



HAL
open science

Etude des processus de spéciation associés à une zone de transition biogéographique : exemple de l'algue brune *Lessonia nigrescens*

Florence Tellier

► **To cite this version:**

Florence Tellier. Etude des processus de spéciation associés à une zone de transition biogéographique : exemple de l'algue brune *Lessonia nigrescens*. Biodiversité. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT : 2009PA066765 . tel-00814626

HAL Id: tel-00814626

<https://theses.hal.science/tel-00814626>

Submitted on 29 Apr 2013

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

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

Avertissement

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



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Diversité du vivant

Présentée par

Mlle Florence TELLIER

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'université Pierre et Marie Curie

**Etude des processus de spéciation
associés à une zone de transition biogéographique :
exemple de l'algue brune *Lessonia nigrescens***

Soutenue le vendredi 10 juillet 2009

Devant le jury composé de :

Mme Anne ATLAN, Chargée de Recherches, CNRS Rennes	(Rapporteur)
M. Elie POULIN, Professeur, Universidad de Chile, Santiago	(Rapporteur)
M. Bernard KLOAREG, Professeur, Université Pierre et Marie Curie	(Président du jury)
Mme Myriam VALERO, Directrice de Recherches, CNRS Roscoff	(Directrice de thèse)
M. Sylvain FAUGERON, Professeur, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago	(Directeur de thèse)



**TESIS DE DOCTORADO DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CHILE**

**“ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE ESPECIACION ASOCIADOS A
UNA ZONA DE TRANSICION BIOGEOGRAFICA: EJEMPLO DEL
ALGA PARDA *LESSONIA NIGRESCENS*”**

para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas mención Ecología

Presentada el 10 de julio de 2009 por

FLORENCE TELLIER

Directores de tesis: Sylvain Faugeron, Pontificia Universidad Católica de Chile
Myriam Valero, Universidad Pierre et Marie Curie

Comisión de tesis: Anne Atlan
Elie Poulin
Bernard Kloareg

Remerciements *Agradecimientos*

A l'image de ces presque quatre ans de thèse, les remerciements sont forcément bilingues !

Siguiendo la tradición de estos cuatros años de tesis, los agradecimientos no pueden ser otros que bilingües!

Je tiens à remercier très sincèrement mes directeurs de thèse, Myriam Valero et Sylvain Faugeron, de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je remercie Myriam en particulier pour sa patience, pour m'avoir laissée partir autant de temps au Chili, pour avoir autant insisté pour que j'aborde des parties qui me paraissaient parfois secondaires au premier abord. Je remercie Sylvain spécialement pour m'avoir toujours poussée vers l'avant au jour le jour surtout durant ces derniers mois et pour avoir facilité mes séjours au Chili. J'ai eu vraiment la chance d'avoir des directeurs de thèse disponibles, exigeants (j'ai beaucoup appris) et qui acceptent que je ne sois pas toujours d'accord ! J'ai également beaucoup apprécié leur soutien dans les heures difficiles de fin de thèse.

Je souhaite également remercier les membres du jury de thèse : Bernard Kloareg, Anne Atlan et Elie Poulin pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Cette thèse en cotutelle a été le fruit d'une véritable collaboration entre les deux laboratoires d'accueil, à travers le Laboratoire International Associé « LIA DIAMS » (Dispersal and Adaptation in Marine Species). J'ai pu bénéficier des outils des conseils et de l'aide des deux équipes tout au long de mon travail.

Esta tesis en cotutela ha sido el resultado de una real colaboración entre los dos laboratorios, gracias al Laboratorio Internacional Asociado "LIA DIAMS" (Dispersal and Adaptation in Marine Species). Me he podido beneficiar de las herramientas y de los consejos de ambos grupos de trabajo durante toda mi tesis doctoral.

Je tiens à remercier Marie Donatien, de l'école doctorale Diversité du Vivant à l'UPMC, qui a vraiment facilité toutes mes démarches administratives, en particulier lors de mes séjours au Chili. L'aide apportée par Céline Manceau a également facilité les choses.

Agradezco a María Teresa Pino por su ayuda en el entendimiento del funcionamiento de la universidad y por su paciencia cuando yo no entendía todo del español. También a María Teresa González y las secretarias del Departamento de Ecología que me ayudaron en las partes administrativas y logísticas de la tesis, a veces con terrenos de última hora.

Cette thèse, c'est beaucoup de kilomètres parcourus... Six aller-retour France-Chili, certains prévus, d'autres non ; certains pour aller prendre l'air roscovite, d'autres pour « aller à la mer », ou encore juste pour aller faire la fête en Lorraine. Egalement beaucoup de kilomètres parcourus au Chili, d'Arica au nord, à Chiloé au sud la première année, à la découverte de régions désertiques aux régions pluvieuses. Egalement des terrains plus « répétitifs » et plus lourd, comme l'expérience de transplantations réciproques. Mais quelle belle surprise de voir la région de Coquimbo en fleur au printemps pour le dernier terrain !

Para realizar los trabajos expuestos en este manuscrito de tesis, se recorrieron un montón de kilometros, tantos que ni los puedo calcular! De norte a sur y del desierto a los lagos durante el primer año de tesis. También hubo terrenos más "repetitivos" y más pesados, como el experimento de trasplantes recíprocos. Pero que buena sorpresa fue ver la región de Coquimbo florecida en la primavera durante el último terreno! Y qué bueno fue estar acompañados por delfines, chungungos y pingüinos durante las vacaciones de Guru-Guru...

Une grosse partie de ce travail de thèse n'aurait pas pu être réalisée sans l'aide de nombreuses personnes sur le terrain : pour échantillonner pour l'étude de phylogéographie mais aussi et surtout pour conduire, percer, visser, marteler, coudre, mesurer et annoter lors de l'expérience de transplantation. Les « aventures » (comme dirait Paul !) de terrain ont fait partie aussi du travail : double crevaison dans une zone désertique, ensablage de 4x4, et les « majeradas »...

Gran parte de este trabajo de tesis no habría sido posible sin la ayuda de numerosas personas en el terreno: para muestrear en el estudio de filogeografía, pero también para manejar, hacer hoyos, tornillar, martillar, coser, medir y anotar durante el experimento de transplatación. Este trabajo de equipo ha sido incentivado gracias a los esfuerzos constantes de Juan Correa y Sylvain Faugeron. Gracias Juan por toda la ayuda durante esta tesis, ya luego viene el famoso “gâteau” de fin de tesis!!

Me ayudaron para este trabajo en particular: Santiago Andrade, Jessica Beltran, Max Blondel, Carolina Camus, Ismael Cáceres, Max Daigre, Paul Faugeron, Alex Gamera, Gonzalo Gomez, Alejandra González, Marie-Laure Guillemain, Ana Lafuente, Erasmo Macaya, Andrés Meynard, René Monsalvo, Valeria Oppliger, Akira Peters, Jordi Plana, Patricio Saavela, Daniela Thomas, y personas de la U. Católica del Norte: Julio Vásquez, Carolina Olivares, Roxana, Nicole, Nicolas, Horacio y Alonso. Tengo un agradecimiento MUY especial para Paula Ayerdi, quien me ayudó mucho en los transplantes. Gracias por tu apoyo, por los miles de kilómetros en todas condiciones (!), por este viaje al “paraíso” de flores... Mucha suerte a ti y al Isma en la Beca Chile!!

La partie de biologie moléculaire a été réalisée avec la collaboration de Claire Daguin, à Roscoff, et de Gioco Peralta à Santiago, qui permettent le bon fonctionnement des laboratoires. Merci aussi à Sophie Plouviez pour m'avoir enseigné les joies du clonage !

En la aventura de los microsátélites, fueron parte David Veliz, Claire Daguin, Gioco Peralta, Eva Mayol, y por supuesto Myriam, Sylvain y Juan. Un agradecimiento MUY especial para Javier Tapia, quién logró (por fin!, echarlos a andar. Gracias por tu apoyo durante esta tesis, Bonne chance pour la suite !

Qui dit expérience d'écologie, dit analyses statistiques... *Gracias a Matías, Jorge, David, Gonzalo Medina-Vogel para la ayuda en entender los casos complejos que tenía.*

Un grand regret de cette thèse est de ne pas avoir eu le temps d'analyser les résultats des croisements. Un grand merci à Carolina Olivares, de la U. Católica del Norte, pour avoir pris soin de mes « bébés algues » ! Merci aussi pour l'aide logistique des terrains de dernière minute, et pour les échantillonnages réalisés.

Les travaux présentés ici ont bénéficié de l'apport des membres du comité de thèse, Eric Petit, Juan Correa et Didier Jollivet, ainsi que des discussions avec les membres des équipes françaises (ex-EGPM) et chiliennes (équipe Correa / Faugeron et équipes ECIM). *Agradezco en particular a Sergio Navarrete, y a la Estación Costera de Investigaciones Marinas (ECIM) por haber aceptado agregar a su juego de datos de temperatura los de Aceituno, y haber permitido poner este análisis en la tesis.*

Qui dit séjour au Chili, dit aussi espagnol et « chilénismes » ! *Gracias a mis profesores de chilenismo y de castellano: Leyla Cárdenas, Antonio Brante y la Francisca. En cuanto a las palabras y los platos de cocina de otros países de latinoamérica, me los enseñaron los doctorantes del Depto, con quienes compartí tiempos agradables en Santiago: Mili, Ana, Paula, Stella, Matias, Ariel, Sabrina, Sergio, Vero, Fernanda... Gracias a Javier y a Paula por entender mi idioma de guru!*

Une pensée également pour ceux qui sont maintenant en étape de rédaction à Roscoff (Sophie, Joana, Constance, Antonio...) et à Santiago (Juliana, Carola, Vero). Bon courage à vous, *Animo !!*

Je tiens enfin à remercier ceux chez qui j'ai appris ce qu'était le travail en labo : Jan Traas à Saint-Cyr d'abord, puis Irène Till-Bottraud et Florence Nicolè à Grenoble. Merci Florence de m'avoir laissé la porte du labo ouverte, ce qui m'a permis de savoir dans quel monde je mettais les pieds en allant en DEA...

Je remercie tous ceux qui sont allés à la recherche des fautes d'orthographe de toutes ces pages, pourtant paraissant parfois un peu chinois : mes parents, JB et Nadia, Aurore et Xavier, Barbara, Anselme, Yves-Alain. Merci également aux informaticiens : Vincent de nuit et Max de jour, duo parfait quand l'ordinateur me fait des misères ! Vincent, également promu dessinateur officiel de cette thèse, mon père correcteur en chef et ma mère et ma tatad'Is logisticiennes. *Agradezco también a aquellos que corrigieron las partes de este manuscrito en español y en inglés: Javier, Andrés y Carola.*

Merci à ma famille, qui m'a laissée partir si loin. Merci pour vos encouragements qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout ! Mes parents qui ont toujours soutenu mes décisions, mes frères Eric et Vincent, ma sœur Marion, et Guillaume, présents par internet...

Après Roscoff et Santiago, Saint Thiébaud a été ma troisième maison de rédaction de thèse, d'où je ne pouvais repartir sans ma bouteille de mirabelle. A ma grand-mère qui suit mes périples par photos et cartes postales interposées et qui attend ce manuscrit pour l'ajouter à sa bibliothèque. A Henri, Bernard, Edouard, Max, Christiane, Sally, Boubou, Louis et Robert, et à matatad'Is, merci pour votre soutien.

La bande de cousins, pour les moments passés ensemble : Anne-Marie, Matthieu, Marie-Cécile, François, Nicolas, Jean-Baptiste, Pierre et Gaby. A mes « nouvelles cousines », Alice et Nadia, pour leur énergie à revendre quand on en avait bien besoin, et aux Bordelais Sara et Silvère, et Solène. Merci à tous ceux qui sont venus à Roscoff pour m'encourager et voir la mer, et à ceux qui m'ont encouragée depuis Berlin (en mode grand écran !), Cahors, Bordeaux, Dijon... A bientôt au Chili ? Je souhaite tout le courage possible à Ola et à Camille pour leur fin de thèse, et merci pour les moments passés ensemble.

A l'heure de terminer avec ce manuscrit de thèse, je pense très fort à Matthieu... Mon grand frère de cœur, compagnon des premières sorties ciné « avec les grands », et des cafés à Nancy, tu m'auras particulièrement encouragée tout au long de ces années de thèse, toujours curieux de savoir ce que je faisais. Nos rêves de mirabelliers et de voyage-reportage radio en Patagonie restent au fond de mon cœur.

Financements / *Financiamientos* :

Allocation de recherches du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, à travers l'école doctorale Diversité du Vivant, Université Pierre et Marie Curie (UPMC).

à laquelle s'ajoutent les financements suivants / *a la cual se agregan los financiamientos siguientes* : FONDECYT 1060493, ANR-ECOKELP (ANR 06 BDIV 012), FONDAP-FONDECYT 1501-0001.

Financements ayant favorisé la réalisation de cette thèse en cotutelle / *Financiamientos que han favorecido la realización de esta tesis en cotutela*: Collège Doctoral Franco-Chilien et programme ARCUS du Ministère des Affaires Etrangères et Européennes, ECOS-CONICYT C03804, Université Pierre et Marie Curie, Universidad Católica de Chile, Laboratoire International Associé « Dispersal and Adaptation in Marine Species » (LIA DIAMS).

La compréhension des forces évolutives agissant lors de la formation des espèces et contribuant au maintien de leur intégrité est un enjeu majeur pour expliquer la distribution de la biodiversité, particulièrement dans le contexte actuel des changements globaux. La spéciation est le processus continu durant lequel d'une espèce ancestrale se forment deux espèces. Le sens même du mot « espèce », et par conséquent du mot « spéciation », a fait l'objet de nombreux débats, qui se poursuivent encore aujourd'hui. Les espèces peuvent par exemple être définies sur la base de l'isolement reproducteur (absence d'hybridation, « concept biologique »), de phylogénies de gènes (groupes monophylétiques d'allèles, « concept phylogénétique »), ou encore suivant leurs caractéristiques écologiques. La définition des espèces sur la base de critères morphologiques a, depuis toujours, montré ses limites : les différences de morphologie entre individus peuvent être par exemple liées à un dimorphisme sexuel, ou à un effet de l'environnement (plasticité phénotypique). Au contraire, deux populations peuvent constituer des espèces distinctes suivant les concepts biologique et/ou phylogénétique sans pour autant montrer de différence morphologique. Dans ce dernier cas, les espèces sont alors appelées « espèces cryptiques ». Chez les macroalgues, la définition morphologique des espèces reste très majoritairement utilisée, et peu d'études se sont intéressées à l'importance de l'isolement reproducteur entre espèces proches ou à l'histoire et la géographie du processus. Chez les Laminariales, grandes algues brunes des eaux tempérées froides, les études antérieures à ces travaux de thèse suggéraient que les barrières reproductives entre espèces sont généralement incomplètes, menant à la formation d'individus hybrides en conditions de laboratoire.

En utilisant une combinaison d'approches à la fois génétiques et écologiques, cette thèse a eu pour objectif général de comprendre quels sont les mécanismes qui sont à l'origine de la distribution de la diversité génétique et ceux qui contribuent à son maintien chez la Laminariale *Lessonia nigrescens*. Cette algue brune forme de véritables forêts et domine l'étage intertidal rocheux le long des côtes chiliennes. Le contexte géographique paraissait d'autant plus intéressant qu'une zone de transition biogéographique avait été préalablement décrite dans cette région (Camus, 2001), bien que controversée (voir pour revue Thiel et al., 2008). Ainsi, alors que certaines espèces marines montrent un changement abrupt dans leur distribution ou dans leur abondance entre 30°S et 33°S, d'autres espèces traversent ces latitudes sans paraître affectées. Contrairement à la majorité des zones de transition côtières dans le monde, aucun évènement géologique historique connu n'explique cette discontinuité. Les zones de transition biogéographiques constituent des régions particulières pour étudier les processus de spéciation, et de divergence en général, dans un contexte géographique : les

processus affectent les aires de distribution des espèces peuvent également avoir des répercussions sur la distribution de la diversité génétique intra-spécifique.

Le premier objectif de cette thèse a été d'étudier la phylogéographie de cette espèce et de la comparer avec l'espèce phylogénétiquement proche, mais présente dans l'étage subtidal, *Lessonia trabeculata*. Avec une approche utilisant quatre marqueurs moléculaires, issus des trois compartiments génomiques (noyau, mitochondrie, chloroplaste), il a été mis en évidence une concordance entre la zone de transition biogéographique décrite à 30°S et une discontinuité génétique majeure au sein de *L. nigrescens*, tandis que *L. trabeculata* ne montre pas de structuration génétique. La conclusion majeure du premier chapitre est la présence de deux espèces cryptiques au sein de *L. nigrescens*, suivant le concept phylogénétique de l'espèce. En attendant une description taxonomique formelle, les deux espèces ont été appelées « espèce AI », correspondant à l'espèce présente dans l'Aire Intermédiaire, et « espèce PP », celle présente dans la Province Péruvienne.

Les résultats acquis au cours de cette thèse, ajoutés à ceux présentés dans divers projets et thèses (PUC, UPMC), ont de plus permis de montrer que des facteurs environnementaux extrinsèques et probablement anciens sont à l'origine des discontinuités phylogéographiques et biogéographiques.

Le deuxième chapitre de la thèse s'intéresse plus particulièrement aux processus actuels, qui permettent le maintien de la différenciation entre les deux espèces de *L. nigrescens*. Pour cela, l'étude s'est recentrée sur la zone de transition, entre 29°S et 31°S, correspondant à la zone de chevauchement des aires de distribution des deux espèces.

La première étape a été de déterminer précisément les aires de distribution des deux espèces dans cette région, à différentes échelles spatiales (100km à 1km). De façon surprenante, une absence complète de sympatrie a été observée : les deux espèces n'ont jamais été observées au sein d'un même site, et ce quelle que soit l'échelle considérée.

Ensuite, je me suis attachée à caractériser l'importance de l'isolement reproducteur entre les deux espèces dans les conditions naturelles, en utilisant une approche de génétique des populations (marqueurs microsatellites). Cette étude, la première du genre chez des Laminariales, a montré que l'isolement reproducteur est apparemment complet entre ces espèces cryptiques. Ainsi, le concept biologique de l'espèce peut être utilisé pour les décrire. Ce résultat contraste particulièrement avec la considération générale suivant laquelle l'hybridation interspécifique (voire inter-générique) serait fréquente chez les Laminariales.

L'étape suivante a été d'étudier le rôle des facteurs environnementaux sur l'absence de sympatrie. Afin de tester l'hypothèse d'une divergence adaptative, une expérience de

transplantations réciproques a été réalisée. Des différences de qualité de l'environnement ont pu être mises en évidence entre les quatre sites considérés. Dans l'un de ces sites, une réponse différentielle entre espèces a été observée : ainsi, dans ce site habité par l'espèce AI (population naturelle), les individus d'espèce PP ont montré une valeur sélective plus faible que les individus d'espèce AI (quelque soit leur site d'origine). Aucune différence de réponse entre espèces n'a cependant pu être mise en évidence pour deux autres sites, sites qui sont géographiquement proches (20km) mais l'un habité par l'espèce AI, l'autre par l'espèce PP. Par conséquent, les résultats de l'expérience ne permettent pas d'expliquer la distribution des espèces à l'échelle locale ni l'absence de sympatrie. Les hypothèses invoquées sont l'action de mécanismes liés à l'isolement reproducteur et/ou à une exclusion compétitive entre espèces.

En conclusions générales, ces travaux de thèse ont montré la présence de deux espèces cryptiques au sein de l'espèce morphologique *L. nigrescens*. Ces espèces sont isolées reproductivement, présentent des niches écologiques distinctes et montrent des histoires démographiques différentes. Au niveau fondamental, ces travaux constituent une avancée importante dans la compréhension des processus de spéciation chez les Laminariales, organismes peu étudiés. Au niveau appliqué, ces résultats ont des conséquences directes en biologie de la conservation et dans la gestion durable des ressources naturelles, les *Lessonia* ayant une importance économique directe (récolte pour l'industrie des algines) et indirecte (espèces-ingénieurs de l'écosystème).

El entendimiento de las fuerzas evolutivas que actúan durante la formación de especies y que contribuyen a la mantención de su integridad es un desafío mayor para explicar la distribución de la biodiversidad, particularmente en el contexto actual de los cambios globales. La especiación es el proceso continuo durante el cual de una especie ancestral se forman dos especies. El sentido mismo de la palabra “especie”, y por consecuencia de la palabra “especiación”, ha sido el objeto de numerosos debates, que prosiguen todavía hoy en día. Las especies pueden ser por ejemplo definidas en base al aislamiento reproductivo (ausencia de hibridación, “concepto biológico”), a filogenias de genes (grupos monofiléticos de alelos, “concepto filogenético”), o también en base a sus características ecológicas. La definición de especies en base a caracteres morfológicos ha mostrado, desde siempre, sus límites: las diferencias de morfología entre individuos pueden estar por ejemplo ligadas a un dimorfismo sexual, o a un efecto del ambiente (plasticidad fenotípica). Al contrario, dos poblaciones pueden constituir especies distintas en base a los conceptos biológico y/o filogenético y no mostrar sin embargo diferencias morfológicas. En este último caso, las especies son llamadas “especies crípticas”. En macroalgas, la definición morfológica de las especies es la que prima en la gran mayoría de los estudios, siendo pocos aquellos que se han interesado en la importancia del aislamiento reproductivo entre especies cercanas, o en la historia y la geografía del proceso. En las Laminariales, grandes algas pardas de aguas templadas-frías, los estudios anteriores a esta tesis sugerían que las barreras reproductivas entre especies generalmente no se completan, llevando a la formación de individuos híbridos en condiciones de laboratorio.

Usando una combinación de aproximaciones tanto genéticas como ecológicas, esta tesis ha tenido como objetivo general entender cuáles son los mecanismos que están al origen de la distribución de la diversidad genética y de aquellos que contribuyen a su mantención en la Laminaríal *Lessonia nigrescens*. Esta gran alga parda forma verdaderos bosques y domina el intermareal rocoso a lo largo de la costa chilena. El contexto geográfico en el que se ubica esta especie parecía inicialmente muy interesante en la medida que una zona de transición biogeográfica había sido previamente descrita en la región en que ella se distribuye (Camus, 2001), pero su existencia era controversial entre los diversos autores (ver por revisión Thiel et al. 2008). Así, ciertas especies marinas muestran un cambio abrupto en su distribución o en su abundancia entre los 30°S y 33°S, mientras que otras especies atraviesan estas latitudes sin ser afectadas aparentemente. Contrariamente a la mayoría de las zonas de transición costeras en el mundo, ningún evento geológico histórico conocido explica esta discontinuidad. Las zonas de transición biogeográficas constituyen regiones particulares para estudiar los procesos de

especiación, y de divergencia en general, en un contexto geográfico: los procesos que afectan las áreas de distribución de especies pueden también tener repercusiones sobre la distribución de la diversidad genética intra-específica.

El primer objetivo de esta tesis ha sido estudiar la filogeografía de esta especie y compararla con la especie filogenéticamente más cercana, pero presente en el submareal, *Lessonia trabeculata*. Con una aproximación que emplea cuatro marcadores moleculares, provenientes de los tres compartimentos genómicos (núcleo, mitocondria, cloroplasto), se puso en evidencia una concordancia entre la zona de transición biogeográfica descrita a los 30°S y una discontinuidad genética mayor dentro de *L. nigrescens*, mientras que *L. trabeculata* no mostró estructuración genética. La conclusión mayor del primer capítulo es la presencia de dos especies crípticas dentro de *L. nigrescens*, según el concepto filogenético de la especie. No existiendo una descripción taxonómica formal, me referiré por mientras a estas especies como “especie AI”, correspondiente a la especie presente en el Área Intermedia, y “especie PP”, presente en la Provincia Peruana.

Los resultados adquiridos durante esta tesis, se suman a los presentados en diversos proyectos y tesis (PUC, UPMC), y han además permitido mostrar que factores ambientales extrínsecos y probablemente antiguos están al origen de las discontinuidades filogeográficas y biogeográficas.

El segundo capítulo de esta tesis se interesa más particularmente en los procesos actuales, que permiten la mantención de la diferenciación entre ambas especies de *L. nigrescens*. Para esto, el estudio se focalizó en la zona de transición, entre 29°S y 31°S, que corresponde a la región de sobreposición de las áreas de distribución de estas especies.

La primera etapa ha sido determinar precisamente las áreas de distribución de ambas especies en esta región, a distintas escalas espaciales (100km a 1km). De manera sorprendente, una ausencia completa de simpatría ha sido observada: las dos especies nunca han sido observadas dentro de un mismo sitio, cualquiera sea la escala geográfica considerada.

Enseguida, me he concentrado en caracterizar la importancia del aislamiento reproductivo entre ambas especies en condiciones naturales, usando una aproximación de genética de poblaciones (marcadores microsatélites). Este estudio, el primero de este tipo en las Laminariales, ha mostrado que el aislamiento reproductivo está aparentemente completo entre estas especies crípticas. Así, el concepto biológico de la especie puede ser usado para describirlas. Este resultado contrasta particularmente con la consideración general según la

cual la hibridación interespecífica (incluso hasta inter-genérica) sería frecuente en las Laminariales.

La etapa siguiente ha sido estudiar el rol de factores ambientales sobre la ausencia de simpatría. Para poner a prueba la hipótesis de una divergencia adaptativa, un experimento de trasplantes recíprocos fue realizado. Diferencias en la calidad del ambiente han sido detectadas entre los cuatro sitios analizados. En uno de estos sitios analizados, una respuesta diferencial entre especies ha podido ser evidenciada: así, en este sitio, en el cual la población natural es de la especie AI, los individuos de la especie PP han mostrado un valor selectivo inferior a la de los individuos de la especie AI (cualquier que sea sus sitios de origen). No obstante, no se detectó diferencia de respuesta entre especies en otros dos sitios, los cuales están geográficamente cercanos (20km) pero habitado uno por la especie AI, y el otro por la especie PP. Por consiguiente, los resultados del experimento no permiten explicar la distribución de las especies a escala local ni la ausencia de simpatría. Las hipótesis explicativas más probables aluden a mecanismos ligados al aislamiento reproductivo y/o a una exclusión competitiva entre ambas especies.

En conclusión, los trabajos de esta tesis han evidenciado la presencia de dos especies crípticas dentro de la especie morfológica *L. nigrescens*. Estas especies están aisladas reproductivamente, presentan nichos ecológicos distintos y muestran historias demográficas diferentes. Desde el punto de vista de la investigación básica, estos trabajos constituyen un avance importante en el entendimiento de los procesos de especiación en las Laminariales, organismos poco estudiados. Desde el punto de vista de las aplicaciones, estos resultados tienen implicancias directas en biología de la conservación y en el manejo sostenible de los recursos naturales, dado que las *Lessonia* tienen una importancia económica directa (cosecha para la industria de los alginatos) e indirecta (especie ingeniero del ecosistema).

Understanding the evolutive forces that act during the formation of species and contribute to maintain their integrity is a major challenge to explain the distribution of biodiversity, particularly in the actual context of global changes. Speciation is a continuous process during which two new species are formed from one ancestral. However, the word “species” and consequently the word “speciation”, has been subject of numerous debates that continue nowadays. This is because, species can be defined in base of reproductive isolation (absence of hybridization, “biological species concept”), genes phylogenies (monophyletic groups of alleles, “phylogenetic species concept”), or their ecological characteristics. The use of morphological characteristics to define species has always shown its limits, because morphological differences between individuals can be due to sexual dimorphism or environmental effects (phenotypic plasticity). Otherwise, two populations can comprise distinct species according to the biological and/or phylogenetic species concepts, without showing morphological difference. In this case, species are said to be “cryptic”. For macroalgae the morphological species definition, besides the above mention problems, continues to be used, and few studies focus on the importance of reproductive isolation among related species or the history and geography of the process. Previous studies in Laminariales, large brown algae inhabiting cold and temperate waters, suggested that reproductive barriers among species are generally incomplete, leading to the formation of hybrid individuals in laboratory conditions.

Using a combination of both ecological and genetic approaches, this thesis aimed to understand the mechanisms responsible for the origin of the distribution of the genetic diversity of *Lessonia nigrescens*, and also those mechanisms that contribute to their maintenance. This brown alga forms veritable forests and dominates the intertidal rocky shore along the Chilean coast. The geographic context was particularly interesting as a biogeographic transition zone has been described in this region (Camus, 2001), but still is controversial (see for review Thiel et al., 2008). While some marine species show an abrupt change in their distribution or in their abundance between 30°S and 33°S, other species cross these latitudes without seemed affected. Contrarily to the majority of the coastal transition zones in the world, no historical geological event is known to explain this discontinuity. Due to the above mention, the biogeographic transition zones constitute a particular region to study the speciation process, and divergence process in general, in a geographic context: the processes affecting the distribution range of species can also have repercussion in the distribution of the genetic diversity at the intra-specific level.

The first objective of this thesis was to study the phylogeography of *L. nigrescens*, and to compare it with that of the phylogenetically closest species, *L. trabeculata*, which is present at the subtidal level. Through an approach that used four markers from each genome compartments (nucleus, mitochondria, chloroplast), it has been revealed a concordance between the biogeographic transition zones described at 30°S and a major genetic discontinuity in *L. nigrescens*, whereas *L. trabeculata* did not show such any genetic structuring. The major conclusion is the presence of two cryptic species within *L. nigrescens*, based on the phylogenetic species concept. Without a taxonomical formal description, the species have been named “IA species”, presents in the Intermediate Area, and “PP species”, presents in the Peruvian Province.

Moreover, the results, together with those presented in various projects and theses (PUC, UPMC), show that extrinsic environmental factors, probably ancient, are at the origin of the phylogeographic and biogeographic discontinuities.

The second chapter of the thesis focused more on the actual processes that allow the maintenance of the differentiation between both species of *L. nigrescens*. For this, the study focused on the transition zone, between 29°S and 30°S, corresponding to the overlapping region of distribution ranges of the species.

As the first step, the distribution range of both species has been determined in this region, using different spatial scales (100km – 1 km). Surprisingly a complete absence of sympatry has been observed: the two species have never been observed within a same location, regardless the geographical scale considered.

As a second step, I characterized the reproductive isolation between the species in natural conditions using a genetic population approach (microsatellite markers). This study, the first of this type in Laminariales, has shown that the reproductive isolation is apparently complete between these cryptic species, allowing using the biological species concept to describe them. This result is particularly contrasting with the general consideration that interspecific hybridization (including inter-genus) within Lamiariales is frequent.

The final step was to study the role of environmental factors on the absence of sympatry. In order to test the hypothesis of adaptative divergence, an experiment of reciprocal transplants was realized. Differences in environment quality have been detected among the four studied sites. In one of these sites, a species-specific response was observed: in this site of IA species (natural population), the individuals of PP species had a lower fitness than those of IA species. However, no species-specific response was observed in the two sites separated by a small geographic distance (20km), but inhabited by distinct species (IA and PP). In

consequence, these results cannot explain the distribution of the species at a local scale, nor the total absence of sympatry. Mechanisms linked to reproductive isolation and/or to exclusive competition between species are possible hypotheses to explain the observed pattern.

As general conclusions, this thesis work has shown the presence of two species within the morphological species *L. nigrescens*. These species are reproductively isolated, have distinct ecological niches and show different demographic histories. As a basic science result, this work constitutes an important advance in the understanding of the speciation processes in Laminariales, slightly studied organisms. These results have also a direct importance for conservation biology and sustainable management of the natural resources, because *Lessonia* species constitute species of economic importance, directly (recollected for the alginates industry) and indirectly (ecosystem engineer species).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	13
A. Espèces, spéciation et évolution des barrières reproductives	16
1. Différentes définitions de l'espèce	16
2. Modes de spéciation	21
3. Evolution des barrières reproductives	25
B. Régions d'étude des processus de spéciation : intérêt des zones de transition biogéographiques	30
C. La zone d'étude : la côte du Pacifique sud-est	33
1. Caractéristiques des côtes chiliennes et péruviennes	33
2. Biogéographie des côtes chiliennes	39
3. Zone de transition 30°S : facteurs historiques et contemporains	41
D. L'espèce modèle : <i>Lessonia nigrescens</i> et l'espèce-sœur <i>Lessonia trabeculata</i>	42
1. Choix de l'espèce modèle	42
2. Importance écologique et économique de ces espèces	44
3. Traits d'histoire de vie des deux espèces	44
4. Information préliminaire concernant la phylogéographie de <i>L. nigrescens</i> et <i>L. trabeculata</i>	51
E. Problématique de la thèse	52
CHAPITRE 1. ETUDE PHYLOGEOGRAPHIQUE : COMPRENDRE LES PROCESSUS PASSES	55
A. Problématique	57
1. Phylogéographie : inférer les processus historiques et contemporains affectant les espèces	57
2. Phylogéographie et traits d'histoire de vie	58
3. Importance de l'utilisation de différents types de marqueurs moléculaires pour inférer l'histoire des espèces : concordance entre marqueurs	61
4. Apports et limites de l'étude préliminaire de phylogéographie de <i>L. nigrescens</i> et <i>L. trabeculata</i>	64
5. Objectifs spécifiques et approches utilisées	65
B. Matériel et Méthodes	66
1. Choix des marqueurs	66
2. Echantillonnage utilisé pour l'étude de phylogéographie	67
3. Obtention des données	68
4. Analyse des données	73
a) Alignement des séquences et polymorphisme des quatre marqueurs de l'approche multilocus	73
b) Analyses phylogénétiques du jeu de données multilocus	74
c) Taux de divergence entre groupes de séquences et estimation du temps de divergence	76
d) Reconstruction de réseaux d'haplotypes	78
e) Analyse du jeu de données populationnel (<i>L. nigrescens</i>)	78

C. Résultats	80
1. Approche multilocus	80
a) Polymorphisme des quatre marqueurs	80
b) Deux lignées divergentes au sein de <i>L. nigrescens</i>	82
c) Divergence entre lignées de <i>L. nigrescens</i> et datation	88
2. Approche populationnelle (<i>L. nigrescens</i>)	89
a) Distribution géographique des lignées et absence « d'admixture »	89
b) Polymorphisme observé dans les clades et les populations de <i>L. nigrescens</i>	89
3. Une structure phylogéographique différente chez <i>L. trabeculata</i>	95
D. Discussion	98
1. Histoire évolutive de <i>L. nigrescens</i> : importance du processus de spéciation	98
a) Une discontinuité génétique à 30°S	99
b) Datation de la divergence entre les lignées de <i>L. nigrescens</i> et scénarios possibles	99
c) Discordance entre marqueurs : une seconde discontinuité génétique à 27°S ?	102
d) Des flux de gènes limités à l'intérieur des lignées et une structure singulière dans la zone de transition	103
2. Une histoire différente pour <i>L. trabeculata</i>	104
3. Comparaison entre espèces : histoire de la zone de transition et importance des traits d'histoire de vie	105
a) <i>L. nigrescens</i> et <i>L. trabeculata</i> : des histoires différentes sur une même aire de distribution	105
b) Comparaison entre espèces à traits d'histoire de vie contrastés : mécanismes à l'origine de la zone de transition 30°S et contribuant à son maintien	108
E. Conclusion	119
 CHAPITRE 2 : COMPRENDRE LES MECANISMES DE MAINTIEN DE LA DIFFERENCIATION ENTRE LES ESPECES CRYPTIQUES PP ET AI DE <i>L. NIGRESCENS</i>.	 121
A. Problématique générale	123
1. <i>L. nigrescens</i> : un cas d'étude des barrières reproductives chez les Laminariales	123
2. Barrières reproductives possibles chez les Laminariales	123
3. Objectifs et approches utilisées	128
4. Choix des régions d'étude des barrières reproductives	129
B. Caractérisation de l'importance de l'isolement reproducteur dans les zones de contact entre espèces AI et PP de <i>L. nigrescens</i> : approche de génétique des populations	133
1. Rappel de la problématique : isolement reproducteur en conditions naturelles	133
a) Influence des forces évolutives dans la structure des zones de contact et zones hybrides	133
b) Isolement reproducteur chez les kelps	134

c) Objectifs spécifiques	135
2. Matériel et Méthodes	137
a) Choix des zones de contact étudiées et échantillonnage	137
b) Développement de marqueurs microsatellites	138
c) Obtention des données génétiques	139
d) Analyses des données microsatellites	139
3. Résultats	142
a) Mise au point des marqueurs microsatellites	142
b) Résultats du marqueur mitochondrial	143
c) Microsatellites : données analysées	144
d) Microsatellites : indices de diversité et flux de gènes entre espèces AI et PP	144
e) Microsatellites : analyses intraspécifiques	148
4. Discussion	153
C. Effets de facteurs environnementaux sur la distribution géographique des deux espèces cryptiques AI et PP de <i>L. nigrescens</i> : importance de ces facteurs pour expliquer l'absence de sympatrie dans la Région de transition	163
1. Introduction	
a) Spéciation et sélection naturelle	163
b) Divergence adaptative : définitions	164
c) Etude de la divergence adaptative : aspects expérimentaux	166
d) Objectifs de l'étude	166
2. Matériel et Méthodes	168
a) Choix des sites	168
b) Réalisation de l'expérience	172
c) Suivis des transplants	174
d) Traitement préalable des données	176
e) Hypothèses spécifiques testées	178
f) Caractéristiques des tests statistiques utilisés	179
g) Analyse des conditions environnementales	182
3. Résultats	184
a) Réalisation de l'expérience et suivis	184
b) Analyses préliminaires	186
c) Analyses statistiques de l'expérience de transplants	186
d) Caractérisation des sites : données de température de l'eau	192
4. Discussion	194
D. Des adaptations liées à un réarrangement du génome mitochondrial ?	199
1. Introduction	199
a) Observations préliminaires suggérant de l'hétéroplasmie	199
b) Importance évolutive de l'hétéroplasmie mitochondriale apparente	199
c) Objectifs du travail	206
2. Matériel et Méthodes	206
a) Identification des fragments correspondants aux bandes supplémentaires	206
b) Etendue géographique des profils multi-bandes	208
3. Résultats	208
a) Séparation et amplification des différents fragments	208
b) Identification des fragments par séquençage	210
c) Position phylogénétique des haplotypes atpX	212
d) Distribution géographique des profils multi-bandes	212
4. Discussion	216

E. Conclusions	223
DISCUSSION GENERALE	225
A. Synthèse	227
B. Conséquences directes des travaux présentés dans cette thèse	231
C. Autres perspectives	235
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	237
ANNEXES	253
Annexes 1 : Annexes du Chapitre 1.	
Annexes 2 : Annexes du Chapitre 2, Parties 2.B et 2.C.	
Annexes 3 : Articles	

INTRODUCTION GENERALE

Le travail réalisé au cours de cette thèse s'intègre dans la problématique générale de l'étude des processus de spéciation, en prenant comme espèces modèles de grandes algues brunes marines (Ordre des Laminariales, appelées « kelps »). Ces algues forment de véritables forêts dans les eaux tempérées froides et ont une importance économique, pour l'industrie des alginates et pour la récolte d'invertébrés marins vivant dans ces forêts. Malgré leur importance écologique et économique, et leur grande diversité en nombre d'espèces dans certaines régions du monde, les mécanismes favorisant la spéciation et contribuant à l'isolement reproducteur ont été très peu étudiés chez ces espèces. Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence l'existence de deux espèces cryptiques au sein du complexe « *Lessonia nigrescens* » le long des côtes chiliennes. Je me suis tout d'abord attachée à comprendre l'histoire des deux taxa, et à discuter les différentes hypothèses à l'origine de cette spéciation. Ensuite, je me suis intéressée aux mécanismes qui permettent actuellement le maintien de l'intégrité des espèces cryptiques de *L. nigrescens*, en particulier dans la région de contact entre leurs aires de distribution.

Je commencerai donc cette introduction par une revue des différents modes de spéciation qui ont été proposés dans la littérature. Puis je soulignerai l'intérêt de l'étude des zones de transition pour comprendre les processus de spéciation. Je présenterai ensuite la région d'étude : les côtes chiliennes et en particulier la zone de transition qui correspond à une zone de transition biogéographique, dont l'origine et l'ancienneté restent indéterminées. Enfin, je présenterai les organismes modèles, c'est-à-dire le complexe d'espèces « *Lessonia nigrescens* » présent dans le bas de l'étage intertidal que j'ai comparé à l'espèce subtidale *Lessonia trabeculata*, ces deux espèces dominant les habitats rocheux exposés aux vagues dans la région d'étude. Pour terminer, j'exposerai le plan de la thèse.

A. Espèces, spéciation et évolution des barrières reproductives

1. Différentes définitions de l'espèce

Le concept d'espèce a fait l'objet de nombreuses discussions, avec une intensification du débat depuis une vingtaine d'années. Coyne et Orr (2004) ont ainsi répertorié 25 concepts d'espèces différents, bien que leur liste ne soit pas exhaustive. Ce vieux débat persiste car il n'existe pas de concept applicable à tous les taxa sans ambiguïté (Hey, 2001), qui prenne en compte les particularités des systèmes de reproduction de certaines espèces - par exemple, la reproduction clonale des bactéries - et l'aspect dynamique de la formation des espèces.

Je présenterai ici trois **concepts d'espèces** : le concept biologique de l'espèce (BSC), celui phylogénétique (PSC) et celui morphologique. A la différence des deux premiers concepts, le dernier ne définit pas l'espèce comme un groupe évolutif, le but étant de classer les espèces sur la base de critères morphologiques (taxonomie). L'espèce morphologique est définie comme un groupe d'individus partageant des critères diagnostiques propres et qui sont suffisamment différents morphologiquement d'autres groupes semblables. Cette définition est celle qui reste majoritairement utilisée, bien qu'elle ait été remise en cause notamment par l'introduction du concept biologique de l'espèce par Mayr (1942, cité par Coyne et Orr, 2004) et l'utilisation d'outils moléculaires pour identifier les espèces. La définition des espèces sur la base de différences morphologiques est en particulier problématique pour les taxa ayant peu de critères morphologiques distinguables, comme les bactéries et certaines espèces d'algues (Knowlton, 2000), ou lorsqu'il y a des différences très importantes entre individus d'une même espèce, par exemple dues à une importante plasticité phénotypique ou à un dimorphisme sexuel. On appelle **espèces cryptiques** les espèces qui sont, ou ont été, classées comme une seule espèce nominale sur la base de critères morphologiques (Bickford *et al.*, 2006). La présence d'espèces cryptiques au sein d'une espèce morphologique est généralement détectée en utilisant les outils moléculaires et/ou en testant l'interfécondité entre individus. Une étude morphologique *a posteriori* peut parfois révéler des différences morphologiques entre espèces cryptiques, et ces critères morphologiques peuvent être ensuite utilisés pour identifier les espèces en conditions naturelles (Bickford *et al.*, 2006 ; Knowlton,

2000).

Le **concept biologique de l'espèce** identifie les espèces comme des groupes de populations naturelles interféconds qui sont reproductivement isolés d'autres groupes semblables (Mayr, 1942, cité par Coyne et Orr, 2004). L'utilisation de ce concept biologique de l'espèce permet d'étudier l'évolution de **barrières reproductives**, définies comme des traits biologiques des organismes limitant les flux de gènes entre individus de différents taxa (Coyne et Orr, 2004). Il faut souligner que la formation de nouvelles espèces est un **processus dynamique**, se traduisant par la possibilité de flux de gènes comme étape intermédiaire avant l'isolement reproducteur complet (Fig. I.1). Lorsque la spéciation est en cours, il est plus difficile de se baser uniquement sur le critère d'isolement reproducteur pour définir à partir de quelle étape les taxa étudiés peuvent être reconnus comme de nouvelles espèces. Il peut être utile d'utiliser un critère subjectif, comme par exemple la présence d'un isolement reproducteur « substantiel mais pas nécessairement complet » (Coyne et Orr, 2004).

Les généalogies de gènes permettent d'identifier des groupes d'organismes partageant un ancêtre commun et donc une histoire commune. Différents **concepts phylogénétiques de l'espèce** (PSC) ont alors été proposés en se focalisant sur l'histoire commune des individus. Ainsi, le premier concept définit l'espèce phylogénétique comme un groupe irréductible, basal, d'organismes qui partagent une relation d'ascendance et de descendance, et qui sont distincts d'autres groupes semblables (Cracraft, 1989 cité par Coyne et Orr, 2004). Le processus de spéciation du point de vue phylogénétique peut être vu comme le processus évolutif par lequel les généalogies de gènes passent de peu structurées à résolues, avec des groupes phylogénétiques dont la séparation est importante (Avice, 2000 ; Coyne et Orr, 2004 ; Fig. I.1 et Fig. I.2). Pendant ce processus, les barrières reproductives sont essentielles car ce sont elles qui favorisent la séparation au cours du temps des taxa phylogénétiques, en limitant les flux de gènes. Lorsque deux taxa sont reproductivement isolés, les généalogies de gènes vont passer par des étapes successives de polyphylie, puis possiblement par une étape de paraphylie avant de montrer finalement une monophylie réciproque : à ce stade, les copies de gènes dans chaque taxon sont plus proches phylogénétiquement entre elles qu'avec les copies de gènes de l'autre taxon (Fig. I.1 et Fig. I.2). Cependant, la monophylie réciproque est un stade qui ne peut être atteint qu'après une longue période de temps, qui dépend de la taille efficace des populations (Avice, 2000) : même en l'absence de flux de gènes entre taxa, les processus de dérive génétique et de sélection naturelle n'éliminent que lentement le polymorphisme ancestral. Le concept phylogénétique de l'espèce est critiqué en particulier

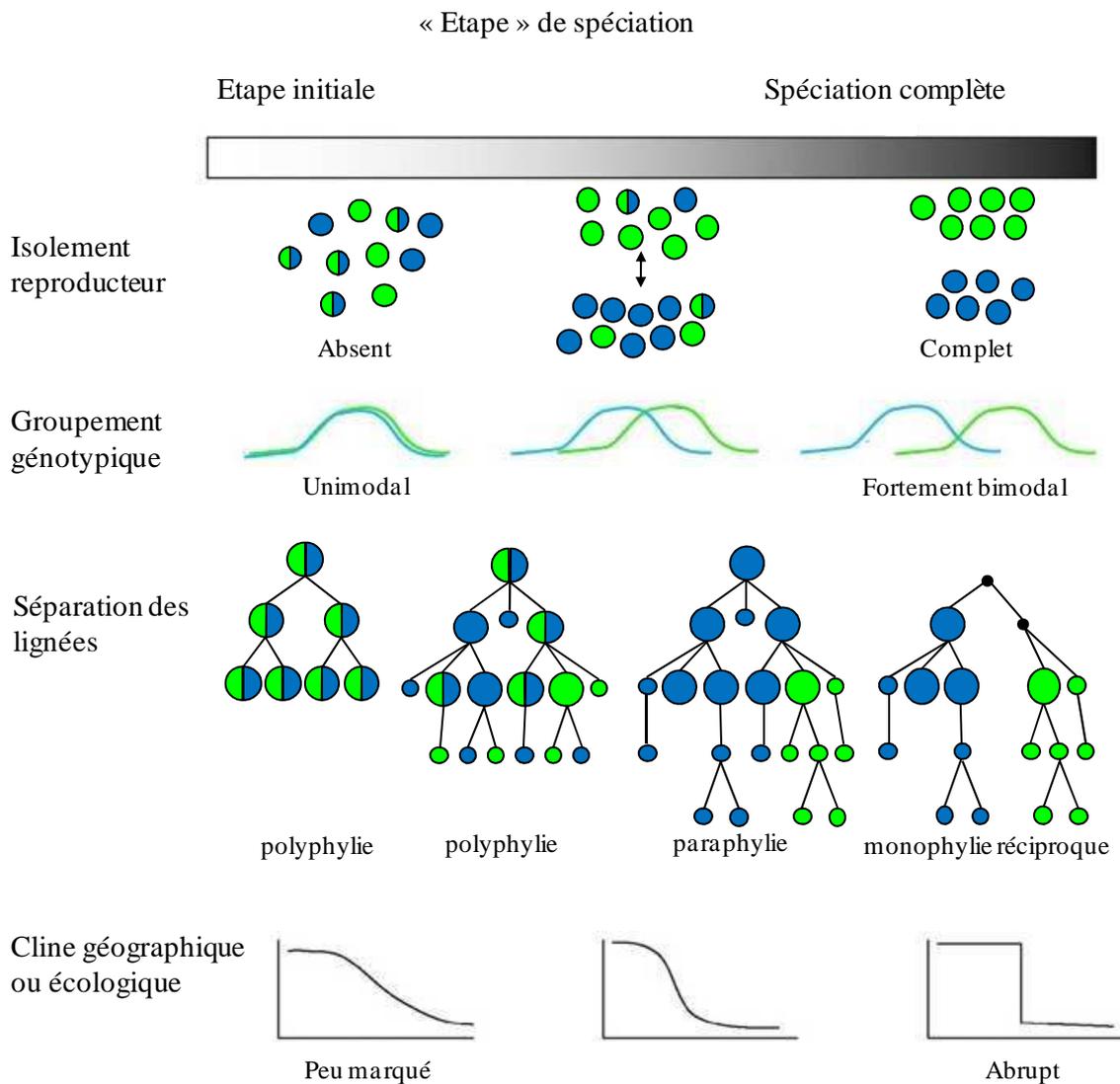


Figure I.1 : Illustration de la nature continue de la divergence lors du processus de spéciation. Deux populations sont représentées ici, en bleu et en vert, depuis le début du processus jusqu'à l'isolement reproducteur complet. Sur cette figure sont représentés différents aspects de divergence entre les populations : 1) l'isolement reproducteur, qui évolue d'absent jusqu'à complet (les individus sont représentés par des cercles, ceux bicolores indiquant les génotypes hybrides) ; 2) la distribution des fréquences de gènes (représentée ici sous la forme de groupement génotypique, ou *clusters*) qui devient bimodale lorsque la spéciation est complète ; 3) la représentation sous forme de réseaux d'haplotype permettant de mettre en évidence la rétention de polymorphisme ancestral et l'apparition de nouvelles mutations. Les points noirs indiquent les haplotypes ancestraux qui ne sont plus présents. La transition de la polyphylie à la monophylie réciproque peut être longue, malgré un isolement reproducteur complet (voir Fig. I.2) ; 4) le cline géographique ou écologique des fréquences géniques, variant de peu marqué à abrupt. Un cline géographique de fréquences géniques sera observé si les populations sont majoritairement en allopatrie, tandis qu'un cline écologique peut être observé si les populations ont divergé sous l'action de la sélection naturelle divergente. Figure modifiée d'après Nosil *et al.* (2009).

car il est impossible d'atteindre la monophylie réciproque entre taxa pour *tous* les gènes du génome : d'autres événements de spéciation auront probablement lieu avant, et de plus, la sélection peut préserver des allèles communs entre taxa pour certains loci. Des critères subjectifs, comme pour le BSC, ont alors été définis, comme la présence de 50% de gènes montrant une monophylie réciproque (Coyne et Orr, 2004).

Depuis quelques années, la taxonomie traditionnelle, basée sur les critères morphologiques, tend à être complétée par l'utilisation de courtes séquences d'ADN d'un gène particulier pour caractériser les espèces et identifier des espèces cryptiques (« barcoding », Hebert *et al.*, 2003). L'utilisation d'un seul critère (un seul gène) pose cependant le problème de la généralisation à l'ensemble du génome : le gène considéré, généralement mitochondrial, peut par exemple être soumis à sélection ou présenter des copies nucléaires et ne pas refléter l'histoire de l'espèce, mais celle du gène (ex : Bazin *et al.*, 2006 ; Song *et al.*, 2008). Quoiqu'il en soit, l'utilisation de phylogénies de plusieurs gènes a l'avantage de permettre d'étudier les aspects historiques, géographiques et démographiques des processus de spéciation. En particulier, les phylogénies de gènes nous renseignent sur l'ancienneté de la divergence entre taxa.

Le PSC est généralement concordant avec le BSC lorsque les espèces sont en sympatrie, car le maintien de l'intégrité des clades phylogénétiques dépend de l'importance de l'isolement reproducteur entre les taxa (pour une discussion plus détaillée des différences entre ces concepts d'espèce, voir Coyne et Orr, 2004). Le contraire n'est pas forcément vrai : des taxa peuvent être complètement isolés reproductivement mais ne pas constituer des clades monophylétiques *au début du processus de spéciation* et être donc considérés comme une seule espèce sous le PSC ; l'évolution indépendante des clades phylogénétiques mènera cependant à terme à une concordance entre PSC et BSC. Ces deux concepts peuvent également être discordants lorsque les taxa sont en allopatrie stricte (séparés géographiquement avec absence de migrants) : les taxa peuvent avoir suffisamment divergé pour être considérés comme des espèces phylogénétiques (PSC) mais ne pas montrer d'isolement reproducteur en conditions de laboratoire. Il est cependant rare qu'il y ait une absence totale de migrants *et* une absence d'isolement reproducteur lors de la mise en contact artificielle, les barrières d'isolement reproducteur restent donc considérées comme primordiales dans le maintien de l'intégrité des groupes définis sur la base de l'histoire évolutive.

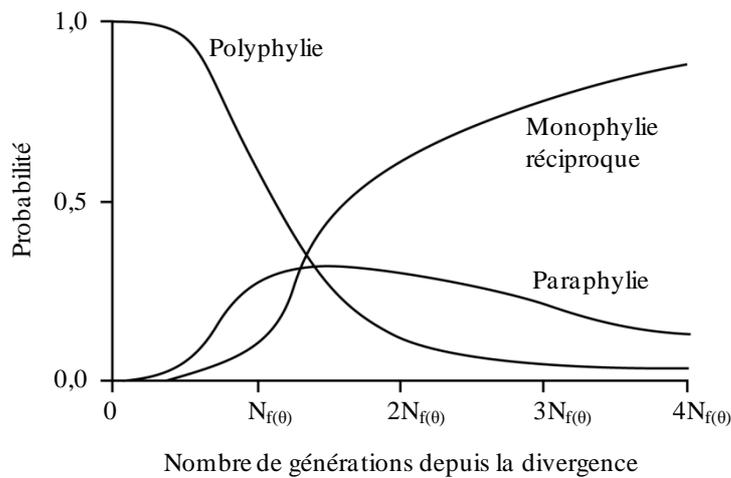


Figure I.2 : Forme générale des courbes de probabilité de phylogénie montrant un patron polyphylétique, paraphylétique ou de monophylie réciproque pour deux populations en fonction du temps écoulé depuis le début de la divergence en allopatrie. Le temps est représenté en fonction de la taille efficace des deux populations, $N_{f(0)}$. Le scénario représenté ici est un scénario de vicariance, les deux populations ayant une même taille efficace. Figure d'après Neigel et Avise (1986), cité par Avise (2000).

2. Modes de spéciation

Les modes de spéciation sont traditionnellement classés selon le degré de divergence géographique des aires de distribution des taxa en formation, ce qui a l'avantage d'en faciliter la représentation graphique (Fig. I.3, Coyne et Orr, 2004). On différencie ainsi la **spéciation allopatrique**, où l'origine des différentes espèces résulte de l'évolution divergente de populations qui sont géographiquement isolées l'une de l'autre, de la **spéciation sympatrique**, où des barrières reproductives entre individus évoluent à l'intérieur d'une seule et même région géographique. Ces deux modes de spéciation se différencient donc par la géographie et par la possibilité de flux de gènes entre les taxa durant le processus de spéciation. La **spéciation parapatrique** est un intermédiaire entre ces deux modes de spéciation : dans ce cas, l'isolement reproducteur évolue entre des populations dont les aires de distribution sont adjacentes et entre lesquelles les échanges de gènes sont possibles mais limités. La **spéciation par « divergence avec flux de gènes »** regroupe l'ensemble des intermédiaires entre spéciation sympatrique et spéciation allopatrique et semble être le processus de divergence le plus fréquent, avec la spéciation allopatrique stricte (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Dans le processus de spéciation allopatrique, on distingue souvent selon la taille relative des populations impliquées (Coyne et Orr, 2004) la spéciation par vicariance de la spéciation par « bourgeonnement » (également appelée spéciation péripatrique, Funk et Omland, 2003, Fig. I.3). Dans le premier cas, l'isolement reproducteur évolue après la division de l'aire de distribution d'une espèce en deux nouveaux groupes isolés mais de tailles importantes. Dans le second cas, l'un des nouveaux groupes est de taille bien plus réduite que l'autre : le plus petit groupe peut être la conséquence de l'isolement géographique d'une petite population ou de la migration de quelques individus vers un habitat isolé.

Cette définition classique des différents modes de spéciation basée sur la géographie est maintenant fortement remise en cause, bien que toujours majoritairement utilisée, et a fait l'objet de nombreuses discussions, comme illustré dans les principales revues traitant d'évolution (voir notamment Schluter, 2001 ; Kirkpatrick et Ravigné, 2002 ; Rundle et Nosil, 2005 ; Butlin *et al.*, 2008 ; Fitzpatrick *et al.*, 2008 ; Schluter, 2009). Le premier problème de cette classification est qu'elle pose la question de la relativité de la « sympatrie » et de l'« allopatrie » en fonction de l'échelle spatiale à laquelle on se situe (Fitzpatrick *et al.*, 2008). C'est le cas, par exemple, des espèces qui sont présentes dans une même région géographique (sympatrie) mais qui sont adaptées chacune à un type de sol particulier, donc présentant des

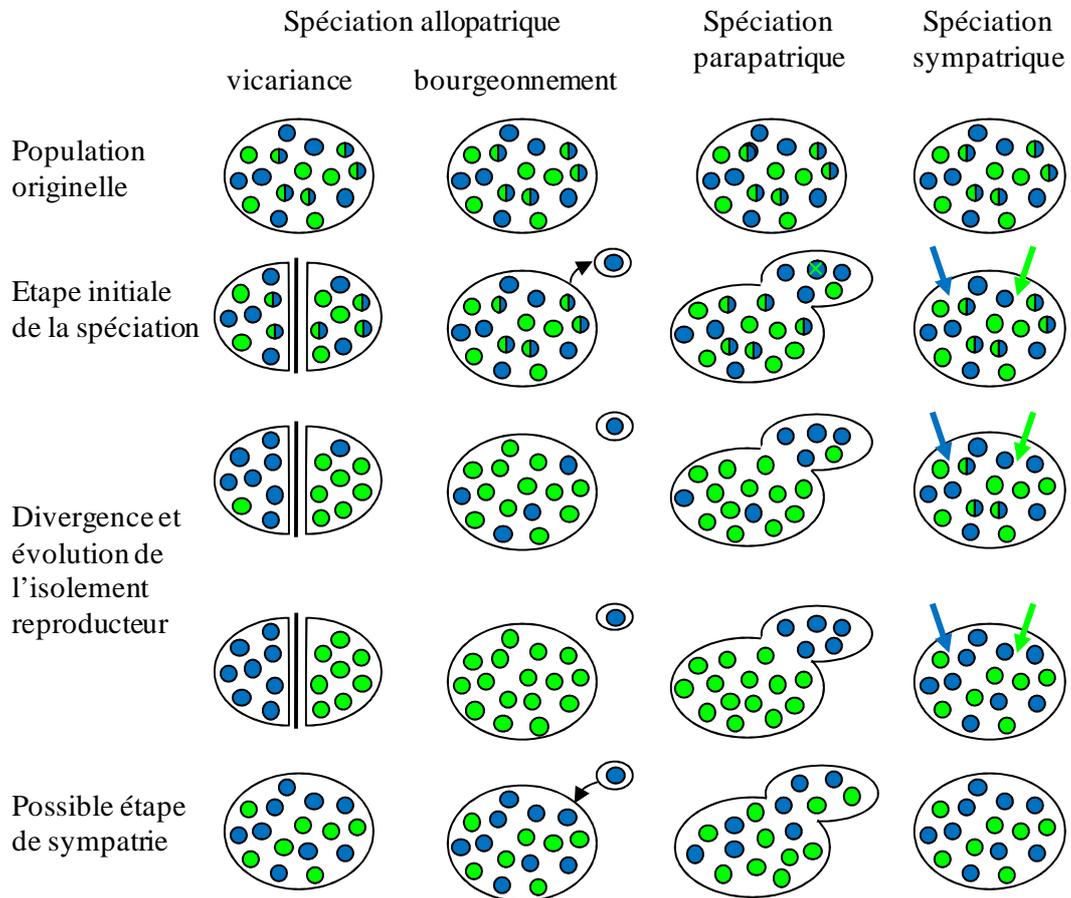


Figure I.3 : Représentation schématique des modes de spéciation en fonction du contexte spatial : spéciation allopatrique (par vicariance et par bourgeonnement), parapatricque et sympatrique. Les deux populations sont représentées en vert et en bleu, les individus sont symbolisés par des cercles (cercle bicolore : individu hybride). Dans le cas de la spéciation sympatrique, les flèches indiquent l'action de la sélection divergente. Une telle sélection peut également contribuer à la divergence en allopatrie et en parapatricque, mais n'est pas indispensable : l'action de la dérive et l'apparition de mutations peuvent suffire pour qu'il y ait évolution d'isolement reproducteur.

aires de distribution non chevauchantes à petite échelle spatiale (allopatric). Un exemple souvent cité est le cas des palmiers de l'île Lord Howe, que Savolainen *et al.* (2006) présentent comme un cas de spéciation sympatrique, argumentant que les différents types de sol coexistent à une échelle géographique qui est inférieure à la distance de dispersion des taxa.

