

**Evaluation de la diversité et de la connectivité génétique de
Zostera noltii dans l'étang de Berre.
Comparaison à d'autres sites de Méditerranée occidentale.**

Groupement d'Intérêt Public pour la Réhabilitation de l'étang de Berre
Cours Mirabeau – 13130, Berre l'étang (France)

Guillaume Bernard
Tel. (33)4.42.74.15.51 – Fax (33)4.42.74.07.95
guillaume.bernard@gipreb.fr

Stazione Zoologica Anton Dohrn
Villa Comunale – 80121, Napoli (Italy)

Gabriele Procaccini
Group of Evolutionary Ecology of Marine Organisms (P.I.) - Functional and Evolutionary Ecology Lab
Tel. ++ 39 081 5833363 - Fax. ++39 081 7641355
gpro@szn.it

Juillet 2010

1. Introduction – Contexte et objectifs de l'étude

Au début du 20^{ème} siècle, l'étang de Berre était un milieu écologiquement riche avec une végétation typique d'un milieu lagunaire méditerranéen, les herbiers de *Zostera* étaient bien représentés et occupaient ainsi la majeure partie des fonds de l'étang, de la surface à 6-7 m de profondeur ; leur surface à l'époque est estimée à plus de 6 000 ha.

L'industrialisation des rives, l'augmentation de la turbidité, les pollutions chimiques de l'eau et des sédiments et la mise en service de la centrale hydro-électrique de Saint-Chamas en 1966, ont entraîné une dégradation de la flore et la régression des herbiers de *Zostera*. Malgré la réduction drastique des rejets polluants industriels depuis les années 70, la mise en conformité des systèmes d'assainissement et la limitation, en 1993, des apports d'eau douce et de limons de la Durance, la régression des herbiers de *Zostera* s'est poursuivie. Les ceintures continues d'herbier ont progressivement laissé la place à des taches reliques, de taille métrique à décamétrique, cantonnées à quelques secteurs de l'étang, principalement le long de la face est du Grand Etang. Dès 1998, les herbiers de *Zostera* ne couvraient plus qu'une surface de 1.5 ha et pouvaient être considérés comme fonctionnellement éteints. Depuis 2005, les apports en nutriments ont encore diminué, la salinité de l'étang s'est stabilisée entre 20 et 30 et la transparence de l'eau semble s'être améliorée, pourtant, on n'observe pas de recolonisation significative des fonds.

Il est probable que les herbiers de *Z. noltii*, seule espèce de *Zostera* encore présente dans l'étang de Berre se situent en-deçà du seuil écologique qui leur permettrait, dans les conditions du milieu actuelles, de se développer à grande échelle et de recoloniser les zones potentiellement favorables (en termes de substrat, d'agitation et de lumière disponible). Dans ces conditions, l'hypothèse la plus probable est donc, à court terme, le maintien des herbiers de *Zostera noltii* à un niveau proche de leur niveau actuel, ou avec une faible progression de proche en proche, et donc une certaine inertie du système. Une inconnue subsiste, toutefois, dans la capacité qu'auraient des propagules de *Z. noltii* et/ou *Z. marina*, en provenance du golfe de Fos voisin, à se déposer sur le fond et à se développer pour créer de nouvelles colonies ponctuelles, à la faveur d'une salinité plus élevée et de l'amélioration de la transparence de l'eau.

L'extinction des herbiers de *Zostera* dans l'étang de Berre résulte de plusieurs facteurs ayant agi simultanément ou en synergie, au cours des dernières décennies. Pour autant, les herbiers qui subsistent, à l'état de vestiges, sont principalement localisés dans la partie Nord-Est de l'étang et sont isolés du point de communication avec la mer ouverte, et de fait, d'avec les vastes herbiers de *Zostera* présents dans le golfe de Fos (Anse de Carteau). L'appauvrissement génétique du à l'isolement géographique pourrait-il jouer un rôle dans l'absence de recolonisation des herbiers de l'étang de Berre ?

L'objectif de cette étude est de caractériser la structure génétique des populations de *Zostera* de l'étang de Berre et d'en retracer l'histoire, notamment en les comparant avec d'autres populations

comme les herbiers du golfe de Fos (Anse de Carteau). Cette comparaison sera étendue à d'autres secteurs géographiques de Méditerranée occidentale.

Les résultats de cette étude pourront également venir alimenter la réflexion en cours sur les possibilités de restauration active des herbiers de *Zostera* de Berre. En effet, dans le cas de réimplantation, la variabilité génétique des populations sources s'est avérée un facteur essentiel dans la définition des stratégies de restauration.

2. Méthodes

2.1 Sites d'étude

Populations échantillonnées :

- Dans l'étang de Berre Delta de l'Arc (Arc) et Pointe de Berre (Ber) 40 échantillons par site ;
- Dans l'anse de Carteau (Car) 40 échantillons.
- Dans la lagune du Brusc (40)

Comparaison des résultats avec trois autres sites de Méditerranée (pour 6 des 9 loci) :

- Livorno (Liv) 26 échantillons ;
- Civitavecchia (Civ) 38 échantillons ;
- Ischia (Is) 99 échantillons.



