gorley R (2006) *Primer v6: User Manual/Tutorial*. Primer-E, Plymouth.
- Coll M, Palomera I, Tudela S, Dowd M (2008) Food-web dynamics in the South Catalan Sea ecosystem (NW Mediterranean) for 1978-2003. *Ecological Modelling* 217, 95-116.
- Coll M, Piroddi C, Steenbeek J, *et al.* (2010) The biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, patterns, and threats. *Plos One* 5.
- Coma R, Ribes M, Serrano E, *et al.* (2009) Global warming-enhanced stratification and mass mortality events in the Mediterranean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 6176-6181.

- Comps B, Gomory D, Letouzey J, Thiebaut B, Petit RJ (2001) Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European Beech. *Genetics* 157, 389-397.
- Concepcion G, Crepeau M, Wagner D, Kahng S, Toonen RJ (2008) An alternative to ITS, a hypervariable, single-copy nuclear intron in corals, and its use in detecting cryptic species within the octocoral genus *Carijoa*. *Coral Reefs* 27, 323-336.
- Conover D, Clarke L, Munch S, Wagner G (2006) Spatial and temporal scales of adaptive divergence in marine fishes and the implications for conservation. *Journal of Fish Biology* 69, 21-47.
- Conover D, Munch S (2002) Sustaining fisheries yields over evolutionary time scales. *Science* 297, 94-96.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001-2014.
- Costantini F, Abbiati M (2006) Development of microsatellite markers for the Mediterranean gorgonian coral *Corallium rubrum*. *Molecular Ecology Notes* 6, 521-523.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007a) Fine-scale genetic structuring in *Corallium rubrum*: evidence of inbreeding and limited effective larval dispersal. *Marine Ecology Progress Series* 340, 110-119.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007b) Genetic structuring of the temperate gorgonian coral (*Corallium rubrum*) across the western Mediterranean Sea revealed by microsatellites and nuclear sequences. *Molecular Ecology* 16, 5168-5182.
- Costantini F, Taviani M, Remia A, *et al.* (2010) Deep-water *Corallium rubrum* (L., 1758) from the Mediterranean Sea: preliminary genetic characterisation. *Marine Ecology*, 31, 261-269.
- Costanza R, d'Arge R, Groot RD, *et al.* (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253-260.
- Cowen RK, Sponaugle S (2009) Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science* 1, 443-466.
- Cracraft J (1983) Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* 1, 159-187.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15, 290-295.

Cvejjic J, Tambutte S, Lotto SL, *et al.* (2008) Reply to the comment of Fritsch and Karampelas on “Determination of canthaxanthin in the red coral (*Corallium rubrum*) from Marseille by HPLC combined with UV and MS detection” by Cvejjic *et al.* (2007) *Mar Biol* 152:855-862. *Marine Biology* 154, 931-9321.

Cvejjic J, Tambutté S, Lotto SL, *et al.* (2007) Determination of canthaxanthin in the red coral (*Corallium rubrum*) from Marseille by HPLC combined with UV and MS detection. *Marine Biology* 152, 855-862.

-D-

Dakin E, Avise J (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504-509.

Daly M, Brugler MR, Cartwright P, *et al.* (2007) The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* 1668, 127-182.

Danovaro R, Dell’Anno A, Pusceddu A, *et al.* (2010) The first metazoa living in permanently anoxic conditions. *BMC Biology* 8.

Dantan J (1928) Recherches sur la croissance du corail rouge *Corallium rubrum* Lamarck. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 53, 42-49.

Darlu P, Tassy P (1993) *La Reconstruction phylogénétique. Concepts et Méthodes.* Paris / Milan / Barcelone: Masson

Darwin C (1859) *On the Origin of Species.* John Murray, London.

Dauphin Y (2006) Mineralizing matrices in the skeletal axes of two *Corallium* species (Alcyonacea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 145, 54-64.

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.

Dawney N, Ogden R, McEwing R, Carvalho G, Thorpe R (2007) Validation of the barcoding gene CO1 for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173, 1-6.

Del Gaudio D, Fortunato G, Borriello M, *et al.* (2004) Genetic Typing of *Corallium rubrum*. *Marine Biotechnology* 6, 511-515.

Dempster A, Laird N, Rubin D (1977) Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society Serie B* 39, 1-38.

- Deutsch C, Tewksbury J, Huey R, *et al.* (2008) Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 6668-6672.
- Di Rienzo A, Peterson A, Garza J, *et al.* (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 3166-3170.
- DiCiccio T, Efron B (1996) Bootstrap confidence intervals (with discussion). Statistical Science, 11, 189-228.
- Diamond J (1989) Overview of recent extinctions. In Conservation for the Twenty-First Century (Western, D. and Pearl, M.C., eds), pp. 37-41, Oxford University Press.
- Diffenbaugh N, Pal J, Giorgi F, Gao X (2007) Heat stress intensification in the Mediterranean climate change hotspot. Geophysical Research Letters 34, 1-6.
- Dionne M, Caron F, Dodson JJ, Bernatchez L (2008) Landscape genetics and hierarchical genetic structure in Atlantic salmon: the interaction of gene flow and local adaptation. Molecular Ecology 17, 2382-2396.
- Dirzo R, Raven PH (2003) Global state of biodiversity and loss. Annual Review of Environmental Resources 28, 137-167.
- Doney S, Fabry V, Feely R, Kleypas J (2009) Ocean acidification: The other CO₂ problem. Annual Review of Marine Science 1, 169-192.
- Dupont L, Bernas D, Viard F (2007) Sex and genetic structure across age groups in populations of the European marine invasive mollusc, *Crepidula fornicata* L. (Gastropoda). Biological Journal of the Linnean Society 90, 365-374.
- Dupont L, Viard F, Dowell MJ, Wood C, Bishop JDD (2009) Fine- and regional-scale genetic structure of the exotic ascidian *Styela clava* (Tunicata) in southwest England, 50 years after its introduction. Molecular Ecology 18, 442-453.

-E-

- Ehrlich P (1985) Human-ecology for introductory biology courses - An overview. American Zoologist 25, 379-394.
- Elias M, Hill R, Willmott K, *et al.* (2007) Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 274, 2881-2889.

Références bibliographiques

- Endler J (1986) Natural selection in the wild. Monographs in Population Biology 21. (Princeton Univ Press, Princeton).
- Ennos R, French G, Hollingsworth P (2005) Conserving taxonomic complexity. Trends in Ecology & Evolution 20, 164-168.
- Epperson B (1995) Fine-scale spatial structure: correlation for individual genotypes differs from those for local gene-frequencies. Evolution 49, 1022-1026.
- Erwin DH (2008) Extinction as the loss of evolutionary history. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 S1, 11520-11527.
- Estoup A, Angers B (1998) Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. pp. 55-86 in Advances in Molecular Ecology, edited by G. Carvalho. IOS Press, Amsterdam.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M (2002) Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. Molecular Ecology 11, 1591-1604.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1, 47-50.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131, 479-491.

-F-

- FAO (2008) FishStat Plus datasets. Total fishery production 1950-2006. Available at www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. Genetics 164, 1567-1587.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. Molecular Ecology Notes 7, 574-578.
- Fenster CB, Vekemans X, Hardy OJ (2003) Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). Evolution 57, 995-1007.

- Ferrière R, Dieckmann U, Couvet D (2004) *Evolutionary Conservation Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fisher DO, Owens IPF (2004) The comparative method in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 19 391-398.
- France S (2007) Genetic analysis of bamboo corals (Cnidaria: Octocorallia: Isididae): Does lack of colony branching distinguish *Lepidisis* from *Keratoisis*? *Bulletin of Marine Science* 81, 323-333.
- France S, Hoover L (2001) Analysis of variation in mitochondrial DNA sequences (ND3, ND4L, MSH) among Octocorallia (=Alcyonaria) (Cnidaria: Anthozoa). *Bulletin of the Biological Society of Washington* 10, 110-118.
- France S, Hoover L (2002) DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiologia* 471, 149-155.
- France S, Rosel P, Agenbroad J, Mullineaux L, Kocher T (1996) DNA sequence variation of mitochondrial large-subunit rRNA provides support for a two-subclass organization of the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5, 15-28.
- Frankham R (2005) Ecosystem recovery enhanced by genotypic diversity. *Heredity* 95, 183.
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126, 131-140.
- Fritsch E, Karampelas S (2008) Comment on: Determination of canthaxanthin in the red coral (*Corallium rubrum*) from Marseille by HPLC combined with UV and MS detection (Cvejic *et al.* *Mar Biol* 152:855-862, 2007). *Marine Biology* 154, 929-930.
- Funk D, Omland K (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 34, 397-423.
- Futuyma D (2010) Evolutionary constraint and ecological consequences. *Evolution* 64, 1865-1884.
- Féral JP (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268, 121-145.

-G-

- Galil B (2009) Taking stock: inventory of alien species in the Mediterranean Sea. *Biological Invasions* 11, 359-372.
- Galloway S, Work T, Bochsler V, *et al.* (2007) Coral disease and health workshop: Coral histopathology II. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 56 and NOAA Technical Memorandum CRCP 4. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD. 84p.
- Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst G (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18, 4541-4550.
- García-Rodríguez M, Masso C (1986) Algunas bases para la determinación directa de la edad del coral rojo (*Corallium rubrum* L). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 3, 65-74.
- García MJL, Millot C, Font J, García-Ladona E (1994) Surface circulation variability in the Balearic Basin. *Journal of Geophysical Research Ocean* 99, 3285-3296.
- Garrabou J, Coma R, Bensoussan N, *et al.* (2009) Mass mortality in NW Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Global Change Biology* 15, 1090-1103.
- Garrabou J, Harmelin JG (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. *Journal of Animal Ecology* 71, 966-978.
- Garrabou J, Perez T, Sartoretto S, Harmelin JG (2001) Mass mortality event in red coral *Corallium rubrum* populations in the Provence region (France, NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*, 217, 263-272.
- Gaston KJ (2000) Global patterns in biodiversity. *Nature* 405, 220-225.
- Gattuso J, Frankignoulle M, Wollast R (1998) Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29, 405-434.
- Gautschi B, Tenzer I, Müller JP, Schmid B (2000a) Isolation and characterization of microsatellite loci in the bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) and crossamplification in three Old World vulture species. *Molecular Ecology* 9, 2193-2195.
- Gautschi B, Widmer A, Koella J (2000b) Isolation and characterization of microsatellite loci in the Dice Snake (*Natrix tessellata*). *Molecular Ecology* 9, 2191-2193.
- Gerhart D (1983) The chemical systematics of colonial marine animals - An estimated phylogeny of the order gorgonacea based on terpenoid characters. *Biological Bulletin* 164, 71-81.

- Gerrodette T (1981) Dispersal of the solitary coral *Balanophyllia elegans* by demersal planular larvae. *Ecology* 62, 611-619.
- Ghiselin M (1997) *Metaphysics and the Origin of Species*, State University of New York Press.
- Gienapp P, Teplitsky C, Alho J, Mills J, Merila J (2008) Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology* 17, 167-178.
- Gilbert C, Schaack S, Pace J, Brindley P, Feschotte C (2010) A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. *Nature* 464, 1347-1350.
- Gili J, Coma R (1998) Benthic suspension feeders: their paramount role in littoral marine food webs. *Trends in Ecology & Evolution* 13, 316-321.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Gould S (1994) Tempo and mode in the macroevolutionary reconstruction of Darwinism. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6764-6771.
- Grant PR, Grant BR (2002) Unpredictable evolution in a 30-year study of Darwin's finches. *Science* 296, 707-711.
- Grillo M-C, Goidberg WM, Allemand D (1993) Skeleton and sclerite formation in the precious red coral *Corallium rubrum*. *Marine Biology* 117, 119-128.
- Grillo MC, Chessa LA (1992) Développement larvaire de *Corallium rubrum*. *Rapports Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, 36, pp. 33-40.
- Grosberg RK (1991) Sperm-mediated gene flow and the genetic structure of a population of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Evolution*, 45, 130-142.
- Guillot G, Santos F (2009) A computer program to simulate multilocus genotype data with spatially autocorrelated allele frequencies. *Molecular Ecology Resources* 9, 1112-1120.
- Guinand B, Lemaire C, Bonhomme F (2004) How to detect polymorphisms undergoing selection in marine fishes? A review of methods and case studies, including flatfishes. *Journal of Sea Research* 51, 167-182.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52, 696-704.

Références bibliographiques

Guo S, Thompson E (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.

Gutiérrez-Rodríguez C, Lasker HR (2004) Isolation and characterization of microsatellite loci in the Caribbean gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Molecular Ecology* 4, 153-155.

-H-

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.

Hall V, Hughes T (1996) Reproductive strategies of modular organisms: comparative studies of reef-building corals. *Ecology* 77, 950-963.

Halpern BS, Walbridge S, Selkoe KA, *et al.* (2008) A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* 319, 948-952.

Ham JLvd, Brugler MR, France SC (2009) Exploring the utility of an indel-rich, mitochondrial intergenic region as a molecular barcode for bamboo corals (Octocorallia: Isididae). *Marine Genomics* 2, 183-192.

Hammond P (1995) Magnitude and distribution of biodiversity. In *Global Biodiversity Assessment*, ed. VH Heywood. Cambridge, GB: Cambridge Univ. Press.

Hardy OJ, Vekemans X (1999) Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity* 83, 145-154.

Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGEDI a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2, 618-620.

Harley CDG, Hughes AR, Hultgren KM, *et al.* (2006) The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters* 9, 228-241.

Harmelin JG (1985) Organisation spatiale des communautés sessiles des grottes sous-marines de Méditerranée. *Rapports Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée* 29, 149-153. .

Harper J, White J (1974) The demography of plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5, 419-463.

Hauser L, Carvalho GR (2008) Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries* 9, 333-362.

- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 313-321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Waard JRd (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, S96-S99.
- Hedgecock D (2010) Determining parentage and relatedness from genetic markers shed light on patterns of marine larval dispersal. *Molecular Ecology*, 19, 845-847.
- Hedgecock D, Launey S, Pudovkin AI, *et al.* (2007) Small effective number of parents (N_b) inferred for a naturally spawned cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 150, 1173-1182.
- Hedrick PW (2005) Large variance in reproductive success and the N_e/N ratio. *Evolution* 59, 1596-1599.
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution* 16, 629-636.
- Hellberg M (2006) No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evolutionary Biology* 6.
- Hellberg ME (2007) Footprints on water: The genetic wake of dispersal among reefs. *Coral Reefs* 26, 463-473.
- Hendry AP, Kinnison MT (2001) An introduction to microevolution: Rate, pattern, process. *Genetica* 112-113, 1-8.
- Hendry AP, Lohmann LG, Conti E, *et al.* (2010) Evolutionary biology in biodiversity science, conservation and policy: a call to action. *Evolution* 64, 1517-1528.
- Herrera S, Baco A, Sanchez JA (2010) Molecular systematics of the bubblegum coral genera (Paragorgiidae, Octocorallia) and description of a new deep-sea species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55, 123-135.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.
- Hey J (2001) The mind of the species problem. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 326-329.
- Hey J, Waples RS, Arnold ML, Butlin RK, Harrison RG (2003) Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 597-603.
- Hoegh-Guldberg O, Bruno J (2010) The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science* 328, 1523-1528.

Références bibliographiques

- Hoffman JI, Amos W (2005) Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* 14, 599-612.
- Hoffman JI, Boyd IL, Amos W (2003) Male reproductive strategy and the importance of maternal status in the antarctic fur seal *Arctocephalus gazella*. *Evolution* 57, 1917-1930.
- Hoffman JI, Trathan PN, Amos W (2006) Genetic tagging reveals extreme site fidelity in territorial male Antarctic fur seals *Arctocephalus gazella*. *Molecular Ecology* 15, 3841-3847.
- Hoffmann AA, Willi Y (2008) Detecting genetic responses to environmental change. *Nature Review Genetics* 9, 421-432.
- Hood G (2008) PopTools version 3.1.0 - Software for analysis of ecological models. Pest Animal Control Cooperative Research Center, CSIRO, Canberra, Australia.
- Huang D, Meier R, Todd PA, Chou LM (2008) Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution* 66, 167-174.
- Hughes D (1992) Genotype-environment interactions and relative clonal fitness in a marine bryozoan. *Journal of Animal Ecology* 61, 291-306.
- Hughes JB, Daily GC, Ehrlich PR (1997) Population diversity: Its extent and extinction. *Science* 278, 689-692.
- Hughes R, Taylor M (1997) Genotype-environment interaction expressed in the foraging behaviour of dogwhelks, *Nucella lapillus* (L), under simulated environmental hazard. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 264, 417-422.
- Hughes TP, Bellwood D, Connolly S (2002) Biodiversity hotspots, centres of endemism, and the conservation of coral reefs. *Ecology Letters* 5, 775-784.
- Hughes TP, Baird AH, Bellwood DR, *et al.* (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301, 929-933.
- Hutchison DW, Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53, 1898-1914.

-I-

IPCC (2007) Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the Fourth Assessment. Report of the intergovernmental panel on climate change (eds Solomon SD, Qin M, Manning Z *et al.*.) Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 996p.

IUCN (2009) <http://www.iucnredlist.org/>. Accessed 4 Sep 2009.

Isaac NJB, Mallet J, Mace GM (2004) Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 465-469.

-J-

Jabin P-E, Lemesle V, Aurelle D (2008) A continuous size-structured red coral growth model. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences* 18, 1927-1944.

Jablonski D (2008) Extinction and the spatial dynamics of biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11528-11535.

Jackson J, Kirby M, Berger W, *et al.* (2001) Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293, 629-638.

Jackson JBC (2008) Ecological extinction and evolution in the brave new ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11458-11465.

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801-1806.

Jakobsson M, Scholz SW, Scheet P, *et al.* (2008) Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature* 451, 998-1002.

Jarman SN, Ward RD, Elliott NG (2002) Oligonucleotide primers for PCR amplification of Coelomate introns. *Marine Biotechnology* 4, 347-355.

Jarving R, Jarving I, Kurg R, Brash A, Samel N (2004) On the evolutionary origin of cyclooxygenase (COX) isozymes - Characterization of marine invertebrate COX genes points to independent duplication events in vertebrate and invertebrate lineages. *Journal of Biological Chemistry* 279, 13624-13633.

Références bibliographiques

- Johannesson K, Johannesson B, Varez-Rolanal E (1993) Morphological-differentiation and genetic cohesiveness over a microenvironmental gradient in the marine snail *Littorina saxatilis*. *Evolution* 47, 1770-1787.
- Johansson M, Primmer C, Merila J (2007) Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology* 16, 2693-2700.
- Johnson M, Vellend J, Stinchcombe J (2009) Evolution in plant populations as a driver of ecological changes in arthropod communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B* 364, 1593-1605.
- Johnson MS, Black R (1982) Chaotic genetic patchiness in an inter-tidal limpet, *Siphonaria sp.*. *Marine Biology* 70, 157-164.
- Jones AG, Small CM, Paczolt KA, Ratterman NL (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10, 6-30.
- K-**
- Kalisz S, Nason JD, Hanzawa FM, Tonsor SJ (2001) Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history and selection. *Evolution* 55, 1560-1568.
- Kangethe E, Jones S, Patterson R (1982) Identification of the species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent-assay procedure. *Meat Science* 7, 229-240.
- Karl SA (2008) The effect of multiple paternity on the genetically effective size of a population. *Molecular Ecology* 17, 3973-3977.
- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7, 1225-1241.
- Kendall M, Stewart A (1977) *The advanced theory of statistics*, volume 1. Macmillan, New York.
- Kinlan BP, Gaines SD (2003) Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology* 84, 2007-2020.
- Kohn MH, Murphy WJ, Ostrander EA, Wayne RK (2007) Genomics and conservation genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 629-637.

- Koizumi I, Yamamoto S, Maekawa K (2006) Decomposed pairwise regression analysis of genetic and geographic distances reveals a metapopulation structure of stream-dwelling Dolly Varden charr. *Molecular Ecology* 15, 3175-3189.
- Koslow J (2007) *The silent deep: The discovery, ecology, and conservation of the deep sea*. Univ. of Chicago Press, Chicago.
- Kress W, Wurdack K, Zimmer E, Weigt L, Janzen D (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8369-8374.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.
- Kuo C, Janzen F (2004) Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics* 5, 425-437.
- Kuo E, Sanford E (2009) Geographic variation in the upper thermal limits of an intertidal snail: implications for climate envelope models. *Marine Ecological Progress Series* 388, 137-146.

-L-

- Laborel J, Vacelet J (1961) Répartition bionomique du *Corallium rubrum* LMCK dans les grottes et falaises sous-marines. *Rapports et Procès-Verbaux des Réunions de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, 16, 464-469.
- Lacaze-Duthiers H (1864) *Histoire naturelle du corail*. JB Bailière et Fils, Paris. 371 pp.
- Lada H, Nally RM, Taylor AC (2006) Genetic reconstruction of the population dynamics of a carnivorous marsupial (*Antechinus flavipes*) in response to floods. *Molecular Ecology* 16, 2934-2947.
- Lahaye R, vanderBank M, Bogarin D, *et al.* (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2923-2928.
- Lambeck K, Bard E (2000) Sea-level change along the French Mediterranean coast for the past 30 000 years. *Earth and Planetary Science Letters* 175, 203-222.
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241, 1455-1460.

Références bibliographiques

- Lasker HR (2006) High fertilization success in a surface-brooding Caribbean gorgonian. *Biological Bulletin*, 210, 10-11.
- Lasker HR, Gutiérrez-Rodríguez C, Bala K, Hannes A, Bilewitch JP (2008) Male reproductive success during spawning events of the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Marine Ecological Progress Series*, 367, 153-161.
- Laurance WF (2006) Have we overstated the tropical biodiversity crisis? *Trends in Ecology & Evolution* 22, 65-70.
- Lavrov D, Forget L, Kelly M, Lang B (2005) Mitochondrial genomes of two demosponges provide insights into an early stage of animal evolution. *Molecular Biology Evolution* 22, 1231-1239.
- Leakey R, Lewin R (1995) *The sixth extinction: Biodiversity and its survival* (Doubleday, New York).
- Leblois R, Estoup A, Rousset F (2003) Influence of mutational and sampling factors on the estimation of demographic parameters in a “continuous” population under isolation by distance. *Molecular Biology Evolution* 20, 491-502.
- Leblois R, Estoup A, Streiff R (2006) Genetics of recent habitat contraction and reduction in population size: Does isolation by distance matter? *Molecular Ecology* 15, 3601-3615.
- Leblois R, Rousset F, Estoup A (2004) Influence of spatial and temporal heterogeneities on the estimation of demographic parameters in a continuous population using individual microsatellite data. *Genetics* 166, 1081-1092.
- Ledoux J-B, Mokthar-Jamai K, Roby C, *et al.* (2010) Genetic survey of shallow populations of the Mediterranean red coral [*Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758)]: new insights into evolutionary processes shaping nuclear diversity and implications for conservation. *Molecular Ecology* 19, 675-690.
- Ledoux J-B, Garrabou J, Bianchimani O, *et al.* (2010) Fine-scale genetic structure and inferences on population biology in the threatened Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*. *Molecular Ecology* In press.
- Leinonen T, O’hara R, Cano J, Merila J (2008) Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: A meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology* 21, 1-17.
- Lejeusne C, Chevaldonné P, Pergent-Martini C, Boudouresque CF, Pérez T (2010) Climate change effects on a miniature ocean: The highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 250-260.
- Lenormand T (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 183-189.

- Levin S (2001) Encyclopedia of Biodiversity. San Diego: Academic. 5 Vols.
- Lewis OT (2006) Climate change, species-area curves and the extinction crisis. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B 361, 163-171.
- Linares C, Bianchimani O, Torrents O, *et al.* (2010) Marine protected areas and the conservation of long-lived marine invertebrates: the Mediterranean red coral. Marine Ecology Progress Series 402, 69-79.
- Linares C, Coma R, Mariani S, *et al.* (2008) Early life history of the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*: implications for population dynamics. Invertebrate Biology 127, 1-11.
- Linares C, Coma R, Zabala M (2008) Restoration of threatened red gorgonian populations: An experimental and modelling approach. Biological Conservation 141, 427-437.
- Linares C, Doak DF, Coma R, Diaz D, Zabala M (2007) Life history and viability of a long-lived marine invertebrate: The octocoral *Paramuricea clavata*. Ecology 88, 918-928.
- Linares C, Doak DF (2010) Forecasting the combined effects of disparate disturbances on the persistence of long-lived gorgonians: a case study of *Paramuricea clavata*. Marine Ecology Progress Series 402, 59-68.
- Lippé C, Dumont P, Bernatchez L (2006) High genetic diversity and no inbreeding in the endangered copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time. Molecular Ecology 15, 1769-1780.
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Sychotria officinalis* (Rubiaceae). American Journal of Botany 82, 1420 -1425.
- Lotze H, Lenihan H, Bourque B, *et al.* (2006) Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. Science 312, 1806-1809.

-M-

- MacKenzie B, Mosegaard H, Rosenberg A (2009) Impending collapse of bluefin tuna in the northeast Atlantic and Mediterranean. Conservation Letters 2, 25-34.
- Maier E, Tollrian R, Nurnberger B (2009) Fine-scale analysis of genetic structure in the brooding coral *Seriatopora hystrix* from the Red Sea. Coral Reefs, 28, 751-759.
- Malakoff D (2003) Marine research - Scientists counting on census to reveal marine biodiversity. Science 302, 773-773.

Références bibliographiques

- Malécot G (1950) Quelques schémas probabilistes sur la variabilité des populations naturelles. *Annales de l'Université de Lyon A*, 13, 37-60.
- Manconi R, Mori M (1992) Caridean Shrimps (Decapoda) Found Among *Corallium rubrum* (L., 1758). *Crustaceana* 62, 105-110.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.
- Marchinko K (2003) Dramatic phenotypic plasticity in barnacle legs (*Balanus glandula* Darwin): Magnitude, age dependence, and speed of response. *Evolution* 57, 1281-1290.
- Marletaz F, Martin E, Perez Y, *et al.* (2006) Chaetognath phylogenomics: a protostome with deuterostome-like development. *Current Biology* 16, R577-R578.
- Marschal C, Garrabou J, Harmelin JG, Pichon M (2004) A new method for measuring growth and age in the precious red coral *Corallium rubrum* (L.). *Coral Reefs* 23, 423-432.
- Mateu G, Traveria A, Fontarnau R, Masso C (1986) Biodiagenesis mineralogica del *Corallium rubrum* (L.). *Boletín del Instituto español de Oceanografía* 3, 1-12.
- May R (2000) The dimensions of life on Earth. In *Nature and Human Society: The Quest for a Sustainable World*, ed. PH Raven, T Williams, pp. 30-45. Washington, DC: Natl. Acad.
- McArdle B, Anderson. M (2001) Fitting multivariate models to community data: A comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* 82, 290-297.
- McElwain JC, Punyasena SW (2007) Mass extinction events and the plant fossil record. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 548-557.
- McFadden C, Hutchinson M (2001) Hybrid origin of soft coral species suggested by ribosomal DNA sequence heterogeneity. *American Zoologist* 41, 1519-1519.
- McFadden C, Hutchinson M (2004) Molecular evidence for the hybrid origin of species in the soft coral genus *Alcyonium* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia). *Molecular Ecology* 13, 1495-1505.
- McFadden CS, France SC, Sánchez JA, Alderslade P (2006) A molecular phylogenetic analysis of the Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on mitochondrial protein-coding sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41, 513-527.
- McFadden CS, Sanchez JA, France SC (2010) Molecular phylogenetic insights into the evolution of Octocorallia: A Review. *Integrative and Comparative Biology* 50, 389-410.

- McFadden CS, Tullis ID, Hutchinson MB, Winner K, Sohm JA (2004) Variation in coding (NADH dehydrogenase subunits 2, 3, and 6) and noncoding intergenic spacer regions of the mitochondrial genome in Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Marine Biotechnology* 6, 516-526.
- McKay J, Latta R (2002) Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 285-291.
- McKinney M, Lockwood J (1999) Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology & Evolution* 14, 450-453.
- McKinney ML (1997) Extinction vulnerability and selectivity: Combining ecological and paleontological views. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 495-516.
- McNeely J, Miller K, Reid W, Mittermeier R, Werner T (1990) Strategies for conserving biodiversity. *Environment* 32, 16-20.
- Meyer C, Paulay G (2005) DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *Plos biology* 3, 2229-2238.
- Millot C (1999) Circulation in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems* 20, 423-442.
- Moritz C (1994) Defining evolutionary-significant-unit for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 9, 373-375.
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* 51, 238-254.

-N-

- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America* 70, 3321-3.
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New-York.

-O-

- O'Hara R, Merila J (2005) Bias and precision in Q(ST) estimates: Problems and some solutions. *Genetics* 171, 1331-1339.
- Ofwegen Lv, McFadden C (2010) A new family of octocorals (Anthozoa: Octocorallia) from Cameroon waters. *Journal of Natural History* 44, 23-29.

Références bibliographiques

Oppen MJHV, Gates RD (2006) Conservation genetics and the resilience of reef-building corals. *Molecular Ecology* 15, 3863-3883.

Oppen MJHV, McDonald BJ, Willis B, Miller DJ (2001) The evolutionary history of the coral genus *Acropora* (Scleractinia, Cnidaria) based on a mitochondrial and a nuclear marker: reticulation, incomplete lineage sorting, or morphological convergence? *Molecular Biology Evolution* 18, 1315-1329.

Osovitz C, Hofmann G (2007) Marine macrophysiology: Studying physiological variation across large spatial scales in marine systems. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A-Molecular & Integrative Physiology* 147, 821-827.

-P-

Padial JM, Riva Idl (2006) Taxonomic inflation and the stability of species lists: The perils of ostrich's behavior. *Systematic Biology* 55, 859-867.

Paetkau D (2003) An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology* 12, 1375-1387.

Palumbi S (2001) *The Evolution Explosion: How Humans Cause Rapid Evolutionary Change*, Norton.

Palumbi SR (1999) All males are not created equal: Fertility differences depend on gamete recognition polymorphisms in sea urchins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12632-12637.

Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13, S146-S148.

Palumbi SR (2004) Marine reserves and ocean neighborhoods: the spatial scale of marine populations and their management. *Annual Review of Environment and Resources* 29, 31-68.

Patterson DJ (1999) The diversity of eukaryotes. *American Naturalist* 154, S96-S124.

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.

Pelletier F, Garant D, Hendry A (2009) Eco-evolutionary dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B* 364, 1483-1489.

Pereira H, Cooper H (2006) Towards the global monitoring of biodiversity change. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 123-129.

- Perez T, Garrabou J, Sartoretto S, *et al.* (2000) Mortalité massive d'invertébrés marins : un événement sans précédent en Méditerranée nord-occidentale - Mass mortality of marine invertebrates on the Provence littoral (France) : an unprecedented event in the NW Mediterranean. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Série III* 323, 853-865.
- Petit RJ, Mousadik AE, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12, 844-855.
- Philippe H, Telford M (2006) Large-scale sequencing and the new animal phylogeny. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 614-620.
- Picciano M, Ferrier-Pages C (2007) Ingestion of pico- and nanoplankton by the Mediterranean red coral *Corallium rubrum*. *Marine Biology* 150, 773-782.
- Pigliucci M (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution* 20, 481-486.
- Pimm SL, Brooks T (2000) The sixth extinction: how large, where and when? In *Nature and Human Society: The Quest for a Sustainable World*, ed. PH Raven, T Williams, pp. 46-62. Washington, DC: Natl. Acad.
- Pimm SL, Russell G, Gittleman J, Brooks T (1995) The Future of Biodiversity. *Science* 269, 347-350.
- Pimm SL, Raven P (2000) Extinction by numbers. *Nature* 403, 843-845.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, *et al.* (2004) GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, 95, 536-539.
- Piry S, Luikart G, Cornuet J-M (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90, 502-503.
- 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.
- Plantivaux A, Furla P, Zoccola D, *et al.* (2004) Molecular characterization of two CuZn-superoxide dismutases in a sea anemone. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1170-1181.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors causes, consequences and solutions. *Nature Review genetics* 6, 847-859.

Références bibliographiques

- Pont-Kingdon GA, Okada NA, Macfarlane JL, *et al.* (1998) Mitochondrial DNA of the coral *Sarcophyton glaucum* contains a gene for a homologue of bacterial MutS: A possible case of gene transfer from the nucleus to the mitochondrion. *Journal of Molecular Evolution* 46, 419-431.
- Pont-Kingdon GA, Okada NA, Macfarlane JL, *et al.* (1995) A coral mitochondrial mutS gene. *Nature* 375, 109-111.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology Evolution* 25, 1253-1256.
- Post D, Palkovacs E (2009) Eco-evolutionary feedbacks in community and ecosystem ecology: interactions between the ecological theatre and the evolutionary play. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B* 364, 1629-1640.
- Prada C, Schizas N, Yoshioka P (2008) Phenotypic plasticity or speciation? A case from a clonal marine organism. *BMC Evolutionary biology* 8.
- Previati M, Scinto A, Cerrano C, Osinga R (2010) Oxygen consumption in Mediterranean octocorals under different temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 390, 39-48.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Pritchard JK, Wen X, Falush D (2007) Documentation for the STRUCTURE software, Version 2. Chicago. Available at <http://pritch.bds.uchicago.edu>.
- Pujol B, Wilson A, Ross R, Pannell J (2008) Are Q(ST)-F-ST comparisons for natural populations meaningful? *Molecular Ecology* 17, 4782-4785.
- Purvis A, Agapow P-M, Gittleman JL, Mace GM (2000a) Nonrandom extinction and the loss of evolutionary history. *Science* 288, 328-330.
- Purvis A, Hector A (2000) Getting the measure of biodiversity. *Nature* 405, 212-219.
- Purvis A, Jones KE, Mace GM (2000b) Extinction. *BioEssays* 22, 1123-1133.

-R-

Rafaelli D, S.Hawkins (1996) *Intertidal ecology*. Chapman & Hall, London

- Rannala B, Mountain J (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9197-9201.
- Rasanen K, Hendry A (2008) Disentangling interactions between adaptive divergence and gene flow when ecology drives diversification. *Ecology Letters* 11, 624-636.
- Raup DM (1986) Biological extinction in earth history. *Science* 231, 1528-1533.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (ver. 1.2): a population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.
- Reed DH, Frankham R (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55, 1095-1103
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17, 230-237.
- Reiss J, Bridle JR, Montoya JM, Woodward G (2009) Emerging horizons in biodiversity and ecosystem functioning research. *Trends in Ecology & Evolution* 24, 505-514.
- Remigio E, Hebert P (2003) Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29, 641-647.
- Romano J-C, Bensoussan N, Younes WAN, Arlhac D (2000) Anomalie thermique dans les eaux du golfe de Marseille durant l'été 1999. Une explication partielle de la mortalité d'invertébrés fixés ? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série III Sciences de la Vie* 323, 415-427.
- Romano J-C, Lugrezi M-C (2007) Série du marégraphe de Marseille : mesures des températures de surface de la mer de 1885 à 1967. *Comptes Rendus Geoscience* 339, 57-64.
- Ronce O (2007) How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 38, 231-253.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4, 137-138.
- Rosenberg NA, Mahajan S, Ramachandran S, *et al.* (2005) Clines, clusters, and the effect of study design on the inference of human population structure. *Plos Genetics* 1, 660-671.
- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, *et al.* (2002) Genetic structure of human populations. *Science* 298, 2381-2385.

Références bibliographiques

- Rossi S, Tsounis G, Orejas C, *et al.* (2008) Survey of deep-dwelling red coral (*Corallium rubrum*) populations at Cap de Creus (NW Mediterranean). *Marine Biology* 154, 533-545.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145, 1219-1228.
- Rousset F (2000) Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* 13, 58-62.
- Rousset F (2004) Genetic structure and selection in subdivided populations. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103-106.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Rozenfeld AF, Arnaud-Haond S, Hernandez-García E, *et al.* (2008) Network analysis identifies weak and strong links in a metapopulation system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 18824-18829.
- Rusch D, Halpern A, Sutton G, *et al.* (2007) The Sorcerer II global ocean sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *Plos Biology* 5.
- Russell G, Brooks T, McKinney M, Anderson C (1997) Present and future taxonomic selectivity in bird and mammal extinctions. *Conservation Biology* 12, 1365-1376.
- Ryder O (1986) Species conservation and systematics - The dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution* 1, 9-10.
- Ryman N (1997) Minimizing adverse effects of fish culture: understanding the genetics of populations with overlapping generations. *ICES Journal of Marine Science* 54, 1149-1159.

-S-

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (2001) *Molecular cloning; A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Sampaio I, Ocaña O, Tempera F, *et al.* (2009) New occurrences of *Corallium* spp. (Octocorallia, Coralliidae) in the Central Northeast Atlantic. *Life and Marine Sciences* 26, 73-78.
- Sanchez JA (2005) Systematics of the bubblegum corals (Cnidaria: Octocorallia: Paragorgiidae) with description of new species from New Zealand and the Eastern Pacific. *Zootaxa* 1014, 1-72.
- Sanchez JA, Diaz J, Zea S (1997) Gorgonian communities in two contrasting environments on oceanic atolls of the southwestern Caribbean. *Bulletin of Marine Science* 61, 453-465.
- Sanchez JA, Lasker H (2003) Patterns of morphological integration in marine modular organisms: supra-module organization in branching octocoral colonies. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 2039-2044.
- Sanchez JA, C.S.McFadden, S.C.France, H.R.Lasker (2003a) Molecular phylogenetic analyses of shallow-water Caribbean octocorals. *Marine Biology* 142, 975-987.
- Sanchez JA, R.Lasker H, J.Taylor D (2003b) Phylogenetic analyses among octocorals (Cnidaria): mitochondrial and nuclear DNA sequences (16S rRNA, 16S and ssu-rRNA, 18S) support two convergent clades of branching gorgonians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29, 31-42.
- Santangelo G, Abbiati M (2001) Red coral: conservation and management of an over-exploited Mediterranean species. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 11, 253-259.
- Santangelo G, Bramanti L, Iannelli M (2007) Population dynamics and conservation biology of the over-exploited Mediterranean red coral. *Journal of Theoretical Biology* 244, 416-423.
- Santangelo G, Carletti E, Maggi E, Bramanti L (2003) Reproduction and population sexual structure of the overexploited Mediterranean red coral *Corallium rubrum*. *Marine Ecological Progress Series* 248, 99-108.
- Santangelo G, Maggi E, Bramanti L, Bongiorni L (2004) Demography of the over-exploited Mediterranean red Coral (*Corallium rubrum* L. 1758). *Scientia Marina* 68 (suppl. 1), 199-204.
- Schwartz MK, Luikart G, Waples RS (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 25-33.
- Selkoe KA, Gaines SD, Caselle JE, Warner RR (2006) Current shifts and kin aggregation explain genetic patchiness in fish recruits. *Ecology* 87, 3082-3094.

Références bibliographiques

- Shanks AL, Grantham BA, Carr MH (2003) Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecological Applications* 13, S159-S169.
- Shearer TL, Coffroth MA (2008) Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Resources* 8, 247-255.
- Shearer TL, Oppen MJHV, Romano SL, W-Rheide G (2002) Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology* 11, 2475-2487.
- Sherman CDH, Ayre DJ (2008) Fine-scale adaptation in a clonal sea anemone. *Evolution* 63, 1373-1380.
- Siddall M, Budinoff R (2005) DNA-barcoding evidence for widespread introductions of a leech from the South American *Helobdella triserialis* complex. *Conservation Genetics* 6, 467-472.
- Skelly D, Joseph L, Possingham H, *et al.* (2007) Evolutionary responses to climate change. *Conservation Biology* 21, 1553-1555.
- Slatkin M (2008) Linkage disequilibrium - understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Review Genetics* 9, 477-485.
- Smith M, Woodley N, Janzen D, Hallwachs W, Hebert P (2006) DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3657-3662.
- Somero G (2010) The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *Journal of Experimental Biology* 213, 912-920.
- Somot S, Sevault F, Deque M (2006) Transient climate change scenario simulation of the Mediterranean Sea for the twenty-first century using a high-resolution ocean circulation model. *Climate dynamics* 27, 851-879.
- Soulé ME (1985) What is conservation biology? *Bioscience* 35, 727-734.
- Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15261-15264.
- Spitze K (1993) Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* 135, 367-374.
- Stearns S (1992) *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.