Schluter (2001), Rundle et Nosil (2005) ont proposé d'abandonner cette classification pour se recentrer sur les forces évolutives qui ont permis l'évolution de l'isolement reproducteur et qui contribuent à son maintien. La **spéciation écologique** est ainsi définie comme un processus de spéciation dans lequel la sélection naturelle divergente mène à l'évolution d'isolement reproducteur. Alors que la spéciation avec flux de gènes était peu considérée dans les années 1970 en comparaison avec la spéciation allopatric, les travaux pionniers réalisés sur les plantes *Anthoxanthum odoratum* et *Agrostis tenuis* ont permis de montrer que la divergence adaptative pouvait mener à l'évolution de barrières reproductives, les pressions de sélection étant ici la présence de fertilisants (*A. odoratum* : Snaydon, 1970 ; Snaydon et Davies, 1976) ou de déchets miniers (*A. odoratum* et *A. tenuis* : Antonovics et Bradshaw, 1970). Ces travaux, ainsi que ceux plus récents (théoriques : ex : Gravilets, 2003, et voir pour revue des travaux empiriques et théoriques : Hendry *et al.*, 2007), ont pu mettre en évidence le fait que la spéciation écologique peut être un processus rapide, à l'échelle de quelques générations, pouvant ainsi être observée « en marche », tandis que la spéciation due à l'action de la dérive ou de mutations est généralement plus lente (à l'exception de la spéciation par changement chromosomique). L'importance de la divergence adaptative dans les processus de spéciation est aujourd'hui largement acceptée par la communauté scientifique, comme en témoignent des articles des numéros spéciaux sur la spéciation, en cette année anniversaire de Darwin (ex : *Evolutionary Ecology* de janvier, *Science* du 6 février). Cependant, la sélection divergente comme seule force évolutive semble rarement conduire à une spéciation *complète* (voir pour revue Nosil *et al.*, 2009). L'inférence des processus passés reste cependant parfois difficile, notamment pour les processus de spéciation anciens (contrairement aux cas d'*A. odoratum* et *A. tenuis*).

Un deuxième inconvénient posé par la classification des modes de spéciation en fonction uniquement du contexte spatial, est que ce contexte peut changer au cours du processus de spéciation : l'isolement reproducteur peut évoluer par exemple d'abord en allopatric puis être complété en présence de flux de gènes. Comme évoqué par Butlin *et al.*, (2008, Encadré I.1), l'étude du processus de spéciation nécessite de prendre en compte le contexte spatial (influent sur la migration) *et* les forces évolutives, en y ajoutant l'architecture

Encadré I.1 : Modes de spéciation, d'après Butlin *et al.* (2008)

Etape dans le processus de spéciation :

- 1) Initiation de l'isolement reproducteur intrinsèque
- 2) Augmentation de l'étendue génomique de l'isolement
- 3) Isolement reproducteur complet

Pour chaque étape :

Quel est le contexte spatial ?

Position dans un continuum, pouvant être variable au cours du temps avec m = taux d'échange de gènes

Sympatrie ($m = 0,5$)

Parapatricie ($0 < m < 0,5$)

Allopatricie ($m \approx 0$)

Quelle est la force ou quelles sont les forces conduisant à la divergence ?

Catégories non-exclusives et pouvant interagir entre elles

Hasard (mutation, hybridation, dérive)

Sélection naturelle (écologie)

Sélection sexuelle ou conflit sexuel

Quelle sont les bases génétiques de l'isolement reproducteur ?

Catégories non-exclusives et pouvant interagir entre elles

Bases génétiques ou non-génétiques (plasticité, apprentissage)

Incompatibilité intrinsèque *versus* mal-adaptation

Mécanisme à un-gène, un-allèle et deux-allèles

Avec ou sans restriction de la recombinaison

génétique des taxa. Ainsi, une forte sélection divergente est nécessaire pour initier la différenciation en présence de flux de gènes substantiels (sympatrie et parapatrie), tandis qu'en l'absence de flux de gènes (allopatric), la divergence peut être causée par la sélection (quelle qu'en soit l'intensité) ou par la dérive. Le processus de spéciation peut être long, et donc l'importance de ces trois composantes (contexte spatial, forces évolutives, architecture génétique) et de leurs interactions peut changer dans le temps. A chaque étape de la spéciation, il est possible de déterminer l'importance relative de la mutation, de la dérive, de la migration et de la sélection divergente sur l'évolution des barrières reproductives entre taxa. La démarche préconisée par Butlin *et al.* (2008) est présentée dans l'Encadré I.1.

3. Evolution des barrières reproductives

Définitions

L'étude de l'importance des différentes barrières d'isolement reproducteur permet d'identifier les forces évolutives maintenant l'intégrité des taxa. Une distinction est généralement faite entre les **barrières reproductives prézygotiques**, agissant avant la fécondation en diminuant la probabilité de formation d'hybrides, et les **barrières reproductives postzygotiques**, qui agissent après la fécondation sur les génotypes hybrides (Encadré I.2). Certaines de ces barrières reproductives sont dites « écologiques », quand la sélection naturelle favorise la divergence en agissant dans des directions opposées dans un environnement contrasté et fixant ainsi des allèles différents (Schluter, 2001 ; Coyne et Orr, 2004 ; Rundle et Nosil, 2005). Les barrières dites « non-écologiques » sont celles où la chance a joué un rôle important, comme par exemple l'accumulation de différences par dérive, ce qui peut mener à de l'isolement par incompatibilité gamétique (forme d'isolement gamétique non-compétitif, voir Encadré I.2). A la différence des barrières reproductives écologiques (extrinsèques), celles non-écologiques (intrinsèques) sont indépendantes de l'environnement et se maintiennent lorsque les deux taxa divergents se retrouvent au sein d'un même environnement.

Les barrières reproductives agissent de façon séquentielle, comme des filtres successifs (Encadré I.2) : les barrières postzygotiques ne peuvent limiter que le flux de gènes résiduel des barrières prézygotiques. De ce fait, toutes choses étant égales par ailleurs, les barrières prézygotiques vont contribuer plus fortement que les barrières postzygotiques à l'isolement reproducteur (Ramsey *et al.*, 2003).

Encadré I.2 : Barrières reproductives pouvant limiter les flux de gènes entre taxa

Les barrières reproductives sont ordonnées suivant leur ordre séquentiel d'action. Elles peuvent être intrinsèques (non-dépendantes de l'environnement, I) ou extrinsèques (dépendante de l'environnement, E) ou possiblement intrinsèques et/ou extrinsèques (I/E). D'après Coyne et Orr (2004) et Rundle et Nosil (2005).

- A. Barrières d'isolement prézygotique, avant la rencontre des gamètes :** diminuent la probabilité de formation d'hybrides en agissant avant le transfert du sperme ou du pollen entre individus de taxa différents.
- a. Isolement écogéographique** (ou isolement par l'habitat) (E) : les taxa sont présents dans des habitats distincts dans une même région, réduisant la probabilité de rencontres interspécifiques (absence de migration entre habitats).
 - b. Contre-sélection des immigrants** (E) : les taxa montrent des préférences héréditaires pour des habitats distincts. Il y a de la migration entre habitats, mais les migrants sont contre-sélectionnés car ils sont maladaptés à leur nouvel habitat.
 - c. Isolement comportemental** (I) : absence d'attraction entre individus de taxa différents due à des différences comportementales.
 - d. Isolement temporel** (ou allochronique) (E/I) : les flux de gènes entre taxa sont empêchés car ces taxa se reproduisent à des moments différents, du fait de différences environnementales et/ou de différences génétiques.
 - e. Isolement par pollinisateur** (I/E) : chez les Angiospermes, les flux de gènes entre taxa sont réduits par l'attraction différentielle des pollinisateurs.
 - f. Isolement mécanique** (I) : Copulation ou pollinisation entre taxa empêchée du fait de l'incompatibilité des structures reproductives.
- B. Barrières d'isolement prézygotique, lors de la rencontre des gamètes :** agissent après le transfert du pollen ou du sperme mais avant la fécondation.
- a. Isolement comportemental copulatoire** : le comportement de l'individu pendant la copulation est insuffisant pour assurer la fécondation.
 - b. Isolement gamétique non-compétitif** (I) : faible transfert, stockage et viabilité des gamètes dans les structures reproductives des femelles hétérospécifiques, absence d'attraction entre gamètes hétérospécifiques, incompatibilité gamétique intrinsèque (la fécondation échoue lorsque les gamètes entrent en contact).
 - c. Isolement gamétique compétitif** (I) : les gamètes hétérospécifiques ont une probabilité plus faible de fécondation lorsqu'il y a possibilité de compétition avec des gamètes conspécifiques.
- C. Barrières d'isolement postzygotique :** diminuent la valeur sélective des hybrides.
- a. Létalité des hybrides, intrinsèque** (I) : des problèmes de développement causent une létalité partielle ou complète des hybrides, indépendamment de l'environnement.
 - b. Stérilité des hybrides, intrinsèque** (I) : les hybrides sont stériles du fait de problèmes lors du développement du système reproducteur ou de la production des gamètes, indépendamment de l'environnement.
 - c. Contre-sélection des hybrides, extrinsèque** (E) : les hybrides se développent normalement mais ont une survie plus faible que les individus parentaux car ils ne peuvent pas trouver de niche écologique appropriée.

Importance des différents types de barrières reproductives : comparaison entre groupes de taxa

Le nombre et le type de barrières reproductives sont très variables entre taxa, mais des tendances générales ont pu être observées. Ainsi, chez les animaux, les barrières prézygotiques sont généralement contrôlées par quelques gènes d'effets majeurs dans les premières étapes du processus de spéciation, tandis que les barrières postzygotiques sont plutôt contrôlées par de nombreux gènes d'effets mineurs qui s'accumulent graduellement (Coyne et Orr, 2004). Les taxa de plantes sont typiquement séparés par de multiples barrières reproductives avec des effets individuels limités, plutôt qu'une seule barrière reproductive d'effet majeur sur la réduction des flux de gènes entre taxa, suggérant que l'isolement reproducteur complet est atteint après un nombre important de générations (Rieseberg et Willis, 2007 ; Widmer *et al.*, 2009). Cependant, la spéciation par polyploïdie, avec une augmentation du nombre de chromosomes, entraîne un isolement reproducteur quasi instantané et est fréquemment observée chez les plantes supérieures (Stebbins, 1940 ; voir pour revue Soltis *et al.*, 2004 et Rieseberg et Willis, 2007, et notamment le cas de *Spartina anglica*, Ainouche *et al.*, 2004). La spéciation par spécificité de pollinisateur est également généralement liée à quelques allèles d'effets majeurs (Ramsey *et al.*, 2003 ; Schemske et Bradshaw, 1999 ; Bradshaw et Schemske, 2003).

Les études réalisées chez les invertébrés marins montrent que des patrons similaires à ceux observés chez les organismes terrestres contribuent à l'isolement reproducteur (ex : Fig. I.4). Par exemple chez les moules *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis*, l'hybridation est limitée par des barrières prézygotiques comme l'isolement écogéographique, l'isolement temporel et de l'isolement gamétique ainsi que par des barrières postzygotiques, avec la présence d'incompatibilité de Dobzhansky-Muller (DMI, Encadré I.3) (Bierne *et al.*, 2006). Malgré une capacité de dispersion importante pendant la phase larvaire planctonique, une forte structuration en mosaïque de la zone hybride a été décrite chez ces taxa. Chez les macroalgues marines, la majorité des études de spéciation se sont cependant concentrées sur la description d'espèces cryptiques, à l'aide de phylogénies et parfois de croisements testant l'isolement reproducteur. Des études montrent cependant le rôle dans l'isolement reproducteur du système de reproduction chez les espèces de *Fucus* (ex : Billard *et al.*, 2005 ; Engel *et al.*, 2005 ; Coyer *et al.*, 2007) tandis que d'autres suggèrent la présence d'isolement temporel chez des algues vertes d'eaux tropicales (Clifton, 1997). La présence de protéines de reconnaissance entre gamètes jouant un rôle dans l'isolement reproducteur a également été montrée chez les algues rouges *Aglaothamnion* (Ryu *et al.*, 2004). Ces études d'isolement

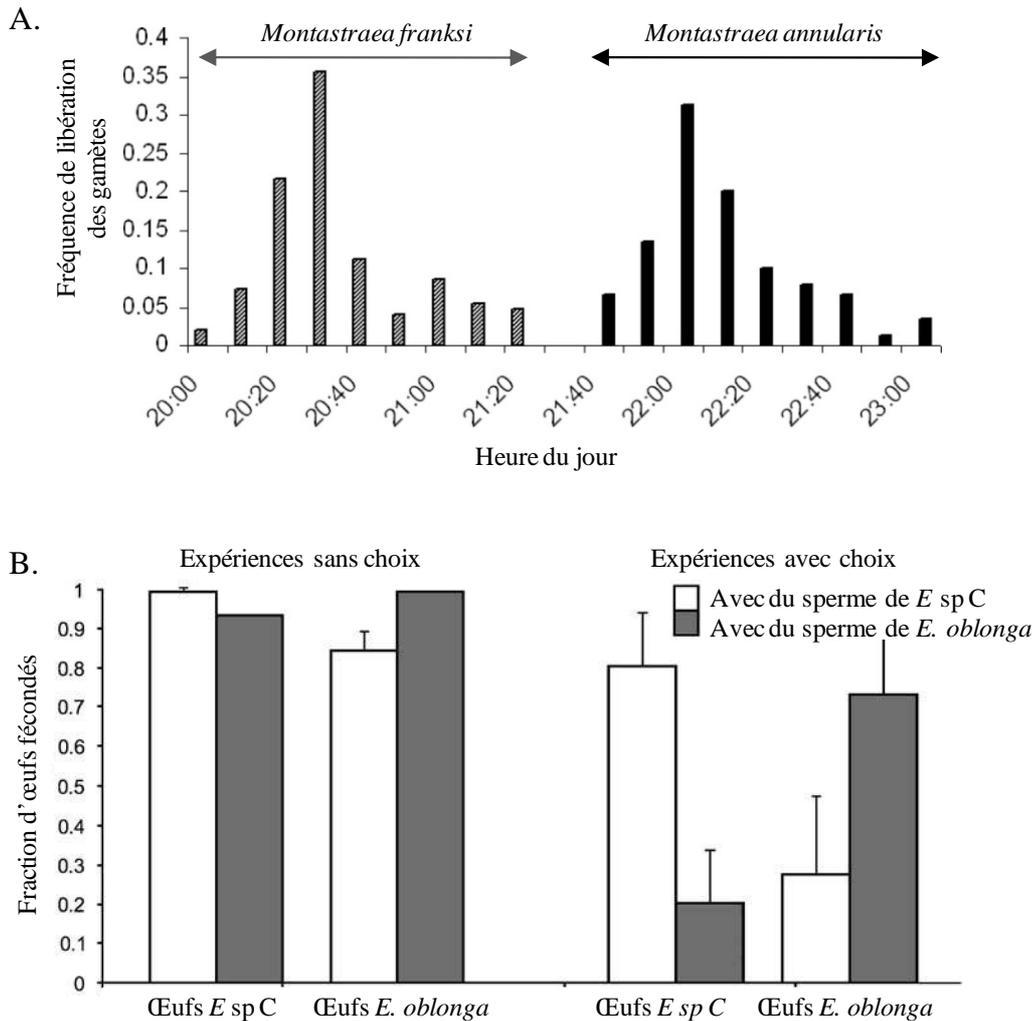
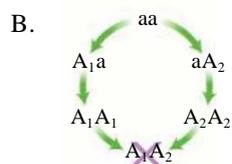
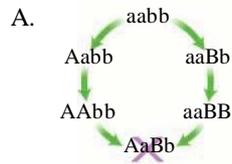
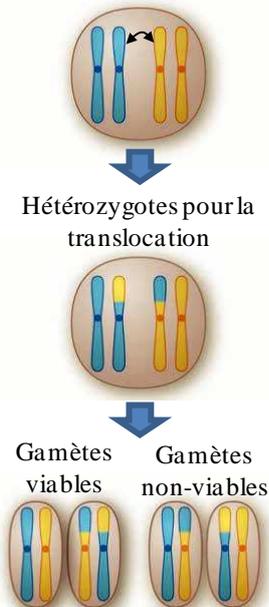


Figure I.4 : Illustration de barrières reproductives prézygotiques : (A) Isolement temporel. Distribution de fréquence de libération des gamètes en fonction des heures de la journée pour deux espèces de coraux *Montastraea annularis* et *M. franksi* : l'isolement temporel limite l'hybridation entre les taxa, bien que les gamètes soient compatibles. La viabilité réduite des gamètes et leur dispersion contribuent à l'isolement temporel. Les résultats sont consistants entre sites (2 sites à Panama et 1 site aux Bahamas). Figure d'après Tomaiuolo *et al.* (2007) et Levitan *et al.* (2004). **(B) Isolement gamétique compétitif.** Exemple des oursins *Echinometra oblonga* et *E. sp. C* : le taux de fécondation interspécifique est élevé lorsque du sperme d'une seule espèce est présent (expérience sans choix). Lorsque le sperme des deux espèces est mélangé en proportions égales, les œufs ont une probabilité 2,5 à 4 fois plus importante d'être fécondés par du sperme conspécifique que par du sperme hétérospécifique, montrant que la préférence du sperme conspécifique est forte chez ces espèces d'oursins sympatriques. Figure d'après Palumbi (2009).

Encadré I.3 : Isolement postzygotique intrinsèque

Le **modèle d'incompatibilités de Dobzhansky-Muller (DMI)**, également appelé modèle de Bateson-Dobzhansky-Muller) considère que lorsque les taxa divergent, des mutations responsables d'incompatibilités interspécifiques peuvent s'accumuler au sein des génomes des différents taxa de manière indépendante. Ces mutations restent compatibles avec le génome ancestral mais deviennent incompatibles entre elles. Lors d'un contact secondaire entre les taxa, les DMI vont alors se traduire par une réduction de la valeur sélective des hybrides, alors que la valeur sélective des taxa parentaux n'est pas affectée. Les DMI sont souvent le résultat de mutations sur deux loci (Fig. A) ou plus, mais il est possible qu'une seule mutation rende les génomes incompatibles (Fig. B). La divergence adaptative des taxa à différents environnements peut favoriser l'apparition de DMI (Coyne et Orr, 2004).

C. Translocation réciproque



Réarrangement chromosomique, montrant une perte de fertilité pour les hétérozygotes car ils produisent 50% de gamètes balancés et viables et 50% de gamètes « non-balancés » et non-viables (Fig. C). L'isolement postzygotique intrinsèque peut également être causé par des mutations de plus grande ampleur : les **réarrangements chromosomiques** et la **polyploïdisation** des génomes (Fig. C). Ces réarrangements en conditions hétérozygotes, chez les hybrides, entraînent souvent des problèmes lors de la méiose, causant la stérilité des hybrides, ou lors de la recombinaison, augmentant ainsi les DMI (Rieseberg, 2007, 2001). Des réarrangements chromosomiques ont été montrés chez certaines espèces d'animaux et de plantes (ex : les translocations robertsoniennes *Mus musculus domesticus*) et les phénomènes de spéciation par polyploïdie sont fréquemment observés chez les plantes (estimations autour de 30-35% des Angiospermes, Rieseberg, 2007), mais il est difficile de savoir si ces réarrangements sont à l'origine de la spéciation, s'ils contribuent à l'isolement reproducteur ou s'ils se sont accumulés alors que la spéciation était déjà complète (Coyne et Orr, 2004).
Figures d'après Rieseberg (2007).

reproducteur chez les macroalgues marines sont donc actuellement peu nombreuses, ce qui ne permet pas de déterminer les contributions relatives de l'isolement prézygotique et postzygotique et d'inférer l'importance des traits du cycle de vie sur les barrières reproductives. Une connaissance détaillée de l'importance des différentes barrières reproductives est cependant une première étape nécessaire pour ensuite identifier les forces évolutives qui favorisent la spéciation et prédire l'issue d'une possible hybridation en cours.

B. Régions d'étude des processus de spéciation : intérêt des zones de transition biogéographiques

Les études des processus de spéciation en conditions naturelles peuvent être réalisées dans des lieux très variés. Que la spéciation ait été initiée en sympatrie ou en allopatrie, la coexistence en sympatrie de nombreuses espèces proches a toujours intéressé les biologistes. Un nombre important d'études se sont focalisées sur les mécanismes ayant lieu dans les îles, et en particulier dans les archipels. La radiation adaptative – diversification à une variété de niches écologiques ayant entraîné des processus de spéciation rapides au sein d'un groupe évolutif – est en particulier souvent liée à la colonisation d'un habitat initialement peu peuplé, comme des îles océaniques ou des lacs (Gravilets et Losos, 2009). Ces cas particuliers permettent d'étudier l'importance de la divergence adaptative dans les processus de spéciation. On peut ainsi citer l'exemple de l'archipel d'Hawaï qui abrite environ un tiers des espèces mondiales de *Drosophila*, soit environ 800 espèces, qui semblent descendre d'une seule espèce ancestrale ayant colonisé une île actuellement submergée (voir Coyne et Orr, 2004 pour revue). Ces espèces montrent des différences écologiques importantes et sont séparées par un fort isolement reproducteur.

L'étude des zones de transition peut également permettre d'étudier la spéciation sur de nombreux taxa et inférer le rôle de l'histoire, de la géographie et des traits d'histoire de vie des espèces dans les processus de spéciation. Différentes terminologies ont été utilisées pour définir ces régions. Les **zones de transition biogéographiques** sont des régions où de

nombreuses espèces terminent leur aire de distribution, tandis que les **zones de suture** sont plus spécifiquement des régions géographiques étroites où sont observés de nombreux hybrides dans des groupes de taxa très variés (Swenson et Howard, 2005 ; Hewitt, 2001). Le point commun entre ces deux patrons consiste dans le fait qu'il s'agit de régions de transition entre assemblages de biota majeurs. Les **discontinuités phylogéographiques** sont quant à elles observées à l'échelle intraspécifique, et se caractérisent par la présence au sein d'un taxa de deux lignées divergentes, de distributions géographiques contrastées, mais ces lignées ne sont pas forcément isolées reproductivement (Avisé, 2000). Il a été montré que les discontinuités phylogéographiques majeures, les zones hybrides (ou zones de suture) et les zones de contact entre espèces-sœurs qui ne s'hybrident pas sont souvent concentrées dans des régions géographiques particulières qui peuvent correspondre à des zones de transition biogéographiques (Swenson et Howard, 2005 ; Hewitt, 2001 ; Avisé, 2000). La concordance entre ces différents types de zones de transition est liée au fait que les mêmes facteurs historiques peuvent avoir façonné les phylogénies intraspécifiques et les aires de distribution des espèces. Ces zones de transition peuvent être la conséquence d'un contact secondaire entre taxa ayant divergé en allopatrie, ou correspondre à un changement environnemental abrupt (écotone) ayant entraîné une divergence en parapatricie.

En Amérique du Nord, une concordance géographique entre plusieurs zones hybrides et zones de contact entre espèces-sœurs a été montrée au niveau de la zone de transition biogéographique située entre la péninsule de Floride et le continent américain chez les taxa terrestres (Avisé, 2000). Chez les animaux marins, la péninsule de Floride constitue également une zone de transition biogéographique, entre la province biogéographique de l'Atlantique, avec des taxa d'eaux tempérées, et celle du Golfe du Mexique, avec des taxa d'eaux tropicales. La concordance entre limites d'aires et présence d'une discontinuité phylogéographique marquée chez plusieurs taxa marins ayant des traits d'histoire de vie variés suggère que certains facteurs historiques ont influencé de manière similaire la distribution de ces espèces ainsi que leur architecture génétique. Ces facteurs historiques semblent être liés aux cycles glaciaires-interglaciaires s'accompagnant de variations du niveau des mers et de la température de l'eau. A ces processus historiques s'ajoutent les conditions écologiques actuelles qui influencent la distribution des lignées, avec la présence de masses d'eaux chaudes et froides de part et d'autre de la zone de transition.

Les études dans les zones de transition biogéographiques suggèrent que la spéciation allopatrique est largement majoritaire en milieu marin et que ces régions sont principalement des régions de contact secondaire. Les barrières passées à la dispersion peuvent être d'origine multiple et sont souvent liées aux variations de la hauteur de l'eau lors des cycles glaciaires-interglaciaires, provoquant l'apparition de terres émergées et modifiant les isothermes de température. C'est le cas dans l'Atlantique Nord, en Floride, en Basse Californie et au niveau du Détroit de Bass entre la Tasmanie et l'Australie (Maggs *et al.*, 2008 ; Avise, 2000 ; Dawson, 2001 ; Waters, 2008). D'autres barrières passées aux flux de gènes sont moins évidentes et sont liées à la courantologie (ex : Californie) et/ou à des différences de température marquées entre masses d'eaux (ex : Afrique du Sud) (Dawson, 2001 ; Teske *et al.*, 2008). Les conséquences évolutives des barrières à la dispersion dépendent à la fois de la persistance temporelle et spatiale de la barrière à la dispersion (ex : barrière totale : Isthme de Panama, ou « barrière poreuse » : Afrique du Sud).

Par une approche multidisciplinaire, alliant biologie moléculaire et écologie ainsi que géographie historique, l'étude des zones de transition biogéographiques permet de relier l'histoire d'un taxa particulier et la présence d'un évènement de spéciation à l'histoire d'une région particulière. Tandis que les différences écologiques passées et actuelles entre régions biogéographiques peuvent agir comme pression de sélection divergente, la présence d'une barrière passée à la migration peut avoir favorisé une divergence en allopatrie entre les taxa isolés. En milieu marin, les zones de transition biogéographiques ont été principalement étudiées dans l'objectif de reconstituer l'histoire évolutive d'un groupe d'espèces en fonction des facteurs géographiques par une approche de phylogéographie ou de phylogénie. La présence de nombreuses espèces cryptiques a ainsi été décrite chez les animaux marins, et dans les trois règnes d'algues : Phaeophyceae (algues brunes), Rhodophyceae (algues rouges) et Chlorophyceae (algues vertes) (Knowlton, 2000). Par rapport au milieu terrestre, les études de l'isolement reproducteur en milieu marin, soit dans les zones de contact soit dans les zones hybrides, sont limitées à très peu d'organismes modèles, principalement invertébrés (zone hybride en mosaïque des moules *Mytilus galloprovincialis* et *M. edulis*, liée à un contact secondaire entre taxa ayant divergé en allopatrie (Bierne *et al.*, 2006), et sont pratiquement inexistantes chez les algues. Ces zones sont pourtant de véritables « laboratoires naturels », pour l'étude des processus de spéciation en cours (Hewitt, 1988).

Afin d'identifier les facteurs évolutifs et écologiques qui peuvent mener à des évènements de spéciation en milieu marin et chez les algues brunes en particulier, je me suis intéressée à une zone de transition biogéographique localisée dans le Pacifique sud-est. La région d'étude, et l'hémisphère Sud en général, ont fait l'objet de peu d'études de phylogéographie, en comparaison avec l'hémisphère Nord (Beheregaray, 2008). Dans les deux parties suivantes, je présenterai les connaissances relatives à la région d'étude et aux espèces modèles.

C. La zone d'étude : la côte du Pacifique sud-est

La région d'étude, localisée entre 16°S et 42°S le long des côtes péruviennes et chiliennes, se caractérise par la présence d'une zone de transition biogéographique dont l'importance est discutée par les biogéographes. Tandis que l'histoire de la région est mal connue et qu'il est difficile d'expliquer l'origine de cette zone de transition, la concordance entre patrons d'abondance, de recrutement et de reproduction avec les limites d'aires de nombreuses espèces suggère la présence de facteurs environnementaux externes contribuant au maintien de cette discontinuité.

1. Caractéristiques des côtes chiliennes et péruviennes

Le système du Courant de Humboldt est l'un des écosystèmes marins les plus productifs au monde. Il s'étend le long des côtes chiliennes et péruviennes, depuis l'île de Chiloé (41-43°S) jusqu'à la frontière Pérou-Equateur (4°S) (Fig. I.5). Nous nous intéresserons plus particulièrement à la région située entre 16°S et 42°S. Ce système du Courant de Humboldt se caractérise par un flux prédominant des eaux de surface d'origine subantarctique en direction de l'équateur et par la présence de zones de résurgence d'eaux de sous-surface froides (upwellings). Autour de 42°S, la « Dérive de l'Ouest » se sépare en deux courants, le Courant de Humboldt vers le nord et le Courant du Cap Horn vers le sud (Fig. I.5). Les caractéristiques climatiques et océanographiques des côtes chiliennes et péruviennes seront ici résumées (pour revue, voir Montecino *et al.*, 2006 et Thiel *et al.*, 2007).

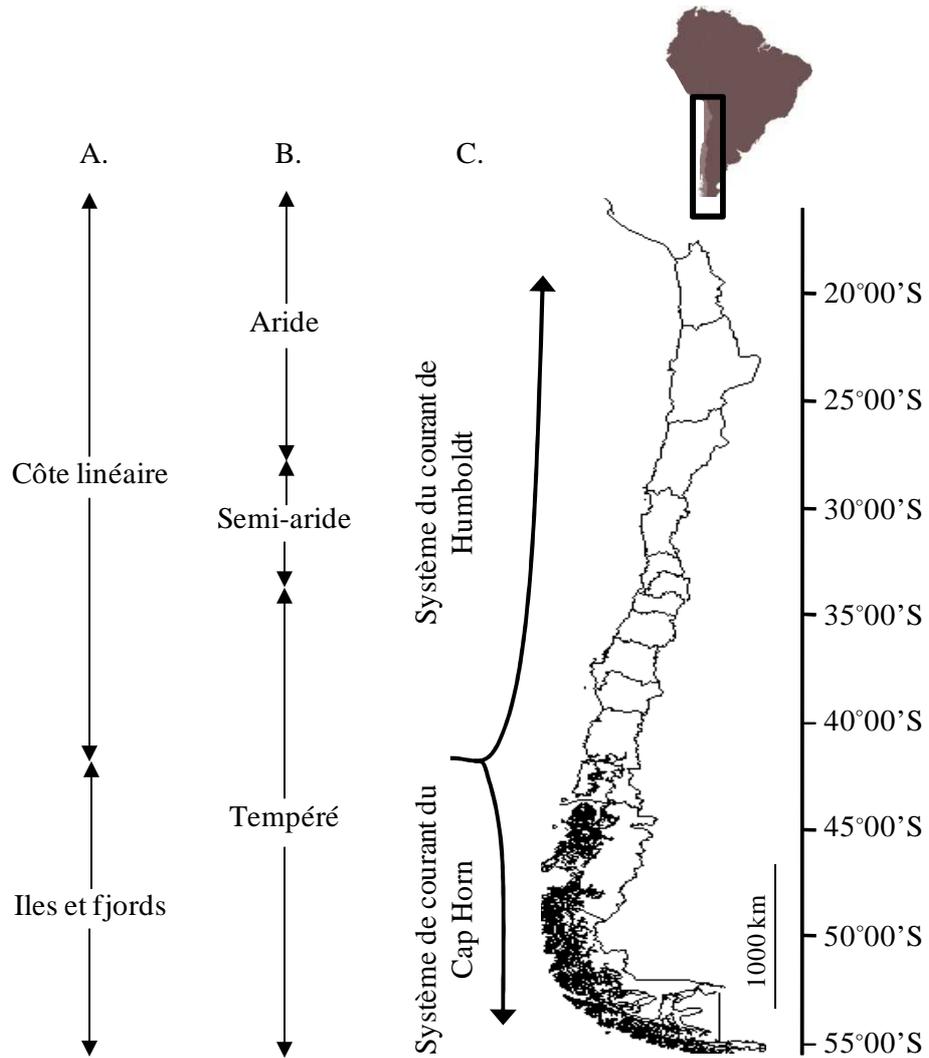


Figure I.5 : Principales caractéristiques physiques des côtes tempérées Pacifiques d'Amérique du Sud : topographie (A), climats (B) et systèmes de courants (C).

Trois principales régions climatiques peuvent être distinguées le long des côtes chiliennes (Fig. I.5) et dépendent de l'influence relative de l'anticyclone du Pacifique Sud et des vents d'ouest. Au nord de 30°S, le climat est semi-aride à aride, et sous l'influence permanente de l'anticyclone du Pacifique Sud. Entre 38°S et 56°S, le climat est tempéré, avec une pluviosité toute l'année sous l'influence des vents d'ouest. Entre 30°S et 38°S, la saisonnalité est plus particulièrement marquée, dépendant de la variation latitudinale de la zone d'influence des vents d'ouest, apportant des précipitations en hiver, et de l'anticyclone du Pacifique Sud, provoquant des sécheresses estivales.

La température de surface de l'eau (SST) montre un gradient latitudinal qui est considérablement moins prononcé que pour des latitudes similaires dans d'autres régions du monde (Latorre *et al.*, 2007 ; Fig. I.6). Le long de la côte chilienne, les résurgences sont faibles mais constantes au nord de 30°S, tandis qu'elles sont fortes mais saisonnières entre 30°S et 41°S. Ce phénomène de résurgence (upwelling) est provoqué par les vents soufflant en direction de l'équateur permettant la remontée d'eaux de sous-surface, plus froides et riches en nutriments. Les principaux centres de résurgence identifiés le long des côtes chiliennes sont Antofagasta (23°S), Coquimbo (30°S, plus précisément la Punta Lengua de Vaca) et Concepción (37°S) (Fig. I.6). Ces zones se caractérisent par un changement abrupt de l'orientation de la côte, favorisant les résurgences. Bien que le courant de Humboldt soit globalement orienté vers le nord, le relâchement des vents favorables aux résurgences peut être suivi par une inversion temporaire des courants de surface côtiers, en direction du sud (Thiel *et al.*, 2007).

Aux variations saisonnières s'ajoutent des variations interannuelles liées aux événements d'ENSO (El Niño Southern Oscillation). Le phénomène climatique global ENSO se présente sous la forme de deux périodes ayant des effets contrastés : La Niña et El Niño (Trenberth, 1997). Sur la côte ouest de l'Amérique du Sud, le phénomène El Niño se caractérise par l'arrivée d'eaux chaudes (température de surface de l'eau 3 à 5°C supérieure à la normale) et pauvres en nutriments, une élévation du niveau de la mer allant jusqu'à 20 cm, un affaiblissement des résurgences côtières et une pluviosité supérieure à la normale sur le continent (Fernandez *et al.*, 2000). La Niña correspond au phénomène inverse, avec une intensification des résurgences côtières et un climat aride sur le continent. Les événements de type ENSO sont un élément important du climat depuis au moins 130 000 ans (Tudhope *et al.*, 2001) avec une activité continue, bien que variable depuis 7 000 ans (Moy *et al.*, 2002). La fréquence et la sévérité du phénomène, ainsi que son extension vers le sud, varient et ne sont pas prédictibles. Les périodes d'anomalies négatives (El Niño) peuvent persister pendant 6 à

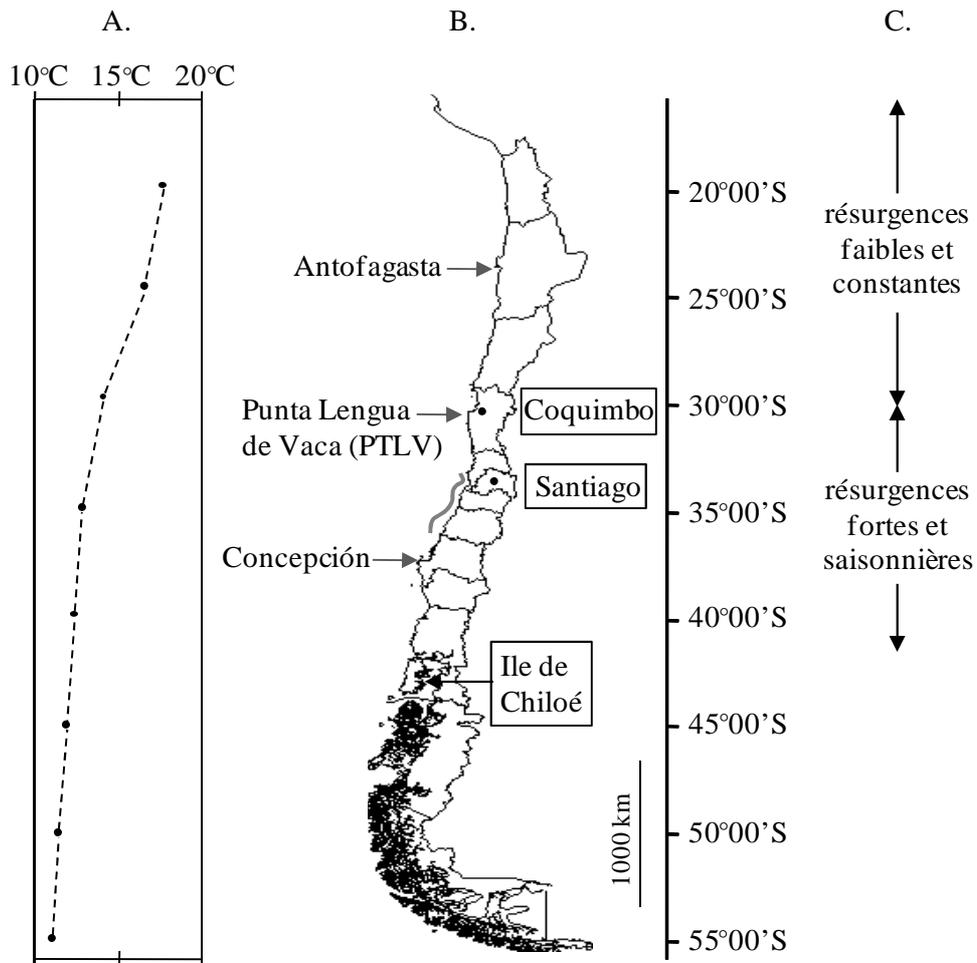


Figure I.6 : Caractéristiques thermiques des côtes chiliennes. (A) Variation latitudinale de la température de surface de l'eau (SST) moyenne, (B) Principaux sites de résurgence : permanents (flèches grises) et occasionnels (ligne grise). Les localités fréquemment mentionnées dans le texte sont indiquées en encadré. (C) Régions définies selon les régimes de résurgence. Figure d'après Fernandez *et al.* (2000) et Thiel *et al.* (2007).

18 mois et sont parfois suivies de périodes La Niña. Tandis que le nord du Chili et le Pérou sont régulièrement affectés par El Niño, certains événements sont ressentis également plus au sud avec des augmentations de température jusqu'à Concepción (36°S, Graco *et al.*, 2006) et des conséquences possiblement perçues jusqu'en Antarctique (Turner, 2004). Les changements climatiques liés à ENSO ont des conséquences sur les êtres vivants terrestres et marins (Holmgren *et al.*, 2001 ; Castilla et Camus, 1992). Notamment, la limite d'aire de répartition d'une espèce peut être modifiée par les événements El Niño, comme c'est le cas dans l'hémisphère Nord, pour l'algue brune géante *Macrocystis pyrifera* (Hernandez-Carmona *et al.*, 2001).

Les caractéristiques océanographiques actuelles de la côte chilienne sont le résultat de processus qui ont débutés avec l'ouverture du passage de Drake (entre les océans Atlantique et Pacifique) et l'origine du système du Courant de Humboldt, événements qui semblent avoir eu lieu durant l'époque Tertiaire (entre -35 et -1,6 millions d'années selon les auteurs, voir pour revue Camus, 2001). Les conditions climatiques et de température de l'eau ont montré des fluctuations importantes depuis l'instauration de ce système, avec des patrons complexes de variation latitudinale de la zone d'influence des vents d'ouest (ex : Lamy *et al.*, 2001 ; pour revue voir Camus, 2001 et Latorre *et al.*, 2007). Les avancées et retraits successifs des glaciers entre 41°S et 56°S, liés aux périodes glaciaires et interglaciaires, ainsi que les mouvements tectoniques ont fortement affecté la géomorphologie de cette région, actuellement composée de nombreux fjords et îles. Durant le dernier maximum glaciaire, cette région était recouverte de glace, à l'exception de la partie orientale de la Terre de Feu (55°S) et de la partie nord-ouest de l'île de Chiloé (41°S) (Hulton *et al.*, 2002, Fig. I.7). Cette situation contraste avec celle de la côte située au nord de 40°S, qui n'a pas été affectée directement par l'avancée des glaciers lors du Pléistocène. Cependant, les variations du niveau des mers, des précipitations, et des températures de l'eau et de l'air semblent avoir provoqué des modifications importantes des biotas dans cette région (Kim *et al.*, 2002 ; Romero *et al.*, 2006). Ces changements auraient été complexes, comme le suggèrent les registres fossiles étudiés dans la zone de 23°S et datés de 400 000 ans, montrant la présence à la fois d'espèces tropicales et d'espèces d'eaux tempérées froides (Ortlieb *et al.*, 2003).

La zone autour de 41-43°S (île de Chiloé) correspond donc à la fois à une forte discontinuité environnementale (fjords vs. côte linéaire), à une barrière physique maintenue par la séparation du courant de Humboldt et du courant du Cap Horn et à la limite nord de la

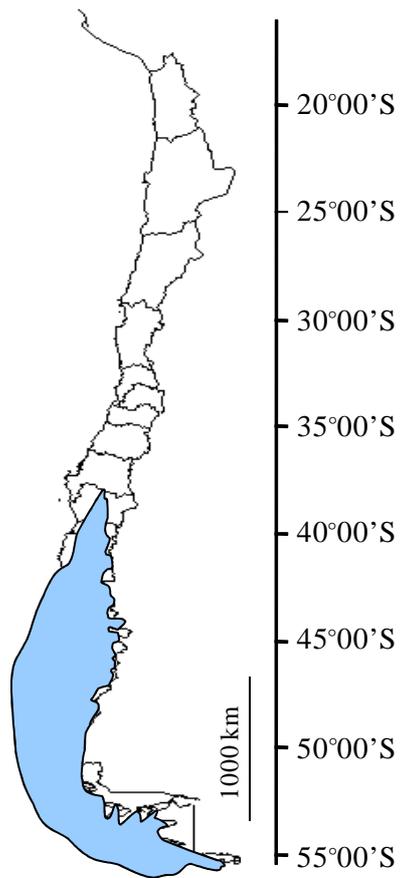


Figure I.7 : Zone recouverte par les glaces lors du dernier maximum glaciaire le long des côtes chiliennes.
Figure d'après Hulton *et al.* (2002).

couche de glace lors du dernier maximum glaciaire (Hulton *et al.*, 2002). Au contraire, dans la région d'étude, entre 16°S et 41°S, aucune discontinuité majeure n'est observée, que ce soit pour des critères topographiques, océanographiques ou historiques. Des différences actuelles existent mais sont présentes sous la forme de gradient sans discontinuité abrupte : ces gradients concernent en particulier la température de l'eau, les précipitations, l'influence des événements ENSO ainsi que l'importance et la saisonnalité des résurgences.

2. Biogéographie des côtes chiliennes

De nombreuses études de biogéographie ont été publiées sur les patrons de distribution des groupes floristiques et faunistiques marins le long des côtes tempérées Pacifiques d'Amérique du Sud (voir pour revue : Camus, 2001 ; Fernandez *et al.*, 2000 ; et Thiel *et al.*, 2007). En 2001, Camus a proposé trois unités biogéographiques majeures : (i) la **Province de Magellan (PM)** au sud, dominée par des espèces subantarctiques et antarctiques, (ii) la **Province Péruvienne (PP)** au nord, dominée par des espèces subtropicales et tempérées et (iii) une **Aire Intermédiaire (AI)** au centre, caractérisée par une diminution des espèces subtropicales et subantarctiques au nord et au sud, respectivement, plutôt que par une superposition des biotas (Camus, 2001, Fig. I.8). Deux zones de transition biogéographiques séparent ces unités spatiales : l'une située entre 40°S et 42°S et l'autre, de moindre importance, située entre 30°S et 33°S. Par la suite, ces deux zones de transition biogéographiques seront appelées transition 42°S et transition 30°S, respectivement.

La discontinuité biogéographique 42°S est située au niveau de l'île de Chiloé et correspond à la séparation entre deux environnements qui diffèrent quant à leurs caractéristiques physiques, océanographiques et historiques, comme vu précédemment (Fig. I.5-8). Cette discontinuité biogéographique se retrouve presque systématiquement chez tous les taxa : invertébrés benthiques, poissons côtiers (Fernandez *et al.*, 2000 ; Ojeda *et al.*, 2000) ainsi que dans les trois règnes d'algues marines (Meneses et Santelices, 2000).

En revanche, la zone de transition 30°S n'est pas observée systématiquement pour tous les taxa et sa délimitation géographique est plus floue (30-33°S). Ainsi, la discontinuité se trouverait aux alentours de 30°S chez les Phaeophyceae, entre 32°S et 33°S pour les Rhodophyceae, mais elle serait absente chez les Chlorophytes (Meneses et Santelices, 2000). Chez les invertébrés benthiques, la localisation géographique de la zone de transition

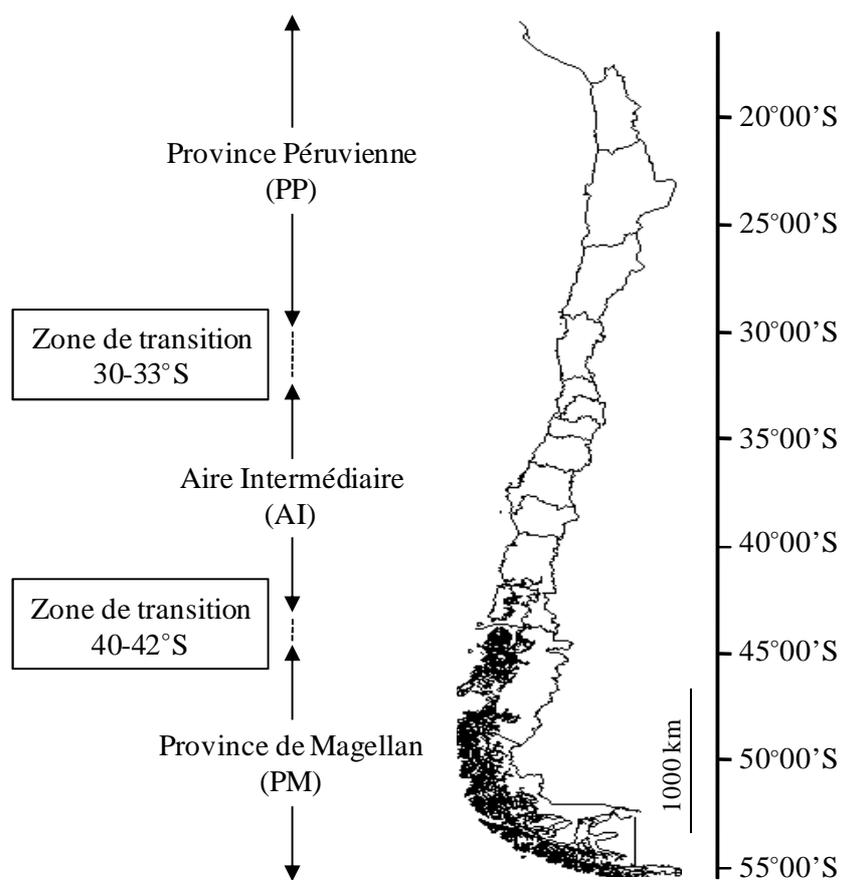


Figure I.8 : Régions biogéographiques décrites le long des côtes chiliennes. Les zones de transition biogéographiques entre régions sont représentées par des lignes pointillées. Figure d'après Camus (2001).

biogéographique varie selon les auteurs et les taxa, mais est généralement située entre 30°S et 33°S (Thiel *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter qu'une zone de transition marquée située autour de 29-30°S a été décrite également pour la flore terrestre (Villagrán et Hinojosa, 2005), séparant la flore méditerranéenne et tempérée-humide au sud, de la flore xérophyte des zones semi-désertiques et hyperarides au nord. L'aridité au nord est due à la présence permanente de l'anticyclone du Pacifique Sud et à l'effet de barrière des Andes pour les vents venant de l'est (Amazonie).

3. Zone de transition 30°S : facteurs historiques et contemporains

Une étude des patrons d'abondance des groupes fonctionnels et trophiques a montré que la zone de transition 30°S (entre 30°S et 33°S) est perçue différemment selon les groupes (Broitman *et al.*, 2001) : tandis qu'aucun patron clair n'est observé pour certains groupes (ex : Cirripèdes), d'autres groupes montrent un léger gradient latitudinal d'abondance (ex : algues éphémères) et d'autres un changement abrupte à 31-32°S (moules). Chez les moules (*Perumytilus purpuratus*) et certaines espèces de cirripèdes (cirripèdes chtamaloïdes : *Jehlius cirratus* et *Notochtamalus scabrosus*), une discontinuité dans les patrons de recrutement a ensuite été montrée, autour des latitudes 32-33°S (Navarrete *et al.*, 2002 ; Navarrete *et al.*, 2005). Chez les algues, certaines espèces de Rhodophytes traversent cette zone de transition mais ne complètent pas leur cycle de vie au sud de cette latitude, sans doute à cause des basses températures des résurgences durant l'été (Acuña *et al.*, 1988). Cette zone de transition biogéographique semble donc être aussi une zone de transition écologique, perçue par différents organismes (invertébrés et algues) : soit parce qu'ils y terminent leur aire de distribution, soit parce qu'ils y montrent une discontinuité démographique (recrutement, abondance et reproduction).

Les deux régions biogéographiques PP et AI ne sont donc pas séparées par une discontinuité environnementale marquée aux alentours de 30°S, mais par la présence d'un gradient s'étirant entre 30 et 33 degrés de latitude sud. Parmi les facteurs environnementaux, le plus marqué est la différence dans les régimes de variation des résurgences (Fig. I.6) : tandis que les résurgences sont permanentes et faibles dans la région PP, elles sont fortes mais saisonnières dans la région AI (Mackas *et al.*, 2006). Les autres facteurs, comme la température de surface de l'eau et l'influence des événements ENSO, forment un gradient entre 18°S et 42°S, sans discontinuité importante (Thiel *et al.*, 2007).

Une étude récente de phylogéographie concernant le gastéropode *Concholepas concholepas* a montré que cette espèce traverse non seulement la zone de transition située à 30°S mais également celle localisée à 42°S sans montrer aucune discontinuité génétique (Cárdenas *et al.*, 2009). Cet organisme se caractérise par une capacité de dispersion importante, avec une durée de vie larvaire supérieure à trois mois. Ces résultats sont donc en accord avec l'observation que chez les organismes marins, la structuration génétique est souvent corrélée négativement avec la capacité de dispersion (Kinlan *et al.*, 2005). Les auteurs suggèrent cependant que le patron phylogéographique observé serait lié à un événement d'expansion démographique datant de 400 000 ans, qui aurait pu « effacer » la structuration phylogéographique préexistante. Afin d'inférer l'histoire de la région, il apparaissait donc particulièrement intéressant de confronter cette étude à celles d'espèces ayant une plus faible capacité de dispersion.

Dans ce travail de thèse, **les espèces de macroalgues brunes *Lessonia nigrescens* et *Lessonia trabeculata* ont été choisies pour leur faible capacité de dispersion : ces espèces sont plus susceptibles de montrer un signal phylogéographique correspondant à la zone de transition biogéographique 30°S** que l'espèce *C. concholepas*. Les deux espèces de *Lessonia* se différenciant principalement par l'habitat (intertidal et subtidal), la comparaison des patrons phylogéographiques permettait d'inférer le rôle de l'habitat dans la perception de cette zone de transition. Dans un deuxième temps, la présence de deux espèces cryptiques au sein de *L. nigrescens* en a fait un bon modèle pour étudier les processus de spéciation chez les algues brunes.

D. L'espèce modèle : *Lessonia nigrescens*, et l'espèce-sœur *Lessonia trabeculata*

1. Choix de l'espèce modèle

*L'espèce modèle principale de mes travaux de thèse a été le taxa *Lessonia nigrescens*. Cependant, l'espèce-sœur *Lessonia trabeculata* a été considérée comme élément de comparaison. Ces taxa étant co-distribués dans la région d'étude et leur distinction taxonomique étant relativement récente (1986), il est apparu important de considérer également *L. trabeculata* dans l'étude des processus de spéciation.*

Lessonia nigrescens Bory et *Lessonia trabeculata* Villouta et Santelices sont deux

Encadré I.4 : Présentation des espèces modèles : *Lessonia nigrescens* et *Lessonia trabeculata*TaxonomieDivision : *Chromophyta*Famille : *Lessoniaceae*Classe : *Phaeophyceae*Espèces : *Lessonia nigrescens* Bory

Ordre : Laminariales

Lessonia trabeculata Villouta et SantelicesNoms communs : *L. nigrescens* : huiro negro, chascón*L. trabeculata* : huiro palo

Genre des *Lessonia* : *Lessonia* est le seul genre de Laminariales qui soit présent uniquement dans l'hémisphère Sud (Cho *et al.*, 2006). Le nombre exact d'espèces reste incertain, notamment en ce qui concerne les espèces habitant les îles subantarctiques et la pointe sud du continent américain, du fait de la variabilité morphologique importante dans ce genre et du nombre restreint d'études réalisées dans ces régions. En Amérique du Sud, la dernière révision taxonomique réalisée avant le début de cette thèse faisait état de quatre espèces : *L. nigrescens* Bory, *L. trabeculata* Villouta et Santelices, *L. flavicans* Bory et *L. vadosa* Searles (Villouta et Santelices, 1986).

Critères de reconnaissance entre les deux espèces : Dans la région d'étude (16-42°S), seules *L. trabeculata* et *L. nigrescens* sont présentes (Fig. I.10). D'après Villouta et Santelices (1986), les deux caractères les plus importants séparant ces deux espèces sont la présence de trabecules dans le tissu cortical des frondes et des stipes et une différence dans la morphologie du disque, plus massif et irrégulier chez *L. trabeculata* que chez *L. nigrescens*. Dans les populations naturelles, il est généralement possible de distinguer *L. nigrescens* de *L. trabeculata* par la couleur des frondes (brun vs. vert-noir) et par la morphologie des frondes, bien que dans certains sites particuliers la distinction soit parfois difficile (obs. pers.).

Habitats : Les deux espèces sont spécifiques de l'habitat rocheux exposé à semi-exposé. *L. nigrescens* est considérée comme une espèce de l'intertidal bas (-1 à +1m), tandis que *L. trabeculata* est présente généralement dans le haut de l'étage subtidal (jusqu'à 30 m de profondeur) mais peut être observée également dans l'étage intertidal (Villouta et Santelices, 1986 et obs. pers.).

Traits d'histoire de vie : Les deux espèces de *Lessonia* étudiées présentent un cycle de reproduction haplo-diploïde hétéromorphe, se caractérisant par l'alternance d'une phase haploïde microscopique, le gamétophyte, et d'une phase diploïde macroscopique, le sporophyte (Fig. I.12). Les sporophytes peuvent atteindre jusqu'à 6 mètres de longueur et sont constitués de trois éléments : le disque de fixation, les stipes et les frondes. La croissance s'effectue au niveau de la zone méristématique située entre le stipe et la fronde. Cette zone se divise de façon dichotomique au cours de la croissance, ce qui entraîne une augmentation du nombre de stipes et de frondes. Les disques d'individus proches peuvent fusionner lors de la croissance, rendant difficile l'identification des différents individus sur le terrain. Le nombre de stipes et de frondes par disque est variable, allant parfois jusqu'à plus de 50 stipes au niveau du disque, chaque stipe étant ramifié et pouvant avoir plus d'une centaine de frondes. Les tissus végétatifs des frondes peuvent passer à l'état reproductif et produire des spores, les tissus reproductifs et végétatifs n'étant pas spatialement séparés. Le nombre de frondes matures et la surface représentée par les sores sont variables selon les saisons, les sites et les individus. Les sporophytes peuvent survivre plusieurs années (au moins plus de 5 ans), bien que des suivis démographiques seraient nécessaires pour estimer correctement les paramètres démographiques des espèces, tels que la survie, l'âge à la maturité ou le taux de recrutement.

espèces de macroalgues brunes dominant l'habitat rocheux du Pacifique sud-est (Encadré I.4 et Fig. I.9). Ces deux espèces diffèrent par leur habitat, respectivement intertidal et subtidal, et par leur aire de distribution (Fig. I.10) : *L. trabeculata* est présente entre 12°S et 40°S (île de Chiloé), tandis que *L. nigrescens* s'étend de 17°S à 56°S (Cap Horn) (Ramírez et Santelices, 1991 ; Searles, 1978). Cependant, des doutes concernant la limite nord de la distribution des deux espèces existent car elle semble reculer vers le sud sous l'effet des événements ENSO (Martínez *et al.*, 2003 ; Peters et Breeman, 1993 ; Castilla et Camus, 1992), et des interrogations subsistent quant à la présence ou l'absence de chacune des deux espèces dans le nord du Chili et au Pérou central (Villouta et Santelices, 1986). Etant donné les connaissances actuelles, *L. trabeculata* et *L. nigrescens* semblent donc différer dans leur perception de la zone de transition biogéographique 42°S puisque, contrairement à l'espèce intertidale, *L. trabeculata* trouve sa limite sud dans cette zone. En revanche, aucune des deux espèces ne semble percevoir les discontinuités environnementales de la zone de transition biogéographique 30°S.

2. Importance écologique et économique de ces espèces

Les *Lessonia* sont considérées comme des espèces ingénieurs (*sensu* Jones *et al.*, 1994) jouant un rôle majeur dans la structuration des étages intertidal et subtidal rocheux exposés et semi-exposés (Hoffman et Santelices, 1997). Les *Lessonia* spp. forment de véritables forêts (*sensu* Steneck *et al.*, 2002) qui sont des zones d'habitat et de recrutement pour de nombreuses espèces d'invertébrés (voir par exemple Vásquez et Santelices, 1984 et Cancino et Santelices, 1984). Ce sont également les principaux producteurs primaires par leur biomasse et sont à la base de la chaîne alimentaire de l'habitat rocheux des côtes chiliennes.

Ces espèces ont également une forte importance économique, servant à produire des alginates, polysaccharides qui sont notamment inclus dans la nourriture, les cosmétiques et les peintures (Encadré I.5). La récolte de *Lessonia* au Chili se fait de deux façons : en ramassant les individus échoués sur les plages ou en extrayant directement les individus des populations naturelles (Fig. I.11).