Figure 1. Localisation des sites échantillonnés (Car), (Arc), (Ber), (Liv), (Civ), (Is) en 2009 pour l'évaluation de la diversité génétique de *Z. noltii*.

2.2. Prélèvement et conditionnement des échantillons

Sur chaque site d'étude, 40 individus ont été collectés en plongée sous-marine, à une profondeur de 1 m environ. Les feuilles sont séchées, découpées, les tronçons de feuille sont placés dans des tubes de 1.7 ml contenant du silica-gel pour dessiccation et stockage. Au moment du prélèvement les paramètres de vitalité de l'herbier échantillonné sont relevés : densité de faisceaux, biomasse épigée, biomasse endogée, surface utile (LAI).



Figure 2. Rhizomes et faisceaux de feuilles (= 1 individu) collectés pour l'analyse de la diversité génétique.

2.3. Extraction de l'ADN et développement des micro satellites

Pour chaque individu, une fraction de quelques cm² de feuille est isolée, l'ADN génomique est extrait selon une procédure automatisée, optimisée pour les phanérogames marines (Tomasello *et al.*, 2009). La procédure est basée sur l'utilisation du kit pour végétaux NucleoSpin (Macherey-Nagel), adapté pour une application sur la plate-forme automatisée Biomek FX (Beckman Coulter, Fullerton CA) équipée d'un bras robotisé, d'une machine à PCR et d'un carrousel à plaques. Chaque fragment d'ADN est PCR-amplifié pour 9 spécifiques microsatellites-loci (Coyer *et al.*, 2004).

Les microsatellites sont des courtes séquences d'ADN des chromosomes ou de nucléotides, formées de la répétition d'un motif lui-même constitué de une à quatre bases (mono, di, tri ou tetra tandem). Très polymorphes, ce sont de bons marqueurs pour la cartographie génétique. Ici, le terme locus¹ se

¹ Un locus est un emplacement physique précis et invariable sur un chromosome, et par extension la carte factorielle le représentant. Un locus peut être un endroit du chromosome où se situe un gène ou, comme ici, une séquence de micro satellite.

réfère aux micro-satellites et non aux gènes. Pour chaque locus, plusieurs allèles peuvent être présents.

En effet, les méthodes d'évaluation des états alléliques et des génotypes ne concernent pas tous les loci. On n'étudie une population qu'à travers les loci pour lesquels les génotypes sont faciles à distinguer. L'analyse des fragments a été réalisée sur un analyseur d'ADN Beckman Coulter CEQ 2000XL.

L'analyse des profils d'électrophorèse a été réalisée avec le logiciel Beckman CEQ 2000 ver. 3.0. L'attribution allélique est affinée en fonction des jeux de données existants.

2.4 Traitement des données

Les statistiques descriptives portent sur la diversité génétique intra-sites (nombre d'allèles, hétérozygotie) et inter-sites (distance génétique, paramètres du gene-flow, CFA) elles ont été calculées avec le programme GENETIX 4.02 (<http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>) (Belkhir et al. 2001). Par ailleurs, les test d'assignation ont été réalisés avec le logiciel GenClass 2.0 (Piry et al., 2004) de manière à établir la direction des flux de gènes entre populations.

L'hypothèse de "goulot d'étranglement" des populations isolées a été testée, ainsi que la présence éventuelle de « consanguinité ».

3. Résultats

La première section des résultats se réfère uniquement aux quatre populations collectées en France.

Une population est souvent définie comme un ensemble d'individus de la même espèce, de même niveau de ploïdie, de même mode de reproduction et occupant le même habitat. Le polymorphisme génétique d'une population représente la réserve de variabilité nécessaire qui permet à la population de s'adapter à de nouvelles conditions du milieu. La variabilité génétique reste, donc, le garant de la colonisation d'habitats. L'un des facteurs du maintien du polymorphisme des populations réside dans l'effet de l'hétérosis qui peut être définie comme l'avantage déterminé par l'état hétérogène de nombreux loci.

L'évolution des distances génétiques entre les populations nécessite d'abord, l'étude de leur polymorphisme séparément. Ainsi, l'étude de la variabilité intrapopulation précède toujours l'étude de la variation interpopulations.

3.1 Expression de la diversité génétique au niveau intrapopulation

Pour un locus donné, on détermine les différents génotypes présents dans une population. Ceci permet de définir les fréquences génotypiques (Tab. 1), et dans le cas d'espèces diploïdes, d'en déduire les fréquences alléliques².