- Stillman J, Tagmount A (2009) Seasonal and latitudinal acclimatization of cardiac transcriptome responses to thermal stress in porcelain crabs, *Petrolisthes cinctipes*. *Molecular Ecology* 18, 4206-4226.
- Stockwell CA, Hendry AP, Kinnison MT (2003) Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 94-101.
- Stork NE (2010) Re-assessing current extinction rates. *Biodiversity Conservation* 19, 357-371.
- Szpiech ZA, Jakobsson M, Rosenberg NA (2008) ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics* 27, 2498-2504.

-T-

- Tescione G (1965) *Il corallo nella storia e nell'arte*. Montanino Editore, Napoli.
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, *et al.* (2004) Extinction risk from climate change. *Nature* 427, 145-148.
- Torrents O (2007) *Biologie des populations du corail rouge *Corallium rubrum* (L. 1758) de Méditerranée nord-occidentale*. PhD Dissertation, Université de la Méditerranée, France.
- Torrents O, Garrabou J, Marschal C, Harmelin JG (2005) Age and size at first reproduction in the commercially exploited red coral *Corallium rubrum* (L.) in the Marseilles area (France, NW Mediterranean). *Biological Conservation* 121, 391-397.
- Torrents O, Tambutté E, Caminiti N, Garrabou J (2008) Upper thermal thresholds of shallow vs. deep populations of the precious Mediterranean red coral *Corallium rubrum* (L.): Assessing the potential effects of warming in the NW Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 357, 7-19.
- Tracey M, Bellet N, Gravem C (1975) Excess allozyme homozygosity and breeding population structure in mussel *Mytilus californianus*. *Marine Biology*, 32, 303-311.
- Tsounis G, Rossi S, Aranguren M, Gili J-M, Arntz W (2006) Effects of spatial variability and colony size on the reproductive output and gonadal development cycle of the Mediterranean red coral (*Corallium rubrum* L.). *Marine Biology* 148, 513-527.
- Tsounis G, Rossi S, Gili J, Arntz W (2007) Red coral fishery at the Costa Brava (NW Mediterranean): Case study of an overharvested precious coral. *Ecosystems* 10, 975-986.

Tsounis G, Rossi S, Grigg R, *et al.* (2010) The Exploitation and Conservation of Precious Corals. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 48, 161-212.

-U-

Underwood JN, Smith LD, Oppen MJHV, Gilmour JP (2007) Multiple scales of genetic connectivity in a brooding coral on isolated reefs following catastrophic bleaching. *Molecular Ecology* 16, 771-784.

-V-

Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24, 110-117.

Valière N (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2, 377-379.

Valmsen K, Jarving I, Boeglin W, *et al.* (2001) The origin of 15R-prostaglandins in the Caribbean coral *Plexaura homomalla*: Molecular cloning and expression of a novel cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7700-7705.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 6, 255-256.

Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13, 921-935.

Vences M, Thomas M, Bonett R, Vieites D (2005) Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B* 360, 1859-1868.

Vertino A, Zibrowius H, Taviani M (2010) Fossil ancestors of family Coralliidae in the Mediterranean Sea. In: Bussoletti, E., D. Cottingham, A. Bruckner, G. Roberts, and R. Sandulli (eds) *Proceedings of the International Workshop on Red Coral Science, Management, and Trade: Lessons from the Mediterranean*. NOAA Technical Memorandum CRCP-13, Silver Spring, MD pp 94-98.

Via S, Gomulkiewicz R, Jong GD, *et al.* (1995) Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends in Ecology and Evolution* 10, 212-217.

Viard F, Franck P, Dubois M-P, Estoup A, Jarne P (1998) Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate

- species. *Journal of Molecular Evolution* 47, 42-51.
- Vielzeuf D, Floquet N, Chatain D, *et al.* (2010) Multilevel modular mesocrystalline organization in red coral. *American Mineralogist* 95, 242-248.
- Vielzeuf D, Garrabou J, Baronnet A, Grauby O, Marschal C (2008) Nano to macroscale biomineral architecture of red coral (*Corallium rubrum*). *American Mineralogist* 93, 1799-1815.
- Vighi M (1970) Recherche sul ciclo riproduttivo del corallo rosso (*Corallium rubrum* (L.)) del promontorio di Portofino. *Atti Acc. Naz. Lincei Mem., S. VIII, vol. X, sez. 3.* 10, pp. 1-26.
- Vighi M (1972) Etude sur la reproduction du *Corallium rubrum* (L.). *Vie et Milieu* 23, 21-32.
- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997) Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277, 494-499.
- Vollmer S, Kline D (2008) Natural disease resistance in threatened staghorn corals. *PLoS one* 3.
- Vollmer SV, Palumbi SR (2004) Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics. *Molecular Ecology* 13, 2763-2772.

-W-

- Wake DB, Vredenburg VT (2008) Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11466-11473.
- Wang J (2004) Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166, 1963-1979.
- Wang J, Santure A (2009) Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics* 181, 1579-1594.
- Waples R (1991) Genetic interactions between hatchery and wild salmonids - Lessons from the Pacific-Notwest. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 124-133.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* 15, 1419-1439.

Références bibliographiques

- Waples RS, Punt AE, Cope JM (2008) Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? *Fish and Fisheries* 9, 423-429.
- Watling L, Auster P (2005) Distribution of deep-water Alcyonacea off the Northeast Coast of the United States. Conference Information: 2nd International Symposium on Deep-Sea Corals, SEP, 2003 Erlangen, Germany, Cold-Water Corals and Ecosystems Book Series: Erlangen Earth Conference Series, 279-286.
- Watts PC, Rousset F, Saccheri IJ, *et al.* (2007) Compatible genetic and ecological estimates of dispersal rates in insect (*Coenagrion mercuriale*: Odonata: Zygoptera) populations: analysis of 'neighbourhood size' using a more precise estimator. *Molecular Ecology* 16, 737-751.
- Webb T (2009) Biodiversity research sets sail: showcasing the diversity of marine life. *Biology Letters* 5, 145-147.
- Weinberg S (1979) The light-dependent behaviour of planula larvae of *Eunicella singularis* and *Corallium rubrum* and its implication for octocorallian ecology. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 49, 16-30.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Western D (2001) Human-modified ecosystems and future evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5458-5465.
- Whitaker K (2004) Non-random mating and population genetic subdivision of two broadcasting corals at Ningaloo Reef, Western Australia. *Marine Biology*, 144, 593-603.
- Whitlock M (2008) Evolutionary inference from Q(ST). *Molecular Ecology* 17, 1885-1896.
- Whitlock M, Guillaume F (2009) Testing for Spatially Divergent Selection: Comparing Q(ST) to F-ST. *Genetics* 183, 1055-1063.
- Whitlock M, McCauley D (1990) Some population genetic consequences of colony formation and extinction: genetic correlations within founding groups. *Evolution* 44, 1717-1724.
- Whitworth T, Dawson R, Magalon H, Baudry E (2007) DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 274, 1731-1739.
- Willi Y, Buskirk JV, Hoffmann A (2006) Limits to the adaptive potential of small populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37, 433-458.

- Williams G (1966) *Adaptation and Natural Selection*. Princeton University Press, Princeton.
- Williams G (1975) *Sex and evolution*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Williams G, Cairns S (2009) Systematic list of valid octocoral genera. <http://www.calacademy.org/research/izg/OCTOCLASS.htm/>.
- Williams P, KJ KG, CJ. CH (1997) Mapping biodiversity value worldwide: combining higher-taxon richness from different groups. . *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 264, 141-148.
- Willis B, Oppen Mv, Miller D, Vollmer S, Ayre D (2006) The role of hybridization in the evolution of reef corals. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37, 489-517.
- Wilson E (1989) Threats to biodiversity. *Scientific America* 261, 108-116.
- Wilson E, Peter F (1988) *Biodiversity*. National Academy Press, Washington.
- Wilson RS, Franklin CE (2002) Testing the beneficial acclimation hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution* 17, 66-70.
- Wilson S, Costello M (2005) Predicting future discoveries of European marine species by using a non-homogeneous renewal process. *Journal of the Royal Statistical Society Series C-Applied Statistics* 54, 897-918.
- Wirshing HH, Messing CG, Douady CJ, *et al.* (2005) Molecular evidence for multiple lineages in the gorgonian family Plexauridae (Anthozoa: Octocorallia). *Marine Biology* 147, 497-508.
- Wolfe K, Li W, Sharp P (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 9054-9058.
- Worm B, Barbier E, Beaumont N, *et al.* (2006) Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* 314, 787-790.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28, 114-138.
- Wright S, Muller-Landau H (2006) The uncertain future of tropical forest species. *Biotropica* 38, 443-445.

-Y-

Yanick J, Heath J, Heath D (2003) Survival and growth of local and transplanted blue mussels (*Mytilus trossulus*, Lamark). *Aquaculture research* 34, 869-875.

-Z-

Zibrowius H, Monteiro-Marques V, Grasshoff M (1984) La répartition du *Corallium rubrum* dans l'Atlantique (Cnidaria: Anthozoa: Gorgonaria). *Téthys*, 11, 163-170.

ANNEXE 1

Protocole d'extraction de l'ADN

L'ADN génomique total a été extrait à partir des bourgeons apicaux (extrémités charnues des branches) pour le corail rouge. Pour les huit autres espèces, 5 à 10 polypes ou de petits morceaux de coenenchyme ont été utilisés. Les tissus ont d'abord été broyés puis digérés dans 500 µl de tampon de lyse (0.1 M EDTA ; 0.05M TrisHCl pH = 8 ; 1% SDS) et 15 µl de protéinase K pendant 4h dans un bain sec à 55°C. Nous avons ensuite utilisé un protocole d'extraction phénol-chloroforme-alcool isoamylic (25 :24 :1) (Sambrook *et al.* 2001) dont les étapes principales sont les suivantes:

1. le produit de digestion est transféré dans un tube de 2 ml « *phase lock gel* » (Eppendorf) contenant une gélose qui séparera la phase aqueuse contenant l'ADN de la phase organique lors des centrifugations.
2. 500 µl de phénol-chloroforme-alcool isoamylic (25 :24 :1) sont ajoutés avant centrifugation pendant 10 min à 13700 rotations par minute (rpm).
3. 500 µl de chloroforme sont ensuite ajoutés avant une 10 min de centrifugation à 13700 rpm. Cette étape est répétée une seconde fois.
4. la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube. L'ADN est précipité grâce à l'ajout de 500 µl d'isopropanol et culotté grâce à une nouvelle centrifugation de 15 min à 13000 g.
5. l'isopropanol est pipeté et l'ADN est finalement rincé à l'alcool 70° avant une dernière centrifugation (13000 g ; 15 min).
6. le surplus d'alcool est pipeté et le tube est laissé à l'air libre pendant une nuit afin de permettre l'évaporation de l'alcool restant.
7. l'ADN est repris dans 100 µl d'eau stérile et conservé à -20°C.

ANNEXE 2

Mise au point des marqueurs moléculaires

Les connaissances génétiques chez les gorgonaires sont relativement limitées en comparaison d'autres taxons proches comme les hexacoralliaires (cf. Chapitre 2 Fig. 2-1). Le corail rouge ne faisant pas exception à ce « vide génétique », un important travail de développement de marqueurs a dû être mené notamment en prologue de la problématique de génétique des populations traitée au cours de cette thèse.

J'ai donc cherché à mettre au point différents types de marqueurs moléculaires pour aborder des questions aussi bien pour des approches populationnelles (génétique de populations, phylogéographie) que phylogénétiques. J'ai ainsi développé des marqueurs mitochondriaux (cf. Chapitre 2) et nucléaires (cf. Chapitres 3, 4 et 5) présentant des niveaux (i.e. inter- vs. intra-spécifique) et des types (i.e. séquence vs. taille) de polymorphismes variés. Une partie de ces mises au point s'est déroulée en parallèle sur plusieurs espèces. En plus de *Corallium rubrum*, *Eunicella singularis* et *Eunicella cavolini* ont ainsi été ciblées pour certains marqueurs nucléaires. Les marqueurs mitochondriaux ont, quant à eux, été testés sur 9 espèces dans la plupart des cas (cf. Chapitre 2).

1) Protocole général de mise au point des marqueurs: définition des amorces et PCR gradient

La mise au point de ces marqueurs s'est faite globalement, selon un protocole classique dont les principales étapes sont les suivantes :

1. Définition d'un jeu d'amorces nucléotidiques à partir de séquences existantes dans *GenBank* (marqueurs de séquences et certains microsatellites) ou de banques développées spécialement pour cette thèse (une partie des marqueurs microsatellites ; voir ci-dessous). Le logiciel Primer3 v 0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000 <http://frodo.wi.mit.edu/>) a été utilisé pour dessiner les amorces ;
2. Test de la qualité de l'amplification de la paire d'amorces utilisée parallèlement à la détermination des températures d'appariement grâce une PCR en gradient sur deux individus de populations géographiquement éloignées. Les conditions de cette PCR sont récapitulées en fin d'annexe ;
3. Visualisation du produit d'amplification sur gel d'agarose 2% chargé de 2,5 µL de bromure d'éthidium (BET) (1,2 g d'agarose dilués dans 60ml de TAE 1X ; 2,5 µL de BET ; 3 µL de produit de PCR dilués dans 3µL de bleu de charge et 3 µL de marqueur de taille 200 pb) ;
4. Optimisation éventuelle des paramètres de PCR en jouant notamment sur le nombre de cycles, la durée de chaque phase et la concentration en magnésium (MgCl₂) ;

5. Dans le cas d'une amplification correcte, 8 à 10 individus de populations géographiquement éloignées sont amplifiés afin d'évaluer le polymorphisme du locus en question par séquençage ou génotypage.

Pour certains locus, ce protocole a été répété plusieurs fois avec différentes paires d'amorces. Les tableaux A2-1, A2-2 et A2-3 récapitulent l'ensemble des locus testés.

2) Différents types de marqueurs

2-1) Polymorphisme de séquence : marqueurs nucléaires

J'ai testé divers couples d'amorces provenant de différentes sources dans le but d'isoler et d'amplifier des marqueurs ribosomiques ou introniques.

Pour l'approche phylogénétique, un fragment de l'*ARNr 28S* (domaines C1-D1-C2-D2-C3-D3 ; Borchiellini com. pers.) et un de l'*ARNr 18S* (domaine D2 ; Chenuil com. pers.) ont été séquencés.

Concernant les marqueurs introniques, les locus testés l'ont été à partir de couples d'amorces existants ou définis au cours de ce travail. Des alignements à partir des séquences disponibles dans *GenBank* ont ainsi été réalisés dans le but d'isoler des introns des gènes du facteur d'élongation 1 (*EF1*) et de l'actine (*Act*). En ce qui concerne l'utilisation des données publiées, divers locus ont été testés:

- quatre locus introniques amplifiés par amorçage sur exons (Exon Primed Intron Crossing *EPIC*) « universels » (ATP Synthetase Subunit beta (*ATPS-beta*) ; Adenine Nucleotide Transporter/ADP-ATP Translocase (*ANT*) ; Signal Recognition Particle 54-kDa subunit (*SRP54*) ; Lysidyl Aminoacyl Transfer RNA Synthetase (*LTRS*) Jarman *et al.* 2002) ;
- différents gènes déjà étudiés chez les Hexacoralliaires comme ceux du minicollagène (*mCol*) et de la calmoduline (*Calm*) ainsi que le gène du développement Pax-C (*Pax-C*) isolés chez différentes espèces du genre *Acropora* (Vollmer & Palumbi 2004 ; VanOppen *et al.* 2001) et quatre *EPIC* répartis sur 2 gènes de la superoxyde dismutase à cofacteur zinc et cuivre (*AvCuZnSODa* et *AvCuZnSODb*) isolé chez *Anemonia viridis* (Plantivaux *et al.* 2004) ;
- six *EPIC* des gènes de la cyclooxygénase (*cox-A* et *cox-B*) isolés chez deux octocoralliaires *Plexaura homomella* et *Gersemia fruticosa* (Valmsen *et al.* 2001 ; Jarving *et al.* 2004) ; une portion du gène de la famille des protéines de choc thermique isolé chez *Eunicella cavolini* (*HSP-70* Borchiellini *et al.* 1998) ; une portion du gène de la *SRP54* a été amplifiée avec succès à partir des amorces développées sur l'octocorallaire *Carijoa riisei* (Concepcion *et al.* 2008) ;

Dans la plupart des cas (i.e. tous sauf le *SRP54* de Concepcion *et al.* 2008), les amplifications étaient peu spécifiques donnant des patterns multi-bandes lors de la visualisation sur gel d'agarose (Fig. A2-1). Une étape de clonage a donc été menée afin de pouvoir définir

des amorces plus spécifiques de la séquence ciblée chez corail rouge. Au final, les PCR ont pu être optimisées (amplification ciblée) pour sept locus nucléaires : *ARNr 28S* ; *ARNr 18S* ; quatre introns de *cox* et *SRP54* (cf. en suivant).

L'obtention de marqueurs mitochondriaux (cf. ci-dessous) a conduit à laisser de côté les marqueurs ribosomiques nucléaires multicopies. Le génome mitochondrial étant à transmission clonale (maternelle), il évolue comme un locus unique sans recombinaison (Galtier *et al.* 2009) contrairement aux séquences ribosomiques nucléaires dont certaines régions sont caractérisées par un mode d'évolution atypique chez les octocoralliaires (Calderon *et al.* 2006).

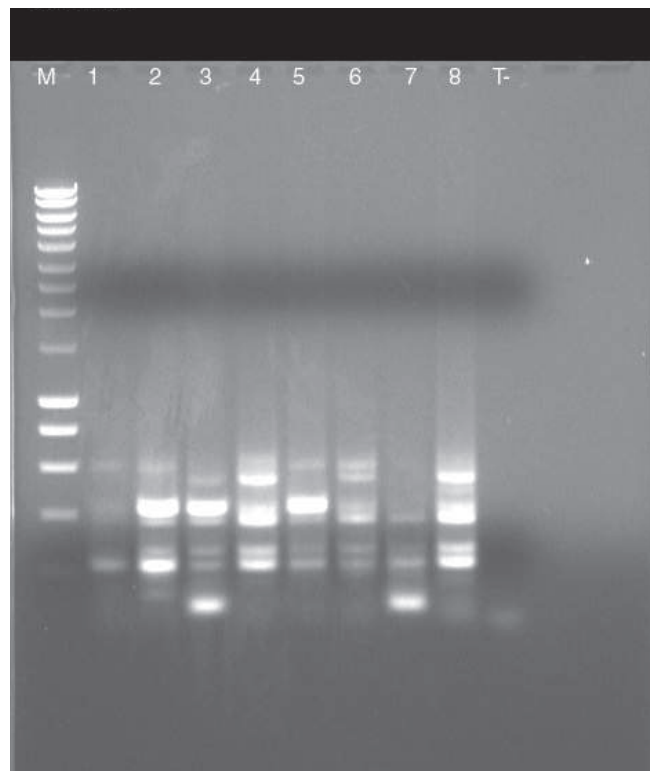


Figure A2-1: Visualisation sur gel d'agarose 2% des produits de PCR obtenus chez le corail rouge. Les amorces utilisées dans cet exemple ont été développées pour cibler les gènes Pax-C chez les espèces du genre *Acropora* (Hexacorallaire) (VanOppen *et al.* 2001). M : marqueur de taille 200pdb ; 1-8 : différents individus ; T- : témoin.

Le faible polymorphisme observé sur les cinq séquences (quatre introns de *cox* et *SRP54*) n'a pas permis une utilisation à l'échelle populationnelle chez le corail rouge malgré la présence probable d'un polymorphisme nucléotidique simple (« *single nucléotide polymorphism* » *SNP*) notamment sur les introns de la cyclooxygénase. La résolution de ces derniers locus reste aussi à être évaluée au niveau inter-spécifique dans un cadre de phylogénie / barcoding (cf. Chapitre 2 Partie II).

Tableau A2-1: Récapitulatif des différents locus nucléaires testés pour développer des marqueurs permettant de travailler sur du polymorphisme de séquence. Les séquences des amorces, températures d'appariement et la taille du produit de PCR obtenu ne sont données que pour les marqueurs ayant été utilisés ou adaptés avec succès chez le corail rouge. Les locus en gras ont été testés sur plusieurs espèces. N : nombre de paires d'amorces testées pour le locus en question. Ta : température d'appariement en °C chez le corail rouge. * désigne les amorces développées au cours de cette thèse.

Locus	Origine	Isolé à partir de séquences de:	N	Clonage	Séquences des amorces	Ta (°C)	Taille du produit de PCR (pdb)
28S	Borchiellini com. pers.		3	oui	28S1: 5'-ACCCgCTgAATTTAAgCA 28 Y: 5'-gTCTTTCgCCCCTA	59	400
18S	Chenuil com. pers.		1	oui	18S F: 5'-AATTCTAGAGCTAATACATG 18S R: 5'-ACCATTATTCATGCTTATG	59	600
<i>ATPSbeta</i>	Jarman et al.2002	«coelomates»	1	oui			
<i>ANT</i>	Jarman et al.2002	«coelomates»	1	oui			
<i>SRP54</i>	Jarman et al.2002 / Concepcion et al.2008	«coelomates» / Carijoa riisei	2	oui / non	CrSRP54f: 5'-CGAACTAAAATTAGAAGAAAACGAAG CrSRP54r: 5'-TCATACATGTCTCTCAGCGTAAAC	54	200
<i>LTRS</i>	Jarman et al.2002	«coelomates»	1	oui			
<i>Pax C</i>	VanOppen et al.2001	Acropora	1	oui			
<i>Calm</i>	Vollmer & Palumbi 2002	Acropora	1	oui			
<i>mCol</i>	Vollmer & Palumbi 2002	Acropora	1	oui			
<i>HSP70</i>	Borchiellini et al.1998	Acropora	1	oui			
<i>Act</i>	Genbank		3	oui			
<i>EF1</i>	Genbank		3	oui			
<i>Cox: NCPup_TNTSdown</i>	Jarving et al.2004	<i>Plexaura homomella</i>	2	oui	NC1: 5'-AGACGTATTGCCGTTTGGTTAC * TN1: 5'-ACCCAAGAACTGTCCAAAGC *	60	900
<i>Cox: DERup_GSTdown</i>	Jarving et al.2004	<i>Plexaura homomella</i>	1	oui			
<i>Cox: VAVup_DMVdown</i>	Jarving et al.2004	<i>Plexaura homomella</i>	1	oui	VA1:5'-TGTCTTCACCATATCAAGCAAAC * DM1: 5'-CTTGGACGTAGCAGTTGATCTTT *	60	400
<i>Cox: EDGup_FMYdown</i>	Jarving et al.2004	<i>Plexaura homomella</i>	1	oui	ED1: 5'-TGAAGATGGACCCTTTCGTATAAT * FM1: 5'-CATGAAGAAGCTGACACTAGGTTG *	60	600
<i>Cox: RHIVup_EPYdown</i>	Jarving et al.2004	<i>Plexaura homomella</i>	1	oui			
<i>Cox: KALup_DYAdown</i>	Jarving et al.2004	<i>Plexaura homomella</i>	1	oui	KA1: 5'-TCAAGGCATTGAAATTTGCT * DY1: 5'-ATTGTTGCATAGTCAGTGAGTG *	60	200
<i>AvCuZnSODa</i>	Plantivaux et al.2004	<i>Anemonia viridis</i>	2	oui			
<i>AvCuZnSODb</i>	Plantivaux et al.2004	<i>Anemonia viridis</i>	2	oui			

2-2) Polymorphisme de séquence : marqueurs mitochondriaux

J'ai testé sept marqueurs mitochondriaux: l'extrémité 5' du gène de la sous-unité 2 de la NADH-déshydrogénase (*ND2*) ; l'extrémité 5' du gène *msh1* ; l'extrémité 3' du gène de la sous-unité 6 de la NADH-déshydrogénase (*ND6*) ; la séquence intergénique (IGS) située entre les cytochromes oxydases 1 et 2 (*COI-COII*) ; une portion du gène de la *COI*. Les paires d'amorces pour les quatre premiers locus ont été dessinées par McFadden *et al.* 2004 ; la dernière pour la *COI* par Calderón *et al.* 2006. Dans le même temps, j'ai essayé de séquencer le locus *msh1* dans son ensemble grâce à deux couples d'amorces supplémentaires définies ici. Seule l'extrémité 5' du gène *msh1* a pu être amplifiée alors que la séquence intergénique *COI-COII* n'a pu être obtenue chez aucune des espèces testées (Tableau A2-2). Les conditions d'amplifications de ces marqueurs sont présentées en suivant et rappelées dans les parties I et II du chapitre 2. Les locus *ND2*, *ND6* ont été utilisés pour les parties I et II du chapitre 2 alors que *msh1* et *COI* l'ont été pour la partie II du chapitre 2.

Tableau A2-2: Récapitulatif des différents locus mitochondriaux testés. Les séquences des amorces, températures d'appariement et la taille du produit de PCR obtenu ne sont données que pour les marqueurs ayant été utilisés ou adaptés avec succès chez le corail rouge. Les locus en gras ont été testés sur plusieurs espèces. Ta : température d'appariement en °C.

Locus	Origine	Séquences des amorces	Ta (°C)	Taille produits de PCR (pdb)
<i>ND2</i>	McFadden <i>et al.</i> 2004	16S647F: 5'-ACACAgCTCggTTTCTATCTACCA ND21418R: 5'-ACATCgggAgCCACATA	59	800
<i>ND6</i>	McFadden <i>et al.</i> 2004	ND61487F: 5'-TTTggTTAgTTATTgCCTTT ND32126R: 5'-CACATTCATAgACCgACACTTT	50	600
<i>COI-COII</i>	McFadden <i>et al.</i> 2004	COII8068F: 5'-CCATAACAggACTAgCAgCATC COI8325R: 5'-TCCTTATgATTAgTAgAAAA		
<i>msh1</i>	McFadden <i>et al.</i> 2004	ND42599F: 5'-GCCATTATggTAACTATTAC Mut-3458R: 5'-TSgAgCAAAAgCCAYTCC	59	800
<i>msh1bis</i>		Mut-3459: 5'-TRCCRTGTTATTTATCTTATAGGTACG Mut-3460R: 5'-CCGCTTAATGCAACATCTAATCT		
<i>msh1ter</i>		Mut-3461: 5'-TCTATTTYATCTAAAAAGTTAACTAAG Mut-3462R: 5'-AGTTCACACTRTCTRAAGAYTCR		
<i>COI</i>	Calderon <i>et al.</i> 2006	CO1CniF: 5'-GGYACTYTATATTTACTATTTGG CO1CniR: 5'-CCSGCAGGATCAAAGAAWGTG	60	600

2-3) Polymorphisme de taille : Marqueurs nucléaires de type ISSR

Les marqueurs ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) sont des marqueurs dominants. Cette technique consiste à amplifier des portions d'ADN se trouvant entre 2 microsatellites proches à orientation opposée en utilisant pour cela des amorces présentant un motif di-, tri- ou tétranucléotidiques répété *n* fois. Bien que moins informatifs que les microsatellites qui sont co-dominants, les ISSR sont plus simples d'utilisation puisqu'il n'est pas nécessaire de définir des amorces spécifiques du locus ciblé. Onze locus ont été testés

sans que les patterns observés soient concluants et ce, malgré l'utilisation dans certains cas de gels d'acrylamide qui permettent une séparation plus fine des produits de PCR.

2-4) Polymorphisme de taille : Marqueurs nucléaires de type microsatellite

Plusieurs stratégies ont été mises en place pour isoler les locus microsatellites. J'ai, dans un premier temps, tenté de transposer les quatre locus (*Pel34*, *Pel56*, *Pel74*, *Pel32*) développés chez un autre octocoralliaire : *Pseudopterogorgia elisabethae* (Gutierrez-Rodriguez & Lasker 2004). Après clonage, l'absence de séquence utilisable a conduit à abandonner ces locus.

Une première banque enrichie a été développée chez le corail rouge (Aurelle, Lejeusne & Chenuil non publié) courant 2003. L'amplification des cinq locus isolés était peu spécifique dans deux cas (*Mic3* et *Mic2*). Les trois autres locus (*Mic1*, *Mic4*, *Mic5*) n'étant pas assez polymorphes, aucun n'a été retenu.

Une nouvelle banque enrichie a été achetée à Bioprofiles LD (Université de Newcastle). Les séquences de 40 clones positifs pour le motif (CA)_n ont été obtenues. Parmi ces clones certaines séquences ne permettaient pas de définir des amorces ou la séquence répétée était trop longue. J'ai ainsi dessiné les amorces et tenté d'optimiser les PCR pour 12 locus (*Mic10* à *Mic21*). Après une première vérification sur gel d'agarose, 11 locus ont été retenus pour des tests de polymorphisme par génotypage. Les amorces sens de ces 11 locus ont donc été marquées en 5' par un marqueur fluorescent. La migration des produits de PCR a été effectuée sur un ABI3130 (Applied Biosystem) avant d'être analysée grâce à Genemapper v.3.0 (Applied Biosystem). Sur les 11 locus, considérant leur facilité de lecture et leur niveau de polymorphisme, seuls deux ont été retenus pour les analyses populationnelles : *Mic13* et *Mic20*.

Une nouvelle banque enrichie a été réalisée par Ecogenics GmbH (Zurich, Switzerland). Des fragments d'ADN génomique liés à un SAULA/SAULB-linker (Armour *et al.* 1994) ont été isolés grâce à l'utilisation de sondes magnétiques portant des répétitions oligonucléotidiques (GT)₁₃ et (GATA)₈, et marquées à la biotine (Gautschi *et al.* 2000a,b). Sur les 948 clones obtenus, 150 ont donné un signal positif après hybridation. Vingt-deux paires d'amorces ont été dessinées à partir de ces 150 clones. Douze ont été retenues pour les tests de polymorphismes et 6 locus ont été finalement fournis: *Mic22*, *Mic23*, *Mic24*, *Mic25*, *Mic26* and *Mic27*. Mon travail a consisté à adapter les conditions de PCR qui sont présentées en suivant et rappelées dans le chapitre 3.

Enfin, pendant le développement de ces marqueurs, une équipe italienne a publié son propre jeu de cinq microsatellites spécifique au corail rouge (Costatini & Abbiati, 2006). Ces microsatellites présentant des taux d'allèles nuls très importants (Costatini *et al.* 2007a, b), j'ai essayé d'améliorer les taux d'amplification en redessinant des amorces à partir des séquences disponibles dans *GenBank*. Après une première visualisation des produits de PCR sur gel d'agarose, quatre nouvelles paires d'amorce ont été testées en génotypage. Finalement, deux ont été retenues correspondant aux locus *COR9* et *COR46*

et sont désignées *COR9bis* et *COR46bis* dans la suite de ce manuscrit. Parmi les locus initiaux, *COR48* et *COR58* ont été amplifiés dans certains chapitres de ce manuscrit (Chapitres 4 et 5). Au final, douze locus provenant de trois sources différentes ont été utilisés pour cette thèse (Tableau A2-3). Les conditions d'amplification sont décrites ci-dessous.

3) Conditions de PCR pour les différents types de locus

3-1) Conditions de PCR gradient

Le mélange réactionnel de 20 μL comprend 2 μL de tampon de PCR Promega® 10X, 2,5 mM de MgCl_2 , 0,125 mM de dNTPs, 0,5 μM de chacune des amorces, 0,025 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Flexigotaq polymérase (Promega®), 2 μL d'ADN et de l'eau en quantité suffisante pour atteindre le volume final.

Le programme de PCR en gradient est le suivant : une phase de dénaturation de 5 min à 94°C, 35 cycles composés d'une phase de dénaturation de 1 min à 94°C, d'une phase d'appariement des amorces de 1 min à température variable (i.e. gradient de température allant de 45 à 60 °C), d'une phase d'élongation de 2 min à 72°C et une phase d'élongation finale de 5 min à 72°C.

3-2) Conditions de PCR pour les marqueurs nucléaires de séquences

Les mélanges réactionnels sont identiques à ceux présentés précédemment.

Le programme PCR pour l'amplification de ces locus est le suivant : une phase de dénaturation de 5 min à 94°C, 35 cycles composés d'une phase de dénaturation de 1 min à 94°C, d'une phase d'appariement des amorces de 1 min à la température d'appariement (*Ta* cf. Tableau A2-1), d'une phase d'élongation de 2 min à 72°C et une phase d'élongation finale de 5 min à 72°C.

3-3) Conditions de PCR pour les marqueurs mitochondriaux

Chaque PCR a été effectuée dans un volume final de 30 μL contenant 3 μL d'ADN, 3 μL de tampon 10X, 0,3 mM de dNTP, 1 μM de chacune des amorces, 0,15 μL de Taq Polymerase à 0,25 $\text{U}/\mu\text{L}$ et 9,85 μL d'eau.

Les PCR ont été réalisées avec les programmes suivants: une phase de dénaturation de 5 min à 94°C ; 35 cycles composés d'une phase de dénaturation de 1 min à 94°C, d'une phase d'appariement des amorces de 1 min à température d'appariement (*Ta* cf. Tableau A2-2), et d'une phase d'élongation de 2 min à 72°C ; une phase d'élongation finale de 5 min à 72°C.

Tableau A2-3: Récapitulatif des différents locus microsattellites ou affiliés testés. Les séquences des amorces et les températures d'appariement ne sont données que pour les marqueurs ayant été utilisées avec succès chez le corail rouge. Les locus en gras ont été testés sur 3 espèces (*Corallium rubrum*, *Eunicella cavollini* et *Eunicella singularis*). Une étape de clonage a été menée pour les locus Pel34, 56, 74 et 32. N : nombre de paires d'amorces testées pour le locus en question. * désigne les amorces développées au cours de cette thèse.

Locus	Origine	N	Séquences des amorces	Ta	Nombre de cycles
ISSR		11			
Pel 34*	Gutierrez-Rodriguez & Lasker	1			
Pel 56*	Gutierrez-Rodriguez & Lasker	1			
Pel 74*	Gutierrez-Rodriguez & Lasker	1			
Pel 32*	Gutierrez-Rodriguez & Lasker	1			
<i>Mic1</i>	Aurette, Lejeusne, Chenuil	1			
<i>Mic2</i>	Aurette, Lejeusne, Chenuil	2			
<i>Mic3</i>	Aurette, Lejeusne, Chenuil	1			
<i>Mic4</i>	Aurette, Lejeusne, Chenuil	1			
<i>Mic5</i>	Aurette, Lejeusne, Chenuil	1			
<i>Mic10</i>	Bioprofiles LD	1			
<i>Mic11</i>	Bioprofiles LD	2			
<i>Mic12</i>	Bioprofiles LD	2			
<i>Mic13</i>	Bioprofiles LD	1	Mic13F: 5'-CTTTGATTGGCCCTGATGTAA* Micr13R: 5'-GCCAGGAAAGAATTGGGTATATTA*	59	25
<i>Mic14</i>	Bioprofiles LD	2			
<i>Mic15</i>	Bioprofiles LD	1			
<i>Mic16</i>	Bioprofiles LD	2			
<i>Mic17</i>	Bioprofiles LD	2			
<i>Mic18</i>	Bioprofiles LD	1			
<i>Mic19</i>	Bioprofiles LD	2			
<i>Mic20</i>	Bioprofiles LD	1	Mic20F: 5'-CACGTGATTGACGAAAACATTC* Mic20R: 5'-TGTCGGGAAATTGTTCACTGTA*	59	25
<i>Mic21</i>	Bioprofiles LD	2			
<i>Mic22</i>	Ecogenics	1	Mic22F: 5'-CGAGCGAGGGAAATTAATAGG Mic22R: 5'-GATGTAATTGTCGCGCATTG	56	25
<i>Mic23</i>	Ecogenics	1	Mic23F: 5'-GATCTCTGACTGAATGGTATTGG Mic23R: 5'-CCTGGCTACGTCCTGACT	56	25
<i>Mic24</i>	Ecogenics	1	Mic24F: 5'- TCGAGCACTTCCTTGGTAGC Mic24R: 5'-TGAATTCCATACACCCACTGC	59	25
<i>Mic25</i>	Ecogenics	1	Mic25F: 5'-GCAAGGTAATGATGTAGTCTGG Mic25R: 5'-GATCGCACTAAATCTTAATAGTGTTC	59	25
<i>Mic26</i>	Ecogenics	1	Mic26F: 5'-AGGGAACAATCTTTGTTGTGC Mic26R: 5'-ATGTTTGCGGACCTACACG	59	25
<i>Mic27</i>	Ecogenics	1	Mic27F: 5'-GATCTCTCGGGATAGTCTG Mic27R: 5'-GACGGTGGGACGAACAGG	59	25
<i>COR9</i>	Costantini & Abbiati 2006	2	COR9bisF: 5'-GTTCTTGAAGCATGTTGGATT* COR9bisR: 3'-CAGGAATTCTGCCAGTACACA*	53	30
<i>COR46</i>	Costantini & Abbiati 2006	2	COR46bisF: 5'-TTGGGTACAATCAAGCTACCA* COR46bisR: 5'-AGACCAGCGCATCACTTT*	53	28
<i>COR48</i>	Costantini & Abbiati 2006	1	COR48F: 5'-AAAAGAGCCTGGGTATGAGGTT COR48R: 5'-ATGATGATTGCAAATTGAGTCG	58	28
<i>COR58</i>	Costantini & Abbiati 2006	1	COR58F: 5'-CGCTATAATTGGCGTAAGCTGT COR58R: 5'-GTACGCTTCGGAGTTTTGAGTT	57	30
<i>COR15</i>	Costantini & Abbiati 2006	1			

3-3) Conditions de PCR pour les marqueurs mitochondriaux

Chaque PCR a été effectuée dans un volume final de 30 μ L contenant 3 μ L d'ADN, 3 μ L de tampon 10X, 0,3 mM de dNTP, 1 μ M de chacune des amorces, 0,15 μ L de Taq Polymerase à 0,25 U/ μ L et 9,85 μ L d'eau.

Les PCR ont été réalisées avec les programmes suivants: une phase de dénaturation de 5 min à 94°C ; 35 cycles composés d'une phase de dénaturation de 1 min à 94°C, d'une phase d'appariement des amorces de 1 min à température d'appariement (*Ta* cf. Tableau A2-2), et d'une phase d'élongation de 2 min à 72°C ; une phase d'élongation finale de 5 min à 72°C.

3-4) Conditions de PCR pour les microsatellites

Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 10 μ L contenant: 1 μ L d'ADN, 2 μ L de tampon 5X Colorless Flexi GoTaq (Promega), 0,2 mM de dNTPs, 0,25 U de GoTaq DNA Polymérase (Promega), 3 mM de MgCl₂ et 1 μ M de chaque amorce.

Deux programmes de PCR différents ont été utilisés. Les locus *Mic* ont été amplifiés de la façon suivante: 2 min de dénaturation à 95°C suivie par 25 cycles composés de 30s de dénaturation à 94°C, 30s à température d'appariement (*Ta*), sans phase d'élongation; une étape finale d'élongation à 72°C pendant 20 min (C. Hubert Functional Genomic Bordeaux com. pers.). L'amplification des quatre locus de Costantini & Abbiati (2006) a été effectué selon le programme suivant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 min ; *n* cycles de 30s à 94°C, 30s à température d'appariement (*Ta*), 30s à 72°C ; une étape d'extension finale à 72°C pendant 20 min. La température d'appariement et le nombre de cycles pour ces locus sont présentés dans le tableau A2-3.