3. Traits d'histoire de vie des deux espèces

Les processus historiques et contemporains qui sont à l'origine de la distribution de la diversité génétique sont étroitement liés aux traits d'histoire de vie. Ainsi, la capacité de

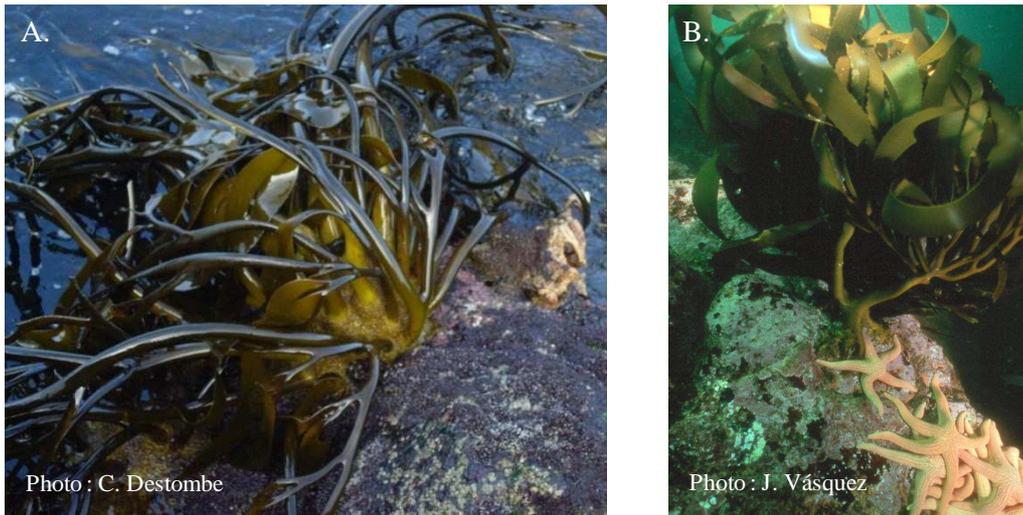


Figure I.9 : Individus adultes de *L. nigrescens* (A) et de *L. trabeculata* (B). Ces thalles mesurent entre un et trois mètres.

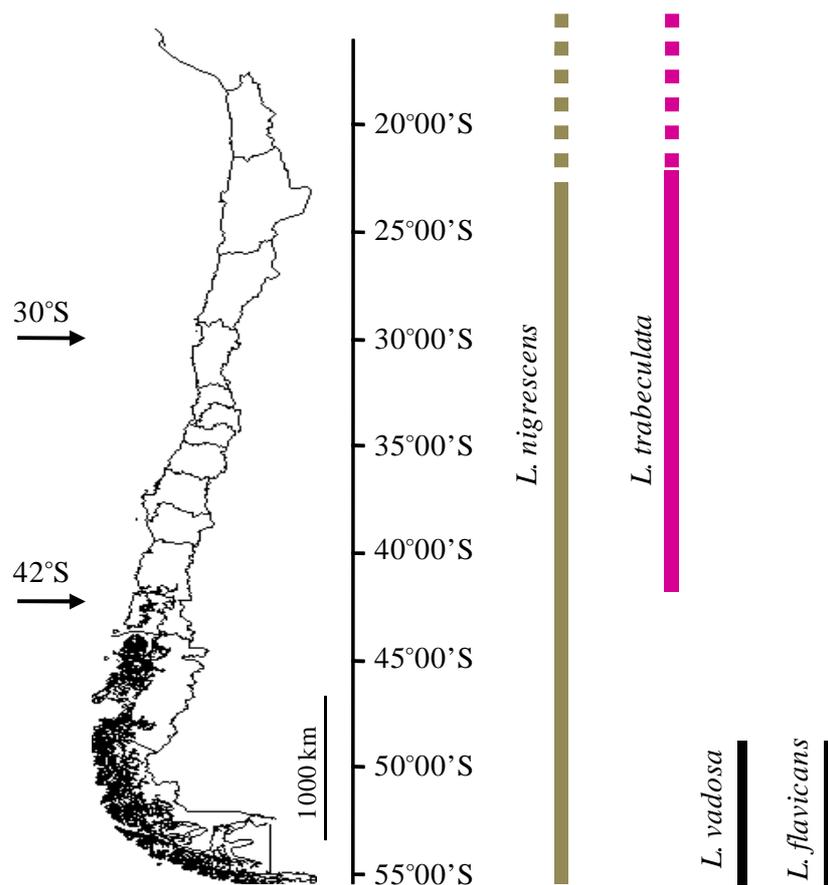


Figure I.10 : Aires de distribution des espèces de *Lessonia* reconnues en Amérique du Sud. La limite nord de l'aire de distribution de *L. nigrescens* et de *L. trabeculata* n'étant pas clairement définie (voir texte), l'aire de distribution est représentée par une ligne discontinue dans cette région. La localisation des deux zones de transition biogéographiques est indiquée par des flèches.

Encadré I.5 : Importance économique de *Lessonia nigrescens* et *Lessonia trabeculata*

La récolte des macroalgues brunes chiliennes représente 10% de la récolte mondiale et est constituée à 90% par *L. nigrescens* et *L. trabeculata*, soit respectivement 162 000 et 27 000 tonnes en 2006 (source : SERNAPESCA). Les *Lessonia* spp sont principalement utilisées comme source d'alginate, polysaccharides qui sont notamment inclus dans la nourriture, les cosmétiques et l'industrie pharmaceutique. L'industrie des ormeaux, nécessitant des individus fraîchement récoltés, reste pour l'instant marginale pour *Lessonia* spp, *Macrocystis* spp étant la principale source d'alimentation pour ces cultures (Vásquez, 2008).

L'extraction de *Lessonia* spp par les pêcheurs-collecteurs artisanaux s'effectue de deux façons : (i) par le ramassage des individus qui se sont détachés naturellement et sont échoués sur les plages, et (ii) par l'extraction directe d'individus dans les populations naturelles en coupant le disque de l'individu ou en coupant les stipes. Alors que le ramassage d'individus échoués est une pratique ancienne, l'extraction directe des individus augmente depuis la fin des années 90, suite à la pression des marchés internationaux des alginate (Vásquez, 2008). La culture de *Lessonia* spp, et en particulier de *L. trabeculata*, a fait l'objet d'études (Edding, et Tala, 2003) mais reste difficile à mettre en œuvre.

La récolte de *Lessonia* spp s'effectue principalement entre 26°S et 32°S (Région d'Atacama et Région de Coquimbo), ce qui s'explique par les conditions climatiques arides qui permettent le séchage des algues. La récolte est limitée plus au nord par l'impact des événements ENSO sur les populations de *Lessonia*, conduisant à des extinctions locales de populations.

Le système des Aires de Gestion et d'Exploitation des Ressources Benthiques (*Areas de Manejo y Explotación de Recursos Bentónicos*), particulier au Chili, consiste à définir un plan de gestion durable des ressources benthiques spécifique à une zone géographique donnée en établissant un accord entre les pêcheurs, organisés en syndicats locaux, et les autorités. Ces plans de gestion concernent généralement des espèces d'invertébrés à forte valeur commerciale, mais peuvent inclure les espèces de *Lessonia* comme espèce principale ou secondaire. L'augmentation de l'extraction directe a cependant amené les autorités chiliennes à déclarer une interdiction de la récolte de *Lessonia* hors des Aires de Gestion pour une période de temps indéterminée depuis 2005 (SERNAPESCA). Les études scientifiques recommandent de prendre en compte spécifiquement les kelps, *Macrocystis* spp et *Lessonia* spp, dans les plans de gestion et d'inclure des règles pour l'extraction directe des individus dans les populations naturelles, afin de permettre le recrutement et le renouvellement des populations (Vásquez, 2008).



Figure I.11 : Récolte de *L. nigrescens* et *L. trabeculata*. Les algues échouées sur la plage ou récoltées par extraction directe sont d'abord mises à sécher (A) puis empaquetées (B) avant d'être vendues à un intermédiaire (C). Les algues sont ensuite transformées en poudre, dont une grande proportion sera exportée vers la Chine, le Japon ou l'Europe (en particulier vers la France), avant l'extraction des alginate.

L'algue au premier plan sur la photo A mesure environ deux mètres de longueur, les fagots sur la photo B sont d'environ 1m x 50 cm.

dispersion et la démographie des populations permettent de faire des hypothèses sur les patrons phylogéographiques des espèces étudiées. D'autre part, une connaissance des caractéristiques du cycle de vie est essentielle pour déterminer les barrières reproductives qui contribuent au maintien de l'intégrité des taxa. Dans cette partie, les connaissances actuelles des traits d'histoire de vie de ces deux espèces seront présentées.

Caractéristiques générales du cycle de vie

Comme les autres espèces de Laminariales, *L. nigrescens* et *L. trabeculata* ont un cycle de vie haplo-diploïde hétéromorphe, avec une phase diploïde macroscopique (le sporophyte) et une phase haploïde microscopique (le gamétophyte) (Fig. I.12). Ces espèces sont dioïques : les organes mâles et femelles se développent sur des individus gamétophytiques distincts. La libération des gamètes mâles et leur attraction se fait par l'intermédiaire de phéromones produites par le gamétophyte femelle (Lünning et Müller, 1978). Les phéromones étant produites en petites quantités, l'effet d'attraction des gamètes mâles semble limité à de très courtes distances, décrites comme inférieures au millimètre (Boland, 1983, cité par Reed *et al.*, 2005). Le jeune sporophyte obtenu après fécondation germe *in situ*, sur le gamétophyte femelle sans phase de dispersion. Lorsque le sporophyte est mature, des méiospores biflagellées sont produites au niveau des frondes (sores) et, dans le cas de *L. nigrescens*, relativement fréquemment au niveau des stipes (Venegas *et al.*, 1992). Ces spores, libérées dans la colonne d'eau, semblent en général avoir une durée de vie relativement courte, inférieure à 24 h (E. Martínez, com. pers.).

Une capacité de dispersion limitée

La principale phase de dispersion des Laminariales s'effectuerait donc par l'intermédiaire des spores, plutôt que par l'intermédiaire des gamètes. Cette dispersion semble largement déterminée par les vagues et les courants, avec une forte proportion de spores germant à proximité des parents (Gaylord *et al.*, 2002 ; Reed *et al.*, 2005, mais voir discussion de Billot *et al.*, 2003 et Kusumo *et al.*, 2006 en utilisant des marqueurs moléculaires). La distance de dispersion des spores semblerait liée à la morphologie des espèces et en particulier à la stratégie de dispersion « distale » ou « proximale » : les espèces dont les structures reproductives sont situées à la base de l'individu (« proximales ») semblerait montrer une plus faible dispersion des spores que les espèces dont les structures reproductives sont situées à l'extrémité des frondes (« distales », Billot *et al.*, 2003). Les espèces distales, comme *Laminaria digitata* et *Pelagophycus porra*, montrent ainsi des distances de dispersion allant

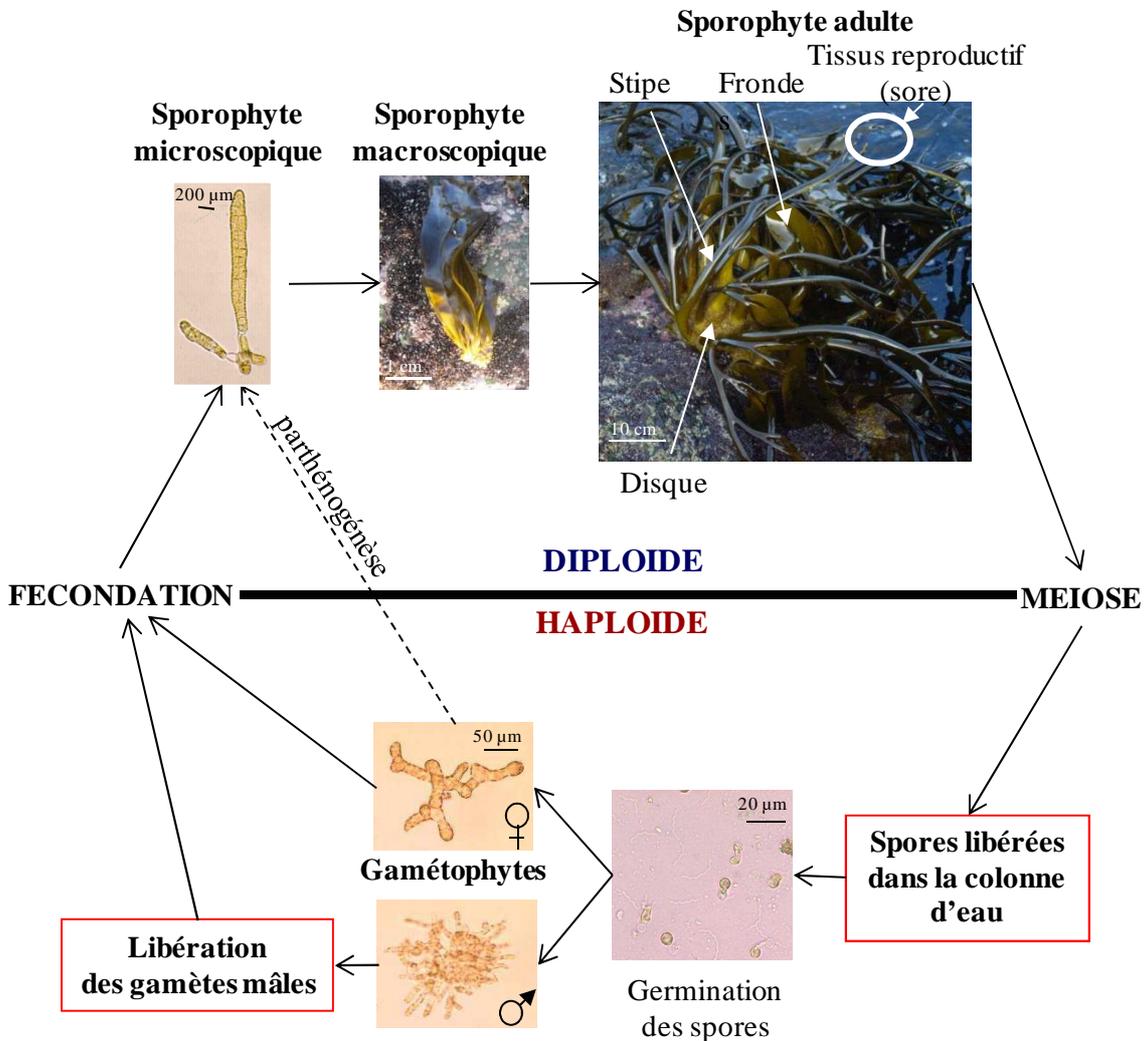


Figure I.12 : Cycle de vie haplo-diploïde hétéromorphe des espèces du genre *Lessonia*. Photos : *L. nigrescens*. Le cycle comporte une phase haploïde microscopique (gamétophyte) et une phase diploïde macroscopique (sporophyte). Le sporophyte produit par méiose des spores au niveau de frondes. Ces spores sont libérées dans la colonne d'eau et constituent sans doute la principale structure de dispersion. La germination des spores sur la roche produit deux types de gamétophytes, mâles et femelles. La dispersion des gamètes mâles peut être considérée comme une étape de dispersion, mais elle s'effectue probablement sur de faibles distances (inférieure au millimètre) : la fusion avec le gamète femelle est dépendante de l'effet de phéromones. Le sporophyte se développe directement sur le gamétophyte femelle. La possibilité de parthénogénèse existe en conditions de laboratoire, et on suppose qu'elle est le résultat d'une endoduplication du génome. Cependant, la parthénogénèse n'a pas encore été démontrée en conditions naturelles (flèche en pointillés).

jusqu'à quelques kilomètres, tandis que cette distance est de quelques mètres pour les espèces proximales *Alaria marginata* et *Postelsia palmaeformis* (voir pour revue Billot *et al.*, 2003 et Kusumo *et al.*, 2006).

La dispersion entre habitats favorables s'effectue probablement par la dérive d'individus reproducteurs détachés de la roche et emmenés par les courants. L'importance de ce mode de dispersion par rapport à la dispersion par les spores paraît être dépendante de la capacité de flottaison des thalles. En particulier, la présence de structures de flottaison remplies d'air favorise la formation de radeaux de thalles, comme par exemple pour les espèces de *Macrocystis* spp. : ces radeaux peuvent dériver sur des milliers de kilomètres et libérer des spores dans la colonne d'eau (Reed *et al.*, 2005 ; Macaya *et al.*, 2005). La dispersion par thalle dérivant semble également jouer un rôle primordial pour certaines espèces ne possédant pas de telles structures de flottaison, comme par exemple *Postelsia palmaeformis* (Kusumo *et al.*, 2006). Même si la proportion de spores qui dispersent à grande distance est faible, ce mécanisme peut néanmoins avoir des conséquences importantes pour la connectivité entre populations et pour la biogéographie des espèces (Kinlan *et al.*, 2005).

Les espèces de *Lessonia* produisant des spores sur toute la longueur des frondes, elles peuvent être considérées comme des espèces à stratégie de dispersion distale. L'absence de structure de flottaison chez ces espèces limite néanmoins la dispersion par thalles flottants : ces espèces n'ont jamais été observées dans les radeaux flottants présents au large des côtes chiliennes (Thiel et Gutow, 2004). Cependant, il est fréquent d'observer des thalles échoués sur des plages proches des populations naturelles, suggérant une dérive d'individus sur des distances de l'ordre de quelques kilomètres, en particulier lors de tempêtes (Rodriguez, 2003 ; obs. pers.). Une étude basée sur des marqueurs génétiques dominants (RAPD) a montré que chez *L. nigrescens* la dispersion semble se faire majoritairement à très courtes distances, formant ainsi des groupes d'individus apparentés (familles), avec cependant des événements probables de dispersion à plus grande distance (Faugeron *et al.*, 2005). La vitesse de recolonisation après un événement de mortalité massive de populations de *L. nigrescens* paraît très lente (par ex. : suite à El Niño 1982/83 où la recolonisation s'est effectuée à environ 3 km par an Martínez *et al.*, 2003 ; 25-300m par an suite à la contamination par les métaux lourds, S. Faugeron, com. pers). A titre de comparaison, *Macrocystis pyrifera* en Basse Californie (Mexique) a recolonisé plus de 300 km de côte en six mois (Reed *et al.*, 2005).

La présence de gamétophytes dioïques et de phéromones agissant sur de très courtes distances chez les Laminariales rend nécessaire le recrutement de gamétophytes mâles et femelles à très faible distance l'un de l'autre pour qu'il y ait fécondation et recrutement de

sporophytes. Néanmoins, il a été montré que les gamétophytes femelles de certaines espèces de Laminariales, dont *L. nigrescens*, sont capables de produire des sporophytes par parthénogenèse en conditions de laboratoire, lorsqu'ils sont en l'absence de gamétophytes mâles (Oppliger *et al.*, 2007). Cela semblerait s'accompagner d'une endo-duplication du matériel génétique, le sporophyte étant diploïde. Bien que la présence d'individus parthénosporophytes dans les populations naturelles n'ait pas été encore démontrée, ce mécanisme pourrait avoir des conséquences importantes pour la capacité de colonisation de l'espèce : pour coloniser un nouvel environnement, il suffirait alors qu'un seul gamétophyte femelle recrute, sans qu'un gamétophyte mâle soit nécessairement présent à très courte distance du gamétophyte femelle (millimètres), ni que les deux individus soient matures au même moment.

Démographie des populations de Lessonia

Certaines données existent sur les patrons de recrutement, de croissance et de survie de *L. nigrescens* pour des populations situées entre 26°S et 33°S (Santelices *et al.*, 1980 ; Santelices et Ojeda, 1984 ; Ojeda et Santelices, 1984 ; Vásquez *et al.*, 2008). Cependant, ces études ne s'intéressent que rarement à l'estimation de la valeur sélective des individus (par ex. une possible relation entre la taille des individus et leur âge ou entre la taille et la contribution à la reproduction).

La majorité de ces études se sont concentrées autour des latitudes 33°S et 26-32°S et les résultats sont difficilement extrapolables à d'autres régions du Chili. Notamment, la comparaison entre des sites situés à 20°S et entre 26°S et 33°S permet de noter une asynchronie latitudinale de la phénologie de la reproduction : le pic de recrutement est situé à la fin de l'automne / début de l'hiver entre 33°S et 26°S, tandis qu'à 20°S ce pic se situe en décembre (été austral) (Camus, 1994 ; Vásquez *et al.*, 2008). Cette asynchronie pourrait être liée aux différences climatiques et à une différence de saisonnalité de l'herbivorie. Des individus reproducteurs et des recrues peuvent cependant être observés toute l'année dans les populations (S. Faugeron et J. Correa, com. pers.).

Une forte mortalité a été observée pour le stade juvénile, tandis que les individus arrivés à maturité ont un taux de survie important. Le sporophyte est pérenne, pouvant vivre plusieurs années avec plusieurs périodes de reproduction (S. Faugeron, com. pers. et obs. pers.). Les individus deviennent matures entre 9 et 12 mois après recrutement (Vásquez *et al.*, 2008).

Avant ce travail de thèse, des différences morphologiques et de phénologie avaient été

observées entre populations de *L. nigrescens*, mais aucune véritable comparaison n'avait été effectuée pour déterminer s'il s'agissait de plasticité phénotypique, en réponse à l'environnement (radiations UV plus importantes au nord, eaux plus chaudes...), ou d'adaptation locale.

L. trabeculata montre un pic de maturité en automne et un recrutement principalement en automne et en hiver. Contrairement à *L. nigrescens*, la croissance des individus adultes est limitée par la dégradation des frondes, amenant parfois à une croissance négative (Tala et Edding, 2005 ; Vásquez *et al.*, 2008). Des résultats récents montrent que la portion de tissus reproducteur et la production de spores chez *L. trabeculata* est inférieure à ce qui a été observé chez *L. nigrescens* (Vásquez *et al.*, 2008). Le recrutement semble être également globalement plus limité que pour *L. nigrescens* et fortement variable entre localités (Vásquez *et al.*, 2008).

4. Information préliminaire concernant la phylogéographie de *L. nigrescens* et *L. trabeculata*

Une étude préliminaire de phylogéographie de *L. nigrescens* et *L. trabeculata* entre 19°S et 41°S avait été réalisée dans le cadre d'un stage de Master 2 par Andrés Meynard (2005). Afin de tester l'hypothèse qu'à la zone de transition biogéographique 30°S correspond une discontinuité génétique, Meynard (2005) a utilisé trois marqueurs mitochondriaux intergéniques non codants : *atp8/trnS*, *trnW/trnI* et *rpl31/rns*, développés par Engel *et al.* (2008). Ces marqueurs ont été utilisés pour analyser un échantillonnage réduit d'une trentaine d'individus de *L. nigrescens* répartis sur l'ensemble de l'aire de distribution. Une analyse populationnelle a ensuite été menée à l'aide du marqueur montrant le polymorphisme le plus important, à la fois en terme de substitution et d'insertion-délétion (indels) : cette analyse a porté sur un total de 407 individus issus de 24 populations (1 à 33 individus par population).

Ces données préliminaires ont montré la présence d'une faible différenciation génétique au sein de *L. trabeculata*, avec deux haplotypes différents de part et d'autre de la zone de transition 30°S. Pour *L. nigrescens*, l'analyse des marqueurs mitochondriaux a montré l'existence d'une discontinuité génétique majeure située autour de 30°S. Deux groupes d'haplotypes ont ainsi été observés et semblent montrer une divergence comparable à ce qui peut être observé entre espèces différentes au sein du genre *Lessonia* (Meynard, 2005).

L. nigrescens montre globalement une diversité extraordinairement plus forte comparée à *L. trabeculata*, avec une structuration génétique beaucoup plus prononcée. Les objectifs de la thèse ont été déterminés en prenant en compte ces résultats. Les marqueurs utilisés par Meynard (2005) pouvaient cependant refléter l'histoire de la mitochondrie plutôt que l'histoire des espèces. Il nous fallait élargir cette étude en utilisant des marqueurs d'autres compartiments du génome. D'autre part, dans le cas où *L. nigrescens* serait effectivement constituée de deux lignées fortement divergentes, ce taxon apparaissait comme une opportunité pour étudier les processus de spéciation et l'évolution des barrières reproductives chez les Phaeophyceae, dans ce « laboratoire naturel » constitué par la zone de contact entre les lignées. Enfin, la comparaison entre *L. nigrescens* et *L. trabeculata* permettait de reconstruire l'histoire de la zone de transition biogéographique 30°S et d'étudier l'importance des traits d'histoire de vie dans la perception de cette zone de transition.

E. Problématique de la thèse

L'objectif général de ma thèse a été d'inférer les processus historiques et contemporains qui sont à l'origine de la distribution de la diversité génétique chez *L. nigrescens*. Ce projet de thèse s'intègre dans le cadre du Laboratoire International Associé (LIA « DIAMS », regroupant les deux laboratoires impliqués), dont un des programmes de recherche a pour but de réaliser une étude comparative de phylogéographie et de la dispersion de plusieurs espèces dans la région d'étude. Tandis que le premier chapitre de cette thèse se concentre sur les processus historiques, le second chapitre présente l'étude des processus contemporains contribuant au maintien de la structuration observée. Pour répondre à ces objectifs, j'ai utilisé des approches différentes mais complémentaires, de biologie moléculaire (phylogénie et phylogéographie, génétique des populations) et d'écologie expérimentale (en conditions naturelles et contrôlées). J'ai également utilisé une combinaison de différentes échelles spatiales, allant de l'échelle des régions biogéographiques du Chili (16-40°S), à l'échelle de la zone de transition (29-30°S) et à l'échelle des zones de contact (quelques kilomètres).

Le premier objectif de cette thèse a été de reconstituer l'histoire évolutive de *L. nigrescens* à l'aide d'approches de phylogénie et de phylogéographie, en utilisant une

combinaison de marqueurs issus des trois compartiments génomiques : mitochondrial, chloroplastique et nucléaire. A l'aide d'un échantillonnage important autour de la zone de transition biogéographique 30°S, j'ai testé la concordance entre cette zone de transition et une discontinuité génétique chez ce taxa, et j'ai analysé les processus démographiques pouvant être à l'origine de la distribution de la diversité génétique observée entre 16°S et 40°S. L'espèce *L. trabeculata* a été utilisée comme élément de comparaison. Afin de reconstruire l'histoire de cette région et de déterminer l'importance des traits d'histoire de vie, les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'autres espèces marines chiliennes. Cette partie constitue le premier chapitre de ce manuscrit de thèse.

La détection de deux lignées fortement divergentes au sein de *L. nigrescens* m'a amené à suggérer la présence de deux espèces cryptiques, en se basant sur les phylogénies obtenues (concept phylogénétique de l'espèce). **Le deuxième objectif s'est concentré sur le processus de spéciation chez l'espèce morphologique *L. nigrescens*, en se focalisant sur la région géographique où les deux espèces cryptiques sont présentes (29-30°S).** Afin de caractériser l'importance de l'isolement reproducteur en conditions naturelles, j'ai tout d'abord estimé les flux géniques entre ces espèces. J'ai ensuite utilisé des approches d'écologie expérimentale en conditions naturelles et de laboratoire afin d'identifier les barrières reproductives et les forces évolutives impliquées dans l'isolement reproducteur. Les hypothèses spécifiques testées ont été (i) la présence de flux de gènes limités en conditions naturelles, confirmant la présence d'espèces cryptiques, et (ii) l'action de barrières reproductives extrinsèques, liées à l'action de la sélection naturelle divergente. Ces objectifs ont été testés en utilisant des approches respectivement de génétique des populations, d'écologie expérimentale en conditions naturelles, par une expérience de transplantations réciproques, et en conditions contrôlées, par une expérience de tolérance à un paramètre environnemental spécifique, la température et ses régimes de variation temporelle. Enfin, des résultats préliminaires suggérant des mécanismes de réarrangement du génome mitochondrial seront présentés, de par leur intérêt dans l'étude du processus de spéciation, comme possible mécanisme d'isolement reproducteur, chez *L. nigrescens*. L'ensemble de ces études des barrières reproductives constitue le second chapitre de ce manuscrit de thèse.

Enfin nous concluons ce manuscrit de thèse en discutant du statut d'espèce chez les taxa étudiés et de son importance pour la gestion de la ressource naturelle. Nous dégagerons également les éléments de cette thèse qui ont permis de mieux comprendre l'histoire de la région d'étude et les processus de spéciation chez les Laminariales.

CHAPITRE 1

ETUDE PHYLOGEOGRAPHIQUE :
COMPRENDRE LES PROCESSUS PASSES

CHAPITRE 1. Etude phylogéographique : comprendre les processus passés

*Note : L'étude phylogéographique de *Lessonia nigrescens* (approches multilocus et populationnelle) a fait l'objet d'un article accepté, en cours de révision, dans la revue Molecular Phylogenetics and Evolution (Annexe 3.1).*

A. Problématique

1. Phylogéographie : inférer les processus historiques et contemporains affectant les espèces

La phylogéographie, sous-discipline de la biogéographie, est l'étude des principes et des processus qui gouvernent la distribution géographique des lignées de gènes, au niveau intra-spécifique et entre espèces phylogénétiquement proches (Avice, 2000). En étudiant la distribution spatiale des allèles et en reconstruisant les relations phylogénétiques entre ceux-ci, la phylogéographie permet d'inférer les processus historiques et contemporains ayant affecté les espèces. L'analyse et l'interprétation des données nécessitent l'intégration des concepts de génétique des populations et de phylogénie mais également de données intrinsèques aux espèces (ex : capacité de dispersion, physiologie), et de connaissances sur leur histoire (paléontologie) et sur l'histoire de la région géographique étudiée (géographie historique et géologie). La phylogéographie permet ainsi d'étudier la spéciation dans un contexte géographique et temporel.

Contrairement à l'approche classique de la phylogénie, la théorie de la coalescence utilise les généalogies de gènes pour remonter dans le temps et identifier l'ancêtre commun le plus récent. En traitant des attendus statistiques des relations historiques entre lignées de gènes en fonction des paramètres démographiques, la théorie de la coalescence permet de situer dans le temps les évènements démographiques passés, comme par exemple des évènements de vicariance ou une expansion démographique, et des évènements plus récents, comme la présence de contacts secondaires après vicariance.

2. Phylogéographie et traits d'histoire de vie

Les trois hypothèses fondamentales de la phylogéographie ont été présentées par Avise (1987) et sont reprises dans l'Encadré 1.1. La première hypothèse concerne la présence d'une structuration géographique de la structure génétique. Alors que les études de phylogéographie montrent des résultats congruents avec cette hypothèse, et notamment l'absence de taxa présent sur l'ensemble du globe sans discontinuité génétique, cette hypothèse n'est pas acceptée par tous les auteurs (voir notamment Whitfield, 2005). L'hypothèse 2 suppose que la capacité de dispersion joue généralement un rôle majeur dans la structure géographique des espèces. Chez les invertébrés marins, la présence d'une phase larvaire planctonique, sa durée de vie et la possibilité de dérive des individus adultes sont des traits d'histoire de vie qui favorisent la dispersion. Ils sont généralement négativement corrélés avec la structure génétique (Palumbi, 1994 ; Féral, 2002 ; Kinlan et Gaines, 2003), comme par exemple au niveau des zones de transition biogéographiques de Californie (Dawson, 2001 ; Dawson *et al.*, 2002) ou d'Afrique du Sud (Teske *et al.*, 2006). La durée de vie larvaire n'est cependant pas suffisante pour déterminer le potentiel de dispersion d'une espèce, et il est important de prendre en compte les traits d'histoire de vie comme le comportement des larves.

Le potentiel de dispersion interagit également avec des facteurs environnementaux, tels que la présence de barrières physiques à la dispersion (courants, gyres) et/ou physiologiques (température) actuelles et passées. Le cas du gastéropode *Nerita atramentosa* illustre bien l'importance de ces facteurs environnementaux (Waters *et al.*, 2005) : cette espèce présente un fort potentiel de dispersion, avec une phase larvaire planctonique de cinq à six mois, et montre une absence de structure phylogéographique entre les côtes australiennes et néo-zélandaises, séparées par plus de 2000 km (région du détroit de Bass), ce qui est donc en accord avec l'hypothèse 2 de phylogéographie (Encadré 1.1). Cependant, cette espèce montre une discontinuité phylogéographique marquée entre l'est et l'ouest du détroit de Bass, avec la présence d'une zone de chevauchement entre lignées relativement limitée. L'origine de cette discontinuité est associée à la présence de terres émergées entre l'Australie et la Tasmanie lors des régressions marines qui ont eu lieu pendant les trois derniers millions d'années, constituant ainsi une barrière à la dispersion, tandis que le maintien de cette discontinuité est liée à la présence de courants limitant actuellement les flux de gènes entre l'est et l'ouest du détroit. Des espèces sœurs co-distribuées et ayant donc été soumises aux

Encadré 1.1 : Présentation des hypothèses de phylogéographie et des corolaires, d'après Avise (1987).

Hypothèse 1 :

La plupart des espèces sont composées de populations géographiques dont les membres occupent différentes branches d'un arbre phylogénétique intraspécifique = présence d'une structuration phylogéographique.

Hypothèse 2 :

Les espèces montrant une faible structuration phylogéographique ont des traits d'histoire de vie favorables à la dispersion et ont une aire de distribution caractérisée par l'absence de barrière à la dispersion.

Hypothèse 3 :

Les groupes monophylétiques séparés par une discontinuité phylogénétique importante sont généralement la conséquence de barrières extrinsèques aux flux de gènes qui ont persisté pendant une longue période de temps. Trois corolaires découlent de cette hypothèse :

- (i) Le degré de concordance phylogéographique entre différentes généalogies de gènes augmente lorsque le temps écoulé depuis l'apparition de la barrière aux flux de gènes augmente : la différenciation phylogénétique entre populations isolées depuis longtemps devrait être observée pour de nombreux gènes nucléaires et cytoplasmiques.
- (ii) Les positions géographiques des discontinuités phylogénétiques sont concordantes entre espèces co-distribuées.
- (iii) Les discontinuités phylogénétiques intraspécifiques sont géographiquement concordantes avec les zones de transition biogéographiques décrites.

mêmes facteurs historiques peuvent également montrer des différences de structure génétique, malgré un potentiel de dispersion similaire : la perception des barrières (ou filtres) à la dispersion peut être différente selon les tolérances physiologiques des espèces ou selon l'habitat. Ainsi, probablement du fait de conditions plus stressantes en intertidal, les espèces situées plus haut sur l'estran semblent montrer une structure génétique plus prononcée que celles situées en bas de l'estran (Marko, 2004),

Les études réalisées chez les invertébrés marins ont ainsi montré que la distance de dispersion est souvent directement liée à la durée de vie larvaire planctonique (Kinlan et Gaines, 2003) mais également que le comportement des larves, la topographie et l'histoire de la région jouent un rôle dans la structure génétique intraspécifique. Chez les algues, le nombre d'études est plus restreint. Ces taxa sont généralement considérés comme de faibles disperseurs, conséquence de la durée de vie courte des spores et des gamètes (Santelices, 1990 ; Kinlan *et al.*, 2005). Des structures génétiques à petite échelle spatiale ont effectivement été observées pour une variété de taxa, allant d'une échelle de quelques mètres (ex : algues rouges : Engel *et al.*, 2004 ; algues brunes : Kusumo *et al.*, 2006) à plusieurs kilomètres, probablement liées à des événements de dispersion à longue distance (ex algues brunes : Billot *et al.*, 2003 ; Muhlin *et al.*, 2008). Chez certaines espèces d'algues, la capacité de flottaison peut cependant favoriser la dispersion à longue distance et avoir pour conséquence une structure génétique peu prononcée (phénomène de « rafting », ex : *Durvileae antarctica* : Fraser *et al.*, 2009 ; *Macrocystis sp.* : Coyer *et al.*).

Le long des côtes chiliennes, l'étude de la phylogéographie du gastéropode *Concholepas concholepas* (loco) a montré l'absence de discontinuité phylogéographique associée aux deux zones de transition biogéographiques situées aux latitudes 30°S et 42°S (Cárdenas *et al.*, 2009). Cependant, cette espèce est caractérisée par une capacité de dispersion très élevée (phase larvaire planctonique supérieure à trois mois), et ce résultat est donc concordant avec l'hypothèse 2 de la phylogéographie (Encadré 1.1 ; Avise, 2000). Chez *L. nigrescens*, une étude utilisant des RAPD a montré que la capacité de dispersion serait au contraire très faible, avec une structuration en famille à petite échelle spatiale et de rares événements de dispersion à longue distance (Faugeron *et al.*, 2005). Cette espèce, de part sa faible capacité de dispersion, serait donc plus susceptible de montrer une structure phylogéographique que *C. concholepas*.

L. nigrescens et *L. trabeculata* partagent les mêmes caractéristiques générales du cycle de vie, ce qui pourrait suggérer une capacité de dispersion similaire : alternance obligatoire de phases, dispersion principalement par les spores, absence de structures de flottaison.

Néanmoins, plusieurs éléments suggèrent des différences entre ces deux espèces morphologiques, avec de possibles conséquences sur la démographie et les flux de gènes entre populations : (i) la différence de hauteur sur l'estran : intertidal *versus* subtidal, et donc une possible différence de perception des facteurs environnementaux (dessiccation et lumière, notamment) ; (ii) la taille des populations, conséquence de la différence d'habitat : l'étage intertidal où vit *L. nigrescens* (entre +1 et -1 m de profondeur) est réduit à un cordon de quelques mètres de largeur, tandis que l'étage subtidal où vit *L. trabeculata* est plus large (entre 0 et -30 m de profondeur) ; (iii) les populations de *L. nigrescens* seraient plus fragmentées que celles de *L. trabeculata*, du fait des discontinuités de l'habitat (Thiel *et al.*, 2007) ; et (iv) la capacité de dispersion par dérive des thalles semblerait être différente entre les espèces : il est ainsi plus fréquent d'observer parmi les algues échouées sur les plages des individus de *L. trabeculata* que des individus de *L. nigrescens* (obs. pers.). La libération de spores par des thalles dérivant pourrait avoir pour conséquence une connectivité plus importante entre populations de *L. trabeculata*. La position sur l'estran, la taille des populations et la possibilité d'évènements de dispersion à longue distance font que *L. trabeculata* serait susceptible de montrer une structure phylogéographique moins prononcée que *L. nigrescens*. Cependant, en comparaison avec *C. concholepas*, la capacité de dispersion de ces deux espèces morphologiques de *Lessonia* reste très réduite.

3. Importance de l'utilisation de différents types de marqueurs moléculaires pour inférer l'histoire des espèces : concordance entre marqueurs

L'hypothèse 3 concerne la concordance entre différents types de données, le degré de concordance augmentant avec le temps écoulé depuis la séparation des populations. Le premier d'entre eux concerne la concordance entre marqueurs moléculaires (Encadré 1.1). Les études de phylogéographie ont souvent été basées sur des marqueurs cytoplasmiques : mitochondriaux chez les animaux (Ballard et Rand, 2005) et chloroplastiques chez les plantes (Petit *et al.*, 2005). L'hypothèse de concordance entre marqueurs n'est que rarement testée, malgré la publication récurrente de revues critiques recommandant l'utilisation de plusieurs gènes issus des différents compartiments génomiques pour inférer l'histoire d'une espèce (ex : Hare, 2001 ; Ballard et Rand, 2005 ; Kuo et Avise, 2005 ; Bazin *et al.*, 2006).

En particulier, il a été montré que l'utilisation d'un seul locus (mitochondrial ou autre) pouvait conduire à des conclusions erronées, en inférant l'histoire du gène plutôt que l'histoire de l'espèce. En effet, une discontinuité génétique observée pour un gène donné peut être également expliquée par un processus de vicariance ou de sélection divergente sur le marqueur directement ou sur une région liée au marqueur (effet auto-stop) ou encore par l'action de la dérive génétique (origine stochastique). La neutralité des gènes mitochondriaux, y compris non-codants, a notamment été remise en cause (Bazin *et al.*, 2006). En effet, le génome mitochondrial se caractérisant généralement chez les animaux par l'absence de recombinaison, les effets de sélection sur une partie du génome mitochondrial affecteront l'ensemble de la molécule (Ballard et Rand, 2005). Or, certains gènes mitochondriaux ayant des rôles physiologiques importants, comme par exemple dans la respiration cellulaire, de tels effets de sélection sont possibles (balayage sélectif, Ballard et Rand, 2005 ; Bazin *et al.*, 2006).

En outre, du fait de la différence de ploïdie et de l'héritabilité généralement uniparentale des génomes cytoplasmiques, les marqueurs mitochondriaux et chloroplastiques sont caractérisés par une taille efficace plus faible que les marqueurs nucléaires et sont donc plus susceptibles d'être fortement affectés par la dérive génétique que les marqueurs nucléaires (Ballard et Rand, 2005). Ces marqueurs cytoplasmiques ont donc une plus grande probabilité que les marqueurs nucléaires de montrer une structure phylogéographique prononcée, soit d'origine déterministe (causée par une barrière historique aux flux de gènes), soit d'origine stochastique (causée par la dérive génétique sous l'effet du hasard) (Kuo et Avise, 2005 ; Irwin, 2002).

D'autre part, la dérive génétique seule peut provoquer une discontinuité génétique d'origine stochastique, que ce soit pour des marqueurs cytoplasmiques ou nucléaires. La probabilité d'occurrence d'une discontinuité d'origine stochastique est augmentée pour les espèces présentant une faible capacité de dispersion (Kuo et Avise, 2005 ; Irwin, 2002). Enfin, il a été montré théoriquement (Excoffier et Ray, 2008) et vérifié expérimentalement (Hallatschek *et al.*, 2007) que la dérive génétique combinée avec des événements démographiques, tels que la fondation d'une nouvelle population, pouvaient aussi mener à une discontinuité génétique.

Afin de refléter l'histoire des espèces et non celle de l'organite, ces auteurs recommandent d'utiliser différents types de marqueurs indépendants. Les génomes chloroplastiques et mitochondriaux étant généralement tous deux à transmission maternelle, les marqueurs de ces deux organites ne sont pas indépendants, et l'utilisation de marqueurs

nucléaires s'avère donc nécessaire. En particulier, chez les algues brunes oogames dont font parties les *Lessonia*, la mitochondrie et le chloroplaste ont été décrits comme présentant une hérédité maternelle (Motomura, 1990 ; Kato *et al.*, 2006), bien que de l'hétéroplasmie (présence de plus d'un type d'ADN mitochondrial au sein d'un même organisme) ait été reportée chez l'algue brune *Fucus serratus* dans une région colonisée récemment par l'espèce (Coyer *et al.*, 2004).

En fonction des forces évolutives en jeu, les phylogénies peuvent montrer des patrons différents selon les gènes étudiés. Dans le cas d'une vicariance, une structure phylogénétique est attendue quelque soit le type de marqueur choisi, l'importance de cette structure dépendant du taux de mutation et du mode d'hérédité. Le stade ultime dans le cas de la vicariance est l'observation de monophylie réciproque pour tous les marqueurs (Avise, 2000). Dans le cas d'un scénario par péripatrie, suite à la colonisation d'un nouvel habitat ou à l'isolement d'une petite population, il est plus probable d'obtenir des arbres phylogénétiques montrant de la paraphylie (Fig. I.1 de l'Introduction) : les haplotypes observés dans le nouvel habitat constituant un clade emboîté dans le clade formé par les haplotypes de la population ancestrale (Funk, 2003). S'il y a absence de flux de gènes entre populations, le stade ultime de ce scénario sera également la présence de monophylie réciproque à tous les marqueurs, rendant difficile la distinction entre péripatrie et vicariance. Dans le cas de ces deux scénarios, l'ensemble des marqueurs devrait montrer une discontinuité génétique, et la localisation géographique de cette discontinuité devrait être concordante entre marqueurs (Kuo et Avise, 2005). Le degré de concordance phylogéographique entre marqueurs nous renseigne sur le temps écoulé depuis l'apparition de la barrière à la dispersion (hypothèse 3i, Encadré 1.1).

Dans le cas où les différents marqueurs ne seraient pas congruents, deux types de processus spécifiques sont possibles : la sélection et la dérive. Dans le cas d'un effet de sélection lié à un marqueur particulier, par exemple un marqueur mitochondrial, plusieurs gènes peuvent être affectés et montrer le même patron, par balayage sélectif (gènes mitochondriaux) ou parce qu'ils ont le même mode d'héritabilité (gènes chloroplastiques). Au contraire, les gènes nucléaires devraient montrer un signal phylogénétique discordant de celui montré par les gènes cytoplasmiques. Si la dérive génétique et la faible capacité de dispersion sont à l'origine d'une discontinuité génétique (origine stochastique), il est très improbable qu'il y ait une concordance géographique des discontinuités génétiques entre marqueurs différents (Irwin, 2002 ; Kuo et Avise, 2005). La comparaison entre différents types de marqueurs permet donc de distinguer les différents scénarios à l'origine d'une discontinuité phylogénétique et d'inférer l'histoire des espèces.

4. Apports et limites de l'étude préliminaire de phylogéographie de *L. nigrescens* et *L. trabeculata*

L'étude préliminaire de phylogéographie de *L. nigrescens*, réalisée par Meynard (2005), a montré la présence de deux lignées au sein de cette espèce, avec une distribution géographique semblant correspondre aux régions biogéographiques PP et AI (Fig. I.8 de l'Introduction). Cependant, cette étude a été réalisée à l'aide de trois marqueurs mitochondriaux, et peut donc refléter l'histoire de la mitochondrie plutôt que l'histoire de l'espèce. Il apparaissait donc nécessaire de compléter cette étude à l'aide de marqueurs situés dans les autres compartiments du génome : nucléaire et chloroplastique et de tester la concordance entre marqueurs (hypothèse 3i de la phylogéographie, Encadré 1.1).

L'échantillonnage réalisé par Meynard (2005) ne permettait pas non plus de conclure sur la localisation géographique précise de la discontinuité phylogénétique (entre les latitudes 30°S et 32°S) et de tester la concordance avec la zone de transition biogéographique (hypothèse 3iii de phylogéographie, Encadré 1.1). En particulier, la structure de la zone de transition restait inconnue et il était important de distinguer entre les trois cas suivants : (i) une zone de transition abrupte, avec des lignées en allopatrie ; (ii) une zone de transition graduelle, avec des aires de distribution des lignées majoritairement allopatriques mais chevauchantes ; ou (iii) une zone d'hybridation entre les lignées, conséquence d'un contact secondaire entre lignées ayant divergé en allopatrie ou d'un contact primaire dans le cas d'une divergence en parapatrie. Dans ce dernier cas, l'issue de l'hybridation dépendra de l'importance de l'isolement reproducteur entre les lignées et cette zone hybride pourrait être soit transitoire, soit permanente.

Les caractéristiques actuelles de la côte chilienne (*cf.* Introduction) semblent montrer des gradients environnementaux plutôt que des discontinuités abruptes : la région de transition entre les lignées pourrait être plutôt graduelle qu'abrupte, qu'il y ait ou non hybridation. On peut également s'attendre à ce que cette région de transition soit relativement étendue, entre 30°S et 32°S, correspondant ainsi à l'étendue de la zone de transition biogéographique (30-33°S, Camus, 2001) et à la discontinuité observée dans les patrons de recrutement d'invertébrés (30-32°S, Broitman *et al.*, 2001 ; Navarrete *et al.*, 2005).

Concernant *L. trabeculata*, l'étude préliminaire de Meynard (2005) a montré la présence de deux haplotypes mitochondriaux au sein de cette espèce. Néanmoins, le nombre réduit de sites et d'échantillons n'avait pas permis de déterminer précisément les aires de

distribution de ces haplotypes. En particulier, l'importance de la discontinuité chez *L. trabeculata* et la concordance entre celle-ci et celle de *L. nigrescens* sont des questions qui restent ouvertes. La comparaison des structures phylogéographiques entre les deux espèces nous paraissait intéressante, afin de tester l'hypothèse de concordance entre espèces (hypothèse 3ii) et de déterminer l'importance des traits d'histoire de vie dans la perception de la zone de transition biogéographique (hypothèse 2).

5. Objectifs spécifiques et approches utilisées

L'étude de la phylogéographie des deux espèces *Lessonia nigrescens* et *Lessonia trabeculata* a été réalisée pour répondre aux objectifs suivants :

- (1) Inférer l'histoire démographique de l'espèce et les possibles scénarios à l'origine de la structure phylogéographique observée chez *L. nigrescens*.
- (2) Tester la concordance entre zone de transition biogéographique 30°S (décrite autour de 30-33°S, mais discutée selon les auteurs), et discontinuité génétique au sein de *L. nigrescens*.
- (3) Déterminer la structure de la zone de transition et inférer les processus actuels contribuant au maintien de la structure phylogéographique au sein de *L. nigrescens*.
- (4) Tester la présence d'une discontinuité phylogéographique chez *L. trabeculata* concordante avec la zone de transition biogéographique : en particulier, tester l'hypothèse d'une structure intermédiaire entre celles observées pour *C. concholepas* et pour *L. nigrescens*, du fait des différences dans les traits d'histoire de vie.
- (5) Inférer plus généralement les mécanismes pouvant être à l'origine de la zone de transition biogéographique 30°S et sur les facteurs contribuant actuellement à son maintien.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé plusieurs approches :

- (1) Pour répondre au premier objectif, une approche multilocus combinant des marqueurs des trois régions génomiques a été utilisée pour tester la concordance entre marqueurs et différencier les possibles processus (sélection, dérive et histoire) à l'origine de la structure phylogéographique de *L. nigrescens* dans l'aire

d'étude (14°S-42°S). Nous avons choisi pour cela quatre marqueurs se différenciant par leurs taux de mutation et modes d'héritabilité. Ces marqueurs sont : le marqueur mitochondrial *atp8/trnS*, la région intergénique chloroplastique de la RuBisCo et les régions intergéniques nucléaires ITS1 et ITS2 (Internal Transcript Spacers).

- (2) Les objectifs 2 et 3 ont été réalisés à l'aide du marqueur mitochondrial *atp8/trnS* sur un échantillonnage plus important que celui de Meynard (2005) (1045 individus issus de 36 populations), en particulier dans la zone de transition biogéographique. Cet effort d'échantillonnage a permis de préciser la concordance entre zone de transition biogéographique et discontinuité phylogéographique et de suggérer des mécanismes contribuant au maintien de la discontinuité chez *L. nigrescens*, aspects qui seront développés dans le Chapitre 2.
- (3) Enfin, l'importance des traits d'histoire de vie sur la perception de la zone de transition biogéographique a été étudiée d'une part en comparant les données obtenues pour *L. nigrescens* et *L. trabeculata*, et d'autre part en comparant nos résultats à ceux obtenus chez d'autres espèces marines le long des côtes chiliennes, permettant ainsi d'inférer plus précisément les mécanismes historiques et contemporains à l'origine de la zone de transition biogéographique 30°S.

B. Matériel et Méthodes

1. Choix des marqueurs

Les quatre marqueurs retenus ont été choisis de façon à représenter les trois compartiments génomiques présents chez les algues brunes (nucléaire, mitochondrial et chloroplastique). En ce qui concerne le compartiment mitochondrial, parmi les marqueurs mitochondriaux récemment développés chez les Laminariales (Engel *et al.*, 2008), trois (*atp8/trnS*, *trnW/trnI* et *rpl31/rns*) avaient été analysés sur un échantillonnage de 29 individus de *L. nigrescens* lors du stage de Master 2 de Meynard (2005). Le marqueur le plus polymorphe, *atp8/trnS*, a été retenu pour la suite. Pour le compartiment nucléaire, les marqueurs choisis sont les ITS (internal transcribed spacer 1 et 2), qui sont classiquement

utilisés dans les études phylogénétiques des algues, malgré la présence de polymorphisme intra-individuel (ex : Lane *et al.*, 2007, Lane *et al.*, 2006, Yoon *et al.*, 2001, Coyer *et al.*, 2001). Enfin, pour le compartiment chloroplastique, le marqueur sélectionné est la région intergénique de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCo spacer), classiquement utilisé dans les études de phylogénies chez les algues (Destombe et Douglas, 1991). Son polymorphisme au niveau intraspécifique est relativement limité par son faible taux de mutation (ex : Yoon et Boo, 1999 ; Kraan et Guiry, 2000). Cette région non-codante est située entre le gène *rbcS*, codant pour la petite sous-unité de la RuBisCo, et le gène *rbcL*, codant pour la grande sous-unité (chez les plantes terrestres, ces gènes sont séparés : le gène *rbcS* est situé dans le noyau, tandis que *rbcL* est dans le génome chloroplastique). Au commencement de ce travail, les trois marqueurs ITS1, ITS2 et RuBisCo avaient déjà été utilisés dans des phylogénies d'algues brunes, incluant des espèces de *Lessonia* (Yoon *et al.*, 2001 ; Lane *et al.*, 2006).

Les quatre marqueurs utilisés se caractérisent par des taux de mutation différents : ITS2 et RuBisCo spacer sont généralement considérés comme des marqueurs à faible taux de mutation par rapport à ITS1 et aux marqueurs mitochondriaux (par ex, chez les algues brunes : Coyer *et al.*, 2001 ; Yoon et Boo, 1999 ; Voisin *et al.*, 2005 ; Harvey et Goff, 2006 ; Engel *et al.*, 2008), L'utilisation de ces quatre marqueurs permet donc de détecter des processus ayant eu lieu à différentes échelles de temps.

2. Echantillonnage utilisé pour l'étude de phylogéographie

L'échantillonnage, qui s'étend sur plus de 3000km de côte pas toujours facile d'accès, n'a été possible que grâce à la collaboration de nombreux collègues de la P. Universidad Católica de Chile, de la Universidad Católica del Norte et de la Station Biologique de Roscoff. Chaque échantillon consiste en un fragment de fronde prélevé dans une zone méristématique (tissu jeune), non-reproductive et sans épiphytes. Les échantillons ont été essuyés avec du papier absorbant puis mis dans un sachet avec du silica gel (desséchant) jusqu'à extraction d'ADN. Pour l'échantillonnage de *L. nigrescens*, 28 à 33 individus par localité (sauf pour les localités HCO : huit individus et CST : 12 individus) ont été échantillonnés au hasard sur un transect de 100-150 m de longueur de côte, en prélevant un fragment de fronde par individu. L'échantillonnage représente un total de 1045 individus répartis dans 36 localités distribuées entre 16°S et 42°S de latitude (Tableau 1.1). Afin

d'inférer les mécanismes à l'origine de la zone de transition biogéographique, un effort particulier d'échantillonnage a été réalisé entre les latitudes 27°S et 33°S pour *L. nigrescens* (Fig. 1.1) L'échantillonnage de *L. trabeculata* a été réalisé en plongée ou lors de marées basses de grande amplitude. L'échantillonnage représente un total de 68 individus, provenant de 13 localités distribuées entre 14°S et 42°S de latitude (Tableau 1.2 et Fig. 1.2)..

L'analyse multilocus de *L. nigrescens* a porté sur un sous-échantillonnage de 127 individus mais couvrant l'ensemble de la zone d'étude (16-42°S, soit 2 à 6 individus par site sur les 36 localités, Tableau 1.1). L'analyse populationnelle de *L. nigrescens* a été effectuée en utilisant seulement le marqueur mitochondrial atp8/trnS sur l'échantillonnage total de 1045 individus (Tableau 1.1).

L'étude de la phylogéographie de *L. trabeculata* a été réalisée en utilisant le marqueur atp8/trnS sur l'échantillonnage total de 68 individus. Sept de ces individus ont également été analysés avec les marqueurs ITS1, ITS2 et RuBisCo spacer (Tableau 1.2). Bien que notre échantillonnage soit faible pour cette espèce, il couvre la quasi-totalité de l'aire de distribution supposée de l'espèce, allant du Pérou à l'île de Chiloé (entre 14°S et 42°S, Fig. 1.2).

Nous avons inclus dans les analyses des séquences provenant d'autres espèces de *Lessonia* : *L. flavicans* et *L. vadosa*, qui ont une aire de distribution restreinte au sud de l'Amérique du Sud (47-56°S, cf. Fig. I.10 de l'Introduction). Nous avons obtenus les séquences de chacun des quatre marqueurs utilisés pour deux individus de *L. flavicans* (sites Lfla-FBA : 53°35'S / 73°41'O et Lfla-ELI : 54°19'S / 71°37'O) et un individu de *L. vadosa* (site Lvad-FBA : 53°35'S / 73°41'O).