La proportion de locus polymorphes, encore appelée taux de polymorphisme ou polymorphisme (P), rend compte de la proportion de loci variables par rapport à l'ensemble des protéines étudiées. Une population sera dite polymorphe pour un locus donné si la fréquence allélique de l'allèle le plus fréquent est inférieure à 95%. La signification biologique du polymorphisme pourrait servir pour l'explication des facultés d'adaptation des populations à des milieux hétérogènes dans le temps et dans l'espace. Le nombre moyen d'allèles par Locus, appelé également taux d'allélisme, est un paramètre de diversité particulièrement important pour les stratégies de conservation. Il était notamment utilisé dans la gestion des collectes et banques de semences.

Tableau 1. Fréquences génotypiques et fréquences alléliques des populations de Carteau, Arc, Berre et Brusc. N (nb. d'individus), G (nb. de génotypes), G/N (fréq. Géotyp.), A/Locus (fréq. Allél.), SE ().

	N	G	G/N	A/Locus	SE	Private alleles
Car	40	39	0.975	4.111	0.716	11
Ber	40	32	0.8	4.000	0.553	7
Arc	40	23	0.575	2.889	0.351	2
Bru	40	37	0.925	2.778	0.324	6

La population de l'Arc, montre le plus faible nombre de génotypes (23 sur 40 individus prélevés). Les populations de l'Arc et du Brusc présentent le plus faible pourcentage d'allèles par locus.

L'hétérozygotie (H.obs.) peut être calculée à partir de la fréquence mesurée des hétérozygotes (nombre d'individus hétérozygotes³ divisé par le nombre total d'individus de l'échantillon). Elle peut alors être comparée à la fréquence théorique des hétérozygotes (H.exp.). Si plusieurs loci sont concernés on considère la moyenne de toutes les valeurs de H.

Pour les populations de Carteau, de l'étang de Berre et du Brusc, les valeurs d'hétérozygotie sont élevées, mais ne diffèrent pas significativement d'une population à l'autre (Tab. 2).

² On appelle allèles les différentes versions d'un même gène ou d'un même micro satellite. Chaque allèle se différencie par une ou plusieurs différences de la séquence de nucléotides. Ces différences apparaissent par mutation au cours de l'histoire de l'espèce, ou par recombinaison génétique

³ Un organisme est hétérozygote pour un gène quand il possède deux allèles différents de ce gène ou micro satellite sur un même locus pour chacun de ses chromosomes homologues

Tableau 2. Hétérozygotie moyenne sur les locus.

	H. exp.	H. n.b.	H. obs.	P(0.95)	P(0.99)
Car40	0.4722	0.4783	0.4834	0.7778	0.7778
Ecart-type	0.2812	0.2848	0.3593		
Ber33	0.5156	0.5237	0.4790	0.8889	0.8889
Ecart-type	0.2865	0.2910	0.2885		
Arc25	0.4425	0.4519	0.5507	0.8889	0.8889
Ecart-type	0.2297	0.2347	0.2942		
Bru37	0.4195	0.4252	0.4614	0.8889	0.8889
Ecart-type	0.2323	0.2355	0.2779		

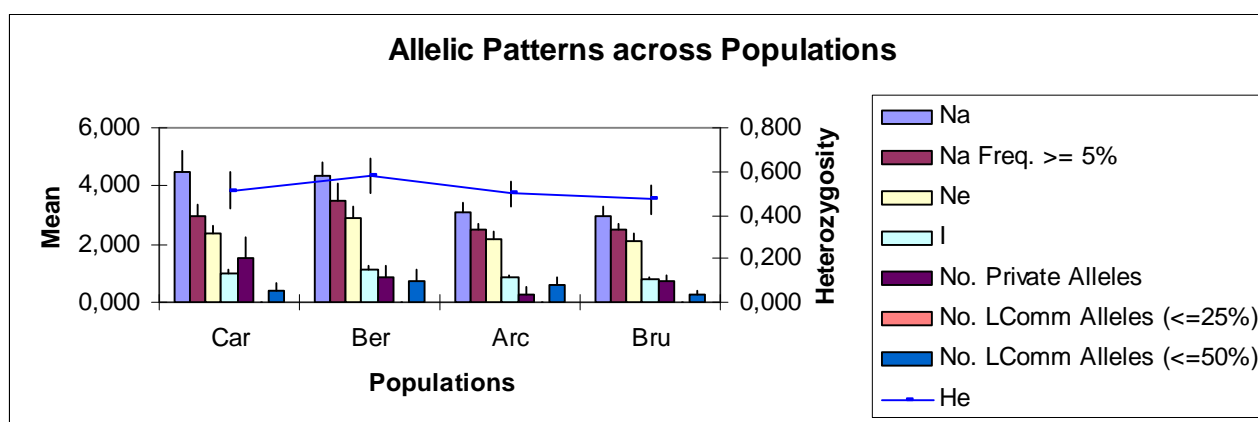


Figure 3. Expression de la diversité génétique au niveau intrapopulation.