A l'issue de ce travail, trois marqueurs mitochondriaux (*ND2*, *ND6*, *msh1*) ont été appliqués aux gorgonaires méditerranéens, quatre marqueurs nucléaires devraient être testés dans un cadre phylogénétique chez ces mêmes espèces. D'autres part, ce travail a participé à la mise au point du locus *EFL* qui est utilisé chez le corail rouge et d'autres gorgonaires de Méditerranée (Aurette *et al.* soumis; Annexe 6). Enfin 10 nouveaux marqueurs microsatellites ont été caractérisés chez le corail rouge.

ANNEXE 3

Taux d'erreur, homogénéité génétique des colonies, génotypes multilocus répétés et analyse factorielle des correspondances

1) Estimation des taux d'erreur liés au génotypage des microsatellites

Afin de tester la répétabilité des locus microsatellites utilisés au cours de cette thèse, 102 individus sur les 1728 colonies génotypées, soit environ 6 %, ont été ré-extraits, ré-amplifiés et génotypés une deuxième fois de manière indépendante. Ces tests ont été menés sur tous les locus à l'exception de *COR48* et *COR58*.

Deux types de taux d'erreurs ont été calculés : le taux d'erreur par allèle et le taux d'erreur par réaction (Hoffman & Amos 2005) pour chacun des locus. Le taux d'erreur par allèle (*Ea*) correspond au nombre de différences entre les deux PCR menées sur un même individu, divisé par le nombre total d'allèles amplifiés (soit le nombre d'individus amplifiés au locus considéré multiplié par 4 ; chaque individu étant amplifié 2 fois). Il permet de différencier l'impact des différentes sources d'erreur (artéfacts de PCR ou de lecture) sur le jeu de données. Le taux d'erreur par réaction de PCR (*Er*) correspond au nombre de génotypes différents entre les deux PCR menées sur un même individu, divisé par le nombre total d'amplification (soit le nombre d'individus amplifiés au locus considéré multiplié par 2). Ces deux taux ont aussi été calculés sur l'ensemble du jeu de données. Enfin le taux d'erreur sur les génotypes multilocus a été calculé et comparé à l'attendu théorique lorsque les erreurs se produisent de façon indépendantes (voir Pompanon *et al.* 2005). Le tableau A3-1 récapitule ces résultats. Les taux d'erreur par allèle total est de 0,01 (36 allèles sur les 4080 amplifiées) ce qui correspond à un taux d'erreur par réaction total de 0,016 (32 réactions sur les 2040 menées). Ce taux d'erreur par allèle *Ea* varie de 0 pour *Mic23* à 0,17 pour *Mic25* et *Mic26*. Les erreurs de lecture sont la source d'erreur majoritaire pour tous les locus. Le taux d'erreur par locus *Er* varie de 0 pour *Mic23* à 0,055 pour *Mic25*. Le taux d'erreur multilocus théorique correspondant est de 0,311 soit supérieur au taux observé de 0,113 ce qui sous entend que les erreurs ne sont pas distribuées de façon indépendantes et que certains génotypes multilocus en présentent plusieurs. Etant donné le nombre important d'estimateurs des taux d'erreur existant, il est difficile de comparer ces valeurs avec celles de la littérature (Paetkau 2003 ; Broquet *et al.* 2007). Toutefois, les valeurs calculées pour la présente étude sont concordantes avec celles précédemment publiées utilisant les mêmes méthodes de calculs (Hoffman *et al.* 2003; Lada *et al.* 2006; Hoffman & Amos 2005; Hoffman *et al.* 2006). Les marqueurs utilisés dans cette étude présentent donc des taux d'erreur acceptables qui ont été utilisés notamment pour l'analyse de parenté menée avec le logiciel COLONY (Wang 2004) dans le chapitre 4.

Tableau A3-1: Taux d'erreur par allèle et taux d'erreur par réaction calculés pour chaque locus et sur l'ensemble du jeu de données.

	E_a	E_r
<i>Mic13</i>	0,005	0,021
<i>Mic20</i>	0,013	0,051
<i>Mic22</i>	0,003	0,013
<i>Mic23</i>	0	0
<i>Mic24</i>	0,011	0,042
<i>Mic25</i>	0,017	0,056
<i>Mic26</i>	0,018	0,04
<i>Mic27</i>	0,011	0,046
<i>COR9bis</i>	0,011	0,046
<i>COR46bis</i>	0,013	0,051
Global	0,01	0,016

2) Relation colonie vs individu génétique

Quatre colonies provenant de la réserve naturelle de Scandola et caractérisées par une hauteur et un diamètre à la base importants et donc un âge avancé, ont été récoltées afin de tester leur homogénéité génétique à l'échelle individuelle. Pour ce faire, j'ai donc échantillonné deux morceaux de la même colonie situés à l'extrémité de deux branches distantes afin de voir s'ils présentaient le même génotype multilocus. L'ADN a été extrait et amplifié sur l'ensemble des locus exception faite de *COR48* et *COR58* et ce, indépendamment pour chaque extrémité. Sur les 40 paires de génotypes amplifiés (2 amplifications sur 10 locus pour 4 colonies), une seule différence résultant d'une erreur de lecture a été observée sur *Mic24* chez la colonie 1 (Tableau A3-2). Les résultats de ce test montrent que chaque colonie correspond a priori à un individu génétique et suggèrent l'absence de chimère chez le corail rouge.

3) Préparation du jeu de données

Etant donné les erreurs possibles lors de l'échantillonnage, du conditionnement (colonies cassées) ou de l'ensemble des étapes permettant l'obtention des génotypes, j'ai cherché à éliminer les éventuels génotypes répétés dans le jeu de données. J'ai donc utilisé la macro Excel IRmacroN4 (Amos *et al.* 2001 ; <http://www.zoo.cam.ac.uk/zoostaff/meg/amos.htm>) qui permet l'identification des génotypes multilocus identiques. Cette macro a été remplacée par le logiciel GIMLET v.1.3.3 (Valière 2002) pour le chapitre 4. Ainsi sur les 1261 colonies amplifiées pour le chapitre 3, 39 génotypes multilocus se sont révélés doubles, ce qui induit un jeu de données final de 1222 individus. Sur les 81 colonies amplifiées au chapitre 4, 75 génotypes multilocus différents ont été identifiés. Enfin, sur les 183 colonies génotypées pour le chapitre 5, trois génotypes multilocus étaient présents deux fois, aboutissant à un jeu de données finales de 180 individus.

Tableau A3-2: Homogénéité génétique des colonies de corail rouge. Deux morceaux de la même colonie (A et B) ont été génotypés sur 10 locus microsattellites. Une seule différence est observée sur le locus Mic24 pour la colonie PZUCol1.

	PZUCol1A	PZUCol1B	PZUCol2A	PZUCol2B	PZUCol3A	PZUCol3B	PZUCol4A	PZUCol4B
<i>Mic13</i>	131133	131133	131133	131133	131133	131133	131131	131131
<i>Mic20</i>	198200	198200	198200	198200	198198	198198	198200	198200
<i>Mic22</i>	165169	165169	165165	165165	165169	165169	165165	165165
<i>Mic23</i>	101101	101101	095101	095101	095095	095095	095099	095099
<i>Mic24</i>	225225	223225	145221	145221	179225	179225	179179	179179
<i>Mic25</i>	166166	166166	130130	130130	193193	193193	144144	144144
<i>Mic26</i>	155158	155158	126153	126153	168187	168187	168187	168187
<i>Mic27</i>	169175	169175	173401	173401	401405	401405	169377	169377
<i>COR9bis</i>	171171	171171	173173	173173	181181	181181	173181	173181
<i>COR46bis</i>	193193	193193	204204	204204	193193	193193	193200	193200

4) Analyse factorielle des correspondances

Afin d'avoir une première représentation de la structure génétique à l'intérieur du jeu de données obtenu sur le bassin Nord-Occidental, une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été menée grâce au logiciel GENETIX v.4.05 (Belkhir *et al.* 2004). Dans le cas présent, ce type d'analyse est utilisé pour tester la présence de pools génétiques fortement différenciés traduisant éventuellement l'existence d'espèces cryptiques. Chaque génotype est codé en fonction des allèles qui le composent (0 lorsque l'allèle considéré est absent, 1 quand l'individu est hétérozygote et 2 lorsqu'il est homozygote pour cet allèle). Les axes sont définis afin de maximiser les différences entre les individus. Les valeurs d'inertie associées à chacun de ces axes sont comparables à des combinaisons linéaires des valeurs de F_{ST} monolocus (Guinand 1996). Afin d'éviter la distorsion du nuage de points induite par la présence d'allèles rares, les allèles présents moins de cinq fois ont été placés en variable supplémentaire. La figure A3-1 montre la projection des individus dans l'espace formé par les trois premiers axes. Ces trois axes portent peu d'information : 1,24 % ; 1,15 % ; 0,98 % pour les axes 1, 2 et 3 respectivement, soit 3,37 % d'informations cumulées sur les trois axes. Globalement les individus sont bien regroupés en fonction de leur population et de leur région d'appartenance. L'axe 1 semble séparer les individus Liguro-Provençaux du reste de l'échantillonnage, alors que les individus des Baléares qui sont globalement plus dispersés se distinguent sur l'axe 2. La distinction sur l'axe 3 concerne les individus de Corse et de Catalogne. L'absence de cassure nette dans le nuage de points suggère une certaine homogénéité du pool génétique étudié. Ainsi, les individus génotypés appartiennent probablement à la même espèce.

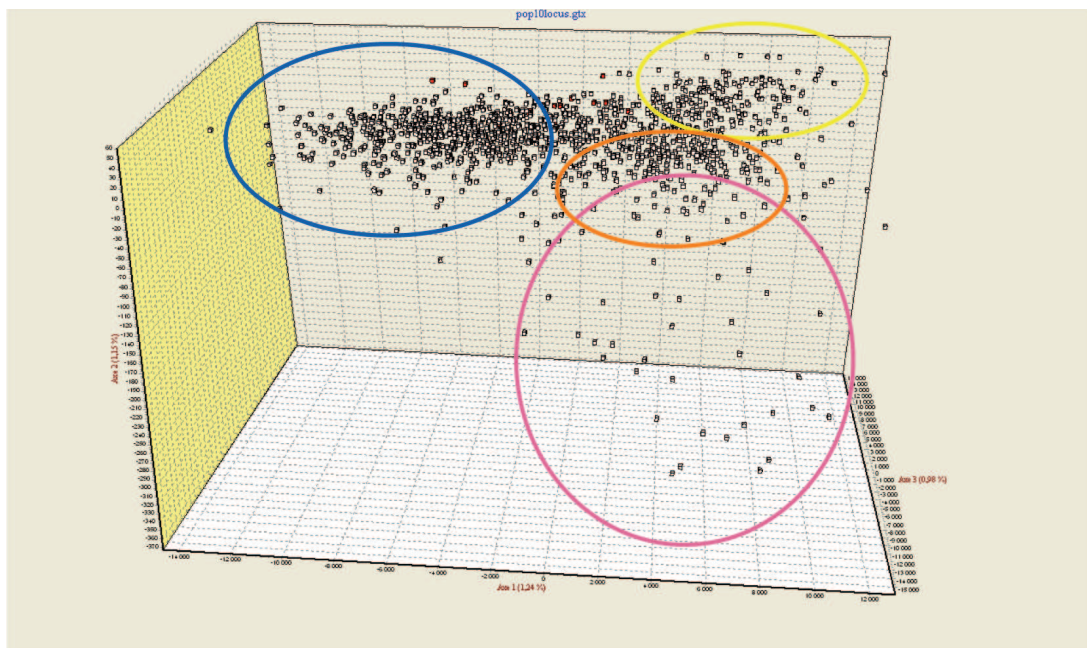


Figure A3-1: Analyse factorielle des correspondances. Chaque point représente un individu dans l'espace factoriel défini par les 3 axes (axe 1 : 1,24 %; axe 2 %: 1,15; axe 3 : 0,98 %). Afin de faciliter la lecture, la plupart des individus provenant d'une même région sont entourés par un cercle de couleur qui n'est donc qu'informatif (bleu : région Liguro-Provençale ; Rose : Baléares ; Jaune : Catalogne ; Orange : Corse).

ANNEXE 4

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

J-B LEDOUX,* K. MOKHTAR-JAMAÏ,* C. ROBY,+ J-P FÉRAL,* J. GARRABOU§ and D. AURELLE*

*Aix-Marseille Université, CNRS UMR 6540 DIMAR, Centre d'Océanologie de Marseille, Station Marine d'Endoume, Chemin de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France,+ Département de Biologie, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6, § Institut de Ciències del Mar CSIC, Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, E-08003, Barcelona, Spain,

Keywords: *Corallium rubrum*, microsatellites, isolation by distance, genetic clustering, conservation biology.

Correspondence: Jean-Baptiste Ledoux / Didier Aurelle; Fax: +33491041635; E-mail: jean-baptiste.ledoux@univmed.fr / didier.aurelle@univmed.fr

Running title: Genetic survey of red coral populations.

Abstract:

Combined action from over-harvesting and recent mass mortality events potentially linked to ongoing climate changes has led to new concerns for the conservation of shallow populations (5-60 m) of *Corallium rubrum*, an octocorallian that is mainly found in the Mediterranean Sea. The present study was designed to analyze population structure and relationships at different spatial scales (from tens of meters to hundreds of kilometers) with a focus on dispersal pattern. We also performed the first analysis of the distribution of genetic diversity using a comparative approach between regional clusters and samples. Forty populations dwelling in four distinct regions between 14 and 60 m in depth were genotyped using 10 microsatellites. Our main results indicate 1) a generalized pair-sample differentiation combined with a weak structure between regional-clusters; 2) the occurrence of isolation by distance at the global scale, but also within two of the three analyzed regional-clusters; 3) a high level of genetic diversity over the surveyed area with a heterogeneous distribution from regional-cluster to sample levels. The evolutionary consequences of these results are discussed and their management implications are provided.

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

J.-B. LEDOUX,* K. MOKHTAR-JAMAÏ,* C. ROBY,† J.-P. FÉRAL,* J. GARRABOU‡ and D. AURELLE*

*Aix-Marseille Université, CNRS UMR 6540 DIMAR, Centre d'Océanologie de Marseille, Station Marine d'Endoume, Chemin de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France, †Département de Biologie, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6, ‡Institut de Ciències del Mar CSIC, Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, E-08003, Barcelona, Spain

Abstract

Combined action from over-harvesting and recent mass mortality events potentially linked to ongoing climate changes has led to new concerns for the conservation of shallow populations (5–60 m) of *Corallium rubrum*, an octocorallian that is mainly found in the Mediterranean Sea. The present study was designed to analyse population structure and relationships at different spatial scales (from 10s of meters to 100s of kilometres) with a focus on dispersal pattern. We also performed the first analysis of the distribution of genetic diversity using a comparative approach between regional-clusters and samples. Forty populations dwelling in four distinct regions between 14 and 60 m in depth were genotyped using 10 microsatellites. Our main results indicate (i) a generalized pair-sample differentiation combined with a weak structure between regional-clusters; (ii) the occurrence of isolation by distance at the global scale, but also within two of the three analysed regional-clusters; (iii) a high level of genetic diversity over the surveyed area with a heterogeneous distribution from regional-cluster to sample levels. The evolutionary consequences of these results are discussed and their management implications are provided.

Keywords: conservation biology, *Corallium rubrum*, genetic clustering, isolation by distance, microsatellites

Received 4 June 2009; Revision received 15 November 2009; accepted 21 November 2009

Introduction

Coastal marine ecosystems are important from socio-economic and ecological points of view (Costanza *et al.* 1997; Harley *et al.* 2006). These ecosystems are subjected to the direct and indirect effects of human activities, resulting in local and global pressures. In many areas, coastal ecosystems are critically endangered by severe dysfunctions, including extinction of species (Halpern *et al.* 2008; Jackson 2008). The effects of climate change

are the most recent source of strong disturbance pressures in these ecosystems worldwide (Harley *et al.* 2006).

This study is focused on the Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*, a species that is typically associated with the coralligenous assemblage, one of the richest biodiversity habitats in the Mediterranean Sea (Ballesteros 2006; Airoidi & Beck 2007). The red coral is an aposymbiotic octocorallian with a highly fragmented distribution which centers mainly around the western Mediterranean and the neighbouring Atlantic Ocean (Zibrowius *et al.* 1984). It inhabits semi-dark to dim-light rocky benthic habitats such as caves and coralligenous overhangs between 5 and 600 m in depth (Labrel & Vacelet 1961; Zibrowius *et al.* 1984; Zibrowius

Correspondence: Jean-Baptiste Ledoux/Didier Aurelle,
Fax: +33491041635; E-mail: jean-baptiste.ledoux@univmed.fr/
didier.aurelle@univmed.fr

676 J.-B. LEDOUX *ET AL.*

pers. comm.). It is a long-lived species (more than 50 years) with a short larval phase, estimated from 4 to 12 days *in aquaria* (Vighi 1972; Weinberg 1979), displaying slow population dynamics with very low growth and mortality rates (Garrabou & Harmelin 2002; Marschal *et al.* 2004; Santangelo *et al.* 2004, 2007; Torrents 2007), and showing recruitment by pulses (Garrabou & Harmelin 2002).

The red coral species has a high socio-economical value. It has been intensively harvested since antiquity for its use in jewellery. This important fishing pressure resulted in profound changes in the species range (Santangelo & Abbiati 2001) and in the size structure of the shallow populations, preventing the colonies from reaching their potential maximum size (Garrabou & Harmelin 2002). Moreover, in 1999 and 2003, the red coral was among 30 species affected by two large-scale mass mortality events (MMEs), which were linked to positive thermal anomalies that were potentially associated with the warming trend currently detected in this area (Perez *et al.* 2000; Romano *et al.* 2000; Garrabou *et al.* 2001, 2009). MMEs have differentially impacted red coral populations. In some sites, approximately 80% of the colonies were affected, while in others only 5% of colonies showed some mortality (Garrabou *et al.* 2001). The red coral was included in several international conservation conventions to protect the species and control its harvest. However, these management measures do not take into account the distribution of genetic diversity, the connectivity between populations and the new climatic threat and its impact on shallow populations (5–60 m).

Previous genetic studies investigated effective larval dispersal as well as the spatial genetic structure of red coral populations; these studies used nuclear markers because of the lack of polymorphism in mitochondrial markers (Calderón *et al.* 2006) putatively linked to the presence of the *msh1* gene (Pont-Kingdon *et al.* 1995; McFadden *et al.* 2006; Ledoux *et al.* unpublished). Based on use of allozymes, significant differentiation was observed between samples separated by 10 km (Abbiati *et al.* 1993). Del Gaudio *et al.* (2004) used AFLP profiles to distinguish four population samples separated by tens to hundreds of kilometres. These patterns of differentiation were refined by analysis of four microsatellites among eight samples derived from two locations. This analysis revealed strong genetic structuring at distances of tens of metres (Costantini *et al.* 2007a). Finally, a large-scale study of 11 samples scattered around the northwestern Mediterranean basin, using ITS-1 sequences and five microsatellites confirmed this high level of differentiation between populations. However, a clear genetic structure could not be established at long distances despite generalized differentiation between the samples (Costantini *et al.* 2007b). Moreover, the

ITS-1 signal might be affected by a lack of concerted evolution (Calderón *et al.* 2006).

The major goals of this study were to analyse the link between geographical distance and genetic structure and to gain insight into the distribution of genetic diversity. Using 10 microsatellite loci and a sampling of 40 shallow populations separated by a range from tens of metres to hundreds of kilometres and dwelling in different environments, three main objectives were addressed: (i) to thoroughly define the population structure and relationships with particular emphasis on dispersal patterns over the whole area and within each regional-cluster; (ii) to conduct the first analysis of the patterns of genetic diversity using comparative approaches; and (iii) to test for deviation from mutation-drift equilibrium impacting the genetic diversity of the studied samples. The results, discussed in light of the species' life history traits, should further our understanding of the evolutionary history of the shallow red coral populations. In particular, we show for the first time that isolation by distance (IBD) occurs at different spatial scales in this species. Moreover, we reveal contrasting patterns of genetic structure among the analysed regional-clusters. We also demonstrate a strong heterogeneity in the distribution of genetic diversity and we highlight the particular status of the Balearic cluster. These results constitute valuable data for conservation of red coral populations and could also be useful for other species with similar life-history traits belonging to the threatened Mediterranean rocky benthic community. Finally, this study is necessary for exploration of the adaptive capacity of red coral populations facing the ongoing shifts in environmental conditions (Ferrière *et al.* 2004).

Materials and methods

Sampling and DNA extraction

Corallium rubrum colonies were sampled by scuba diving at 40 sites corresponding to different habitats (overhangs, caves and interior of caves) and located at the upper limit (between 14 and 60 m in depth) of the bathymetric distribution of the species between the years 2003 and 2006. Two to 22 sites were thus sampled in four geographically distinct parts of the species range: the northwestern part of Corsica, Catalonia, the northern part of the Balearic Islands and the Liguro-Provençal region (Fig. 1; Table 1). These regions are well separated based on their insular position or due to the lack of continuous shallow rocky habitats between them (such as between Catalonia and the Liguro-Provençal region). One apical fragment measuring 2–3 cm, from around 30 colonies per site (from 21–50; mean

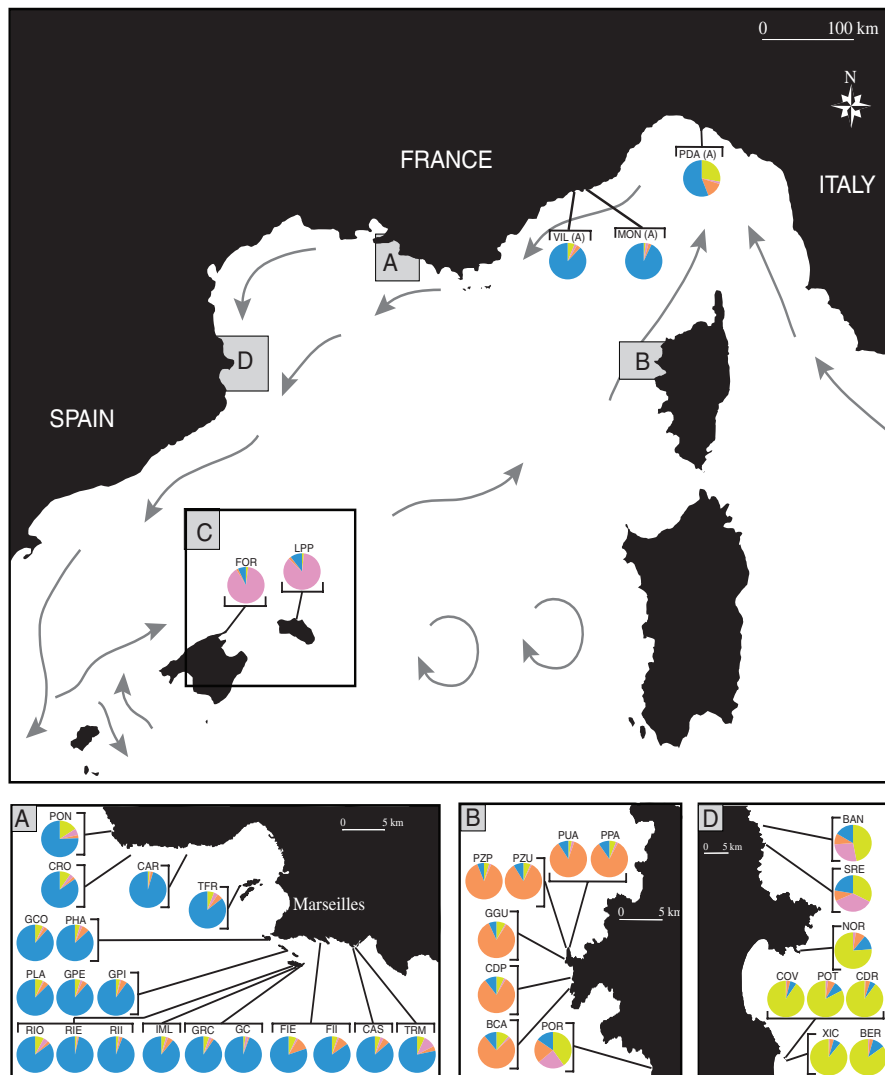


Fig. 1 Location of 40 sites distributed among the four regions (A: Liguro-Provençal, B: Corsica, C: Balearic Islands, D: Catalonia) analysed in the present study. Correspondences between sample names and locations are shown in Table 1. Grey arrows represent the predominant sea surface currents as defined in Millot (1999). Circles correspond to assignment results for each sample obtained with STRUcTURE for $K = 4$.

30.5 ± 5.2), was hand-collected randomly to cover the area of each study site. The resulting 1222 red coral fragments were preserved in 95% ethanol and stored at -80°C until DNA extraction. Total genomic DNA was extracted from 5–10 polyps using standard proteinase K/SDS digestion followed by phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) extraction (Sambrook *et al.* 2001).

Microsatellite analysis

All individuals were genotyped using 10 microsatellite loci (Table 2) from three different sources: Ecogenics GmbH, Bioprofiles LTD (Newcastle University) and

Costantini & Abbiati (2006) (see Supporting Information). PCR amplifications were realized in a final reaction volume of $10 \mu\text{L}$ containing $1 \mu\text{L}$ of DNA, $2 \mu\text{L}$ of 5X Colourless GoTaq Flexi Buffer (Promega), 0.2 mM of dNTPs, 0.25 U of GoTaq DNA Polymerase (Promega), 3 mM of MgCl_2 and $1 \mu\text{M}$ of each primer. The forward primer was fluorescently labelled. The PCR reactions were done as follows for all loci, except COR9bis and COR46bis: 95°C for 2 min followed by 25 cycles of 94°C for 30 s and annealing temperature for 30 s without elongation; the final step was 72°C for 20 min (C. Hubert Functional Genomic Bordeaux, pers. comm.). Amplifications of the two remaining loci were done

Table 1 *Corallium rubrum* samples collected for the study

Geographic region	Sample location	Label	Latitude (North)	Longitude (East)	Depth (m)	Habitat	N
Provenço-Liguria	Punta dell'Altare	PDA	44.3055°	9.21481°	35	2	29
Provenço-Liguria	Monaco	MON	43.7349°	7.43342°	35	2	21
Provenço-Liguria	Villefranche	VIL	43.6896°	7.34897°	22	1	36
Provenço-Liguria	Grotte Tremies	TRM	43.2012°	5.51339°	14	3	26
Provenço-Liguria	Castelvieil	CAS	43.1976°	5.49875°	16	2	30
Provenço-Liguria	Figuier extérieur	FIE	43.205°	5.44723°	20	2	29
Provenço-Liguria	Figuier intérieur	FII	43.205°	5.44736°	20	3	27
Provenço-Liguria	Grand Congloué	GC	43.1759°	5.40185°	40	1	30
Provenço-Liguria	Grand Congloué	GRC	43.1754°	5.40097°	52	2	29
Provenço-Liguria	Impériales du large	IML	43.1698°	5.39435°	60	2	23
Provenço-Liguria	Riou Sud	RIO	43.1728°	5.3886°	40	2	29
Provenço-Liguria	Riou Sud Extérieur	RIE	43.1728°	5.38942°	20	2	25
Provenço-Liguria	Riou Sud Intérieur	RII	43.1729°	5.38941°	20	3	33
Provenço-Liguria	Plane	PLA	43.1869°	5.39117°	38	2	29
Provenço-Liguria	Grotte à Péres entrée	GPE	43.1869°	5.39029°	20	2	50
Provenço-Liguria	Grotte à Péres intérieur	GPI	43.1868°	5.39029°	20	3	28
Provenço-Liguria	Pharillons de Maïre	PHA	43.2074°	5.3382°	39	1	32
Provenço-Liguria	Tiboulen du Frioul	TFR	43.28°	5.2876°	38	1	38
Provenço-Liguria	Grotte à corail	GCO	43.2102°	5.33273°	20	3	29
Provenço-Liguria	Carry le Rouet	CAR	43.3226°	5.162°	20	1	35
Provenço-Liguria	Carro	CRO	43.3151°	5.06052°	21	1	32
Provenço-Liguria	Ponteau / Lavera	PON	43.3643°	4.99941°	21	1	28
N-W Corsica	Grotte Palazzinu	PUA	42.3798°	8.55009°	40	2	32
N-W Corsica	Passe Palazzu	PPA	42.3799°	8.54758°	27	1	29
N-W Corsica	Palazzu (grotte à corail)	PZU	42.3802°	8.54635°	22	2	34
N-W Corsica	Palazzu	PZP	42.3802°	8.54575°	40	2	28
N-W Corsica	Garganellu	GGU	42.3726°	8.5369°	43	2	32
N-W Corsica	Cala di Ponte	CDP	42.3546°	8.55209°	26	1	30
N-W Corsica	Baja casju	BCA	42.3496°	8.55095°	30	1	28
N-W Corsica	Porto	POR	42.2725°	8.68812°	24	1	29
Catalonia	Cap de l'Abeille	BAN	42.475°	3.16192°	25	1	21
Catalonia	Sec Reuderis	SRE	42.4641°	3.16658°	23	2	27
Catalonia	Cap de Norfeu	NOR	42.2443°	3.26684°	24	1	30
Catalonia	Pota del Lop	POT	42.0497°	3.2254°	35	2	35
Catalonia	Cova de la Reina	CDR	42.0461°	3.22477°	14	1	38
Catalonia	Cova de la vaca SE	COV	42.0472°	3.22583°	18	1	39
Catalonia	Carall Bernat	BER	42.0422°	3.22816°	18	1	27
Catalonia	Meda xica tunel dofi SE	XIC	42.0436°	3.22644°	35	1	34
Balearic Islands	Cap Formentor	FOR	39.9964°	3.21188°	36	1	32
Balearic Islands	Llosa des Patro Pere	LPP	40.0726°	4.1075°	34	1	29

Habitat numbers correspond respectively to 1 = overhang; 2 = cave entrance; 3 = inside cave. N: number of colonies sampled at each site.

following Costantini & Abbiati (2006), but with a last extension step at 72 °C for 20 min.

Electrophoresis of the amplification products was conducted on an ABI3130 genetic analyser (Applied Biosystems) by multiplexing PCR products (Mic13/-Mic22/Mic24/Mic27, Mic23/Mic25/Mic26 and COR9-bis/Mic20/COR46bis) and using an internal size standard for sizing (Genescan 600 LIZ, Applied Biosystems). Three reference individuals were included in each migration. Electropherograms were analysed with Genemapper version 3.0 (Applied Biosystems).

Microsatellite characteristics

MICROCHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) was used to test for large allele dropout and scoring errors due to stutters. Frequencies of null alleles were estimated for each sample and locus by the expectation maximization algorithm (Dempster *et al.* 1977) implemented in FREENA (Chapuis & Estoup 2007). Repeatability tests based on extraction and genotyping replicates were performed to control the genotyping procedure. The results obtained suggested that PCR

Table 2 Primer sequences, PCR conditions and genetic characteristics of 10 polymorphic microsatellites in *Corallium rubrum*

Locus name	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Number of cycles	Ta (°C)	Size range (bp)	Number of alleles	Ho	Hs	f	r	Genbank accession number
Mic13	F: NED_CTTTGATTGGCCCTGATGTAA R: GCCAGGAAAAGAAATGGGTATATTA	(AC) ₂ A (AC)G (AC) ₃ TA (AC) ₇	25	59	126-141	7	0.18	0.53	0.65***	0.24	GQ169280
Mic20	F: 6-FAM_CACGTGATTGACGAAAACATTC R: TGTCCGGGAAATGTTCACTGTA	(CA) ₈	25	59	198-286	27	0.49	0.54	0.07***	0.07	GQ169281
Mic22	F: VIC_CGAGCGAGGAAAATTAATAGG R: GATGTAATTCGGCAATTG	(GT) ₁₆	25	56	153-190	18	0.3	0.64	0.49***	0.37	GQ169282
Mic23	F: VIC_GATCTCTGACTGAATGGTATTGG R: CCTGGCTACGTCCTGACT	(GT) ₁₄	25	56	93-143	23	0.35	0.71	0.47***	0.4	GQ169283
Mic24	F: NED_TCGAGCACTCCCTTGGTAGC R: TGAATTCATACACCCACTGC	(CA) ₁₈	25	59	145-312	55	0.73	0.76	0.04***	0.02	GQ169284
Mic25	F: TGAATTCATACACCCACTGC R: GATCGCACTAAATCTTAATAGTITTC	(GTTT) ₃ (GT) ₁₆	25	59	130-208	38	0.39	0.78	0.46***	0.38	GQ169285
Mic26	F: NED_AGGGAACAATCTTGTGTGC R: ATGTTTGGGACCTACACG	(GT) ₂₄	25	59	126-200	30	0.89	0.89	-0.005	0.01	GQ169286
Mic27	F: 6-FAM_GATCTCTCGGGATAGTCTG R: GACGGTGGGACGAAACAGG	(GT) ₃₀	25	59	140-536	67	0.74	0.94	0.19***	0.16	GQ169287
COR9bis	F: 6-FAM_GTTCCTTGAAGCATGTTGGATT R: CAGGAACTTCTGCCAGTACACA	(C) ₁₁ (CA) ₁₃	30	53	141-200	56	0.27	0.89	0.7***	0.4	AY726758
COR46bis	F: NED_ITGGGTACAAATCAAGTACCA R: AGACCAGCGGATCACATT	(GT) ₁₅	28	53	172-243	36	0.72	0.76	0.04***	0.04	AY726761

Ho: observed heterozygosity; He: gene diversity (Nei 1967); f: Weir & Cockerham (1984) estimator of F_{IS}; r: null allele frequency. Presented values correspond to the mean value over all samples.

680 J.-B. LEDOUX *ET AL.*

reactions and genotyping were repeatable (data not shown).

The total number of alleles, size range, observed (H_o) and unbiased heterozygosity (H_e Nei 1973) were calculated for each locus using FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2001).

Hardy–Weinberg equilibrium

GENETIX v.4.05 (Belkhir *et al.* 2004) was used to test the null hypothesis of linkage equilibrium for each pair of loci in each sample with a permutation procedure ($n = 1000$). Departure from panmixia was tested for each sample using the score test for heterozygote deficiency in GENEPOP 4.0 (Rousset 2008). Significance was addressed by a Markov Chain (MC) algorithm (Guo & Thompson 1992; Raymond & Rousset 1995), with default parameters. The f estimator of F_{IS} (Weir & Cockerham 1984) was computed for each sample using GENETIX.

Interpopulation differentiations and isolation by distance

Global and pairwise differentiations between samples were quantified using Weir and Cockerham's (1984) estimator of F_{ST} (θ) in GENETIX. Genotypic differentiation between samples was tested using an exact test based on the MC algorithm (Guo & Thompson 1992) with default parameters in GENEPOP.

Pattern of isolation by distance was analysed following Rousset's method (1997). Geographic distances were measured using GOOGLE EARTH v.5.0 (<http://earth.google.fr/>), using Euclidian distance or taking into account the minimum distances between regions along the path of the predominant surface current as defined in Millot (1999) (Fig. 1 and Table S3, Supporting Information). Slatkin's linear $F_{ST} [F_{ST}/(1 - F_{ST})]$ was regressed on the logarithm of the distance [$\ln(d)$], as recommended for a two-dimensional model of IBD (Rousset 1997) using GENEPOP. The significance of the correlation between the two distance matrices was tested using a Mantel test (1967) ($n = 2000$) in GENEPOP. IBD was also assessed independently over each of the three clusters (Liguro-Provençal, Corsican and Catalanian) for which the number of available samples was sufficient.

Hierarchical analyses of molecular variance (AMOVA) were conducted in ARLEQUIN v.3.10 (Excoffier *et al.* 2005) in order to quantify genetic variation among samples (F_{ST}), among samples within a group (F_{SC}) and among groups (F_{CT}). Significance of F-statistics was achieved using 1000 permutations. AMOVA tests were performed first using the groups defined by STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al.* 2000) for $K = 4$ (see below)

and then within each of these groups, except for the Balearic cluster because of its low number of samples.

Clustering analyses

Simulated dataset. We used computer simulations to evaluate the effect of positive and significant F_{IS} on STRUCTURE, considering genetic parameters close to those observed for *C. rubrum*. The behaviour of the model allowing for separate alpha values among clusters was also evaluated under the simulated scenarios.

The obtained results showed that the two models (admixture with correlated allele frequencies with the same alpha or with separated alphas) gave good results despite HW equilibrium not being met in all samples (see Supporting Information).

Real dataset. The underlying population structure contained in the data was analysed using the Bayesian approach implemented in STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003, 2007) that infers the number of genetic clusters K from the individual's genotypes dataset. Ten different runs of 200 000 burn-in followed by 500 000 iterations were computed for each K value, with the model allowing for admixture and correlated allele frequencies between clusters, and using the recessive allele option to deal with null alleles (Falush *et al.* 2007). Alpha, the degree of admixture between the K clusters, was evaluated separately for each cluster. Following the recommendations of Rosenberg *et al.* (2002) and Jakobsson *et al.* (2008) for cases of large datasets, we first studied the behaviour of STRUCTURE at several small values of K during a first round of analysis and then we looked for additional substructure on partitioned datasets during a second round. For the first round, the whole dataset (1222 individuals) was used. K was set to vary between 1 and 8 and only the smallest values were discussed (from $K = 2$ to $K = 4$). The clustering solution given for $K = 4$ was then used to divide the whole dataset into four partitioned datasets that were subsequently analysed in a second round of STRUCTURE with K varying between 1 and 23 (i.e. the total number of samples plus one). A K value was then selected for each partitioned dataset based on the plot of $\ln P(D)$ (the logarithm of the likelihood of observing the data) as a function of K (Waples & Gaggiotti 2006; Pritchard *et al.* 2007) and looking for the value that captured the major structure in the data (Pritchard *et al.* 2007). When only one clustering solution appeared for a selected K value, CLUMPP v.1.1 (Jakobsson & Rosenberg 2007) was used to average the assignment scores over the 10 runs. If several solutions were observed, the symmetric similarity coefficient (SSC) was used to pool runs belonging to the same mode (i.e. $SSC > 0.9$)

(Jakobsson *et al.* 2008) and the mode with the highest likelihood was selected. Finally, DISTRUCT v.1.1 (Rosenberg 2004) was used for graphical display.

Estimation and distribution of genetic diversity

Genetic diversity analyses focused on gene diversity (He), allelic richness [Ar(*g*)] and private allelic richness [Ap(*g*)]. A rarefaction method (Petit *et al.* 1998) was applied to obtain estimates of Ar(*g*) and Ap(*g*) independently of the sample size, with *g* representing the minimum number of genes observed at one locus in one of the samples (i.e. twice the number of genotypes). These computations were done for *g* equal to 22 (Mic22 for MON) or 66 (Mic22 for Catalonia), depending on whether the samples or the four regional-clusters defined by STRUCTURE were considered.

The coefficient Arst(*g*) was computed for *g* = 22 to measure the partitioning of allelic richness among samples (Petit *et al.* 1998) using ADZE (Szpiech *et al.* 2008). ADZE was also used to compute Ar(22) and Ap(22) for each sample and Ar(66) and Ap(66) for each cluster. Computations of He were done with FSTAT. Comparisons of He and Ar(66) values between each cluster were done using pair-group comparisons and the one-sided probability test implemented in FSTAT.

The occurrence of deviation from mutation-drift equilibrium linked to recent demographic events and affecting the genetic diversity within samples was tested using BOTTLENECK 1.2.02 (Piry *et al.* 1999). The expected heterozygosity under mutation-drift equilibrium (Heq) was computed for each locus considering a two-phase model (TPM) (Di Rienzo *et al.* 1994), with 95% of the stepwise mutation model (SMM) and variance among multiple steps equal to 12 (Piry *et al.* 1999). The null hypothesis of 'no significant difference between He and Heq' was then tested using the Wilcoxon's signed rank-test.