3. Obtention des données

Les protocoles d'extraction d'ADN, d'amplification et de séquençage utilisés sont détaillés en Annexes 1.1 et 1.2. Le séquençage des marqueurs nucléaires ITS1 et ITS2 se révélant particulièrement difficile, l'existence d'un polymorphisme intra-individuel a été suspecté. Les séquences qui présentaient des doutes de lecture ont alors été éliminées du jeu de données. L'ADN de cinq individus provenant de localités proches de la zone de transition biogéographique (SLDN6, CAR1, TBL2, PTLV2-11, PTAL3) a été cloné afin de vérifier l'existence d'un polymorphisme de séquence et de déterminer si ce polymorphisme intra-individuel était dû à de l'hybridation entre les entités localisées de chaque côté de la transition biogéographique. Le principe du clonage bactérien est d'insérer un fragment d'ADN dans un

Tableau 1.1. Localisation géographique des sites échantillonnés pour l'étude phylogéographique de *L. nigrescens* Le nombre d'individus analysés (N) par site et pour chaque marqueur (atp8/trnS, RuBisCo spacer, ITS1 et ITS2) est indiqué. Pour l'analyse populationnelle utilisant atp8/trnS, le nombre total d'individus analysés par site (N_{TOTAL}), ainsi que le nombre d'individus analysés par séquençage (N_{SEQ}) et par SSCP (N_{SSCP}) sont précisés. N_{TOTAL} est différent de la somme de N_{SEQ} et N_{SSCP} car chaque profil SSCP a été vérifié par séquençage

Site d'échantillonnage	Abréviation	Coordonnées (Latitude/Longitude)	N atp8/trnS	N RuBisCo spacer	N ITS1	N ITS2	Analyse populationnelle (atp8/trnS)		
							N_{TOTAL}	N_{SEQ}	N_{SSCP}
Qda Mollendito	QMO	16°58'S / 72°07'O	0	0	0	0	30	2	30
Ilo-Perú	ILO	17°37'S / 71°20'O	5	5	1	2	0	-	-
Qda Camarones	QCA/CAC	19°11'S / 70°16'O	4	2	0	2	30	2	30
Pta Pichidalo	PCH	19°36'S / 70°14'O	2	2	2	2	29	3	27
Pta Patache	PAT	20°48'S / 70°12'O	2	2	0	0	28	3	26
Pta Coloso	COL	23°46'S / 70°29'O	5	5	0	1	30	5	30
Pan de Azúcar	CHA/SLD	26°09'S / 70°40'O	5	5	2	1	29	2	28
Morro Copiapó	MOC	27°12'S / 70°57'O	5	5	2	1	30	5	30
Cta Pajonal	PAJ	27°41'S / 71°02'O	3	3	2	2	30	3	30
Carrizal Bajo	CAR	28°04'S / 71°08'O	5	5	2	3	30	5	30
Huasco	HCO	28°27'S / 71°13'O	5	5	2	2	8	5	8
Aceituno	ACE	29°03'S / 71°29'O	5	5	1	2	29	29	0
Choros Norte	CHN	29°15'S / 71°27'O	2	2	2	2	30	2	30
Choros Sur	CHS	29°21'S / 71°19'O	5	5	3	3	30	5	30
El Temblador	TBL	29°28'S / 71°18'O	2	2	0	0	33	2	33
Isla Pájaros (île)	IPA	29°35'S / 71°31'O	5	5	2	2	30	30	0
Arrayan	ARY	29°41'S / 71°19'O	2	2	1	2	33	3	33
Teatinos	TEA	29°49'S / 71°17'O	5	5	1	2	30	5	30
Coquimbo-Cruz	COZ	29°57'S / 71°21'O	5	5	1	2	28	28	0
Totoralillo	OTO	30°04'S / 71°22'O	4	4	1	2	30	5	30
Guaqueros	GUANA	30°11'S / 71°27'O	2	2	2	2	32	3	32
Tongoy	TON	30°14'S / 71°29'O	2	2	2	2	30	2	30
Pta Lengua de Vaca 2	PTLV2	30°15'S / 71°38'O	4	4	1	2	30	30	0
Cta San Lorenzo	CSLO	30°20'S / 71°40'O	2	2	0	2	0	6	-
Río Limari	RLI	30°44'S / 71°42'O	3	2	2	3	29	29	0
Pta Talca	PTAL	30°55'S / 71°40'O	5	5	2	2	31	8	31
Los Molles	LM	32°14'S / 71°31'O	2	2	1	2	33	2	33
Montemar	MTM	32°57'S / 71°32'O	2	2	2	2	33	12	33
Curamilla	CURAM	33°05'S / 71°43'O	5	5	2	2	30	16	30
El Quisco	QUIS	33°23'S / 71°42'O	2	2	2	2	30	18	14
Las Cruces	LC	33°30'S / 71°38'O	2	2	2	2	30	16	27
Matanzas	MAT	33°57'S / 71°52'O	2	2	1	2	30	8	25
Pichilemu	PICHI	34°23'S / 72°01'O	0	0	0	0	30	19	14
Constitución	CST	35°19'S / 72°25'O	2	2	0	0	12	12	0
Concepción	CONCE	36°30'S / 72°54'O	5	5	2	2	28	27	5
Mehuín	MEH	39°25'S / 73°12'O	5	5	2	2	30	30	0
Pucatrihue	PUC	40°32'S / 73°43'O	2	2	2	2	30	30	0
Pta Guabún (Chiloé)	GBN	41°48'S / 74°01'O	4	4	2	2	30	30	0
Total <i>L. nigrescens</i>	38 sites		127	124	52	66	1045	434	729

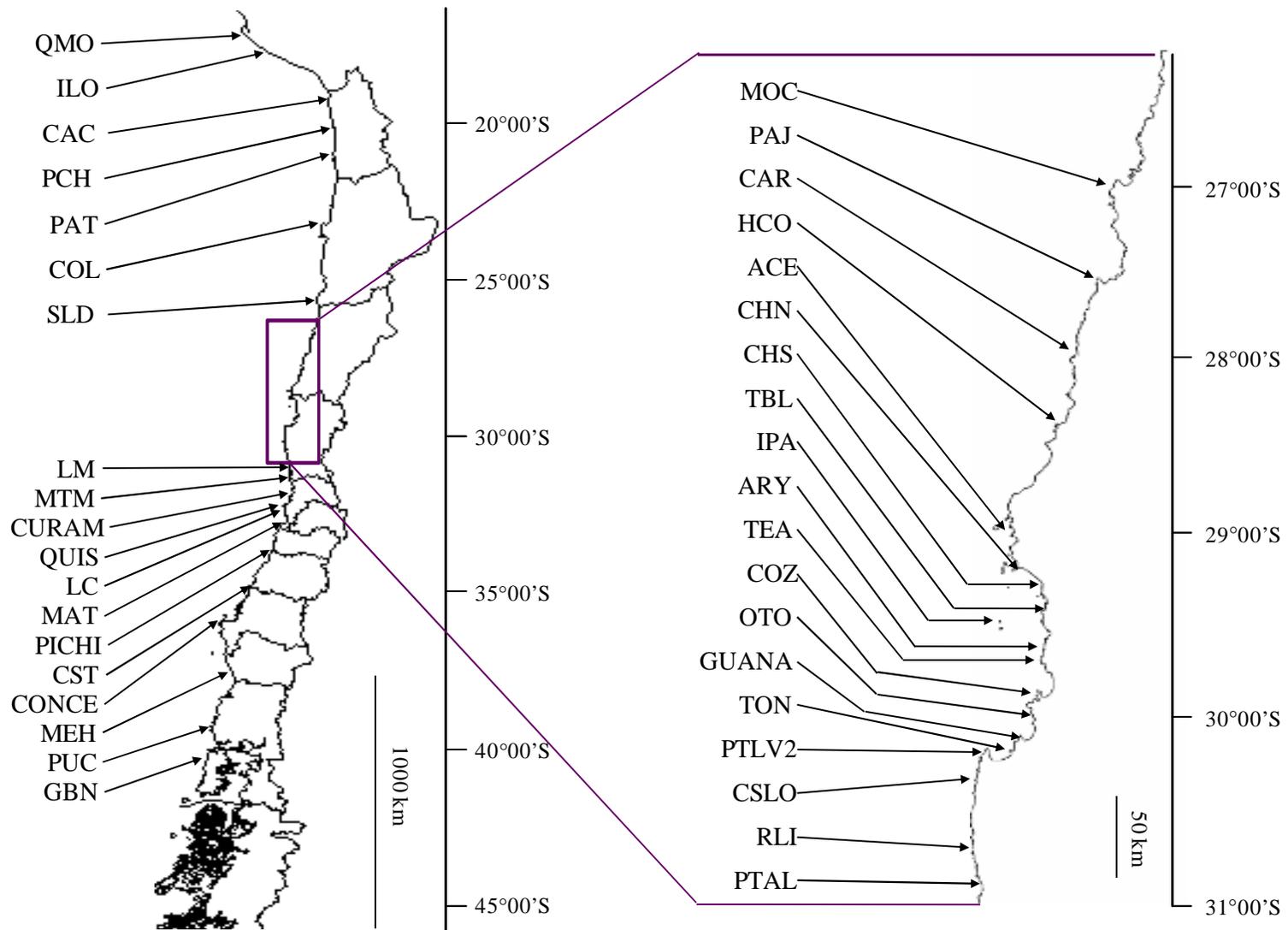


Figure 1.1 : Localisation des sites d'échantillonnage de *Lessonia nigrescens* pour l'étude de phylogéographie.

Tableau 1.2. Localisation géographique des sites échantillonnés pour l'étude phylogéographique de *L. trabeculata*. Le nombre d'individus analysés (N) par site et pour chaque marqueur (atp8/trnS, RuBisCo spacer, ITS1 et ITS2) est indiqué. Pour l'analyse populationnelle utilisant atp8/trnS, le nombre total d'individus analyses par site (N_{TOTAL}), ainsi que le nombre d'individus analysés par séquençage (N_{SEQ}) et par SSCP (N_{SSCP}) sont précisés.

Site d'échantillonnage	Abréviation	Coordonnées (Latitude/ Longitude)	N atp8/ trnS	N RuBisCo spacer	N ITS1	N ITS2	Analyse populationnelle (atp8/trnS)		
							N_{TOTAL}	N_{SEQ}	N_{SSCP}
Bahia Mendieta – Pérou	Lt-MEN	14°03'S / 76°18'O	0	0	0	0	1	1	0
Trumpa del elefante – Pérou	Lt-TRU	15°23'S / 75°09'O	1	1	1	1	1	1	0
Cabañas	Lt-CAB	20°18'S / 70°08'O	1	1	1	1	1	1	0
San Marcos	Lt-SM	21°07'S / 70°07'O	0	0	0	0	4	1	4
Pan de Azúcar	Lt-PA	26°09'S / 70°40'O	0	0	0	0	1	1	0
Huasco	Lt-HCO	28°27'S / 71°13'O	1	1	1	1	29	1	29
Isla Pájaros (île)	Lt-IPO	29°34'S / 71°31'O	0	0	0	0	1	1	0
Coquimbo	Lt-COQUI	30°00'S / 71°25'O	0	0	0	0	14	1	14
Totalillo	Lt-OTO	30°04'S / 71°22'O	0	0	0	0	1	1	1
Tongoy	Lt-TOY	30°14'S / 71°29'O	1	1	1	0	1	1	0
Algarrobo	Lt-ALGA	33°21'S / 71°40'O	1	1	1	1	10	1	10
Pta Estaquilla	Lt-EST	41°23'S / 73°44'O	1	1	1	1	1	1	0
Ancud (Ile de Chiloe)	Lt-ANC	41°48'S / 74°01'O	1	1	1	1	3	2	1
Total <i>L. trabeculata</i>	13 sites		7	7	7	6	68	14	55

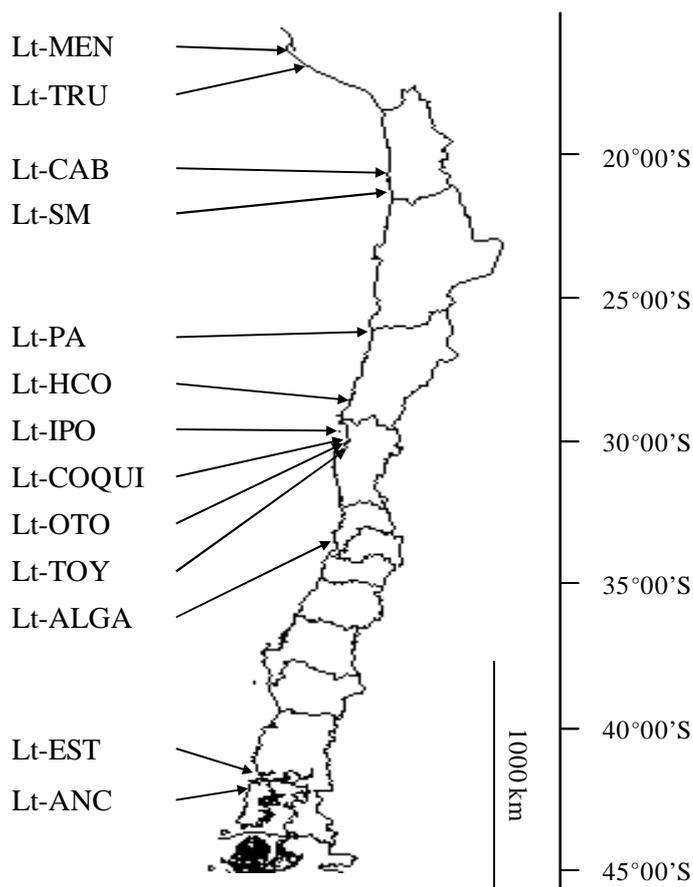


Figure 1.2 : Localisation des sites d'échantillonnage de *Lessonia trabeculata*.

vecteur (plasmide) par ligation et de transférer le tout dans des bactéries rendues compétentes. La ligation a été réalisée avec le kit de clonage pGEM-T Vector System (Promega corporation, Madison, Wisconsin, Etats-Unis). Le vecteur utilisé est un plasmide particulier contenant un gène de résistance à un antibiotique, ici l'ampicilline. De plus, ce plasmide est ouvert au niveau du gène *galZ*, codant pour la beta-galactosidase. La ligation du vecteur avec l'insert au niveau du gène *galZ* a été réalisée en suivant les indications du fabricant. Les plasmides ont ensuite été incorporés par choc thermique (90 sec. à 42°C) dans des bactéries *Escherichia coli* rendues compétentes. Les bactéries ont été cultivées pendant une heure à 37°C en milieu nutritif de Luria et Bertani (LB) puis étalées sur des boîtes de Pétri contenant du LB gélosé, supplémenté avec de l'ampicilline (100µg/mL), du X-galactose (2%) et de l'IPTG (0,2 M). Après une nuit à 37°C, les colonies bactériennes présentant l'insert ont été repiquées et mises en culture dans du milieu LB supplémenté en ampicilline pendant une nuit à 37°C. La présence d'IPTG (un inducteur de l'opéron lactose) et de X-Gal (galactoside chromogène) permet de contrôler les bactéries ayant incorporé le plasmide recombinant : dans les bactéries non recombinantes, le gène *galZ* est exprimé et les colonies bactériennes sont bleues. Au contraire, les bactéries possédant un plasmide ayant incorporé l'insert d'ADN ont un gène *galZ* inactif et les colonies resteront blanches. La présence de l'insert a également été vérifiée par PCR. Les plasmides contenant l'insert ont ensuite été purifiés suivant le protocole de mini-préparation d'ADN plasmidique de Sambrook *et al.* (1989), et les produits de purification ont été utilisés pour la réaction de séquençage.

Le jeu de données populationnel a été obtenu en combinant les méthodes de séquençage direct et d'analyse du polymorphisme de conformation simple brin (SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism). Cette méthode permet d'identifier les mutations qui affectent la conformation de l'ADN simple brin en faisant migrer les produits de PCR sur un gel d'acrylamide non dénaturant (Orti *et al.*, 1997 ; Sunnucks *et al.*, 2000). Cette méthode avait été préalablement mise au point par M. Voisin et A. Meynard chez *Lessonia nigrescens* (protocole présenté en Annexe 1.2). Des haplotypes déjà séquencés ont été utilisés comme marqueurs de profil dans chaque gel SSCP. Afin de vérifier la fiabilité de la méthode, nous avons séquencé au moins deux individus par profil SSCP et par population, lorsque c'était possible. La plupart des profils SSCP (14 sur 18) correspondaient à une séquence unique. Pour deux des trois profils restants, un criblage additionnel des individus a été réalisé par RFLP (polymorphisme de longueur de fragments de restriction ou Restriction Fragment Length Polymorphism) au moyen d'enzymes de restriction. Les difficultés pour distinguer les

profils dans le sud de la zone d'étude nous ont amené à préférer la méthode de séquençage pour les individus de ces populations.

4. Analyse des données

a) Alignement des séquences et polymorphisme des quatre marqueurs de l'approche multilocus

Les séquences ont été alignées avec Chromas v 2.01 (McCarthy, 1997) et les alignements de séquences ont été construits avec Multalin (Corpet, 1988). Nous avons ajouté au jeu de données des séquences provenant de la base de données GenBank pour un autre individu de *L. flavicans* provenant des Iles Malouines (site : 51°43'S / 57°54'O, n° d'accèsion : AY851543 pour RuBisco et AY857900 pour ITS1-ITS2) et pour un individu de *L. corrugata*, espèce présente uniquement en Tasmanie (site : 41°52'S / 148°18'O, n° d'accèsion : AY851545 pour RuBisCo spacer et AY857902 pour ITS1-ITS2), séquences provenant de Lane *et al.* (2006). Les analyses ont été effectuées en considérant uniquement la région intergénique pour les marqueurs ITS1 et ITS2. Pour *atp8/trnS*, le fragment considéré est composé de 13 paires de bases (pb) de la partie 3' du gène *atp8*, de la région intergénique *atp8/trnS* et de 23pb de la partie 5' du gène *trnS*. L'alignement du RuBisCo spacer consistait en 198pb du gène *rbcL*, de la région intergénique de la RuBisCo et de 121pb du gène *rbcS*. Pour chaque marqueur, nous avons calculé le nombre de sites polymorphes (*s*) en considérant uniquement les substitutions de nucléotides. Le nombre de sites avec un polymorphisme de type insertion-déletion (indel) a également été calculé.

La diversité génique (*H*) a été calculée pour chaque marqueur. Cet indice est défini comme la probabilité que deux allèles ou haplotypes tirés au hasard dans un échantillon soient différents (Nei, 1987) et est calculé selon la formule :

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum p_i^2 \right)$$

avec *n* le nombre d'allèles ou haplotypes dans l'échantillon et *p_i* la fréquence du *i*-ème haplotype. Cet indice a été calculé avec le logiciel Arlequin v 3.1.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

b) Analyses phylogénétiques du jeu de données multilocus

Les indels des jeux de données ITS1, ITS2 et RuBisCo spacer n'apportant pas d'information phylogénétique, ces sites ont été traités comme « données manquantes » lors des analyses phylogénétiques (aucun traitement spécial, option par défaut). Dans le cas du marqueur *atp8/trnS*, un polymorphisme important d'indel a été détecté. Un nombre croissant d'études montrent que les indels fournissent des informations phylogénétiques consistantes et présentent souvent de faibles niveaux d'homoplasie (par ex. Freudenstein et Chase, 2001). En effet, il est peu probable qu'une délétion se répète à la même position, et dans le cas d'une insertion, qu'il s'agisse en plus de la même séquence. Ainsi, même si le polymorphisme indel est moins informatif que celui de substitution, exclure les indels des analyses (soit les considérer comme des données manquantes, soit exclure les sites) est équivalent à éliminer des données potentiellement informatives (Giribet et Wheeler, 1999). Pour le marqueur *atp8/trnS*, trois méthodes de traitement des indels ont donc été utilisées : (i) en considérant les indels comme « données manquantes » ; (ii) en excluant les sites montrant du polymorphisme d'indel ; et (iii) en recodant les indels en présence/absence. Le recodage automatisé des indels a été réalisé avec le menu « IndelCoder » du logiciel SeqState v 1.37 (Müller, 2006). Nous avons utilisé la méthode SIC (Simple Indel Coding), qui consiste à coder les indels comme données manquantes à l'intérieur de la matrice de données et à ajouter une matrice binaire de présence/absence des indels (Simmons et Ochoterena, 2000). Suivant le principe de parcimonie, les positions adjacentes d'indels ont été traitées comme le résultat d'un seul évènement.

Les séquences ITS1 et ITS2 ont été traitées comme deux marqueurs indépendants, car ces deux régions présentent des taux d'évolution différents (Hershkovitz et Lewis, 1996) et les analyses phylogénétiques ont été réalisées avec et sans les séquences obtenues par clonage. *L. corrugata* a été considérée comme « outgroup » (espèce externe) pour les analyses des marqueurs ITS1, ITS2 et RuBisCo spacer, tandis que pour les analyses de *atp8/trnS*, en l'absence de séquence disponible pour *L. corrugata*, *L. vadosa* a été considérée comme outgroup.

Trois méthodes de reconstruction d'arbres sont traditionnellement utilisées : les méthodes de distance (dont la méthode de Neighbor Joining, NJ), le Maximum de Parcimonie (MP) et le Maximum de Vraisemblance (Maximum Likelihood, ML). Récemment, les méthodes d'inférence bayésienne se sont ajoutées. Bien que les méthodes de distances présentent l'avantage d'un calcul rapide, elles ne prennent en compte qu'une partie de

l'information disponible, car elles résument la différence entre les séquences par une matrice de distances (Holder et Lewis, 2003). La méthode de MP consiste à calculer un score pour chaque arbre à partir du nombre minimum de mutations qui pourraient produire les données à partir de l'arbre, puis à trouver l'arbre de score minimum. Le ML permet d'utiliser pleinement l'information donnée par les séquences sous un modèle d'évolution donné. L'arbre choisi est celui qui a la plus grande probabilité de produire les séquences observées (vraisemblance ou *likelihood* de l'arbre). Le choix objectif du modèle d'évolution optimal pour un jeu de données est important pour obtenir une estimation fiable de l'arbre et de ses paramètres (Bos et Posada, 2005).

Pour les méthodes de MP et ML, la mesure de l'incertitude des groupements observés sur l'arbre peut être réalisée par la méthode des bootstraps (Felsenstein, 1985) : des pseudo-réplicas sont produits par tirage aléatoire avec remise des séquences et des arbres sont construits à partir de ces jeux de données. Les valeurs de bootstrap représentent la robustesse des groupements de l'arbre en nœuds.

La méthode d'inférence phylogénétique bayésienne est relativement récente (Holder et Lewis, 2003). Cette méthode d'analyse permet d'obtenir simultanément une estimation de l'arbre phylogénétique et la mesure de l'incertitude des nœuds de cet arbre. Pour estimer le soutien des nœuds des arbres, la méthode bayésienne est, de plus, généralement plus rapide que la méthode des bootstraps associée au Maximum de Vraisemblance. La méthode consiste à choisir l'arbre qui maximise la probabilité *a posteriori*, qui est proportionnelle à la vraisemblance et à la probabilité *a priori* de l'hypothèse. Cette probabilité *a priori* est la probabilité d'une hypothèse ou d'un paramètre qui ne s'appuie pas sur les données en cours d'analyse, mais sur d'autres données (expériences antérieures, connaissances générales). Le désavantage de la méthode réside dans le fait que les distributions des paramètres *a priori* doivent être spécifiées. Cependant, lorsque la quantité de données augmente, l'influence des connaissances *a priori* sur l'estimation de la distribution *a posteriori* diminue (Lewis, 2001). Comme la méthode de Maximum de Vraisemblance, la méthode bayésienne permet d'inclure des modèles d'évolution des séquences.

Les alignements obtenus pour chacun des marqueurs ont été analysés en utilisant trois de ces méthodes de reconstructions phylogénétiques : les reconstructions de maximum de parcimonie et de maximum de vraisemblance ont été obtenues en utilisant le logiciel PAUP* v 4.0b10 (Swofford, 2002) et l'inférence bayésienne avec le logiciel MrBayes v 3.1.2 (Huelsenbeck et Ronquist, 2001). L'analyse MP a été réalisée avec les caractéristiques suivantes : recherche heuristique, 100 réplicas d'ajout aléatoire de séquences, option « tree-

bisection-and-reconnection » (TBR) et le nombre maximum d'arbres en mémoire a été fixé à 100000. La technique de bootstraps a été utilisée, avec 1000 pseudo-répliques. Pour les deux autres méthodes (ML et inférence Bayésienne), nous avons utilisé le Critère d'Information d'Akaike (Akaike Information Criterion, AIC) obtenu avec le logiciel ModelTest v 3.7 (Posada et Crandall, 1998) pour estimer le meilleur modèle d'évolution pour chaque jeu de séquences. Les modèles sélectionnés ont été K81uf + I pour les alignements du RuBisCo spacer et de atp8/trnS, TnEf + I pour ITS1 et HKY pour ITS2. La lettre I représente ici la présence de sites invariables (dont la proportion est estimée par le logiciel). Les analyses de ML ont été réalisées par recherche heuristique avec 100 répliques d'ajout aléatoire de séquences et le soutien des nœuds a été calculé par analyse de bootstrap en effectuant 1000 pseudo-répliques. L'inférence Bayésienne a été obtenue en spécifiant le type général du modèle, c'est-à-dire le nombre de taux de substitutions différents et le mode de variation des taux de substitutions entre sites, comme préconisé par le constructeur du logiciel. Pour chaque jeu de données, l'analyse a été réalisée à partir de quatre analyses indépendantes de quatre chaînes chacune pendant $5 \cdot 10^6$ générations. Les arbres et les paramètres ont été échantillonnés toutes les 1000 générations et les paramètres par défaut ont été utilisés pour la température. Le premier quart des arbres échantillonnés a été exclu pour assurer la stabilisation, et les arbres restants ont été utilisés pour le calcul de l'arbre consensus. Dans le cas du recodage des indels avec la méthode SIC, la matrice mixte obtenue avec IndelCoder a été utilisée comme fichier source pour MrBayes. Les séquences nucléotidiques ont alors été analysées avec le modèle d'évolution déterminé par ModelTest, tandis que la matrice de présence/absence d'indels a été traitée comme données de site de restriction.

c) Taux de divergence entre groupes de séquences et estimation du temps de divergence

Entre chacun des groupes phylogénétiques (lignées) définissant des clades dans les analyses précédentes, l'importance de la divergence a été estimée en calculant la p -distance, qui se définit comme la proportion p de sites nucléotidiques qui sont différents entre paires de séquences. Cette distance a été calculée avec le logiciel MEGA v 4.0 (Kumar *et al.*, 2004) avec 1000 répliques et en excluant les indels.

Afin d'estimer le temps écoulé depuis la séparation de deux groupes phylogénétiques (lignées), l'approche utilisant une « horloge moléculaire » est souvent utilisée. L'horloge

moléculaire fait l'hypothèse que le taux d'accumulation des substitutions est constant au cours du temps et entre différentes lignées, et qu'en comptant le nombre de mutations entre deux lignées, il est possible d'estimer la date de divergence de ces lignées. Il est cependant possible de relâcher cette hypothèse en permettant des différences de taux de mutation entre lignées (voir pour revue Pulquério et Nichols, 2006). Les algues brunes étant phylogénétiquement très distantes des animaux, des plantes et des algues rouges et vertes (Keeling *et al.*, 2005), il n'est pas possible d'utiliser une horloge moléculaire définie pour un de ces règnes. De plus, une calibration directe de l'horloge moléculaire pour les algues brunes n'est pas possible du fait de l'absence de données fossiles. Ce problème a été récemment contourné par Hoarau *et al.* (2007), qui ont proposé une méthode indirecte pour estimer une horloge moléculaire pour les espèces d'algue brune *Fucus* en utilisant des séquences des hétérochontes les plus proches sur l'arbre phylogénétique et ayant à la fois des données fossiles et une base de séquences disponibles importante, c'est-à-dire les diatomées. Nous avons utilisé le même raisonnement pour calculer une horloge moléculaire pour le RuBisCo spacer pour *Lessonia*. Ce marqueur a été préféré aux trois autres marqueurs de notre analyse multilocus pour deux raisons : (i) la présence de multiples copies et d'évolution concertée pour les ITS en fait de mauvais marqueurs pour une horloge moléculaire ; et (ii) la base de données disponible pour le marqueur *atp8/trnS* dans GenBank reste pour l'instant limitée (données des articles de Engel *et al.*, 2008 et Voisin *et al.*, 2005) et surtout, le polymorphisme de type indel s'avérant important pour ce marqueur, il était difficile de faire l'hypothèse d'une horloge moléculaire. Le RuBisCo spacer paraissait donc le meilleur des quatre marqueurs pour estimer des dates de divergence entre lignées phylogénétiques, d'autant plus qu'un nombre important de séquences étaient disponibles sur GenBank pour ce marqueur. Le but ici a été d'obtenir une estimation, même grossière, des dates de divergence entre lignées détectées par les reconstructions phylogénétiques afin d'inférer les mécanismes pouvant être à l'origine de la divergence. Hoarau *et al.* (2007) ont estimé le taux de mutation pour la protéine D1 du photosystème II (*psbA*) des diatomées entre 0,08% et 0,12% par million d'années (Ma). La divergence pour *psbA* étant de 1,2% entre les deux espèces de Laminariales *L. digitata* (accession n°AY528849) et *Alaria crassifolia* (AY528847), la date de divergence entre ces deux espèces a donc été estimée entre 10 et 15Ma (1,2/0,12 et 1,2/0,08, respectivement). Le taux de divergence entre ces deux espèces pour le marqueur RuBisCo spacer est de 8% (accessions n°AY851559 et AF109802, seule la région utilisée dans notre étude multilocus a été considérée). Le taux de divergence du RuBisCo spacer a donc été estimé entre 0,80 et 0,53% par Ma (8/10 et 8/15, respectivement). L'effet du temps de génération peut être négligé, car il

est équivalent pour les diatomées, *Fucus*, *Laminaria* et *Lessonia nigrescens*, c'est-à-dire entre une et quelques années (Hoarau *et al.*, 2007 ; Chapman, 1993 ; S. Faugeron, com. pers.). La date de divergence entre lignées phylogénétiques a été estimée en utilisant la valeur minimale et la valeur maximale de p -distance calculée entre lignées avec le logiciel MEGA.

d) Reconstructions de réseaux d'haplotypes

Les méthodes de réseaux d'haplotypes ont été développées pour incorporer les processus populationnels dans la construction des relations entre haplotypes phylogénétiquement proches (Posada et Crandall, 2001). Les réseaux permettent la représentation, sur une même figure, de toutes les hypothèses également parcimonieuses (relations ambiguës) des relations entre haplotypes. Les relations entre gènes échantillonnés chez des individus d'une population ne sont pas hiérarchiques, contrairement aux relations entre gènes échantillonnés dans des espèces différentes. Elles présentent de l'homoplasie, résultat de la reproduction sexuée, de mutations qui peuvent être récentes, et souvent d'évènements de recombinaison (Posada et Crandall, 2001). Contrairement aux méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques, les méthodes de construction de réseaux incorporent la possibilité de persistance d'haplotypes ancestraux dans la population, les multifurcations et les réticulations. De plus, il est possible de prendre en compte la fréquence de chaque haplotype au sein de l'échantillon. La théorie de la coalescence montre qu'il existe une relation directe entre la fréquence d'un haplotype et l'âge de cet haplotype, en l'absence de sélection (Posada et Crandall, 2001). Afin de prendre en compte en particulier la persistance d'haplotypes ancestraux dans les données, nous avons donc construit des réseaux d'haplotypes en utilisant la méthode de median-joining implémentée dans le logiciel NETWORK v 4.5 (Bandelt *et al.*, 1999).

e) Analyse du jeu de données populationnel (*L. nigrescens*)

Pour chaque site d'échantillonnage et chaque lignée phylogénétique, nous avons calculé deux indices de diversité moléculaire pour le marqueur mitochondrial *atp8/trnS* : la diversité génique (H , la probabilité que deux haplotypes choisis au hasard soient différents, définie plus haut) et la diversité nucléotidique, π . Ce dernier indice est défini comme la probabilité que deux sites nucléotidiques homologues choisis au hasard soient différents et se calcule suivant la formule :

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j d_{ij}$$

où d_{ij} est un estimateur du nombre de mutations ayant eu lieu depuis la divergence entre les haplotypes i et j , k est le nombre d'haplotypes, p_i la fréquence de l'haplotype i et n la taille de l'échantillon. Les deux indices, H et π , ont été calculés en utilisant le logiciel Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). La moyenne sur l'ensemble des sites échantillonnés a été calculée en excluant les deux sites avec moins de 28 échantillons (sites HCO et CST).

Etant donné que les sites échantillonnés ne sont pas régulièrement répartis le long de la côte (échantillonnage important autour de 29-31°S et 33°S), nous avons utilisé une méthode de ré-échantillonnage pour comparer les indices de diversité entre les lignées. Cela a consisté à calculer les indices de diversité pour 100 ré-échantillonnages aléatoires de sept localités dans la lignée la plus échantillonnée (lignée AI, voir Résultats).

Afin de tester la présence d'une divergence génétique située au niveau de la zone de transition biogéographique, les populations ont été regroupées en fonction de leur situation géographique. La localisation précise de la zone de transition biogéographique restant controversée (entre 30°S et 33°S), nous avons testé la présence d'une discontinuité située à 30°S d'une part et à 33°S d'autre part. Afin de tester ces deux hypothèses, nous avons réalisé des analyses hiérarchiques de la variance moléculaire (AMOVA) avec le logiciel Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). L'AMOVA permet d'étudier la distribution de la variance génétique entre les populations, entre les populations à l'intérieur des groupes et entre les groupes. Les groupes de populations ont ici été définis en fonction de trois critères : (i) la localisation par rapport à la latitude 30°S (nord *versus* sud) ; (ii) la localisation par rapport à la latitude 33°S (nord *versus* sud) ; et (iii) la position phylogénétique des haplotypes (groupes correspondant aux lignées phylogénétiques). L'AMOVA prend en compte les fréquences des haplotypes et la distance nucléotidique entre haplotypes. Une procédure de test non-paramétrique par permutation permet de tester la significativité des indices calculés pour chaque niveau de structure (groupe de populations, entre populations à l'intérieur des groupes, à l'intérieur des populations). Les tests ont été réalisés avec 10000 permutations.

L'hypothèse d'un isolement génétique par la distance (Slatkin et Hudson, 1991) selon laquelle il existe une relation linéaire positive entre distance génétique et distance géographique a été testée à l'aide du test de Mantel, implémenté dans le logiciel Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005), avec 1000 permutations et en excluant les localités HCO et CST. La distance génétique entre populations a été obtenue par la relation $\pi/(1-\pi)$, où π est le nombre moyen de différences entre paire d'haplotypes pour une paire de populations donnée (Rousset,

1997). Les distances géographiques entre deux populations ont été mesurées en suivant les principales courbes du trait de côte pour les populations continentales et en ligne droite depuis la population continentale la plus proche pour les populations insulaires IPA et GBN (Annexe 1.3).

Des analyses de distribution de « match-mismatch » ont été réalisées pour chaque lignée phylogénétique en utilisant le logiciel Arlequin. La distribution de « match-mismatch » est la distribution du nombre de différences mutationnelles entre les séquences comparées deux à deux (Roger et Harpending, 1992), dont la pente est affectée par la démographie passée du groupe d'individus étudié. Une distribution multimodale est attendue dans le cas d'échantillons provenant de populations à l'équilibre démographique, tandis que la distribution est unimodale dans les populations qui ont subi une expansion démographique récente ou une expansion géographique. Une distribution bimodale peut cependant refléter une sous-structuration de l'échantillon (effet Wahlund). Les modèles d'expansion démographique soudaine (Roger et Harpending, 1992) et d'expansion spatiale (Excoffier, 2004) ont été testés en utilisant 1000 bootstraps. Une valeur de bootstrap importante indique que le modèle s'ajuste bien aux données. Le temps depuis l'expansion la plus récente exprimée en fonction du taux de mutation (τ) a été calculé à partir de ces analyses de distribution.

Un réseau d'haplotypes a été construit pour les données populationnelles obtenues pour atp8/trnS, en utilisant la méthode de median-joining, implémentée dans NETWORK v 4.5 (Bandelt *et al.*, 1999).

C. Résultats

1. Approche multilocus

a) Polymorphisme des quatre marqueurs

Les caractéristiques des quatre marqueurs utilisés pour l'approche multilocus sont indiquées dans le Tableau 1.3. Nous utiliserons ici le terme d'haplotype pour les marqueurs haploïdes (atp8/trnS et RuBisCo spacer) et le terme d'allèle lorsqu'on inclut les marqueurs ITS1 et ITS2. Les numéros d'accèsion des haplotypes et des allèles sont donnés en Annexe 1.4. Pour chacun des marqueurs, l'insertion d'indels de 1pb à 46pb a été nécessaire pour

Tableau 1.3 : Caractéristiques des marqueurs utilisés pour l'approche multilocus. Nind : nombre d'individus, Nalleles : nombre d'allèles, *pb* : longueur en paires de bases de la région séquencée, *s* : nombre de sites avec du polymorphisme de substitution, *Indels* : nombre de sites avec du polymorphisme d'indels, *H* : diversité génétique moyenne intra-groupe. Les groupes ont été définis en référence aux trois clades mitochondriaux (Nord, Z30 et AI) et aux deux clades ITS1 (PP et AI).

	Nind	Nalleles	<i>pb</i>	<i>s</i>	<i>Indels</i>	<i>H</i>
atp8/trnS						
PP	65	11	155	19	27	0,888 ± 0,014
Nord	28	5	155	6	0	0,730 ± 0,047
Z30	37	6	136	5	8	0,806 ± 0,032
AI	62	11	120	11	0	0,863 ± 0,025
<i>Lnig</i>	127	22	155	28	37	0,938 ± 0,007
Total	138	27	159	42	46	0,946 ± 0,006
RuBisCo spacer						
PP	63	6	555	5	0	0,785 ± 0,022
Nord	26	3	555	2	0	0,569 ± 0,083
Z30	37	3	555	3	0	0,581 ± 0,042
AI	61	7	555	5	1	0,727 ± 0,048
<i>Lnig</i>	124	13	555	11	1	0,879 ± 0,013
Total	136	21	555	24	7	0,899 ± 0,012
ITS1						
PP	25	14	330	20	10	0,940 ± 0,025
Nord	7	5	330	8	9	0,904 ± 0,103
Z30	18	9	325	13	3	0,895 ± 0,043
AI	27	10	329	11	6	0,874 ± 0,040
<i>Lnig</i>	52	24	336	34	16	0,953 ± 0,013
Total	63	32	349	52	53	0,966 ± 0,009
ITS2						
PP	31	8	231	10	2	0,851 ± 0,028
Nord	9	2	229	5	0	0,222 ± 0,166
Z30	22	6	231	5	2	0,822 ± 0,037
AI	35	5	231	4	2	0,400 ± 0,100
<i>Lnig</i>	66	13	233	15	6	0,801 ± 0,041
Total	78	19	237	28	11	0,854 ± 0,032

PP : Province Péruvienne (composés des groupes Nord et Z30), AI : Aire Intermédiaire, *L. nig* : *L. nigrescens* (composée des groupes PP et AI), Total : tous les échantillons étudiés, incluant les espèces externes (outgroups).

l'alignement des séquences, avec une variation importante de la longueur de séquence intra- et inter-spécifique (Tableau 1.3). Les marqueurs ont pu être séparés en deux groupes en fonction du polymorphisme observé pour *L. nigrescens* : (i) *atp8/trnS* et ITS1, avec 22 haplotypes et 24 allèles respectivement ; et (ii) RuBisCo spacer et ITS2 avec 13 haplotypes et 13 allèles. De plus, les deux premiers marqueurs ont montré une proportion de sites polymorphes plus importante (18% et 10%) que les deux autres marqueurs (6% et 2%). Tandis que la plupart des haplotypes/allèles de *atp8/trnS* et ITS1 ont une distribution géographiquement restreinte, certains haplotypes/allèles de RuBisCo spacer et ITS2 ont une aire de distribution étendue. Ainsi, pour ITS2 l'allèle *its2-11* dans le sud et *its2-1* dans le nord sont présents sur plus de 1680 km et 1300 km de côte (de IPA à GBN et de ILO à MOC, Fig. 1.3, voir aussi Annexe 1.5 pour le détail). De même, certains haplotypes RuBisCo spacer sont partagés entre populations distantes géographiquement, comme l'haplotype du sud *rs7* (de IPA à GBN, 1680 km) et l'haplotype du nord *rs1* (de ILO à COL, 850 km, Fig. 1.3 et Annexe 1.5). Cependant, quelque soit le marqueur utilisé, nous n'avons pas détecté d'haplotype ou d'allèle partagé entre sites situés au nord et au sud de l'aire étudiée (17-41°S).

La taille et le polymorphisme des indels est fortement variable en fonction des marqueurs. L'alignement ITS1 a nécessité l'insertion de 53pb (indels de 1pb à 14pb), dont 16bp nécessaires pour l'alignement des allèles de *L. nigrescens* (Tableau 1.3). L'insertion de 11bp et 7bp ont été nécessaires respectivement pour l'alignement de ITS2 et de RuBisCo spacer (Tableau 1.3). Le marqueur *atp8/trnS* a montré un patron différent en termes de distribution des indels : la plupart des indels (37pb sur 46pb) ont dû être insérés pour aligner les haplotypes de *L. nigrescens* entre eux. Du polymorphisme d'indel a été observé dans deux régions distinctes du marqueur (région 1 : entre les bases 50 et 80 et région 2 : entre les bases 122 et 127, Fig. 1.4). La première région d'indel a montré à la fois un polymorphisme de longueur et de substitution (trois longueurs différentes d'indel : 13, 21 et 29pb), tandis que le second indel, de 6 bp, ne présentait pas de polymorphisme de longueur (Fig. 1.4).

b) Deux lignées divergentes au sein de *L. nigrescens*

Les reconstructions phylogénétiques sont congruentes entre marqueurs pour montrer que *L. nigrescens* forme un groupe monophylétique, avec *L. trabeculata* comme espèce la plus proche phylogénétiquement. La monophylie de *L. nigrescens* est soutenue par des valeurs élevées de soutien quelque soit le marqueur et la méthode de reconstruction phylogénétique (Fig. 1.5 et Fig. 1.6). A l'intérieur de ce groupe monophylétique, deux

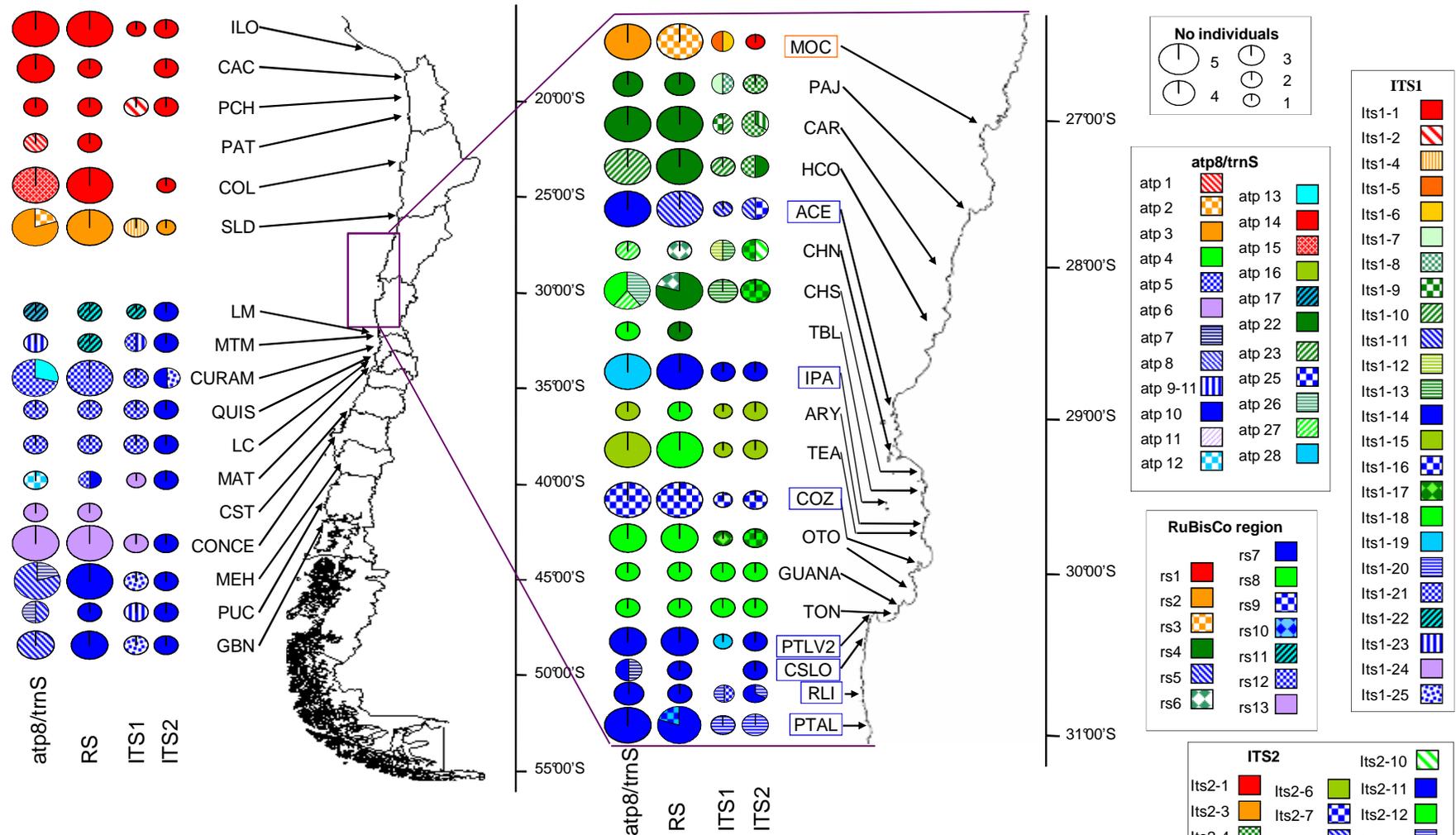


Figure 1.3 : Distribution géographique des allèles de *L. nigrescens* pour chacun des quatre marqueurs. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus analysés dans chaque localité (1 à 5). La couleur des cercles représente les différents clades : orange-rouge pour le clade Nord (17°37'S-27°12'S), vert pour le clade Z30 (27°41'S-30°14'S, avec exception des localités ACE, IPA et COZ), bleu pour le clade AI (30°15'S-41°48'S + localités ACE, IPA et COZ). Pour atp8/trnS, les données montrées sont celles du sous-échantillonnage de l'approche multilocus.

groupes distincts d'allèles/haplotypes ont été détectés : (i) un groupe au nord, correspondant à la région biogéographique de la Province Péruvienne, entre 17°37'S et 30°14'S et appelé « lignée PP » et (ii) un groupe au sud, correspondant à la région biogéographique de l'Aire Intermédiaire, entre 29°03'S et 41°48'S, appelé « lignée AI » (Fig. 1.5 et Fig. 1.6). Les valeurs de soutien pour la lignée PP montrent des variations en fonction de la méthode de reconstruction phylogénétique utilisée et de la manière dont les indels sont traités (Fig. 1.5 et Fig. 1.6). Tandis que la lignée PP est toujours monophylétique quelque soit le marqueur, la monophylie de la lignée AI est observée pour *atp8/trnS* et *ITS1* uniquement (Fig. 1.5).

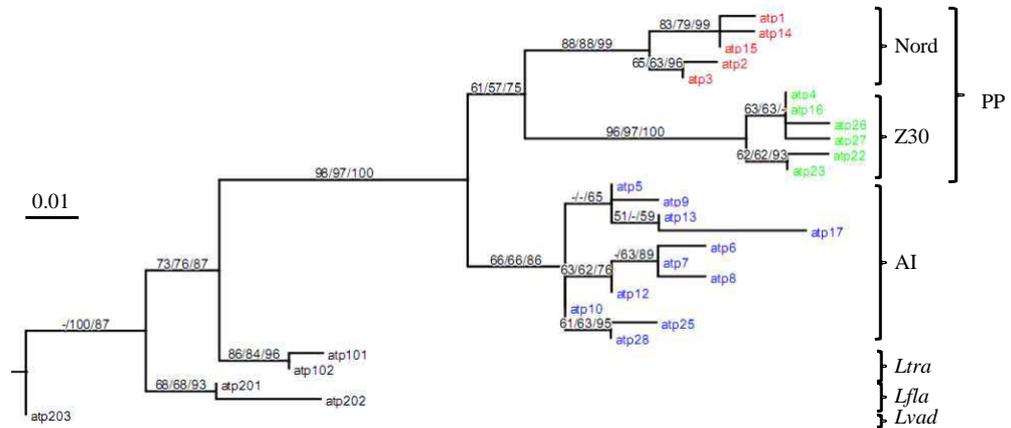
Les arbres obtenus avec les marqueurs *ITS2* et *RuBisCo spacer* présentent une topologie similaire qui se caractérise d'une part par des valeurs de soutien des nœuds faibles en général (même en incluant la lignée PP) et d'autre part, par une polytomie pour les allèles ou haplotypes de la lignée AI (Fig. 1.6). Cette polytomie suggère une rétention de polymorphisme ancestral dans la région AI, avec des branches de longueur nulle. Ceci est confirmé par la structure des réseaux d'haplotypes qui montrent une séparation entre les allèles observés pour les individus de la région PP et ceux de AI (Fig. 1.6). L'haplotype *rs7* et l'allèle *its2-11* sont considérés comme ancestraux, du fait de leur position sur les arbres phylogénétiques (branche nulle au niveau de la polytomie) et sur les réseaux (position centrale) et également parce que ce sont les haplotypes/allèles les plus fréquents et les plus largement distribués (Fig. 1.3). Ces allèles ancestraux ont été observés dans la région AI uniquement, pour les deux marqueurs (Fig. 1.6).

Le marqueur *atp8/trnS* présente une subdivision de la lignée PP en un « clade Nord » et un « clade Zone 30°S » (Z30) avec de fortes valeurs de soutien pour ces clades et pour le clade AI (71 à 100%, Fig. 1.5). Ces deux clades de la région PP présentent des aires de distribution disjointes : le clade Nord est observé au nord de 27°S tandis que le clade Z30 est restreint à la région entre 27°S et 30°S (Fig. 1.3 et Annexe 1.5, voir également l'analyse populationnelle). Une telle sous-division de la lignée PP en deux clades n'a pas été détectée pour les trois autres marqueurs, bien qu'il n'y ait pas d'allèle/haplotype partagé entre ces deux sous-régions (Fig. 1.3 et Fig. 1.4).

En utilisant uniquement l'information de polymorphisme d'indel, quatre groupes d'haplotypes ont pu être distingués pour le marqueur *atp8/trnS*, groupes qui correspondent aux trois clades décrits précédemment, à l'exception du clade Z30 qui regroupe les haplotypes de deux longueurs différentes (1 indel de 8pb, Fig. 1.4). Le recodage des indels n'a pas entraîné de modification de la topologie des arbres de MP et Bayésien pour le marqueur *atp8/trnS*, seule la longueur des branches a été modifiée, les branches étant plus longues

A.

<i>atp8/trnS</i>	Nord	Z30	PP	AI	<i>Lnig</i>	<i>Ltra</i>	<i>Lfla</i>
Z30	6.6						
AI	6.3	7.5	6.9				
<i>Ltra</i>	8.7	9.7	9.3	7.9	8.6		
<i>Lfla</i>	9.4	9.6	9.5	8.5	9.0	3.8	
<i>Lvad</i>	11.6	11.8	11.7	10.8	11.3	6.0	4.0



B.

<i>ITS1</i>	PP	AI	<i>Lnig</i>	<i>Ltra</i>	<i>Lfla</i>	<i>Lvad</i>
AI	2.7					
<i>Ltra</i>	3.0	2.5	2.8			
<i>Lfla</i>	4.3	4.3	4.5	2.3		
<i>Lvad</i>	5.1	5.1	5.3	3.1	2.5	
<i>Lcorr</i>	5.1	5.1	5.7	3.8	3.2	2.7

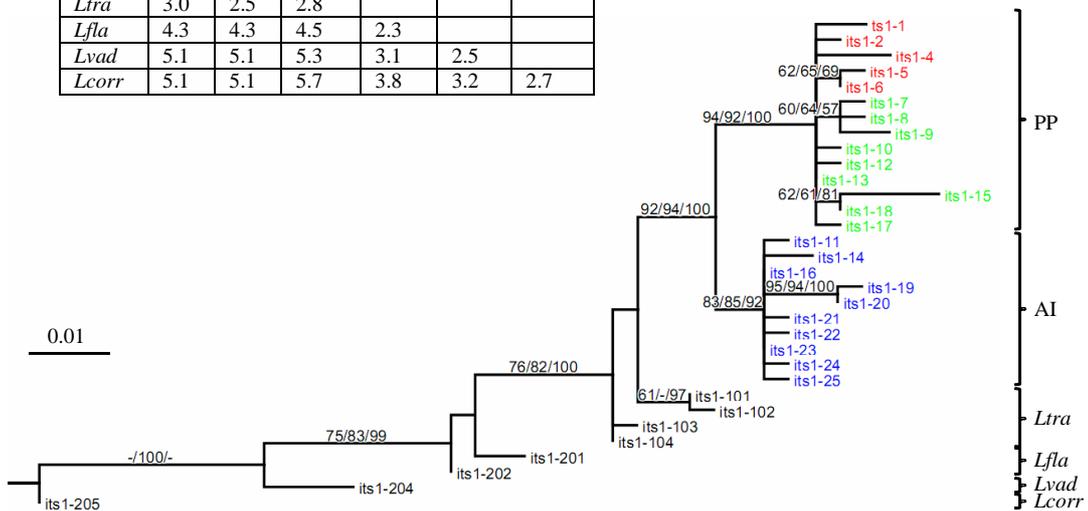


Figure 1.5 : Arbres de Maximum de Vraisemblance (ML) et *p*-distances correspondantes pour les marqueurs *atp8/trnS* et *ITS1*. (A) marqueur *atp8/trnS*, jeu de données de l'approche multilocus, indels considérés comme données manquantes, (B) marqueur *ITS1*. Les valeurs de soutien sont présentées, avec respectivement les bootstraps de maximum de parcimonie, bootstraps de maximum de vraisemblance et probabilités *a posteriori* bayésiennes. Le signe - indique une valeur de soutien < 50 %. La couleur des noms des allèles est fonction du clade *atp8/trnS* d'appartenance des individus montrant ces allèles (bleu : clade AI, deux couleurs pour PP : vert pour le clade Z30 et rouge pour le clade Nord). Les matrices montrent les *p*-distances calculées entre clades en excluant les indels.

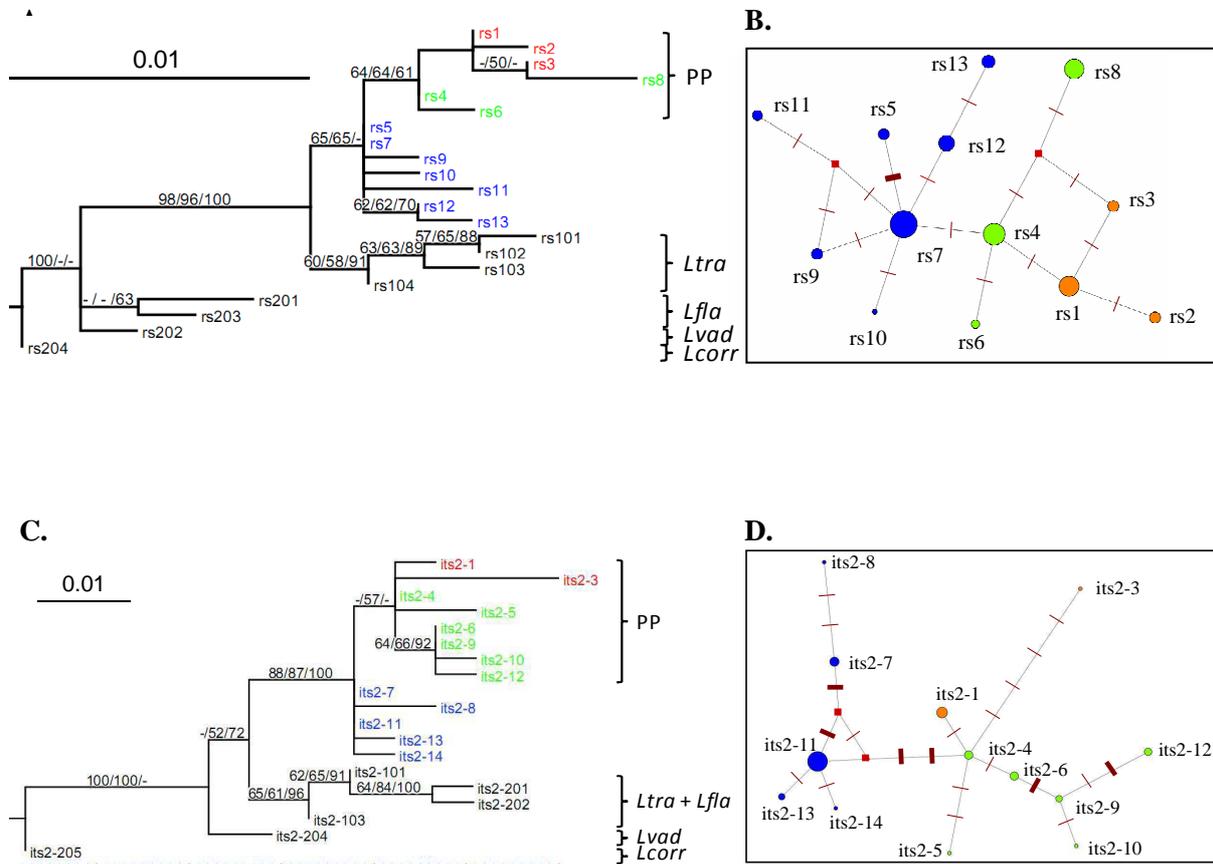


Figure 1.6 : Arbres de Maximum de Vraisemblance et réseaux non racinés pour les haplotypes RuBisCo spacer (A et B) et les ribotypes ITS2 (C et D) de *L. nigrescens*. Pour la légende des arbres voir Fig. 1.5. Dans les réseaux, les carrés rouges représentent des haplotypes ou ribotypes hypothétiques, non détectés dans cette étude. Les traits rouges indiquent les mutations (trait fin : substitution, trait large : indel). La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus présentant les allèles. La couleur des cercles correspond au clade *atp8/trnS* des individus (voir Fig. 1.5). Les flèches indiquent les allèles ancestraux pour chaque réseau (ancestralité déterminée par des réseaux racinés, non présentés).

lorsque les indels sont recodés que lorsqu'ils ne sont pas considérés (« données manquantes ») ou exclus (données non montrées). L'arbre présenté dans la Figure 1.5 est un arbre de ML avec les indels non recodés (« données manquantes »), ce qui permet de comparer entre les différentes méthodes de reconstruction phylogénétiques (la méthode de ML ne permettant pas le recodage des indels).

Le clonage des ITS a permis de détecter la présence d'un polymorphisme intra-individu, avec jusqu'à trois séquences différentes par individu. Plusieurs des séquences de clones correspondaient à de nouveaux allèles (Annexe 1.4). Cependant, chacun des individus contenait des allèles soit de la lignée PP soit de la lignée AI, mais jamais des deux lignées, indiquant que ce polymorphisme intra-individu n'était pas le résultat d'une hybridation. De plus, l'ajout de ces nouveaux allèles dans le jeu de données n'a pas modifié la topologie des arbres phylogénétiques (données non montrées).

Pour les marqueurs ITS1 et ITS2, la diversité en terme de nombre d'allèles, nombre de sites polymorphes (s) et de diversité génique (H) était généralement plus importante pour la lignée PP que pour la lignée AI (Tableau 1.3). En particulier, le marqueur le plus polymorphe, ITS1, a montré près de deux fois plus de sites de substitution dans la lignée PP ($s = 20$) que dans la lignée AI ($s = 11$). Le marqueur *atp8/trnS* a montré exactement le même nombre d'haplotypes dans les lignées PP et AI pour le jeu de données multilocus, tandis que le nombre de sites polymorphes observés dans PP était le double de celui de AI (Tableau 1.3).

c) Divergence entre lignées de *L. nigrescens* et datation

La divergence de séquences entre les lignées PP et AI, lorsqu'elle est calculée pour les marqueurs montrant des clades monophylétiques, est similaire ou supérieure à la divergence entre espèces-sœurs reconnues. Pour le marqueur ITS1, la divergence entre les lignées AI et PP est du même ordre de grandeur (p -distance de 2,7%) que la divergence entre *L. trabeculata* et chacune des lignées de *L. nigrescens* (2,5% et 3%). ou même entre *L. vadosa* et *L. corrugata*, deux espèces séparées par l'Océan Pacifique Sud (2,7%, Fig. 1.5). Pour le marqueur *atp8/trnS*, la divergence (calculée en excluant les sites présentant du polymorphisme d'indels) entre clades de *L. nigrescens* est près de deux fois plus importante que la divergence entre *L. flavicans* et *L. trabeculata* (6,3-7,3% versus 3,8%) ou entre *L. flavicans* et *L. vadosa* (4,0%, Fig 1.5). Toutes ces reconstructions phylogénétiques montrent des branches généralement plus longues pour les allèles de *L. nigrescens* que pour les autres espèces (Fig. 1.5 et Fig. 1.6). A l'intérieur de *L. nigrescens*, les allèles AI sont

systématiquement plus proches des espèces outgroup que les allèles PP (Fig. 1.5 et Fig. 1.6).

La date de divergence entre PP et AI a été estimée en utilisant la calibration indirecte de l'horloge moléculaire calculée pour le RuBisCo spacer (entre 0,53% et 0,80% par Ma). La divergence entre haplotypes PP et AI variant entre 0,2% et 0,9%, la date de divergence entre les deux lignées a donc été estimée entre 0,250Ma et 1,686Ma.

2. Approche populationnelle (*L. nigrescens*)

a) Distribution géographique des lignées et absence « d'admixture »

L'approche multilocus a permis de montrer la présence de trois clades pour le marqueur mitochondrial, chaque clade montrant une aire de distribution distincte (Fig. 1.3). Cependant, en augmentant la taille d'échantillon à environ 30 individus par site, nous avons pu définir plus précisément la distribution géographique de chaque clade. Neuf nouveaux haplotypes ont été détectés, mais les relations phylogénétiques décrites dans l'analyse multilocus restent inchangées. Chacun de ces nouveaux haplotypes (atp29 à atp35, atp28 et atp39) diffère d'haplotypes identifiés précédemment par seulement une à deux paires de bases (Fig. 1.5 ; n° d'accession : FJ410117 à FJ410125, Annexe 1.4).