3.2 Expression de la diversité génétique au niveau inter populations et distance génétique.

Le paramètre F_{IS} de Wright, dénommé indice de fixation (anciennement coefficient de consanguinité) est calculé d'après l'hétérozygotie observée (H.obs.) et attendue (H.exp.). Il reflète la différenciation des individus à l'intérieur des populations ($F_{IS} = 1$ signifie fixation complète, cas d'autofécondation ; $F_{IS} < 1$ homozygotie excédentaire ; $F_{IS} = 0$ équilibre de Hardy-Weinberg⁴ ; $F_{IS} < 0$ hétérozygotie excédentaire).

L'indice F_{ST} , ou indice de fixation (Wright), est défini comme l'hétérogénéité des fréquences alléliques entre subdivisions d'une population. Soit T un ensemble de formé de S populations dont chacune est composée de I individus, la différenciation des populations par rapport au total (F_{ST}) est calculée en fonction des paramètres F_{IS} (différenciation des individus à l'intérieur des populations) et F_{IT} (différenciation des individus par rapport au total) :

⁴ Le principe de (Castle-) Hardy-Weinberg ou la loi ou le modèle du même nom est une théorie qui postule qu'il y a un équilibre de la fréquence des allèles et des génotypes au cours des générations.

- $0 < F_{ST} < 0.05$: différenciation faible
- $0.05 < F_{ST} < 0.15$: différenciation modérée
- $0.15 < F_{ST} < 0.25$: différenciation importante
- $F_{ST} > 0.25$: différenciation très importante

La valeur de l'indice de fixation (F_{IS} proche de 0) confirme que les populations de Carteau, de l'étang de Berre et du Brusca sont en équilibre de Hardy-Weinberg, ce qui suggère une reproduction sexuée efficace et un faible taux de « consanguinité ». Par ailleurs, on note une différenciation importante entre les 4 populations (Tab. 2).

Tableau 2. Indices de fixation de Wright (selon les formules de Weir & Cockerham, 1984) pour les quatre populations de l'Arc, Berre, Carteau et Brusca.

F_{IS}	$F_{IS} = -0.04266$	estime la corrélation des gènes chez les individus dans une population
F_{IT}	$F_{IT} = 0.22787$	estime la corrélation des gènes chez les individus
F_{ST}	$F_{ST} = 0.25946$	estime la corrélation des gènes entre individus dans une population par rapport à l'ensemble des populations

La comparaison par paire des 4 populations montre que les populations de l'Arc et de Berre sont plus proches que celles de Carteau et du Brusca (Tab. 3).

Tableau 3. Matrice des comparaisons par paire (F_{ST} via la fréquence)

	CAR	BER	ARC	BRU
CAR	0			
BER	0.112	0		
ARC	0.140	0.063	0	
BRU	0.196	0.172	0.159	0

L'Analyse des Correspondances Principales permet également de visualiser la différenciation de la population du Brusca par rapport aux sites de l'étang de Berre (Arc, Berre) et de l'anse de Carteau (Fig. 4). Les populations de l'Arc et de Berre semblent, en effet, relativement proches. L'analyse portant sur l'ensemble des génotypes individuels et plus seulement les moyennes (Fig. 5), ainsi que l'Analyse Factorielle des Correspondances (Fig. 6) donnent des résultats similaires.

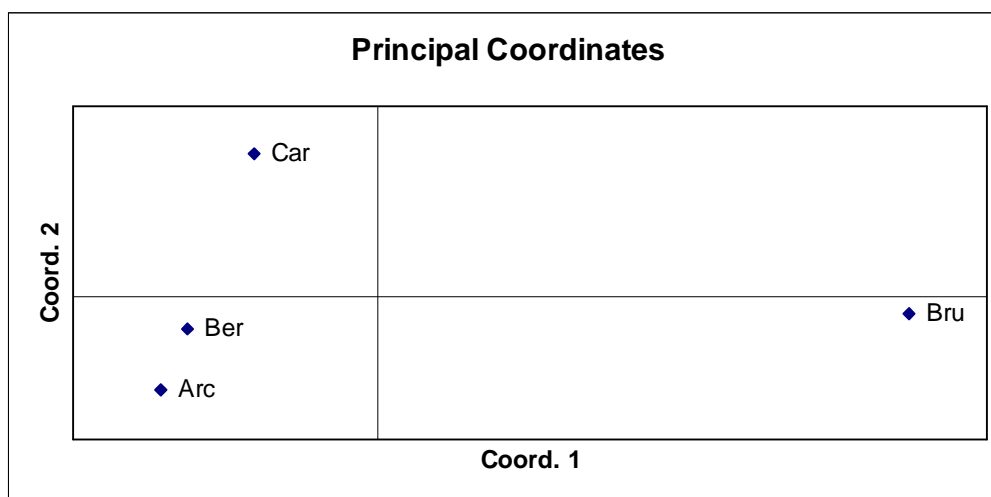


Figure 4. Résultats de l'ACP (valeurs moyennes).