For all analyses, significance levels were corrected using a false discovery rate (FDR) correction for multiple tests (Benjamini & Hochberg 1995) when necessary.

Results

Microsatellite characteristics

According to MICROCHECKER, no evidence of scoring errors due to stuttering or large allele dropout was found in the whole data set. All loci were polymorphic in all populations. Total numbers of alleles ranged between 7 for Mic13 and 67 for Mic27, with a mean of 35 alleles per locus. Observed heterozygosity varied from 0.18 for Mic13 to 0.89 for Mic26. Unbiased hetero-

zygosity ranged from 0.53 for Mic13 to 0.94 for Mic27. Mean estimated null allele frequencies by locus varied from 0.01 for Mic26 to 0.4 for Mic23 and COR9bis, with a mean value of 0.21 per locus (Table 2). No global significant LD among loci was detected considering overall samples (all $P > 0.05$ after FDR correction).

Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium

Significant linkage disequilibrium (LD) among pairs of loci was observed in 10 samples, implying different pairs of loci and different numbers of pairs of loci (from 1 for CAR to 4 for XIC). Significant heterozygote deficiencies were observed in all samples (Table 3). Multilocus values of the F_{IS} estimator (*f*) ranged between 0.2 for XIC and PDA and 0.47 for GRC with a mean value equal to 0.31. Considering each locus separately, *f* values ranged from –0.3 for Mic20 for PDA to 1 for Mic13 for PDA, MON and TRM and for Mic25 for CDP. Departures from panmixia varied between loci and samples. Whereas COR9bis showed significant heterozygote deficiencies in all samples, the null hypothesis of panmixia was not rejected for Mic26 in any sample (Table S2). Mean estimated null allele frequency (*r*) values over all loci by sample were scattered from 0.10 for PPA to 0.35 for PON, with a mean of 0.21. Wahlund effect and/or inbreeding could partially explain the significant heterozygote deficiencies and the LD reported in 10 samples.

Population structure analysis

F_{ST} , IBD and AMOVA. Global F_{ST} was 0.097, and pairwise F_{ST} between all pairs of samples ranged from –0.001 between GPE and GPI to 0.212 between RIE and PZU. After the FDR correction, 779 among 780 pairwise comparisons appeared significant (Table S3, Supporting Information), suggesting a generalized differentiation between samples. Significant differentiations were observed even between samples belonging to the same site and depth but to different environments, and separated by less than 10 m (e.g. RIE vs. RII; FIE vs. FII but GPE vs. GPI). The non-significant comparison implied GPI and GPE that belong to the same site and depth but to different environments (interior cave vs. cave entrance).

The correlation between $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ and $\ln(d)$ was significant using Euclidian distance ($r_{\ln(d)} = 0.377$; $P < 0.001$) or taking into account major surface currents between regions ($r_{\ln(d)} = 0.382$; $P < 0.001$), confirming the occurrence of an IBD model of gene flow (Fig. 2A). At the cluster scale, correlations were also significant for the Liguro-Provençal ($r_{\ln(d)} = 0.530$; $P < 0.05$) and the Catalanian clusters ($r_{\ln(d)} = 0.864$; $P < 0.01$) but not

Table 3 Measures of genetic diversity for 40 shallow samples of *Corallium rubrum* based on 10 microsatellites loci

	Ho	He	f	Ar(22)	Ap(22)	Pw10
PDA	0.54 (0.29)	0.68 (0.23)	0.2	6.47 (3.56)	0.19 (0.35)	0.1
MON	0.46 (0.3)	0.62 (0.25)	0.26	5.7 (3.62)	0.04 (0.13)	0.14
VIL	0.5 (0.29)	0.73 (0.16)	0.31	6.61 (3.03)	0.27 (0.42)	0.01
TRM	0.47 (0.34)	0.73 (0.16)	0.37	7.05 (3.78)	0.05 (0.1)	0.01
CAS	0.55 (0.26)	0.76 (0.16)	0.28	8.07 (3.35)	0.04 (0.08)	0.02
FIE	0.48 (0.24)	0.75 (0.13)	0.36	7.17 (2.88)	0.16 (0.41)	0.14
FII	0.43 (0.22)	0.72 (0.16)	0.41	6.98 (2.72)	0.12 (0.2)	0
GC	0.49 (0.28)	0.71 (0.18)	0.31	6.91 (3.33)	0.03 (0.05)	0.01
GRC	0.4 (0.29)	0.75 (0.19)	0.47	7.79 (3.53)	0.05 (0.09)	0.01
IML	0.48 (0.32)	0.77 (0.19)	0.38	8.31 (3.97)	0.13 (0.31)	0.31
RIO	0.5 (0.35)	0.83 (0.13)	0.41	9.16 (4.08)	0.17 (0.3)	0.25
RIE	0.53 (0.37)	0.67 (0.23)	0.21	6.13 (3.06)	0 (0)	0.02
RII	0.52 (0.29)	0.79 (0.13)	0.35	7.48 (3.54)	0.13 (0.28)	0.35
PLA	0.47 (0.3)	0.75 (0.13)	0.37	6.83 (3.03)	0.04 (0.09)	0.12
GPE	0.47 (0.32)	0.75 (0.18)	0.37	7.6 (3.22)	0.12 (0.3)	0
GPI	0.49 (0.26)	0.75 (0.17)	0.35	7.23 (3)	0.02 (0.03)	0.05
PHA	0.46 (0.33)	0.67 (0.27)	0.32	6.85 (4)	0.19 (0.31)	0.01
TFR	0.49 (0.33)	0.72 (0.19)	0.33	7.12 (4.1)	0.11 (0.18)	0.19
GCO	0.46 (0.34)	0.73 (0.14)	0.38	6.81 (3.51)	0.06 (0.13)	0.01
CAR	0.48 (0.34)	0.66 (0.19)	0.27	5.15 (2.76)	0.15 (0.3)	0.1
CRO	0.52 (0.32)	0.77 (0.16)	0.33	7.96 (3.68)	0.11 (0.24)	0.02
PON	0.43 (0.3)	0.76 (0.16)	0.44	7.78 (3.38)	0.04 (0.06)	0.1
PUA	0.57 (0.27)	0.75 (0.17)	0.25	7.86 (3.71)	0.24 (0.32)	0.01
PPA	0.55 (0.31)	0.72 (0.23)	0.23	7.23 (3.69)	0.16 (0.26)	0.1
PZU	0.46 (0.22)	0.7 (0.18)	0.34	6.2 (3.42)	0 (0.01)	0.19
PZP	0.57 (0.25)	0.72 (0.21)	0.21	6.85 (3.73)	0.09 (0.18)	0.25
GGU	0.52 (0.26)	0.74 (0.18)	0.3	6.7 (3.29)	0.11 (0.17)	0.25
CDP	0.46 (0.29)	0.72 (0.13)	0.37	6.24 (3.03)	0.03 (0.06)	0.14
BCA	0.6 (0.3)	0.8 (0.13)	0.25	8.34 (3.46)	0.12 (0.14)	0.12
POR	0.44 (0.25)	0.68 (0.21)	0.37	6.37 (3.17)	0.26 (0.37)	0.19
BAN	0.58 (0.28)	0.8 (0.1)	0.29	7.53 (3.23)	0.02 (0.05)	0.61
SRE	0.42 (0.28)	0.72 (0.2)	0.42	6.94 (2.58)	0.03 (0.06)	0.12
NOR	0.57 (0.34)	0.76 (0.17)	0.26	7.38 (3.61)	0.03 (0.06)	0.19
POT	0.54 (0.18)	0.76 (0.16)	0.3	8.14 (3.49)	0.06 (0.1)	0.01
CDR	0.5 (0.25)	0.68 (0.21)	0.28	6.98 (3.46)	0.04 (0.07)	0.01
COV	0.55 (0.26)	0.75 (0.16)	0.27	8.07 (3.67)	0.09 (0.13)	0.01
BER	0.56 (0.23)	0.76 (0.14)	0.27	7.94 (3.51)	0.05 (0.14)	0.05
XIC	0.56 (0.24)	0.74 (0.17)	0.2	7.66 (3.25)	0.1 (0.16)	0.01
FOR	0.62 (0.33)	0.78 (0.19)	0.22	9.48 (5.43)	1 (1.94)	0.08
LPP	0.57 (0.26)	0.82 (0.12)	0.31	9.08 (3.61)	0.55 (0.49)	0.053
Mean Value	0.51 (0.05)	0.74 (0.04)	0.32	7.3 (0.91)	0.13 (0.17)	

Ho: observed heterozygosity; He: gene diversity (Nei 1967); f: Weir & Cockerham (1984) estimator of F_{IS} ; Ar(22) and Ap(22): allelic and private allelic richness, respectively, with rarefaction for a corresponding sample size of 22; Pw10: P values of the Wilcoxon test for differentiation between He and Heq as implemented in BOTTLENECK using the 10 loci. Standard deviations are in brackets. Values in bold are significant at the 0.05 level after FDR correction.

for the Corsican cluster ($r_{Ln(d)} = 0.168$; $P = 0.39$) (Fig. 2B).

The AMOVA showed that differentiation among the four clusters and among samples within these clusters was highly significant. However, the percentage of total variation explained by grouping into clusters was around three times lower than the variation explained by the differences among samples within clusters (2.7% vs. 6.7%, respectively). Within a cluster, 7.9%, 7.8%

and 4.2% of the total variation was observed among samples whereas the variation within samples represented 92.1%, 92.2% and 95.8% for the Corsican, Liguro-Provençal and Catalanian clusters, respectively. In every case, the corresponding F -statistics were significant ($P < 0.001$) (Table 4).

Clustering with STRUCTURE. During the first round of STRUCTURE, each new cluster appeared along plausible

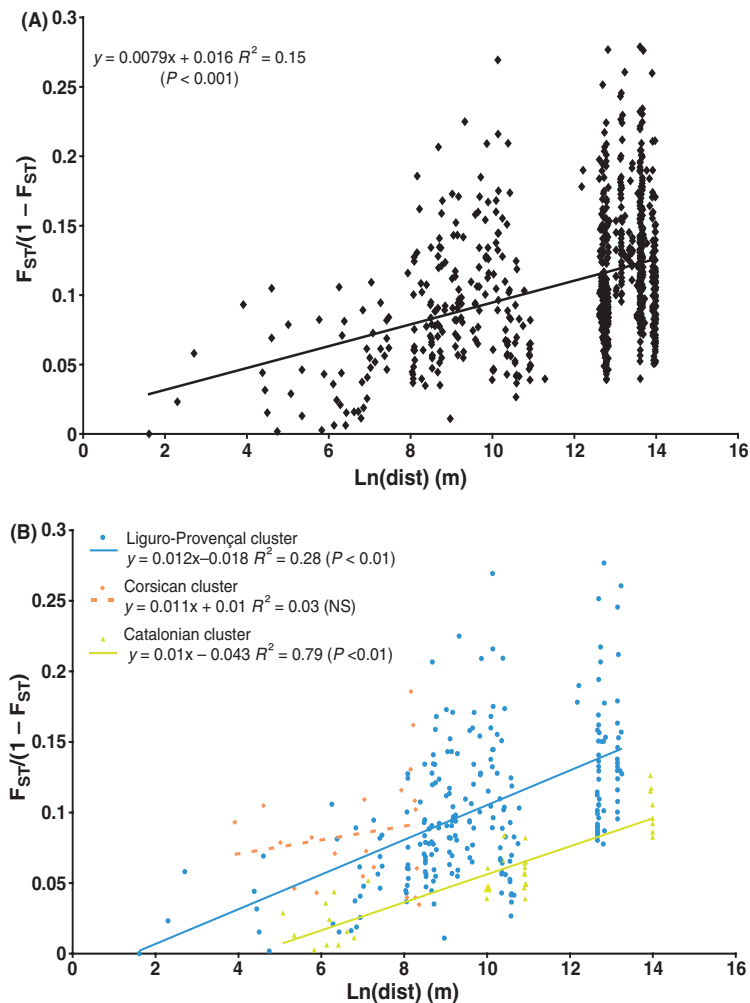


Fig. 2 Isolation by distance pattern (A) in the surveyed area, taking into account the minimum distances between regions along the path of the predominant surface current and (B) within each cluster. The two graphs show the linear regression of the genetic distance measured as $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ over logarithms of the geographic distance (m). Solid and dashed lines represent significant and non-significant regressions, respectively.

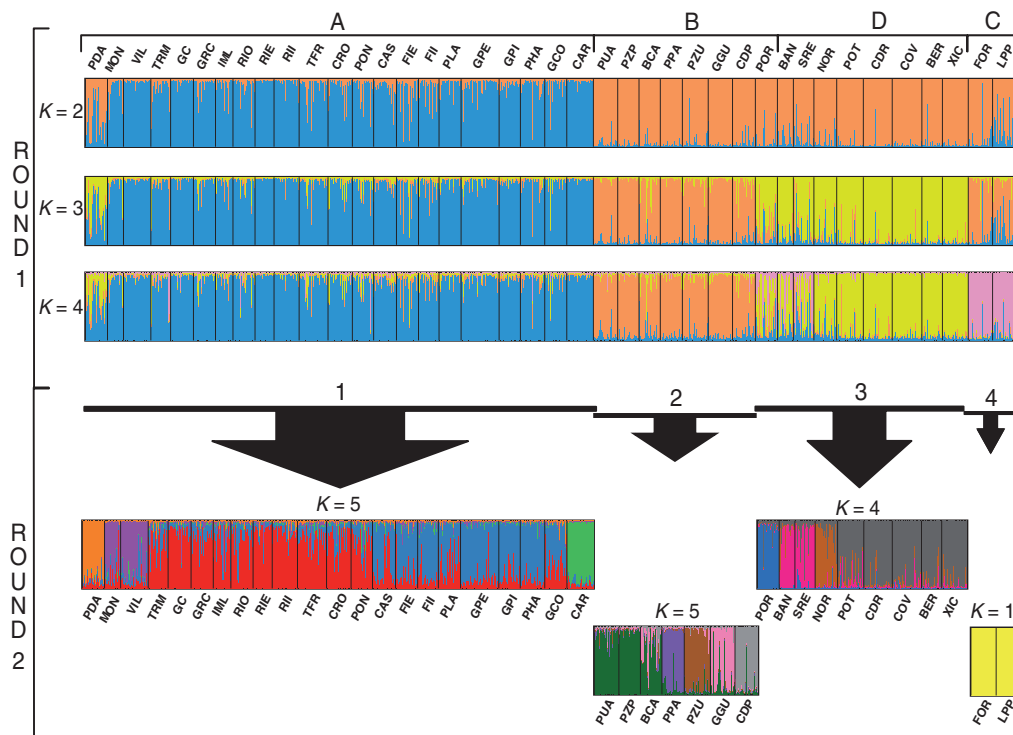
geographical boundaries for K ranging from 2 to 4 (Fig. 3). For $K = 2$, a clear distinction was made between the 21 Liguro-Provençal samples (except PDA) and the remaining samples. For $K = 3$, the N-W Corsica/Balearic samples were separated from the Catalonian ones. POR and PDA samples, which belonged to Corsican and Liguro-Provençal regions, respectively, were assigned in the cluster with Catalonian samples. For $K = 4$, two different clustering solutions were observed. Based on likelihood criteria, the retained mode separated samples into four clusters that respected the four geographical regions, with the exception of POR (Corsica), which was pooled with the Catalonian samples. Samples with a mixed assignment among the four clusters (POR, PDA, BAN and SRE) were assigned to the cluster with the highest

mean assignment scores. Each of these four clusters was then submitted to a second round of STRUCTURE (Fig. 3). For the Liguro-Provençal cluster, $K = 5$ gave the solution that captured most of the structure in the data. Following geographical distribution, CAR, PDA and MON/VIL represented three clusters. The two remaining clusters were centred on RIE and PHA and grouped quite distant samples such as TRM and TFR. For the Corsican cluster, $K = 5$ was selected. PUA, PZP and BCA belonged to one cluster and each of the remaining samples represented their own group. For the Catalonian cluster, the retained solution was $K = 4$. POR represented one cluster. BAN and SRE were grouped together. NOR was isolated in its own cluster and POT, CDR, COV, XIC and BER belonged to the fourth one. This clustering

684 J.-B. LEDOUX ET AL.

Table 4 Results of the analysis of molecular variance (AMOVA): (a) on the whole dataset partitioning genetic variance among *Corallium rubrum* colonies, among samples within cluster and among clusters; (b) within each identified cluster partitioning genetic variance among colonies and among samples

Source of variation	Grouping based on Structure results for K = 4			Liguro-Provençal cluster			Corsican cluster			Catalonian cluster		
	DDL	% of variance	P	DDL	% of variance	P	DDL	% of variance	P	DDL	% of variance	P
	Among clusters	3	2.7	<0.001								
Among samples within cluster	36	6.7	<0.001	21	7.8	<0.001	6	7.9	<0.001	8	4.2	<0.001
Among individuals within samples	2404	90.6	<0.001	1314	92.2		419	92.1		551	95.8	

**Fig. 3** Population structure as inferred by two rounds of hierarchical STRUCTURE analysis. Each individual is represented by a vertical line partitioned into K -coloured segments that represent the individual's membership fraction in K clusters. Each sample is delineated by black vertical lines and named as in Table 1. Letters correspond to the four sampled regions (A: Liguro-Provençal, B: NW Corsica, C: Balearic Islands, D: Catalonia). Numbers above the black arrows correspond to the four genetic clusters defined after the first round of STRUCTURE (1: Liguro-Provençal cluster, 2: Corsican cluster, 3: Catalonian cluster, 4: Balearic cluster).

followed the geographical partitioning of the samples. Finally, for the Balearic cluster, STRUCTURE failed to detect any structure. In every identified cluster, the mean value of alpha (admixture parameters) was relatively constant (variation of < 0.2), confirming the existence of a real structure. This value was always inferior to 1 (mean \pm SD = 0.08 ± 0.05 over the two rounds), implying that

levels of admixture between identified clusters are very small.

Genetic diversity analysis

There were on average 7.4 alleles per polymorphic locus and per sample, considering 22 gene copies

[Ars(22)]. At the global level, the mean Art(22) was equal to 10.2 alleles per locus, resulting in a high Arst(22) equal to 0.3. This value was larger than the global F_{ST} value (0.097). Using the rarefaction method, 47.4 alleles (16.8%) were observed in all clusters. The Balearic cluster showed the most important private allelic richness [Ap(66)], with 41.5 alleles (14.7%) private to this cluster, followed by the Liguro-Provençal cluster with 22.2 (7.9%) and the Catalanian and Corsican clusters with 21.2 (7.5%) and 17.7 (6.3%), respectively. Values of Ar(66) were equal to 7.1, 7.1, 7.5 and 9.3, whereas He values were equal to 0.74, 0.74, 0.75 and 0.81 for the Liguro-Provençal, the Corsican, the Catalanian and the Balearic cluster, respectively. Only the pairwise comparisons involving the Balearic cluster were significant, indicating a higher level of genetic diversity for this cluster.

At the sample level, gene diversity ranged from 0.62 for MON to 0.83 for RIO. Ar(22) and Ap(22) values were scattered from 5.15 for CAR to 9.48 for FOR (Table 3) and from 0 for RIE and PZU to 1 for FOR. Ar(22) was highly correlated with gene diversity (R -spearman: 0.86; dof: 38; $P < 0.05$; $R^2 = 0.74$) but not with Ap(22) (R -spearman: 0.23; dof: 38; $P = 0.1426$; $R^2 = 0.05$).

Based on the Wilcoxon signed rank-test, recent changes in the effective population size were detected. Sixteen samples (Table 3) showed significant heterozygote deficiency compared to the mutation-drift equilibrium, revealing a putative population expansion (see Discussion).

Discussion

Distribution of genetic diversity from global to sample scale with a focus on the Balearic region

Genetic diversity was evaluated for the first time at three different levels: global, regional (corresponding to the four clusters defined with STRUCTURE) and sample levels. As a whole, the levels of gene diversity were high and they were globally higher than those reported previously for the same species (Costantini *et al.* 2007b) (mean He by samples over loci: 0.77 vs. 0.50 and mean He by samples: 0.89 vs. 0.78). This discrepancy is probably due to differences in the number and identity of loci, since the two loci used in both studies show similar diversity levels. However, the present values still fall within the range of those previously reported for octocorallian species [e.g. *Corallium lauuense*, He from 0.86–0.96 (Baco & Shank 2005)] or other cnidarian species [e.g. *Acropora palmata*, He from 0.58–0.85 (Baums *et al.* 2005)].

This high genetic diversity is not homogeneously shared, since only 16.8% of alleles were found in the

four clusters. This result was refined based on the large difference observed between global Arst(g) and F_{ST} values, highlighting the fact that rare alleles tend to be clustered only in some samples (Comps *et al.* 2001). At the regional level, the particular status of the Balearic region previously suggested (Costantini *et al.*, 2007b) was statistically confirmed with He and Ar(66) being significantly higher for this area. Moreover, Ap(66) was found to be two times higher for this cluster when compared to the other clusters. Based on these parameters, the three remaining regions (NW Corsica, Liguro-Provençal and Catalonia) were not found to be significantly different from each other. Interestingly, Rozenfeld *et al.* (2008) recently emphasized the importance of the Balearic populations of *Posidonia oceanica* as genetic suppliers for the surrounding populations. Two non-exclusive hypotheses can be formulated to explain the high genetic diversity observed for the Balearic populations of *P. oceanica* and *C. rubrum*, despite their divergent life history traits. The first hypothesis is based on contemporary oceanographic observations, by which the Balearic region is defined as a transition region between the Liguro-Provençal and the Algerian basin, each characterized by two contrasting dynamic regimes that induce highly variable hydrological conditions (García *et al.* 1994). These conditions could have led to the frequent mixing of different gene pools from the south and the north of the islands, contributing to the high level of observed genetic diversity (Rozenfeld *et al.* 2008). The second hypothesis is based on the observation that colonization processes are usually followed by an important decrease in genetic variability away from refugia (Hewitt 2000). Despite the absence of data concerning the past distribution of *C. rubrum* populations, we may hypothesize that the significantly higher genetic diversity observed for the Balearic cluster could result from the geographic proximity between the Balearic Islands and some putative glacial refugia, when compared to other regions under study.

Heterogeneity in patterns of diversity is also reported at the sample level. This heterogeneity is not linked to depth or to the habitats of the samples, suggesting that these factors do not influence the levels of genetic diversity (data not shown). Although the allelic and private allelic richness are not correlated, the highest values were observed for two samples coming from the Balearic region. The independence between these two parameters underscores their complementarities and the necessity to estimate both of them. Moreover, focusing more precisely on these two parameters is essential to ensure that the widest range of existing alleles is available for future evolution (Bonin *et al.* 2007; also see below). Finally, the bottleneck analysis detected signs of population expansion (i.e. a population recovering from

a past bottleneck) for 16 samples. However, the Wahlund effect could mimic population expansion (Cornuet & Luikart 1996; Dupont *et al.* 2009). This confounding effect could therefore partially explain the observed results, since five of these 16 samples (XIC, RIE, GCO, PUA and CRO) showed significant LD putatively linked to the Wahlund effect (Slatkin 2008). The absence of significant signal of population reduction also needs to be treated with caution. Indeed, inertia in the loss of genetic diversity inducing inaccurate inference on recent demographic events has been observed in the case of long-lived species (Kuo & Janzen 2004; Lippé *et al.* 2006) or when IBD structure occurred (Leblois *et al.* 2006).

Population relationships

The influence of geographical proximity on genetic relationships was demonstrated by the IBD observed over the surveyed area. This result refutes the hypothesis of an island model of dispersal previously proposed (Constantini *et al.* 2007b) and suggests the occurrence of migration-drift equilibrium among neighbouring populations (Hutchison & Templeton 1999). However, despite this clinal genetic variation that could be problematic for STRUCTURE (Guillot & Santos 2009; also see Rosenberg *et al.* 2005; Chen *et al.* 2007), genetic discontinuities were revealed, putatively explaining the relatively low R^2 value (0.15) of the regression model. Indeed, the first round of clustering revealed a structure pattern that followed the geographical partitioning of the samples and potentially also the distribution of suitable habitats (e.g. bathymetric barrier between Corsican and Balearic clusters or absence of rocky habitats between Catalanian and Liguro-Provençal clusters). The AMOVA results confirmed that the differentiation among-clusters was significant, but it was low compared to the differentiation among-samples within clusters. Two non-exclusive hypotheses could be proposed to explain this result. Microsatellites are susceptible to size homoplasy (SH) that could have consequences on inferred relationships among populations (Viard *et al.* 1998). Effective population size, mutation rates and models and divergence time between-populations, all affect SH, but most of these parameters are unknown. However, the impact of SH on assignment methods is negligible when the markers used show a high level of heterozygosity (Estoup *et al.* 2002), as observed with our dataset.

The weak regional genetic structure may also be explained by a putative inter-regional gene flow preventing divergence by genetic drift. However, this is unlikely considering the IBD revealed over the surveyed area. Alternatively, this structure could be due to the retention of an ancestral polymorphism that could be enhanced by longevity (Lippé *et al.* 2006). A shared

ancestral polymorphism implies a recent split between regional-clusters and/or large effective population sizes. High heterozygosity values and large amounts of null alleles could be interpreted as cues for a large effective population size (Chapuis & Estoup 2007; Hellberg 2007), but analyses of temporal samples are needed to confirm this parameter. Regarding the recent divergence hypothesis, the sea level was around 120 m lower than it is today during the last glacial maximum (LGM, 21 000 BP) (Lambeck & Bard 2000). The recolonization of new habitats was mostly done gradually because of the observed IBD. *C. rubrum* is estimated to reach sexual maturity at approximately 10 years of age (Torrents *et al.* 2005). However, at least 20 years are needed to reach high reproductive potential (Garrabou & Harmelin 2002; Santangelo *et al.* 2003). These parameters therefore imply that the recolonization occurred within a maximum of 2000 generations, highlighting the relatively recent origin of these shallow populations, and potentially explaining the low genetic divergence observed between regional-clusters.

The within cluster analysis emphasized the different structure patterns among the three studied regions. The subdivision of samples was indeed stronger for the Corsican than for the Liguro-Provençal and the Catalanian clusters, with, respectively, 7.9%, 7.8% and 4.2% of the total genetic variation observed among samples. This is in agreement with the stronger mean assignment of individuals for the Corsican and the Liguro-Provençal clusters than for the Catalanian cluster during the first round of clustering analysis (data not shown). Based on the IBD results, these differences between the three clusters could be explained in terms of their concordance with the regional drift-gene flow equilibrium (Hutchison & Templeton 1999). The absence of significant IBD in the Corsican cluster ($r = 0.168$; $P = 0.39$) and the wide range of the scatterplot observed for the regression model suggest a stronger impact of genetic drift in this cluster compared to the other ones, where IBD is observed putatively due to regional drift-gene flow equilibrium. As previously shown, despite these clinal variations, STRUCTURE results suggest a putative barrier to gene flow between the north and the south of the Cap de Creus in the Catalanian region. Regarding the Liguro-Provençal cluster, the eastern (PDA, MON/VIL) and CAR samples were isolated from the remaining ones, indicating putative barriers to gene flow.

Evolutionary hypothesis and consequences for conservation and management plans

The results presented above allow us to suggest an evolutionary scenario to explain the observed pattern of

nuclear genetic diversity. Due to restricted dispersal abilities and IBD, we argue that recolonization from LGM refugia probably occurred mainly following a gradual process. Regarding the generation time of the species, this process is likely to have been recent, potentially inducing the retention of ancestral polymorphism and the weak regional structure observed. At the same time, the differential reproductive success (Costantini *et al.* 2007a), combined with the localized dispersal, could induce small-scale genetic structure coupled with high heterogeneity in the distribution of nuclear genetic diversity. Small-scale studies with known spatial locations of individuals, designed to help define breeding units (e.g. Underwood *et al.* 2007) and specific samplings of cohorts to evaluate the effective size of red coral populations (e.g. Calderón *et al.* 2009) are needed to test these different hypotheses. Analyses of populations from the Algerian basin and from deep habitats, such as below sea level during the LGM, should also help to refine this evolutionary history.

The results of the present study provide information that could significantly enhance the management of shallow populations of *C. rubrum*. Because of their slow dynamics, the recovery of red coral populations from environmental disturbances should be measured in decades (Garrabou *et al.* 2001). As a complement, the strong genetic differentiation between nearby samples implies that this recovery should be mainly due to self-recruitment. The genetic diversity results obtained at different spatial scales correspond to a baseline for monitoring genetic consequences of actual global changes (Schwartz *et al.* 2007) on shallow populations of *C. rubrum*. They also represent a new step in the conservation of the red coral, since they allow the targeting of particular samples that need to be protected as putative genetic pool. In fact, despite the controversy about the role of genetic factors in species extinction (e.g. Lande 1988), genetic diversity is one of the three levels of biodiversity that need attention in regards to conservation (McNeely *et al.* 1990). Genetic diversity is indeed required for populations to evolve in response to environmental changes (Frankham 2005). Conservation of the putative adaptive diversity and evolutionary potential require preservation of the natural network of genetic connections existing between populations (Crandall *et al.* 2000). The combined action of climate changes and harvesting could induce selective genetic changes (Allendorf *et al.* 2008) and the extinction of local populations in the near future (Garrabou *et al.* 2009), resulting in the loss of genetic diversity and the isolation of populations by disrupting the IBD pattern. Protection and management plans for shallow red coral populations should therefore concomitantly address measures at local and global scales.

The first step should be the development of a marine reserve network based on the restricted dispersal abilities of the species (Palumbi 2004) and focused on areas with high density of populations or high genetic diversity, such as, west of the Liguro-Provençal region, including RIO IML and CAS or Balearic Islands, including LPP and FOR. Restoration programmes could also be planned to help the recovery of local populations (Baums 2008; Linares *et al.* 2008). Bearing in mind the restricted dispersal ability of red coral, these restoration programs must consider putatively strong local adaptation (Lenormand 2002) to environmental parameters, such as depth or temperature (Hughes *et al.* 2003; Torrents *et al.* 2008). Resistance to increasing temperatures could be taken into account to choose source populations for restoration projects. Finally, scenarios available for the Mediterranean basin for the 21st century predict a dramatic increase in the frequency of heat waves (Dif-ferbaugh *et al.* 2007; IPCC 2007), which will particularly affect shallow populations of *Corallium rubrum*. Considering the ongoing warming, global conservation actions must be focused on the reduction of harvesting pressure. The necessity to promote large areas of harvesting exclusion on shallow habitats (0–60 m) must therefore be seriously considered through international concerted actions.

Acknowledgements

We are grateful to J. M. Dominici (Réserve Naturelle de Scandola, Parc Régional de Corse), R. Graille, B. de Ligondes, C. Marschal, O. Torrents, and F. Zuberer (Centre d'Océanologie de Marseille) for the assistance during sampling. We are also grateful to J. Coll, C. Linares, N. Teixido and D. Diaz for providing samples from the Medes and the Balearic Islands. We thank C. Hubert, A. Chenuil and C. Rocher for helpful discussion concerning applications and analyses of microsatellite loci. The comments made by Stephen R. Palumbi, Cécile Fauvelot and three anonymous reviewers greatly improved the original manuscript. This study was funded by the 'Provence-Alpes-Côte d'Azur' region (J-B Ledoux Doctoral Fellowship) and by the IFB Foundation (Institut Français de la Biodiversité), the environmental department of TOTAL-FINA-ELF group, an 'Action Concertée Initiative' (ACI) program 'Jeunes chercheurs 2003' (number JC5360) from the French Research Ministry and the MEDCHANGE project funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR). It is also a contribution to the responsive mode project GBIRM (European Network of Excellence MARBEF).

References

- Abbiati M, Santangelo G, Novelli S (1993) Genetic variation within and between two Tyrrhenian populations of the Mediterranean alcyonarian *Corallium rubrum*. *Marine Ecological Progress Series*, **95**, 245–250.

- Airoldi L, Beck M (2007) Loss, status and trends for coastal marine habitats of Europe. *Oceanography and Marine Biology: an annual review*, **45**, 345–405.
- Allendorf FW, England PR, Luikart G, Ritchie PA, Ryman N (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**, 327–337.
- Baco AR, Shank TM (2005) Population Genetic Structure of the Hawaiian Precious Coral *Corallium Lauense* (Octocorallia: Coralliidae) Using Microsatellites. In: *Cold-Water Corals and Ecosystems* (eds Freiwald A, Roberts JM), pp. 663–678. Springer-Verlag, Berlin.
- Ballesteros E (2006) Mediterranean coralligenous assemblages: a synthesis of present knowledge. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **44**, 123–195.
- Baums IB (2008) A restoration genetics guide for coral reef conservation. *Molecular Ecology*, **17**, 2796–2811.
- Baums IB, Miller MW, Hellberg ME (2005) Regionally isolated populations of an imperiled Caribbean coral, *Acropora palmata*. *Molecular Ecology*, **14**, 1377–1390.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate – a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*, **57**, 289–300.
- Bonin A, Nicole F, Pompanon F, Miaud C, Taberlet P (2007) Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. *Conservation Biology*, **21**, 697–708.
- Calderón I, Garrabou J, Aurelle D (2006) Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **336**, 184–197.
- Calderón I, Palacin C, Turon X (2009) Microsatellite markers reveal shallow genetic differentiation between cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in northwest Mediterranean. *Molecular Ecology*, **18**, 3036–3049.
- Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology Evolution*, **24**, 621–631.
- Chen C, Durand E, Forbes F, Francois O (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 747–756.
- Comps B, Gomory D, Letouzey J, Thiebaut B, Petit RJ (2001) Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics*, **157**, 389–397.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001–2014.
- Costantini F, Abbiati M (2006) Development of microsatellite markers for the Mediterranean gorgonian coral *Corallium rubrum*. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 521–523.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007a) Fine-scale genetic structuring in *Corallium rubrum*: evidence of inbreeding and limited effective larval dispersal. *Marine Ecology Progress Series*, **340**, 110–119.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007b) Genetic structuring of the temperate gorgonian coral (*Corallium rubrum*) across the western Mediterranean Sea revealed by microsatellites and nuclear sequences. *Molecular Ecology*, **16**, 5168–5182.
- Costanza R, d'Arge R, Groot Rd, et al. (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, **387**, 253–260.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 290–295.
- Del Gaudio D, Fortunato G, Borriello M, et al. (2004) Genetic typing of *Corallium rubrum*. *Marine Biotechnology*, **6**, 511–515.
- Dempster A, Laird N, Rubin D (1977) Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*, **39**, 1–38.
- Di Rienzo A, Peterson A, Garca J, et al. (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 3166–3170.
- Diffenbaugh N, Pal J, Giorgi F, Gao X (2007) Heat stress intensification in the Mediterranean climate change hotspot. *Geophysical Research Letters*, **34**, 1–6.
- Dupont L, Viard F, Dowell MJ, Wood C, Bishop JDD (2009) Fine- and regional-scale genetic structure of the exotic ascidian *Styela clava* (Tunicata) in southwest England, 50 years after its introduction. *Molecular Ecology*, **18**, 442–453.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, **11**, 1591–1604.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567–1587.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 574–578.
- Ferrière R, Dieckmann U, Couvet D (2004) *Evolutionary Conservation Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation*, **126**, 131–140.
- García MJL, Millot C, Font J, García-Ladona E (1994) Surface circulation variability in the Balearic Basin. *Journal of Geophysical Research Ocean*, **99**, 3285–3296.
- Garrabou J, Coma R, Bensoussan N, et al. (2009) Mass mortality in NW Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Global Change Biology*, **15**, 1090–1103.
- Garrabou J, Harmelin JG (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. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 966–978.
- Garrabou J, Perez T, Sartoretto S, Harmelin JG (2001) Mass mortality event in red coral *Corallium rubrum* populations in the Provence region (France, NW Mediterranean). *Marine Ecological Progress Series*, **217**, 263–272.

- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Guillot G, Santos F (2009) A computer program to simulate multilocus genotype data with spatially autocorrelated allele frequencies. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1112–1120.
- Guo S, Thompson E (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361–372.
- Halpern BS, Walbridge S, Selkoe KA, *et al.* (2008) A global map of human impact on marine ecosystems. *Science*, **319**, 948–952.
- Harley CDG, Hughes AR, Hultgren KM, *et al.* (2006) The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, **9**, 228–241.
- Hellberg ME (2007) Footprints on water: the genetic wake of dispersal among reefs. *Coral Reefs*, **26**, 463–473.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hughes TP, Baird AH, Bellwood DR, *et al.* (2003) Climate change, human impacts and the resilience of coral reefs. *Science*, **301**, 929–933.
- Hutchison DW, Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, **53**, 1898–1914.
- IPCC (2007) Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the Fourth Assessment Report of the intergovernmental panel on climate change (eds Solomon SD, Qin M, Manning Z, *et al.*), 996 pp. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.
- Jackson JBC (2008) Ecological extinction and evolution in the brave new ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 11458–11465.
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, **23**, 1801–1806.
- Jakobsson M, Scholz SW, Scheet P, *et al.* (2008) Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature*, **451**, 998–1002.
- Kuo C, Janzen F (2004) Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics*, **5**, 425–437.
- Labrel J, Vacelet J (1961) Répartition bionomique du *Corallium rubrum* LMCK dans les grottes et falaises sous-marines. *Rapports et Procès-Verbaux des Réunions de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, **16**, 464–469.
- Lambeck K, Bard E (2000) Sea-level change along the French Mediterranean coast for the past 30 000 years. *Earth and Planetary Science Letters*, **175**, 203–222.
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science*, **241**, 1455–1460.
- Leblois R, Estoup A, Streiff R (2006) Genetics of recent habitat contraction and reduction in population size: does isolation by distance matter? *Molecular Ecology*, **15**, 3601–3615.
- Lenormand T (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 183–189.
- Linares C, Coma R, Zabala M (2008) Restoration of threatened red gorgonian populations: an experimental and modelling approach. *Biological Conservation*, **141**, 427–437.
- Lippé C, Dumont P, Bernatchez L (2006) High genetic diversity and no inbreeding in the endangered copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time. *Molecular Ecology*, **15**, 1769–1780.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, **27**, 209–220.
- Marschal C, Garrabou J, Harmelin JG, Pichon M (2004) A new method for measuring growth and age in the precious red coral *Corallium rubrum* (L.). *Coral Reefs*, **23**, 423–432.
- McFadden CS, France SC, Sánchez JA, Alderslade P (2006) A molecular phylogenetic analysis of the Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on mitochondrial protein-coding sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 513–527.
- McNeely J, Miller K, Reid W, Mittermeier R, Werner T (1990) Strategies for conserving biodiversity. *Environment*, **32**, 16–20.
- Millot C (1999) Circulation in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems*, **20**, 423–442.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, **70**, 3321–3323.
- Palumbi SR (2004) Marine reserves and ocean neighborhoods: the spatial scale of marine populations and their management. *Annual Review of Environmental Resources*, **29**, 31–68.
- Perez T, Garrabou J, Sartoretto S, *et al.* (2000) Mortalité massive d'invertébrés marins: un événement sans précédent en Méditerranée nord-occidentale – mass mortality of marine invertebrates on the Provence littoral (France): an unprecedented event in the NW Mediterranean. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Série III*, **323**, 853–865.
- Petit RJ, Mousadik AE, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, **12**, 844–855.
- Piry S, Luikart G, Cornuet J-M (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502–503.
- Pont-Kingdon GA, Okada NA, Macfarlane JL, *et al.* (1995) A coral mitochondrial mutS gene. *Nature*, **375**, 109–111.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Pritchard JK, Wen X, Falush D (2007) *Documentation for the STRUCTURE software, Version 2*. Chicago. Available at <http://pritch.bds.uchicago.edu>.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (ver. 1.2): a population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Romano J-C, Bensoussan N, Younes WAN, Arlhac D (2000) Anomalie thermique dans les eaux du golfe de Marseille durant l'été 1999. Une explication partielle de la mortalité d'invertébrés fixés ? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série III*, **323**, 415–427.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 137–138.