Les aires de distribution des clades Nord et Z30 sont totalement disjointes et présentent une discontinuité abrupte localisée entre 27°12'S et 27°41'S (Fig. 1.3 et 1.7). A l'opposé, les aires des clades Z30 et AI présentent une région de chevauchement localisée entre 29°03'S et 30°14'S (Fig. 1.3 et 1.7, appelée Région de transition par la suite). Cette Région de transition est caractérisée par une structure de taches renfermant des populations composées exclusivement d'haplotypes AI (sites COZ à 29°57'S, IPA à 29°35'S et ACE à 29°03'S, Fig. 1.7) dispersées dans l'aire de distribution du clade Z30. Il est important de noter que chaque population est composée d'haplotypes d'un seul clade (Fig. 1.7). Cette absence de mélange ou « admixture » entre clades a également été observée pour chacun des trois autres marqueurs utilisés dans l'approche multilocus (Fig. 1.3).

b) Polymorphisme observé dans les clades et les populations de *L. nigrescens*

La méthode de SSCP nous a permis de discriminer sans ambiguïté la majorité des haplotypes du marqueur atp8/trnS, la plupart des profils (15 sur 18) correspondant en effet à une séquence unique. Deux des trois profils correspondant à plus d'un haplotype ont pu être

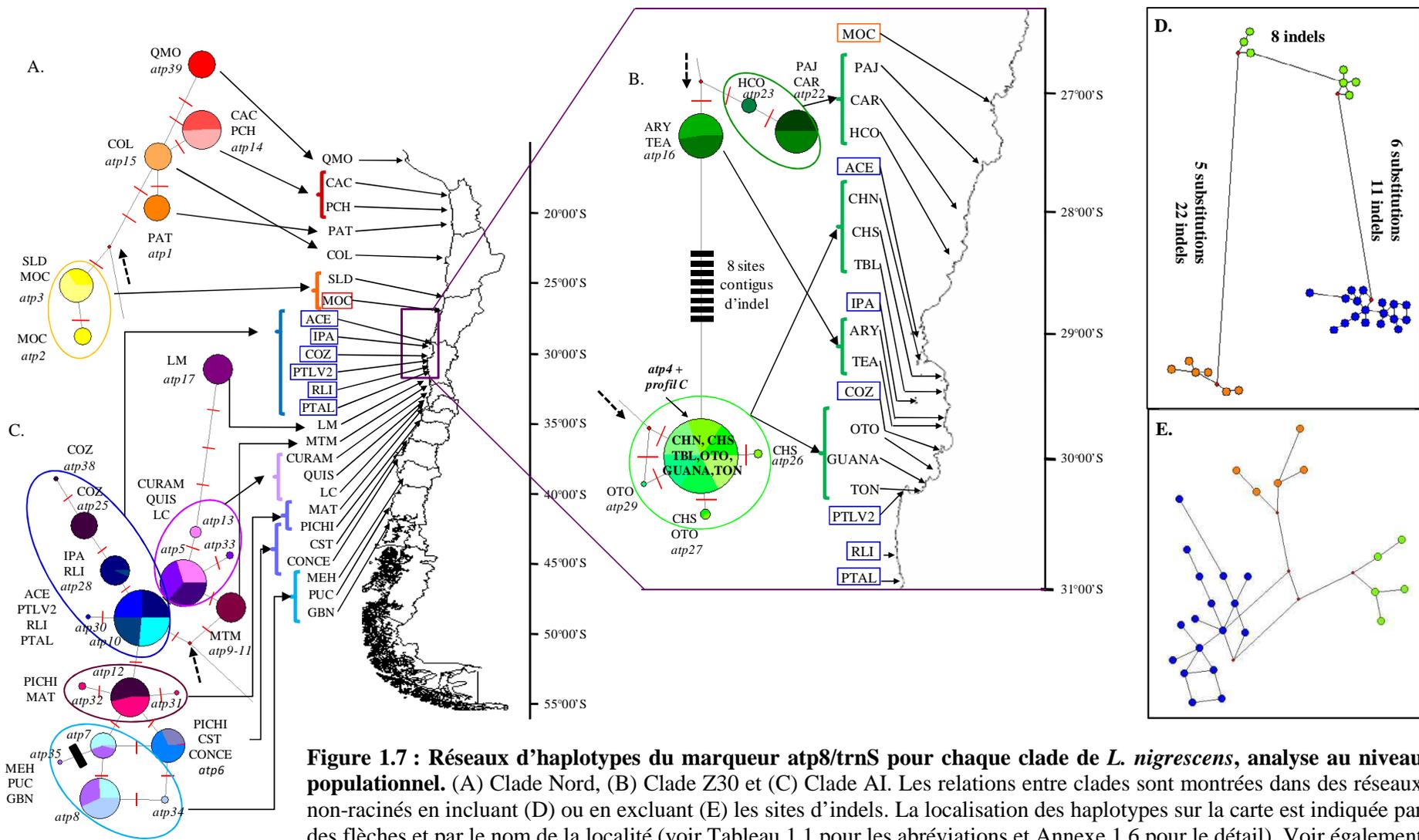


Figure 1.7 : Réseaux d'haplotypes du marqueur *atp8/trnS* pour chaque clade de *L. nigrescens*, analyse au niveau populationnel. (A) Clade Nord, (B) Clade Z30 et (C) Clade AI. Les relations entre clades sont montrées dans des réseaux non-racinés en incluant (D) ou en excluant (E) les sites d'indels. La localisation des haplotypes sur la carte est indiquée par des flèches et par le nom de la localité (voir Tableau 1.1 pour les abréviations et Annexe 1.6 pour le détail). Voir également la légende de la Fig. 1.4 pour les composants du réseau. Les individus ayant un profil « C » sur les gels de SSCP sont représentés comme ayant l'haplotype *atp4* (caractères gras).

ensuite identifiés par criblage en utilisant la méthode de RFLP (haplotypes atp5 et atp10 d'une part et atp12 et atp13 d'autre part). Seules les séquences correspondant à un profil (profil C) n'ont pas pu être différenciées. Ce profil, exclusivement observé dans la région Z30, correspond à trois haplotypes, différant par une paire de base (haplotypes atp4, atp27 et atp29). L'haplotype atp4 étant le plus fréquent (observé dans 13 sur 19 séquences analysées) et occupant la position centrale du réseau d'haplotypes (Fig. 1.7), nous avons considéré tous les individus montrant ce profil C comme porteurs de l'haplotype atp4 pour le calcul des indices de diversité. Cette approximation a certainement entraîné une sous-estimation du polymorphisme dans cette région.

L'analyse de 1051 individus a révélé la présence de 31 haplotypes (Fig. 1.7 et Annexe 1.6). Les clades Nord et AI ont été échantillonnés sur une longueur de côte similaire (1416km et 1815km respectivement). Le clade AI a montré un nombre d'haplotypes plus important et une diversité nucléotidique (π) et génique (H) plus importante que le clade Nord (Tableau 1.4). Cependant, comme l'effort d'échantillonnage n'était pas équivalent entre ces régions, nous avons utilisé une méthode de ré-échantillonnage pour estimer les indices de diversité pour le clade AI (100 ré-échantillonnages aléatoires de sept sites sur les 17 échantillonnés). Le ré-échantillonnage a montré que les clades Nord et AI présentent des indices de diversité génique similaires : l'effort d'échantillonnage plus important pour le clade AI est donc à l'origine de la plus grande diversité génique détectée dans ce clade (données non montrées). La diversité nucléotidique reste légèrement supérieure dans le clade AI par rapport au clade Nord, mais les deux valeurs montrent des écart-types importants (Tableau 1.4, données non montrées pour le ré-échantillonnage) : ceci est la conséquence de la forte structure observée dans les deux clades, avec en plus la présence d'haplotypes rares dans le clade AI (Fig. 1.7). Une plus faible diversité génique a été observée dans le clade Z30. Ceci pourrait être cependant la conséquence d'une sous-estimation du polymorphisme, les haplotypes rares (atp27 et atp29) n'ayant pas été détectés par la méthode de SSCP. La diversité nucléotidique du clade Z30 est inférieure à celle des deux autres clades lorsque l'on considère comme un seul événement de mutation les huit sites d'indels contigus (spécifiques au clade Z30) (Tableau 1.4).

A l'aide des analyses d'AMOVA, nous avons testé différents modèles hiérarchiques : les populations ont été groupées en fonction de leur localisation géographique (en situant la zone de transition biogéographique à 30°S ou à 33°S) ou en fonction de leur affinité phylogénétique (clades Nord, Z30 et AI). Seuls les résultats de l'analyse en fonction des clades phylogénétiques est présentée ici, cette analyse étant celle qui expliquait le mieux la

Tableau 1.4 : Diversité génétique à l'intérieur de *L. nigrescens*. $\% \pi$: diversité nucléotidique, exprimée en pourcentage, H : diversité génique moyenne (et déviation standard) calculée sur l'ensemble des individus appartenant à chaque clade, sur l'ensemble des localités à l'intérieur des clades et pour chaque localité (en excluant celles avec moins de 28 individus, HCO et CST). Seules les populations polymorphes sont présentées. Dans le clade Z30, les huit indels contigus ont été considérés comme un évènement de mutation unique. N : nombre.

Clade <i>atp8/trnS</i> et <i>Localité polymorphe</i>	N individus (N localités)	N haplotypes	$\% \pi$ (SD)	H (SD)
Clade Nord	206 (7)	6	1,6116 ± 0,9658	0,8072 ± 0,0101
<i>SLD</i>	29	2	0,3305 ± 0,3198	0,5123 ± 0,0311
Moyenne sur les localités Nord	29,4	1,14	0,0472 ± 0,1249	0,0732 ± 0,1936
Clade Z30	308 (10)	6	1,1151 ± 0,7537	0,5690 ± 0,0224
<i>CHS</i>	30	2	0,1006 ± 0,1744	0,1287 ± 0,0792
Moyenne sur les localités Z30	30,8	1,30	0,0101 ± 0,0318	0,0129 ± 0,0407
Clade AI	511 (17)	18	2,0360 ± 1,2217	0,8762 ± 0,0060
<i>COZ</i>	28	2	0,0595 ± 0,1364	0,0714 ± 0,0652
<i>PTLV2</i>	30	2	0,0556 ± 0,1313	0,0667 ± 0,0613
<i>RLI</i>	29	2	0,1108 ± 0,1895	0,1330 ± 0,0814
<i>CURAM</i>	30	2	0,2395 ± 0,2912	0,2874 ± 0,0917
<i>QUIS</i>	30	2	0,1073 ± 0,1860	0,1287 ± 0,0792
<i>PICHI</i>	30	4	0,2184 ± 0,2761	0,2506 ± 0,1017
<i>MEH</i>	30	2	0,4291 ± 0,4139	0,5149 ± 0,2680
<i>PUC</i>	30	3	0,4559 ± 0,4300	0,5034 ± 0,0642
<i>GBN</i>	30	3	0,1628 ± 0,2338	0,1908 ± 0,0928
Moyenne sur les localités AI	30,1	1,72	0,1397 ± 0,1892	0,1263 ± 0,1694

Tableau 1.5 : Analyse de variance moléculaire (AMOVA) pour l'analyse populationnelle de *L. nigrescens* avec le marqueur *atp8/trnS*. Les populations avec moins de 28 individus (HCO et CST) ont été exclues de l'analyse.

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Composantes de la variance	Pourcentage de variation (%)	Valeur de p
Entre clades Nord, Z30 et AI	2	8860,756	13,76594	88,86	< 0,00001
Entre populations à l'intérieur des clades	31	1624,550	1,68507	10,88	< 0,00001
A l'intérieur des populations	961	40,899	0,04127	0,27	
Total	1024	10477,782	15,49227		

variance. La majorité de la variation génétique du marqueur mitochondrial est expliquée par la différenciation entre les clades (88,9%, Tableau 1.5 ; 90,2% lorsque les indels sont exclus, données non montrées). Cependant, la différenciation entre sites à l'intérieur des clades est également significative et explique plus de 10% de la variation génétique observée pour atp8/trnS (Tableau 1.5). La prise en compte du modèle de substitution obtenu avec ModelTest ne modifie pas les résultats (données non montrées).

Alors que des valeurs de polymorphisme relativement élevée ont été observées dans les clades, le polymorphisme intra-localité s'est révélé être extrêmement faible. Le nombre de localités montrant plus d'un haplotype mitochondrial est très limité (11 sur 34, Tableau 1.4). De plus, la plupart des localités polymorphes sont caractérisées par la présence d'un haplotype prédominant et généralement d'un haplotype rare, ces haplotypes différant d'une paire de base (Fig. 1.7). Ce polymorphisme intra-localité particulier se traduit par des valeurs de diversité géniques et nucléotidiques intra-localité faibles et des écart-types importants (Tableau 1.4). Trois localités montrent cependant un patron différent, avec deux haplotypes de fréquences similaires : SLD dans le clade Nord et MEH et PUC dans le sud de la région AI (Tableau 1.4 et Fig. 1.7).

L. nigrescens est également caractérisée par une proportion importante d'haplotypes privés, observés dans seulement une localité : quatre haplotypes sur six dans le clade Nord, trois sur sept dans le clade Z30 et 11 sur 18 dans le clade AI. La distance entre localités partageant des haplotypes est généralement faible, inférieure à 150km de côte dans la plupart des cas. Les quatre exceptions concernent les haplotypes du sud de l'aire de distribution de AI : les haplotypes atp6, atp7 et atp8 sont partagés entre localités distantes de 270km à 347km (PICHI et GBN, Fig. 1.7). Dans le clade Z30, l'haplotype atp4 a été observé dans des localités séparées par 132km (profils vérifiés par séquençage). C'est l'unique cas d'haplotype partagé entre localités non-adjacentes (le groupe de localités TON/GUANA/OTO est séparé du groupe TBL/CHS/CHN par les localités TEA, ARY et COZ, Fig. 1.7). A l'intérieur de chaque clade, les tests d'isolement par la distance ont été significatifs (tests de Mantel, valeurs de p de 0,009, 0,004 et 0,014 pour les clades Nord, Z30 et AI, respectivement, Fig. 1.8). Le patron d'isolement par la distance explique une plus grande portion de la variance dans le clade Nord ($R^2 = 0,55$) que dans le clade AI ($R^2 = 0,15$, Fig. 1.8). La localité LM s'est avérée être fortement différenciée des autres localités AI en comparaison avec la différenciation attendue en suivant le patron d'isolement par la distance. L'exclusion de cette localité augmente la valeur de R^2 à 0,44 (valeur de $p < 0,001$).

La distribution de « match-mismatch » est clairement unimodale pour les haplotypes

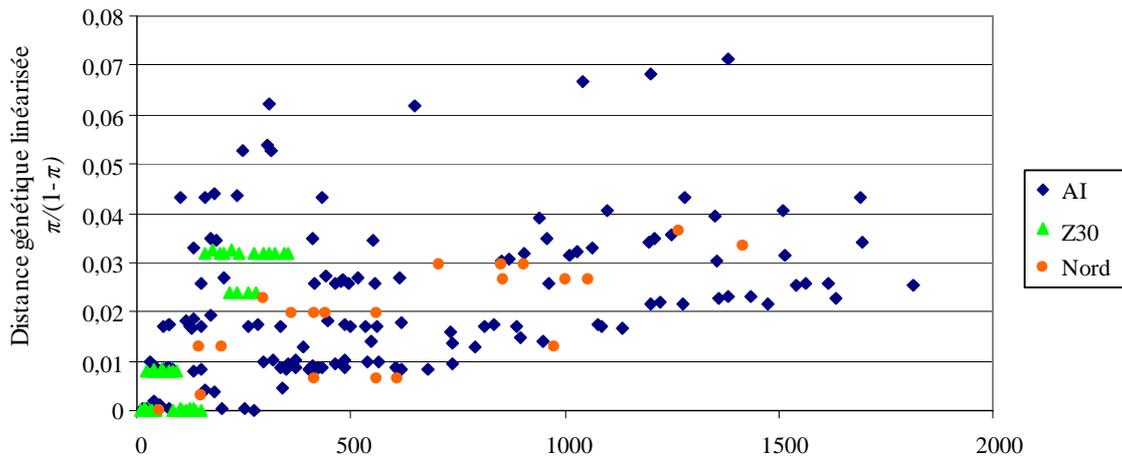


Figure 1.8 : Différenciation génétique entre localités de *L. nigrescens* à l'intérieur des trois clades mitochondriaux : AI (en bleu), Z30 (en vert) et Nord (en orange). Pour chaque paire de localités, la distance génétique, calculée par la relation $\pi/(1-\pi)$, et la distance géographique sont représentées.

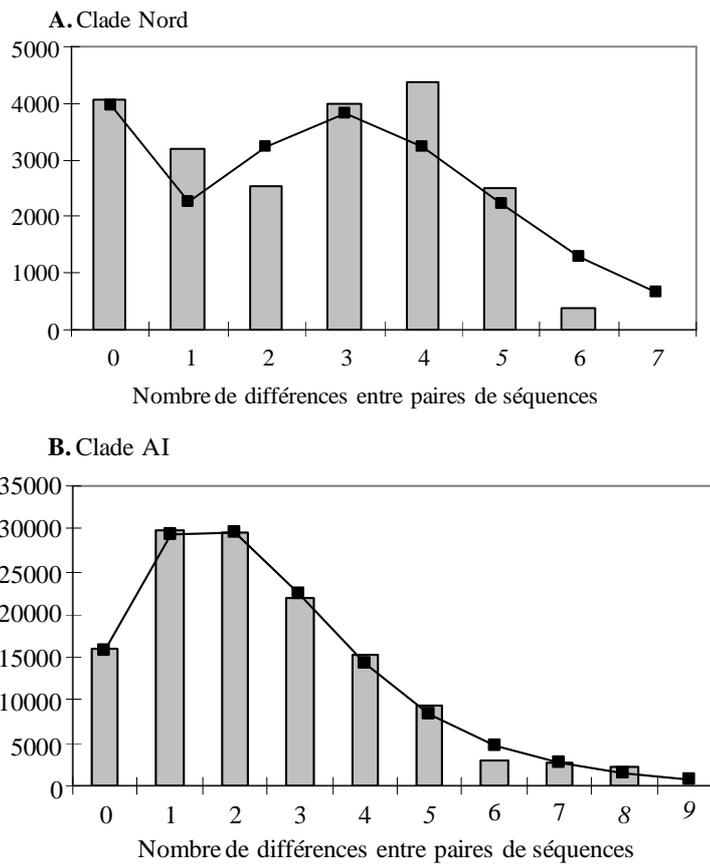


Figure 1.9 : Distribution de « match-mismatch » montrant l'histoire démographique des clades Nord et AI de *L. nigrescens*. Les distributions observées (histogramme) sont comparées à la distribution attendue sous un modèle d'expansion spatiale (courbe).

AI, tandis que le clade Nord montre une distribution bimodale (Fig. 1.9). Les modèles d'expansion démographique soudaine et d'expansion spatiale s'ajustent à la distribution observée pour le clade AI avec des valeurs de bootstrap relativement importantes (respectivement 0,795 et 0,781), avec des valeurs de τ de 1,4 et 1,3. Pour le clade Nord, le modèle d'expansion démographique soudaine montre une valeur de bootstrap négligeable (0,37), tandis qu'une valeur plus importante est obtenue pour le modèle d'expansion spatiale (0,63) avec une valeur de τ de 3,0.

3. Une structure phylogéographique différente chez *L. trabeculata*

La distribution géographique des haplotypes et les arbres phylogénétiques sont présentés dans les figures 1.10 (atp8/trnS et RuBisCo spacer) et 1.11 (ITS1 et ITS2) (voir également Annexes 1.5 et 1.7). Les arbres sont les mêmes que ceux présentés pour l'analyse multilocus focalisée sur *L. nigrescens* (l'haplotype supplémentaire, atp103, détecté lorsque l'échantillonnage de *L. trabeculata* a été augmenté, n'a pas été inclus dans ces analyses).

Les arbres phylogénétiques des marqueurs atp8/trnS et RuBisCo spacer montrent que les haplotypes de *L. trabeculata* forment un clade monophylétique bien soutenu (Fig. 1.10). Pour le marqueur ITS1, la monophylie de *L. trabeculata* n'est pas soutenue (valeurs de soutien < 50%), ce qui semblerait dû à la persistance d'un haplotype ancestral (haplotype its1-104) à *L. nigrescens* et *L. trabeculata* au sein du jeu de données (Fig. 1.11). Le marqueur ITS2 montre cependant une topologie nettement différente de celle des autres marqueurs : les haplotypes de *L. trabeculata* étant regroupés avec ceux de *L. flavicans* au sein d'un même clade monophylétique, relativement bien soutenu (Fig. 1.11).

Les données obtenues pour *L. trabeculata* montrent globalement une différenciation entre deux groupes d'individus, appelés « nord » et « sud », correspondant à des groupes monophylétiques. Ainsi, les marqueurs ITS1, ITS2 et RuBisCo spacer montrent un clade groupant les individus des localités situées à 15°S et 20°S (nord), tandis qu'un autre clade regroupe les individus situés entre 30°S et 41°S (sud) (Fig. 1.10 et 1.11). Le marqueur atp8/trnS montre également une structure entre « nord » et « sud », mais les haplotypes « nord » ne forment pas un clade monophylétique. Le nombre plus important d'individus analysés pour atp8/trnS montre que les deux groupes ont des distributions géographiques contrastées, le groupe « nord » étant présent entre 14°S et 21°S, tandis que l'unique haplotype « sud » est observé entre 26°S et 41°S. La sous-structure dans le clade sud suggérée par les

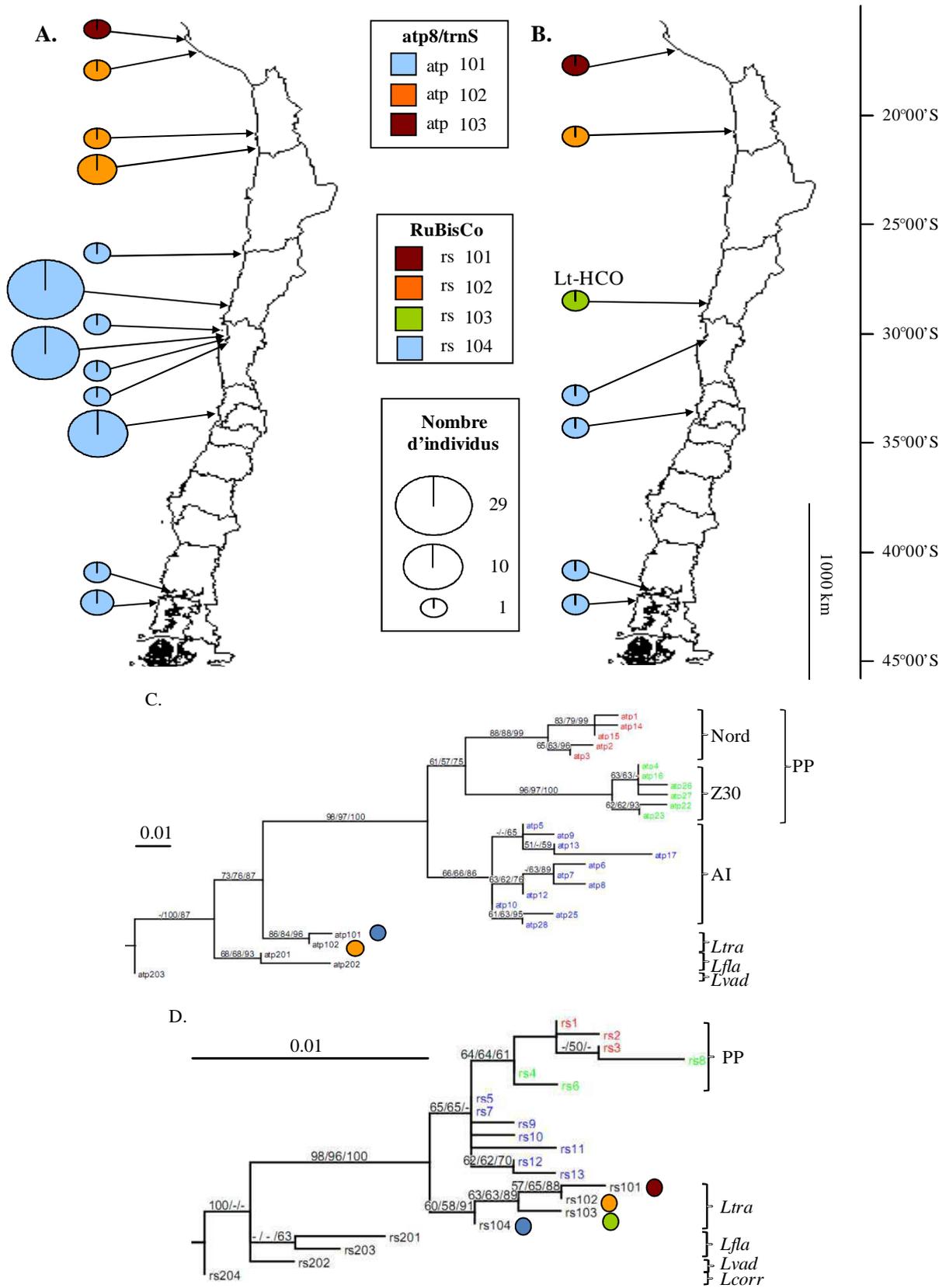


Figure 1.10 : Distribution géographique des haplotypes de *L. trabeculata* pour *atp8/trnS* (A) et *RuBisCo* (B). La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus. La localité Lt-HCO montrant un haplotype particulier pour RubisCo, est indiquée sur la figure B. Les arbres correspondants sont rappelés ici (C : *atp8/trnS* et D : *RuBisCo* spacer).

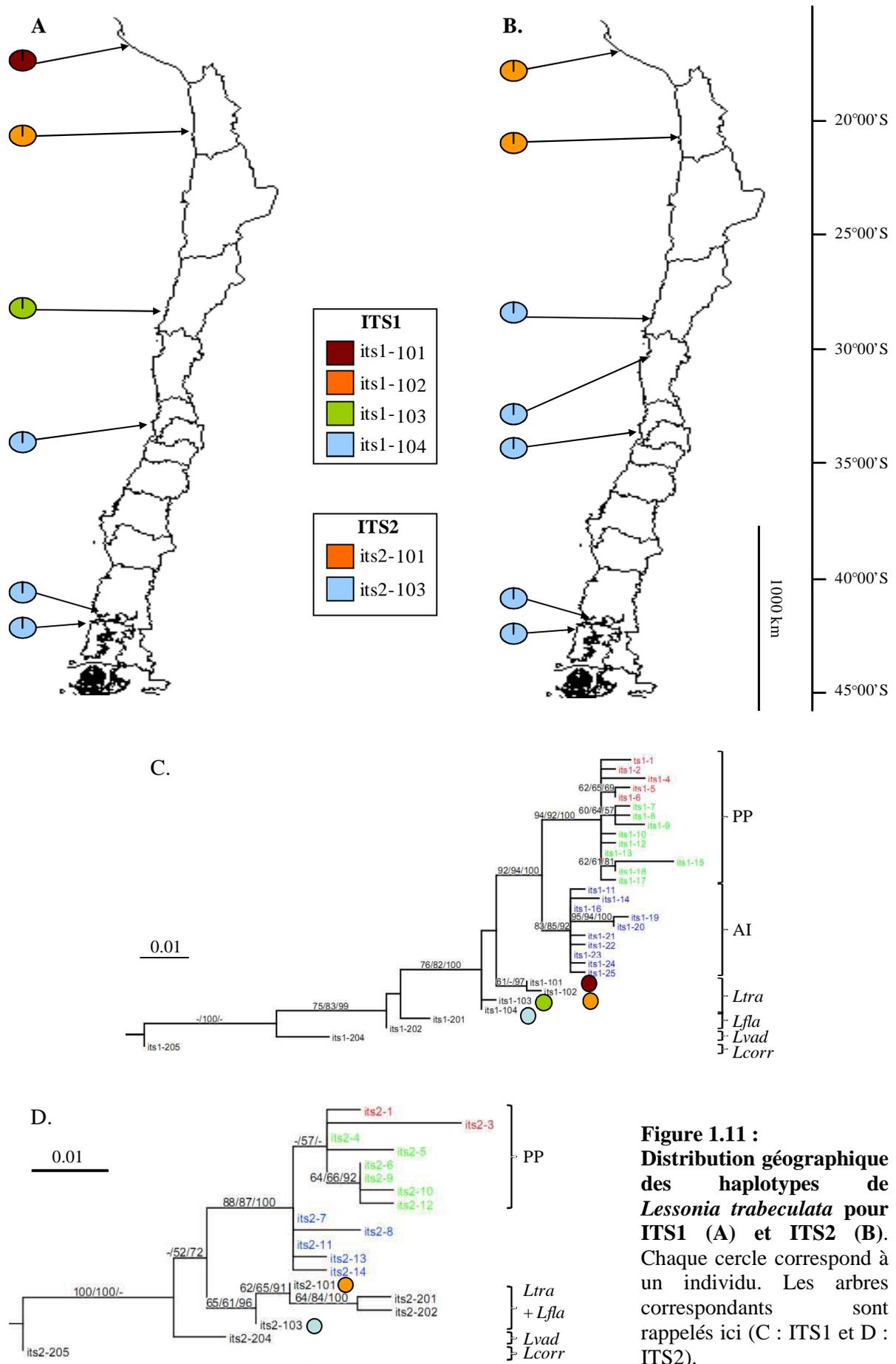


Figure 1.11 :
Distribution géographique
des haplotypes de
Lessonia trabeculata
pour ITS1 (A) et ITS2 (B).
 Chaque cercle correspond à
 un individu. Les arbres
 correspondants sont
 rappelés ici (C : ITS1 et D :
 ITS2).

marqueurs RuBisCo spacer et ITS1 séparant LtHCO des autres localités, nécessiterait d'être confirmée par un échantillonnage plus important (Fig. 1.10 et 1.11).

Il est intéressant de remarquer que l'importance de la différenciation entre les groupes nord et sud dépend des marqueurs (si on exclue la localité LtHCO) : une mutation les séparent pour *atp8/trnS* et ITS2, tandis qu'il y a deux à trois mutations (en fonction des haplotypes) pour RuBiCo spacer, et trois à quatre pour ITS1. Ce faible nombre de mutations contraste par rapport aux forts taux de mutation de ces marqueurs très polymorphes chez *L. nigrescens* (*atp8/trnS* et ITS1).

Les trois populations pour lesquelles un nombre important d'individus (entre 10 et 29 individus) a été analysé montrent la présence d'un unique haplotype pour *atp8/trnS*, donc une diversité intra-population nulle (Fig. 1.10).

D. Discussion : histoire évolutive des espèces et origine de la zone de transition

1. Histoire évolutive de *L. nigrescens* : importance du processus de spéciation

L'étude de phylogéographie de *L. nigrescens* a révélé la présence de deux lignées divergentes au sein de cette espèce morphologique, ces lignées étant présentes de part et d'autre de la zone de transition biogéographique 30°S. A l'aide d'un échantillonnage couvrant une partie importante de l'aire de distribution de l'espèce, l'utilisation de marqueurs provenant des trois compartiments génomiques a montré que cette zone de transition biogéographique correspondait à une discontinuité génétique marquée. Des différences importantes entre marqueurs ont cependant été observées, concernant l'intensité de la divergence génétique. Les marqueurs sont également discordants sur la présence d'une seconde discontinuité génétique à 27°S. Les scénarios qui peuvent être à l'origine de ces patrons phylogéographiques sont discutés ci-dessous.

a) Une discontinuité génétique à 30°S

Tous les marqueurs ont montré la présence d'une discontinuité génétique au sein de *L. nigrescens*, différenciant la Province Péruvienne (PP) de l'Aire Intermédiaire (AI). Cette concordance entre marqueurs, bien qu'il y ait des différences de topologies, suggère fortement que la cause principale de la divergence entre lignées est due à un facteur externe. Il est ainsi possible d'écarter l'hypothèse de la dérive (origine stochastique) et de la sélection sur une région particulière du génome comme mécanisme responsable de la discontinuité génétique observée entre ces deux régions biogéographiques.

Pour tous les marqueurs, des valeurs importantes de bootstrap et de probabilités *a posteriori* ont été observées. Une monophylie réciproque a été constatée pour les deux marqueurs ayant les taux d'évolution les plus importants (atp8/trnS et ITS1). Ceci contraste avec les marqueurs à taux de mutation faible (ITS2 et RuBisCo spacer) qui montraient une topologie où la lignée monophylétique PP est emboîtée dans la lignée AI. L'information complémentaire apportée par les réseaux d'haplotypes indique que l'absence de monophylie réciproque est certainement liée à la rétention d'allèles ancestraux dans la lignée AI pour ces deux marqueurs. La lignée PP monophylétique emboîtée peut être une étape intermédiaire, avant une monophylie réciproque (Omland *et al.*, 2006 ; Avise, 2000). Ce type de patron peut avoir lieu lorsque la dérive génétique élimine progressivement les allèles ancestraux de certaines populations plus rapidement que dans d'autres populations, du fait d'une plus faible taille efficace ou de fluctuations démographiques. Dans le cas de *L. nigrescens*, la différence de topologie des arbres peut cependant être interprétée comme la conséquence des différences de taux de mutation entre marqueurs. En effet, les données de la littérature suggèrent que le marqueur ITS1 a un taux de mutation plus élevé que ITS2 (ex : pour *Macrocystis* sp. : Coyer *et al.*, 2001). Le RuBisCo spacer est généralement considéré comme étant plus conservé que les ITS, chez les Phaeophyceae (Yoon et Boo, 1999 ; Harvey et Goff, 2006). La comparaison du polymorphisme entre neuf espèces de Laminariales et trois espèces de Fucales a également montré que RuBisCo spacer était plus conservé que atp8/trnS (Engel *et al.*, 2008).

b) Datation de la divergence entre les lignées de *L. nigrescens* et scénarios possibles

Pour les deux marqueurs montrant une monophylie réciproque, la distance entre lignées est du même ordre de grandeur que les distances entre les autres espèces de *Lessonia* incluses dans cette étude. Ainsi, pour ITS1, nous avons observé une divergence entre les

lignées PP et AI aussi importante que celle entre les espèces *L. vadosa* et *L. corrugata*, espèces présentes l'une à l'est, l'autre à l'ouest de l'océan Pacifique sud. Plus généralement, la divergence pour ITS1 entre les lignées PP et AI est du même ordre de grandeur que celle décrite entre espèces de Laminariales phylogénétiquement proches, comme entre les espèces européennes *Laminaria digitata* et *Laminaria hyperborea* (3,1% de divergence pour ITS1 et ITS2, Erting *et al.*, 2004) ou entre les espèces japonaises de *Laminaria* (3,4 à 4,2% pour ITS1, Yotsukura *et al.*, 1999). De plus, nous n'avons observé ni introgression entre les lignées AI et PP ni présence des deux lignées au sein d'une même localité, quelque soit le nombre d'individus analysés par localité. Le clonage de la région ITS a montré que les multiples copies détectées au sein d'un même individu proviennent toujours d'une seule lignée. L'absence de flux de gènes entre lignées suggère fortement la présence de deux espèces cryptiques avec une date de divergence ancienne.

Notre capacité à estimer le temps depuis la séparation des deux lignées de *L. nigrescens* est limitée par l'absence de registres fossiles de cette espèce et par l'absence d'évènements géologiques ou paléontologiques marquants dans cette région. L'estimation indirecte de l'horloge moléculaire pour le RuBisCo spacer suggère que la divergence a eu lieu entre 0,250 et 1,698 millions d'années (Ma). Malgré le manque de précision de notre datation, nous pouvons conclure que la divergence entre les lignées est ancienne et proche de la divergence avec l'espèce-sœur *L. trabeculata*. La divergence entre lignées a certainement eu lieu bien avant le dernier maximum glaciaire, considéré comme le facteur historique ayant façonné les patrons phylogéographiques de nombreuses espèces marines (Avisé, 2000 ; Dawson, 2005 ; Maggs *et al.*, 2008). La plupart des zones de transition biogéographiques côtières étudiées dans le monde correspondent de plus à des barrières historiques ou contemporaines à la dispersion et ces barrières ont été considérées comme la cause principale des discontinuités génétiques révélées par les études de phylogéographie. Dans le cas de la zone de transition du Pacifique sud-est située entre 30°S et 33°S, l'hypothèse de vicariance est au contraire difficilement soutenue, du fait de l'absence de preuves géologiques ou paléontologiques qui auraient pu séparer PP et AI à proximité de ces latitudes (Camus, 2001).

Une hypothèse alternative peut être proposée pour expliquer le patron observé d'une lignée PP emboîtée dans un groupe ancestral d'allèles AI. Cette topologie pourrait correspondre à une expansion d'aire soudaine depuis un groupe réduit d'allèles. Dans ce cas, la forte différenciation génétique entre les populations sources au sud et les régions nouvellement colonisées au nord pourrait être la conséquence d'une forte dérive génétique, associée non seulement aux effets de fondation mais également à l'expansion d'aire (gene

surfing ; Excoffier et Ray, 2008). Cette hypothèse est corroborée par le fait que le genre *Lessonia* est considéré comme un taxon d'origine subantarctique d'après ses caractéristiques écologiques et physiologiques (Santelices et Meneses, 2000), caractéristiques s'appliquant à l'ensemble de ces grandes algues brunes (appelées kelps) qui peuplent les régions d'eaux froides à tempérées mais qui sont presque inexistantes dans les régions tropicales (Steneck *et al.*, 2002). Les analyses de « match-mismatch » effectuées pour le marqueur *atp8/trnS* au sein de chacun des clades appuient également l'hypothèse d'une expansion spatiale du clade Nord, probablement lié à la colonisation vers le nord.

Si on accepte cette hypothèse d'origine plus récente de la lignée PP, deux scénarios peuvent expliquer l'origine de la discontinuité génétique : (i) un changement des conditions environnementales et (ii) une adaptation aux conditions environnementales de la région nord. Des données de paléo-océanographie seraient nécessaires pour déterminer la date, la fréquence et l'importance des changements climatiques ayant eu lieu le long des côtes chiliennes entre 0,250 et 1,698 Ma avant notre ère. Les régimes de résurgence apportant les eaux froides et riches en nutriments vers les côtes semblent avoir été globalement persistants depuis l'instauration du Système du Courant de Humboldt (HSC, Thiel *et al.*, 2007). Ces eaux froides favorisant la présence des populations de kelps, l'instauration du HSC pourrait avoir favorisé l'expansion d'aire d'espèces d'eaux tempérées froides vers le nord. Les datations concernant l'instauration de ce système océanographique complexe sont cependant fortement divergentes en fonction des auteurs, entre 1,6Ma et 35Ma (voir pour revue Camus, 2001), et cette période n'est que peu chevauchante avec les dates estimées pour la divergence entre lignées de *L. nigrescens*.

D'un autre côté, une adaptation à des conditions environnementales particulières au nord de la latitude 30°S est un scénario qui nécessite la présence de forts facteurs de sélection qui auraient affectés l'ensemble du génome. La sélection est généralement considérée comme trop faible dans les populations marginales pour conduire à une adaptation locale face aux forts effets de la dérive génétique et du fardeau d'immigration depuis les populations centrales (Bridle et Vines, 2007). Cependant, l'hypothèse d'une mutation bénéfique ne peut pas être éliminée, en particulier si cette mutation est associée à de forts effets de fondation lors de la colonisation du nord.

Quelles que soient les circonstances spécifiques qui ont provoqué l'extension d'aire vers le nord, ce scénario est un cas intéressant d'une probable spéciation par bourgeonnement (ou péripatrique), menant à une lignée PP généalogiquement emboîtée dans une lignée AI

pour les marqueurs à faible taux d'évolution. Les exemples concernent généralement des cas de spéciation suite à la colonisation d'îles depuis le continent (ex : îles de Macaronésie pour une espèce de plante : Vanderpoorten et Long, 2006) ou depuis d'autres îles (ex : espèce de Lépidoptère dans les îles Galápagos : Schmitz *et al.*, 2006) ou le cas d'une espèce phytophage généraliste donnant naissance par « bourgeonnement » à une espèce d'insecte spécialiste (Morse et Farrell, 2005). A notre connaissance, ce type de processus n'avait jamais été décrit en environnement côtier marin.

c) Discordance entre marqueurs : une seconde discontinuité génétique à 27°S ?

En plus de la discontinuité phylogénétique majeure observée pour tous les marqueurs, *atp8/trnS* montre une seconde discontinuité génétique autour de 27°S de latitude, avec une division de la lignée PP en un clade Z30 et un clade Nord, tous les deux très fortement soutenus. Ces deux clades divergent par un polymorphisme à la fois d'indel et de substitution. De plus, la divergence entre ces deux clades est du même ordre de grandeur que la divergence entre AI et chacun de ces clades PP, suggérant également une origine ancienne de cette discontinuité. La distribution géographique des deux clades est disjointe, avec une discontinuité abrupte entre 27°12'S et 27°41'S, mais aucune zone de transition biogéographique ou écologique n'a été reportée à cette latitude (Camus, 2001 ; Thiel *et al.*, 2007).

La discordance entre ce marqueur mitochondrial et les marqueurs des autres compartiments génomiques suggère que cette seconde discontinuité génétique pourrait être expliquée par l'effet de la sélection ayant affecté uniquement le génome mitochondrial. Ballard et Rand (2005) et Bazin *et al.* (2006) ont discuté de l'importance de la sélection sur l'évolution de ce génome, en particulier du fait du rôle de la mitochondrie dans des fonctions physiologiques importantes, telles que la respiration cellulaire. Par auto-stop, la région intergénique *atp8/trnS* pourrait avoir été affectée par la sélection et la discontinuité à 27°S pourrait refléter une adaptation spécifique à un environnement plus fortement influencé par les événements ENSO ou à une température de surface de l'eau plus élevée (Castilla et Camus, 1992 ; Camus, 2001). Pour tester ce point spécifique, il serait nécessaire de réaliser des études de physiologie dans les différents environnements et de tester le rôle du génome mitochondrial dans des adaptations potentielles à un environnement spécifique.

Une hypothèse alternative est que la discontinuité phylogéographique à 27°S est d'origine stochastique, c'est-à-dire déterminée par la dérive génétique : les marqueurs

mitochondriaux, en particulier pour les espèces à faible capacité de dispersion, sont plus susceptibles de montrer des discontinuités phylogéographiques « par hasard » que les marqueurs nucléaires en l'absence de barrières à la dispersion (Irwin, 2002 ; Kuo et Avise, 2005). L'absence d'allèles partagés entre les clades Nord et Z30 pour *atp8/trnS* mais aussi pour les trois autres marqueurs et le nombre important d'individus analysés dans cette région suggèrent une absence de flux de gènes entre populations situées de part et d'autre de 27°S.

d) Des flux de gènes limités à l'intérieur des lignées et une structure singulière dans la zone de transition

Au sein de chaque clade mitochondrial, l'analyse populationnelle confirme la très faible capacité de dispersion de ce complexe d'espèces, déjà reportée par Faugeron *et al*, (2005). Dans la Région de transition, dominée par des individus de la lignée PP, nous avons observé une distribution en « taches » de plusieurs populations, exclusivement constituées d'individus de la lignée AI. De rares événements de dispersion à longue distance depuis les populations AI plus au sud pourraient expliquer cette structure en taches. De plus, ce patron est cohérent avec la présence des courants généralement orientés vers le nord. Il est cependant difficile de distinguer ce scénario d'un scénario de modification des aires de distribution qui aurait pu avoir lieu par le passé. Quoiqu'il en soit, il est néanmoins remarquable d'observer que, probablement à cause d'une capacité de dispersion limitée, les deux lignées n'ont pas étendu leur aire de distribution au-delà de cette Région de transition (29°03'S-30°14'S).

Cette très faible dispersion associée à l'absence de flux génique peut avoir contribué au maintien de la signature génétique pendant une longue période de temps (Irwin, 2002). En effet, aucun génotype multilocus mixte (contenant des allèles des deux lignées AI et PP) n'a été observé, malgré un échantillonnage important dans la Région de transition. De plus, et de façon concordante avec le patron général de monomorphisme intra-population, chaque population échantillonnée dans la Région de transition est fixée soit pour des allèles PP, soit pour des allèles AI. Cette Région de transition ne correspond donc pas à une zone de transition avec un remplacement graduel d'une lignée par l'autre, mais plutôt à une zone de parapatrie, avec une aire de chevauchement entre deux espèces. L'importance du processus de spéciation observé chez *L. nigrescens* et les mécanismes contribuant au maintien de l'intégrité des lignées feront l'objet du second chapitre. Nous nous focaliserons en particulier sur cette Région de transition, où les deux lignées sont présentes dans des sites séparés par des distances géographiques insuffisantes pour empêcher toute dispersion.

2. Une histoire différente pour *L. trabeculata*

Les données obtenues pour *L. trabeculata* suggèrent une histoire différente de celle de *L. nigrescens*. Le nombre d'individus analysés par marqueur est limité (six à 68 individus en fonction du marqueur, Tableau 1.2), du fait de difficultés rencontrées lors de l'extraction d'ADN. Néanmoins, nous pouvons remarquer certaines différences entre les deux espèces de *Lessonia* étudiées. Notre échantillonnage nous permet tout d'abord de confirmer que l'aire de distribution de *L. trabeculata* s'étend au moins entre 14°03'S et 41°48'S. La présence de l'espèce au nord de 23°S avait été préalablement suggérée par Villouta et Santelices (1986).

La majorité des marqueurs utilisés montrent que *L. nigrescens* et *L. trabeculata* sont des espèces-sœurs, proches phylogénétiquement. La discordance observée pour ITS2, avec un clade formé des haplotypes de *L. trabeculata* et *L. flavicans*, pourrait être due à de l'homoplasie ou à de la rétention de polymorphisme ancestral, ce marqueur montrant un faible taux de mutation. La proximité phylogénétique entre *L. nigrescens* et *L. trabeculata*, également montrée par Lane *et al.*, (2006), suggère que la divergence entre les deux espèces a eu lieu dans la région AI, au nord de 42°S (*L. trabeculata* n'étant pas présente plus au sud) et serait associée à une adaptation à l'habitat intertidal pour *L. nigrescens*. L'absence d'haplotype partagé entre *L. nigrescens* et *L. trabeculata*, y compris pour les localités où elles sont en sympatrie et pour les marqueurs de faible taux de mutation, suggère que l'isolement reproducteur entre ces taxa est complet et ancien.

La distribution de la diversité génétique entre marqueurs chez *L. trabeculata* est clairement différente de celle de *L. nigrescens*. Les marqueurs considérés comme ayant des taux de mutation élevés (atp8/trnS et ITS1) montrent un faible polymorphisme, alors que le RuBisCo spacer montre la plus forte variabilité avec quatre haplotypes détectés sur un échantillonnage de sept individus (à comparer avec 13 haplotypes pour 127 individus pour *L. nigrescens*). De plus, les haplotypes centraux du sud (rs104) et du nord (rs102) sont séparés par deux mutations, soit une distance égale à celle entre les haplotypes centraux (ancestraux) de *L. nigrescens* (rs7) et *L. trabeculata* (rs104).

De façon similaire au patron observé pour *L. nigrescens*, les populations de *L. trabeculata* étudiées au niveau intra-populationnel (trois localités, 10 à 29 individus par localité) pour le marqueur atp8/trnS montrent un polymorphisme nul. Cependant, tandis que les haplotypes de *L. nigrescens* se caractérisent par une faible étendue géographique (< 150km en général, une exception de 350km), les haplotypes de *L. trabeculata* sont présents

sur de très grandes étendues côtières : 430km pour l'haplotype atp102 au nord et 2050km pour l'haplotype atp101 au sud.

En conclusion, chez *L. trabeculata*, il semble qu'il n'y ait pas de discontinuité génétique marquée correspondant à la zone de transition biogéographique 30°S, mais qu'une différenciation existe entre des individus situés au nord de 21°S et ceux au sud de 26°S. Cette discontinuité génétique correspondrait plutôt à la discontinuité observée pour le marqueur atp8/trnS chez *L. nigrescens* (discontinuité à 27°S) qu'à la zone de transition biogéographique décrite entre 30°S et 33°S. Un échantillonnage plus important est cependant absolument nécessaire afin d'inférer correctement l'histoire de cette espèce. Les différences de traits d'histoire de vie entre les deux espèces et leurs conséquences possibles sur la distribution de la diversité génétique seront discutées dans la partie suivante.

3. Comparaison entre espèces : histoire de la zone de transition et importance des traits d'histoire de vie

Notre étude de la phylogéographie de deux espèces de Laminariales, *Lessonia nigrescens* et *Lessonia trabeculata*, a mis en évidence deux histoires contrastées, bien que ces espèces soient phylogénétiquement proches et aient des traits d'histoire de vie relativement similaires. Nous discuterons tout d'abord les facteurs qui peuvent être à l'origine de la différence observée entre ces espèces, puis nous comparerons nos données avec celles d'autres espèces présentes dans la région d'étude, afin d'inférer plus précisément l'histoire de la zone de transition biogéographique 30°S. Cette comparaison entre espèces nous permettra de tester les hypothèses de phylogéographie présentées en introduction de ce chapitre, à savoir la corrélation entre capacité de dispersion et structure phylogéographique et la concordance géographique des discontinuités phylogénétiques entre taxa d'une part, et avec la zone de transition biogéographique d'autre part. Nous terminerons en présentant les mécanismes pouvant contribuer au maintien de cette zone de transition biogéographique.

- a) *L. nigrescens* et *L. trabeculata* : des histoires différentes sur une même aire de distribution

Le patron de structure génétique contrasté entre les deux espèces-sœurs *L. nigrescens* et *L. trabeculata* pourrait être la conséquence de deux types de différences : (i) des différences

intrinsèques entre espèces (capacité de dispersion, habitat, taux de mutation) et/ou (ii) des différences dans l'histoire des espèces (expansion récente vs. ancienne, différence de perception des barrières passées à la dispersion).

Tout d'abord, la présence plus fréquente d'individus de *L. trabeculata* échoués sur les plages suggère que *L. trabeculata* présenterait une capacité de dispersion à plus grande distance que *L. nigrescens*. Une étude de génétique des populations à l'aide de marqueurs plus variables (type microsatellites) permettrait de tester spécifiquement cette hypothèse. Nos résultats concordent également avec l'hypothèse que la structure génétique attendue est plus faible dans l'étage subtidal que dans l'étage intertidal, du fait des conditions plus homogènes en subtidal (Marko, 2004). La ségrégation par la hauteur sur l'estran reste cependant relative entre les deux espèces de *Lessonia* ; il n'est pas rare d'observer des individus de *L. nigrescens* en subtidal, jusqu'à 5 m de profondeur, et des individus de *L. trabeculata* en intertidal, généralement dans des flaques restant sous l'eau à marée basse (C. Olivares, com. pers. et obs. pers.).

Ensuite, la plus grande variabilité génétique observée pour *L. nigrescens* pourrait être liée à des différences de taux de mutation efficace. L'ensemble des arbres phylogénétiques montrent en effet des différences de longueur de branches entre les trois taxa identifiés : les branches des haplotypes de la lignée PP sont en moyenne plus longues que celles de la lignée AI, elles mêmes plus longues que celles de *L. trabeculata*. Baer *et al.* (2007) recensent quatre hypothèses pour expliquer les différences de taux de mutation efficace entre espèces : (i) l'hypothèse du système de réparation de l'ADN : l'accumulation de mutations dépend de l'efficacité du système de réparation des dommages de l'ADN ; (ii) l'hypothèse de différences de taux métabolique : un taux métabolique important entraîne une plus forte production de radicaux libres, entraînant des dommages à l'ADN et un taux de mutation plus important ; (iii) l'hypothèse du temps de génération : à taux de mutation égal, plus le temps de génération est court, plus les espèces ont la possibilité d'accumuler des mutations au cours d'une période de temps donnée ; et (iv) la sélection variable. Cette dernière hypothèse est liée à la théorie quasi-neutraliste de l'évolution : la plupart des mutations ont des effets faiblement délétères, de telle façon que leur évolution est inversement liée à la taille efficace des populations et que la dérive prédomine sur la sélection purifiante. A taux de mutation égal, les petites populations sont donc susceptibles de montrer un taux de mutation *efficace* (mutations accumulées) plus important que les grandes populations. Il est souvent difficile de différencier ces quatre hypothèses pour expliquer une différence de taux de mutations entre espèces, mais elles peuvent être discutées en fonction des connaissances sur la biologie des deux espèces de

Lessonia. La croissance des frondes est plus rapide chez *L. trabeculata* que chez *L. nigrescens*, mais s'accompagne d'une forte érosion distale, entraînant une croissance nette proche de zéro chez cette espèce (Tala et Edding, 2005 ; Vásquez *et al.*, 2008). L'hypothèse d'un taux métabolique plus important pour expliquer un taux de mutation plus élevé chez *L. nigrescens* est donc difficilement soutenue par ces données. Concernant le temps de génération, la taille à première maturité est difficile à évaluer chez *L. trabeculata* du fait de la croissance quasiment nulle des adultes, et l'âge à maturité n'a pas été estimé (Vásquez *et al.*, 2008). Les études chez *L. nigrescens* montrent cependant que les caractéristiques de taille et âge à maturité dépendent fortement des conditions locales (latitude, exposition aux vagues) et de facteurs anthropiques (pression de récolte), ce qui complique la comparaison entre espèces (Vásquez *et al.*, 2008). En revanche, la fragmentation plus importante des populations due à la restriction de l'habitat sur la bande étroite de l'estran pour *L. nigrescens* suggère que les tailles efficaces des populations sont effectivement plus faibles que pour *L. trabeculata* (Thiel *et al.*, 2007 ; S. Faugeron, com. pers.) et pourraient donc expliquer, en partie, la différence observée dans les taux de mutation efficace entre *L. trabeculata* et les lignées PP et AI de *L. nigrescens*.

Enfin, les patrons phylogéographiques contrastés entre *L. nigrescens* et *L. trabeculata* pourraient témoigner d'une histoire différente entre ces espèces. Premièrement, il est possible que la structure phylogéographique de *L. trabeculata* n'ait pas été affectée par les événements anciens relatifs à la zone de transition biogéographique 30°S si l'histoire de celle-ci est marquée par une expansion d'aire récente, probablement associée à une colonisation depuis le sud vers le nord. Deuxièmement, il est également possible que les deux espèces diffèrent quant à leur perception de barrières passées aux flux géniques suite à des différences physiologiques, ce qui rendrait compte de la dissemblance entre leur patron phylogéographique. Par exemple, diverses publications montrent que : (i) la tolérance aux hautes températures est plus faible pour *L. nigrescens* que pour *L. trabeculata* (survie des gamétophytes et des sporophytes en laboratoire : Peters et Breeman, 1993), mortalité de sporophytes en populations naturelles suite aux événements El Niño (Vega *et al.*, 2005 ; Martínez *et al.*, 2003 ; Fernandez *et al.*, 1999), et que (ii) la tolérance aux radiations UV est également plus faible chez *L. trabeculata* que *L. nigrescens* (expérience effectuée sur les stades microscopiques ; Tala *et al.*, 2007). Dans le paragraphe suivant, la comparaison avec d'autres études de phylogéographie effectuées dans la même région géographique va permettre de discuter comment les traits d'histoire de vie façonnent la réponse des espèces à un même événement historique.

- b) Comparaison entre espèces à traits d'histoire de vie contrastés : mécanismes à l'origine de la zone de transition 30°S et contribuant à son maintien

Les caractéristiques des différentes études de phylogéographie et de génétique des populations qui ont été réalisées sur des espèces marines traversant la zone de transition biogéographique 30°S sont résumées dans le Tableau 1.6. Cette synthèse de la littérature incorpore des mémoires de thèse récents, ainsi que des éléments d'articles publiés ou en préparation. Seules les études où le nombre d'individus était supérieur à 1 individu par site et où la région comprise entre 29°S et 31°S était étudiée ont été retenues.

Une absence de discontinuité génétique associée à la zone de transition biogéographique 30°S (six espèces)

Des études de phylogéographie publiées ou en cours montrent une absence de discontinuité génétique au niveau de la zone de transition biogéographique 30°S pour une variété de taxa, incluant des algues, des invertébrés marins et une espèce de poisson. La seule étude publiée dans la région d'étude concerne le gastéropode benthique *Concholepas concholepas* (Cárdenas *et al.*, 2009). Cette espèce d'origine péruvienne est caractérisée par une capacité de dispersion larvaire à grande distance (durée de vie larvaire supérieure à trois mois). Sa présence dans les registres fossiles au sud de 30°S de latitude a pu être datée de la première moitié du Pléistocène. L'étude phylogénétique a montré l'absence de discontinuité génétique dans l'ensemble de l'aire de distribution de l'espèce (11°S-49°S), incluant les deux zones de transition biogéographiques décrites au Chili (30°S et 42°S). Les auteurs suggèrent qu'une expansion démographique à partir d'un unique haplotype a probablement effacé la signature de structure génétique préexistante. Cette expansion démographique chez *C. concholepas* a été estimée à environ 400000 ans avant notre ère, en se basant sur la distribution « match-mismatch » pour le marqueur mitochondrial COI. Cette date d'expansion correspond à la période interglaciaire la plus longue et la plus chaude du Pléistocène, période favorable pour cette espèce originaire d'eaux plus chaudes (Ortlieb *et al.*, 2003).

Un patron similaire, avec une expansion démographique datée à 250000 ans, a été observé pour la galathée *Pleuroncodes monodon*, espèce se caractérisant par une capacité de dispersion importante, avec tout ou partie du cycle de vie pélagique (P. Haye, com. pers.). Le poisson benthique *Trachurus murphyi* montre également une absence de structure phylogéographique sur l'ensemble de son aire de distribution, incluant la Nouvelle Zélande (Cardenas *et al.*, soumis). Un signal d'expansion démographique a également été observé

Tableau 1.6 : Comparaison des patrons de structuration génétique d'espèces marines traversant la zone de transition biogéographique située autour de 30°S. Seules les études incluant des sites situés de part et d'autre des latitudes 29°S-32°S et présentant des données populationnelles sont indiquées. Pour chaque espèce, sont indiqués les principaux traits d'histoire de vie, les caractéristiques de l'étude génétique et ses principaux résultats, ainsi que les auteurs de travaux. *aire* : aire de distribution connue, *habitat* : type d'habitat (pélagique, rocheux ou sableux) et position sur l'estran pour les espèces sessiles, *dispersion (durée)* : indique la phase de dispersion et sa durée de vie, *étude génétique* : indique les caractéristiques des études génétiques réalisées : étendue de l'aire d'étude (*région*), le nombre d'individus et de sites (*Nind* et *Nsites*), le type de marqueur (*marqueur* : mitochondrial (mt), nucléaire (nu ; msat : microsattellites), la concordance d'une discontinuité phylogéographique avec la zone de transition biogéographique 30°S (*disc. phylo. 30°S*), sa localisation géographique (*localisation*) et le type de zone de transition (*type disc. phylo.* : lignées à distribution chevauchantes ou non), ainsi que la présence d'un signal d'expansion démographique récent (*exp. démo.*). Les datations pour les événements de divergence et d'expansion démographique sont indiquées dans le texte. ND : donnée non disponible.

Espèce (nom vernaculaire)	Classification	Traits d'histoire de vie					Etude génétique					Auteurs
		<i>Aire</i>	<i>Habitat</i>	<i>Dispersion (durée)</i>	<i>Région</i>	<i>Nind</i> (<i>Nsites</i>)	<i>Marqueurs</i>	<i>Disc. phylo. 30°S</i>	<i>Localisation</i>	<i>Type disc. phylo.</i>	Exp. demo.	
Espèces sans discontinuité phylogéographique à 30°S												
<i>Concholepas concholepas</i> (loco)	Mollusque, Gastéropode	6°S – 56°S	rocheux, intertidal et subtidal	larve planctonique (>3 mois)	11°S– 49°S	337 ind (14 sites)	COI (mt)	non	-	-	oui	L. Cárdenas, J.C. Castilla, F. Viard (2009)
<i>Pleuroncodes monodon</i> (galathée rouge)	Crustacé, Décapode	6°S – 42°S	forme benthopélagique et forme benthique	variable selon la forme mais importante	6°30'S– 36°60'S	44 ind (9 sites)	COI (mt)	non	-	-	oui	P.A. Haye, P. Salina, E. Acuña, E. Poulin
<i>Cancer setosus</i> (crabe soyeux)	Crustacé, Décapode	18°S – 46°S	sableux et rocheux, subtidal	larve planctonique (60 j)	20°00'S- 41°50'S	359 ind (6 sites)	allozymes et AFLP	non	-	-		D. Gomez- Uchida, <i>et al.</i> (2003)
<i>Jehlius cirratus</i> (balane)	Crustacé, Maxillipode	ND	rocheux, intertidal haut	larve planctonique (13- 31j)	28°23'S– 34°24'S	159 ind (6 sites)	COI (mt)	non	-	-		C. Zakas, J. Binford, S.A. Navarrete, J.P. Wares
<i>Macrocystis sp.</i> (huïro)	Phaeophycée, Laminariale	Pacifique Nouvelle Zélande	Est, rocheux, subtidal	spores à faibles distance, individus adultes dérivants sur longues distances (radeaux)	18-56°S	ND	atp8/trnS (mt), ITS (nu)	non	-	-		E. Macaya, J. Plana, S. Faugeron, J. Zuccarello
<i>Trachurus murphyi</i> (jurel, chinchard)	Perciformes, Carangidae, (poisson)	Chili, Nouvelle Zélande, Tasmanie	pélagique	pélagique et migratoire (cycle de vie complet)	20°07'S- 39°37'S	173 ind (3 sites)	région contrôle (mt), msat (nu)	non	-	-	oui	L. Cárdenas, A.X. Silva, A. Magoulas, J. Cabeza, E. Poulin, P. Ojeda (soumis)

Tableau 1.6 (suite) : Comparaison des patrons de structuration génétique d'espèces marines traversant la zone de transition biogéographique 30°S.