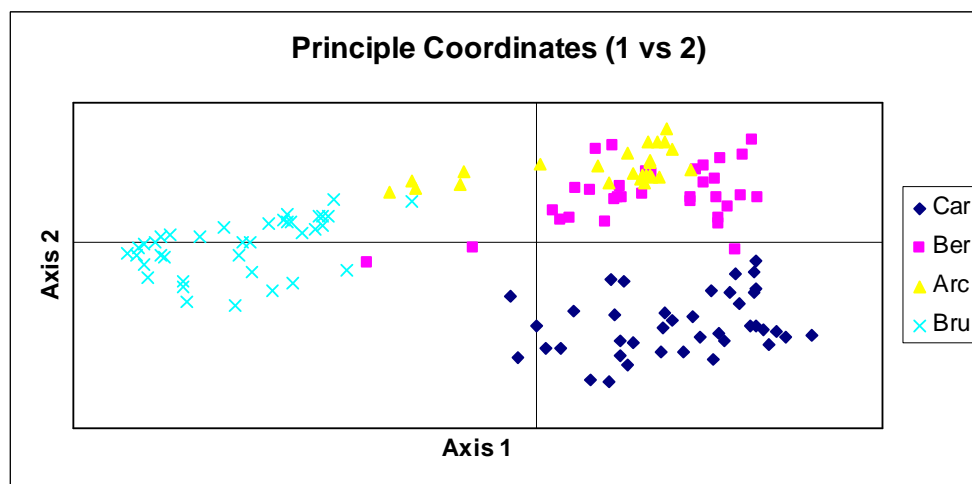


Figure 5. Résultats de l'ACP (pour l'ensemble des génotypes individuels).

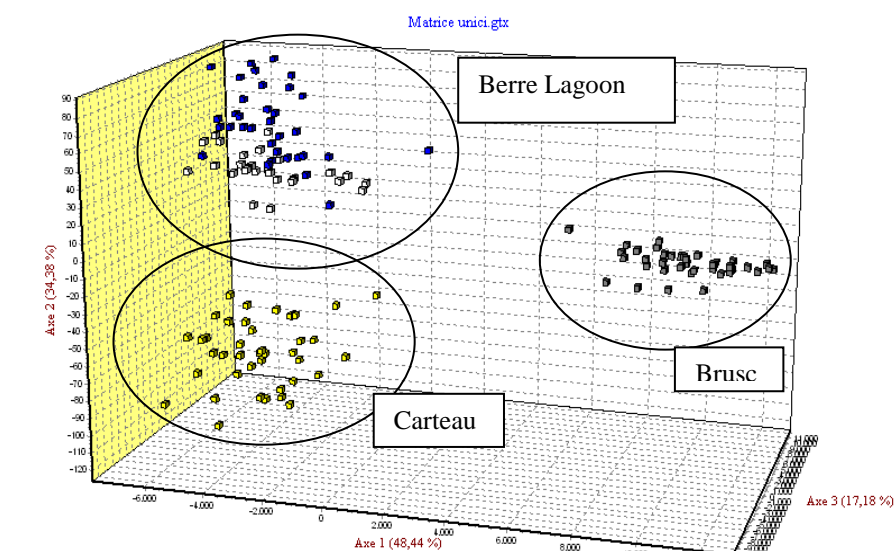


Figure 6. Analyse Factorielle des Correspondances pour l'ensemble des génotypes individuels des populations de l'Etang de Berre (Arc et Berre), de l'anse de Carteau et du Brusc.

En se basant sur les fréquences alléliques, les degrés de ressemblance et de dissemblance des structures génétiques entre les populations peuvent être évalués, notamment par l'indice d'identité de Nei⁵ (1972). La proximité génétique des populations de l'Arc et de Berre par rapport aux populations de Carteau et du Brusuc est confirmée (Tab. 4 ; Tab. 5 ; $D = -\ln I$).

Tableau 4. Matrice des comparaisons par paire (Identité génétique Nei).

	CAR	BER	ARC	BRU
CAR	1			
BER	0.680	1		
ARC	0.620	0.823	1	
BRU	0.503	0.524	0.586	1

Tableau 5. Matrice des comparaisons par paire (Distance génétique Nei).

	CAR	BER	ARC	BRU
CAR	0			
BER	0.386	0		
ARC	0.477	0.195	0	
BRU	0.687	0.646	0.534	0

Par ailleurs, il est possible de quantifier le flux de gènes entre populations, dans un modèle théorique dit « en île », par le calcul du nombre de migrants par génération (N_m)⁶. Plus la valeur de N_m est supérieure à 1, plus l'échange de gènes est important (Tab. 6).

Tableau 6. Matrice des N_m par paires pour les populations de l'Arc de Berre, de Carteau et du Brusuc.