- Rosenberg NA, Mahajan S, Ramachandran S, et al. (2005) Clines, clusters, and the effect of study design on the inference of human population structure. *Plos Genetics*, **1**, 660–671.
- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, et al. (2002) Genetic structure of human populations. *Science*, **298**, 2381–2385.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219–1228.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103–106.
- Rozenfeld AF, Arnaud-Haond S, Hernández-García E, et al. (2008) Network analysis identifies weak and strong links in a metapopulation system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 18824–18829.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santangelo G, Abbiati M (2001) Red coral: conservation and management of an over-exploited Mediterranean species. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **11**, 253–259.
- Santangelo G, Bramanti L, Iannelli M (2007) Population dynamics and conservation biology of the over-exploited Mediterranean red coral. *Journal of Theoretical Biology*, **244**, 416–423.
- Santangelo G, Carletti E, Maggi E, Bramanti L (2003) Reproduction and population sexual structure of the overexploited Mediterranean red coral *Corallium rubrum*. *Marine Ecological Progress Series*, **248**, 99–108.
- Santangelo G, Maggi E, Bramanti L, Bongiorni L (2004) Demography of the over-exploited Mediterranean red Coral (*Corallium rubrum* L. 1758). *Scientia Marina*, **68**(Suppl. 1), 199–204.
- Schwartz MK, Luikart G, Waples RS (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**, 25–33.
- Slatkin M (2008) Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Review Genetics*, **9**, 477–485.
- Szpiech ZA, Jakobsson M, Rosenberg NA (2008) ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics*, **27**, 2498–2504.
- Torrents O (2007) *Biologie des populations du corail rouge Corallium rubrum (L. 1758) de Méditerranée nord-occidentale*, PhD Dissertation. Université de la Méditerranée, France.
- Torrents O, Garrabou J, Marschal C, Harmelin JG (2005) Age and size at first reproduction in the commercially exploited red coral *Corallium rubrum* (L.) in the Marseilles area (France, NW Mediterranean). *Biological Conservation*, **121**, 391–397.
- Torrents O, Tambutté E, Caminiti N, Garrabou J (2008) Upper thermal thresholds of shallow vs. deep populations of the precious. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **357**, 7–19.
- Underwood JN, Smith LD, Oppen MJHV, Gilmour JP (2007) Multiple scales of genetic connectivity in a brooding coral on isolated reefs following catastrophic bleaching. *Molecular Ecology*, **16**, 771–784.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 255–256.
- Viard F, Franck P, Dubois M-P, Estoup A, Jarne P (1998) Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate species. *Journal of Molecular Evolution*, **47**, 42–51.
- Vighi M (1972) Etude sur la reproduction du *Corallium rubrum* (L.). *Vie et milieu*, **23**, 21–32.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, **15**, 1419–1439.
- Weinberg S (1979) The light-dependent behaviour of planula larvae of *Eunicella singularis* and *Corallium rubrum* and its implication for octocorallian ecology. *Bijdragen tot de Dierkunde*, **49**, 16–30.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Zibrowius H, Monteiro-Marques V, Grasshoff M (1984) La répartition du *Corallium rubrum* dans l'Atlantique (Cnidaria: Anthozoa: Gorgonaria). *Téthys*, **11**, 163–170.

This article is a part of the PhD thesis of J. -B. Ledoux. J. -B. Ledoux's current research focuses on the application of genetic and evolutionary approaches to unravel the population structure and local adaptation processes in *Corallium rubrum*. K. Mokhtar-Jamaï is a PhD student interested in population genetics and phylogeography of gorgonians. C. Roby is a PhD student interested in marine ecological and evolutionary process such as hybridization in marine organisms. J. -P. Féral is a researcher interested in ecology and evolution of marine biodiversity. J. Garrabou is a researcher involved in marine population and community studies focused in the conservation of long-lived invertebrate species. D. Aurelle is an associate professor interested in evolutionary biology and population genetics.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Document S1 Development of microsatellite loci.

Table S1 Impact of heterozygote deficiency on STRUCTURE outputs

Table S2 Multilocus and monolocus values of F_{IS} estimator (f) computed for each samples

Tables S3 a and b Pairwise F_{ST} values

Fig. S1 STRUCTURE plots.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

ANNEXE 5

Fine-scale genetic structure and inferences on population biology in the threatened Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*

J.-B. Ledoux*, J. Garrabou*§, O. Bianchimani*, P. Drap+, J.-P. Féral*, D. Aurelle*

*Aix-Marseille Université, CNRS UMR 6540 DIMAR, Centre d'Océanologie de Marseille, Station Marine d'Endoume, Chemin de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France ; +Ecole d'ingénieur de Luminy, CNRS UMR 6168 LSIS Avenue de Luminy 13288 Marseille Cedex 09, France ; § present address : Institut de Ciències del Mar CSIC, Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, E-08003, Barcelona, Spain.

Correspondence: Jean-Baptiste LEDOUX / Didier AURELLE CNRS UMR 6540 DIMAR, Centre d'Océanologie de Marseille, Station Marine d'Endoume, rue de la batterie des Lions, 13007 Marseille, France.

Fax: +33491041635;

E-mail: jean-baptiste.ledoux@univmed.fr / didier.aurelle@univmed.fr

Keywords: *Corallium rubrum*, microsatellites, photogrammetry, spatial genetic structure, kinship analysis, dispersal, drift, heterozygote deficiency.

Running title: Spatial genetic structure in the red coral.

Abstract:

Identifying microevolutionary processes acting in populations of marine species with larval dispersal is a challenging but crucial task because of its conservation implications. In this context, recent improvements in the study of spatial genetic structure (SGS) are particularly promising because they allow accurate insights into the demographic and evolutionary processes at stake. Using an exhaustive sampling and a combination of image processing and population genetics, we highlighted significant SGS between colonies of *Corallium rubrum* over an area of half a square meter, which sheds light on a number of aspects of its population biology. Based on this SGS, we found the mean dispersal range within sites to be between 22.6 and 32.1 cm, suggesting that the surveyed area approximately corresponded to a breeding unit. We then conducted a kinship analysis, which revealed a complex half-sib family structure and allowed us to quantify the level of self-recruitment and to characterize aspects of the mating system of this species. Furthermore, significant temporal variations in allele frequencies were observed, suggesting low genetic drift. These results have important conservation implications for the red coral and further our understanding of the microevolutionary processes acting within populations of sessile marine species with a larval phase.

	M	E	C	4	8	1	4	B	Dispatch: 23.8.10	Journal: MEC	CE: Anusha
	Journal Name			Manuscript No.					Author Received:	No. of pages: 13	PE: Abinaya

Molecular Ecology (2010)

doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04814.x

Fine-scale genetic structure and inferences on population biology in the threatened Mediterranean red coral, *Corallium rubrum*

J.-B. LEDOUX,* J. GARRABOU,* ‡ O. BIANCHIMANI,* P. DRAP, † J.-P. FÉRAL* and D. AURELLE*
 *Aix-Marseille Université, CNRS UMR 6540 DIMAR, Centre d'Océanologie de Marseille, Station Marine d'Endoume, Chemin de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France, †Ecole d'ingénieur de Luminy, CNRS UMR 6168 LSIS Avenue de Luminy 13288 Marseille Cedex 09, France

Abstract

Identifying microevolutionary processes acting in populations of marine species with larval dispersal is a challenging but crucial task because of its conservation implications. In this context, recent improvements in the study of spatial genetic structure (SGS) are particularly promising because they allow accurate insights into the demographic and evolutionary processes at stake. Using an exhaustive sampling and a combination of image processing and population genetics, we highlighted significant SGS between colonies of *Corallium rubrum* over an area of half a square metre, which sheds light on a number of aspects of its population biology. Based on this SGS, we found the mean dispersal range within sites to be between 22.6 and 32.1 cm, suggesting that the surveyed area approximately corresponded to a breeding unit. We then conducted a kinship analysis, which revealed a complex half-sib family structure and allowed us to quantify the level of self-recruitment and to characterize aspects of the mating system of this species. Furthermore, significant temporal variations in allele frequencies were observed, suggesting low genetic drift. These results have important conservation implications for the red coral and further our understanding of the microevolutionary processes acting within populations of sessile marine species with a larval phase.

Keywords: *Corallium rubrum*, dispersal, drift, heterozygote deficiency, kinship analysis, microsatellites, photogrammetry, spatial genetic structure

Received 6 May 2010; revision received 22 July 2010; accepted 26 July 2010

Introduction

The *population* is a central concept in biology. However, the identification of population boundaries and, consequently, inferences on their biology are not straightforward and depend on whether the adopted paradigm is ecological (focused on demographic cohesion) or evolutionary (focused on reproductive cohesion) (see Waples & Gaggiotti 2006; Waples *et al.* 2008 for discussion). Defining population boundaries is particularly problem-

atic in marine species (Tracey *et al.* 1975; Johnson & Black 1982; David *et al.* 1997; Whitaker 2004) and even more so in long-lived sessile species (Ayre & Hughes 2000; Underwood *et al.* 2007) in which heterozygote deficiencies at a small geographical scale challenge the evolutionary definition of populations that are usually based on panmixia (i.e. random union of gametes) and nonoverlapping generations (Whitlock & McCauley 1990). Moreover, the larval phase and reproductive features in most of these species reduce the efficiency of traditional demographic approaches (Féral 2002). Therefore, despite their major theoretical implications (Palumbi 2004), questions related to the spatial and temporal continuity of populations are still debated in the marine realm, particularly from a conservation perspective (Palumbi 2003).

Correspondence: Jean-Baptiste Ledoux, Fax: +33491041635; E-mails: jean-baptiste.ledoux@univmed.fr; didier.aurelle@univmed.fr

‡Present address: Institut de Ciències del Mar CSIC, Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, E-08003, Barcelona, Spain.

2 J.-B. LEDOUX ET AL.

1
2 In this context, recent advances in methods for
3 genetically based estimation of dispersal are promising
4 (Broquet & Petit 2009). Dispersal plays a crucial role in
5 the spread of populations and in their biology (Epperson
6 1995) because it has important consequences for repro-
7 ductive strategies and on demographic interactions
8 between individuals (Ronce 2007). Focusing on the isolation-
9 by-distance (IBD) model (Wright 1943; Malécot
10 1950), Rousset (1997, 2000) demonstrates that the prod-
11 uct of the dispersal rate and population density (so-
12 called neighbourhood size (Nb) see Rousset 1997, 2004
13 for discussion) can be accurately inferred from genetic
14 data (see also Hardy & Vekemans 1999; Vekemans &
15 Hardy 2004), which is consistent with more recent stud-
16 ies showing that genetic estimations of Nb are in good
17 agreement with demographic ones (e.g. Broquet *et al.*
18 2006). This method has often been used in studies on ter-
19 restrial plant or tree species (e.g. Born *et al.* 2008)
20 because it allows a determination of the strength of spa-
21 tial genetic structure (SGS) and inference of the extent of
22 the main genetic interactions between continuously dis-
23 tributed organisms. These studies have shown that SGS
24 is significantly related to mating system, demonstrating
25 that selfing species are characterized by higher SGS and,
26 therefore, reduced dispersal compared to outcrossing
27 species (Vekemans & Hardy 2004). In contrast, only a
28 few studies of SGS have been conducted in the marine
29 realm, and therefore, we still have little understanding
30 of the scale at which SGS may occur in this environment
31 (Palumbi 2004). Moreover, such studies have mainly
32 focused on species with complex reproductive biology,
33 including clonality (Calderon *et al.* 2007; Blanquer *et al.*
34 2009) or selfing (Underwood *et al.* 2007; Maier *et al.*
35 2009). The occurrence of SGS in strictly outcrossing spe-
36 cies has not been investigated so far.

37
38 In addition to spatial spread, the temporal continuity
39 of populations is also an open question in the marine
40 realm (e.g. Calderon *et al.* 2009). In long-lived species
41 with overlapping generations, temporal fluctuations of
42 allele frequencies are expected because of differential
43 contributions of the distinct generations involved in a
44 given reproductive event (Dupont *et al.* 2007). Studying
45 these temporal genetic changes constitutes an important
46 step towards characterizing recruitment variability (Sel-
47 koe *et al.* 2006) and evaluating the level of genetic drift
48 (Planes & Lenfant 2002).

49
50 The red coral, *C. rubrum*, is a long-lived sessile octo-
51 corallian species with a fragmented distribution centred
52 mainly in the western Mediterranean Sea. It inhabits
53 semi-dark to dim light rocky benthic habitats such as
54 caves and coralligenous overhangs between 5 and 800 m
55 in depth (Laborel & Vacelet 1961; Zibrowius *et al.* 1984;
56 Costantini *et al.* 2010). It has been harvested since Antiq-
57 uity for its use in jewellery, and its shallow populations

(5–50 m depths) were recently affected by mass mortal-
ity events putatively linked to positive thermal anom-
alies because of climate change (Garrabou *et al.* 2009).
C. rubrum is a gonochoric (Lacaze-Duthiers 1864),
brooding species with an annual reproductive cycle
(Vighi 1970, 1972), a balanced sex-ratio (Tsounis *et al.*
2006; Torrents 2007) and limited capability for asexual
reproduction (Garrabou *et al.* 2001). Sexual maturity is
reached at approximately 10 years of age (Torrents *et al.*
2005), but it only reaches high reproductive potential
after 20 years (Garrabou & Harmelin 2002; Santangelo
et al. 2003). It is characterized by a promiscuous mating
system (sensu Karl 2008) with internal fertilization. Sper-
matozoa released into the environment by sire colonies
fertilize oocytes retained in the polyps of the female col-
onies (Vighi 1970, 1972). After approximately 30 days of
development within the female polyps (Vighi 1970,
1972), a lecithotrophic planula larva is released. The fol-
lowing larval phase extends between 4 and 12 days *in*
aquaria and probably less in the field (Weinberg 1979;
Grillo & Chessa 1992). These restricted dispersal fea-
tures are reflected in the frequent aggregative distribution of
red coral colonies (Harmelin 1985), which are designated
as 'site' in the following text. These characteristics were
formally demonstrated using genetic approaches that
highlighted a strong pattern of differentiation between
sites separated by ten metres (Costantini 2007a,b; Le-
doux *et al.* 2010) with an IBD model of gene flow (Le-
doux *et al.* 2010). In these studies overall, large
deviations from panmixia leading to heterozygote defi-
ciencies were observed within the sampled sites (Abbiati
et al. 1993; Costantini *et al.* 2007a,b; Ledoux *et al.* 2010).
Costantini *et al.* (2007a) suggested that the combination
of null alleles, inbreeding and spatial or temporal Wahl-
und effects could be responsible for these heterozygote
deficiencies, which are observed even within areas of
one square metre. Nonetheless, an accurate characteriza-
tion of the ecological and evolutionary forces acting at
this scale is still lacking.

Therefore, the major goal of this study was to define
the extent of a population of *C. rubrum*. We put particu-
lar emphasis on the characterization of local dispersal
(i.e. acting within site) occurring during the gamete and
larval phases. We conducted our study on an area of
approximately half a square metre, a scale that has only
rarely been investigated previously (but see Grosberg
1991 for an example in the ascidian *Botryllus schlosseri*).
We used an exhaustive and individual-based sampling
scheme and 12 microsatellite loci to address four main
objectives: (i) to thoroughly define the correlation
between genetic and spatial distances at this spatial
scale; (ii) to characterize demographic parameters
linked to local dispersal; (iii) to test for the temporal
stability of the studied gene pool; and (iv) to analyse

SPATIAL GENETIC STRUCTURE IN THE RED CORAL 3

the kin structure of the sample and, therefore, characterize some aspects of the reproductive biology of the red coral. Our results showed the occurrence of SGS over the small area investigated (i.e. $<1 \text{ m}^2$) for the first time in the marine realm and allowed us to discuss a number of features of the population biology of *C. rubrum*. These results also have important implications for the evaluation of the capacity of the red coral to adapt to a changing environment (Bell & Gonzalez 2009).

Materials and methods

Sampling and photogrammetric methods

We exhaustively sampled (see Ledoux *et al.* 2010 for details on sampling) and mapped 81 colonies dwelling

at a depth of 15 m in an area of approximately 0.5 m^2 ($70 \times 69 \text{ cm}$) in the Grotte Pérès ($43^\circ 11' 12.96'' \text{N}$, $5^\circ 23' 25.04'' \text{E}$; Fig. 1a). This cave is characteristic of disturbed and harvested shallow sites with a high density of small colonies (Linares *et al.* 2010) and a mean diameter and height equal to 3.7 ± 1.6 and $20.5 \pm 10.6 \text{ mm}$ (mean \pm SD here and in the following text), respectively (Bianchimani 2005). This site was chosen mainly considering the feasibility of sampling. To map the colonies, we used underwater high-resolution photographs obtained using a Nikon D70 camera with housing and two electronic strobes. Previously, 25 permanent marks placed every 15–20 cm were fixed into the rock at the site with epoxy putty, forming a grid on the sampling area. Photographs (each covering about 300 cm^2) were taken with a high degree of overlap to ensure that

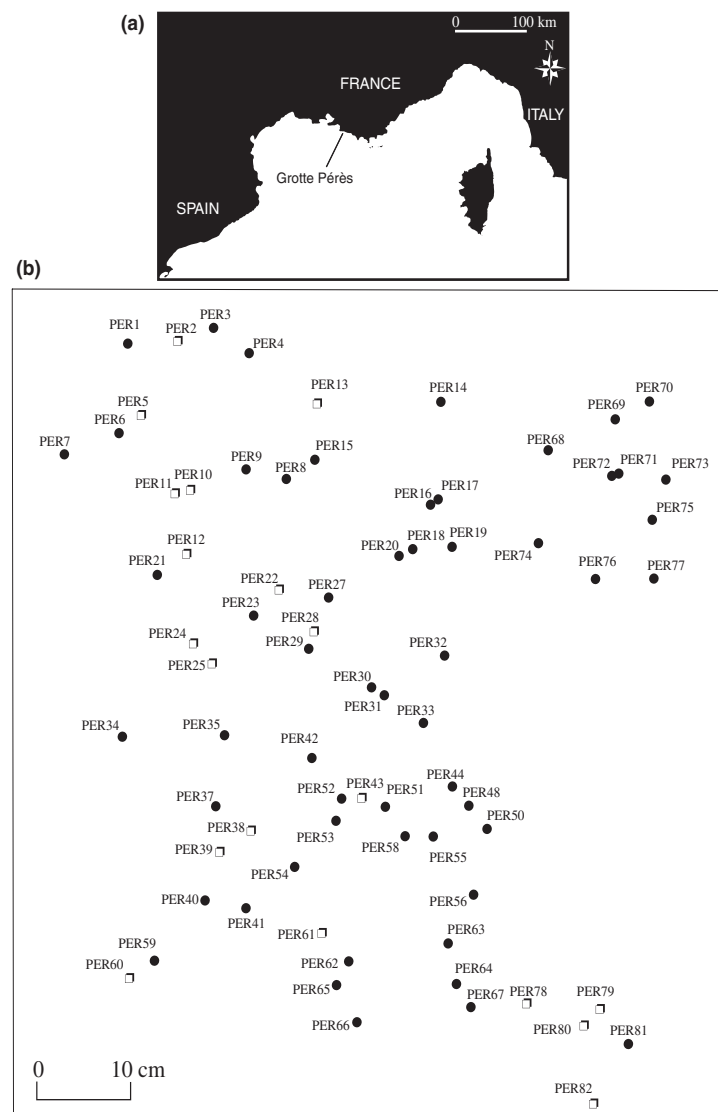


Fig. 1 (a) Location of the Grotte Pérès. (b) Map of the sampled colonies of *Corallium rubrum* in the study area. Only the 75 genetically different individuals, corresponding to 19 nonmature (□) and 56 mature colonies (●), are shown.

4 J.-B. LEDOUX *ET AL.*

1 several photographs covered different areas but showed
2 the same permanent marks.

3 They were analysed with photogrammetric methods,
4 which allow for a precise acquisition of spatial data
5 compared to classical *in situ* measurement methods
6 (Bythell *et al.* 2001). We first created a composite image
7 of the whole sampling area under the same reference
8 system using the position of the permanent marks. Sec-
9 ond, we determined the position of the 81 colonies
10 within the sampling area (Fig. 1b), and we measured
11 pairwise distances between colonies. We also measured
12 the maximum diameter and height for each colony to
13 define their reproductive status (i.e. mature vs. nonma-
14 ture) and stage-class membership. These procedures
15 were carried out with PHOTOMODELLER v.6 (Eos Systems
16 Inc.).

17 *Reproductive status and stage-classes assignment*

18 The main issue of this assignment procedure was to
19 define stage-classes that were probably linked by ances-
20 tor–descendant relationships to test kinship and tempo-
21 ral genetic structures. To achieve this aim, we first
22 defined the reproductive status of the colonies and then
23 estimated ages of the mature ones. A colony was con-
24 sidered sexually mature if its diameter or height was
25 greater than 3.6 or 24 mm, respectively, following Tor-
26 rents *et al.* (2005). Unfortunately, we could not obtain
27 measurements for 13 colonies (17%) because of their
28 complex shapes, their position relative to other colonies
29 or substrate ruggedness. In these cases, the reproduc-
30 tive status was, therefore, assessed visually relative to
31 the measured colonies. In a second step, we estimated
32 the age of the mature colonies that had unambiguous
33 diameter measurements. This ageing technique was
34 possible because a positive correlation exists between
35 diameter and age of the colonies (Marschal *et al.* 2004).
36 We used the growth rate in the diameter of mature col-
37 onies at the study site (0.22 ± 0.07 mm \times per year) that
38 was previously estimated (Torrents 2007) using the age-
39 ing method of Marschal *et al.* (2004). Once the ages of
40 these mature colonies were determined, we divided
41 them into three stage-classes based on two criteria: 1)
42 age at first reproduction, defined at around 10 years
43 (Torrents *et al.* 2005) and 2) age for high reproductive
44 potential, reached at around 20 years (Garrabou & Har-
45 melin 2002; Santangelo *et al.* 2003). Thus, in addition to
46 stage-class 0 (C0), corresponding to nonmature colonies
47 (i.e. 0–10 years old), stage-class 1 (C1) corresponded to
48 recently mature colonies (i.e. 10–20 years old) and
49 stage-class 2 (C2) to fully mature colonies (i.e. >20 years
50 old). Considering the differences in size between the
51 three stage-classes defined here (see results), individu-
52 als from stage-class 1 were old enough to be considered
53
54
55
56
57

as potential parents for class 0; and this was also
the case for stage-class 2 compared to stage-classes 0
and 1.

Microsatellite genotyping

DNA extractions were carried out following Ledoux
et al. (2010). We used 12 microsatellite loci. Ten of them
were amplified and analysed following Ledoux *et al.*
(2010). The two remaining loci, COR48 and COR58 (Co-
stantini & Abbiati 2006), were amplified following Co-
stantini *et al.* (2007a) with an additional last extension
step of 72 °C for 20 min and were multiplexed before
electrophoresis.

Identification of multi-sampled individuals

Because some colonies were closely related in space,
inducing putative multiple sampling of the same indi-
vidual, we first used GIMLET v.1.3.3 (Valière 2002) to
define the number of different individuals or multilocus
genotypes in our sample. We computed the unbiased
probability of identity (P_{ID} Kendall & Stewart 1977) that
two individuals in the sample share the same multilo-
cus genotype by chance and not by descent. Thus, the
following analyses were conducted considering a final
data set of 75 different multilocus genotypes.

Locus characteristics and Hardy–Weinberg equilibrium

Frequencies of null alleles (r) were estimated for each
locus by the expectation maximization algorithm
(Dempster *et al.* 1977) implemented in FREENA (Cha-
puis & Estoup 2007). The total number of alleles (N_a),
observed (H_o) and unbiased expected heterozygosity
(H_e Nei 1973) were calculated for each locus using
FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2001).

We tested the null hypothesis of linkage equilibrium
for each pair of loci in the sample with an exact test.
Departure from panmixia was tested for each locus and
for the whole sample using the score test for heterozy-
gote deficiency. Significance was addressed in the two
cases using a Markov chain (MC) algorithm (Guo &
Thompson 1992; Raymond & Rousset 1995) with default
parameters. The f estimator of F_{IS} (Weir & Cockerham
1984) was computed for each locus separately and for
all loci. Computations were made using GENEPOP 4.0
(Rousset 2008).

Genetic homogeneity of the sample

We tested for the occurrence of major temporal or spa-
tial genetic discontinuities in the sample using the
Bayesian clustering method implemented in STRUC-

TURE (Pritchard *et al.* 2000), and we looked for putative first-generation migrants using a Bayesian assignment method (Rannala & Mountain 1997) implemented in GENECLASS2 (Piry *et al.* 2004).

We further looked for temporal structure by testing genotypic differentiation between the three stage-classes (C0, C1, C2) using an exact test in GENEPOP. Significance was addressed using an MC algorithm with default parameters. We then performed analyses of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) using GENALEX v.6.3 (Peakall & Smouse 2006) and including three hierarchical levels: within colonies (i.e. within individuals), among colonies within stage-classes (i.e. among individuals within groups) and among stage-classes (i.e. among groups). Significance was addressed using 9999 permutations of the original data.

Spatial genetic structure and demographic parameters

Spatial autocorrelation. The genetic distances between individuals were estimated using Rousset's genetic distance \hat{e} (Watts *et al.* 2007) with GENEPOP and regressed on the natural logarithm of the distance between colonies ($\ln(d)$). The 95% confidence interval (CI) of the regression slope ($b_{L(d)}$) was obtained using a nonparametric bootstrap procedure (DiCiccio & Efron 1996; Leblois *et al.* 2003), and its significance was tested using a Mantel test with 5000 permutations.

Following Castric & Bernatchez (2001), we highlighted the rise of the SGS by progressively including pairs of individuals separated by increasing distances, arbitrarily choosing a step size of 4 cm. We therefore performed 21 regression analyses for increasing distance classes ranging from 0 to 84 cm (i.e. the maximum distance value between individuals). We tested the significance of the slope for each regression using a permutation procedure equivalent to a Mantel test (Hardy & Vekemans 2002). For each regression, individual locations were, therefore, permuted ($N = 5000$) using the resampling procedure implemented in POPTOOLS v.3.1.0 (Hoods 2000; <http://www.cse.csiro.au/poptools/>).

Demographic parameters: 'neighbourhood size' and gene dispersal estimates. In a two-dimensional model of IBD, N_b can be approximated as $N_b = 4\pi D_e \sigma_g^2$, where D_e is the effective density, and σ_g^2 is the mean square parent-offspring distance. It is also directly linked to the slope of regression between \hat{e} and $\ln(d)$ because $N_b = 1/b_{L(d)}$ (Watts *et al.* 2007). Despite the fact that our sampling scheme was not ideal in regard to theoretical assumptions (i.e. sampling over a $10 \times 10 \sigma_g$ area see Rousset 2000; Hardy & Vekemans 2004), Leblois & Rousset (2003) and Leblois *et al.* (2004) showed that σ_g is robust to departures from most of the model assumptions,

such as the sampling scale or homogenous and constant effective density. Therefore, the regression based on the whole data set was used to compute a moment estimate of σ_g . D_e was approximated based on the relationship $D_e = D \times N_e/N$ (Hardy & Vekemans 2004), where D is the census density of mature individuals, and N_e and N are the effective and the census population sizes, respectively. We sampled 75 different colonies on an area of 0.48 m² and, therefore, approximated the total density of the site at 160 colonies \times m². Seventy-five per cent of these colonies were considered as sexually mature (see Results), with a resulting density of around 120 mature colonies \times m². Because N_e/N is unknown for *Corallium rubrum*, we adopted two different values considering that all or only 50% of the mature colonies were involved in the reproductive effort (i.e. $D_e = D = 120$ colonies \times m² or $D_e = 0.5 \times D = 60$ colonies \times m²). Despite the fact that these values were probably overestimates at the species level, we considered that they were relevant at the studied scale.

Kinship structure

We analysed the relationships between individuals and characterized some parameters of the mating system using the maximum likelihood approach implemented in COLONY v.2.0 (Wang 2004; Wang & Santure 2009), which assigned parentage and sibship from individual multilocus genotypes. Four categories of relationships were considered: unrelated, half-sibling, full-sibling and parent-offspring. The method uses a group-likelihood ratio to partition individuals into full- and half-sibling families accounting for genotyping errors. Because age estimates based on diameter size were not available for all colonies, the analysis focused on the colonies belonging to stage-class 0 and stage-class 1 during two different rounds of analyses. For the 19 colonies belonging to stage-class 0, we considered the remaining 56 mature colonies (i.e. C1+ C2+ unassigned but mature colonies) as candidate male and female parents, whereas for the 19 stage-class 1 colonies, the 37 remaining mature colonies (i.e. C2+ unassigned but mature colonies) were considered as candidate male and female parents. The locus-specific null allele rates computed with FREENA were used as the allelic dropout rate (Jones *et al.* 2010), and only the eight loci with null alleles frequencies <0.3 were retained (Wang 2004). The rate of other kinds of errors, such as miscalling or false alleles, was evaluated on a larger data set based on extraction and genotyping replicates of 100 individuals (Ledoux *et al.* 2010). We assumed polygamous mating systems for both males and females and used the full-likelihood method. The analysis was run five times with five different random seed numbers to check the robustness of our results. To

6 J.-B. LEDOUX *ET AL.*

ensure that convergence was obtained, only relationships with a probability higher than 0.9 over the five runs were considered.

We then compared the geographical distance for each category of relationship (parent–offspring, half-sib and unrelated) using a nonparametric Kruskal–Wallis test.

Significance levels were corrected using a false discovery rate (FDR) correction for multiple tests (Benjamini & Hochberg 1995) when necessary.

Results

Identification of multi-sampled individuals

Three multilocus genotypes were shared between eight colonies that were closely related in space. The probability of identity was 9.45×10^{-16} . Shared genotypes were considered as belonging to the same individual and included only once, resulting in a final data set of 75 different multilocus genotypes.

Reproductive status and stage-class assignment

Of the 75 colonies, 19 (25%) were considered nonmature based on photogrammetric measures or visual assessments. Within the remaining 56 mature colonies, 30 diameter measures were considered accurate enough to assign the corresponding colony to a stage-class. Concerning the age estimation of these 30 colonies, 19 were assigned to C1 (mean diameter size = 3.6 ± 0.8 mm) and 11 to C2 (mean diameter size = 6.9 ± 2.1 mm).

Locus characteristics and Hardy–Weinberg equilibrium

Null allele frequencies ranged from 0 for Mic26 and Mic24 to 0.53 for COR58, with a mean value equal to 0.22. The occurrence of null alleles can bias our results because they generally induce an overestimation of genetic distance (Chapuis & Estoup 2007), and they can affect kin assignment (Dakin & Avise 2004). However, the following results were mostly consistent with those obtained when we used the INA data set corrected for null alleles (Chapuis & Estoup 2007) or when only the six loci with lowest level of null alleles (i.e. $r < 0.15$ see Table 1) were considered (not shown).

All loci were polymorphic with a total number of alleles ranging from 3, for Mic13, to 28, for Mic27, with a mean value of 13 alleles per locus. The observed and unbiased expected heterozygosity varied respectively between 0.09, for Mic13, and 0.89, for Mic26 (mean value over loci = 0.50 ± 0.28) and between 0.47, for Mic13, and 0.93, for Mic27 (mean value over loci = 0.77 ± 0.15). One pair of loci (Mic20–Mic22) was in linkage disequilibrium after FDR

Table 1 Locus characteristics: N_a , number of alleles per locus; r , null allele frequency; H_o , observed heterozygosity; H_e , gene diversity (Nei 1967); f , Weir & Cockerham (1984) estimator of F_{IS} (*, significant deviation from panmixia after false discovery rate correction at 0.05; ***, significant deviation from panmixia at 0.01)

	N_a	r	H_o	H_e	f
Mic13	3	0.27	0.09	0.47	0.80*
Mic20	7	0.02	0.57	0.52	−0.09
Mic23	10	0.49	0.21	0.69	0.70*
Mic24	13	0	0.69	0.71	0.03
Mic22	5	0.36	0.33	0.75	0.56*
Cor46bis	12	0.08	0.71	0.8	0.10*
Mic25	10	0.5	0.26	0.81	0.68*
Cor48	14	0.11	0.66	0.86	0.23*
Cor58	12	0.53	0.20	0.86	0.77*
Cor9bis	21	0.23	0.47	0.89	0.47*
Mic26	21	0	0.89	0.91	0.02
Mic27	28	0.02	0.88	0.93	0.05*
Mean value	13	0.22	0.5	0.77	0.35***

correction. Locus values of the F_{IS} estimator varied between −0.09, for Mic20, to 0.80, for Mic13. Deviation from panmixia was observed for nine out of the twelve loci (Table 1) after FDR correction. The multilocus value of the F_{IS} estimator was equal to 0.35, and the deviation from panmixia was significant ($P < 0.001$).

Genetic homogeneity of the sample

We assumed that there was no major genetic discontinuity in our sample because only one cluster was detected by STRUCTURE, and only one individual (PER9) was detected as a putative first-generation migrant (not shown). The following results did not change when PER9 was removed.

Pairwise genotypic differentiation tests between the three stage-classes were marginally (C0 vs. C2: $P = 0.06$) or highly significant (C0 vs. C1 and C1 vs. C2: $P < 0.05$) with low F_{ST} values (mean value = 0.012; Table 2a), putatively explaining why these genetic discontinuities were not detected with STRUCTURE. The AMOVA analysis showed that only 1% of variation was found between these stage-classes, whereas 39.8% and 59.2% were found within colonies and among colonies within stage-classes, respectively. All values were significant ($P < 0.05$; Table 2b).

Spatial genetic structure and demographic parameters

The slope of the regression between genetic and geographical distances was equal to 0.013 (95% CI:

SPATIAL GENETIC STRUCTURE IN THE RED CORAL 7

Table 2 Temporal genetic structure: (a) Pairwise genotypic differentiation between the three stage-classes: F_{ST} and P values are shown below and above the diagonal line [* , significant at 0.05 after false discovery rate (FDR) correction]; (b) Results of the AMOVA partitioning genetic variance among the three stage-classes, among colonies within stage-classes and within colonies of *Corallium rubrum* (d.f., degree of freedom; %, percentage of variance; P , P value; *significant at 0.05 after FDR correction)

	C0	C1	C2
C0		0.004*	0.06
C1	0.018		0.004*
C2	0.001	0.018	

Source	d.f.	%	P
Among stage-classes	2	1	0.017*
Among colonies within stage-classes	46	39.8	0.001*
Within colonies	49	59.2	0.001*

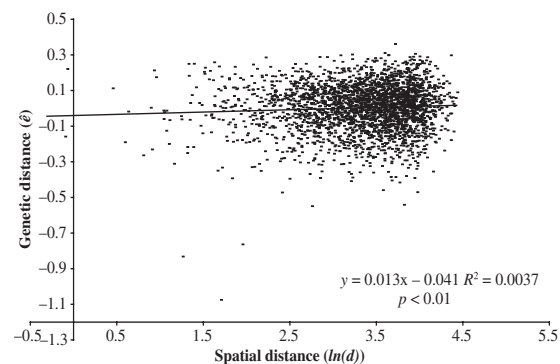


Fig. 2 Linear regression between the geographical ($\ln(d)$) and the genetic (δ) distances between pairs of colonies of *Corallium rubrum*.

0.005–0.037) and significant ($P < 0.05$), showing the occurrence of IBD at the very small scale considered (Fig. 2; Table 3). Our restricted regression analysis demonstrated that this IBD arose from the distance of 24 cm. The slope values for the distance classes beyond the fifth one (0–20 cm) were significantly different from 0 after FDR correction.

Based on the whole data set, the 'neighbourhood size' was estimated at 75 individuals (95% CI: 27–200 individuals), resulting in a σ_g of 22.6 cm (95% CI: 13.5–36.8 cm) and 32.1 cm (95% CI: 19.2–52.4 cm) for $D_e = D$ or $D_e = 0.5^*D$, respectively (Table 3).

Table 3 Summary statistics for the linear regression analysis between geographical ($\ln(d)$) and genetic (δ) distances between pairs of colonies of *Corallium rubrum* and related demographic parameters with their 95% confidence interval (*, $P < 0.05$)

	Computed value	95% CI interval
Slope	0.013*	0.005–0.037
Intercept	0.041	
Nb (individuals)	75	27–200
σ_g (cm) for $D_e = 120$ colonies/m ²	22.6	13.5–36.8
σ_g (cm) for $D_e = 60$ colonies/m ²	32.1	19.2–52.4

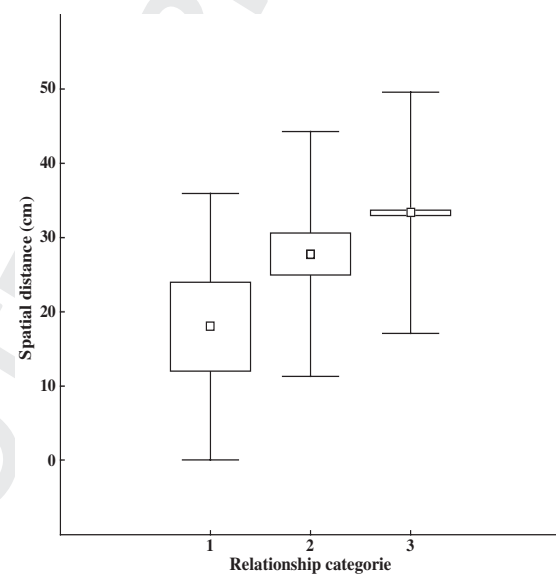


Fig. 3 Mean values (\square) of distances separated pairs of parent-offspring (1), half-sib (2) or unrelated (3) colonies. Boxes and bars respectively represent standard error and standard deviation.

Kinship structure

Over the 171 dyads considered in each stage-class analysed, bearing in mind that we only retained relationships with a probability >0.9 over the five runs, we obtained 18 half-sib dyads (10.5%) for C0 and 16 half-sibs (9.4%) for C1. No full-sib relationship was observed. The resulting pedigrees showed that 15 and 16 colonies were kin-related, corresponding respectively to 78.9% of the 19 colonies sampled for C0 and 84.2% of the 19 colonies sampled for C1. Moreover, five parent-offspring dyads involving three different candidate parents were inferred for C0, and four parent-offspring dyads involving three candidate parents were inferred for C1. These results demonstrated the occurrence of a half-sib family structure. Accordingly, each putative

8 J.-B. LEDOUX ET AL.

1 mother or father was assumed to have been involved in
2 multiple mating events, producing 2.3 ± 0.8 offspring
3 on average.

4 Geographical distances of the three relationship categories
5 were significantly different (Kruskal–Wallis test: $H = 10.65$;
6 $d.f. = 2$; $P < 0.05$), showing an increase in
7 distance from parent–offspring (18.0 ± 17.9 cm) to half-
8 sib (27.8 ± 16.4 cm) to unrelated (33.3 ± 16.2 cm) dyads
9 (Fig. 3).

12 Discussion

13 The present study is the first to demonstrate the occurrence
14 of significant spatial and temporal genetic structure
15 between individuals over half a square metre in
16 *Corallium rubrum*. At this fine scale, assuming that the
17 markers used are neutral, the observed SGS probably
18 results from 'the formation of local pedigree structure
19 as a result of limited gene dispersal and local random
20 genetic drift, that is the "isolation-by-distance" process'
21 (Wright 1943).