Espèce (nom vernaculaire)	Classification	Traits d'histoire de vie			Etude génétique							
		Aire	Habitat	Dispersion (durée)	Région	Nind (Nsites)	Marqueurs	Disc. phylo. 30°S	Locali- sation	Ttype disc. phylo.	Exp. demo.	Auteurs
Espèces montrant une discontinuité phylogéographique marquée entre 30°S et 33°S												
<i>Notochthamalus scabrosus</i> (balane)	Crustacé, Maxillipode	ND	rocheux, intertidal moyen	larve planctonique (20-37 j)	28°23'S– 34°24'S	190 ind (9 sites)	COI (mt) EF1 (nu)	oui	30-31°S	discontinuité des fréquences alléliques		C. Zakas, J. Binford, S.A. Navarrete, J.P. Wares
<i>Mesodesma donacium</i> (macha, couteau)	Mollusque, Bivalve	5°S – 42°S	sableux, intertidal et subtidal	larve planctonique (26-28j)	18°18'S– 42°38'S	60 ind (12 sites)	COI (mt)	oui	32°21'S- 33°57'S	distributions chevauchantes avec sympatrie	oui, pour chaque lignée	G. Peralta, J.C. Castilla, E. Poulin
<i>Crepidatela dilatata</i> (crépidule)	Mollusque, Gastéropode	20°S – 43°S	rocheux, intertidal et subtidal	absente : développement direct et fécondation interne	28°29'S– 33°23'S	253 ind (10 sites)	COI (mt)	oui	29°28'S- 29°58'S	distributions peu chevauchantes, parapatric		A. Brante, M. Fernández, F. Viard
<i>Excrolana hirsuticauda</i> (puce de mer)	Crustacé, Isopode	23°S – 41°S	sableux, intertidal	absente : développement direct et fécondation interne	ND	ND	COI (mt)	oui	entre 30°S et 32°S	allopatric	oui, pour chaque lignée	A. Varela P.A Haye
Espèces montrant une structuration phylogéographique intermédiaire												
<i>Lontra felina</i> (chungungo, loutre marine)	Mammifère, Carnivore	6°S – 56°S	rocheux, grottes marines	femelles phylopatric	13°00'S – 42°00'S	162 ind	3 marqueurs mt	oui, parmi d'autres	30°14'S parmi d'autres	allopatric	non	J. Vianna, G. Medina-Vogel, P. Ayerdi, H. Zeballos, M. Apaza, S. Faugeron
<i>Codium sp.</i>	Chlorophycée Bryopsidale	25-38°S	rocheux, intertidal bas à subtidal	faible	25° 00'S– 38°00'S	112 ind 10 sites	marqueur mt	légère	graduel	cline de fréquences alléliques	non	A. González, M.T.K Arroyo M. Valero J. Correa B. Santelices

chez cette espèce, mais serait bien plus récent (postglaciaire, E. Poulin, com. pers.).

Une absence de discontinuité phylogéographique a été observée également pour un cirripède, *Jehlius cirratus* (Zakas *et al.*, soumis), tandis que des données génétiques (AFLP et allozymes) ont montré l'absence de discontinuité génétique au sein de l'aire de distribution du crabe *Cancer setosus* (Gomez-Uchida *et al.*, 2003).

Enfin, l'algue brune géante *Macrocystis pyrifera* montre aussi une absence de discontinuité phylogéographique autour de la zone de transition 30°S. Cette espèce est caractérisée par une très faible structure phylogéographique sur l'ensemble de son aire de distribution, incluant toute la côte chilienne (jusqu'au Cap Horn), la Nouvelle Zélande et l'Amérique du Nord (E. Macaya, com. pers.). Bien qu'il s'agisse d'une espèce de Laminariales, comme les espèces de *Lessonia*, sa capacité de dispersion est considérée comme remarquablement importante, du fait de la présence de structures de flottaison au niveau des frondes. La formation de radeaux flottants incluant des individus de *Macrocystis* matures et libérant des spores est commune le long des côtes chiliennes et permet à l'espèce de disperser sur l'ensemble du Pacifique entre les deux hémisphères (Macaya *et al.*, 2005 ; Thiel et Gutow, 2004). L'origine de cette espèce dans les eaux du Pacifique Sud a été datée entre 0,01Ma et 3Ma (Coyer *et al.*, 2001).

Toutes ces espèces qui montrent une absence de discontinuité génétique dans la zone de transition biogéographique 30°S sont caractérisées par une capacité de dispersion importante, en concordance avec l'hypothèse 2 de phylogéographie (Encadré 1.1). Il est intéressant de remarquer que pour ces mêmes espèces, lorsque leur aire de distribution s'étend au sud de 42°S de latitude, elles ne montrent pas non plus de discontinuité génétique associée à la zone de transition biogéographique 42°S (*C. concholepas*, *M. pyrifera*). Pourtant, cette zone de transition implique des événements historiques, liés aux glaciations et aux mouvements tectoniques du Quaternaire, et des barrières à la dispersion contemporaines, liées aux courants et à une différence marquée de l'habitat (salinité, exposition aux vagues).

Une forte discontinuité génétique séparant deux lignées (cinq espèces)

D'autres études de phylogéographie en cours montrent, en revanche, un patron similaire à celui de *L. nigrescens*, avec une forte divergence génétique associée à la zone de transition biogéographique 30°S. C'est le cas pour *Notochthamalus scabrosus* (cirripède, Zakas *et al.*, soumis), *Mesodesma donacium* (« macha », bivalve, Peralta, 2008), *Crepipatella dilatata* (gastéropode, A. Brante, com. pers.) et *Excirolana hirsuticauda* (isopode, P. Hayes, com. pers.). Dans ce groupe d'espèces, les traits d'histoire de vie sont contrastés : espèces

intertidales et subtidales, espèces d'habitat rocheux et des plages de sable, espèces à développement direct (absence de phase larvaire pélagique) ou avec une phase larvaire allant jusqu'à cinq semaines (Tableau 1.6). La présence d'une discontinuité phylogéographique correspondant à la zone de transition biogéographique 30°S n'est donc pas limitée aux espèces à faible capacité de dispersion.

Une datation de la divergence à 5,9Ma a été obtenue pour *M. donacium* en calibrant l'arbre phylogénétique à l'aide de registres fossiles (Peralta, 2008). Il est difficile de déterminer si cet événement est contemporain de la divergence des lignées chez *L. nigrescens* (divergence datée entre 0,250 et 1,698 Ma), étant donné la différence dans les méthodes de datation.

Bien que les différences d'échantillonnage limitent la précision des comparaisons entre espèces, on peut remarquer que la localisation de la discontinuité phylogéographique semble dépendre de la capacité de dispersion des espèces. Ainsi, la discontinuité semble être abrupte pour les espèces d'invertébrés à développement direct (*E. hisuticauda* : entre 30°S et 32°S, position exacte non connue ; *C. dilatata* : 31°S), avec une absence de mélange des clades. Les espèces d'invertébrés à phase larvaire pélagique au contraire montrent une région de chevauchement des clades (*M. donacium* : entre 32°21'S et 33°57'S, soit environ 200km de côtes) ou une discontinuité dans la fréquence des clades, chaque clade étant présent sur l'ensemble de la région d'étude (*N. scabrosus* : 28-34°S). Les discontinuités phylogéographiques sont donc concordantes à l'échelle régionale entre taxa et avec la zone de transition biogéographique à 30°S (hypothèses 3ii et 3iii de phylogéographie, Encadré 1.1).

Un signal d'expansion démographique des clades, postérieur à la divergence, a été observé non seulement chez *L. nigrescens*, mais également chez *M. donacium* et *E. hisuticauda* (Peralta, 2008 ; P. Hayes, com. pers.). L'absence de datation de cet événement ne nous permet cependant pas de préciser s'ils sont contemporains des expansions détectées chez les espèces ne montrant pas de discontinuité génétique : 400000 ans pour *C. concholepas* (Cárdenas *et al.*, 2009) et 250 000 ans pour *P. monodon* (E. Poulin, com. pers.).

Des cas intermédiaires (trois espèces) :

Trois espèces montrent des patrons phylogéographiques intermédiaires et ne peuvent pas être classées dans les deux groupes précédents : il s'agit de *L. trabeculata*, de l'algue verte *Codium sp.* et de la loutre marine *Lontra felina* (chungungo). Le cas de *L. trabeculata* a déjà été discuté et une analyse en utilisant des marqueurs plus polymorphes et sur un nombre plus important d'individus et de localités permettrait d'inférer plus précisément sur l'histoire de

l'espèce. Cependant, il est clair que cette espèce ne montre pas une discontinuité génétique marquée correspondant à la zone de transition biogéographique 30°S.

L'espèce *Codium sp* montre une structure phylogéographique peu prononcée, avec une variation clinale de fréquence des haplotypes entre 18°S et 40°S (Gonzalez *et al.*, en prep.). Ce patron est en accord avec le fait qu'aucune discontinuité biogéographique n'avait été détectée chez les algues vertes dans cette région (Meneses et Santelices, 2000).

Enfin, la loutre marine *Lontra felina* montre un patron phylogéographique également peu prononcé le long des côtes chiliennes, possiblement lié au fait que cette espèce est présente dans ces eaux depuis seulement 148000 à 262000 ans (Vianna *et al.*, en prep.). Une discontinuité de faible importance a été détectée à 30°S au niveau de la Punta Lengua de Vaca, mais cette discontinuité génétique est d'importance similaire à celle de six autres discontinuités observées entre 18°S et 40°S, et semblerait liée au comportement phylopatric des femelles (Vianna *et al.*, en prep.).

Inférer l'origine de la zone de transition biogéographique 30°S

De la même façon que pour comprendre l'histoire d'une espèce il est nécessaire d'utiliser différents marqueurs moléculaires indépendants, inférer l'histoire d'une région nécessite d'étudier l'histoire de taxa de traits d'histoire de vie variés. Les études de biogéographie déterminent la localisation des provinces biogéographiques sur la base des aires de distribution de taxa ayant des traits d'histoire de vie et des tolérances physiologiques variés en incluant généralement des taxa de groupes phylogénétiques divers. Les études de biogéographie réalisées le long des côtes chiliennes s'accordent à considérer la zone de transition biogéographique 42°S comme une discontinuité majeure, tandis qu'entre 18°S et 40°S les résultats diffèrent selon les groupes étudiés, allant de l'absence de discontinuité majeure (ex : algues vertes) à des discontinuités importantes localisées souvent entre 30°S (ex : algues brunes) et 33°S (ex : algues rouges) ou encore à des patrons intermédiaires, comme le remplacement graduel des espèces sans discontinuité marquée (ex : crustacés peracarides) (voir pour revue : Camus, 2001 et Thiel *et al.*, 2007). Ces discordances entre études ont amené Camus (2001) à définir l'Aire Intermédiaire (AI) comme une zone de transition entre la Province Péruvienne (PP) au nord et la Province de Magellan au sud, cette zone manquant de caractère biogéographique bien défini. Les résultats des études de phylogéographie montrent cependant une discontinuité phylogéographique majeure pour cinq taxa entre 30°S et 33°S de latitude renforçant ainsi l'hypothèse de la présence d'une zone de transition biogéographique à ces latitudes.

La zone de transition biogéographique 30°S est un exemple pour lequel la capacité de dispersion seule ne suffit pas à expliquer les patrons observés : bien que l'absence de discontinuité génétique soit observée uniquement chez des taxa ayant une grande capacité de dispersion, l'inverse n'est pas vrai (Tableau 1.6). Les traits d'histoire de vie comme l'habitat (rocheux ou sableux) et l'étage sur l'estran (intertidal ou subtidal) ne semblent pas non plus expliquer les différences observées entre taxa (Tableau 1.6). On a vu que d'autres hypothèses devaient être avancées, liées à l'histoire particulière de chacune des espèces.

L'observation de patrons phylogéographiques concordants entre espèces de traits d'histoire variés, comme c'est le cas ici, suggère la présence d'une barrière extrinsèque aux flux de gènes ayant persisté pendant une longue période de temps (hypothèse 3 de phylogéographie, Encadré 1.1). Cependant, la difficulté réside dans l'identification de cette barrière à la dispersion. Les études de paléo-océanographie des côtes chiliennes suggérant qu'une barrière physique totale dans le passé semble improbable, mais les données ne permettent pas de décrire avec précision l'histoire de la région depuis 2Ma et d'identifier des traits océanographiques qui auraient pu être assez marqués pour limiter fortement les flux de gènes entre deux régions (Camus, 2001). Il est certain que pendant le Quaternaire le niveau des mers a montré des fluctuations importantes liées aux périodes glaciaires et interglaciaires et aux mouvements tectoniques. Par exemple, dans le système des Baies de Coquimbo (ensemble des baies entre 29°S et 30°S), une transgression avec un niveau des mers de 50m au-dessus du niveau actuel a eu lieu il y a 1,4 Ma, suivie de 4 autres lors des derniers 500000 ans (Le Roux *et al.*, 2006). Les transgressions dans cette région ont eu pour conséquence la connexion entre les différentes baies et la formation d'îles, comme par exemple au niveau de la pointe de Guanaqueros (localités GUANA et TON), tandis que la Punta Lengua de Vaca est restée émergée (localités PTLV2 et RLI, chaîne de collines Altos de Talinay culminant à 340 m au-dessus du niveau actuel de la mer). D'autre part, l'ensemble de la côte chilienne a subi des variations importantes de température de l'eau. Ainsi, des registres fossiles montrent la coexistence d'une faune tropicale (aujourd'hui observée au nord de 6°S) et d'une faune d'eaux tempérées froides autour de 23°S durant la phase interglaciaire la plus chaude de l'hémisphère sud, il y a 400000 ans (Ortlieb *et al.*, 2003). Cette coexistence d'espèces d'affinités contrastées suggère que la distribution des espèces résulte d'une interaction complexe entre les courants apportant des masses d'eaux chaudes et l'activité des résurgences. L'absence de discontinuité environnementale évidente autour de 30°S suggère qu'une combinaison de différents facteurs pourrait être à l'origine de la discontinuité biogéographique. Une connaissance plus précise des caractéristiques océanographiques

passées de la région serait nécessaire pour pouvoir inférer la chronologie des événements, et en particulier déterminer si les divergences observées chez les cinq taxa sont la conséquence d'un même événement historique ou d'événements distincts.

Des zones de transition biogéographiques marines ont été décrites dans tous les continents, et sont généralement expliquées par une combinaison d'événements géologiques et de fluctuations liées aux cycles glaciaires-interglaciaires (température de l'eau et niveau des mers). Ainsi, pendant les périodes glaciaires depuis 3Ma, le Détroit de Bass, entre la Tasmanie et l'Australie, était émergé et le sud de la Tasmanie était baigné par des eaux froides, constituant ainsi une barrière à la dispersion pour les espèces d'eaux tempérées chaudes du sud de l'Australie (Waters, 2008 ; Waters *et al.*, 2005 ; Dawson, 2005). En Floride, en Basse Californie et en Californie, l'origine des zones de transition biogéographiques semble également liée à la présence d'une barrière physique à la dispersion totale mais temporaire (péninsule) ou partielle (îles et canyons altérant le régime de courants) (Avice, 2000 ; Dawson, 2001 ; Dawson, 2005). Deux régions présentent cependant un patron similaire au cas de la zone de transition à 30°S, où aucune discontinuité physique n'a été identifiée, que ce soit dans le passé ou actuellement : il s'agit de la région du sud-est de l'Australie (Etat de Nouvelle Galle du Sud, près de Sydney) et de la côte d'Afrique du Sud. De façon similaire, des zones de transitions biogéographiques ont été décrites : une large zone de transition avec un remplacement progressif des espèces subtropicales et tempérées en Australie (Dawson, 2005), et trois zones de transition en Afrique du Sud séparant des provinces biogéographiques se différenciant également par la température de l'eau (de l'ouest vers l'est, des provinces constituées principalement d'espèces d'eaux tempérées froides, tempérées chaudes, subtropicales et tropicales) (Teske *et al.*, 2008). Alors que les zones de transition biogéographiques sont particulièrement marquées, les études de phylogéographie des espèces traversant ces zones ont montré soit une absence de discontinuité génétique soit une discontinuité peu prononcée (voir pour revue Dawson, 2005 pour l'Australie et Teske *et al.*, 2008 pour l'Afrique du Sud). Seule la zone de transition biogéographique entre biota d'eaux tempérées chaudes et subtropicales en Afrique du Sud correspond à une discontinuité phylogéographique marquée comme attendu sous l'hypothèse 3iii d'Avice (Encadré 1.1). L'absence de traits géologiques ayant pu provoquer une vicariance suggère que la divergence a eu lieu en parapatrie et que la barrière partielle aux flux de gènes est liée à des traits océanographiques similaires à ceux actuels, à savoir la présence d'une discontinuité dans la température de l'eau, associée à des changements dans les courants et à la présence de résurgences permanentes (Teske, 2008).

Le cas de la zone de transition 30°S serait plutôt similaire à celui de la transition entre biota tempéré-chaud et subtropical en Afrique du Sud, de part la concordance entre biogéographie et phylogéographie et de part l'absence de barrière physique à la dispersion marquée.

L'adaptation divergente à la température a été montrée dans le cas d'une espèce de crustacée sud-africaine, limitant la dispersion depuis l'habitat subtropical (température de l'eau entre 20°C et >26°C) vers l'habitat tempéré-chaud (températures entre 14°C et 22°C) malgré la présence de courants favorables (Teske *et al.*, 2008). L'origine de la zone de transition biogéographique 30°S pourrait également être liée à des traits océanographique peu prononcés mais permanents dans le temps, agissant comme barrière « poreuse » à la dispersion.

Possibles mécanismes contribuant au maintien de la zone de transition

Alors que des différences de température de l'eau sont responsables du maintien des discontinuités biogéographiques marines dans différentes régions du monde (ex : Afrique du Sud, Teske *et al.*, 2008 ; Floride, Avise, 2000), la zone de transition biogéographique 30°S se caractérise plutôt par un gradient latitudinal des températures moyennes (Broitman *et al.*, 2001 ; Fig. 1.12), ainsi qu'une variation temporelle et récurrente de ces températures sous l'influence des événements ENSO.

La région autour de 30°S constitue cependant aujourd'hui un des principaux centres de résurgence des côtes chiliennes, caractérisés par un maximum dans les vents favorables aux résurgences (Thiel *et al.*, 2007). A cette latitude correspond également une discontinuité dans les régimes de résurgence : les vents favorables sont faibles mais persistants au nord, tandis qu'ils sont d'intensité forte, mais plus variable dans le temps, dans le sud (Homazabal *et al.*, 2004 ; Mackas *et al.*, 2006 ; Fig. 1.13). De même, la production primaire montre une discontinuité autour de 30°S, avec un patron plus variable dans le sud (Thomas, 1999). Des traits océanographiques particuliers sont également observés à méso-échelle près de 30°S, pouvant entraîner soit la rétention des propagules soit leur exportation vers le large, comme par exemple la présence de gyres (Homazabal *et al.*, 2004) ou encore la production de filaments d'eaux froides au niveau de la Punta Lengua de Vaca et de la Punta Pájaros (les deux extrémités du système des baies de Coquimbo, Fig. 1.14 ; Marín et Delgado, 2007). Dans d'autres régions du monde, de telles caractéristiques océanographiques semblent effectivement constituer une barrière aux flux de gènes, bien que « poreuse », avec des

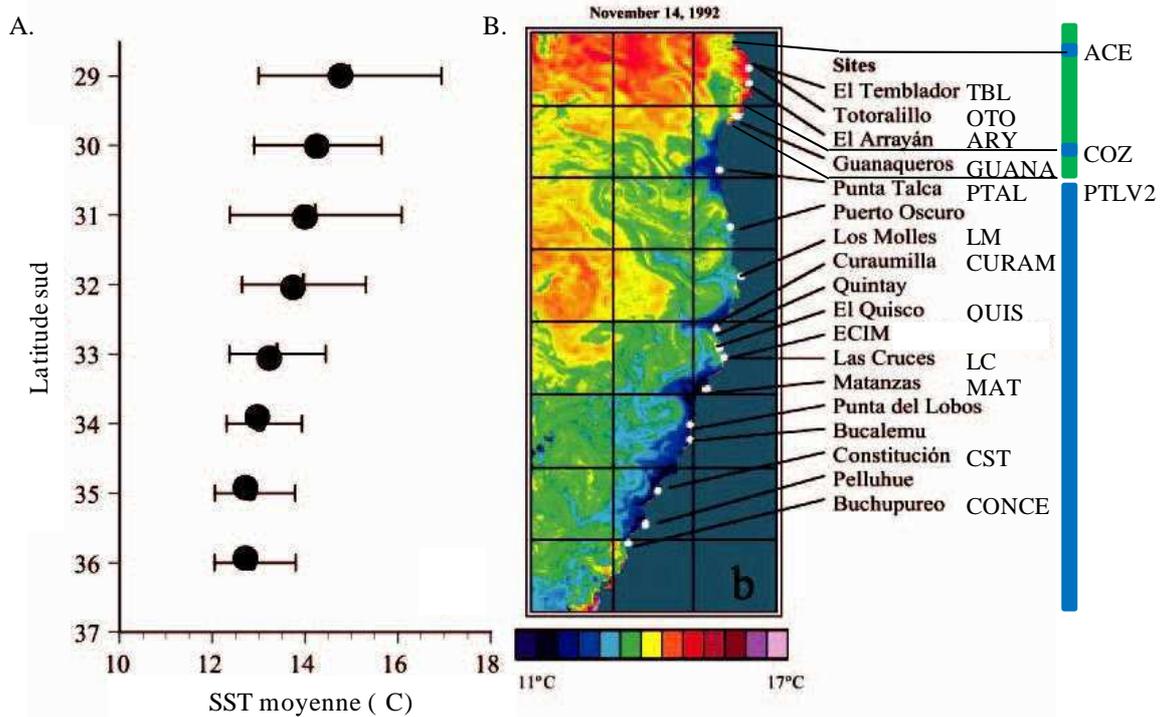
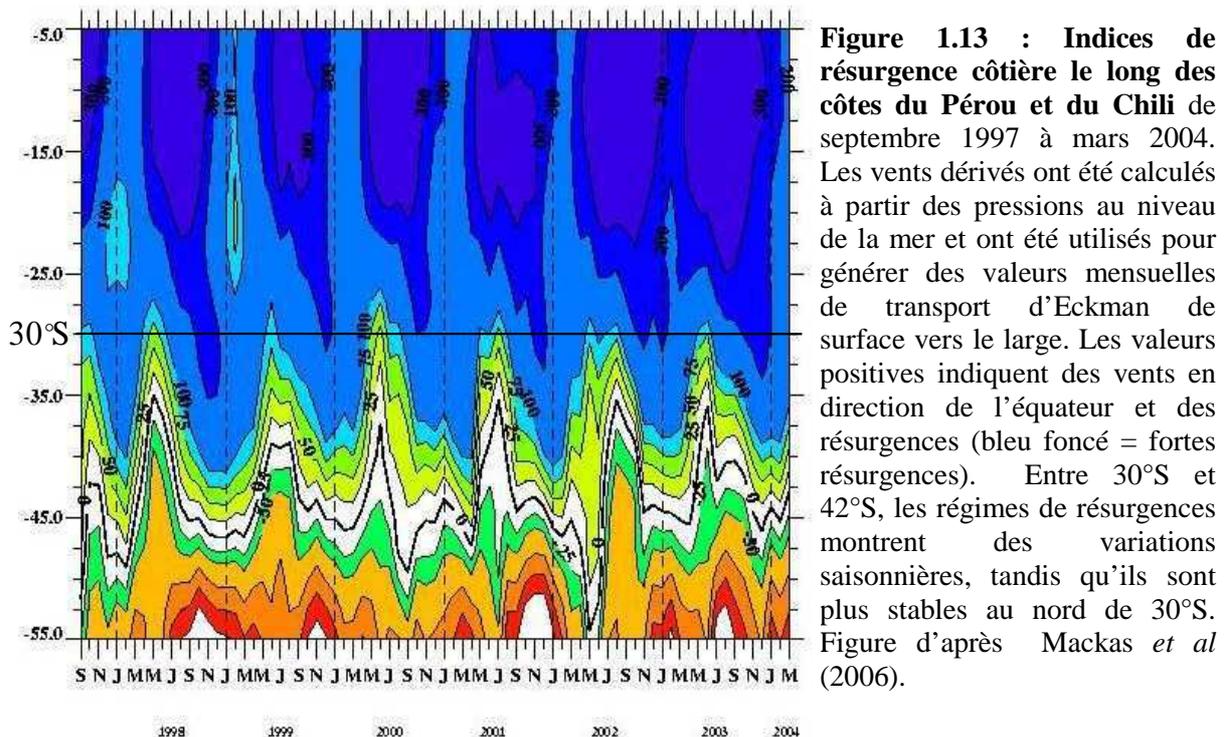


Figure 1.12 : Caractéristiques de température de l’eau autour de la zone de transition 30°S : (A) Moyenne annuelle (et déviation standard) des températures de l’eau de surface (SST) à chaque degré de latitude, obtenue à partir de données allant de 1930 à 1991. Ce graphe montre la diminution latitudinale de la moyenne et du maximum de SST vers les hautes latitudes. (B) Image satellite du 14 Novembre 1992 montrant la présence de nombreux centres de résurgence dans cette région. Sur la droite, sont situés les sites inclus dans l’étude de phylogéographie de *L. nigrescens*, avec les lignées correspondantes (bleu : AI et vert : PP). La localité IPA n’a pas été représentée (île au large). Figure d’après Broitman *et al* (2001).



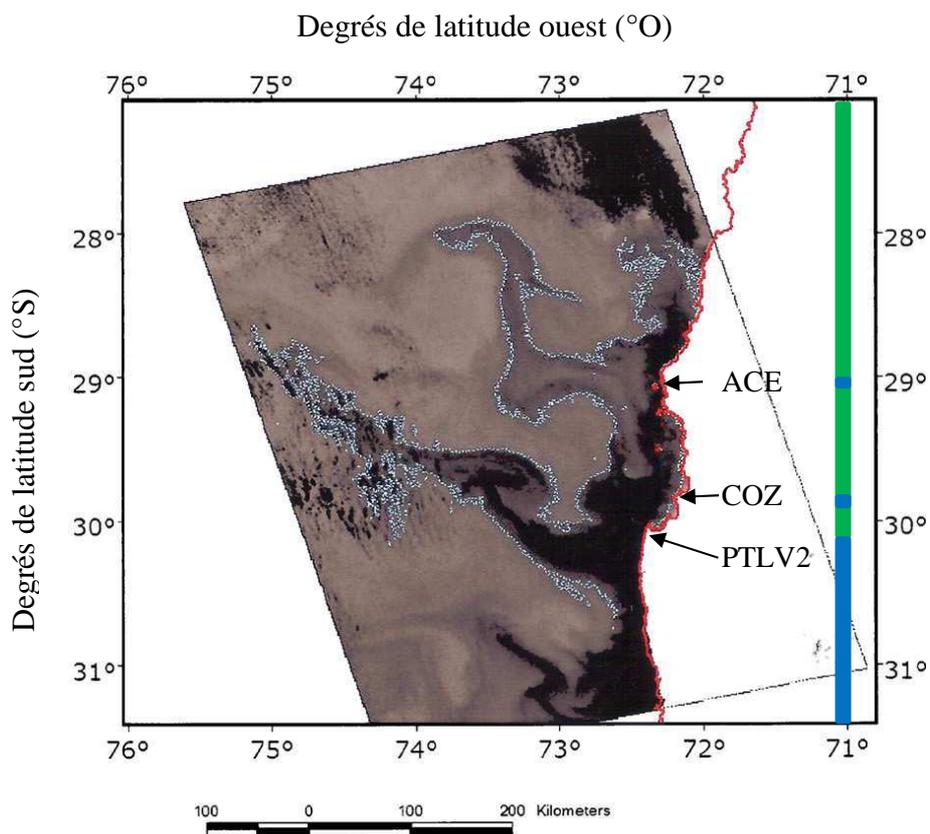


Figure 1.14 : Filaments d'eaux froides à proximité du système des baies de Coquimbo (29-31°S). Données du 16 janvier 2006. La ligne pointillée bleu clair correspond à l'isotherme de 18,5°C (SST), la ligne rouge au trait de côte. La distribution des lignées de *L. nigrescens* est également indiquée (bleu : AI ; vert : PP), ainsi que trois sites mentionnés dans le texte (ACE : Aceituno ; COZ : Coquimbo-Cruz et PTLV2 : Pta Lengua de Vaca. Figure d'après *Molina et Delgado (2007)*

conséquences sur le maintien de zones de transition biogéographiques et de discontinuités phylogéographiques (courants et gyres en Californie : Dawson, 2005 ; courants et résurgences en Afrique du Sud : Teske *et al.*, 2008 ; résurgences en Nouvelle Zélande : Waters et Roy, 2004).

E. Conclusion

En conclusion, des facteurs environnementaux extrinsèques sont très probablement à l'origine de discontinuités biogéographiques et génétiques détectées entre 30°S et 33°S de latitude le long des côtes chiliennes. Bien que toutes les espèces ne soient pas affectées, la concordance entre ces différents patrons suggère fortement la présence d'une barrière aux flux de gènes dans le passé, qui aurait été maintenue durant une période de temps suffisamment longue pour permettre une divergence phylogénétique chez plusieurs taxa. En l'absence de discontinuité topographique ou océanographique marquée dans cette région, le scénario le plus probable est celui de divergence en parapatrie. Autour de 30°S, une discontinuité est observée pour différents facteurs environnementaux (chlorophylle, régimes de résurgences), tandis que d'autres montrent un gradient latitudinal (température, effets ENSO). La présence de conditions océanographiques particulières pourrait limiter la dispersion entre le sud et le nord de la zone de transition biogéographique 30°S, tandis que d'autres facteurs (température, nutriments liés aux résurgences) pourraient agir comme facteurs de sélection, diminuant ainsi la migration efficace. La comparaison entre études de phylogéographie semble montrer que l'étendue de la zone de transition est liée à la capacité de dispersion des espèces, suggérant que la barrière aux flux de gènes est actuellement partielle. La présence d'une barrière « poreuse » est également montrée par l'absence de discontinuité phylogéographique chez certaines espèces ayant une forte capacité de dispersion.

L'importance de la discontinuité phylogéographique chez certains taxa suggère cependant la présence d'espèces cryptiques, comme chez *L. nigrescens*. Dans ce cas précis, la distribution des espèces cryptiques serait alors la conséquence non seulement de la présence de barrières à la *dispersion* dans la région (résurgence, température) mais également de la présence de barrières reproductives. Ces barrières reproductives peuvent être la conséquence d'une adaptation à un environnement particulier ou être intrinsèques. L'étude des barrières reproductives et du rôle des facteurs environnementaux dans l'action de ces barrières fait l'objet du Chapitre 2 de ce manuscrit.

CHAPITRE 2 :

**COMPRENDRE LES MECANISMES
DE MAINTIEN DE LA DIFFERENCIATION
ENTRE LES ESPECES CRYPTIQUES PP ET AI
DE *L. NIGRESCENS***

CHAPITRE II : COMPRENDRE LES MECANISMES DE MAINTIEN DE LA DIFFERENCIATION ENTRE LES ESPECES CRYPTIQUES PP ET AI DE *L. NIGRESCENS*

A. Problématique générale

1. *L. nigrescens* : un cas d'étude des barrières reproductives chez les Laminariales

L'étude de phylogéographie de *Lessonia nigrescens* a montré la présence de deux lignées principales, pouvant être considérées comme deux espèces suivant le concept phylogénétique de l'espèce (Chapitre 1). Ces espèces cryptiques seront dorénavant appelées *espèce AI* et *espèce PP*, tout en conservant l'idée que **la définition d'espèce est, à ce stade du manuscrit de thèse, strictement phylogénétique.**

A l'échelle utilisée pour l'étude de phylogéographie, les espèces PP et AI ont montré des aires de distribution largement allopatriques mais « chevauchantes » entre 29°03'S et 30°14'S (Chapitre 1). Cette région de chevauchement (Région de transition) est singulière car elle est composée de localités composées exclusivement d'individus de l'espèce PP et de trois localités composées exclusivement d'individus de l'espèce AI. A l'échelle utilisée pour cette étude, nous n'avons donc pas détecté de localité où des individus des deux espèces seraient présents. **La structure en mosaïque de la Région de transition (29-30°S) est une opportunité pour étudier les mécanismes qui contribuent au maintien de la divergence entre les espèces cryptiques AI et PP** : dans cette région, l'environnement, et en particulier la latitude, est similaire entre localités AI et PP voisines, séparées par une distance géographique faible (entre 19 et 29 km).

2. Barrières reproductives possibles chez les Laminariales

Comme décrit dans l'Introduction générale de ce manuscrit de thèse, différentes barrières reproductives peuvent agir pour limiter les flux de gènes entre lignées divergentes ou

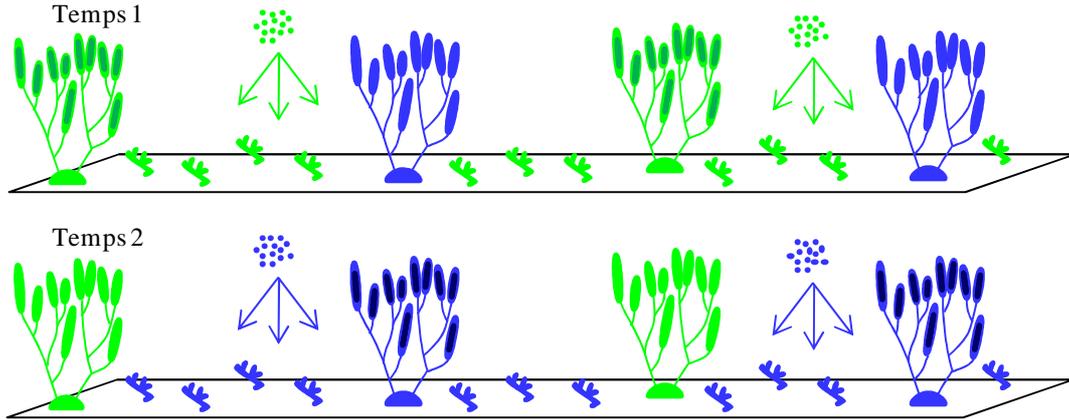
entre espèces proches. La grande majorité des études de spéciation étant réalisées sur des espèces animales ou des plantes terrestres, il est nécessaire d'adapter cette classification des barrières reproductives au cycle de vie complexe des Laminariales. **Les figures 2.A.1 à 2.A.3 présentent l'ensemble de ces barrières reproductives appliquées au cas des deux espèces cryptiques de *L. nigrescens*.** Les barrières reproductives liées au comportement animal (isolements comportementaux, isolement par pollinisateur) n'ont pas été considérées. De même, les barrières reproductives liées aux organes reproducteurs ne sont pas pertinentes chez les Laminariales, le gamète mâle entrant directement en contact avec le gamète femelle, sans étape de transfert dans les organes reproducteurs femelles. J'ai pris en compte la présence des deux stades du cycle de vie des Laminariales : le sporophyte, diploïde et macroscopique, et le gamétophyte, haploïde et microscopique. Seules les spores (haploïdes car normalement issues de méiose) produites par les sporophytes ont été considérées comme une phase de dispersion, car les gamètes mâles semblent avoir une distance de dispersion inférieure au millimètre (Boland, 1995).

La première barrière reproductrice possible est l'**isolement temporel** (Fig. 2.A.1). Les rencontres entre gamètes hétérospécifiques peuvent être limitées par des différences de phénologie entre espèces, liées à l'habitat ou à des différences génétiques. Cette différence de phénologie peut avoir lieu à deux étapes distinctes du cycle de vie : (i) une différence du pic de maturité des sporophytes et de libération des spores peut entraîner une asynchronie de maturité des gamétophytes entre espèces, et limiter ainsi les fécondations interspécifiques ; et (ii) les gamétophytes peuvent être présents dans un même habitat au même moment mais être matures à des temps différents.

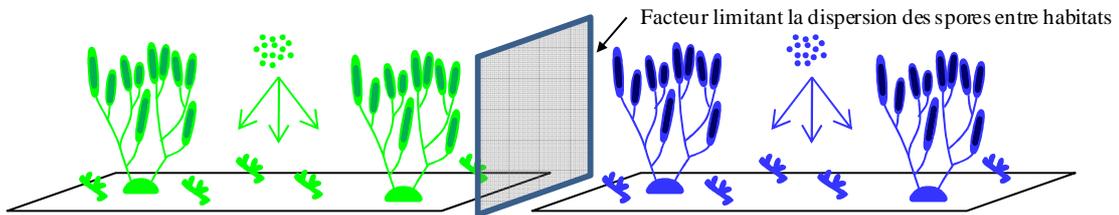
L'**isolement écogéographique (ou isolement par l'habitat)** se traduit par la présence des espèces dans des habitats différents, séparés par une distance géographique supérieure à la distance moyenne de dispersion des spores ou par une barrière physique à la dispersion. Dans le cas où un tel isolement serait total, chaque population devrait être constituée uniquement d'individus d'une seule espèce parentale. Les populations d'espèces différentes seraient alors séparées par la présence d'habitats non favorables (plages de sable ou rochers non-exposés aux vagues) sur des distances suffisamment importantes pour limiter la migration des spores.

J'ai ensuite séparé la **contre-sélection des immigrants** en deux parties, reflétant l'action de la sélection naturelle (i) sur les gamétophytes issus de l'immigration de spores (gamétophytes immigrants), et (ii) sur les sporophytes issus de la fécondation entre gamétophytes immigrants (appelés ici sporophytes « immigrants », bien que ces individus ne constituent pas la première génération de migrants) (Fig. 2.A.1). Les deux cas de contre-

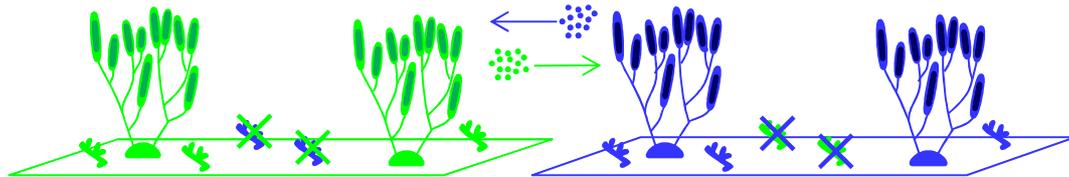
A. Isolement temporel : exemple de différence de phénologie des sporophytes



B. Isolement écogéographique (ou isolement par l'habitat)



C. Contre-sélection des gamétophytes immigrants



D. Contre-sélection des sporophytes « immigrants »

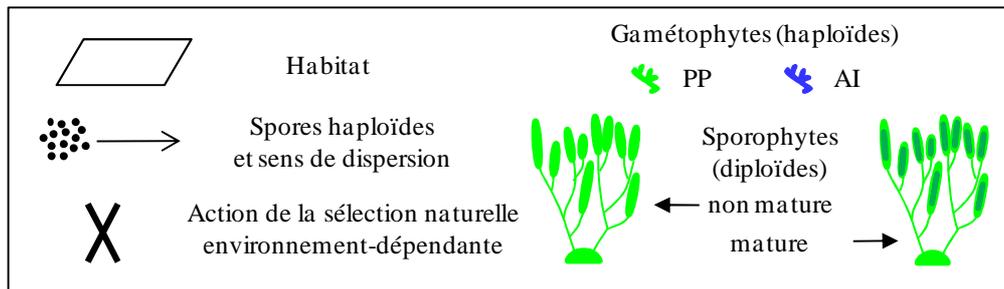
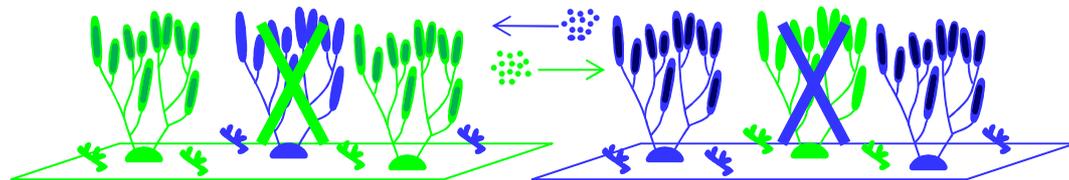
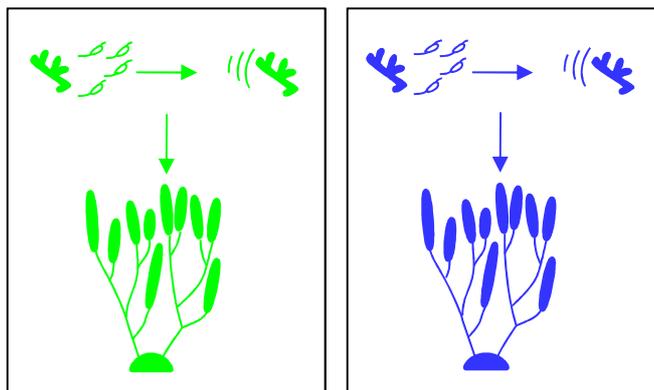


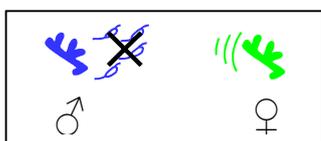
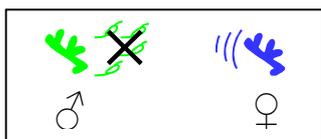
Figure 2.A.1 : Barrière reproductives pré-zygotiques possibles entre les espèces AI (en bleu) et PP (en vert) de *L. nigrescens*. L'action de la sélection naturelle considère les facteurs abiotiques et biotiques de l'habitat, dont l'exclusion compétitive entre les espèces AI et PP. Les individus sont considérés comme immigrants s'ils sont issus de la germination de spores provenant d'un habitat distinct (gamétophytes immigrants) ou de la fécondation entre gamètes de gamétophytes immigrants (sporophytes « immigrants »). Les barrières reproductives sont ici représentées comme étant totales, mais peuvent être partielles et interagir entre elles. Les barrières pré-zygotiques agissant lors de la rencontre des gamètes et celles post-zygotiques sont présentées dans les Figures 2.A.2 et 2.A.3.

Reproduction intraspécifique:

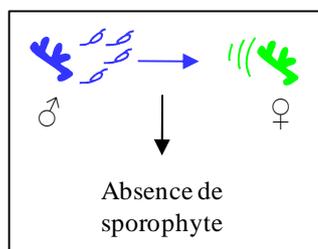
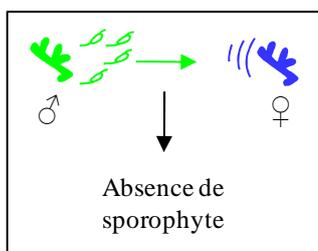


A. Isolement gamétique non compétitif

Non-attraction des gamètes mâles hétérosécifiques



Incompatibilités gamétique intrinsèque



B. Isolement gamétique compétitif

Compétition entre gamètes mâles
Fécondations majoritairement entre gamètes consécifiques

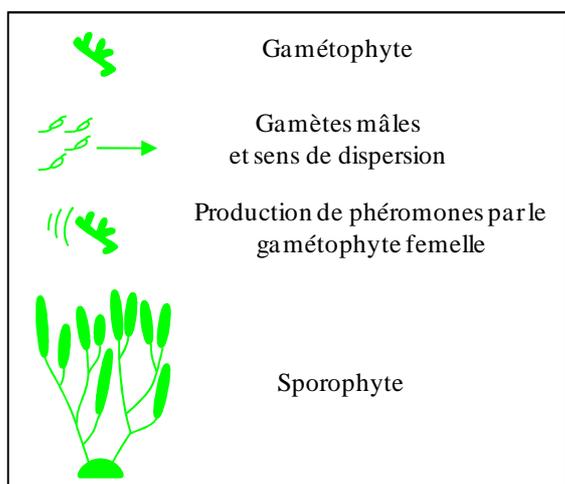
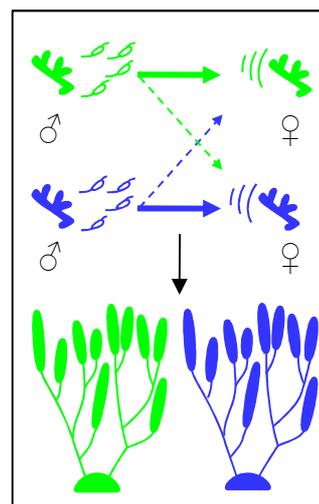
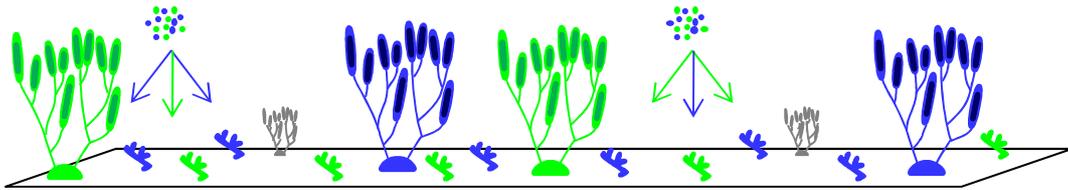
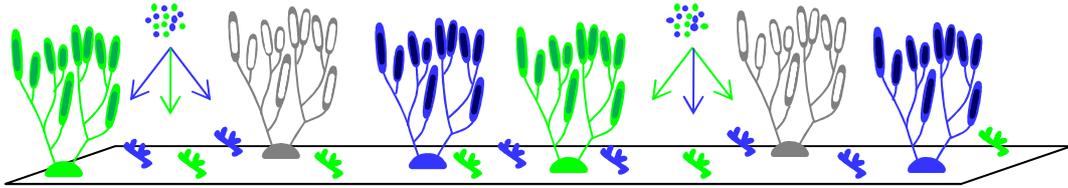


Figure 2.A.2 : Barrière reproductives possibles entre les espèces AI (en bleu) et PP (en vert) de *L. nigrescens* lors de la rencontre des gamètes.

A. Létalité des hybrides (intrinsèque)



B. Stérilité des hybrides (intrinsèque)



C. Contre-sélection des sporophytes hybrides (extrinsèques) : survie et/ou fertilité réduite

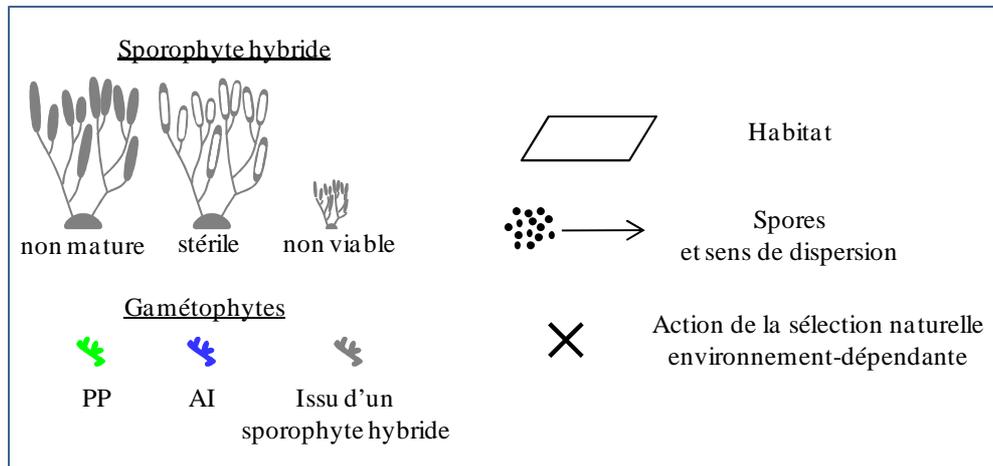
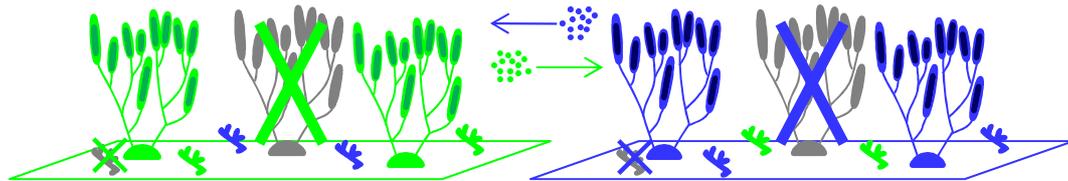


Figure 2.A.3 : Barrières reproductives post-zygotiques possibles entre les espèces AI (en bleu) et PP (en vert) de *L. nigrescens*. Les individus hybrides sont représentés en gris.

sélection des immigrants reflèteraient l'adaptation des espèces à leur environnement respectif. La présence d'une telle barrière reproductive poserait la question de savoir quels sont les facteurs environnementaux, biotiques ou abiotiques, qui limitent la migration efficace entre habitats. L'exclusion par compétition interspécifique est un cas particulier de contre-sélection des immigrants.

Différentes **formes d'isolement gamétiques** sont possibles chez *L. nigrescens*, incluant l'absence d'attraction des gamètes hétérosécifiques (action des phéromones), l'incompatibilité gamétique intrinsèque et l'isolement gamétique compétitif (Fig. 2.A.2).

Les **barrières d'isolement postzygotiques** peuvent être intrinsèques ou extrinsèques et se traduire par une létalité et/ou une stérilité des hybrides (Fig. 2.A.3). Chez les Laminariales, la première génération d'hybrides est constituée par la phase sporophytique (diploïde). La létalité intrinsèque des gamétophytes produits par ces individus hybrides peut être considérée comme une stérilité des sporophytes hybrides.

3. Objectifs et approches utilisées

Afin de distinguer les différentes formes de barrières reproductives limitant les flux de gènes entre les espèces AI et PP de *L. nigrescens* et les forces évolutives qui régissent la distribution géographique de ces taxa j'ai divisé cette étude en différents objectifs, utilisant des approches complémentaires :

- **Caractérisation de l'isolement reproducteur en conditions naturelles**, dans trois zones de contact entre espèces AI et PP, localisées dans la Région de transition (Partie B). L'identification d'hybrides et la quantification des flux géniques a nécessité la mise au point de marqueurs hypervariables et à transmission biparentale (microsatellites), à laquelle j'ai participé. En particulier, nous avons recherché des loci qui amplifient correctement dans les deux espèces. Afin d'identifier la direction des flux de gènes interspécifiques, nous avons complété cette étude en utilisant le marqueur mitochondrial *atp8/trnS*, identifiant ainsi la lignée maternelle des individus. L'étude de génétique des populations des zones de contact permet d'inclure toutes les barrières reproductives agissant en conditions naturelles. Afin d'étudier plus spécifiquement le rôle des barrières reproductives intrinsèques, j'ai réalisé une expérience de croisements interspécifiques, en conditions contrôlées, dont les

principaux objectifs seront exposés (en attente du géotypage de la génération filiale).

- **Rôle des facteurs environnementaux dans la distribution géographique des espèces et dans l'isolement reproducteur** (Partie C) : contre-sélection des sporophytes « immigrants ». Pour déterminer l'importance de cette barrière reproductrice, une expérience de transplantation réciproque de jeunes sporophytes a été effectuée entre quatre localités de la Région de transition (29-30°S). Lors de cette expérience, la survie, la croissance et la maturité des individus ont été utilisées comme mesures de valeur sélective. Nous avons cherché à mettre en évidence des différences de valeur sélective entre individus d'espèces différentes, reflétant une adaptation aux conditions environnementales. Nous présenterons également brièvement une expérience réalisée pour tester le rôle d'un facteur environnemental particulier, la température, et de ses variations temporelles, comme facteur de contre-sélection des immigrants (résultats en cours d'analyse).
- Enfin, la détection de plusieurs variants mitochondriaux au sein d'un même individu (hétéroplasmie apparente) lors de l'étude de phylogéographie nous a amené à poser la question de **l'importance d'un possible réarrangement mitochondrial dans le processus de spéciation et dans l'adaptation aux conditions environnementales** (Partie D). Par clonage et séquençage, nous avons cherché à identifier les différents fragments. Nous avons également caractérisé l'étendue géographique de cette hétéroplasmie apparente.

4. Choix des régions d'étude des barrières reproductives

Les zones de contact entre espèces cryptiques sont des endroits privilégiés pour étudier les processus de spéciation en cours et les forces évolutives impliquées dans l'isolement reproducteur. Nous réserverons ici le terme de **Région de transition** pour désigner la région où peuvent être présentes les deux espèces (29-30°S) et le terme de **zone de contact** pour désigner à une échelle locale les régions où les deux espèces sont à proximité géographique l'une de l'autre (jusqu'à quelques dizaines de kilomètres). Trois zones de contact ont été étudiées, avec, du nord vers le sud (Fig. 2.A.4) : (i) la région d'Aceituno (espèce AI) – Choros (espèce PP), (ii) la région de Coquimbo (AI) – Totalillo (PP), et (iii) la région de Tongoy

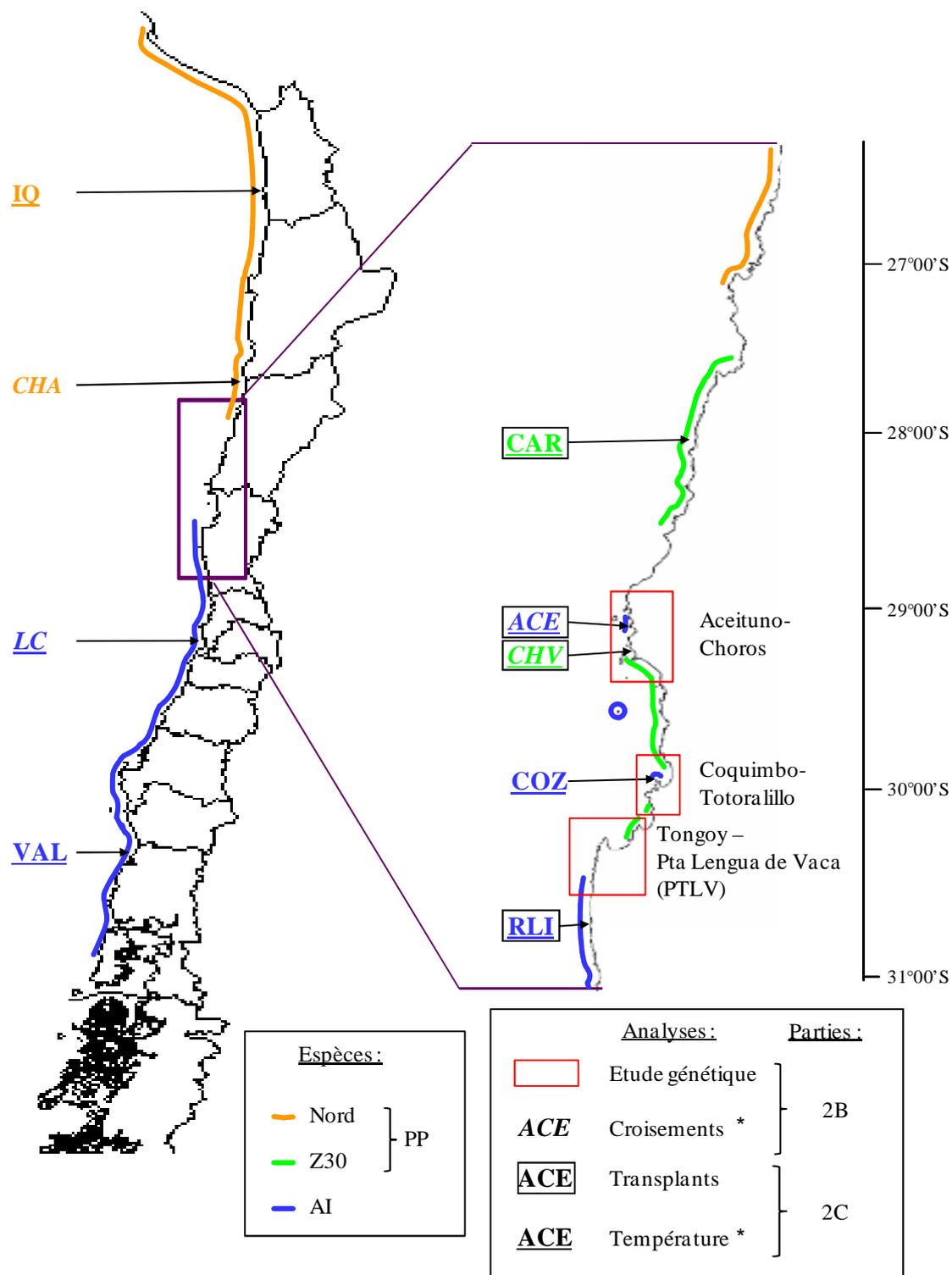


Figure 2.A.4 : Localisation des sites mentionnés au cours du Chapitre 2. Pour chaque site, le type d'analyse réalisée est indiqué, et la partie du Chapitre 2 correspondant. Les aires de distribution des espèces sont basées sur les résultats obtenus avec le marqueur mitochondrial atp8/trnS (Chapitre 1 uniquement). * : analyses qui ne seront pas détaillées dans ce manuscrit (analyses en cours).

(PP) – Punta Lengua de Vaca (AI). Tandis que les deux premières zones de contact sont caractérisées par la présence de populations de l'espèce AI isolées dans l'aire de distribution de l'espèce PP, la dernière zone de contact constitue la limite sud de l'aire de distribution de l'espèce PP. Ces trois zones de contact sont présentes sur une échelle de 270km de côte. En plus des localités d'Aceituno (ACE) et Coquimbo (COZ), une troisième localité AI avait été détectée dans la Région de transition lors de l'étude phylogéographique : la localité insulaire Isla Pájaros (IPA), située à 25km du continent. Les populations connues d'espèce PP les plus proches sont donc également situées à 25km de la localité IPA ; de ce fait nous n'avons pas considéré cette localité pour l'étude des zones de contact.

Les sites utilisés pour les expériences de croisements, de transplantation réciproque et de tolérance à la température ont été choisis dans ces trois zones de contact (Fig. 2.4). Certaines expériences ont également inclus des sites localisés en dehors de la Région de transition (29-30°S), afin de distinguer l'effet de l'espèce de l'effet de la latitude. L'ensemble des sites mentionnés dans ce chapitre est détaillé dans la Figure 2.A.4.

B. Caractérisation de l'importance de l'isolement reproducteur dans les zones de contact entre espèces AI et PP de *L. nigrescens* : approche de génétique des populations

1. Rappel de la problématique : isolement reproducteur en conditions naturelles

a) Influence des forces évolutives dans la structure des zones de contact et zones hybrides

Les limites d'aires de distribution des espèces dépendent d'interactions complexes entre des forces physiques, historiques, écologiques et évolutives (Brown *et al.*, 1996). Dans le cas de taxa phylogénétiquement proches (espèces-sœurs) ayant divergé en allopatrie, l'issue du contact secondaire entre les taxa et le maintien de l'intégrité des génomes parentaux dépend de l'importance de l'isolement reproducteur entre ces taxa. L'absence de barrières reproductives provoque la fusion des taxa en une seule espèce, tandis qu'un isolement reproducteur partiel peut provoquer la formation d'une zone hybride, dont la structure dépend du degré de différenciation génétique et écologique entre les taxa, de leur taux de dispersion et de la valeur sélective de leur descendance hybride (Coyne et Orr, 2004). La coexistence de taxa bien différenciés en sympatrie suppose qu'ils occupent des niches écologiques différentes au sein du même habitat.