	BER	ARC	BRU
CAR	0.97	0.72	0.52
BER		1.88	0.60
ARC			0.59

Si les populations de l'Arc et de Berre semblent en communication, pour autant le gene-flow n'est que partiellement actif dans l'étang, seuls quelques individus de la population de l'Arc peuvent être assignés à la population de Berre et vice-versa (Fig. 7).

⁵ La distance de Nei permet de transformer les fréquences génétiques en distance entre populations.

⁶ N_m est mesuré à partir de G_{ST} (ou Theta) paramètre analogue au F_{ST} .

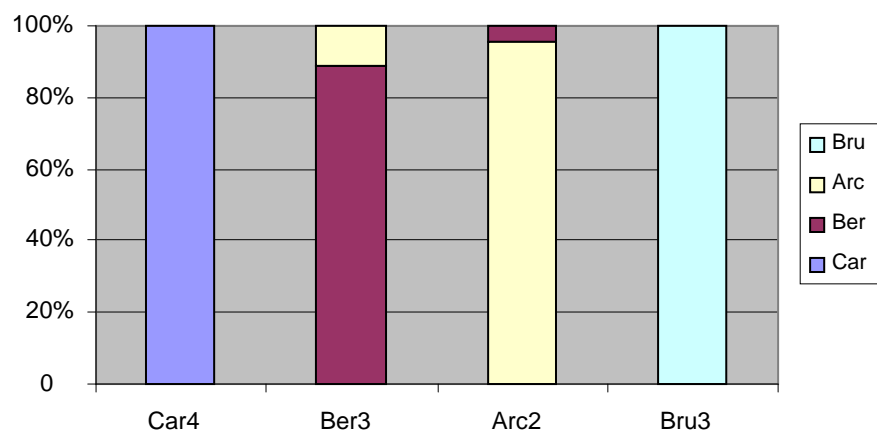


Figure 7. Résultats du test d'assignation entre les populations de l'Arc, de Berre, de Carteau et du Brus.

La fréquence des allèles locus par locus pour chacune des 4 populations est données en annexe 1.

3.3 Expression de la diversité génétique des populations de l'étang de Berre en comparaison à d'autres sites méditerranéens.

L'intégration de deux populations supplémentaires à l'Analyse en Composante Principale (Civitavecchia et Livorno pour 9 loci) met nettement en évidence la différenciation des populations les unes par rapport aux autres (Fig. 8).