25 Spatial genetic structure and gene dispersal

26 We demonstrated that proximate colonies are more
27 genetically alike than colonies further apart using two
28 methods (regression-based and kin structure analyses).
29 IBD within a site of sessile marine organisms has
30 already been reported in a number of species (*Crambe*
31 *crambe* Calderon *et al.* 2007; *Seriatopora hystrix* Under-
32 wood *et al.* 2007; *Scopalina lophyropoda* Blanquer *et al.*
33 2009). However, our results are original in this respect
34 because they revealed the occurrence of IBD at a very
35 fine scale in a gonochoric and strictly outcrossing species.
36 Accordingly, this reinforces the view that restricted
37 dispersal of larvae is more common than was previously
38 thought based, for example, on the 'collection of larvae
39 of coastal species far out at sea' (Cowen & Spona-
40 nagle 2009).

41 A small 'neighbourhood size' of 75 individuals char-
42 acterized this pattern of IBD. Based on this result, we
43 analysed the local dispersal of the red coral. The two
44 considered values of D_e led to comparable estimates of
45 the mean axial parent–offspring distance (σ_g), ranging
46 between 22.6 and 32.1 cm. While there is no available
47 direct estimate of the larval dispersal distance for the
48 red coral, experiments *in aquaria* have suggested a low
49 swimming capability and geonegative behaviour that
50 tend to confine larva in the vicinity of parental colonies
51 (Weinberg 1979; Torrents pers. comm.). These dispersal
52 estimates are also concordant with previous genetic
53 studies that have suggested that most of the dispersal
54 of the red coral take place at less than ten metres (Co-
55 stantini *et al.* 2007a; Ledoux *et al.* 2010). Such low val-

ues have already been reported in other marine
invertebrates using direct or indirect approaches (e.g.
Balanophyllia elegans $\sigma < 50$ cm (Gerrodette 1981); *Botryl-
lus schlosseri* $\sigma_g = 17$ –24 cm (Grosberg 1991); *C. crambe*
 $\sigma_g = 24$ –25 cm (Calderon *et al.* 2007)) (see Shanks *et al.*
2003 and Kinlan & Gaines 2003 for reviews). However,
to our knowledge, this is the first time that such low
dispersal abilities have been inferred using a genetic
approach in a strictly outcrossing species. Interestingly,
two complementary results strengthened the validity of
this estimate. First, the mean geographical distance
computed for the nine parent–offspring dyads identi-
fied was 18.0 ± 17.9 cm. Second, the IBD pattern
became significant at 24 cm, as shown by the restricted
regression analyses. Because this dispersal parameter
encompasses dispersal of both the gamete and larval
phases, we contend that breeding units of *C. rubrum* in
the Grotte Pérès are highly restricted in space and
approximately correspond to the sampled surface.
Although a given value of σ^2 can correspond to differ-
ent dispersal distributions (Leblois *et al.* 2003), these
results imply that red coral sites are likely to be mainly
closed (Cowen & Sponaagle 2009) and that local pro-
cesses probably play a central role in their biology.

Local pedigree, mating system and recruitment

The occurrence of a unique breeding unit within our
sample is in accord with the genetic homogeneity con-
firmed by the clustering and first-generation migrant
analyses, which respectively did not find major genetic
discontinuity within the sample and identified only one
putative migrant. As expected in the case of SGS, our
results revealed the occurrence of a local pedigree. This
breeding unit is composed of half-sib families, probably
explaining the slight linkage disequilibrium observed in
this sample (e.g. Hedgecock *et al.* 2007) and those
observed for different pairs of loci at different sites (Le-
doux *et al.* 2010). In addition to the nine parent–off-
spring dyads identified over the stage-classes 0 and 1,
81.5% of the colonies were linked by half-sib relation-
ships. Moreover, these two stage-classes were linked by
second-degree relationships (i.e. 25% of alleles identical
by descent, Blouin 2003), highlighting the complex level
of relationships occurring in our sample (not shown).
To our knowledge, this is the first time that such a high
level of family structure has been characterized in a ses-
sile marine species.

The half-sib family structure revealed by our analyses
demonstrated the occurrence of multiple mating with
each parental colony being involved in 2.3 ± 0.8 mat-
ings. In gorgonians, multiple mating combined with
accumulation effects (i.e. long time-averaged exposure
of egg to sperm) could enhance fertilization success (see

1 Lasker 2006; Lasker *et al.* 2008 in *Pseudopterogorgia elis-*
2 *abethae*). The absence of mass spawning, the asynchro-
3 nous fertilization and the release of larva over a 6-week
4 period (Torrents 2007) could be consistent with an accu-
5 mulation effect in *C. rubrum*. Combined with the multi-
6 ple mating demonstrated by our study, these life
7 history traits could, thus, enhance fertilization success.
8 Additional experiments, such as parentage analyses
9 using aged and sexed individuals, are required to fur-
10 ther test this hypothesis.

11
12 The observed kin structure also suggested the occur-
13 rence of biparental inbreeding (i.e. mating between
14 genetically close relatives) in the study sample. Follow-
15 ing Vekemans & Hardy (2004), comparison between
16 the average Nason's estimators of kinship (Loiselle
17 *et al.* 1995) between truly outcrossed mates
18 ($F_X = 0.01 \pm 0.01$) and the Wright inbreeding coefficient
19 ($F_{IS} = 0.35 \pm 0.09$) demonstrated that the level of bipa-
20 rental inbreeding is small within the studied 'neigh-
21 bourhood'. Thus, most matings probably occur
22 between nonsib colonies. This is consistent with the
23 interpretation of a 'neighbourhood area' as an area
24 within which biparental inbreeding remains low (Fen-
25 ster *et al.* 2003) and does not necessarily prevent its
26 occurrence at a larger scale (Costantini *et al.* 2007a) as
27 shown in Fenster *et al.* (2003).

28
29 Subtle genetic structure was observed between the
30 analysed stages-classes (mean $F_{ST} = 0.012$), suggesting
31 that allele frequencies fluctuated over a short period of
32 time, as expected in long-lived species with overlapping
33 generations (Ryman 1997) such as the red coral. Never-
34 theless, the AMOVA suggested that the influence of this
35 structure on the total genetic variation is low. Hedge-
36 cock *et al.* (2007) proposed that such 'chaotic temporal
37 genetic structure' results from a sweepstake effect (i.e. a
38 random reduction of the effective population size),
39 which promotes local genetic drift over short periods of
40 time (Hedrick 2005). This is consistent with the recruit-
41 ment by pulse combined with the high postrecruitment
42 mortality observed in *C. rubrum* (Garrabou & Harmelin
43 2002). A sweepstake effect can, indeed, be explained by
44 differential reproductive success between adults or by
45 stochastic mortality during larval or postrecruitment
46 phases (Hedgecock 2010). Analyses of well-defined
47 cohorts covering several generations are needed to dis-
48 entangle these factors and to allow accurate estimation
49 of effective population size variation.

50
51 Considering the low level of biparental inbreeding
52 and the low temporal Wahlund effect because of the
53 temporal genetic structure, the high F_{IS} value observed
54 in the sample can be explained mainly by the presence
55 of null alleles. At larger sampling scales, in addition to
56 previous hypotheses (Costantini *et al.* 2007a), we pro-
57 pose that a 'family' Wahlund effect (Pudovkin *et al.*

1996) resulting from the presence of a limited number
of families at each site also contributes to the heterozy-
gote deficiencies reported for this species (Abbiati *et al.*
1993; Costantini *et al.* 2007a,b; Ledoux *et al.* 2010).

Implications for conservation and future directions

Our results have important implications for the conser-
vation of the red coral. The occurrence of nine parent-
offspring dyads shows that self-recruitment appears to
be crucial in the functioning of red coral populations.
Moreover, considering σ_g^2 as a measure of the speed at
which two lineages that derived from a common ances-
tor move away from each other generation after genera-
tion (Rousset 2004), we are now able to quantify the
low power of recolonization of this species. These
results complement the conservation advice proposed
by Ledoux *et al.* (2010), and we further argue that con-
servation actions targeting the preservation of several
small patches of colonies would improve site viability.
In addition, restoration of disturbed sites should also be
focused on the restoration of dense patches of colonies
through transplantation to allow for local recoloniza-
tion.

This study represents a first step towards a better
understanding of the demographic and evolutionary
processes acting within red coral sites and opens sev-
eral perspectives for future studies. First, because local
processes depend mostly on local density and local
gene dispersal (Fenster *et al.* 2003), the self-recruit-
ment and restricted dispersal highlighted in this study
are likely to be supplemented by some long-distance
dispersal as illustrated by the first-generation migrant
(PER9) identified in our sample. The interaction of
this long-distance dispersal with local processes high-
lighted in this study thus remains to be studied. Our
study was conducted by pooling all sampled colonies.
Therefore, further analyses of the evolution of SGS
across age-classes will also help to refine our conclu-
sions (e.g. Kalisz *et al.* 2001). Moreover, this study
was focused on a single sample coming from a dis-
turbed and harvested shallow cave so our results
should be generalized with caution. Demographic
characteristics of red coral sites, such as density and
size structure, which respectively affect σ_g^2 (Rousset
2000) and the differential reproductive success of colo-
nies (Hall & Hughes 1996), are thus spatially hetero-
geneous (Linares *et al.* 2010). Accordingly, the
strength of local dispersal and genetic drift may be
heterogeneous and should be evaluated at sites with
different characteristics. Finally, because our study
was focused on neutral variation, the impact of local
environmental conditions on these closed systems
remains to be studied.

Conclusion

Although they represent data that are essential for management policies, basic features of the population biology of marine invertebrates with sedentary adult and planktonic larval phases, such as the definition and spread of breeding units, are still poorly understood (Palumbi 2004 but see Ayre & Miller 2006; Underwood *et al.* 2007). Thus, using an adapted sampling strategy and a combination of approaches including photogrammetry and population genetics, we showed that sites colonized by *Corallium rubrum* are probably composed of small breeding units composed of kin-related colonies that are spatially and temporally structured because of restricted dispersal and low genetic drift. Therefore, our results provide new insights into the short-range differentiation and heterozygote deficiencies previously observed in this species (Abbiati *et al.* 1993; Costantini *et al.* 2007a,b; Ledoux *et al.* 2010). These results also contribute to a broader understanding of the microevolutionary processes impacting sessile marine invertebrates, which are often key species in biodiversity-rich, but threatened, communities.

Acknowledgements

We are grateful to Bernard de Ligondes (Centre d'Océanologie de Marseille) for support during sampling and to Caroline Rocher for technical assistance. We thank Myriam Heuertz and Jinliang Wang for helpful suggestions during analyses and Clément Gilbert for critical comments during the preparation of the manuscript. We are also grateful to Jean-Georges Harmelin and Oriol Torrents for discussions about reproductive features of the red coral. We thank Dr. Tim Vines, Dr. van Oppen and two anonymous reviewers for useful comments. This study was funded by the "Provence-Alpes-Côte d'Azur" region (J.-B. Ledoux Doctoral Fellowship) and by the IFB Foundation (Institut Français de la Biodiversité), the environmental department of TOTAL-FINA-ELF group, an 'Action Concertée Initiative' (ACI) program 'Jeunes chercheurs 2003' (number JC5360) from the French Research Ministry and the MEDCHANGE project funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR).

References

- Abbiati M, Santangelo G, Novelli S (1993) Genetic variation within and between two Tyrrhenian populations of the Mediterranean alcyonarian *Corallium rubrum*. *Marine Ecological Progress Series*, **95**, 245–250.
- Ayre DJ, Hughes TP (2000) Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the great barrier reef, Australia. *Evolution*, **54**, 1590–1605.
- Ayre DJ, Miller K (2006) Random mating in the brooding coral *Acropora palifera*. *Marine Ecology Progress Series*, **307**, 155–160.
- Bell G, Gonzalez A (2009) Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. *Ecology Letters*, **12**, 942–948.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate – a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, **57**, 289–300.
- Bianchimani O (2005) Évaluation des effets des aires marines protégées sur les populations de Corail rouge (*Corallium rubrum*): le cas des réserves marines françaises. *DU d'Environnement et Pollution*. Université de la méditerranée, France.
- Blanquer A, Uriz M-J, Caujapé-Castells J (2009) Small-scale spatial genetic structure in *Scopalina lophyropoda*, an encrusting sponge with philopatric larval dispersal and frequent fission and fusion events. *Marine Ecological Progress Series*, **380**, 95–102.
- Blouin MS (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 503–511.
- Born C, Hardy OJ, Chevallier M-H *et al.* (2008) Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. *Molecular Ecology*, **17**, 2041–2050.
- Broquet T, Petit EJ (2009) Molecular estimation of dispersal for ecology and population genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **40**, 193–216.
- Broquet T, Johnson CA, Petit E *et al.* (2006) Dispersal and genetic structure in the American marten, *Martes americana*. *Molecular Ecology*, **15**, 1689–1697.
- Bythell J, Pan P, Lee J (2001) Three-dimensional morphometric measurements of reef corals using underwater photogrammetry techniques. *Coral Reefs*, **20**, 193–199.
- Calderon I, Ortega N, Duran S *et al.* (2007) Finding the relevant scale: clonality and genetic structure in a marine invertebrate (*Crambe crambe*, Porifera). *Molecular Ecology*, **16**, 1799–1810.
- Calderon I, Palacin C, Turon X (2009) Microsatellite markers reveal shallow genetic differentiation between cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in northwest Mediterranean. *Molecular Ecology*, **18**, 3036–3049.
- Castric V, Bernatchez L (2001) The rise and fall of isolation by distance in the anadromous brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Genetics*, **163**, 983–996.
- Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology Evolution*, **24**, 621–631.
- Costantini F, Abbiati M (2006) Development of microsatellite markers for the Mediterranean gorgonian coral *Corallium rubrum*. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 521–523.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007a) Fine-scale genetic structuring in *Corallium rubrum*: evidence of inbreeding and limited effective larval dispersal. *Marine Ecology Progress Series*, **340**, 110–119.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007b) Genetic structuring of the temperate gorgonian coral (*Corallium rubrum*) across the western Mediterranean Sea revealed by microsatellites and nuclear sequences. *Molecular Ecology*, **16**, 5168–5182.
- Costantini F, Taviani M, Remia A *et al.* (2010) Deep-water *Corallium rubrum* (L., 1758) from the Mediterranean Sea: preliminary genetic characterisation. *Marine Ecology*, **31**, 261–269.
- Cowen RK, Sponaugle S (2009) Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, **1**, 443–466.

- 1 Dakin E, Avise J (2004) Microsatellite null alleles in parentage
2 analysis. *Heredity*, **93**, 504–509.
- 3 David P, Perdieu M, Pernot A, Jarne P (1997) Fine-grained
4 spatial and temporal population genetic structure in the
5 marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evolution*, **51**, 1318–1322.
- 6 Dempster A, Laird N, Rubin D (1977) Maximum likelihood
7 from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the*
8 *Royal Statistical Society Serie B*, **39**, 1–38.
- 9 DiCiccio T, Efron B (1996) Bootstrap confidence intervals (with
10 discussion). *Statistical Science*, **11**, 189–228.
- 11 Dupont L, Bernas D, Viard F (2007) Sex and genetic structure
12 across age groups in populations of the European marine
13 invasive mollusc, *Crepidula fornicata* L. (Gastropoda).
14 *Biological Journal of the Linnean Society*, **90**, 365–374.
- 15 Epperson B (1995) Fine-scale spatial structure: correlation for
16 individual genotypes differs from those for local gene-
17 frequencies. *Evolution*, **49**, 1022–1026.
- 18 Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of
19 molecular variance inferred from metric distances among
20 DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA
21 restriction data. *Genetics*, **131**, 479–491.
- 22 Fenster CB, Vekemans X, Hardy OJ (2003) Quantifying gene
23 flow from spatial genetic structure data in a metapopulation
24 of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). *Evolution*, **57**, 995–
25 1007.
- 26 Féral JP (2002) How useful are the genetic markers in attempts
27 to understand and manage marine biodiversity? *Journal of*
28 *Experimental Marine Biology and Ecology*, **268**, 121–145.
- 29 Garrabou J, Harmelin JG (2002) A 20-year study on life-history
30 traits of a harvested long-lived temperate coral in the NW
31 Mediterranean: insights into conservation and management
32 needs. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 966–978.
- 33 Garrabou J, Perez T, Sartoretto S, Harmelin JG (2001) Mass
34 mortality event in red coral *Corallium rubrum* populations in
35 the Provence region (France, NW Mediterranean). *Marine*
36 *Ecology Progress Series*, **217**, 263–272.
- 37 Garrabou J, Coma R, Bensoussan N et al. (2009) Mass mortality
38 in NW Mediterranean rocky benthic communities: effects of
39 the 2003 heat wave. *Global Change Biology*, **15**, 1090–1103.
- 40 Gerrodette T (1981) Dispersal of the solitary coral *Balanophyllia*
41 *elegans* by demersal planular larvae. *Ecology*, **62**, 611–619.
- 42 Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene
43 diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from
44 <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from
45 Goudet (1995).
- 46 Grillo MC, Chessa LA (1992) Développement larvaire de
47 *Corallium rubrum*. *Rapports Commission Internationale pour*
48 *l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, **36**, 33–40.
- 49 Grosberg RK (1991) Sperm-mediated gene flow and the genetic
50 structure of a population of the colonial ascidian *Botryllus*
51 *schlosseri*. *Evolution*, **45**, 130–142.
- 52 Guo S, Thompson E (1992) Performing the exact test of Hardy-
53 Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361–
54 372.
- 55 Hall V, Hughes T (1996) Reproductive strategies of modular
56 organisms: comparative studies of reef-building corals.
57 *Ecology*, **77**, 950–963.
- Harmelin JG (1985) Organisation spatiale des communautés
sessiles des grottes sous-marines de Méditerranée. *Rapports*
Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la
Mer Méditerranée, **29**, 149–153.
- Hedgecock D (2010) Determining parentage and relatedness
from genetic markers shed light on patterns of marine larval
dispersal. *Molecular Ecology*, **19**, 845–847.
- Hedgecock D, Launey S, Pudovkin AI et al. (2007) Small
effective number of parents (Nb) inferred for a naturally
spawned cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea*
edulis. *Marine Biology*, **150**, 1173–1182.
- Hedrick P (2005) Large variance in reproductive success and
the Ne/N ratio. *Evolution*, **59**, 1596–1599.
- Johnson MS, Black R (1982) Chaotic genetic patchiness in an
inter-tidal limpet, *Siphonaria* sp. *Marine Biology*, **70**, 157–164.
- Jones AG, Small CM, Paczolt KA, Ratterman NL (2010) A
practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular*
Ecology Resources, **10**, 6–30.
- Kalisz S, Nason JD, Hanzawa FM, Tonsor SJ (2001) Spatial
population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the
roles of dispersal, mating, history and selection. *Evolution*,
55, 1560–1568.
- Karl SA (2008) The effect of multiple paternity on the
genetically effective size of a population. *Molecular Ecology*,
17, 3973–3977.
- Kendall M, Stewart A (1977) *The Advanced Theory of Statistics*,
vol. 1. Macmillan, New York.
- Kinlan BP, Gaines SD (2003) Propagule dispersal in marine
and terrestrial environments: a community perspective.
Ecology, **84**, 2007–2020.
- Laborel J, Vacelet J (1961) Répartition bionomique du *Corallium*
rubrum LMCK dans les grottes et falaises sous-marines.
Rapports et Procès-Verbaux des Réunions de la Commission
Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée,
16, 464–469.
- Lacaze-Duthiers H (1864) *Histoire Naturelle du Corail*. JB Baillière
et Fils, Paris, 371pp.
- Lasker H (2006) High fertilization success in a surface-
brooding Caribbean gorgonian. *Biological Bulletin*, **210**, 10–11.
- Lasker HR, Gutiérrez-Rodríguez C, Bala K, Hannes A,
Bilewitch JP (2008) Male reproductive success during
spawning events of the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*.
Marine Ecological Progress Series, **367**, 153–161.
- Leblois R, Estoup A, Rousset F (2003) Influence of mutational
and sampling factors on the estimation of demographic
parameters in a “continuous” population under isolation by
distance. *Molecular Biology Evolution*, **20**, 491–502.
- Leblois R, Rousset F, Estoup A (2004) Influence of spatial and
temporal heterogeneities on the estimation of demographic
parameters in a continuous population using individual
microsatellite data. *Genetics*, **166**, 1081–1092.
- Ledoux J-B, Mokhtar-Jamai K, Roby C et al. (2010) Genetic
survey of shallow populations of the Mediterranean red
coral [*Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758)]: new insights into
evolutionary processes shaping nuclear diversity and
implications for conservation. *Molecular Ecology*, **19**, 675–
690.
- Linares C, Bianchimani O, Torrents O et al. (2010) Marine
Protected Areas and the conservation of long-lived marine
invertebrates: the Mediterranean red coral. *Marine Ecology*
Progress Series, **402**, 69–79.

12 J.-B. LEDOUX ET AL.

- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Sychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, **82**, 1420–1425.
- Maier E, Tollrian R, Nurnberger B (2009) Fine-scale analysis of genetic structure in the brooding coral *Seriatopora hystrix* from the Red Sea. *Coral Reefs*, **28**, 751–759.
- Malécot G (1950) Quelques schémas probabilistes sur la variabilité des populations naturelles. *Annales de l'Université de Lyon A*, **13**, 37–60.
- Marschal C, Garrabou J, Harmelin JG (2004) A new method for measuring growth and age in the precious red coral *Corallium rubrum* (L.). *Coral Reefs*, **23**, 423–432.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**, 3321–3323.
- Palumbi SR (2003) Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, **13**, S146–S148.
- Palumbi SR (2004) Marine reserves and ocean neighborhoods: the spatial scale of marine populations and their management. *Annual Review of Environment and Resources*, **29**, 31–68.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288–295.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M et al. (2004) GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, **95**, 536–539.
- 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.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Pudovkin AI, Zaykin DV, Hedgecock D (1996) On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics*, **144**, 383–387.
- Rannala B, Mountain J (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 9197–9201.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (ver. 1.2): a population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Ronce O (2007) How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **38**, 231–253.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219–1228.
- Rousset F (2000) Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology*, **13**, 58–62.
- Rousset F (2004) *Genetic Structure and Selection in Subdivided Populations*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103–106.
- Ryman N (1997) Minimizing adverse effects of fish culture: understanding the genetics of populations with overlapping generations. *ICES Journal of Marine Science*, **54**, 1149–1159.
- Santangelo G, Carletti E, Maggi E, Bramanti L (2003) Reproduction and population sexual structure of the overexploited Mediterranean red coral *Corallium rubrum*. *Marine Ecological Progress Series*, **248**, 99–108.
- Selkoe KA, Gaines SD, Caselle JE, Warner RR (2006) Current shifts and kin aggregation explain genetic patchiness in fish recruits. *Ecology*, **87**, 3082–3094.
- Shanks AL, Grantham BA, Carr MH (2003) Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecological Applications*, **13**, S159–S169.
- Torrents O (2007) *Biologie des populations du corail rouge Corallium rubrum (L. 1758) de Méditerranée nord-occidentale*. PhD Dissertation, Université de la Méditerranée, ???, France. **8**
- Torrents O, Garrabou J, Marschal C, Harmelin JG (2005) Age and size at first reproduction in the commercially exploited red coral *Corallium rubrum* (L.) in the Marseilles area (France, NW Mediterranean). *Biological Conservation*, **121**, 391–397.
- Tracey M, Bellet N, Gravem C (1975) Excess allozyme homozygosity and breeding population structure in mussel *Mytilus californianus*. *Marine Biology*, **32**, 303–311.
- Tsounis G, Rossi S, Aranguren M, Gili J-M, Arntz W (2006) Effects of spatial variability and colony size on the reproductive output and gonadal development cycle of the Mediterranean red coral (*Corallium rubrum* L.). *Marine Biology*, **148**, 513–527.
- Underwood JN, Smith LD, Oppen MJHV, Gilmour JP (2007) Multiple scales of genetic connectivity in a brooding coral on isolated reefs following catastrophic bleaching. *Molecular Ecology*, **16**, 771–784.
- Valière N (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 377–379.
- Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, **13**, 921–935.
- Vighi M (1970) Ricerca sul ciclo riproduttivo del corallo rosso *Corallium rubrum* (L.) del promontorio di Portofino. *Atti Acc. Naz. Lincei Mem*, S. VIII, vol. X, sez. 3. 10, pp. 1–26.
- Vighi M (1972) Etude sur la reproduction du *Corallium rubrum* (L.). *Vie et Milieu*, **23**, 21–32.
- Wang J (2004) Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics*, **166**, 1963–1979.
- Wang J, Santure A (2009) Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics*, **181**, 1579–1594.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, **15**, 1419–1439.
- Waples RS, Punt AE, Cope JM (2008) Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? *Fish and Fisheries*, **9**, 423–429.
- Watts PC, Rousset F, Saccheri IJ et al. (2007) Compatible genetic and ecological estimates of dispersal rates in insect (*Coenagrion mercuriale*: Odonata: Zygoptera) populations: analysis of 'neighbourhood size' using a more precise estimator. *Molecular Ecology*, **16**, 737–751.
- Weinberg S (1979) The light-dependent behaviour of planula larvae of *Eumicella singularis* and *Corallium rubrum* and its implication for octocorallian ecology. *Bijdragen tot de Dierkunde*, **49**, 16–30.

SPATIAL GENETIC STRUCTURE IN THE RED CORAL 13

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.

Whitaker K (2004) Non-random mating and population genetic subdivision of two broadcasting corals at Ningaloo Reef, Western Australia. *Marine Biology*, **144**, 593–603.

Whitlock M, McCauley D (1990) Some population genetic consequences of colony formation and extinction: genetic correlations within founding groups. *Evolution*, **44**, 1717–1724.

Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114–138.

Zibrowius H, Monteiro-Marques V, Grasshoff M (1984) La répartition du *Corallium rubrum* dans l'Atlantique (Cnidaria: Anthozoa: Gorgonaria). *Téthys*, **11**, 163–170.

Xxxxxxxx.

9

UNCORRECTED PROOF

ANNEXE 6

Phylogeography of the red coral (*Corallium rubrum*), a temperate gorgonian: inferences on evolutionary history and consequences of past climatic fluctuations

D. Aurelle¹, J.-B. Ledoux¹, C. Rocher¹, P. Borsa², A. Chenuil¹, J.-P. Féral¹

1. Aix-Marseille Université, CNRS UMR 6540 DIMAR, Centre d'Océanologie de Marseille, Marseille, France.

2. Institut de recherche pour le développement, UR 227, Montpellier, France

Correspondence: Didier AURELLE, CNRS UMR 6540 DIMAR, Centre d'Océanologie de Marseille, Station Marine d'Endoume, rue de la batterie des Lions, 13007 Marseille, France.

Mail: didier.aurelle@univmed.fr

Tel: +33 4 91 04 16 18

Fax: +33 4 91 04 16 35

Keywords

Red coral, phylogeography, EPIC, genetic structure, recolonization

Abstract

The red coral *Corallium rubrum* (Cnidaria, Octocorallia) is an exploited, long-lived sessile species from the Mediterranean Sea and the adjacent coastline in the Atlantic Ocean. Surveys of genetic variation using microsatellites have shown that populations of *C. rubrum* are characterized by strong differentiation at the local scale but a study of the phylogeography was still lacking. Here, we used sequence data from an intron of the elongation factor 1 (EF1) gene, together with seven microsatellite polymorphisms, to investigate the genetic structure of *C. rubrum* across its geographical range in the Mediterranean Sea, from North Africa to the Adriatic Sea. The EF1 sequences were also used to analyse the consequences of past demographic fluctuations linked with environmental change. Clustering analysis with microsatellite loci highlighted six genetic groups with the distinction of North African and Adriatic populations; this distinction appeared significant with AMOVA and differentiation tests. Microsatellite data also extended the isolation by distance pattern previously observed for this species at the Western Mediterranean scale. EF1 sequences confirmed the generalised genetic differentiation observed with microsatellites. Nevertheless a statistical parsimony network of EF1 haplotypes provided no evidence of high sequence divergence among regions, suggesting no long-term isolation. Selective neutrality tests on EF1 revealed a significant demographic expansion signal when considering all samples together but not at regional or population scale. These results suggest that the most recent Quaternary environmental fluctuations had a limited impact on the genetic diversity of *C. rubrum*.

Introduction

The phylogeographic approach yields insights into the evolutionary history of a species by revealing vicariance events, migration pathways, population expansion or bottleneck (Avice 2000). Phylogeography also helps towards the management of threatened species by providing information on genetic subdivisions, gene flow and genetic diversity. This is crucial in the present context of climate change where species dynamics will be linked to their dispersal or recolonisation abilities and to the possibility of *in situ* evolution. Nevertheless in most marine species, only scarce genetic data are available (Féral 2002) whereas some of them require adequate management strategies in a context of global change, such as the emblematic red coral, *Corallium rubrum*, in the Mediterranean.

C. rubrum is a sessile cnidarian inhabiting caves, vertical cliffs and overhangs at depths ranging from less than 20 m to more than 800 m (Costantini et al. 2010). It has a fragmented distribution and occurs in the Western Mediterranean, in some parts of the Eastern Mediterranean and on the neighbouring Atlantic coasts such as those of Morocco (Zibrowius et al. 1984). This species has long been exploited for jewellery. *C. rubrum* has also been affected by mortality events potentially linked with positive thermal anomalies in 1999 and 2003 (Garrabou et al. 2009) which may have had some impact on the resilience of populations (Santangelo et al. 2007). As a sessile species with presumably low dispersal abilities (Weinberg 1979), *C. rubrum* is a good model to study the genetic consequences of range fluctuations: at the last glacial maximum (LGM) 20 000 years ago, the sea level in the north western Mediterranean Sea was around 105-115 m below the present level (Lambeck and Bard 2000). Whether current shallow populations were established from long distance colonisation events within the last 20 000 years (refugia hypothesis), or originated from ancient populations whose habitat gradually expanded upwards, might be expected to leave different genetic signatures (Hewitt 2000; Marko et al. 2010). Genetic consequences of Quaternary climatic fluctuations have been studied for terrestrial species (Hewitt 2000; Petit et al. 2003) but less frequently in the marine realm. In the North Atlantic various histories with different refugia have been inferred from genetic data for benthic species (Maggs et al. 2008). Few sessile species (necessarily more affected by recent fluctuations than mobile ones) have been analysed from this point of view in the Mediterranean Sea (Duran et al. 2004; Serra et al. 2010). Analysing past demographic changes and population connectivity may also provide valuable insights into the potential evolution of populations in a context of global change (Maggs et al. 2008).

Previous genetic studies of *C. rubrum* have been performed with allozymes (Abbiatti et al. 1993), AFLP (del Gaudio et al. 2005) and microsatellites (Costantini and Abbiatti 2006; Costantini et al. 2007a,b; Ledoux et al. 2010). These studies indicated generalised genetic differentiation among populations, even at short distances (starting around 10 m) and therefore low effective dispersal. No

major genetic break was observed among the most distant populations and a regional pattern of isolation by distance was evidenced by Ledoux et al. (2010).

Concerning the evolutionary history of red coral, no study was specifically dedicated to this subject and some sequence data were still lacking in order to evaluate divergence time and to test past demographic fluctuations. Sequence data are also useful for the definition of evolutionary significant units compared to management units as they allow to identify the major historical lineage inside one species (Moritz 2002). Mitochondrial DNA is not variable enough for this species (Calderón et al. 2006). Internal Transcribed Spacers (ITS) have been used as nuclear sequence data for the red coral by Costantini et al. (2007b; 2010), but these results may have been biased by intra-individual variation (Calderón et al. 2006; Aurelle et al. in prep). We present here new data from an exon priming intron crossing (EPIC) marker from the elongation factor 1 (EF1) gene in *C. rubrum*. Introns have given some promising results as genetic markers for intraspecific genetic studies in cnidarians (Eytan et al. 2009). We assess the variability of this new marker and use it for the study of the phylogeography of *C. rubrum*.

The sampling design of the present study includes samples of *C. rubrum* from the southern Western Mediterranean and the northern Adriatic regions, which have not been analysed in previous studies. Our aim was to investigate the phylogeography of the red coral across a much larger part of its geographical range in order to identify its main genetic subdivision over this area. We extended the microsatellite data of Ledoux et al. (2010) to these populations and we used sequence data of the EF1 intron in order to assess the divergence between populations and to look for potential signals of past bottlenecks.

Materials and methods

Samples

The samples and their geographical distribution are listed in Table 1 and Fig.1. Sampling was hierarchical and included nine regions: the Adriatic Sea, North Africa, Corsica, South Italy (Ionian Sea), North Italy (Ligurian Sea), Balearic Islands, Gulf of Lion, Monaco (Ligurian Sea) and Catalonia, with several localities for most of them, leading to 38 samples. Regions were considered according to microsatellite results (Ledoux et al. 2010; our results) and to geographical breaks. The sampling protocol is described in Ledoux et al. (2010).

For intron sequences we tried as far as possible to obtain some samples scattered throughout the corresponding geographical regions. The number of obtained intron sequences is twice the number of individuals indicated in Table 1.

Concerning microsatellites, 18 samples already analysed by Ledoux et al. (2010) were considered here

Annexe 6

along with six new samples (four from North Africa and two from the Adriatic Sea; Table 1). The samples were chosen as representative of the regions analysed with EF1, but with a maximum of six samples per region in order to avoid any over-representation of some regions (Marseille for example) in the dataset and because the intra-regional genetic structure was not the aim of this paper.

Molecular analyses of introns:

Total DNA extraction

Genomic DNA was extracted using the QIAmp DNA Mini Kit 50 (Qiagen®) kit, following manufacturer's instructions, or with phenol – chloroform protocol (Ledoux et al. 2010). In both cases extractions were realised from 5 to 15 polyps per colony or, when not possible, using tissue scraped from the superficial part of the colony.

EF1 sequencing

EF1 cDNA isolation and sequencing are described in the supplementary material. The cDNA EF1 sequence was used to define primers with the online Primer 3 software (Rozen and Skaletsky 2000) in order to amplify overlapping fragments of 200-300 pb of the cDNA. When applied to genomic DNA these primers allowed the identification of introns when the amplified fragment was longer than the corresponding cDNA sequence. One primer pair (EF1 CR4 F: TAGATAGCATTCTTCCTCCCAAAC and EF1 CR4 R: AACCAACATTATCTCCAGGAAGAG) gave regular amplification of an intron and adjacent regions. PCR conditions were: Promega® PCR buffer 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.125 mM, 0.5 μM of each primer, Flexigotaq polymerase (Promega®) 0.025 U.μL⁻¹, and 5μL DNA for a 50μL reaction volume. The PCR program was: 3 min at 94°C, 35 cycles with [1 min at 94°C, 1 min at 59°C, 1 min at 72°C], and a final extension of 5 min at 72°C. PCR results were checked on 1.5% agarose gels and sent to the Genomer sequencing platform (Roscoff, France) or to the Genome Express® company for sequencing.

As some ambiguous / heterozygous positions were observed for various EF1 sequences, we tested whether this was due to heterozygous individuals by cloning the PCR product for ten individuals (Table 1). EF1 sequences are available in Genbank under accession numbers GQ202326 to GQ202528.

Microsatellites:

The samples analysed with microsatellites are described in Table 1. Seven loci were used: Mic13, 20, 24, 26, 27 of Ledoux et al. (2010) and COR9bis and 46bis of Costantini and Abbiatti (2006). The three other loci used by Ledoux et al. (2010), Mic 22, 23 and 25, were not used here because they did not give any amplification in the Adriatic and North African samples. Molecular methods for the analysis of microsatellite loci are described in Ledoux et al. (2010).

EF1 sequence data

Sequences were aligned with BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999). For EF1 intron, individuals with ambiguous sites were considered as heterozygous. For individuals heterozygous at only one site, we directly inferred the two corresponding haplotypes. Apart from the cloned PCR products (numbers of clones indicated in Table 1), the haplotype sequences of the other heterozygous individuals were determined by using the Phase 2.1 software (Stephens et al. 2001; Stephens and Scheet 2005) run on a Linux operating system. The homozygous individuals and those heterozygous for which the corresponding haplotypes had been identified either by cloning or by direct deduction (individuals heterozygous for one site) were used as known phases. Five independent runs were performed with the multi-allelic option without stepwise mutation. Other parameters were set as defaults. Phase also allowed estimation of the recombination parameter ρ (Li and Stephens 2003). We did not get readable sequences for some individuals heterozygous for insertion-deletion (indels), and they were not used for further analyses, except when cloning was performed (Table 1).

Network reconstruction

EF1 sequences were used for a network reconstruction with the statistical parsimony approach implemented in TCS 1.21 (Clement et al. 2000) with a 95% limit to parsimony and indels considered as a fifth state.

Sequence polymorphism analyses on EF1

Observed heterozygosities for EF1 were calculated with the number of observed heterozygous individuals based on observed sequence ambiguities and cloning of PCR products. All other analyses were performed on the alignment combining the sequences reconstructed with Phase and those obtained by direct sequencing and cloning. Considering the low sample sizes for some sites, statistics used for the analysis of genetic diversity and neutrality tests were also computed at the regional level according to the groups indicated in Table 1 and to the results of clustering analysis based on microsatellites (Ledoux et al. 2010; our results).

Nucleotide diversity (π) and gene diversity (Nei 1987) were calculated with DNAsp 5.0 (Librado and Rozas 2009). DNAsp was also used to test for mutation - drift equilibrium with a comparison of three different tests. Fu's F_s test (Fu 1997) and the R_2 test (Ramos-Onsins and Rozas 2002) are among the more powerful selective neutrality tests when there is no recombination (Ramírez-Soriano et al. 2008; Ramos-Onsins and Rozas 2002). When recombination is suspected, Ramírez-Soriano et al. (2008) advise the use of R_2 and Tajima's D (Tajima, 1989) test. Nevertheless these tests may not be able to distinguish the consequences of selective effects (selective sweep) from demographic events such as population growth (Ramírez-Soriano et al. 2008). The significance of these tests was assessed by using the coalescent simulations implemented in DNAsp 5.0 which assume a constant population size. The simulated

populations were based on the observed theta per gene value with no recombination (according to Phase results) or intermediate levels of recombination (with $R=10$ per gene and 494 sites); 1000 replicates were used for each analysis. As the power of neutrality tests may be greatly reduced for low sample sizes (Ramos-Onsins and Rozas 2002), they were also performed by grouping samples at the regional and global (all samples) levels. The interpretation of the results took into account the different properties of local, scattered and pooled samples in these tests (Städler et al. 2009).

Population structure

Microsatellite loci were used for a Bayesian clustering analysis using the STRUCTURE 2.2 software (Pritchard et al. 2000) from $K=1$ to 10 with ten replicates for each run. An admixture model with correlated allele frequencies was chosen (Falush et al. 2003) with the option of inferring alpha. Analyses with independent allele frequencies or with the estimation of lambda gave similar results (five replicates for each analysis); only the results of the correlated models will be presented. For each run, 10 000 burn-in iterations were followed by 100 000 iterations. The estimation of the number K of genetic groups was realised by considering the evolution of K according to $\Delta(K)$ (Evanno et al. 2005) and by focusing on values of K that capture most of the structure in the data (Pritchard et al. 2007).

Genetic relationships among populations were studied with a Principal Coordinate Analyses (PCA) performed with the Genalex 6 software (Peakall and Smouse 2006) on microsatellite data. The analysis used the algorithm of Orloci (1978) with the option of standardized distances and was based on F_{ST} values.

The analysis of population differentiation was performed with the Arlequin 3.0 software (Excoffier et al. 2005). For EF1, pairwise comparisons were done using conventional F_{ST} statistics (Wright 1965) with the estimator θ of Weir and Cockerham (1984) and with Φ_{ST} statistics with proportion of differences between haplotypes (Excoffier et al. 1992). Pairwise comparisons with microsatellite were analysed with F_{ST} . Both F_{ST} and Φ_{ST} were tested with 1000 permutations.

An analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992) was performed on EF1 and microsatellites with Arlequin 3.0 in order to evaluate genetic differentiation within groups and between groups of populations. Population groups were defined according to the geographical regions and to the microsatellite results of clustering analysis leading to the following groups: Adriatic Sea, North Italy (one population), South Italy (one population; not analysed with microsatellites), Monaco, Marseille, Catalonia, Balearic Islands, Corsica and North Africa (Table 1). Grouping the two Italian populations did not change the general results. Nor did the grouping of North Italy with Monaco (both in Ligurian Sea but quite different on the basis of clustering analysis). For EF1; the AMOVA was performed without (F_{ST} like) and with (Φ_{ST} like) sequence information (proportion of differences); for microsatellites, the AMOVA was performed on the basis of allele frequencies (F_{ST} like) and by taking into account the sum of squared

differences of alleles sizes (R_{ST} like). Results were tested with 1000 permutations.

Isolation by distance was tested with microsatellite data by comparing $F_{ST}/(1-F_{ST})$ with the logarithm of geographical distance (Rousset 1997). Geographical distances were measured on Google Earth with the shortest way separating sites by sea. Significance was tested with a Mantel test implemented in IBD web service 3.16 (Jensen et al. 2005) with 1000 permutations and a reduced major axis regression was performed.

For all analyses, when necessary, a correction for multiple tests was applied with a false discovery rate of 0.05 (Benjamini and Hochberg 1995).

Results

EF1 intron sequences:

Sequence variability:

In total, 376 EF1 sequences corresponding to 188 individuals were analysed. The length of the sequence alignment was 494 bp, with 46 variables sites including four indels of one bp each. The cloning of PCR products for two individuals with unreadable direct sequence made it possible to recover the two corresponding sequences and to reveal an indel in heterozygous state. The alignment of genomic sequences with the EF1 cDNA sequences of red coral obtained here indicated that the length of the intron varied from 344 to 347 bp.

Observed heterozygosity inferred from the direct sequencing of PCR products varied from 0 (e.g. sample PZU, Corsica; n=9 individuals) to 1 (sample RIE, Marseilles; n=8). For the haplotype reconstruction, the five independent runs of the Phase software gave identical results. Most haplotypes were identified with high probability values for the considered sites: 1 for most of them and at least 0.80 for the other haplotypes. Only three different sites in three different individuals had lower probabilities: two at 0.50 and one at 0.56. The Phase analysis also indicated low recombination rate when considering all sequences with an estimated ρ value of 0.003, consistent over the five runs. For the whole data set 39 different haplotypes were observed with a nucleotide diversity of 0.006 (Table 2). The most frequent haplotype was found 105 times (frequency 0.28) and the second most frequent 49 times (frequency 0.13). Eleven haplotypes were observed at least ten times (minimum frequency in the total dataset 0.03); most other haplotypes corresponded to one to four occurrences.

At the regional level the number of different haplotypes varied from two (North Italy) to 17 (for Marseille, the region with the highest sample size; table 2). Haplotype diversity varied from 0.36 (North Italy) to 0.83 (North Africa); nucleotide diversity varied from 0.001 (North Italy) to 0.007 (Catalonia and Marseille; Table 2). At the population level, when considering samples with at least ten sequences, the

number of different haplotypes varied from 2 (PDA) to 11 (RIE). Haplotype diversity varied from 0.24 (LPP) to 0.95 (RIE); nucleotide diversity varied from 0.001 (PDA and LPP) to 0.007 (POT; Table 2).

Network reconstruction:

The EF1 TCS network is presented in Fig.2. Most links between haplotypes corresponded to one or two mutations. The highest divergence was observed for four sequences (haplotype XXXVII) from two individuals from RII (Marseille) which differed by nine mutations from the nearest haplotype (XI). Several loops were present in the network, indicating possible alternative relationships among haplotypes. Several haplotypes (e.g. haplotypes I, III, X, XI) were shared among distant locations, such as the most frequent one (X) which was observed in Marseille, Monaco, North Italy, Corsica, Catalonia and North Africa. Nevertheless the network showed heterogeneous distribution of the haplotypes.

Selective neutrality tests:

The results of selective neutrality tests without recombination are presented in Table 2 for samples with at least ten sequences (five individuals) and at global and regional scales (grouped samples). After corrections for multiple tests, only the Fu's F_s test (Fu 1997) indicated a significant deviation from mutation – drift equilibrium when considering the whole data set, with a highly negative F_s indicating an excess of rare alleles / rare mutations. The low R_2 value ($p=0.04$) (Ramos-Onsins and Rozas 2002) was concordant with this observation. At the regional scale, the signal varied from one region to another and did not evidence any significant or generalised pattern. The analyses of Fu's F_s and R_2 with intermediate levels of recombination gave similar results (data not shown). At the population level, only the RIE sample (Marseilles) showed some significant F_s and R_2 values ($p=0.01$ and 0.05 respectively) but this was not significant after correction for multiple tests.

Population differentiation and AMOVA:

Genetic differentiation between populations:

For EF1, the estimates (Φ_{ST} and F_{ST}) of pairwise population differentiation and results of permutation tests are presented in tables S1 and S2 (supplementary material). The Φ_{ST} values varied between -0.75 and 1, whereas F_{ST} varied between -0.3 and 1. Permutation tests indicated generalised significant differentiation for the comparisons involving the most distant populations such as for example North Africa or the Balearic Islands compared to other regions. For comparisons at shorter distances, most tests involving samples with at least eight individuals were significant with the exceptions of four Φ_{ST} and two F_{ST} comparisons. With lower sample sizes, the frequency of significant tests generally decreased. The lowest geographical distance for which significant differentiation was observed with EF1 corresponded to the

comparison between RII and RIE: two samples from the same site, but in different environments (inside and outside cave) and about 15m apart. Differentiation tests for EF1 were also performed between regions (as indicated in Table 1). Using Φ_{ST} , only five permutation tests over 36 comparisons at regional level were not significant after multiple tests correction: Adriatic-South Italy, Marseille-Catalonia, Marseille-Monaco, Marseille-Corsica and Monaco-Corsica. For F_{ST} comparisons, seven permutation tests were not significant: Adriatic-South Italy, Monaco-North Italy, Marseille-Monaco, Marseille-North Italy, Marseille-Corsica, North Italy-Corsica and Monaco-Corsica.

For microsatellites, permutation tests of differentiation at population level indicated significant differentiation for all pairwise analyses except for the comparisons: RIE - RII, PON - CRO, CDR – POT (data not shown). Highest F_{ST} values reached 0.41 and 0.44 for comparisons of GHA (Adriatic) with TEN and TNS (North Africa) respectively. At the regional level, all comparisons were significant.

Clustering analysis

The application of the STRUCTURE software to microsatellite data revealed a first peak in the evolution of Delta(K) (Evanno et al. 2005) at K=3 followed by two smaller ones at K=6 and K=8 (data not shown). As the K=8 solution did not provide much more information than K=6, we only discuss the results for K=3 and 6. For K=3, an African-Adriatic group appeared as separated from a second group with North Italy, Monaco and Marseille, and a third group with all other populations. Apart from the North Italy (PDA) and Balearic samples (FOR, LPP) most samples presented some high and homogeneous membership coefficients for their corresponding groups. For K=6, clustering globally followed geographical distribution. Adriatic and African individuals appeared well differentiated from other samples. One run out of ten grouped Adriatic and African populations. For two runs, the Adriatic ALB sample was separated from the other Adriatic individuals (GHA) and grouped partly with Monaco or Balearic Islands. Samples from Corsica, Catalonia and Monaco-Marseille were grouped in different clusters, but with possibly two more or less mixed clusters for Marseille (with a separation of CAR). Balearic Islands and North Italy seemed more admixed. At K=6, in contrast to K=3, apart from Adriatic, African, CAR and some Catalonian individuals, numerous individuals did not present strong membership coefficients.

Principal Coordinate Analysis:

The Principal Coordinate Analyses (PCA) of genetic relationships between populations based on microsatellites F_{ST} is presented in Fig.3. Axis 1 indicated a gradient between North African and Adriatic samples and axis 2 separated these samples from the other ones which are grouped, except for the CAR sample (Marseille). The analysis of axis 3 only separated a few populations from this last grouping (MON

– Monaco one side and PZU – Corsica on the other side for example; data not shown).

AMOVA:

The AMOVA analysis on EF1 sequences performed by taking into account sequence differences (Φ_{ST} -like) indicated that around 13% of genetic variance was due to differences between regions and 16% to differences between populations within regions (Table 3). When AMOVA was performed based on haplotype frequencies (F_{ST} -like) these percentages were 15 and 13% respectively. Concerning microsatellites, the AMOVA based on R_{ST} parameters indicated that around 3% of the variation corresponded to differences between regions and 18% to differences between populations within regions (Table 3). With F_{ST} like analysis, these percentages were 5 and 8% respectively. Apart from the comparison between regions with R_{ST} (microsatellites), permutation tests indicated significant differentiation at all levels of analyses.

Isolation by distance:

The Mantel test applied to the comparison of microsatellites $F_{ST} / (1-F_{ST})$ with logarithm of geographical distance was significant ($p < 0.001$); the reduced major axis regression indicated a positive correlation between these distances ($r = 0.577$; estimated slope: 0.127; intercept: -0.173).

Discussion

EF1 as a population genetic marker: characteristics and variability

Nuclear introns are efficient markers for intra-specific studies owing to their level of variability and some primers can easily be defined in flanking coding regions. Nevertheless if the level of variability is high, sequences cannot be determined for heterozygous individuals without cloning of PCR products (see for example Faure et al. 2007) or statistical reconstruction of haplotypes (Stephens et al. 2001; Stephens and Scheet 2005). We obtained high identification probabilities using this haploype phase inference owing to the moderate observed level of variability and the low frequency of indels. The nucleotide diversity observed for *C. rubrum* (0.006) was similar to values observed in other marine organisms: the deep-water coral *Oculina sp.* (Eytan et al. 2009) and the deep-sea mussels *Bathymodiolus thermophilus* and *B. azoricus* (Faure et al. 2007). Much higher π values at locus EF1 have been observed in the blue mussel *Mytilus edulis* (0.015 across introns and exons; Faure et al. 2008), a potential effect of the very high effective size of this species. Two additional characteristics designate EF1 as a convenient marker for population genetics of *C. rubrum*: its moderate length (allowing one-step sequencing) and the absence of additional gene copies. France et al. (1999) suggested the occurrence of two elongation factor 1 α loci for the prawn *Penaeus vannamei*. Our data did not support this hypothesis in *C. rubrum*, nor is it supported in

other invertebrate species (Eytan et al. 2009; Faure et al. 2007).

Patterns of genetic differentiation and structure

At the population level the EF1 allele frequencies evidenced genetic differentiation at various distances, most non-significant pairwise tests corresponding to low sample sizes. This is confirmed by microsatellite data which showed genetic differentiation between *C. rubrum* populations for almost all comparisons and between regions. This result had already been observed with microsatellites (Costantini et al. 2007a,b; Ledoux et al. 2010) but is new for an EPIC marker. The highest differences involved comparisons with Adriatic and North Africa samples as indicated by the results of STRUCTURE, PCA and F_{ST} analyses. The percentage of genetic variation between regions observed here was around 15% with EF1 and 5% with microsatellites (F_{ST} based AMOVA). This inter-group variation observed with microsatellites was higher than for previous studies which did not include such distant populations: Costantini et al. (2007b) and Ledoux et al. (2010) obtained around 3% of variation between groups with 5 and 10 microsatellite loci respectively (two and seven of which were scored in the present study respectively). The higher variation observed between groups with EF1 than with microsatellites may be a consequence of (i) a possible microsatellite allele size homoplasy where microsatellites do not completely reflect the highest genetic differentiation (Viard et al. 1998) or (ii) of an upper limit to some F_{ST} estimates inherent to their statistical properties when applied to highly variable markers (Jost 2008). Including EF1 sequence differences in the AMOVA slightly lowered the percentage of variation between group indicating that this differentiation is not associated with high sequence divergence (see below). Integration of North African and Adriatic samples also extended at higher distances the isolation by distance (IBD) pattern observed by Ledoux et al. (2010). Under IBD, the number of clusters inferred by Bayesian structuring may be overestimated (i.e. too many clusters inferred; Frantz et al. 2009) and this may partly explain some relatively low assignment values observed here (Pritchard et al. 2007). The distant geographical location of African and Adriatic populations and a lack of intermediate samples may be consistent with their position in different clusters. IBD also explains the multivariate analysis (PCA) indication of a gradient between Adriatic and North Africa.

Dispersal abilities and putative barriers to gene flow

Our results are in agreement with the low dispersal abilities estimated for *C. rubrum* (Costantini et al. 2007a; Ledoux et al. 2010). Nevertheless Bayesian clustering displayed some individuals with incorrect assignment when considering their geographical origin: this might indicate that there is not enough discriminating information in the dataset, but this has also been observed, less frequently, with ten microsatellite markers (Ledoux et al. 2010). Another non-exclusive hypothesis would be that incorrectly

assigned individuals correspond to some recent migration events (Pritchard et al. 2000). Sporadic migration at higher distances might be compatible with genetic differentiation if the level of genetic drift is high enough to overcome gene flow (Tatarenkov et al. 2010); high genetic drift may come from low effective size as is assumed for *C. rubrum* populations (Costantini et al. 2007a). Sporadic migration could also explain the sharing of EF1 haplotypes among distant locations. Even if the mean dispersal distance is low (Costantini et al. 2007a), these putative migration events would shed new light on population connectivity for *C. rubrum* and could have important consequences for recolonisation ability.

A low mean dispersal distance agrees well with the genetic differences observed along geographical boundaries and transition zones as confirmed by the AMOVA. Insular populations (Corsica and Balearic Islands) were clearly delimited and sharp genetic differentiation was observed among continental samples separated by gaps in suitable habitats (such as Marseille and Catalonia) or from different hydrographic regions. The differentiation of Adriatic populations has already been observed for *C. rubrum* (Costantini et al. 2007; a single sample) but also for other marine organisms (Ruggiero et al. 2002). Nevertheless for *C. rubrum* it is not clear whether this differentiation is higher than expected under IBD. Moreover EF1 allele frequencies did not demonstrate significant genetic differentiation between South Italy (APU) and Adriatic samples; this could be linked to small samples sizes or indicate that the putative barrier between the Adriatic Sea and the rest of Mediterranean Sea is located further south. In any case the lack of high divergence on EF1 sequences and the geographical distribution of haplotypes did not support the hypothesis of long-term barriers to gene flow (Avice 2000). This could be linked to the recent recolonisation of the northern part of the Adriatic Sea following its emersion during glacial events (Ruggiero et al. 2002; Thiede 1978). The presence of a Siculo-Tunisian genetic break (Borsa et al. 1997) also remains to be tested.

We observed significant genetic differences between *C. rubrum* populations from the northern and the southern parts of the Western Mediterranean. Nevertheless, as in the case of the Adriatic Sea, there was no deep genetic divergence and the IBD pattern could explain the higher differentiation of the southern samples. A North-South differentiation within the Western Mediterranean has rarely been documented: the southern Western Mediterranean has been poorly sampled in most studies of geographical variation. In the rare cases where the sampling design was suitable the studied species possessed high dispersal ability and no genetic differentiation was observed (Bahri-Sfar et al. 2000). This north-south differentiation has nevertheless been suspected in *Sparus aurata* (Chaoui et al. 2009), but the sampling scheme did not allow to separate a potential IBD pattern from a barrier to gene flow.

The Atlantic – Mediterranean differentiation remains to be studied for *C. rubrum*; nevertheless our data provide some preliminary information on this point. For various marine organisms the Atlantic-Mediterranean break, when present, is often located at the Almeria – Oran front (Borsa et al. 1997;

Patarnello et al. 2007). The comparison of *C. rubrum* samples from Ceuta (FUE and DEL) and Algeria (TEN and TNS) located on either side of this front, did not show any particular genetic break: no sequence divergence was observed and these samples were grouped by the clustering analysis (but quite heterogeneous on PCA). This suggests either a more extended influence of Atlantic populations in the Mediterranean, or a lack of such a phylogeographic break for this species. The analysis of Atlantic samples is necessary to test this hypothesis.

In all cases, the low divergence among EF1 haplotypes may simply result from a low evolutionary rate for EF1 relative to the duration of isolation. Though we have no way to estimate this rate, the observed levels of nucleotide diversity do not seem to support the hypothesis of low mutation rate. This low divergence implies that the main genetic groups evidenced here should be considered as some management units as suggested in Ledoux et al. (2010), but not to different evolutionary significant units (sensu Moritz 2002). Nevertheless the adaptive component of differentiation remains to be studied.

Genetic signals of expansion or selection?

The highly negative F_s value (Fu 1997) along with the low R_2 (Ramos-Onsins and Rozas 2002) values indicated an excess of rare alleles / rare mutations at global scale. These observations are compatible with population expansion or selective sweep but this was not observed at regional or population scales. The lack of significant results at the regional or population level may be a consequence of reduced test power with lower sample sizes (Ramos-Onsins and Rozas 2002). Inversely, the significant signal at global scale could be a false positive signal of expansion induced by grouping scattered samples under strong subdivision (Städler et al. 2009). It is not clear whether our sampling scheme and the observed level of differentiation for EF1 could generate this effect. In case where this effect would apply to *C. rubrum*, this would agree with the hypothesis of a lack of expansion signal. Selection may also produce a misleading expansion signal. This selective hypothesis would require a hitch-hiking effect on a selected locus linked to this intron; a similar scenario has been proposed for EF1 in *Mytilus spp.* species (Faure et al. 2008). The demographic hypothesis of recent expansion is in agreement with putative signs of population expansion which were observed for some *C. rubrum* samples with ten microsatellites by Ledoux et al. (2010). This common signal could not be explained by selection, which should concern only one marker, but microsatellite tests may be influenced by departures from panmixia and were not significant in all populations (Ledoux et al. 2010). The analysis of more nuclear sequence markers will thus be useful in order to discriminate between these hypotheses. In any case, the expansion signal does not seem strong enough to be detected in the different regions and populations with sequence data.

Evolutionary history of C. rubrum

Our results on genetic differentiation and selective neutrality tests can help for analysis of the

evolutionary history of *C. rubrum* in the context of Quaternary sea-level fluctuations. Two extreme scenarios can be discussed. On the one hand, climatic fluctuations may have induced important changes in the distribution area of this species which could have persisted in some refugia only, about 2000 generations ago at the LGM (Ledoux et al. 2010). This should have led to high divergence between source populations corresponding to distant refugia and various impacts on genetic diversity including bottlenecks (Hewitt 2000; Petit et al. 2003), but secondary contacts can modify this pattern (Petit et al. 2003). During the last glacial events, the connections between the different basins of the Mediterranean were potentially more restricted than at present due to sea level variations (Thiede 1978). This could have induced such a long-term divergence scenario at least between basins. Alternatively, *C. rubrum* may have persisted in most non-emerged areas with a gradual displacement of populations matching sea level variations. This scenario would have less marked consequences for genetic structure. Our genetic data, with low divergence on EF1 sequences and microsatellites tend to reject the refugium hypothesis and agree with that of gradual population displacement. Other observations support the hypothesis of gradual displacement. The persistence of an IBD pattern indicates a migration – drift equilibrium, which could have been broken in case of long distance recolonization (see Castric and Bernatchez 2003). Neutrality tests did not evidence signals of bottleneck followed by expansion at regional or population scale which could happen after migration from distant refugia.

Therefore persistence of *C. rubrum* populations seems plausible during last Quaternary fluctuations, potentially followed by some moderate demographic expansion. In a comparative study of 14 rocky-shore species from the northeastern Pacific, Marko et al (2010) observed that half of them had histories consistent with long-term stability in population size. This pattern indicates a regional persistence during the LGM and is coherent with the ecological characteristics of the considered species. In the northern Western Mediterranean, sea-surface temperatures were lower at the LGM than at present, with estimates of around 7°C in winter and 9-13°C in summer (Thiede 1978; Hayes et al. 2005); this may have been compatible with the presence of *C. rubrum* in most parts of Western Mediterranean Sea as suggested by our results. Few fossil data have been published concerning the genus *Corallium*, but they suggest that populations of *C. rubrum* were present without interruption in the Mediterranean basin since the early Pleistocene (Vertino et al. 2009). The hypothesis of persistence will be further tested by analysing additional nuclear markers. More generally, taking into account the inherent variance in genetic and demographic processes, such multimarker analyses are necessary, especially considering the advances in sequencing technology. The extension of such studies to other Mediterranean species should help understand the evolutionary history of marine organisms during past environmental fluctuations and to analyse the potential evolution of these organisms in a context of global change.

Acknowledgements

We thank Joaquim Garrabou, Olivier Bianchimani, Christian Marschal, Pierre Chevaldonné, Frédéric Zuberer, Roland Graille, Thierry Pérez for providing samples and Didier Forcioli and Helmut Zibrowius for useful comments. We thank Charlotte Roby, Kenza Mokhtar-Jamaï, Emmanuelle Renard, Carole Borchellini, Emilie Egea, Gwilherm Penant, Eve Gazave and Pascal Lapébie for their help in the laboratory. This work was funded by the French ANR (National Research Agency) in the Medchange program (www.medchange.org). This was also part of the EPIC project in the European Union Network of Excellence Marine Genomics. Some samples were obtained through the GBIRM project in the European Union Network of Excellence MARBEF. J.-B.L's PhD was funded by the Région Provence Alpes Côte d'Azur.

References

- Abbiati M, Santangelo G, Novelli S (1993) Genetic variation within and between two Tyrrhenian populations of the Mediterranean alcyonarian *Corallium rubrum*. *Mar Ecol Prog Ser* 95:245-250
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge
- Bahri-Sfar L, Lemaire C, Ben Hassine OK, Bonhomme F (2000) Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern mediterranean as revealed by microsatellite polymorphism. *Proc R Soc Lond B* 267:929-935
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate - A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* 57:289-300
- Borsa P, Naciri M, Bahri L, Chikhi L, Garcia de Leon FJ, Kotoulas G, Bonhomme F (1997) Intraspecific zoogeography of the Mediterranean: population genetic analysis on sixteen atlanto-mediterranean species (fish and invertebrates). *Vie Milieu* 47:295-305
- Calderón I, Garrabou J, Aurelle D (2006) Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. *J Exp Mar Biol Ecol* 336:184-197
- Castric V, Bernatchez L (2003) The rise and fall of isolation by distance in the anadromous brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Genetics* 163:983-966
- Chaoui L, Hichem Kara M, Quignard J-P, Faure E, Bonhomme F (2009) Forte différenciation génétique de la daurade *Sparus aurata* (L., 1758) entre les deux rives de la Méditerranée occidentale. *C R Biol* 332:329-335
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9:1657-1660
- Costantini F, Abbiati M (2006) Development of microsatellite markers for the Mediterranean gorgonian coral *Corallium rubrum*. *Mol Ecol Notes* 6:521-523
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007a) Fine-scale genetic structuring in *Corallium rubrum*: evidence of inbreeding and limited effective larval dispersal. *Mar Ecol Prog Ser* 340:109-119
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M (2007b) Genetic structuring of the temperate gorgonian coral (*Corallium rubrum*) across the western Mediterranean Sea revealed by microsatellites and nuclear sequences. *Mol Ecol* 16:5168-5182
- Costantini F, Taviani M, Remia A, Pintus E, Schembri J, Abbiati M (2010) Deep-water *Corallium rubrum* (L., 1758) from the Mediterranean Sea: preliminary genetic characterisation. *Mar Ecol* 31:261-269

- del Gaudio D, Fortunato G, Borriello M, Gili JM, Buono P, Calcagno G, Salvatore F, Sacchetti L (2005) Genetic typing of *Corallium rubrum*. *Mar Biotech* 6:511-515
- Duran S, Giribet G, Turon X (2004) Phylogeographical history of the sponge *Crambe crambe* (porifera, poecilosclerida): range expansion and recent invasion of the Macaronesian islands from the Mediterranean Sea. *Mol Ecol* 13:109-122
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611-2620
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinforma Online* 1:47-50
- Eytan R, Hayes M, Arbour-Reily P, Miller M, Hellberg M (2009) Nuclear sequences reveal mid-range isolation of an imperilled deep-water coral population. *Mol Ecol* 18:2375-2389
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567-1587
- Faure B, Bierne N, Tanguy A, Bonhomme F, Jollivet D (2007) Evidence for a slightly deleterious effect of intron polymorphisms at the EF1 α gene in the deep-sea hydrothermal vent bivalve *bathymodiolus*. *Gene* 406:99-107
- Faure M, David P, Bonhomme F, Bierne N (2008) Genetic hitchhiking in a subdivided population of *Mytilus edulis*. *BMC Evol Biol* 8:164
- Féral JP (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage biodiversity? *J Exp Mar Biol Ecol* 268:121-145
- France S, Tachino N, Duda T, Shleser R, Palumbi S (1999) Intraspecific genetic diversity in the marine shrimp *Penaeus vannamei*: multiple polymorphic elongation factor-1 α loci revealed by intron sequencing. *Mar Biotech* 1:261-268
- Frantz A, Cellina S, Krier A, Schley L, Burke T (2009) Using spatial bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: clusters or isolation by distance? *J Appl Ecol* 46:493-505
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925
- Garrabou J, Coma R, Bensousson N, Chevaldonné P, Cigliano M, et al. (2009) Mass mortality in NW Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Glob Change Biol* 15:1090-

1103

- Hayes A, Kucera M, Kallel N, Sbaifi L, Rohling EJ (2005) Glacial mediterranean sea surface temperatures based on planktonic foraminiferal assemblages. *Quat Sci Rev* 24:999-1016
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature* 405:907-913
- Jensen J, Bohonak A, Kelley S (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6:1-6
- Jost L (2008) Gst and its relatives do not measure differentiation. *Mol Ecol* 17:4015-4026
- Lambeck K, Bard E (2000) Sea-level change along the french mediterranean coast for the past 30 000 years. *Earth Planet Sci Lett* 175:203-222
- Ledoux J, Mokthar-Jamaï K, Roby C, Féral JP, 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 nuclear diversity and implications for conservation. *Mol Ecol* 19:675–690
- Li N, Stephens M (2003) Modelling linkage disequilibrium and identifying recombination hotspots using single-nucleotide polymorphism data. *Genetics* 165:2213-2233
- Librado P, Rozas J (2009) Dnasp v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452
- Maggs CA, Castilho R, Foltz D, Henzler C, Taimour Jolly M, Kelly J, Olsen J, Perez KE, Stam W, Väinölä R, Viard F, Wares J (2008) Evaluating signatures of glacial refugia for north atlantic benthic marine taxa. *Ecology* 89:S108–S122
- Marko P, Hoffman J, Emme S, McGovern T, Keever C, Cox L (2010) The “expansion-contraction” model of pleistocene biogeography: rocky shores suffer a sea change? *Mol Ecol* 19:146-169
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Syst Biol* 51:238-254
- Orloci L (1978) *Multivariate analysis in vegetation research*. The Hague: Dr W Junk BV
- Patarnello T, Volckaert FAMJ, Castilho R (2007) Pillars of hercules: is the atlantic-mediterranean transition a phylogeographical break? *Mol Ecol* 16:4426-4444
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288-295
- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu J, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi Ret al. (2003) Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300:1563-1565
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- Pritchard J, Wen X, Falush D (2007) Documentation for structure software: version 2.2
- Ramírez-Soriano A, Ramos-Onsins SE, Rozas J, Calafell F, Navarro A (2008) Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination.

Genetics 179:555-567

Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol* 19:2092-2100

Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145:1219-1228

Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. pp 365-386

Ruggiero M, Turk R, Procaccini G (2002) Genetic identity and homozygosity in north-adriatic populations of *Posidonia oceanica*: an ancient, post-glacial clone? *Cons Gen* 3:71-74

Santangelo G, Bramanti L, Iannelli M (2007) Population dynamics and conservation biology of the over-exploited Mediterranean red coral. *J Theo Biol* 244:416-423

Serra IA, Innocenti AM, Di Maida G, Calvo S, Migliaccio M, Zambianchi E et al. (2010) Genetic structure in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: disentangling past vicariance events from contemporary patterns of gene flow. *Mol Ecol* 19:557-568

Städler T, Haubold B, Merino C, Stephan W, Pfaffelhuber P (2009) The impact of sampling schemes on the site frequency spectrum in nonequilibrium subdivided populations. *Genetics* 182:205-216

Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Gen* 68:978-989

Stephens M and Scheet P (2005) Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *Am J Hum Gen* 76:449-462

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595

Tatarenkov A, Healey CIM, Avise JC (2010) Microgeographic population structure of green swordtail fish: genetic differentiation despite abundant migration. *Mol Ecol* 19:257-268

Thiede J (1978) A glacial mediterranean. *Nature* 276:680-683

Vertino A, Zibrowius H, Taviani M (2010). Fossil ancestors of family Coralliidae in the Mediterranean Sea. In: Bussolletti E, Cottingham D, Bruckner A, Roberts G and Sandulli R (eds) *Proceedings of the International Workshop on Red Coral Science, Management, and Trade: Lessons from the Mediterranean*. NOAA Technical Memorandum CRCP-13, Silver Spring, MD pp 94-98

Viard F, Franck P, Dubois M, Estoup A, Jarne P (1998) Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate species. *J Mol Evol* 47:42-51

Weir B, Cockerham C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370

Annexe 6

Weinberg S (1979) The light-dependent behaviour of planula larvae of *Eunicella singularis* and *Corallium rubrum* and its implication for octocorallian ecology. *Bijdragen tot de Dierkunde* 49:16–30

Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420

Zibrowius H, Monteiro Marques V, Grasshoff M (1984) La répartition du *Corallium rubrum* dans l'Atlantique (Cnidaria : Anthozoa : Gorgonaria). *Téthys* 11:163-170

Table 1: Characteristics of the sampling sites of *Corallium rubrum*: location, hydrographic region, identification code, depth, total sample size for EF1, number of EF1 sequences obtained after cloning, observed heterozygosity (Hobs) for EF1 and sample size for microsatellites. For microsatellites, sample size in bold corresponds to samples analysed for this paper; other sample sizes correspond to data from Ledoux et al. (2010).

Regions, Sampling site	Hydrographic region	Code	Depth (m)	Sample size EF1 (individuals)	EF1 PCR clones	Hobs EF1	Sample size microsatellites (individuals)
AdriaticSea, Sazan, Albania	Adriatic Sea	ALB	58	14	2	0.50	20
Garmenjok Veli Islet, Croatia	Adriatic Sea	GHA	57	7	0	0.29	30
Total Adriatic Sea				21			50
North Africa, Tenes	SW Mediterranean	TEN	47	5	0	0.80	15
Tenes	SW Mediterranean	TNS	33-36	0	-	-	15
Ciçlon de Fuera	Alboran Sea	FUE	25-30	18	2	0.72	22
Cueva del Coral	Alboran Sea	DEL	42	9	0	0.44	15
Total North Africa				32			67
Corsica, Baja Casju	NW Mediterranean	BCA	30	1	0	0	28
Cala di Ponte	NW Mediterranean	CDP	26-27	2	0	0	
Palazzinu (cave)	NW Mediterranean	PUA	40	1	0	0	
Palazzu	NW Mediterranean	PZU	22	7	0	0.29	34
Palazzu deep	NW Mediterranean	PZP	40	9	0	0	
Porto	NW Mediterranean	POR	24	4	0	0	30
Total Corsica				24			92
South Italy, Apulia	Ionian Sea	APU	45	7	2	0.57	
Total South Italy				7			
North Italy, Portofino	Ligurian Sea	PDA	35	7	4	0.43	30
Total North Italy				7			30
Balearic Islands, Cap Formentor	Balearic Sea	FOR	36-38	4	0	0.25	32
Llosa des Patro Pere	Balearic Sea	LPP	34-36	8	2	0.25	30
Total Balearic Islands				12			62
Marseilles, Carro	Lions Gulf	CRO	21	3	0	0.33	35
Carry le Rouet	Lions Gulf	CAR	20	3	0	0	37
Figuier (cave)	Lions Gulf	FII	20	1	0	0	
Grand Congloué	Lions Gulf	GC	40	1	0	1	
Grotte à Peres (inside cave)	Lions Gulf	GPI	20	3	1	1	
Grotte à Peres (outside cave)	Lions Gulf	GPE	20	2	1	0	
Impériales du Large	Lions Gulf	IML	60	5	2	0.40	
Plane	Lions Gulf	PLA	38-41	1	0	0	
Ponteau	Lions Gulf	PON	21	4	0	0	28
Riou (inside cave)	Lions Gulf	RIF	20	14	0	0.14	36
Riou (outside cave)	Lions Gulf	RIE	20	8	8	1	30
Riou deep (outside cave)	Lions Gulf	RIO	40	1	2	1	
Tiboulou du Frioul	Lions Gulf	TFR	38-40	1	0	0	42
Tremies (cave)	Lions Gulf	TRM	14-15	1	0	0	
Total Marseille				48			208
Côte d'Azur, Monaco	Ligurian Sea	MON	35-38	7	4	0.43	23
Villefranche sur Mer	Ligurian Sea	VIL	22-24	2	0	0	36
Total Villefranche - Monaco				9			59
Catalonia, Cap de Norfeu	NW Mediterranean	NOR	24	8	0	0	31
Cova de la Reima	NW Mediterranean	CDR	14-17	3	2	0.33	38
Cova de la Vaca	NW Mediterranean	COV	18	1	0	0	
Meda Xica	NW Mediterranean	XIC	35	2	2	0.50	
Pota del Lop	NW Mediterranean	POT	35	8	0	0.63	35
Cap de l'Abeille	NW Mediterranean	BAN	25	1	0	1	
Sec Rederis	NW Mediterranean	SRE	23-24	5	0	0.60	27
Total Catalonia				28			131

Annexe 6

Table 2: results of analyses of sequence polymorphism for the EF1 marker. The columns indicate for each region the number of analysed sequences (2N genes for N individuals), the number of observed haplotypes (h), the gene diversity (Hd), the nucleotide diversity (π) and the results of the analysis of the Fs and R2 parameters and Tajima's D test. For Fs and R2, the observed value is indicated followed by the mean value obtained over 1000 coalescent simulations and the probability that the mean simulated value is lower than the observed value (see text for details). The first part of the table ("region") gives the results for pooled samples at the regional and global scale; the second part ("population") gives the results at the population level for samples with at least 10 analysed sequences (five individuals). Populations codes are indicated in Table 1. Significant values are indicated in bold at the 0.05 level after correction for multiple tests with $n = 9$ for the regional level and $n=17$ for the population level.

Region	Sample size (2N genes)	h	Hd	π	observed Fs value	mean simulated Fs	p(Fs sim \leq obs)	observed R2 statistics	mean simulated R2	p(R2 sim \leq obs)	Tajima's D
All	376	39	0.88	0.006	-20.95	-0.55	0.00	0.03	0.07	0.04	-1.73
Adriatic Sea	42	7	0.64	0.003	-1.43	-0.03	0.22	0.11	0.12	0.47	-0.26
North Africa	64	11	0.83	0.005	-1.29	-0.22	0.31	0.14	0.10	0.86	0.81
Corsica	48	9	0.79	0.004	-1.09	-0.05	0.33	0.11	0.11	0.58	0.07
South Italy	14	5	0.77	0.003	-0.67	0.11	0.30	0.18	0.17	0.64	0.56
North Italy	14	2	0.36	0.001	0.64	0.31	0.69	0.18	0.20	0.45	0.32
Balearic Islands	24	5	0.38	0.001	-2.08	0.18	0.05	0.10	0.15	0.10	-1.52
Marseilles	96	17	0.77	0.006	-2.69	-0.29	0.19	0.05	0.09	0.08	-1.39
Villefranche- Monaco	18	4	0.66	0.002	0.18	0.08	0.57	0.14	0.16	0.35	-0.05
Catalonia	56	6	0.81	0.006	3.28	-0.17	0.91	0.16	0.10	0.94	1.24
Population											
ALB	28	6	0.66	0.003	-0.71	0.06	0.34	0.12	0.13	0.48	-0.23
GHA	14	3	0.62	0.002	0.78	0.23	0.69	0.24	0.18	0.81	1.46
TEN	10	7	0.93	0.005	-2.36	0.16	0.05	0.27	0.18	0.97	2.09
FUE	36	6	0.75	0.004	0.64	-0.03	0.66	0.16	0.12	0.87	1.01
DEL	18	4	0.73	0.006	2.78	0.05	0.91	0.21	0.14	0.96	1.40
PZU	14	4	0.50	0.004	1.22	0.22	0.77	0.14	0.16	0.35	-0.30
PZP	18	4	0.55	0.002	0.09	0.14	0.55	0.14	0.16	0.33	-0.17
APU	14	5	0.77	0.003	-0.68	0.24	0.28	0.18	0.17	0.62	0.59
PDA	14	2	0.36	0.001	0.64	0.30	0.70	0.18	0.20	0.44	0.32
LPP	16	3	0.24	0.001	-0.98	0.25	0.10	0.13	0.19	0.21	-1.04
IML	10	4	0.80	0.005	1.26	0.28	0.77	0.21	0.18	0.78	1.06
RII	28	6	0.79	0.008	2.65	0.01	0.88	0.15	0.12	0.79	0.56
RIE	16	11	0.95	0.008	-3.82	0.17	0.01	0.09	0.14	0.05	-1.03
MON	14	3	0.60	0.002	0.46	0.25	0.64	0.19	0.19	0.65	-0.39
NOR	16	4	0.77	0.006	2.85	0.11	0.91	0.20	0.15	0.91	1.13
POT	16	5	0.83	0.007	1.80	0.07	0.82	0.18	0.15	0.83	0.91
SRE	10	5	0.82	0.005	-0.05	0.19	0.48	0.15	0.18	0.17	-0.42

Table 3: Results of AMOVA on EF1 sequences (left) and microsatellites (right). The grouping corresponds to the subdivision of populations into 9 groups: Adriatic Sea, South Italy, North Italy, Monaco, Marseille, Catalonia, Corsica, Balearic Islands and North Africa (see Table 1 and text for details). For each defined structure, the first part of the table (Φ_{ST} or R_{ST} like) corresponds to the computation of AMOVA using pairwise differences between sequences (for EF1) or sum of squared differences (for microsatellites); the second part of the table (F_{ST} like) only takes into account haplotype frequencies and is equivalent to conventional F_{ST} . The p values for fixation indices have been obtained with 1000 permutations.

Source of variation	Percentage of variation	Fixation indices	Percentage of variation	Fixation indices
	<i>EF1 - Φ_{ST} like</i>		<i>Microsatellites - R_{ST} like</i>	
Among groups	12.88	$F_{CT} = 0.13$ (p = 0)	3.41	$F_{CT} = 0.03$ (p = 0.21)
Among populations within groups	15.62	$F_{SC} = 0.18$ (p = 0)	17.13	$F_{SC} = 0.18$ (p = 0)
Within populations	71.51	$F_{ST} = 0.28$ (p = 0)	79.46	$F_{ST} = 0.21$ (p = 0)
	<i>EF1 - F_{ST} like</i>		<i>Microsatellites - F_{ST} like</i>	
Among groups	15.04	$F_{CT} = 0.15$ (p = 0)	4.71	$F_{CT} = 0.05$ (p = 0)
Among populations within groups	12.75	$F_{SC} = 0.15$ (p = 0)	8.34	$F_{SC} = 0.09$ (p = 0)
Within populations	72.21	$F_{ST} = 0.28$ (p = 0)	86.94	$F_{ST} = 0.13$ (p = 0)

Figures

Fig. 1 Geographical location of sampling sites. Codes for populations are detailed in Table 1. FUE and DEL samples are about 2km apart; TEN and TNS correspond to two samples from the same site but at different depths (Table 1). Asterisks * indicate the names of some regions covering several sampling sites detailed in Table 1; the precise locations of populations inside these regions are described in Ledoux et al. (2010).