Les zones de contact peuvent être décrites en fonction de la proportion de génotypes intermédiaires (hybrides) et de génotypes parentaux au sein des populations locales (Harrison et Bogdanowicz, 1997). Aux deux extrêmes d'un continuum, on peut distinguer : (i) les **zones hybrides bimodales**, où prédominent les génotypes parentaux au sein des populations, et (ii) les **zones hybrides unimodales**, où prédominent les génotypes intermédiaires. Quelque soit le concept d'espèce utilisé, la bimodalité au sein des populations locales indique que la spéciation des formes parentales est complète ou presque complète (Jiggins et Mallet, 2000). Les espèces ont alors acquis la possibilité de rester distinctes y compris en sympatrie.

Les zones hybrides peuvent être maintenues par des différences de valeurs sélectives

entre génotypes parentaux le long d'un gradient environnemental (**zone hybride d'écotone**, sélection environnement-dépendante) et/ou par un équilibre entre la dispersion, permettant l'hybridation, et la sélection intrinsèque contre les hybrides ou contre le taxon localement rare (en fréquence inférieure à celle de l'autre taxon), indépendamment de l'environnement (**zones hybrides de tension**, Hewitt, 1988). Les zones hybrides d'écotones sont caractérisées par une meilleure valeur sélective des taxa parentaux dans leur habitat natif que dans l'habitat non-natif, les individus hybrides pouvant avoir une valeur sélective inférieure à celle des individus parentaux dans l'ensemble des habitats ou une valeur sélective supérieure dans un certain type d'habitat, par exemple un habitat écologiquement intermédiaire entre les habitats parentaux (modèle de supériorité hybride limitée).

L'objectif de cette partie du manuscrit a été de caractériser les zones de contact entre les espèces AI et PP de *L. nigrescens*, afin d'identifier l'importance de l'isolement reproducteur et de pouvoir poser de nouvelles hypothèses quant aux forces évolutives contribuant au maintien de la structuration observée (proportion et localisation géographique des génotypes parentaux et des génotypes hybrides).

b) Isolement reproducteur chez les kelps

Cette approche de quantification de l'hybridation entre espèces-sœurs est récente chez les Laminariales, et est rendue possible par l'utilisation de marqueurs moléculaires à hérédité biparentale.

Chez les Laminariales, l'hybridation entre espèces est généralement considérée dans la littérature comme relativement commune et pouvant impliquer des espèces différentes, et même des genres et des familles différentes (voir pour revue : Liptack et Druehl, 2000 ; Druehl *et al.*, 2005 ; Bartsch *et al.*, 2008). Cet isolement reproducteur incomplet serait lié au fait que la libération et l'attraction des gamètes mâles par le gamétophyte femelle sont sous le contrôle d'un seul et même bouquet de phéromones chez l'ensemble des Laminariales (lamoxirène, ectocarpène et pentadecane) (Pohnert et Boland, 2002). Chez les espèces de *Lessonia*, ce bouquet a été montré chez *L. variegata*, et est probablement également conservé chez les autres espèces du genre. Cette communication phéromonale non spécifique semblerait être compensée par des barrières immunologiques à la surface des cellules, agissant comme mécanisme de reconnaissance différentielle entre les gamètes (voir références citées par Pohnert et Boland, 2002). La radiation rapide et récente des Laminariales (de Reviere et Rousseau, 1999 ; Draisma *et al.*, 2001) pourrait notamment

expliquer ces barrières reproductives incomplètes.

La possibilité de flux de gènes interspécifiques chez les Laminariales est généralement étudiée par des croisements entre gamétophytes mâles et gamétophytes femelles d'espèces différentes, en conditions contrôlées. Malheureusement, la possibilité de parthénogénèse et/ou d'apogamie chez de nombreuses espèces de Laminariales complique l'identification des sporophytes hybrides (issus de croisements interspécifiques) et souligne les limites de ce type d'approche expérimentale. Néanmoins, l'utilisation conjointe des marqueurs moléculaires (Druehl *et al.*, 2005) permet de contrôler l'importance de la reproduction asexuée et surtout de vérifier la présence d'hybrides. Cette étude a montré que l'interprétation des croisements basés sur la morphologie des individus obtenus peut mener à des résultats erronés : les individus hybrides, comme ceux issus d'apogamie ou de parthénogénèse, peuvent en effet présenter une morphologie similaire à celle de l'espèce parentale (Druehl *et al.*, 2005). L'hybridation entre Laminariales serait ainsi moins fréquemment obtenue en conditions contrôlées que ce qui est généralement admis dans la communauté scientifique. Toutefois, des études récentes démontrent formellement qu'elle est bien possible entre espèces du même genre (chez *Alaria* : Kraan et Guiry, 2000 et Kraan *et al.*, 2001 ; chez *Laminaria* : Druehl *et al.*, 2005) et même entre espèces de genres différents (*Alaria marginata* x *Lessoniopsis littoralis*, Liptack et Druehl, 2000).

D'après cette littérature, on peut alors supposer ici que les espèces phylogénétiques AI et PP de *L. nigrescens* présenteraient un isolement reproducteur incomplet. L'échantillonnage réalisé dans des sites distants d'une vingtaine de kilomètres dans la Région de transition n'avait pas montré de sites où les espèces seraient en sympatrie (Chapitre 1) : ceci pose la question de savoir quels sont les facteurs qui limiteraient alors l'étendue de la zone hybride : facteurs environnementaux (zone d'écotone) et/ou intrinsèques (zone de tension) ? Paradoxalement, il n'existe pas, à ma connaissance, d'article publié sur l'importance de l'hybridation sur le terrain entre espèces de Laminariales. La présente étude est la première étude de ce type entre espèces-sœurs cohabitant dans une zone de contact.

c) Objectifs spécifiques

Afin de comprendre les mécanismes contribuant au maintien des aires de distribution des espèces PP et AI de *L. nigrescens* et en particulier dans la Région de transition (29-30°S, Fig. 2.B.1), la première étape a été de caractériser plus précisément cette région : la structure en mosaïque se maintient-elle lorsqu'on augmente l'échantillonnage et lorsqu'on travaille à

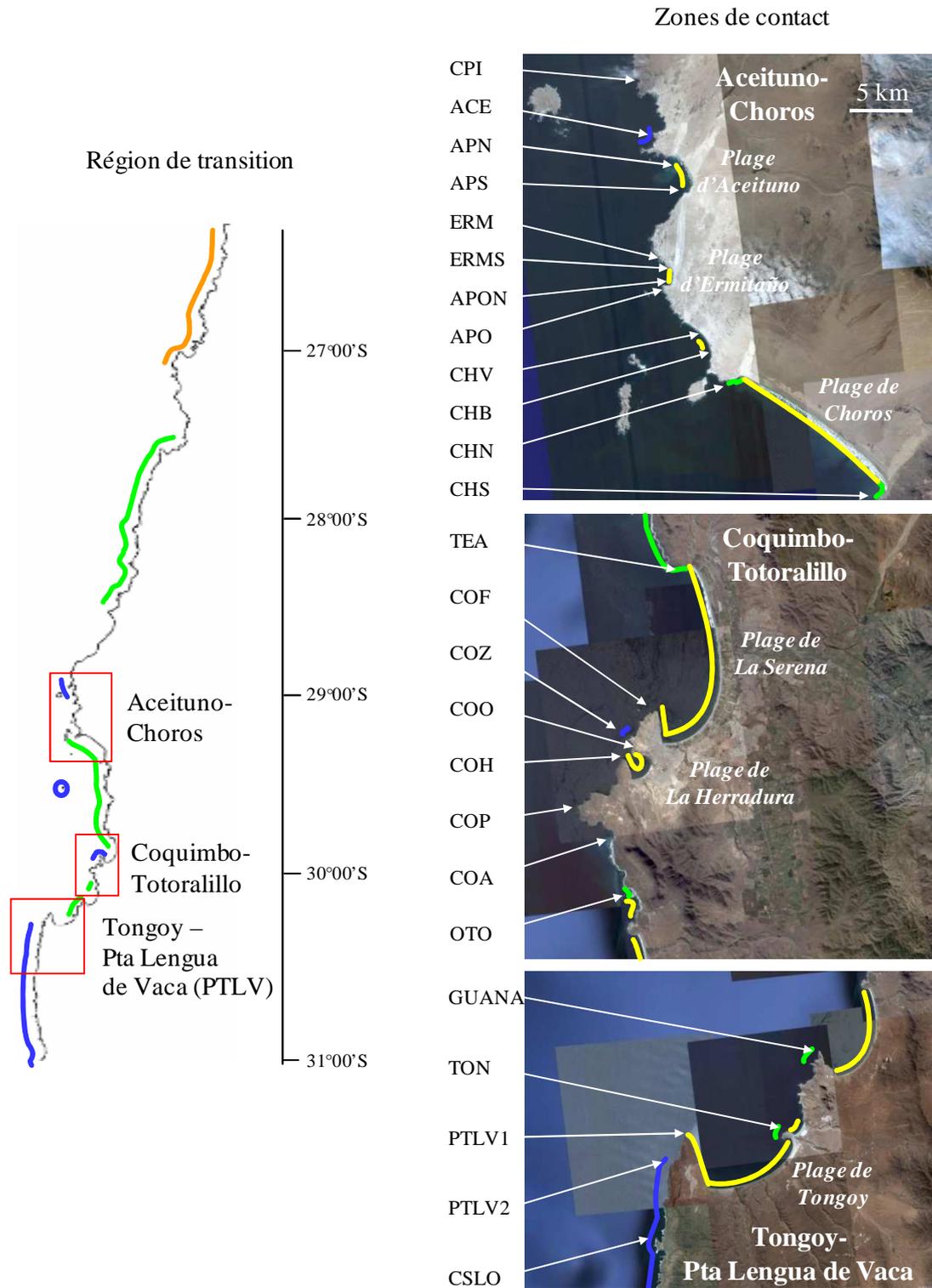


Figure 2.B.1 : Localisation des sites échantillonnés pour la caractérisation des zones de contact entre espèces PP et AI. Les résultats de l'étude de phylogéographie sont représentés schématiquement par la couleur du trait de côte : bleu pour l'espèce AI et vert/orange pour l'espèce PP (vert : clade Z30, orange : clade Nord). Les plages de sable, habitat non favorable à *L. nigrescens*, sont représentées par un trait jaune et le nom donné dans le texte indiqué en italique.

une échelle géographique plus fine ? Le marqueur mitochondrial *atp8/trnS* a pu être utilisé pour répondre à cette première question.

Le second objectif a été de déterminer l'importance de l'isolement reproducteur entre les espèces AI et PP en conditions naturelles. Pour cela, nous avons développé et utilisé des marqueurs microsatellites, marqueurs hypervariables à transmission généralement biparentale, qui nous ont permis d'identifier les flux de gènes à deux niveaux : (i) entre individus de même espèce (intraspécifique) et (ii) entre individus d'espèces différentes (interspécifique). La comparaison entre inter- et intra-spécifique nous a permis de prendre en compte les facteurs environnementaux qui peuvent limiter les flux de gènes entre populations et donc constituer des barrières partielles à la dispersion, comme par exemple la présence d'habitats non favorables (plages de sable).

Enfin, nous avons cherché à caractériser l'isolement reproducteur en conditions contrôlées, en réalisant des croisements interspécifiques. Ceci avait pour objectif de s'affranchir des conditions environnementales pour tester spécifiquement l'isolement reproducteur intrinsèque : isolement gamétique compétitif et non-compétitif. Le génotypage de la génération filiale, nécessaire pour identifier et quantifier les hybrides, n'ayant pas été complété, cette partie ne sera pas détaillée ici (seul le protocole expérimental des croisements réalisés est présenté en Annexe 2.B.1).

2. Matériel et Méthodes

a) Choix des zones de contact étudiées et échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé dans trois zones de contact identifiées dans la Région de transition (29-30°S) lors de l'étude de phylogéographie (Chapitre 1), en excluant le cas particulier de l'île Pájaros (IPA) (Fig. 2.B.1). Dans chacune des trois zones de contact, les sites d'échantillonnage ont été choisis de façon à inclure des sites de chaque côté des discontinuités d'habitat : plages de sable, où *L. nigrescens* est absente, ou discontinuités topographiques (ex : pointe rocheuse). L'échantillonnage a été réalisé tous les 5km environ, avec exception de la zone de contact de Tongoy-Pta Lengua de Vaca, du fait de difficultés d'accès aux sites et de la présence de longues plages de sables où *L. nigrescens* est absente (Fig. 2.B.1). Ces trois zones de contact se différencient par le nombre et l'étendue des plages de sable (Fig. 2.B.1). Au sein de chaque site, l'échantillonnage a été réalisé comme pour

l'étude de phylogéographie.

b) Développement de marqueurs microsatellites

Le développement de marqueurs microsatellites spécifiques aux espèces AI et PP de Lessonia nigrescens a fait l'objet d'un article paru dans Molecular Ecology Ressources, dont je suis co-auteur (Faugeron et al., 2009 ; Annexe 3.2).

Les marqueurs microsatellites sont des marqueurs à hérédité biparentale, co-dominants, sélectivement neutres et hypervariables (taux de mutation compris entre 5.10^{-2} et 5.10^{-6} mutations par locus et par génération, voir pour revue Jarne et Lagoda, 1996 et Li *et al.*, 2002). Ils sont caractérisés par la répétition d'un motif de deux à six paires de bases, pouvant être purs (ex : GAGAGAGAGAGAGA), composés (ex : CACACATGTGTG) ou discontinus (ex : CACATTCACATTCACA). Deux types de mécanismes mutationnels peuvent expliquer le taux de mutation important de ces marqueurs : (i) le glissement de l'enzyme polymérase durant la réplication de l'ADN et (ii) la recombinaison entre chromosomes. Les allèles diffèrent entre eux par le nombre de répétitions du motif et donc par leur longueur. L'obtention des données se fait à l'aide d'un séquenceur à capillaire où les fragments migrent selon leur taille dans un gel d'acrylamide non dénaturant. Du fait de leur variabilité importante et de leur transmission biparentale, les marqueurs microsatellites sont très largement utilisés en génétique des populations (Slekoe et Toonen, 2006 ; Jarne et Lagoda, 1996), et particulièrement dans la caractérisation de l'isolement reproducteur entre taxa et l'étude des zones hybrides (ex : Arias *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2008 ; Boissin *et al.*, 2008).

Une première tentative pour obtenir ces marqueurs chez le complexe *L. nigrescens* avait été réalisée en essayant d'utiliser les amorces des loci développés pour l'algue brune *Laminaria digitata*, mais elle n'avait pas été concluante (Martínez *et al.*, 2005). Deux banques enrichies en microsatellites ont donc été réalisées successivement par Claire Billot et par ATG Genetics (Vancouver, Canada). La première banque a été réalisée à partir d'ADN provenant d'individus de l'espèce AI (localité Las Cruces, LC, 33°30'S) uniquement. La seconde banque ayant été réalisée après l'identification des deux espèces phylogénétiques au sein de *L. nigrescens*, nous avons cherché à ce que les microsatellites développés soient amplifiables et polymorphes à la fois pour l'espèce AI et pour l'espèce PP. En particulier, pour l'étude des zones de contact, des loci amplifiant bien dans les deux espèces étaient indispensables. Au total, neuf loci ont pu être obtenus à partir des deux banques et ont été initialement testés sur

un total de 60 individus : 24 individus d'une localité de l'espèce AI (Las Cruces, LC, 33°30'S), 24 d'une localité de l'espèce PP (PAz, 26°09'S), et 7 et 5 individus répartis respectivement dans les aires de distribution des espèces AI et PP (AI : localités GBN, CONCE, RLI et ACE ; PP : localités : TON, TEA, CHS, MOC, COL, QIN, ce dernier site correspondant au site PAT, voir Fig. 1.1, Chapitre 1).

c) Obtention des données génétiques

L'extraction d'ADN et l'amplification par PCR du marqueur *atp8/trnS* ont été réalisées comme décrit dans l'étude de phylogéographie (Chapitre I). La lignée maternelle des individus a été déterminée en utilisant le polymorphisme de longueur du marqueur mitochondrial *atp8/trnS*. La migration des produits PCR sur gel d'agarose à 2% a permis de discriminer les lignées. Des individus pour lesquels la séquence *atp8/trnS* était connue ont été utilisés comme marqueurs de taille dans chacun des gels.

Afin de choisir parmi les neuf loci microsatellites disponibles, une analyse préliminaire a été réalisée sur un sous-échantillonnage de 20 individus de la zone de contact Aceituno-Choros (deux sites de 10 individus de chacune des espèces définies selon la lignée maternelle : AI et PP). En fonction du polymorphisme observé et de la qualité des amplifications, quatre loci ont été retenus : P3, P9, LESS1 et LESS22 (correspondant aux loci LESS1T3, LESS1T9, LESS2D1 et LESS2D22 de l'article Faugeron *et al.*, 2009, Annexe 3.2). Les conditions d'amplification et de passage sur séquenceur à capillaire pour chacun des loci sont décrites dans l'Annexe 2.B.2. Les chromatogrammes ont été lus à l'aide du logiciel GeneMarker v 1.75 (SoftGenetics, State College, Etats-Unis) et les fichiers d'entrée des différents logiciels d'analyses ont été créés en utilisant le logiciel CREATE v.1.1 (Coombs *et al.*, 2007).

Le génotypage des individus de la zone de contact Aceituno-Choros a fait l'objet du stage d'Eva Mayol, étudiante de Licenciatura de la P. Universidad Católica de Chile (module BIO 296), dont j'ai été co-encadrante.

d) Analyses des données microsatellites

Indices de diversité génétique et de structure des populations et des espèces

Les indices de polymorphisme ont été estimés pour chaque population (site d'échantillonnage) et pour chaque espèce, ces dernières étant définies sur la base de la lignée mitochondriale des individus (*cf.* Chapitre 1, marqueur *atp8/trnS*). Tout d'abord, les

fréquences alléliques à chaque locus, le nombre moyen d'allèles par locus, l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e) à l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été calculés avec le logiciel GENETIX v 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 1999). Comme le nombre de génotypes finalement obtenus était variable selon les populations, nous avons également calculé des indices de raréfaction, qui permettent de comparer des échantillons de tailles différentes : la richesse allélique (nombre d'allèles) et la richesse en allèles privés (nombre d'allèles privés, observés uniquement dans une population ou une espèce donnée) ont été calculées en utilisant le logiciel HP-Rare v June-6-2006 (Kalinowski, 2005). La taille minimale d'échantillon a été utilisée pour ces calculs. Les valeurs d'indices de diversité des populations (richesse allélique, richesse en allèle privés et hétérozygotie observée) ont été comparées entre espèces en réalisant des tests U de Mann-Whitney avec le logiciel Minitab v 13.20 (State Collège, Etats-Unis), avec un seuil α fixé à 0,05.

Pour chaque population, nous avons calculé un estimateur de l'indice F_{IS} , comparant l'hétérozygotie observée avec celle attendue sous l'hypothèse de l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Les calculs et les tests de significativité ont été réalisés avec le logiciel GENETIX, avec 1000 permutations. Un F_{IS} positif et significatif peut avoir plusieurs origines : (i) la présence dans l'échantillon de groupes génétiquement différents ne se reproduisant pas de manière aléatoire (effet Wahlund) ; (ii) la reproduction entre individus apparentés (consanguinité) ; (iii) la présence d'allèles nuls, c'est-à-dire d'allèles qui ne sont pas amplifiés, causant un déficit en hétérozygotes ; et (iv) l'effet de la sélection sur certains loci. La présence d'allèles nuls et l'effet de la sélection devraient affecter un nombre limité de loci, tandis que la reproduction non aléatoire (effet Wahlund ou consanguinité) devrait affecter l'ensemble des loci.

L. nigrescens étant caractérisée par une distance de dispersion très limitée (Faugeron *et al.*, 2005 ; voir également Chapitre 1), notre échantillonnage réalisé sur 100-150 m de côte englobe probablement des groupes génétiques différents, ce qui peut provoquer un F_{IS} positif. Cependant, des valeurs de F_{IS} encore plus importantes sont attendues dans le cas d'une zone hybride bimodale (coexistence des espèces AI et PP en sympatrie, avec une hybridation nulle ou limitée), du fait d'un effet Wahlund.

La possibilité de reproduction asexuée pourrait également affecter la structure génotypique des populations. Deux types de reproduction peuvent être considérés : la reproduction clonale des sporophytes et la parthénogénèse, cette dernière se traduisant par une endoploïdisation du génome du gamétophyte femelle (apogamie non observée chez *L. nigrescens*, Oppliger *et al.*, 2007). Dans le cas de la reproduction clonale, des génotypes

multilocus répétés devraient être observés dans les populations. Dans le cas de la parthénogénèse, on s'attend à observer des génotypes multilocus homozygotes à tous les loci analysés, ces génotypes pouvant être répétés : si un même gamétophyte femelle a plusieurs descendants par parthénogénèse, comme décrit par Oppliger *et al.* (2007), ou si la parthénogénèse est à déterminisme génétique (capacité de parthénogénèse transmise d'une génération à l'autre). Nous avons donc cherché à déterminer l'importance des génotypes multilocus homozygotes à tous les loci d'une part, et répétés d'autre part. Pour cela, le logiciel API-CALC v 1.0 (Ayres et Overall, 2004) a été utilisé sur les données obtenues pour trois loci (excluant les individus avec des données manquantes). Afin d'estimer la puissance des trois loci pour différencier les individus d'une même population, nous avons calculé les valeurs minimales et maximales de la probabilité d'identité moyenne, en considérant les deux cas extrêmes de la panmixie et de croisements plein-frères. Nous avons ensuite déterminé la fréquence des quatre types de génotypes : génotypes multilocus répétés ou non répétés, homozygotes à tous les loci ou non.

Analyse des flux de gènes entre espèces et entre populations

La différenciation génétique entre paires de populations et entre groupes d'individus de lignées mitochondriales différentes (espèces phylogénétiques) a été évaluée en calculant des estimateurs des statistiques F_{ST} et R_{ST} . La statistique F_{ST} est basée uniquement sur les fréquences des allèles, le modèle de mutation sous-jacent est le modèle en sites infinis où chaque événement de mutation crée un nouvel allèle dont la taille est indépendante de celle de l'allèle progéniteur. La statistique R_{ST} est basée sur les fréquences et les tailles des allèles, le modèle sous-jacent est un modèle d'évolution pas-à-pas, où les mutations consistent en un ajout ou une soustraction d'une ou de plusieurs répétitions à un taux constant (Slatkin, 1995). Sous ce modèle de mutation, la distribution des fréquences alléliques présente une forme Gaussienne (Ellegren, 2004). Cette dernière statistique est parfois considérée comme plus appropriée pour les analyses de microsatellites, bien que le type de modèle de mutation soit difficile à établir avec certitude (Slatkin, 1995). La distribution des allèles étant unimodale pour chaque espèce, nous avons calculé les estimateurs de R_{ST} , en complément des estimateurs de F_{ST} . L'hypothèse testée est que ces estimateurs ne sont pas significativement différents de zéro, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différenciation génétique entre paires de populations testées. Le seuil α a été fixé à 0,05. Le risque de rejeter l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie augmentant avec le nombre de tests réalisés, le seuil de significativité a été ajusté selon la correction de Bonferroni ($\pi = \alpha / \text{nombre de tests}$). Les calculs et tests

statistiques ont été réalisés avec le logiciel Arlequin v 3.1.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Une analyse en composantes principales (ACP) basée sur les fréquences alléliques a été réalisée à l'aide du logiciel PCA-GEN v 1.2 (Goudet, 1999) pour représenter graphiquement les différences génétiques entre populations. La significativité des axes a été testée en réalisant 1000 permutations.

Une analyse hiérarchique de la variance moléculaire (AMOVA) a été réalisée avec le logiciel Arlequin en utilisant les statistiques basées sur les fréquences alléliques (analogues du F_{ST}) et sur les différences de taille d'allèles (analogues du R_{ST}) (Excoffier *et al.*, 1992). Le premier niveau hiérarchique testé regroupe les individus en « espèces » en se basant sur l'information apportée par le marqueur mitochondrial, le deuxième niveau est constitué par les localités, et le troisième par les individus dans les localités. Cette analyse permet de tester l'hypothèse *a priori* d'une structuration correspondant aux espèces phylogénétiques (lignées mitochondriales).

Isolement par la distance

Afin de déterminer si la différenciation génétique suit un patron d'isolement par la distance, nous avons réalisé un test de Mantel, testant l'association entre la matrice de distances géographiques et la matrice de distances génétiques. La distance géographique utilisée est la distance linéaire de côte en suivant les principales courbes du trait de côte (Annexe 2.B.3), tandis que la distance génétique a été transformée sous la forme $F_{ST}/(1-F_{ST})$ (Rousset, 1997). Le logiciel Arlequin a été utilisé pour cette analyse.

Pour tester l'hypothèse d'un gradient latitudinal de diversité au sein de la zone de contact, des tests de corrélation ont été réalisés avec le logiciel Minitab, en utilisant comme variables la distance géographique d'une part, et les indices de diversité calculés par population d'autre part. La distance considérée ici est celle entre les populations et un lieu particulier (plage d'Ermitaño, voir Résultats).

3. Résultats

a) Mise au point des marqueurs microsatellites

Des difficultés ont été rencontrées lors de la mise au point des marqueurs microsatellites, en particulier pour obtenir des loci amplifiables dans les deux espèces AI et

PP. L'un des loci testés, P11, a montré une différence d'amplification entre les espèces : 56 des 58 individus de l'espèce AI n'ont pas pu être amplifiés (Annexe 3.2). L'ensemble des loci montre un polymorphisme relativement important sur l'ensemble des échantillons analysés pour la mise au point des marqueurs, avec entre 8 et 17 allèles par locus. Le polymorphisme intra-population est cependant très variable entre les deux populations testées, suggérant des processus démographiques différents (Annexe 3.2). La plupart des loci présentent des distributions de fréquences alléliques contrastées entre les deux espèces (voir Annexe 2.4). Excepté le locus P11, tous présentent cependant des allèles qui sont partagés par les deux espèces. Le cas du locus P3 est un exemple extrême où l'allèle 115 est l'allèle le plus fréquent dans chacune des deux populations étudiées (PAz, 26°S et LC, 33°S).

b) Résultats du marqueur mitochondrial

L'étude du polymorphisme de longueur pour le marqueur mitochondrial *atp8/trnS* a été réalisée pour 291 individus de la zone de contact Aceituno-Choros et 152 individus de la zone de contact Tongoy-Pta Lengua de Vaca (ces données incluent une partie de celles déjà présentées dans le Chapitre 1). Les données concernant la zone de contact Coquimbo-Totalillo sont en cours d'obtention.

Les résultats montrent une structure en mosaïque des lignées mitochondriales dans la Région de transition (Fig. 2.B.2), chaque site échantillonné étant constitué d'individus d'une seule espèce, PP ou AI, et ce malgré un nombre important d'individus analysés par site (24 à 30). Les espèces présentent donc des aires de distribution chevauchantes entre 29°S et 30°S (Région de transition) mais restant disjointes à petite échelle spatiale (zones de contact).

Les deux zones de contact étudiées diffèrent cependant quant à la localisation de la discontinuité entre espèces. Pour la zone de contact Tongoy-Pta Lengua de Vaca, les aires de distribution des espèces sont séparées par la plage de sable de Tongoy, longue de 21km (11km en ligne directe), au sud de la péninsule de Tongoy (Fig. 2.B.2). Dans cette région d'étude, une seconde plage d'environ 2km est présente, séparant deux localités PP (Fig. 2.B.2). Dans le cas de la zone de contact Aceituno-Choros, la petite plage de sable d'Ermitaño d'une longueur d'environ 1,5km sépare les deux espèces, tandis que des plages deux à dix fois plus étendues sont présentes dans l'aire de distribution de chacune des espèces : une plage de 5km pour l'espèce AI et une plage de 17km pour l'espèce PP (plages d'Aceituno et de Choros respectivement, Fig. 2.B.2).

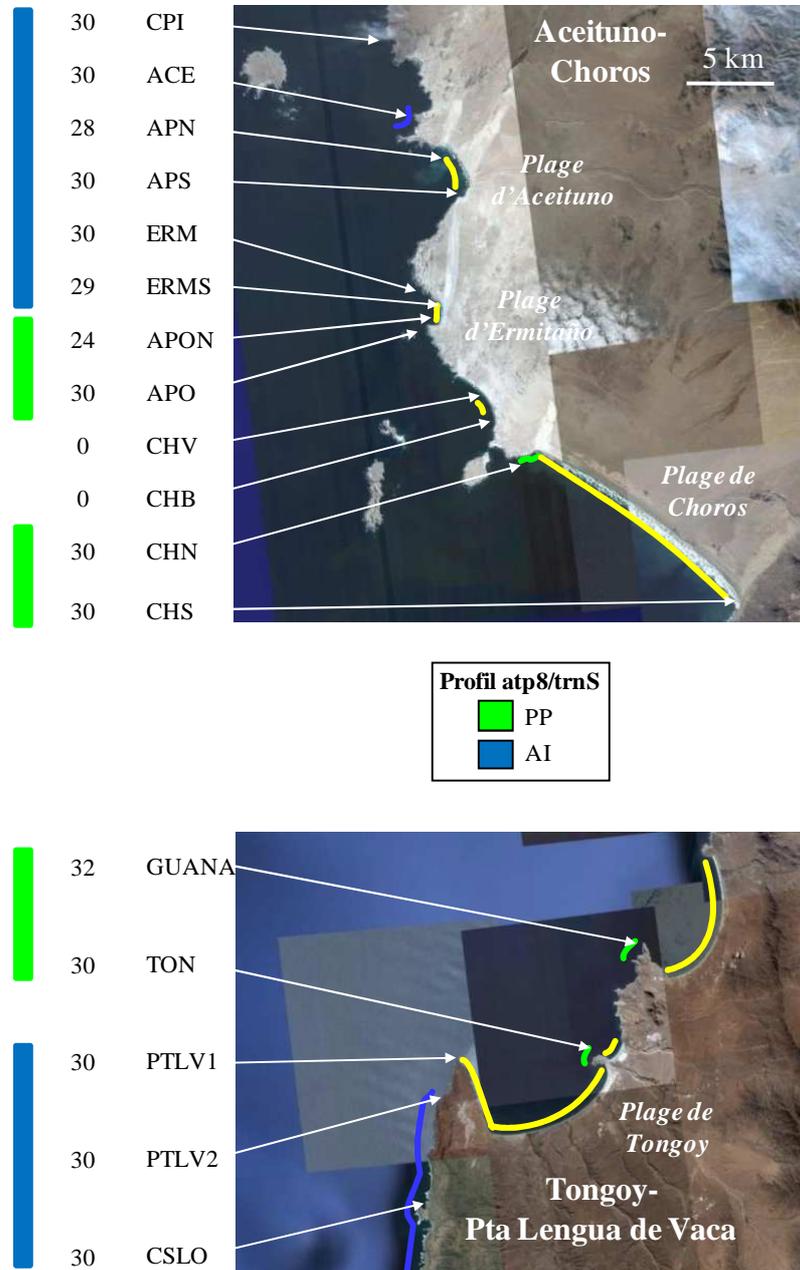


Figure 2.B.2 : Résultats de l'analyse du polymorphisme de longueur du marqueur mitochondrial atp8/trnS dans deux des zones de contact étudiées : distribution des profils. Le nombre d'individus analysés par localité est indiqué.

c) Microsatellites : données analysées

Les analyses ont été réalisées, sauf indications contraires, sur les individus pour lesquels des données ont pu être obtenues pour un minimum de deux loci parmi trois : P3, P9 et LESS1 et concernent uniquement la zone de contact d'Aceituno-Choros. Un total de 248 individus a ainsi été analysé soit, d'après les résultats obtenus pour le marqueur mitochondrial, 130 individus de l'espèce AI et 80 individus de l'espèce PP. Pour les 38 individus restants (populations CHV et CHB), l'espèce n'a pas encore été déterminée (pas de profil mitochondrial). Le nombre d'individus génotypés par population est compris entre 18 et 26, sauf pour la population ACE (13 individus).

d) Microsatellites : indices de diversité et flux de gènes entre espèces AI et PP

Absence d'allèle partagé entre espèces

La figure 2.B.3 montre la distribution des allèles pour les trois loci utilisés en fonction de la lignée mitochondriale (espèce) des individus. Les données microsatellites montrent une parfaite concordance avec les données mitochondriales : tous les allèles sont diagnostiques (ou privés), c'est-à-dire qu'ils sont exclusif d'une espèce donnée. Le locus LESS22, bien qu'analysé sur un nombre réduit d'individus (11 de l'espèce AI et 61 de l'espèce PP) montre le même patron (Fig. 2.B.4). Les distributions d'allèles sont contrastées entre espèces, avec des différences de tailles d'allèle parfois importantes (jusqu'à 7 motifs de répétitions, Fig. 2.B.3). Dans le cas du locus LESS1, un chevauchement des distributions d'allèles des deux espèces est observé, mais aucun allèle n'est partagé entre celles-ci. Les individus des populations CHV et CHB, pour lesquels l'information du marqueur mitochondrial n'est pas disponible, présentent des allèles microsatellites typiques de l'espèce PP, ce qui concorde avec leur distribution au sein de populations PP avoisinantes.

Des indices de diversité contrastés entre espèces

Les indices de diversité, calculés en utilisant les méthodes de raréfaction, montrent des différences importantes entre espèces (Tableau 2.B.1) : ils sont en moyenne significativement plus faibles dans les populations de l'espèce PP que dans les populations de l'espèce AI (richesse allélique et en allèles privés, hétérozygotie, $p < 0,05$, Tableau 2.B.1). L'espèce AI montre une richesse allélique de 11,8 allèles par locus contre 3,9 pour l'espèce PP. Des disparités importantes existent entre loci : LESS1 est le locus montrant le moins de

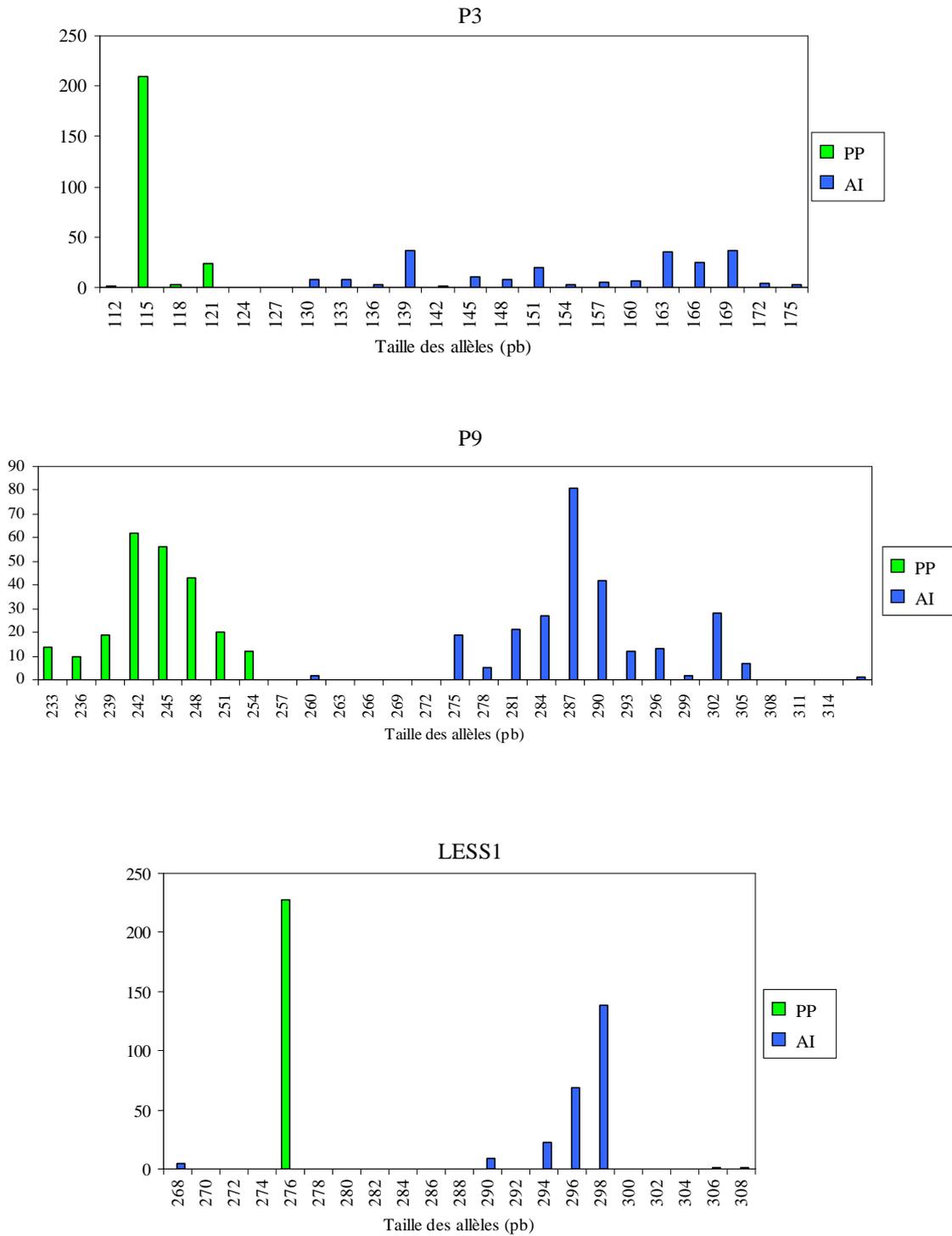


Figure 2.B.3 : Distribution des tailles d'allèles obtenus pour trois loci microsatellites dans la zone de contact Aceituno-Choros entre les espèces PP et AI (espèce déterminée d'après les données du marqueur mitochondrial).

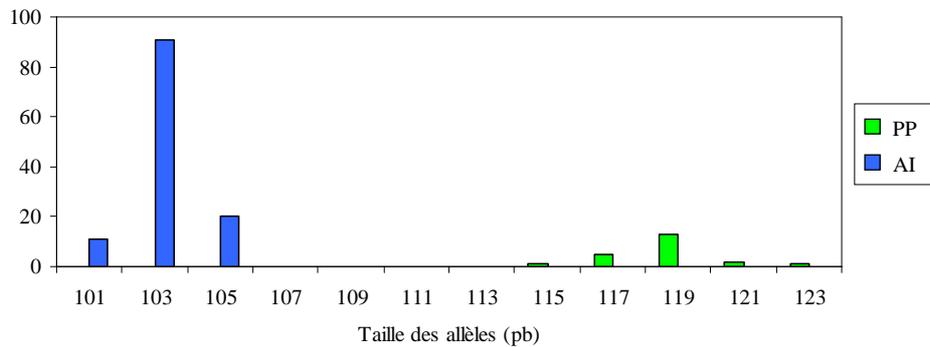


Figure 2.B.4 : Distribution des tailles d'allèles obtenus pour le locus LESS22 sur un sous-échantillonnage de la zone de contact Aceituno-Choros : 11 individus de l'espèce AI et 61 individus de l'espèce PP.

Tableau 2.B.1 : Indices de diversité des populations de la zone de contact Aceituno-Choros (marqueurs microsatellites). La richesse allélique et la richesse en allèles privés, et l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue sous l'hypothèse d'équilibre de Hardy-Weinberg (H_e) sont indiquées pour chaque population. La valeur de la statistique F_{IS} est associée à la probabilité (p) des tests d'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg (probabilité d'obtenir une valeur de F_{IS} supérieure ou égale à celle observée, sous l'hypothèse nulle d'équilibre).

Espèce	Site	Richesse allélique	Richesse en allèles privés	H_o	H_e	F_{IS}	p
AI	CPI	7,02	1,08	0,5370	0,8164	0,36358	<0,0001
	ACE	6,37	0,62	0,3154	0,7478	0,61312	<0,0001
	APN	5,25	0,14	0,5455	0,7397	0,28409	<0,0001
	APS	5,09	0,27	0,3744	0,7072	0,49087	<0,0001
	ERM	5,77	0,34	0,4688	0,6995	0,35125	<0,0001
	ERMS	4,64	0,17	0,3688	0,6119	0,41793	<0,0001
PP	APON	2,67	0,21	0,1667	0,2771	0,41985	<0,0001
	APO	2,85	0,00	0,1241	0,3014	0,60654	<0,0001
	CHV	2,98	0,06	0,3148	0,3740	0,18592	0,0600
	CHB	2,94	0,08	0,1618	0,3449	0,55180	<0,0001
	CHN	2,30	0,00	0,2167	0,2375	0,11311	0,2910
	CHS	2,82	0,00	0,2167	0,3101	0,32687	<0,0001

polymorphisme, avec une richesse allélique de 6,7 et 1 pour AI et PP respectivement, tandis que pour le locus P3, les indices varient de 16,0 à 3,8 allèles pour les deux espèces. Enfin, le locus P9 est le locus le plus polymorphe de l'espèce PP (7 allèles), tandis qu'il montre une diversité intermédiaire entre les deux autres loci dans l'espèce AI (12,7 allèles).

Indices de divergence entre espèces

Les valeurs de F_{ST} et de R_{ST} sont toutes significativement différentes de zéro pour les comparaisons entre sites d'espèces différentes (Tableau 2 de l'Annexe 2.B.5), reflétant l'absence d'allèle partagé entre lignées mitochondriales. En revanche, la différenciation entre populations d'une même espèce n'est généralement pas significative (Tableau 2 de l'Annexe 2.B.5). Les valeurs de F_{ST} entre espèces sont comprises entre 0,355 et 0,561, valeurs qui sont importantes en comparaison avec celles observées entre populations de même espèce (entre 0 et 0,250). Les valeurs de R_{ST} , prenant en compte les différences de tailles d'allèles, montrent un contraste encore plus grand : entre 0 et 0,190 pour les comparaisons intraspécifiques, entre 0,894 et 0,963 pour les comparaisons interspécifiques (Tableau 3 de l'Annexe 2.B.5).

Cette divergence majeure entre les espèces est représentée graphiquement par l'analyse en composantes principales basée sur les fréquences alléliques, confirmant une différenciation significative entre espèces (axe 1 ($p=0,001$), expliquant 85,59% de la variance totale, Fig. 2.B.5).

Enfin, l'analyse hiérarchique AMOVA réalisée sur les F -statistiques confirme encore une fois une différenciation significative entre espèces et explique encore 45,43% de la variation totale (Tableau 2.B.2; 93,89% dans le cas des R -statistiques, données non montrées). La différenciation entre populations à l'intérieur des espèces, bien que significative, n'explique que 2,65% de la variance totale. Enfin, 51,92% de la variation est expliquée par la variation génétique observée intra-population.

e) Microsatellites : analyses intraspécifiques

Diversité intraspécifique

Les populations de l'espèce AI montrent un gradient nord-sud de diversité, avec une corrélation significative entre richesse allélique des populations et la distance à la plage d'Ermitaño ($r=-0,829$, $p=0,041$), et marginalement significatif pour la richesse en allèles privés ($r=-0,798$, $p=0,057$). Ce gradient nord-sud s'observe également pour l'hétérozygotie attendue ($r=-0,940$, $p=0,005$). Les populations AI situées à proximité de la plage de séparation

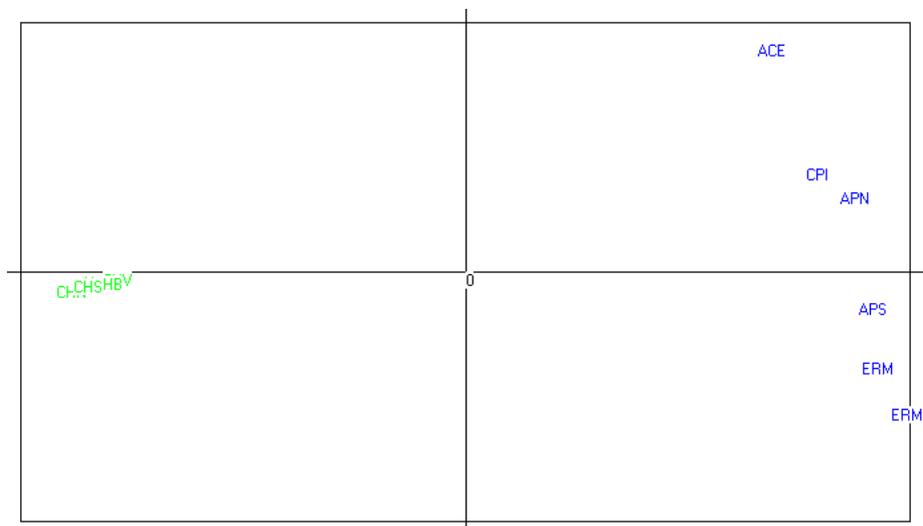


Figure 2.B.5 : Représentation des distances génétiques entre l'ensemble des populations de la zone de contact Aceituno-Choros dans un espace en deux dimensions. L'analyse en composantes principales basée sur les fréquences alléliques montre que seul le premier axe est significatif ($p=0,001$), expliquant 85,59% de la variance totale. Les couleurs symbolisent l'espèce d'appartenance des individus des différentes populations (vert : PP, bleu : AI). Les noms des populations PP sont quasiment superposés (sites APON, APO, CHV, CHB, CHN et CHS).

Tableau 2.B.2 : Analyse de variance moléculaire (AMOVA) des données microsatellites de la zone de contact Aceituno-Choros. L'analyse a été basée sur les statistiques F (basées sur la fréquence des allèles).

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés	Composantes de la variance	Pourcentage de variation (%)	Valeur de p
Entre espèces AI et PP	1	153,235	0,61046	45,43	0,00267
Entre populations à l'intérieur des espèces	10	21,643	0,03562	2,65	<0,00001
A l'intérieur des populations	484	337,658	0,69764	51,92	<0,00001
Total	495	512,536	1,34373		

des espèces montrent donc une diversité plus faible que celles plus éloignées de la zone de contact (Fig. 2.B.6, Tableau 2.B.1). Au sein de l'espèce PP en revanche, les indices sont similaires entre les populations (corrélations non significatives entre les indices populationnels et la distance à la plage d'Ermitaño, $p > 0,05$), et la richesse allélique est très faible à nulle (Fig. 2.B.6, Tableau 2.B.1).

Structure intra-population

Les valeurs de F_{IS} sont significatives pour toutes les populations, exceptées CHV et CHN (valeurs sur l'ensemble des loci : Tableau 2.B.1 ; détails locus par locus dans le Tableau 1 de l'Annexe 2.B.5).

La probabilité d'observer deux fois le même génotype multilocus pour deux individus différents dans une même population (probabilité d'identité moyenne) diminue avec le nombre de loci utilisés (Fig. 2.B.7). Les trois loci considérés montrant peu de résolution pour discriminer les génotypes dans l'espèce PP (faible polymorphisme populationnel), nous nous intéresserons plus particulièrement aux populations AI (voir Annexe 2.B.5a pour PP). Dans les populations ERMS et ERM, un excès de génotypes multilocus répétés est observé, lorsqu'on compare avec les hypothèses de panmixie et de croisements plein-frères (Fig. 2.B.8). Cette différence est moins marquée pour les populations CPI, APN et APS (tests statistiques non réalisés du fait du faible nombre d'attendus pour chaque type de génotype). Tous ces génotypes multilocus répétés dans les populations AI sont des génotypes hétérozygotes pour au moins un des trois loci (Fig. 2.B.9). Les données suggèrent également qu'il y aurait une fréquence d'homozygotes à tous les loci (génotypes répétés ou non) supérieure aux attendus sous à l'hypothèse de panmixie (voir Annexe 2.B.5a). Néanmoins, étant données les valeurs de F_{IS} importantes, il est difficile de savoir si cet excès d'homozygotes est dû à l'échantillonnage ou à un système de reproduction. La fréquence importante de génotypes répétés dans les populations ERMS et ERM correspond cependant aux attendus sous l'hypothèse de reproduction clonale.

Flux géniques entre populations

L'analyse en composantes principales (ACP) à l'intérieur de chacune des espèces révèle l'existence d'une différenciation génétique significative entre populations, expliquant 55,92% et 71,89% de la variance totale respectivement pour AI et PP (Fig. 2.B.10).

Au sein de l'espèce AI, l'axe 1 sépare les populations selon un ordre qui correspond à la latitude : depuis ERMS au sud jusqu'à CPI au nord, à l'exception de la population ACE

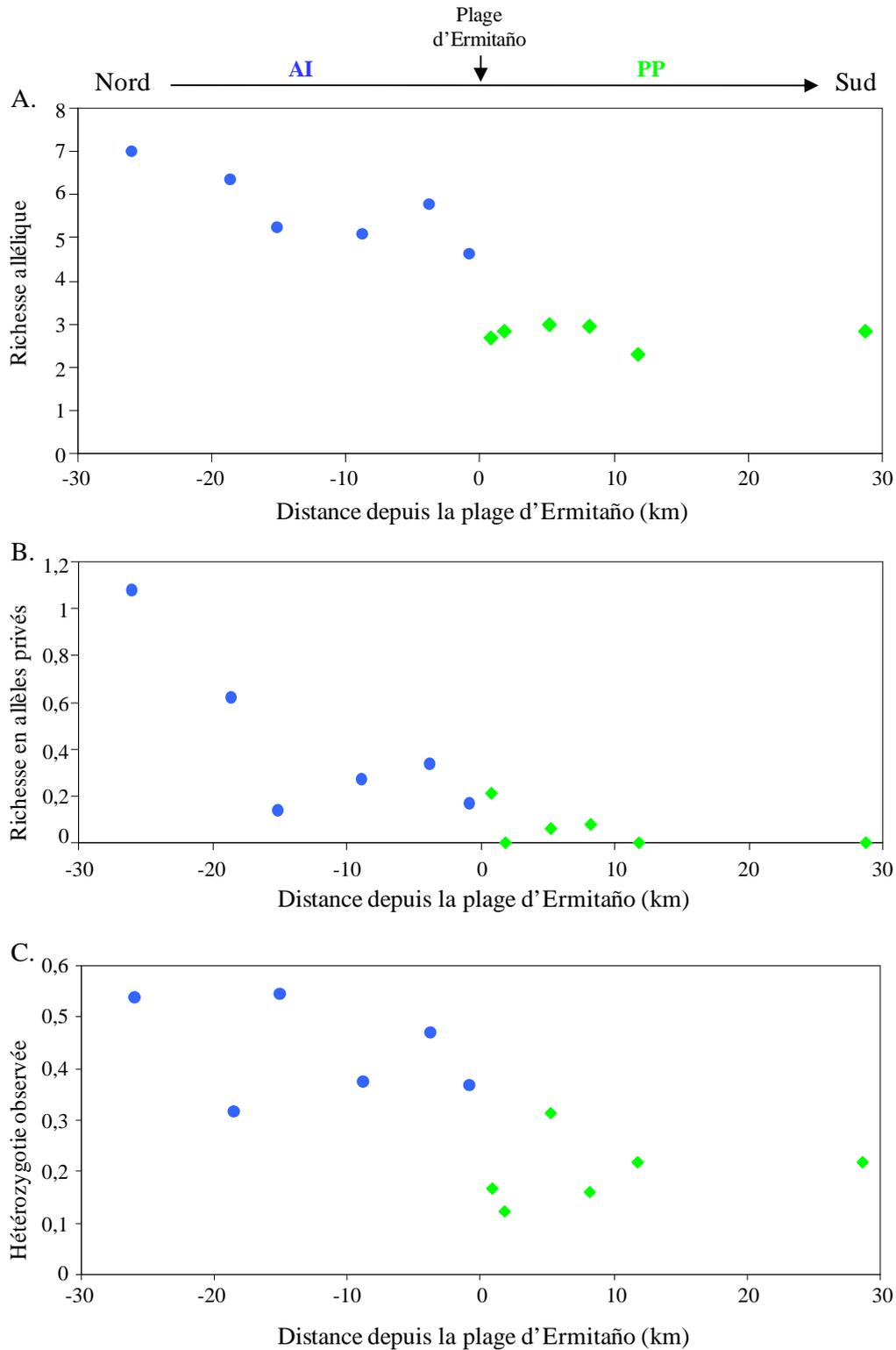


Figure 2.B.6 : Indices de diversité des populations de la zone de contact Aceituno-Choros. A. Richesse allélique, B. Richesse en allèles privés, C. Hétérozygotie observée (H_o). Les populations sont ordonnées du nord vers le sud, et la distance est exprimée en kilomètres depuis la plage de séparation des espèces (Plage d'Ermitaño), valeurs positives vers le sud et négatives vers le nord. Les couleurs symbolisent l'espèce d'appartenance des individus des différentes populations (vert : PP, bleu : AI).

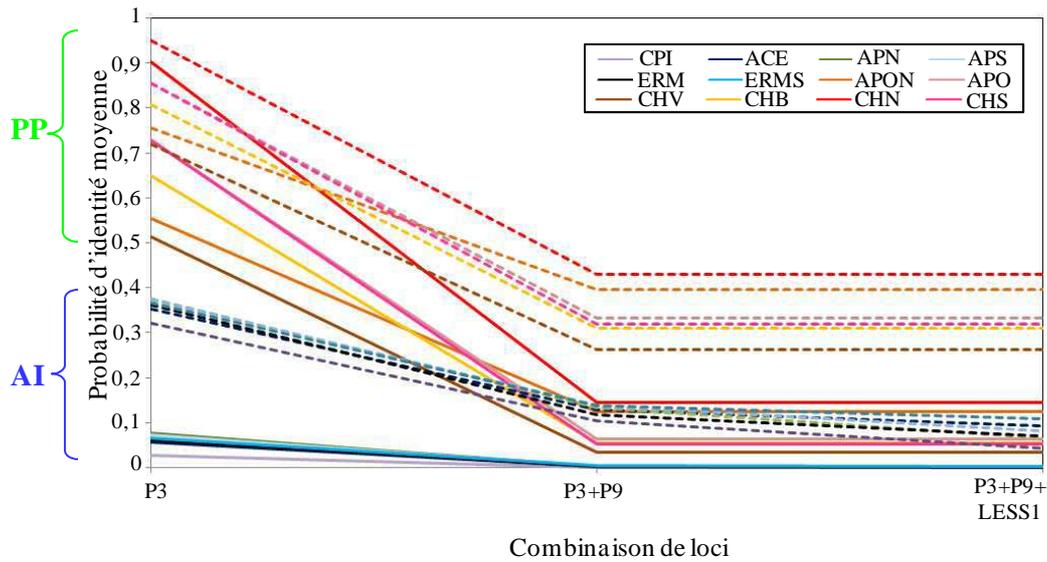


Figure 2.B.7 : Puissance des trois loci microsatellites pour différencier les individus sous l'hypothèse de panmixie (traits pleins) ou de croisements plein-frères (traits pointillés) dans les populations de la zone de contact Aceituno-Choros. La probabilité d'identité moyenne est la probabilité d'observer deux fois le même génotype multilocus pour deux individus différents dans une population. Cette probabilité diminue avec le nombre de loci utilisés.

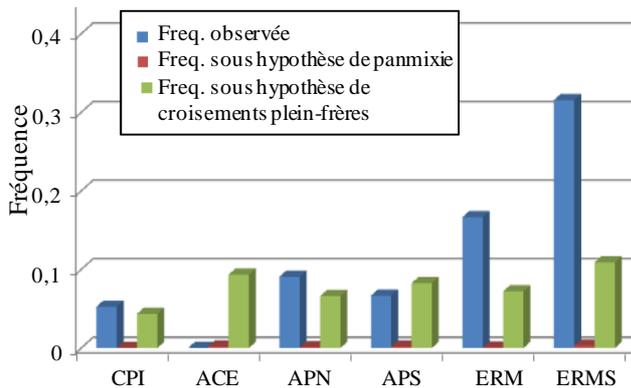


Figure 2.B.8 : Fréquence des génotypes multilocus répétés dans les populations AI de la zone de contact Aceituno-Choros. Cette fréquence (Freq.) observée est comparée avec celle attendue sous l'hypothèse de panmixie et sous l'hypothèse de croisements pleins-frères. Ici, aucun de ces génotypes répétés observé n'est homozygote pour l'ensemble des loci (voir détails sur la Fig. 2.B.9).

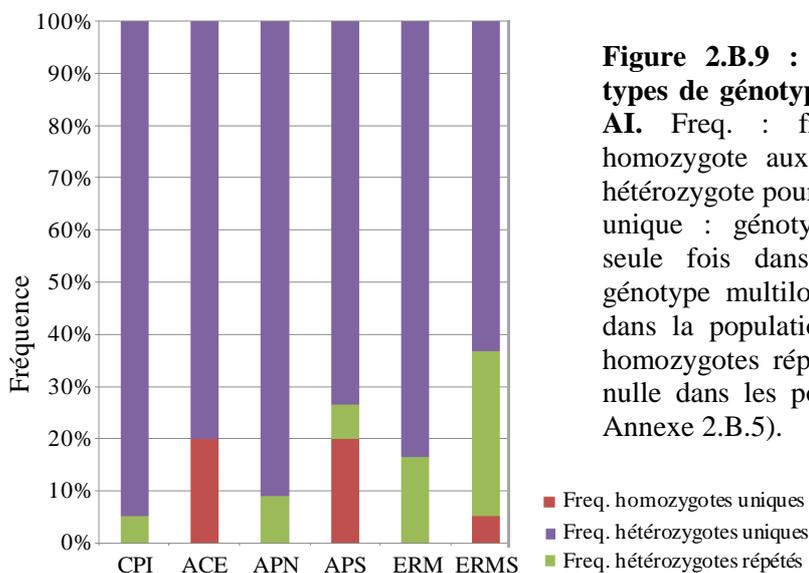


Figure 2.B.9 : Fréquences des différents types de génotypes dans chaque population AI. Freq. : fréquence ; homozygote : homozygote aux trois loci ; hétérozygote : hétérozygote pour au moins l'un des trois loci ; unique : génotype multilocus observé une seule fois dans la population ; répété : génotype multilocus observé plus d'une fois dans la population. Note : la fréquence des homozygotes répétés a été calculée, mais est nulle dans les populations d'espèce AI (voir Annexe 2.B.5).

(Fig. 2.B.10). Lorsque la correction de Bonferroni est appliquée, six valeurs de F_{ST} restent significatives (Tableau 2.B.2 de l'Annexe 2.B.5b).

Au sein de l'espèce PP, le premier axe de l'ACP sépare les populations en trois groupes : CHB et CHN dans un premier groupe, CHV, CHS et APO dans un deuxième et APON constituant un troisième groupe (Fig. 2.B.10). Les valeurs de F_{ST} sont effectivement significatives entre les paires de populations les plus distantes sur l'ACP : APON et CHB, APON et CHN ($F_{ST}=0,153$ et $0,250$, Tableau 2 de l'Annexe 2.B.5b).

Les R_{ST} calculés entre paires de populations de même espèce ne sont pas significativement différents de zéro lorsque la correction de Bonferroni est appliquée (Tableau 3 de l'Annexe 2.B.5b).

L'AMOVA réalisée en définissant les groupes sur la base de la localisation des populations AI par rapport à la plage d'Aceituno montre que la majeure partie de la variation est expliquée par la variation intra-population (94,46%) et que la structure testée n'est pas significative ($p=0,10$). Au sein de l'espèce PP, la séparation des populations en fonction de leur localisation par rapport à la plage de Choros n'est pas non plus significative ($p=0,83$).