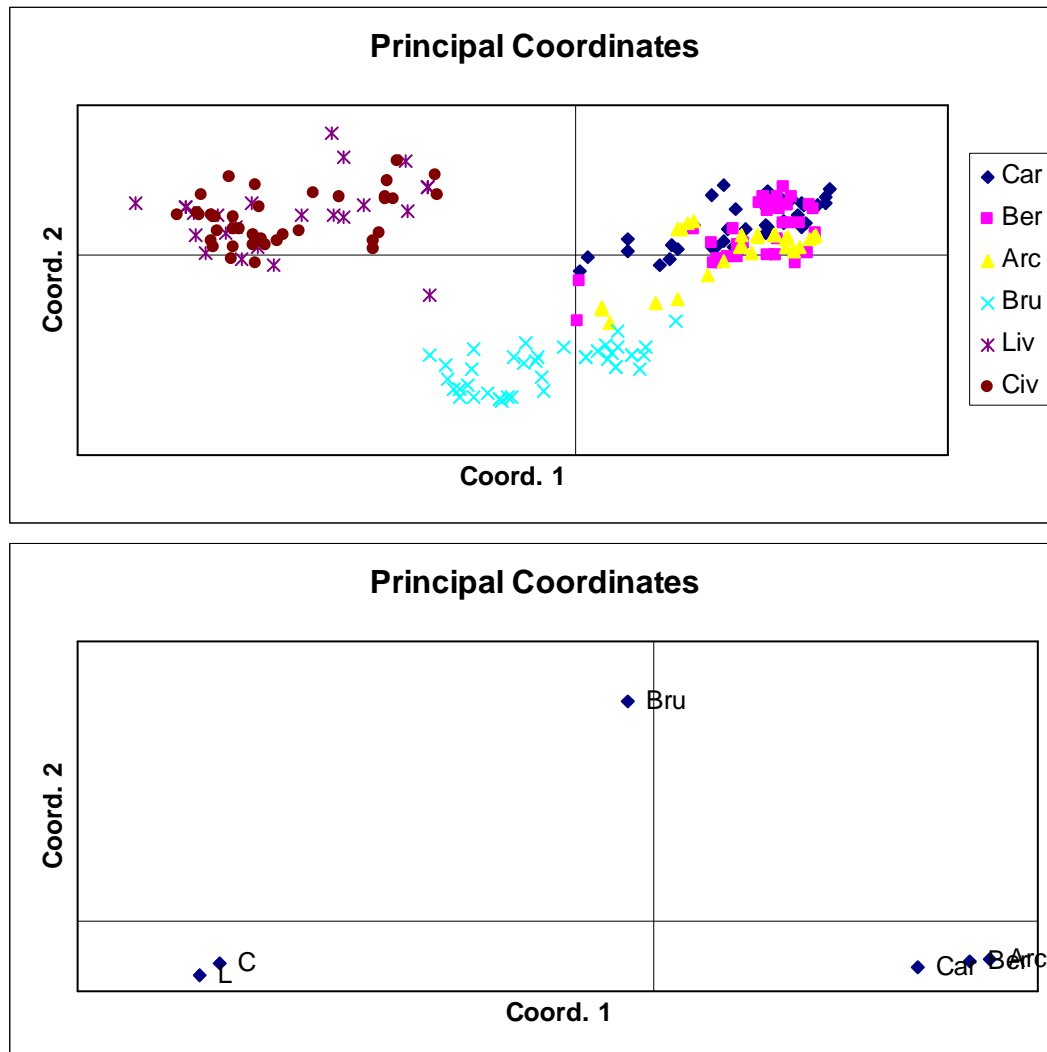


Figure 8. Résultats de l'ACP pour l'ensemble des génotypes individuels et pour les valeurs moyennes pour les 6 populations (Car, Arc, Ber, Bru, Civ, Liv).

Si l'on inclut également dans l'analyse la population d'Ischia (6 loci) à l'analyse, on met en évidence l'existence d'un gradient le long de l'axe Tyrrhénien et vers l'ouest, le long duquel se différencient les populations françaises des populations Tyrrhéniennes.