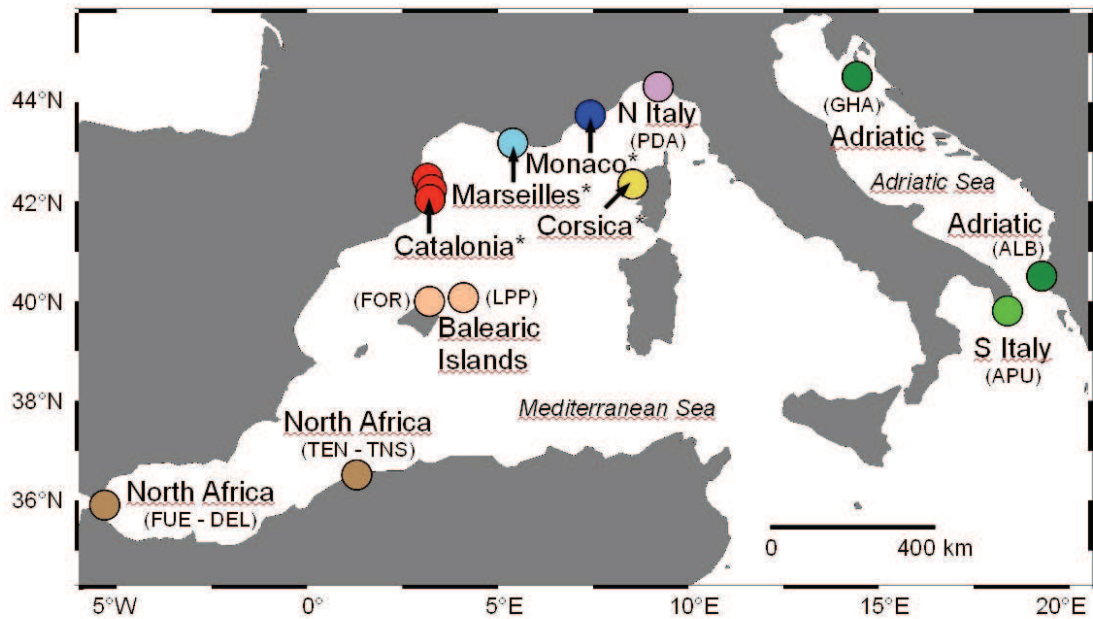


Fig.2. Statistical parsimony network (TCS) of the EF1 haplotypes. Blue Roman numbers correspond to haplotype identifiers. The colors correspond to the regions of origin of the sequences. The pies size is an indicator of the frequency of each haplotype in the dataset.

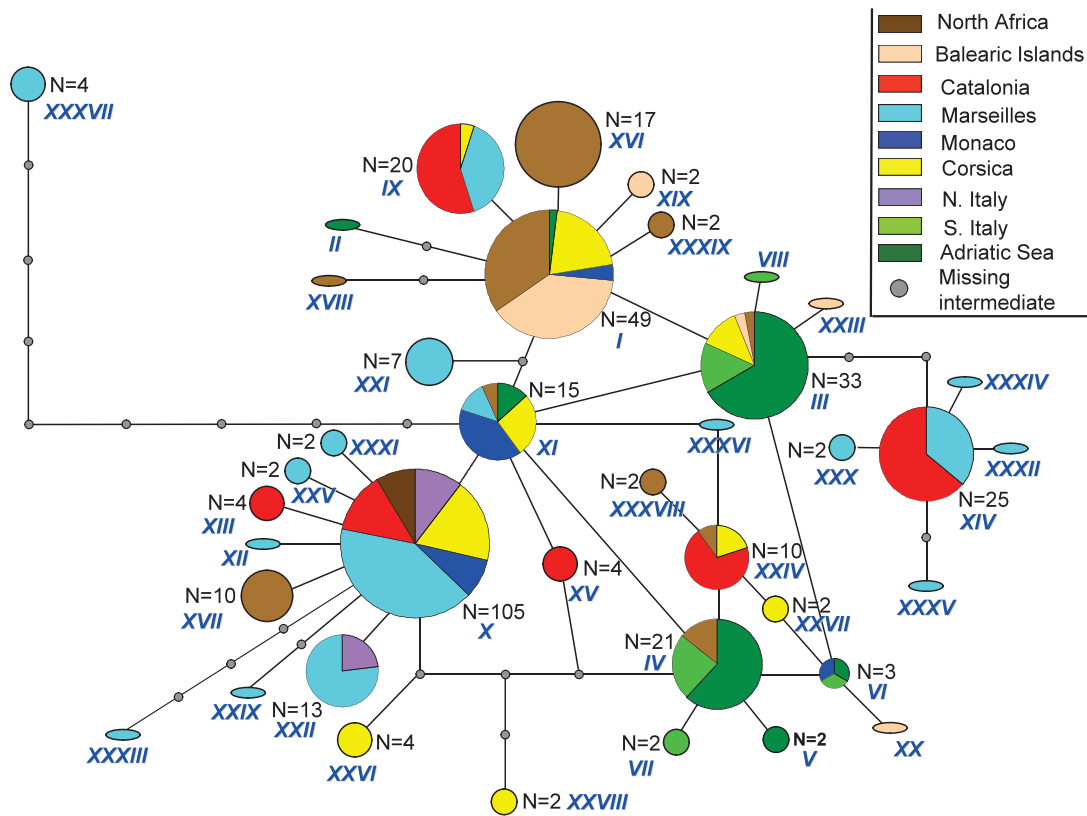
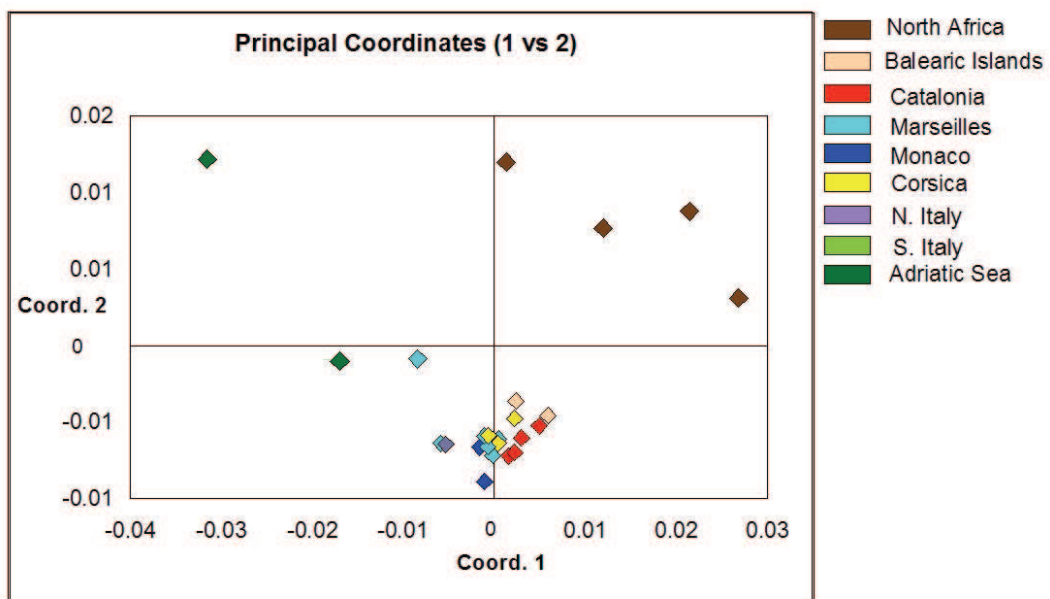


Fig.3 Principal Coordinates Analysis of genetic relationships between regions for microsatellite data.

F_{ST} values were used for population comparison. Percentages of variation explained by the axis: axis 1: 46.6%; axis 2: 18.4%; axis 3: 15.4% (not shown).



Supplementary material:

From the article: “Phylogeography of the red coral (*Corallium rubrum*), a temperate gorgonian: inferences on evolutionary history and consequences of past climatic fluctuations”; by Aurelle et al. Submitted to *Genetica*.

mRNA isolation and cDNA synthesis of EF1

Intron identification was achieved by sequencing the corresponding gene at the messenger RNA level and then at the genomic DNA level. RNA preparation was performed on fresh material. The geographical origin of the individual used for mRNA isolation was Riou island (Marseille) at 40m depth. Messenger RNA were isolated by using the Quick Prep™ Micro mRNA Purification Kit (Amersham Biosciences®) according to manufacturer’s instructions. Two wash steps with high salt buffer were followed by two wash with low salt buffer. RNA was precipitated with potassium acetate and glycogen and resuspended in 20 µL elution buffer. The synthesis of cDNA was performed with the First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences®) according to manufacturer’s instructions with 11 µL Bulk First-Strand Reaction Mix, 1µL of dTT solution, 0.2 µg of Not I-d(T)₁₈ primer and 20 µL of RNA solution. The incubation was performed at 37°C during 1h.

This solution was heated at 65°C during 10 min and then used for the amplification of the elongation factor 1 (EF1) cDNA. The primers used for this PCR were defined according to the alignment of some EF1 sequences available in Genbank by focusing on cnidarian species. The primers used were: EFC2F: CATCGTGAYTTCATCAAGAACATGAT and EFC2R: AAYTTGCADGCAATRTGDGCAGT. PCR conditions were: Promega® PCR buffer 1X, Mg Cl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.125 mM, 0.5 µM of each primer, Flexigotaq polymerase (Promega®) 0.025 U.µL⁻¹, 5 µL of cDNA for a 50µL reaction volume. PCR program was: 3 min at 94°C, followed by 30 cycles with [1 min at 94°C, 1 min at 45°C and 1 min at 72°C] and a final extension of 5 min at 72°C. PCR products were visualised on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

Cloning of cDNA PCR products

The PCR products obtained from cDNA were cloned with the pGEM®-T Easy vector (Promega) and Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells (Invitrogen) according to manufacturer instructions. The insert was amplified by PCR by picking up positive colonies. PCR reaction was achieved with Promega® PCR buffer 1X, Mg Cl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, primers T7 and SP6 0.5 µM each and Flexigotaq polymerase (Promega®) 0.02 U µL⁻¹. The PCR program was: 5 min at 94°C followed by 30 cycles with [1 min at 94°C, 1 min at 50°C and 2 min at 72°C]. After verification of their size on 1.5% agarose gels, PCR products were sent to the Genomer sequencing platform (Roscoff, France) in both directions. A Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysis confirmed that the obtained sequences corresponded to the Elongation Factor 1 gene. The distance tree provided by Blast indicated a cnidarian

Annexe 6

origin, the most similar Genbank sequence being the elongation factor 1A cDNA of *Scleronephtya gracillimum* (octocorallia). We finally obtained a 835 bp EF1 sequence for *C. rubrum* which has been deposited in Genbank under accession number GQ246790.

Tables S1 and S2: results of pairwise genetic differentiation analyses based on EF1 data.

Table S1: EF1 data: Φ_{ST} values (below diagonal) and results of permutation tests of differentiation based on Φ_{ST} (above diagonal). The significant comparisons at the 5% level after multiple tests correction are indicated by a +. Bold names correspond to samples with at least eight individuals.

Table S2: EF1 data : F_{ST} values (below diagonal) and results of permutation tests of differentiation based on F_{ST} (above diagonal). The significant comparisons at the 5% level after multiple tests correction are indicated by a +. Bold names correspond to samples with at least eight individuals.

ANNEXE 7

Intra-individual variability of ITS in the red coral

Corallium rubrum

Subtitle: Implications for population genetic studies

Didier Aurelle*, Jean-Baptiste Ledoux*, Anne Chenuil*, Caroline Rocher*, Philippe Borsa[‡], Jean-Pierre Féral*

*Aix-Marseille Université, CNRS UMR 6540 DIMAR, Centre d'Océanologie de Marseille, Station Marine d'Endoume, rue de la batterie des Lions, 13007 Marseille, France.

[‡]Institut de recherche pour le développement, UR 227, Montpellier, France

Correspondance : Didier Aurelle, didier.aurelle@univmed.fr

Running title : ITS variability in red coral

Abstract

Internal transcribed spacers (ITS) from nuclear ribosomal DNA are popular as population genetic markers, thanks to their level of variability and to the high conservation of the flanking ribosomal DNA sequences, allowing the design of consensus primers for amplification. Nevertheless the obtained results depend on the level of concerted evolution which reduces the divergence levels between different ITS copies. The interpretation of the results can be difficult if different ITS loci instead of alleles are in fact compared. In this article we analysed the intra-individual variability of ITS1 in the red coral, *Corallium rubrum*, by cloning and sequencing PCR products from ten individuals from different sampling locations in the Mediterranean. The 45 obtained sequences were compared to already published sequence types for this species. We observed a high level of intra-individual diversity with up to seven different sequence types per individual. The maximum likelihood tree did not show phylogeographical structuring: sequence types obtained from distant locations were in some instances genetically close and inversely very divergent sequences were observed within individuals. These results suggest that ITS are not suitable as phylogeographic markers in red coral and we discuss the factors which can influence the level of intra-individual variability of ITS.

Keywords: Internal transcribed spacers, concerted evolution, red coral, phylogeography

Introduction

Despite the exponential increase of nucleotide sequence data in the last decade (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/genbankstats.html>), there is a need for the development of genetic markers for numerous species for conservation genetics purposes (Hedrick 2001) and ecological studies (Burton 2009). For example, in marine organisms, the quantitative importance of larval dispersal cannot be directly evaluated but rely on indirect genetic estimates (Féral 2002; Hedgecock et al. 2007; Hellberg et al. 2002). Various strategies have been developed to choose genetic markers (Chenuil 2006) but a straightforward and commonly used approach consists of using “universal” (consensus) primers for popular markers such as mitochondrial DNA (mtDNA) and ribosomal internal transcribed spacers (ITS1 and 2). Nevertheless, despite some interesting properties of mtDNA such as low effective size and lack of recombination (Avice 2000), relying on this molecule as a clonal, neutral and clockwise genetic marker of population structure and phylogeography may be misleading (Galtier et al. 2009). Also, mitochondrial DNA is sometimes not sufficiently polymorphic for intra-specific studies such as for magnoliophytes (Kress et al. 2005), octocorals (Calderón et al. 2006; France and Hoover 2001, 2002) or sponges (Duran et al. 2004a). Internal transcribed spacers (ITS) 1 and 2 constitute a potentially interesting alternative to mtDNA. ITS are non coding and therefore present enough variability for intra-specific studies or for closely related species (phylogenetic studies will not be considered here). As ITS are framed by more conserved coding ribosomal DNA, 18S and 28S, polymerase-chain reaction (PCR) primers can be easily defined from published sequence data and utilized for cross-amplification of species from phylogenetically related groups. ITS sequences have been used to identify closely related species in the coral genus *Porites* (Forsman et al. 2009) and to study genetic differentiation among populations in *Drosophila spp.* (Schlötterer et al. 1994), brown trout, *Salmo trutta* (Presa et al. 2002), sponges (Duran et al. 2004b; Wörheide et al. 2002), octocorals (Sánchez et al. 2007) and hexacorals (Rodríguez-Lannety and Hoegh-Guldberg 2002; Márquez et al. 2003). ITS markers have also been used extensively in population genetic studies of magnoliophytes (Kress et al. 2005).

Nevertheless, as numerous ITS copies are present in the genome, intra-individual variability can be observed between these copies. The utility of ITS as genetic markers of population structure therefore relies on the presumption that different ITS copies maintain a sufficient level of inter- and intra-individual homogeneity by concerted evolution (Arnheim et al. 1980; Baldwin et al. 1995; Diekmann et al. 2001; Dover 1982). Because of a lack of concerted evolution, very divergent copies can be observed inside the same individuals (Calderón et al. 2006) leading to partially unreadable sequences (Costantini et al. 2007b). The cloning of PCR product is then required to analyse these sequences (Vollmer and Palumbi 2004; Kress et al. 2005).

The question of choosing an adequate sequence marker (mtDNA, ITS or other) is well illustrated

by the development of genetic studies on the red coral, *Corallium rubrum*. This exploited cnidarian (octocorallia) has been studied for management purposes. Information from allozymes (Abbiati et al. 1993) and microsatellites (Costantini et al. 2007a,b; Ledoux et al. 2010) indicated differentiation between populations even at short distances. Nevertheless, sequence data are still lacking for the evaluation of divergence time among distant locations and to test mutation-drift equilibrium (Ramos-Onsins and Rozas, 2002). Costantini et al. (2007b) have used ITS1 sequences for a phylogeographic study of red coral, but did not consider intra-individual variability. The obtained tree did not show any clear geographical pattern. Moreover a previous study on another Mediterranean gorgonian, *Eunicella cavolinii*, evidenced high level of intra-individual variability on ITS2 which raised difficulties in the interpretation of the results (Calderón et al. 2006). The impact of intra-individual variability on the results obtained with ITS1 for the phylogeography of red coral remains to be tested. Compared to Calderón et al. (2006) the impact of intra-individual variability might be different as this concerns a different species and more distant and potentially more divergent samples were analysed by Costantini et al. (2007b).

Here, we evaluated the extent of ITS1 intra-individual variability in red coral by cloning PCR products. The number of different copies observed per individual can indicate if this variability can be explained by heterozygous locus or by incomplete concerted evolution. Moreover we added sequences issued from areas not analysed in previous studies on red coral (Costantini *et al.*, 2007b): North Africa and north of Adriatic Sea. These new sequences are analysed along with those of Costantini *et al.* (2007b) in order to study the molecular evolution of this marker and its potential interest for the phylogeography of this species.

Material and methods

Samples and DNA extraction

Ten sites were analysed with one individual per site, including localities analysed or not by Costantini *et al.* (2007b). Sampling locations and characteristics are presented in Table 1. DNA was extracted as described in Ledoux *et al.* (2010). Considering the high observed level of intra-individual variability (see results) we focused our work on analysing different sequences from these individuals and comparing them with already published data rather than analysing more individuals.

ITS1 amplification and cloning

The PCR used the primers ITS1-New-F and the reverse complement of ITS1-New-R (Costantini et al. 2007b; Costantini pers. com.). PCR conditions were: Promega® PCR buffer 1X, Mg Cl₂ 2.5 mM, dNTPs

0.125 mM, 0.5 μ M of each primer, Flexigotaq polymerase (Promega®) 0.025 U. μ L⁻¹, DNA 5 μ L for a 50 μ L reaction volume. PCR program was: 3 min at 94°C, followed by 30 cycles with [1 min at 94°C, 1 min at 56°C and 1 min at 72°C] and a final extension of 5 min at 72°C. PCR products were visualised on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

Cloning and sequencing of PCR products

The PCR products were cloned with the pGEM®-T Easy vector (Promega) and Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ Competent Cells (Invitrogen) according to manufacturer instructions. The insert was amplified by PCR by picking up positive colonies. PCR reactions were realised with Promega® PCR buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, primers T7 and SP6 0.5 μ M each and Flexigotaq polymerase (Promega®) 0.02 U. μ L⁻¹. The PCR program was: 5 min at 94°C followed by 30 cycles with [1 min at 94°C, 1 min at 50°C and 2 min at 72°C]. After verification of their size on 1.5% agarose gels, PCR products were sent to the Genomer sequencing platform (Roscoff, France).

ITS1 sequences obtained in this paper are available in Genbank under accession numbers GQ202281 to GQ202325.

Sequence analysis

For ITS1, the 45 sequences obtained after cloning the PCR products were compared with the 51 already published sequence types from Costantini et al. (2007b). The obtained alignment was used for the reconstruction of a tree describing the relationships among haplotypes. Various insertions / deletions (indels) were observed in this data set and they were used for the phylogenetic study (Simmons and Ochoterena 2000). Indels were recoded using the Seqstate 1.4 software (Millet 2005) with the simple coding method of Simmons and Ochoterena (2000): 61 indels were then coded as some binary states (0/1). ITS sequences were used for tree reconstruction using maximum likelihood (ML) and Bayesian inferences (BI). For the maximum likelihood analysis, the first 30 indels were recoded as A for 0 and G for 1; the last 31 indels were recoded as C for 0 and T for 1. The model of molecular evolution used for reconstruction was chosen following the Akaike Information Criteria with the jModeltest 0.1 software (Guindon and Gascuel 2003; Posada 2008) used with five substitution schemes.

The chosen model was the GTR model (Tavaré 1986) with a gamma variation among sites. The maximum likelihood tree was estimated using the PhyML 3.0 software (Guindon and Gascuel 2003) with estimation of base frequencies and transition / transversion ratio. The gamma distribution was approximated with four classes and an estimation of the alpha parameter. The robustness of the tree was evaluated with 1000 bootstraps resampling (Felsenstein 1985). The Bayesian inference was realised with the MrBayes 3.1 software (Huelsenbeck and Ronquist 2001; Ronquist and Huelsenbeck 2003) by partitioning the

data set in nucleotides and indels. For nucleotides, the model used was the GTR + gamma model; for indels the binary model was used with the option coding=all. 2 000 000 generations were used with a burnin of 5 000 generations and all other parameters by default. The tree was rooted at midpoint and visualised using Treeview 1.6.6 (Page 1996). As the indel coding might influence the choice of model evolution we also analysed the data with ML based on a Kimura 2 parameters model (K2P; Kimura 1980) with empirical estimates of transition / transversion ratio and of the proportion of invariable sites and a maximum parsimony approach (MP) with the Phylowin software (Galtier et al. 1996).

Results

Forty five PCR clones were sequenced (Table 1). The comparison of these sequences with those published by Costantini et al. (2007b) confirmed that our sequences corresponded to red coral ITS1 and gave an alignment of 301 bp with 84 different sequences types (33 new sequences types when compared to Costantini et al. 2007b).

Intra individual variability

Nine individuals were analysed on more than one clone, and three to seven ITS1 sequences were obtained per individual. For the RII individual we only succeeded in sequencing a single clone. Apart from the PZU individual for which the three sequenced clones were identical, we observed from two to seven different ITS1 sequence types per individual (Table 1; Fig.1). The proportion of differences between sequences inside the same individual varied from 0.4 to 6.8% (without taking indels into account). Various indels were observed, with a length varying from one bp to 25 bp.

ITS1 tree and populations differences:

The mean sequence divergence among all ITS1 sequence types (including those of Costantini et al. 2007b) was 1.95% (without the indels) with a maximum divergence of 9.5%. Most of the sequences obtained for this article were different from the sequence types obtained by Costantini et al. (2007b). We retrieved two of their sequences: type 1 (from Medes - Catalonia and Marseilles) was observed in the SRE (Catalonia) and RIE (Marseille) individuals; type 42 (Adriatic and Tyrhenian Sea) in GHA (Adriatic Sea); type 51 from Adriatic Sea was also observed in the Adriatic individual analysed here.

The Fig. 1 presents the ML tree obtained with ITS1 sequences. Bayesian analysis, MP and ML with Kimura 2 parameters models gave similar results (data not shown). Most groupings were poorly supported and the most robust branchings were observed for some of the most distant sequences. Several of our sequences appeared very similar (but different) to those of Costantini et al. (2007b) whereas other

ones were really divergent. A group of very divergent sequences (at the bottom of the tree) was observed in various locations from GHA (Adriatic) to DEL (North Africa). Another divergent group linked most of our sequences from Balearic Islands (LPP) with sequences from Corsica, Marseille and North Africa, and showed clear differences with the Balearic Islands haplotypes (sequence types 10 to 15) observed by Costantini et al. (2007b). More generally this tree did not evidence any geographical structuring. Similar sequences were observed among distant locations. Conversely within location, or even within individual, very divergent sequences were observed, as for the DEL, SRE or MON individuals.

Discussion

Molecular evolution of Internal Transcribed Spacers

Contrary to mitochondrial DNA, ITS1 sequences revealed a high level of variability in red coral. Nevertheless, the combined analysis of sequences produced by Costantini et al. (2007b) and the ones obtained here after cloning did not reveal any clear structuring pattern, even at large geographical distances (Fig.1): sequences obtained from distant locations were genetically close and inversely very divergent sequences were observed within individuals.

The level of intra-individual variability observed with our results is probably too high to result solely from artefacts such as mutations arising from PCR or cloning procedures. An estimation of errors induced by PCR-cloning protocol on bacterial 16s rDNA, indicated that some mutant sequences could be created by this technique (Speksnijder et al. 2001), but their divergence from their putative parents ranged between 0.2 and 1.2%, well below the maximum divergence observed here (up to 6.8% divergence inside individuals without indels). Moreover the PZU individual, for which we obtained three identical sequences, suggests that the error level is not too high. The maximum intra-individual divergence obtained here is similar to the 6.1% mentioned in Calderón et al. (2006) on ITS2 in the gorgonian *Eunicella cavolinii*. Sequencing more clones per individuals extended the results of Calderón et al. (2006) by evidencing up to seven different ITS sequences per individual (compared to a maximum of three for this previous study).

As the number of copies per individual exceeded two, the observed intra-individual variability reflects not only heterozygosity but also differences among different loci. This indicates that different ITS paralogs can be amplified in the same PCR reaction and suggests a lack of concerted evolution for ITS in this species. The most divergent sequences observed here could correspond to different, eventually non-functional ITS copies. Xiao et al. (2010) have identified some nuclear ribosomal (nr) DNA pseudogenes in the seed plant *Cycas*, where divergence reached 28.3% between non-functional ITS paralogs. The divergence between copies seemed lower in the case of the red coral, but the pseudogenes hypothesis is

plausible. Pseudogenes and lack of concerted evolution could result from distant chromosomal locations of nuclear ribosomal DNA copies (Xiao et al. 2010). The different copies could follow an independent evolution and diverge from each other, sometimes leading to pseudogenes.

Lack of concerted evolution has already been invoked for ITS2 sequences in the sponge *Crambe crambe* (with up to seven different sequence types per individual; Duran et al. 2004b), the deep-sea coral *Lophelia pertusa* (Le Goff-Vitry et al. 2004) and other scleractinian corals (Flot et al. 2008; Vollmer and Palumbi 2004), *E. cavolinii* (Calderón et al. 2006), and the Mediterranean coral *Cladocora cespitosa* (with ribosomal DNA; Stefani et al. 2008). Costantini et al. (2007b) also observed some intra individual polymorphism for red coral in 17.5% of the individuals, but without cloning it was not possible to estimate whether this corresponded to heterozygosity for one locus or to differences among loci. Their estimation may also be a lower bound since direct sequencing does not always reveal intra-individual polymorphism (Vollmer and Palumbi 2004).

The presence of similar ITS1 sequences in distant geographical locations could also indicate an incomplete lineage sorting or be the consequence of low divergence or sporadic gene flow. The lack of deep divergence observed with microsatellite markers (Ledoux et al. 2010) and elongation factor 1 intron sequences (D. Aurelle, unpublished results) is concordant with these hypotheses. In any case, the shared polymorphism also participates to the lack of information obtained here.

Implications for population genetic studies

As the sequences of the primers annealing sites may vary among individuals, the frequencies of the preferentially amplified loci may also be different among the assayed samples. Therefore any comparisons of haplotype frequencies might be biased. Costantini et al. (2007b) observed some significant Φ_{ST} values between samples with ITS1 that were consistent with the genetic structure revealed by microsatellites (Costantini et al. 2007b; Ledoux et al. 2010), but it is not known whether this ITS1 variability was allelic or among different paralogs.

Another potential difficulty with ITS markers comes from pseudogenes, which can present high sequence divergence compared to functional copies and induce long-branch attraction in tree reconstruction (Xiao et al., 2010), potentially misleading interpretations.

Nevertheless ITS markers can still provide informative results, conditioned on a verification of their usefulness either by an estimation of intra-genomic variability or a posteriori by congruence with other markers. This is the case for the brown trout *Salmo trutta* (Presa et al. 2002), the sponge *Leucetta chagosensis* (Wörheide et al. 2008) or for some inter-specific comparisons as for example in the scleractinian coral genus *Porites* (Forsman et al. 2009). ITS can sometimes be useful for some octocoral, such as *Pseudopterogorgia elisabethae* (Gutiérrez-Rodríguez et al. 2009); in this last case some intra-

individual variation was observed but with a lower divergence than inter-individual comparisons. Intra-individual variability can even be useful for some analyses of hybridization events (McFadden and Hutchinson 2004).

Several factors may explain why the usefulness of ITS varies across the studied species. A publication bias may be present as ITS are often used without evaluation of intra-genomic variability; some conclusions may have been different if intra-individual variability had been considered. Moreover the observation of high levels of intra-genomic variability can prevent the publication of results similar to those obtained here. Apart from publication bias, ITS may be more useful for organisms with strong phylogeographic structure (such as brown trout; Presa et al. 2002): in this case a long term isolation between populations could eventually lead to a similar signal of differentiation among the different ITS copies as gene flow is reduced or stopped; nevertheless the question remains of the divergence among ITS copies inside the genome. The level of intra-genomic variability can also be influenced by the number and the location of ribosomal DNA copies. Variations in copy number are known for ribosomal DNA loci in animals and plants and sometimes in the same species (Su and Delany 1998; Zhang et al. 1990). More generally large parts of the genome may be concerned by copy number variations (Parfrey et al. 2008). The extent of variation in copy number among different species could be responsible for the presence of more or less divergent ITS sequences in the genome and therefore to different informative contents for these markers. Another potential factor acting on ITS variability is the polymorphism level. The resulting intra-individual variability will depend on the interaction between mutation, genetic drift and concerted evolution, which is not easy to predict. The use of ITS as an intra-specific genetic marker therefore requires an analysis of the potential impact of intra-individual variability on the results and when possible a comparison with a different marker.

Developing sequence markers alternative to ITS and mtDNA herefore remains necessary for various organisms for intra-specific studies of genetic variation and to mitigate potential effects of inter-locus variance, the sequencing of introns by exon priming intron crossing (EPIC) PCR constitutes a promising tool. Such approaches will become easier thanks to the sequencing of more genes in different species and we are currently developing such markers to red coral analyses.

Fundings

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) in the Medchange program (www.medchange.org); and the GBIRM project in the European Union Network of Excellence MARBEF (contract n°GOCE-CT-2003-505446).

Acknowledgments:

We thank Joaquim Garrabou, Olivier Bianchimani, Christian Marschal, Pierre Chevaldonné, Roland Graille and Thierry Pérez for providing samples. Federica Costantini kindly sent us the alignment of ITS sequences corresponding to her article.

References:

- Abbiati M, Santangelo G, Novelli S, 1993. Genetic variation within and between two Tyrrhenian populations of the Mediterranean alcyonarian *Corallium rubrum*. Mar Ecol Prog Ser. 95:245-250.
- Arnheim N, Krystal M, Schmickel R, Golder W, Oliver R, Zimmer E, 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes. PNAS. 77:7323-7327.
- Avice JC, 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press; Cambridge.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal ADN: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Missouri Bot Gard. 82:247-277.
- Burton RS, 2009. Molecular markers, natural history, and conservation of marine animals. Bioscience. 59:831-840.
- Calderón I, Garrabou J, Aurelle D, 2006. Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. J Exp Mar Biol Ecol. 336:184-197.
- Chenuil A, 2006. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. Genetica. 127:101-120.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M, 2007a. Fine-scale genetic structuring in *Corallium rubrum*: evidence of inbreeding and limited effective larval dispersal. Mar Ecol Prog Ser. 340:109-119.
- Costantini F, Fauvelot C, Abbiati M, 2007b. Genetic structuring of the temperate gorgonian coral (*Corallium rubrum*) across the western Mediterranean Sea revealed by microsatellites and nuclear sequences. Mol Ecol. 16:5168–5182.
- Diekmann OE, Bak RPM, Stam WT, Olsen JL, 2001. Molecular genetic evidence of probable reticulate speciation in the coral *Madracis* from a Caribbean fringing reef slope. Mar Biol. 139:221-233.
- Dover G, 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. Nature. 299:111-117.
- Duran S, Pascual M, Turon X, 2004a. Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). Mar Biol. 144:31-35.
- Duran S, Giribet G, Turon X, 2004b. Phylogeographical history of the sponge *Crambe crambe* (porifera, poecilosclerida): range expansion and recent invasion of the macaronesian islands from the Mediterranean Sea. Mol Ecol. 13:109-122.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 39:783–791.

- Féral JP, 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage biodiversity? *J Exp Mar Biol Ecol.* 268:121-145.
- Flot J, Magalon H, Cruaud C, Couloux A, Tillier S, 2008. Patterns of genetic structure among hawaiian corals of the genus *Pocillopora* yield clusters of individuals that are compatible with morphology. *C R Biol.* 331:239-247.
- Forsman Z, Barshis D, Hunter C, Toonen R, 2009. Shape-shifting corals: molecular markers show morphology is evolutionarily plastic in *Porites*. *BMC Evol Biol.* 9:45.
- France SC, Hoover LL, 2001. Analysis of variation in mitochondrial DNA sequences (ND3, ND4L, MSH) among Octocorallia (=Alcyonaria) (Cnidaria: Anthozoa). *Bull Biol Soc Wash.* 10:110-118.
- France SC, Hoover LL, 2002. DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria: Anthozoa). *Hydrobiologia.* 471:149-155.
- Galtier N, Gouy M, Gautier C, 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS.* 12:543-548.
- Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst G, 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol Ecol.* 18:4541-4550.
- Guindon S, Gascuel O, 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 52:696-704.
- Gutiérrez-Rodríguez C, Barbeitos MS, Sánchez JA, Lasker HR, 2009. Phylogeography and morphological variation of the branching octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Mol Phyl Evol.* 50:1-15.
- Hedgecock D, Barber PH, Edmands S, 2007. Genetic approaches to measuring connectivity. *Oceanography.* 20:70-79.
- Hedrick PW, 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends Ecol Evol.* 16:629-636.
- Hellberg ME, Burton RS, Neigel JE, Palumbi SR, 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bull Mar Sci.* 70:273-290.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics.* 17:754-755.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide frequencies. *J Mol Evol.* 16:111-120.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS.* 102:8369-8374
- Le Goff-Vitry M, Pybus O, Rogers A, 2004. Genetic structure of the deep-sea coral *Lophelia pertusa* in the northeast atlantic revealed by microsatellites and internal transcribed spacer sequences. *Mol Ecol.* 13:537-549.

- Ledoux J, Mokthar-Jamaï K, Roby C, Féral J, 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 nuclear diversity and implications for conservation.. Mol Ecol. 19:675–690.
- Márquez LM, Miller DJ, MacKenzie JB, Van Oppen MJH, 2003. Pseudogenes contribute to the extreme diversity of nuclear ribosomal DNA in the hard coral *Acropora*. Mol Biol Evol. 20:1077–1086.
- McFadden CS, Hutchinson MB, 2004. Molecular evidence for the hybrid origin of species in the soft coral genus *Alcyonium* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia). Mol Ecol. 13:1495-1505.
- Müller K, 2005. SeqState - primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. Appl Bioinf. 4, 65-69
- Page RDM, 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci. 12:357-358.
- Parfrey LW, Lahr DJG, Katz LA, 2008. The dynamic nature of eukaryotic genomes. Mol Biol Evol. 25:787-794.
- Posada D, 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol Biol Evol. 25:1253-1256.
- Presa P, Pardo BG, Martinez P, Bernatchez L, 2002. Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. Mol Biol Evol. 19:2161-2175.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J, 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. Mol Biol Evol. 19:2092-2100.
- Rodríguez-Lannety M, Hoegh-Guldberg O, 2002. The phylogeography and connectivity of the latitudinally widespread scleractinian coral *Plesiastrea versipora* in the Western Pacific. Mol Ecol. 11:1177–1189.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 19:1572-1574.
- Sánchez JA, Aguilar C, Dorado D, Manrique N, 2007. Phenotypic plasticity and morphological integration in a marine modular invertebrate. BMC Evol Biol. 7:122.
- Schlötterer C, Tautz D, 1994. Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. Curr Biol. 4:777-783.
- Simmons M, Ochoterena H, 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. Syst Biol. 49:369-381.
- Speksnijder AGCL, Kowalchuk GA, De Jong S, Kline E, Stephen JR, Laanbroek HJ, 2001. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. Appl Env Micro. 67:469-472.
- Stefani F, Benzoni F, Galli P, 2004. Phylogeography of the endemic scleractinian *Cladocora caespitosa* (L., 1767) in the northern Mediterranean Sea. 11th International Coral Reef Symposium; July 7-11, Fort

Lauderdale, Florida, USA.

Su MH, Delany ME, 1998. Ribosomal RNA gene copy number and nucleolar-size polymorphisms within and among chicken lines selected for enhanced growth. *Poultry Sci.* **77**:1748-1754.

Tavaré S, 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: Miura RM editor. *Some mathematical questions in biology - DNA sequence analysis*. Amer. Math. Soc., Providence, RI; p. 57-86

Vollmer S, Palumbi S, 2004. Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics. *Mol Ecol.* **13**:2763-2772.

Wörheide G, Hooper JNA, Degnan BM, 2002. Phylogeography of western Pacific *Leucetta chagosensis* (Porifera: Calcarea) from ribosomal DNA sequences: implications for population history and conservation of the Great Barrier Reef World Heritage Area (Australia). *Mol Ecol.* **11**:1753–1768.

Wörheide G, Epp LS, Macis L, 2008. Deep genetic divergence among Indo-Pacific populations of the coral reef sponge *Leucetta chagosensis* (Leucettidae): founder effects, vicariance or both? *BMC Evol Biol.* **8**:24.

Xiao L-Q, Möller M, Zhu H, 2010. High nrDNA ITS polymorphism in the ancient extant seed plant *Cycas*: Incomplete concerted evolution and the origin of pseudogenes. *Mol Phyl Evol.* **55**:168-177.

Zhang Q, Saghai Maroof MA, Allard RW, 1990. Effects on adaptedness of variations in ribosomal DNA copy number in populations of wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). *PNAS.* **87**:8741-8745

Table legends and figure captions

Table 1: Samples analysed for intra-individual variability. A single individual was analyzed in each sample. The last columns indicate the number of ITS1 PCR clones and the number of different ITS1 sequence types for each individual.

Sampling site	Geographic area	Abbreviation	Geographical coordinates	Depth (m)	Number of ITS1 PCR clones	Number different ITS1 sequences
Sazan	Albania – Adriatic Sea	ALB	40.49 N ; 19.4569 E	58	4	3
Garmenjok Veli Islet	Croatia – Adriatic Sea	GHA	44.5035 N ; 14.4345 E	57	5	5
Ciclón de Fuera	Ceuta / North Africa (Alboran Sea)	FUE	35.9036 N ; 5.3042 W	25-30	3	2
Cueva del Coral	Ceuta / North Africa (Alboran Sea)	DEL	35.9083 N ; 5.3314 W	42	4	4
Palazzu	Corsica	PZU	42.3802 N ; 8.5464 E	22	3	1
Llosa des Patro Pere	Balearic Islands (Minorça)	LPP	40.0726 N ; 4.1075 E	34-36	7	6
Riou (inside cave)	Marseille – France	RII	43.1729 N ; 5.3894 E	20	1	1
Riou (outside cave)	Lion's Gulf Marseille – France	RIE	43.1728 N ; 5.3894 E	20	5	5
Monaco	Lion's Gulf Monaco	MON	43.7349 N ; 7.4334 E	35-38	6	6
Sec Rederis	Ligurian Sea Banyuls – France Catalonia	SRE	42.4641N ; 3.1666 E	23-24	7	7

Fig. 1:

Maximum likelihood phylogenetic tree of ITS haplotypes in red coral. Tree rooted at midpoint (no outgroup). Haplotype numbers are those of Costantini et al. (2007b); three-letter abbreviations (in bold capitals) are sequences obtained from present study (Table1); different sequences cloned in an individual were assigned different small alphabetical letters. Geographical origin of haplotypes indicated on the right panel [see Table 1 and Costantini et al. (2007b) for precise locations]. Numbers in italics at a node are its bootstrap score (above branch, in %) and its Bayesian posterior probability (below branch); only values of bootstrap above 60% and probabilities above 0.7 are reported. Scale bar: 0.01 substitution per nucleotide site.