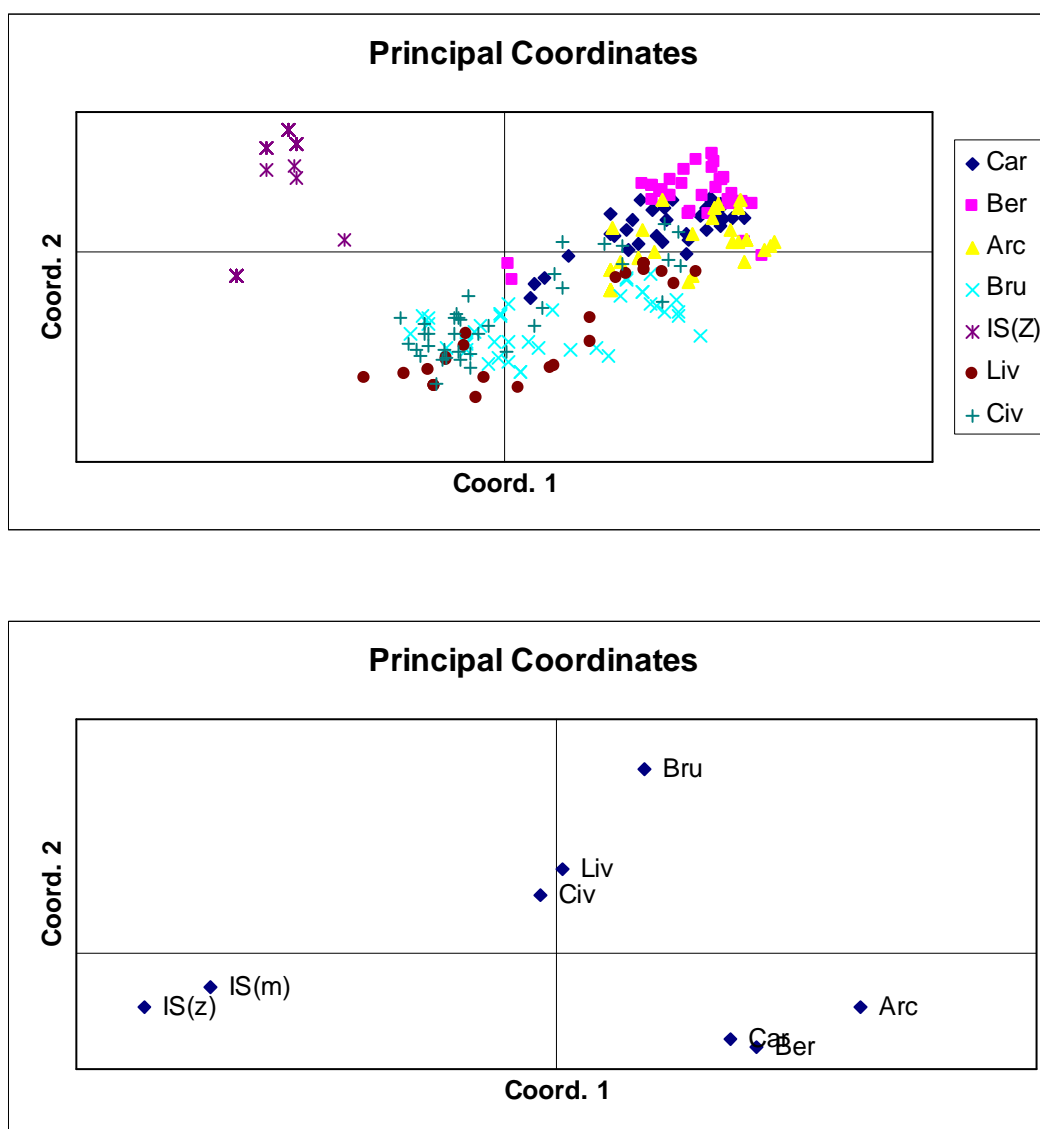


Figure 9. Résultats de l'ACP pour l'ensemble des génotypes individuels et pour les valeurs moyennes pour les 7 populations (Car, Arc, Ber, Bru, Civ, Liv, IS).

L'analyse des distances génétiques confirme cette distribution (Tab. 7).

Tableau 7. Matrice des comparaisons par paire (Distance génétique Nei).

	Car	Ber	Arc	Bru	IS(m)	IS(z)	Liv	Civ
Car	0,000							
Ber	0,596	0,000						
Arc	0,751	0,251	0,000					
Bru	1,086	0,926	0,707	0,000				
IS(m)	1,621	1,347	1,075	1,129	0,000			
IS(z)	1,889	1,397	1,318	1,207	0,106	0,000		
Liv	1,249	1,096	0,757	0,711	1,196	1,664	0,000	
Civ	1,102	0,927	0,720	0,619	0,900	1,287	0,457	0,000

Les tests d'assignation montrent des connections entre les deux populations de Ischia, entre celles de Civitavecchia et Livorno, et entre celle de l'Arc et de Berre. Seul un génotype de la population de Carteau est commun à la population de Civitavecchia.

A titre de comparaison, les populations de Ischia présentent le plus faible taux de polymorphisme, mais il s'agit d'herbiers mixtes à *Zostera noltii* et *Cymodocea nodosa* qui disparaissent totalement en hiver. Parmi l'ensemble des autres sites, les populations de l'Arc et de Berre restent les moins diversifiées (Tab. 8).

Tableau 8. Taux de polymorphisme des 7 populations échantillonnées. N (nb. d'individus), G (nb. de génotypes), R (?), Nb. d'allèles, (?), P (?).

	N	G	R	N. Alleles	Private alleles	%P
Car	40	37	0.9	31	5	100%
Ber	40	30	0.744	29	7	100%
Arc	40	20	0.475	19	1	100%
Bru	40	37	0.923	19	3	100%
Liv	26	22	0.84	30	6	100%
Civ	38	38	1	34	6	100%
Is (M)	90	5	0.04	26	4	100%
Is (Z)	99	8	0.07	20	0	100%

Conclusions et perspectives

L'analyse de la diversité génétique a été réalisée sur les herbiers de *Zostera noltii* de 4 sites en Méditerranée française dont deux dans l'étang de Berre et trois sites de la mer Tyrrhénienne. Les résultats mettent clairement en évidence :

1. Une forte hétérozygotie, dans l'ensemble des populations étudiées, ce qui témoigne d'une reproduction sexuée active et d'un faible taux de consanguinité au sein de chacune des populations ;
2. L'isolement des herbiers de l'étang de Berre (populations du delta de l'Arc et de la pointe de Berre) d'avec les populations de mer ouverte (anse de Carteau, lagune du Brusca) ;
3. Pour l'étang de Berre, un nombre d'allèles inférieur et un niveau de diversité génétique plus faible dans la population de l'Arc, ce qui peut avoir des conséquences sur la persistance de cet herbier. Pour autant, les deux populations de l'Arc et de la Pointe de Berre sont en relation, avec une proportion (faible) de génotypes communs ;
4. Enfin, l'existence d'une structure génétique le long d'un arc côtier de l'est vers l'ouest, avec une différenciation nette des populations sud-tyrrhéniennes, nord-tyrrhéniennes, du Brusca et des populations encore plus à l'ouest, anse de Carteau, étang de Berre.

L'isolement géographique de l'étang de Berre par rapport à la mer ouverte, ou les conditions environnementales pourraient-ils être à l'origine de « l'appauvrissement » génétique des populations en place ?

Il est ainsi proposé de poursuivre cette étude, en y incluant les individus de *Z. noltii* prélevés dans l'anse de Carteau et transplantés dans l'étang de Berre en juin 2009 et préciser alors :

- Si les conditions du milieu peuvent être à l'origine d'un appauvrissement génétique des populations transplantées depuis l'anse de Carteau ;
- Si à l'inverse, l'introduction d'un pool génétique nouveau, par les transplants, conduit à une augmentation de la diversité génétique des populations de l'Arc et Berre déjà en place, et donc à leur « renforcement » génétique.

Annexe 1.

Fréquence des allèles locus par locus pour chacune des populations.