Isolement par la distance

Etant donné la congruence des résultats microsatellites avec la définition des espèces sur la base du marqueur *atp8/trnS*, les tests d'isolement par la distance ont été réalisés au sein de chacune des espèces. Les tests de Mantel n'ont pas détecté d'isolement par la distance significatif lorsque tous les sites sont inclus ($p=0,076$ pour AI et $p=0,384$ pour PP). L'isolement par la distance est cependant important dans l'espèce AI lorsque la population ACE est exclue de l'analyse ($R^2=0,739$, $p=0,022$). Les distances génétiques entre paires de populations en fonction de la distance géographique sont représentées dans la figure 2.B.11. Cette figure permet de voir graphiquement que les barrières naturelles (plage d'Aceituno pour AI et plage de Choros pour PP) n'ont pas d'effet marqué sur les distances génétiques entre sites, résultat déjà montré par les AMOVA réalisées intra-espèce.

4. Discussion

Un isolement reproducteur complet entre espèces : concept biologique de l'espèce

L'absence d'allèles partagés entre espèces définies sur la base des lignées mitochondriales, même si le nombre d'individus et de loci dans cette étude est limité, suggère

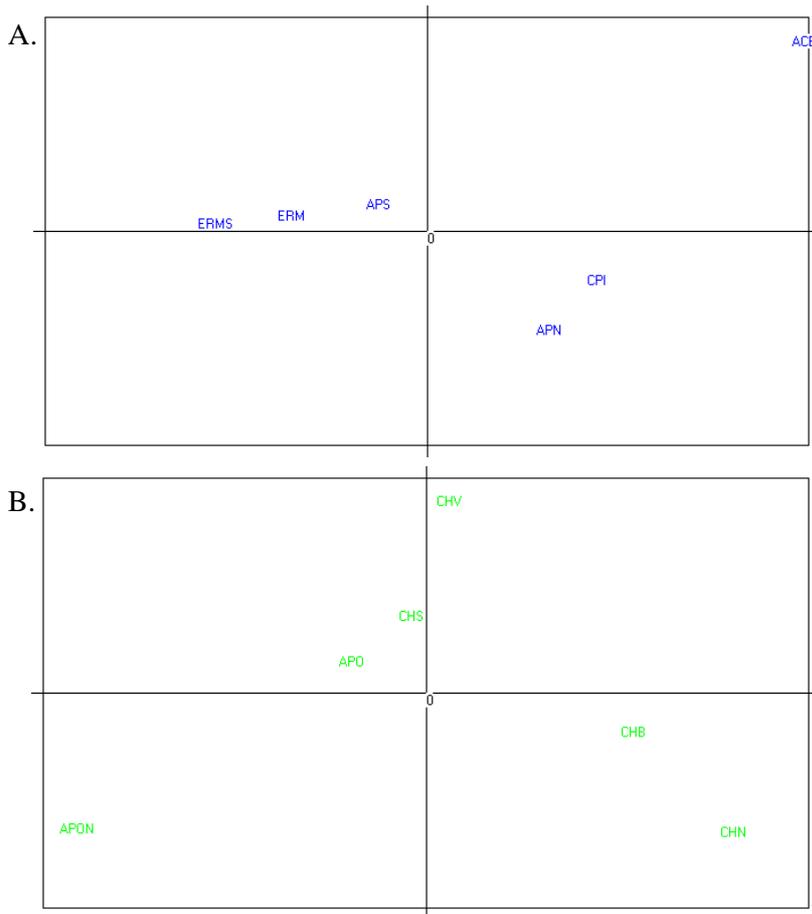


Figure 2.B.10 : Représentation dans un espace en deux dimensions des distances génétiques entre populations de l'espèce AI (A) et entre populations de l'espèce PP (B) de la zone de contact Aceituno-Choros. Les analyses en composantes principales montrent que, dans les deux cas, seul le premier axe est significatif ($p=0,018$ et $p=0,020$ respectivement), expliquant 55,92% et 71,89% de la variance totale.

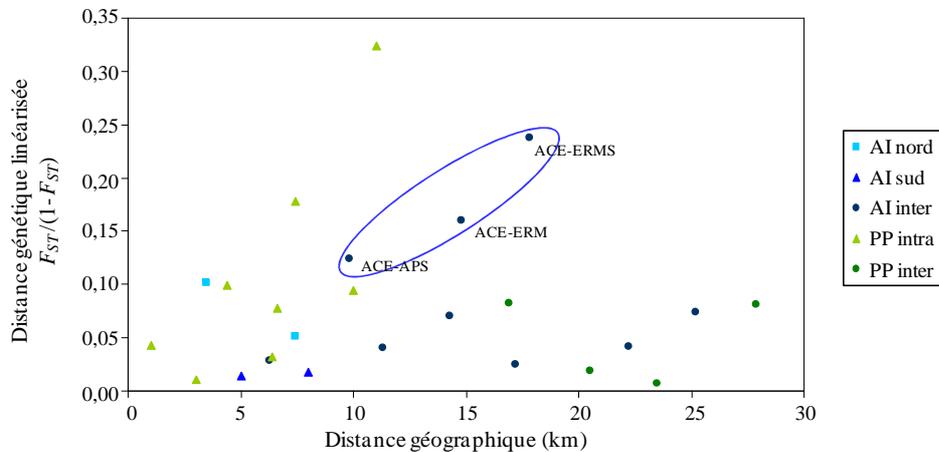


Figure 2.B.11 : Différenciation génétique entre localités composées d'individus de même espèce dans la zone de contact Aceituno-Choros en fonction de la distance géographique (données microsatellites). Pour chaque paire de localités, la distance génétique est calculée par la relation $F_{ST}/(1-F_{ST})$, et la distance géographique est la distance en suivant les principaux traits de côte. Les couleurs bleu et vert indiquent des comparaisons entre paires de populations respectivement de l'espèce AI et de l'espèce PP. L'objectif étant d'identifier le rôle des plages de sable dans la structuration intraspécifique, cinq groupes de comparaison entre populations ont été définis : AI nord : paires de populations AI situées au nord de la plage d'Aceituno ; AI sud : paires de populations AI situées au sud de la plage d'Aceituno ; AI inter : populations AI, l'une située au nord, l'autre au sud de la plage d'Aceituno ; PP nord : paires de populations PP situées au nord de la plage de Choros ; PP inter : populations PP, l'une située au nord de la plage de Choros, l'autre au sud de la plage de Choros inclus une seule population). Trois points particuliers sont indiqués, points pour lesquels la distance génétique est supérieure à celle attendue sous l'hypothèse d'isolement par la distance dans AI (voir texte) : ces trois points montrent que la différenciation génétique entre la population ACE et les autres populations AI est supérieure à celle entre populations AI séparées par une plage (AI inter).

fortement l'absence totale de flux de gènes entre les espèces dans la zone de contact Aceituno-Choros. Cet isolement reproducteur est probablement ancien, les allèles montrant des tailles contrastées entre espèces pour l'ensemble des loci, particulièrement P9 et P3. Les espèces AI et PP partagent pourtant des allèles pour tous les marqueurs lorsque des individus de l'ensemble des aires de répartition sont considérés (Annexe 2.B.4), mais de l'homoplasie peut alors être invoquée, les allèles pouvant être de même taille bien que résultant d'évènements de mutation différents. La probabilité d'homoplasie est en effet généralement proportionnelle à la distance génétique entre deux individus ou populations, en particulier pour les populations de taille efficace faible (Estoup *et al.*, 2002). La divergence entre les espèces étant ancienne (voir Chapitre 1), de telles mutations ont très probablement pu se produire.

L'absence d'allèles partagés indique donc une absence d'hybridation, permettant de conclure quant au statut d'espèces de PP et AI. Le Chapitre 1 avait mis en évidence la présence de deux espèces cryptiques au sein de l'espèce morphologique *L. nigrescens*, en se basant sur le concept phylogénétique de l'espèce. L'étude réalisée ici dans la zone de contact Aceituno-Choros permet de renforcer cette définition d'espèces cryptiques, puisqu'on peut maintenant affirmer qu'elles répondent au concept biologique de l'espèce. En attendant une description et une appellation formelle de ces espèces, elles seront appelées *espèce AI* et *espèce PP* dans la suite de ce manuscrit de thèse, le mot « espèce » ayant un sens plus large que jusqu'à présent (concepts phylogénétique et biologique).

Cet isolement reproducteur complet entre espèces-sœurs de Laminariales contraste particulièrement avec l'idée générale que les croisements interspécifiques, voire intergénériques, sont courants dans ce groupe d'algues brunes appelées « kelps ». L'utilisation de marqueurs moléculaires avait déjà montré que les croisements réalisés en laboratoire n'étaient pas toujours représentatifs de la réalité des croisements interspécifiques (confusion entre hybrides et individus issus d'apogamie ou de parthénogénèse), mais ces études avaient également montré que de telles hybridations étaient possibles en conditions de laboratoire (Liptack et Druehl, 2000 ; Kraan et Guiry, 2000 ; Kraan *et al.*, 2001 ; Druehl *et al.*, 2005). La présente étude est la première à montrer un isolement reproducteur complet entre espèces de Laminariales en conditions naturelles, qui plus est chez des espèces cryptiques sœurs (proches phylogénétiquement et non différenciables morphologiquement).

Ségrégation géographique des espèces

La caractérisation génétique avec le marqueur mitochondrial de deux des trois zones

de contact a montré qu'au sein de chaque site d'échantillonnage (100-150 m. de côte) une seule espèce est présente. Les espèces sont systématiquement séparées par des plages de sable, indiquant une absence de contact réel entre espèces. Contrairement aux attendus théoriques décrits en introduction, non seulement nous n'avons pas observé de zone hybride, mais nous n'avons pas non plus observé de zone de sympatrie. Il s'agit donc de zones de contact bimodales plutôt que de « zones hybrides ». La ségrégation géographique des espèces est d'autant plus impressionnante qu'elle est maintenue à très petite échelle spatiale, alors qu'aucune différence environnementale marquée entre localités voisines n'avait été observée lors de l'échantillonnage. Ceci ouvre de nouvelles questions : les localités AI et PP d'Aceituno-Choros sont-elles vraiment des habitats écologiquement équivalents ? En d'autres termes, les zones de contact observées correspondent-elles à des zones de tension ou à des zones d'écotone ?

Plus généralement, pour expliquer les aires de distribution des espèces AI et PP à l'échelle régionale et locale et pour inférer sur la possible stabilité temporelle de ce patron, il est nécessaire d'étudier les différences de niche écologique entre espèces d'une part, et les conditions environnementales des sites d'autre part. La partie C de ce Chapitre décrit les expériences réalisées pour étudier le rôle des facteurs environnementaux sur la distribution actuelle des espèces. L'hypothèse d'une exclusion compétitive entre les espèces, non testée ici, est une possibilité non négligeable : les espèces AI et PP peuvent avoir divergé suffisamment pour qu'il s'agisse d'espèces selon les concepts phylogénétique et biologique, mais qu'elles soient trop similaires écologiquement pour coexister en sympatrie.

Rôle des plages de sable : isolement reproducteur écogéographique

La présence de plages de sable séparant les aires de distribution des espèces à l'échelle locale suggère un rôle de barrière extrinsèque limitant fortement les flux de gènes entre espèces. Cela correspondrait à de l'isolement reproducteur écogéographique (ou isolement par l'habitat), avec absence ou restriction de la dispersion entre habitats.

La plage d'Ermitaño de 1,5km séparant les espèces dans la zone d'Aceituno-Choros peut être considérée comme étendue lorsque l'on considère la capacité de dispersion des espèces de *L. nigrescens*. Une étude des flux géniques à microéchelle (25 à 275 m.) chez l'espèce PP (localités à 20°S) a confirmé avec des marqueurs microsatellites que la dispersion est en effet très limitée : 85% des individus sont assignés à leur quadra (1m²) d'origine. Les événements de dispersion à 25, 250 et 275m sont rares (<5%) et sont équiprobables (S. Faugeron, com. pers.). La plage de 1,5km qui doit être franchie pour qu'il y ait hybridation

et/ou coexistence des espèces dans la zone d'Aceituno-Choros constitue donc certainement une barrière non négligeable à la dispersion.

A l'échelle évolutive, les plages ne sont cependant pas des barrières absolues à la dispersion et la seule présence de ces plages ne peut pas expliquer l'absence d'hybridation. En effet, de nombreuses plages sont présentes entre 18°S et 42°S (810 plages recensées par Thiel *et al.*, 2007, situées en moyenne tous les 1 à 4km), avec certaines plages atteignant 60km de long (Concepción, 38°S), sans qu'il y ait une discontinuité génétique majeure associée (Chapitre 1). D'autre part, à l'échelle de la zone de contact Aceituno-Choros, les populations de même espèce situées de part et d'autre des plages de sable (plage d'Aceituno et plage de Choros) partagent des allèles pour les loci microsattellites et ne montrent pas de différenciation génétique marquée, traduisant la perméabilité de la barrière aux flux de gènes constituée par les plages de sable (résultats des ACP, test de Mantel, statistiques F_{ST} et R_{ST}). L'isolement écogéographique contribue donc certainement à l'isolement reproducteur entre espèces, mais ne semble pas suffisant pour expliquer l'absence d'hybridation ni la non-coexistence des espèces

La capacité de reproduction asexuée est importante à prendre en compte pour expliquer les aires de distribution des espèces. En effet, en l'absence de reproduction asexuée, il est nécessaire que deux spores recrutent à proximité l'une de l'autre (distance de dispersion des gamètes mâles de l'ordre du millimètre) pour qu'il y ait fécondation et formation de sporophytes. Dans le cas d'un isolement reproducteur complet (ex : par incompatibilité gamétiques ou non-viabilité des hybrides), le gamétophyte issu par exemple de la migration d'une spore AI vers un habitat PP aurait une valeur sélective nulle, à moins que d'autres gamétophytes AI recrutent à très faible distance. Dans ces conditions, un gamétophyte femelle capable de parthénogénèse aurait une meilleure valeur sélective, ce qui se traduirait par la présence d'individus parthénogénétiques AI au sein des populations PP et inversement. La capacité de parthénogénèse a été montrée en laboratoire, mais reste à démontrer en conditions naturelles (Oppliger *et al.*, 2007). Plusieurs éléments ici nous permettent de penser que si ce mode de reproduction existe sur le terrain, il est peu fréquent : (i) Nous n'avons jamais observé d'individus AI dans des populations PP et inversement. Néanmoins, d'autres éléments pourraient limiter ces événements de migration (ex : compétition interspécifique, contre-sélection des sporophytes immigrants). (ii) La fréquence de génotypes multilocus homozygotes à tous les loci est généralement très faible dans les populations AI (inférieure aux attendus sous l'hypothèse de panmixie). Deux exceptions cependant : ACE, où le nombre d'individus doit être augmenté pour affiner les résultats, et APS. L'étude des distributions

génotypiques a cependant révélé une fréquence de génotypes multilocus répétés importante dans toutes les populations AI, suggérant alors de la reproduction clonale dans l'espèce AI, plutôt que de la parthénogénèse. Les données de l'espèce PP ne permettent pas de déterminer si le système de reproduction est similaire ou non. Ces données, bien que portant sur peu de loci et sur une zone géographique particulière, sont prometteuses pour la suite (thèse de Valeria Oppliger en cours). Dans le cadre de la présente étude, la présence de reproduction clonale semble ne pas affecter la distribution des individus, les espèces ne coexistant pas. Ce mode de reproduction est possiblement un processus agissant à l'échelle très locale (population), sans qu'il y ait d'évènements de migrations à moyenne distance.

Zone de contact Aceituno-Choros : des processus démographiques contrastés entre espèces

Les indices calculés ont montré que la diversité des populations AI est supérieure à la diversité des populations PP dans la zone de contact Aceituno-Choros. Cette différence semble liée à des processus spécifiques à la région, plutôt qu'aux espèces en général : l'analyse de deux autres populations (LC, 33°S et PAZ, 26°S) a montré en effet une diversité plus faible dans le site de l'espèce AI que dans celui de l'espèce PP pour ces populations particulières (Annexe 2.B.2).

La différence de diversité observée entre populations AI et PP dans la zone de contact Aceituno-Choros peut être expliquée par quatre hypothèses, non-exclusives :

- (i) **Histoire de la colonisation de la région** : le groupe de sites AI de la zone de contact pourrait être une relique d'une aire de distribution AI plus étendue vers le nord (englobant la région 29-30°S) ; le groupe de sites PP de cette zone, ainsi que ceux situés plus au sud (entre Choros et Tongoy), pourraient être la conséquence d'un ou de plusieurs évènements de dispersion et colonisation depuis des populations PP situées au nord de 29°S. La faible diversité observée pour les sites PP pourrait donc être expliquée par la colonisation relativement récente (liée à des effets de fondation par exemple), tandis que la diversité dans les sites AI reflèterait la diversité ancestrale. L'évènement opposé, c'est-à-dire de fondation des populations AI de la zone de contact Aceituno-Choros à partir des populations situées plus au sud ne peut cependant pas être écartée pour l'instant, en l'absence de données de diversité de populations situées hors de la Région de transition.
- (ii) **Flux de gènes contemporains entre populations AI à longue distance** : la diversité des sites AI d'Aceituno-Choros peut refléter la présence de flux de gènes depuis des populations AI situées plus au sud vers cette zone de contact, favorisés

par les courants qui s'éloignent vers le large au niveau de la Pta Lengua de Vaca et s'approchant à nouveau de la côte à la latitude de la région Aceituno (Thiel *et al.*, 2007, voir également Fig. 1.14, Chapitre 1). Cette hypothèse nécessite cependant des événements de dispersion à longue distance (60-200km).

- (iii) **Taille efficace des populations** : les processus démographiques actuels peuvent être distincts entre populations AI et PP de la zone de contact, soit en conséquence de différences environnementales à l'échelle locale, soit du fait de différences génétiques entre espèces. Ceci peut se traduire par des différences dans la durée du cycle de vie, le succès reproducteur, la possibilité de reproduction asexuée, ou encore la compétition intraspécifique. En particulier, il a pu être démontré par la suite que les régimes de variation de la température de l'eau sont distincts entre les populations ACE (AI) et CHV (PP) (voir Partie C de ce Chapitre) : l'eau plus froide dans les populations AI pourrait en effet augmenter le succès reproducteur des individus en comparaison aux sites PP, plus éloignés du centre de résurgence.
- (iv) **Régimes de perturbation** (variation temporelle de la taille efficace) : le régime de résurgence étant plus marqué vers le nord de la zone Aceituno-Choros que vers le sud, cela peut avoir un impact sur la manière dont les populations sont affectées par les événements ENSO. La diversité plus importante observée pour AI dans cette région pourrait ainsi résulter d'une stabilité temporelle plus importante que pour PP. La distribution unimodale des fréquences alléliques dans AI est un élément suggérant en effet que ce groupe de localités est à l'équilibre mutation-dérive.

L'obtention des données microsatellites pour les deux autres zones de contact étudiées devrait permettre de trancher entre ces différentes hypothèses. Les trois zones de contact diffèrent en effet par les régimes de résurgence et par l'étendue de la distribution locale de l'espèce AI, et donc probablement par la taille efficace des populations.

Zone de contact Aceituno-Choros : processus intraspécifiques

Au sein de l'espèce PP, la faible diversité dans la zone de contact ne permet pas de comparer les différents sites. Au sein de l'espèce AI, nous avons montré la présence d'un gradient de diversité décroissant selon un axe latitudinal nord-sud, axe qui correspond également à un gradient de proximité aux sites PP. Les populations AI situées en bordure d'aire (proches des populations PP : sites ERMS et ERM) montrent une diversité plus faible

que celles qui en sont éloignées. Les mesures de diversité sont donc en accord avec l'hypothèse générale que la diversité génétique des populations en limite d'aire est plus faible que celle des populations centrales, du fait des différences de pression environnementale et de l'isolement de ces populations périphériques (Eckert *et al.*, 2008). Cette tendance semble en outre accompagnée d'une augmentation du taux de reproduction clonale. Bien que ce résultat demande confirmation, il est également en accord avec les attendus théoriques d'une augmentation de la reproduction asexuée dans les populations marginales.

Les conditions environnementales particulières à cette zone de contact pourraient également renforcer cette distinction entre populations centrales et populations marginales de l'AI, si le régime de résurgence est plus prononcé vers les sites ACE et CPI au nord que vers les sites ERM et ERMS au sud. Bien que des différences de régimes de températures ont pu être montrées par la suite entre les sites CHV et ACE (Partie C de ce Chapitre), nous ne disposons actuellement pas de données sur la présence d'un gradient environnemental *entre sites AI* de la zone de contact. D'autre part, l'hypothèse que les populations ACE et CPI seraient des populations centrales nécessite d'être vérifiée : en effet, nous ne connaissons pas l'étendue vers le nord de la zone habitée par l'espèce AI, au-delà de la population CPI, la population connue PP la plus proche est celle de Huasco (HCO, 28°27'S), à 60km au nord de CPI.

Le gradient de diversité observé pour l'espèce AI dans la zone de contact Aceituno-Choros peut être expliqué à l'échelle locale, si l'on considère que les populations AI qui sont à proximité de populations PP sont des populations marginales. Cependant, lorsqu'on se place à l'échelle de l'aire de distribution globale de AI (29-42°S), l'ensemble des populations AI de cette zone de contact (29°S) peuvent être considérées comme marginales : elles sont isolées du reste des populations AI (60-200km des populations les plus proches), et sont situées dans un habitat de limite d'aire. Afin d'identifier les conséquences génétiques de cet isolement, il serait cependant nécessaire de comparer la diversité obtenue pour AI dans la zone de contact Aceituno-Choros avec celles de populations AI plus au sud.

Conclusions

L'analyse de deux zones de contact avec le marqueur mitochondrial a montré une ségrégation complète entre les espèces AI et PP, y compris à l'échelle locale. Dans la région d'Aceituno-Choros, aucune hybridation ni introgression entre espèces n'a été détectée avec les marqueurs microsatellites, suggérant un isolement reproducteur complet et ancien : **PP et AI constituent donc des espèces distinctes, non seulement suivant le concept**

phylogénétique de l'espèce, mais également suivant le concept biologique.

La présence de plages séparant les distributions locales des espèces suggère que **l'isolement écogéographique contribue partiellement à l'isolement reproducteur**, en diminuant les flux de gènes entre populations situées de part et d'autre de ces plages. Cependant, l'étude des flux de gènes intraspécifiques a montré que les plages de sables sont loin d'être des barrières *totales* à la dispersion, et **d'autres barrières reproductives sont nécessaires pour expliquer l'absence d'hybride et la ségrégation spatiale des espèces.**

C. Effets de facteurs environnementaux sur la distribution géographique des deux espèces cryptiques AI et PP de *L. nigrescens* : importance de ces facteurs pour expliquer l'absence de sympatrie dans la Région de transition

1. Introduction

a) Spéciation et sélection naturelle

L'habitat peut influencer différentes barrières reproductives prézygotiques et/ou postzygotiques, présentées dans l'introduction de ce chapitre, comme : (i) la phénologie, (ii) l'isolement écogéographique, (iii) la contre-sélection des immigrants, et (iv) la contre-sélection des hybrides liée à l'environnement (extrinsèque). L'importance de la contre-sélection des immigrants comme barrière reproductrice a été soulignée depuis peu (Rundle et Nosil, 2005 ; Nosil *et al.*, 2005, appelée « immigrant inviability »). Certains auteurs l'incluent dans la définition de l'isolement écogéographique (ou isolement par l'habitat, ex : Coyne et Orr, 2004). L'isolement écogéographique est présent quand les populations montrent des préférences héréditaires pour des habitats distincts d'une même région et échangent peu de migrants, réduisant ainsi directement la probabilité de rencontres et donc de croisements interspécifiques. Au contraire, l'isolement par contre-sélection des immigrants nécessite qu'il y ait migration entre les deux habitats : la sélection naturelle agit contre les immigrants, mal-adaptés à leur nouvel habitat, diminuant ainsi la migration efficace, et donc la probabilité de rencontre interspécifique. Cette barrière d'isolement reproducteur, bien que généralement non considérée, semble jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité des taxa et dans la structure des zones hybrides, notamment celles en mosaïque pour lesquelles les taxa montrent une adaptation à leurs habitats respectifs (Nosil *et al.*, 2005).

L'**isolement par contre-sélection des immigrants** suppose (i) une ou des différences écologiques entre habitats (facteur de sélection), (ii) une distance géographique entre habitats inférieure à la distance de dispersion des taxa, permettant la migration entre habitats, et (iii)

une divergence adaptative des taxa liée à l'habitat. **Ce dernier point se traduit par une différence de valeur sélective entre individus résidents et individus immigrants dans chaque habitat.**

b) Divergence adaptative : définitions

L'évolution de la divergence adaptative est favorisée par une hétérogénéité spatiale de l'environnement et des flux de gènes limités entre populations d'habitats différents. Les différences environnementales vont agir comme facteur de sélection divergente sur les traits liés à la valeur sélective. En l'absence d'autres forces évolutives, la sélection divergente va favoriser dans chaque population locale (dème) l'évolution de traits qui procurent un avantage sélectif dans les conditions environnementales locales (habitat), quel que soient les conséquences de ces traits sur la valeur sélective dans d'autres habitats. Les génotypes résidents dans chaque dème auront donc en moyenne une valeur sélective relative plus forte dans leur habitat local que les génotypes originaires d'autres habitats : ce processus est appelé adaptation locale (Williams, 1966 cité par Kawecki et Ebert, 2004). Cette définition de l'« **adaptation locale** » s'applique aux patrons et processus observés entre **populations locales d'une même espèce, c'est-à-dire potentiellement connectées entre elles par des flux de gènes** (Kawecki et Ebert, 2004). Nous allons donc différencier par la suite ce processus d'adaptation locale de celui de divergence entre espèces caractérisées par un fort isolement reproducteur, que nous appellerons ici « **divergence spécifique** ». Il est donc important de souligner qu'en plus du processus de divergence spécifique, peuvent se superposer des phénomènes d'adaptation locale au sein des espèces. Enfin, nous appellerons « **adaptation liée au site** » les patrons et processus de divergence observés entre individus de sites différents, indépendamment de la présence ou non de flux de gènes entre ces sites.

La définition de l'adaptation locale au sens stricte (*sensu* Kawecki, 2004) se traduit par une meilleure valeur sélective des individus résidents par rapport aux individus immigrants dans chacun des habitats (adaptation réciproque). De la même façon, on pourrait définir la divergence interspécifique d'une manière réciproque. Cependant, cette définition stricte de l'adaptation est restrictive, pour plusieurs raisons. D'une part, elle fait l'hypothèse qu'il y a des coûts symétriques à l'adaptation et à la plasticité phénotypique (voir Encadré 2.C.1), ce qui n'est pas toujours le cas (voir pour revue chez les plantes : Leimu et Fischer, 2008 ;, pour des insectes et organismes unicellulaires : Kassen, 2002). Ensuite, dans les populations naturelles, la sélection n'est pas le seul facteur en jeu. Dérive, histoire des

Encadré 2.C.1 : Etude de la divergence adaptative : aspects théoriques

Pour chaque habitat, il est possible de **représenter la différence entre les valeurs sélectives des résidents et des immigrants de manière graphique** (Fig. 1, Leimu et Fisher, 2008) : les cas où les résidents ont une meilleure valeur sélective que les immigrants seront appelés POS (positif, résidents > immigrants), les cas contraires seront appelés NEG (négatifs, résidents < immigrants). Les quatre cas possibles sont représentés dans les Figure 1a à d, avec les patrons POS et NEG correspondants.

Définition de l'adaptation réciproque et supposés

La définition stricte d'adaptation locale (*sensu* Kawecki, 2004) nécessite de comparer d'une manière réciproque entre habitats la valeur sélective des individus résidents par rapport aux individus immigrants. **L'adaptation locale au sens strict (réciproque) se définit donc par la présence d'une relation POS dans chaque habitat**, reflétant l'action de la sélection divergente et de l'adaptation locale réciproque : les normes de réaction se croisent (POS-POS, Fig. 1a).

Pour expliquer le maintien d'un polymorphisme, on suppose généralement que les allèles ont des effets opposés sur la valeur sélective dans les différents habitats (pléiotropie antagoniste), c'est-à-dire qu'il y a un **coût de l'adaptation** (compromis ou trade-off) (Kawecki, 2004). En effet, un génotype qui serait supérieur dans tous les habitats envahirait l'ensemble des habitats et la diversité ne serait pas maintenue. Pour qu'il y ait adaptation locale et maintien de la diversité, il faut également qu'il y ait **des coûts et des contraintes à la plasticité phénotypique** (Kawecki, 2004). En l'absence de ces coûts et contraintes, un génotype qui produirait le phénotype optimal dans chaque habitat serait fixé dans tous les habitats.

Autres définitions de l'adaptation

La manière de détecter de l'adaptation diverge selon les auteurs, en fonction de la définition donnée à l'adaptation, si elle est **réciproque ou non** et si elle est liée à de la sélection divergente. Cela est le cas pour les articles traitant de l'adaptation locale (voir pour revue Kawecki, 2004 ; Leimu et Fisher, 2008) et également pour les articles concernant les barrières reproductives par contre-sélection des immigrants et/ou par contre-sélection extrinsèque des hybrides (ex : Nosil *et al.*, 2005 ; Lowry *et al.*, 2008). D'un point de vue statistique, **déterminer la présence d'adaptation locale ou de divergence interspécifique non réciproque correspond à tester dans chaque habitat si la valeur sélective des individus résidents est significativement meilleure que celle des individus immigrants (relation POS), indépendamment du patron observé dans les autres habitats.**

Fréquence de l'adaptation réciproque versus non réciproque

Une méta-analyse récente des études d'adaptation locale chez les plantes herbacées terrestres réalisée par Leimu et Fisher (2008) a ainsi montré que 45,3% des études seulement montraient la présence d'une adaptation locale réciproque (POS-POS, Fig. 1a). La présence d'adaptation locale non réciproque (relation NEG-POS) est observée dans 51,4% des cas. La mal-adaptation dans tous les habitats (relation NEG-NEG, Fig. 1d) en comparaison est très peu fréquente, observée dans seulement 3,3% des cas.

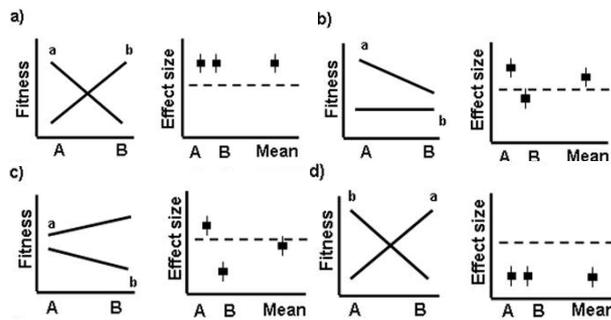


Figure 1 : Graphiques conceptuels des combinaisons possibles de normes de réaction pour la valeur sélective et les tailles d'effets correspondants. La taille d'effet mesure la différence de valeur sélective des individus immigrants et résidents (« a » ou « b ») dans un site (« A » ou « B »). Un effet positif indique que les individus résidents ont une meilleure performance que les individus immigrants. a) Cas POS-POS. b) Cas POS-NEG, moyenne des effets positive, c) Cas POS-NEG, moyenne des effets négative, d) Cas NEG-NEG.

Figure d'après Leimu et Fisher (2008).

populations et taux d'immigration sont des facteurs qui peuvent freiner l'adaptation ou conduire à des maladaptations, rompant ainsi la règle de réciprocité de l'adaptation. L'absence de réciprocité dans l'adaptation peut aussi être due à un biais expérimental, si toutes les composantes de la valeur sélective des individus n'ont pas été prises en compte (ex : expérience limitée en temps, stades de vie dont la performance n'est pas mesurable).

c) Etude de la divergence adaptative : aspects expérimentaux :

Chaque méthode d'étude de l'adaptation présentée dans l'Encadré 2.C.2 a ses avantages et inconvénients. Les transplantations réciproques permettent de tester l'ensemble des facteurs environnementaux *in situ* tandis que les expériences en conditions contrôlées ne peuvent être réalisées qu'en sélectionnant un nombre limité de facteurs environnementaux. En l'absence de différence environnementale évidente, il n'est pas toujours facile de déterminer *a priori* quels sont les facteurs environnementaux les plus pertinents, mais d'un autre côté, cela permet de les tester indépendamment ou en interaction et d'avoir une estimation de la norme de réaction selon les populations d'origine. Les transplantations réciproques sont quant à elles souvent limitées pour des raisons éthiques ou techniques. Il est parfois difficile de déterminer les différences de valeurs sélectives entre immigrants et résidents sur l'ensemble du cycle de vie si on veut éviter la reproduction des génotypes transplantés (et donc les risques d'introduction). Enfin, l'expérience d'éradication locale est particulièrement intéressante dans les cas où les habitats sont géographiquement proches, c'est-à-dire situés à une distance inférieure à la distance de dispersion moyenne de l'espèce, car elle permet de différencier la contre-sélection des immigrants due à un facteur environnemental auquel les immigrants sont mal-adaptés de l'effet de la compétition entre immigrants et résidents.

d) Objectifs de l'étude

L'objectif de cette partie a été de déterminer le rôle de la sélection divergente, liée à l'environnement, comme barrière reproductive entre les espèces AI et PP. La sélection divergente peut, à grande échelle géographique, limiter les aires de distribution des espèces et donc expliquer pourquoi la Région de transition s'étend seulement entre 29°S et 30°S. Le fait que les espèces présentent des aires de distribution disjointes et qu'elles ne coexistent pas à l'échelle locale diminue en effet la probabilité de rencontre entre gamètes hétérospécifiques, et donc contribue à l'isolement reproducteur. Ensuite, à une plus petite échelle spatiale, dans

Encadré 2.C.2 : Etude de la divergence adaptative : aspects expérimentaux

Que ce soit pour étudier les processus de spéciation (contre-sélection des immigrants) ou l'adaptation locale (à l'intérieur d'une espèce), les études expérimentales de l'adaptation utilisent trois types d'approches, qui ont pour point commun de soumettre des individus provenant des différents types d'habitats aux mêmes conditions environnementales :

- **Transplantations réciproques** : approche classiquement utilisée dans l'étude de l'adaptation locale, des zones hybrides et de la compétition interspécifique. Deux étapes : (i) Transplantation d'individus entre habitats différents, en incluant plusieurs sites par habitat. (ii) Comparaison des valeurs sélectives entre individus résidents et immigrants : adaptation locale et/ou divergence interspécifique ?
- **Expérience en conditions contrôlées** (laboratoire ou jardin expérimental) : (i) Recréer les différences écologiques entre les différents habitats, et soumettre à ces conditions des individus issus des différents habitats. (ii) Comparer les normes de réaction (interaction génotype x environnement) entre habitats d'origine pour tester l'adaptation locale, et entre espèces pour tester la divergence interspécifique.
- **Eradication locale** : approche généralement réalisée en complément des deux autres et principalement sur des espèces sessiles (plantes). Consiste à éradiquer tous les individus d'une zone délimitée et à déterminer l'origine des recrues qui recolonisent cette zone.

les zones de contact, la contre-sélection des immigrants peut agir comme barrière reproductive en limitant la migration efficace entre populations des deux espèces différentes mais géographiquement proches.

Afin d'étudier le rôle de la sélection divergente dans l'isolement reproducteur et dans le maintien de la structuration géographique observée, nous avons cherché à déterminer s'il y a contre-sélection des immigrants limitant la migration efficace entre habitats occupés par les deux espèces dans la Région de transition. Cette étude a été menée sur le stade sporophytique à l'aide d'une expérience de transplantation réciproque.

Une seconde expérience a été réalisée afin de déterminer si les deux espèces avaient une réponse différente à un certain paramètre de l'environnement, ici la température de l'eau. La valeur sélective des stades microscopiques (gamétophytes et sporophytes) a été comparée entre espèces pour différentes conditions de température en conditions contrôlées. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec Valeria Oppliger (thèse UPMC-PUCCh), qui a testé spécifiquement la réponse des populations en limite d'aire par rapport à celles situées au centre d'aire de chaque espèce. Le protocole est détaillé en Annexe 2.C.1. Les résultats de cette expérience sont en cours d'analyse et ne seront pas présentés dans ce document.

2. Matériel et Méthodes

a) Choix des sites

L'expérience de transplantation réciproque a été menée sur quatre sites (Fig. 2.C.1) . Les sites Aceituno (ACE, 29°03'S, Fig. 2.C.3) et Rio Limari (RLI, 30°44'S, Fig. 2.C.5) ont été choisis comme sites représentatifs de l'espèce AI, tandis que les sites Carrizal Bajo (CAR, 28°04'S, Fig. 2.C.2) et Choros-Ventana (CHV, 29°12'S, Fig. 2.C.4) ont été choisis pour l'espèce PP.

Afin de différencier l'effet « divergence interspécifique » (adaptation de l'espèce à son environnement) de l'effet proximité géographique, deux de ces sites ont été choisis de façon à inclure des espèces différentes mais trouvées dans des habitats très proches géographiquement, séparés par 24km : cas de ACE et CHV.

Dans la suite de ce chapitre, les sites ont été regroupés en fonction de leur habitat. Néanmoins, nous avons retenu deux définitions possibles de l'habitat, ce qui nous a amené à

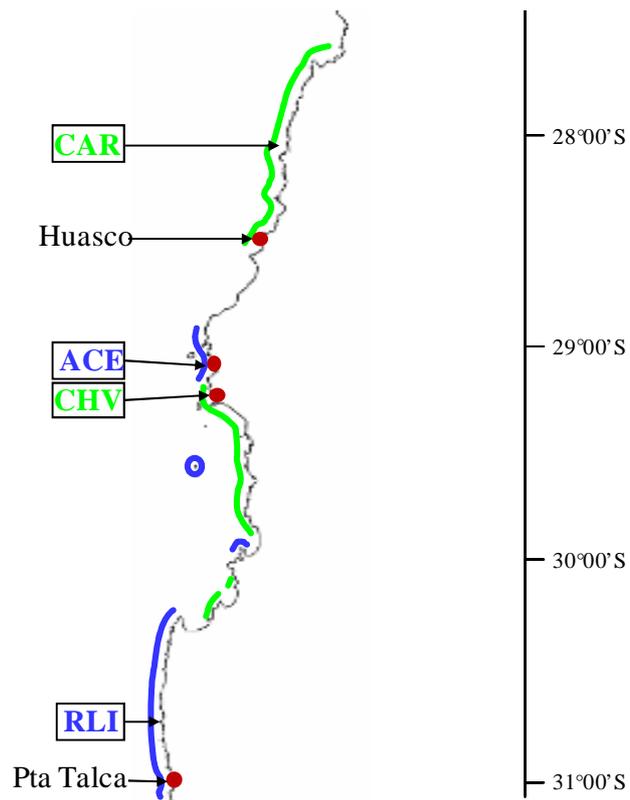


Figure 2.C.1 : Localisation des sites de l'expérience de transplantation réciproque. Les sites où des thermomètres ont été installés dans l'étage subtidal sont indiqués par un point rouge. L'aire de distribution des espèces est représentée par un trait de côte bleu (espèce AI) et vert (espèce PP).



Figure 2.C.2 : Photo d'ensemble du site Carrizal Bajo (CAR).



Figure 2.C.3 : Photo d'ensemble du site Aceituno (ACE).



Figure 2.C.4 : Photo d'ensemble du site Choros Ventana (CHV).



Figure 2.C.5 : Photo d'ensemble du site Rio Limari (RLI).

considérer deux façons de grouper les sites : soit l'habitat est défini en fonction de l'espèce qu'il héberge, soit il est défini en fonction de sa position le long du gradient latitudinal. Selon le premier critère, on appellera ici « habitat AI », les sites où l'espèce AI est présente (sites RLI et ACE) et « habitats PP » ceux où l'espèce PP est présente (sites CAR et CHV). La séparation en habitats AI et habitats PP se base sur les résultats de phylogéographie et de génétique des populations, qui ont montré qu'une seule espèce est présente dans chacun de ces sites (Chapitre 1 et Chapitre 2, partie B). Selon le critère latitudinal, on appellera « région Nord » le site CAR situé le plus au nord à 28°S, « région Sud » le site RLI situé le plus au sud à 31°S et enfin « région Centre » les sites géographiquement proches ACE et CHV situés à environ 29°S. Ici, l'hypothèse *a priori* est que les sites diffèrent par des facteurs environnementaux dépendant du gradient latitudinal, comme par exemple la température moyenne de l'eau de surface et/ou son régime de fluctuations.

b) Réalisation de l'expérience

Cette expérience lourde a pu être mise en place grâce à l'aide précieuse de l'ensemble des membres des équipes de J. Correa et S. Faugeron (PUCCh).

La technique de transplantation d'individus de *L. nigrescens* avait été préalablement mise au point par l'équipe chilienne (Correa *et al.*, 2006). Nous avons adapté le protocole expérimental initial afin de pouvoir transplanter de plus jeunes individus. Le prélèvement des individus a consisté à détacher les individus de la roche à l'aide d'une spatule afin de conserver le disque entier. Le système de fixation est composé d'une maille, de serre-flexes et de vis (Fig. 2.C.6). La maille est pliée en deux et un trou est découpé dans une des deux parties. Les frondes de l'individu sont glissées à travers le trou : le disque est alors inséré entre les deux parties de la maille. L'utilisation de serre-flexes permet de fixer correctement le disque à la maille (Fig. 2.C.6A). Des trous sont réalisés dans la roche avec une perceuse, et les transplants sont fixés à la roche grâce à deux vis inoxydables (Fig. 2.C.6B et Fig. 2.C.6C).

Choix des individus

Les individus à transplanter ont été choisis sur le terrain de façon à ce que le disque soit de taille suffisante pour être fixé sur la maille, soit un diamètre de l'ordre de 1cm à 5cm. Cette taille correspond à des juvéniles ayant un ou plusieurs stipes déjà bien individualisés de la fronde. Lors du choix des individus, la priorité a été donnée à la taille du disque, plutôt qu'à la longueur des frondes.

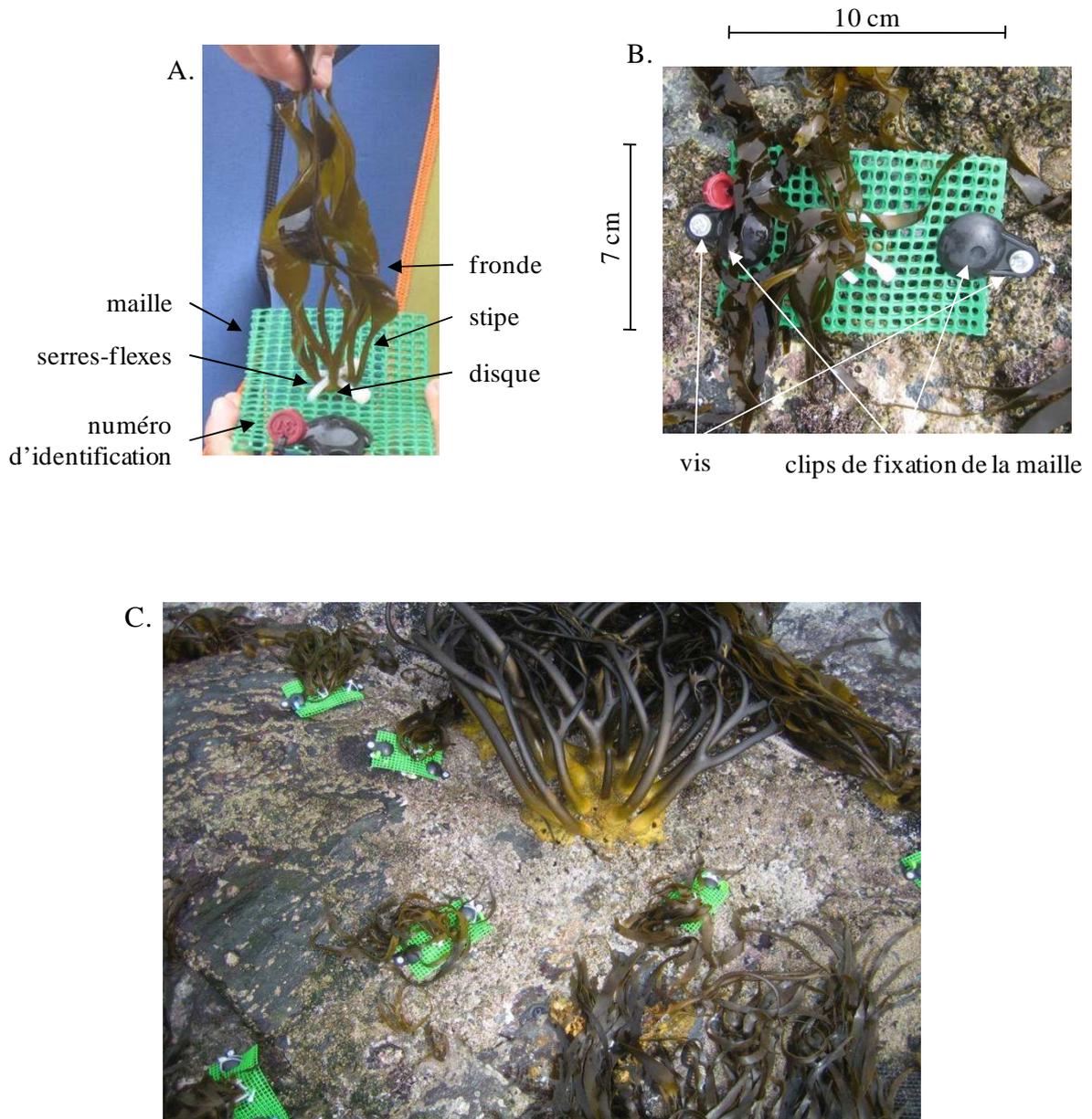


Figure 2.C.6 : Structure de l'unité de transplant et installation. A. Structure de fixation de l'individu dans la maille, B. Fixation de la maille au rocher à l'aide de clips et de vis. C. Exemple d'individus transplantés à proximité de deux individus de taille adulte.

Plan expérimental

Quinze individus ont été transplantés pour chacune des 16 combinaisons possibles de site d'origine x site de destination (Tableau 2.C.1). Ces combinaisons ont été séparées en fonction de trois critères, afin de tester les hypothèses de divergence interspécifique, d'adaptation liée au site et d'adaptation liée à la latitude : (i) les transplantations entre sites d'espèces différentes (« inter ») *versus* les transplantations entre sites d'une même espèce (« intra ») ; (ii) des transplantations « auto », où le site de destination et le site d'origine sont les mêmes *versus* les transplantations « allo » (autres combinaisons) ; et (iii) des transplantations « autoLat » pour lesquelles le site d'origine et le site de destination sont de la même région latitudinale *versus* des transplantations « alloLat » (autres combinaisons).

L'ensemble des transplantations a été réalisé entre les 22 et 25 janvier 2008. Une forte mortalité a été enregistrée lors du suivi réalisé un mois après la transplantation (19-23 février). Afin de distinguer les effets de l'environnement (effets testés) des effets de la manipulation (imprévu de terrain), les individus morts en février ont été remplacés lors des premiers suivis (février et mars), de façon à obtenir 15 individus transplantés par combinaison.

Afin de choisir des sites favorables au recrutement et à la croissance de *L. nigrescens*, les transplants ont été installés à proximité d'individus adultes de l'espèce, sur le même étage de l'estran (position géographique des individus détaillée en Annexe 2.C.2a à d).

Afin de limiter la pollution génétique, nous avons retiré les transplants non-originares du site (« allo ») lorsqu'ils devenaient matures.

c) Suivis des transplants

Les suivis ont consisté à évaluer tous les mois des paramètres de la valeur sélective des individus : la survie, la croissance et la maturité. Nous avons défini cinq états possibles pour chaque transplant :

- *V* : vivant, avec présence de disque, stipes et frondes
- *E* : présence de stipes et du disque, sans frondes
- *D* : disque seul
- *N* : rien (absence de disque)
- *A* : maille absente, cassée (donnée manquante)

Les catégories *E* et *D* ont été définies afin de détecter une éventuelle régénération à partir des stipes ou même du disque en l'absence de frondes. Une telle régénération avait en effet été montrée chez *L. nigrescens* (espèce AI), mais après quelques mois la partie régénérée

Tableau 2.C.1 : Ensemble des combinaisons de site de destination et site d'origine testées.
 L'espèce correspondant aux sites est indiquée ainsi que le type de transplantation réalisée en fonction de l'espèce et de l'habitat, du site d'origine et du site de destination (SiteOri/SiteDest) ou de la latitude d'origine et de destination (LatOri/LatDest).

Destination		Origine		Type de transplants					
Site	Habitat	Site	Espèce	Fonction espèce/habitat		Fonction SiteOri/SiteDest		Fonction LatOri/LatDest	
				Intra	Inter	Auto	Allo	AutoLat	AlloLat
CAR	PP	CAR	PP	x		x		x	
CAR	PP	ACE	AI		x		x		x
CAR	PP	CHV	PP	x			x		x
CAR	PP	RLI	AI		x		x		x
ACE	AI	CAR	PP		x		x		x
ACE	AI	ACE	AI	x		x		x	
ACE	AI	CHV	PP		x		x	x	
ACE	AI	RLI	AI	x			x		x
CHV	PP	CAR	PP	x			x		x
CHV	PP	ACE	AI		x		x	x	
CHV	PP	CHV	PP	x		x		x	
CHV	PP	RLI	AI		x		x		x
RLI	AI	CAR	PP		x		x		x
RLI	AI	ACE	AI	x			x		x
RLI	AI	CHV	PP		x		x		x
RLI	AI	RLI	AI	x		x		x	

finissait par se détériorer et l'individu par mourir (Westermeyer *et al.*, 1994). Dans le cas des individus *vivants*, la longueur totale des frondes et le diamètre maximal du disque ont été mesurés afin d'estimer leur croissance. La présence de sores a été recherchée sur les frondes pour estimer la maturité de ces individus à partir du troisième mois d'observation.

d) Traitement préalable des données

Les analyses statistiques des données (analyses préalables et analyse de l'expérience) ont été réalisées à l'aide du logiciel STATISTICA v 7.0 (Tulsa, Etats-Unis) et les graphiques réalisés avec le logiciel Minitab v 15 (State Collège, Etats-Unis).

Comparaison des tailles initiales entre sites d'origine

Lors de l'installation des transplants, nous avons remarqué qu'il était difficile de trouver des individus de même longueur de frondes pour un diamètre de disque fixé au préalable dans tous les sites : les individus provenant du site CAR en particulier semblaient être en moyenne plus grands que ceux des autres sites, quelque soit le mois de transplantation (janvier à mars). Une analyse de comparaison des tailles initiales (longueur totale des frondes et diamètre maximal du disque) a donc été réalisée en regroupant tous les individus mesurés en janvier (date où le plus de transplantations ont été réalisées), indépendamment de leur état en février (mort/vivant). Un test de comparaison de moyennes non paramétrique (test de Kruskal-Wallis) a été réalisé pour déterminer l'effet espèce et l'effet du site d'origine sur la taille initiale des individus.

Comparaison des tailles initiales entre sites de destination pour chaque site d'origine

Afin de détecter un éventuel effet de l'environnement (site de destination) sur les individus, il est essentiel de vérifier que, pour un site d'origine donné, les tailles initiales des individus ne diffèrent pas entre sites de destination. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour tester l'effet du site de destination sur la taille initiale des individus. Les deux variables utilisées sont la longueur totale des frondes et le diamètre maximal du disque.

Traitement des données brutes avant analyse statistique

Avant analyse statistique, les individus n'ayant pas été observés vivants à l'observation suivant leur transplantation ont été éliminés du jeu de donnée. En effet, il n'est pas possible de déterminer s'il s'agit d'une mortalité due à la manipulation des individus

(stress lors du transport par exemple) ou d'une mortalité due à l'expérience.

Les états N (absence de restes de l'individu) et A (absence de maille) ont été pris en compte de différentes façons, dépendant du suivi antérieur :

- V au suivi antérieur : N et A sont considérés comme « données manquantes » pour l'ensemble de relevés suivants, car il n'est pas possible de savoir s'il s'agit d'une mortalité due à la mal-adaptation au milieu ou à un problème technique lié à la transplantation, comme par exemple un détachement accidentel de l'individu (N) ou de la maille (A).
- E ou D au suivis antérieur : N et A ont été considérés comme mort de l'individu.

Enfin, les individus matures éliminés pour éviter la contamination génétique ont été considérés comme « données manquantes » aux observations suivantes, sauf indication contraire (variable de survie). Les transplantations ayant été réalisées à trois dates différentes, la durée des suivis (variable retenue pour les analyses) a donc varié entre cinq (transplants de mars) et sept mois (transplants de janvier) ; seules les données des cinq premiers mois de suivis de chaque individu ont été considérées pour les analyses.

Traitement des variables

La **survie** des individus a été codée pour chaque mois d'observation : 1 = individu vivant, 0 = individu mort, D ou E . Les individus qui ont été retirés de l'expérience car arrivés à maturité ont été considérés comme *vivants* pendant les mois suivants : ces individus ont bouclé le cycle de vie, et ont donc une valeur sélective maximale. Trois variables de survie ont été obtenues, correspondants aux temps 3, 4 et 5 mois après transplantation.

Les nombres d'individus **matures** et non matures ont été obtenus pour chaque temps (3, 4 et 5 mois). Les individus matures éliminés avant le 5^{ème} mois ont été considérés matures les mois suivants.

La **croissance** des individus a été estimée à partir des pentes de leur courbe de croissance. Ces courbes représentant la longueur de chaque individu au cours du temps après transplantation suggèrent la présence de deux types de réponses suivant les individus : (i) une droite linéaire, de pente positive ou négative, et (ii) une courbe avec décroissance suivie d'une croissance linéaire. La décroissance initiale étant observée juste après transplantation, nous l'avons interprétée comme une période d'acclimatation. Pour chaque individu, nous avons utilisé la régression linéaire pour estimer la pente de croissance et l'ajustement du modèle aux données (R^2), en incluant et en excluant la donnée de longueur au moment de la

transplantation. La comparaison des valeurs de R^2 nous a permis de choisir le meilleur modèle, incluant ou non la phase d'acclimatation, pour chaque individu (voir Annexe 2.C.3 pour la présentation de la méthode).

e) Hypothèses spécifiques testées

Résumé du plan d'expérience

Le plan de l'expérience consiste donc en quatre sites (CAR, ACE, CHV et RLI), utilisés à la fois comme sites d'origine des individus et comme sites de destination, soit 16 combinaisons possibles de site d'origine x site de destination (Tableau 2.C.1). Les individus peuvent être regroupés en fonction de l'espèce (origines ACE et RLI pour l'espèce AI, CAR et CHV pour l'espèce PP) et de l'habitat de destination (destinations ACE et RLI pour Habitat AI et CAR et CHV pour Habitat PP), soit 4 combinaisons espèce x habitat. Le regroupement en fonction de la latitude considère trois régions latitudinales d'origine et de destination (Nord = CAR, Centre = ACE et CHV, Sud = RLI), soit 9 combinaisons possibles.

Hypothèses testées

Afin de tester l'adaptation et la contre-sélection à différentes échelles (sites, habitats et régions latitudinales), nous avons défini trois groupes d'hypothèses à tester.

Le premier groupe d'hypothèses (H1) teste la présence de différences écologiques entre destinations (condition nécessaire à la divergence adaptative). La destination a été considérée à l'échelle des sites, des habitats ou des régions latitudinales :

- H1a : il y a des différences environnementales entre sites (de destination)
- H1b : il y a des différences environnementales entre habitats
- H1c : il y a des différences environnementales entre régions latitudinales (de destination).

Le second groupe d'hypothèses (H2) teste la divergence adaptative entre origines (contre-sélection des immigrants). Comme précédemment, trois échelles (sites, espèces et régions latitudinales) ont été prises en compte :

- H2a : il y a adaptation liée à l'espèce (divergence interspécifique) : individus résidents = individus de la même espèce que la population naturelle du site où ils sont transplantés (« intra », Tableau 2.C.1). Individus immigrants = individus de l'autre

l'espèce (« inter », Tableau 2.C.1).

- H2b : il y a adaptation liée au site (résidents = « auto » *versus* immigrants = « allo », Tableau 2.C.1).
- H2c : il y a adaptation liée à la latitude (résidents = « autoLat ») *versus* immigrants = « alloLat »).

Enfin, un troisième et dernier groupe d'hypothèses (H3) teste la signification des différents types de regroupements effectués, ou en d'autres termes, l'homogénéité des sites au sein des habitats ou des régions :

- H3a : le regroupement des sites en habitats est valide, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence environnementale entre sites de destination au sein d'un habitat donné. Cela se traduit par une absence d'effet du site de destination sur la valeur sélective et par une absence d'effet de l'interaction entre site d'origine et site de destination sur la valeur sélective au sein de chaque habitat.
- H3b : le regroupement des sites en régions latitudinales est valide, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence environnementale entre sites de destination composant une région latitudinale donnée. Comme pour l'hypothèse H3a, cela se traduit par une absence d'effet du site de destination et de l'interaction avec le site d'origine sur la valeur sélective au sein de chaque région latitudinale de destination.

f) Caractéristiques des tests statistiques réalisés

Jeux de données utilisés

Les tests de différences environnementales entre destinations (H1a, b et c) ont été réalisés sur l'ensemble du jeu de données.

La contre-sélection des immigrants étant un processus qui dépend des conditions environnementales du site, nous avons réalisé les tests de divergence adaptative (H2a et b) en divisant le jeu de données en fonction du site de destination des individus. Quatre tests ont donc été réalisés pour chaque hypothèse.

Le test de la validité du regroupement en habitats (H3a) a été réalisé de façon séparée pour chaque habitat. La validité du regroupement en régions latitudinales (H3b) a été testée uniquement pour les données de la région Centre, seule région composée de plus d'un site de destination.

Analyse des variables catégorielles : analyse log-linéaire

Les tests d'indépendance, ou tests d'association, ont pour but de tester l'indépendance entre les variables catégorielles composant un tableau de fréquences. L'analyse se base sur le principe du calcul des fréquences des cases du tableau à partir des fréquences marginales (totaux des lignes et des colonnes) sous l'hypothèse que les facteurs sont indépendants (hypothèse nulle). Si l'écart entre les fréquences attendues sous l'hypothèse nulle et les fréquences observées est significatif, les facteurs ne sont pas indépendants. Afin de tester cet ajustement du modèle aux fréquences observées, deux statistiques peuvent être utilisées : la statistique traditionnelle du Chi-carré et la statistique du Chi-carré de Maximum de Vraisemblance (Maximum Likelihood ou ML Chi-carré), également appelée statistique-*G* (Sokal et Rohlf, 1981). Cette dernière statistique est recommandée par rapport au Chi-carré traditionnel pour des raisons théoriques, du fait de ses propriétés additives (Sokal et Rohlf, 1981). Le modèle log-linéaire permet, à partir d'une transformation logarithmique, de tester l'indépendance entre plus de deux facteurs (tableaux à entrées multiples) et de reformuler l'analyse dans des termes similaires à ceux de l'analyse de variance (ANOVA). Une limitation cependant des tests d'indépendance est qu'ils ne permettent pas de tester les effets des variables emboîtées. Dans le cas de l'expérience de transplants, cette restriction est importante : les sites de destination sont emboîtés dans les habitats (ou régions latitudinales) et les sites d'origine dans les espèces. L'analyse nécessite alors de tester les variables séparément, sans prendre en compte l'emboîtement.

Dans le cas de tableaux à entrées multiples (avec plus de deux variables), une procédure en deux étapes a été utilisée, comme recommandé par les auteurs du logiciel STATISTICA : (i) test des niveaux d'interaction, afin de déterminer le degré de complexité du modèle, et (ii) test des associations partielles et marginales, permettant d'identifier les interactions significatives. Ces deux étapes permettent de déterminer quels sont les effets significatifs à inclure dans le modèle. Prenons un exemple d'un tableau de contingence avec trois facteurs 1, 2 et 3. La première étape va consister à tester la significativité des interactions de niveau 2 (interactions 1x2, 1x3 et 2x3) d'une part, et celle des interactions de niveau 3 d'autre part (interaction 1x2x3). Dans le cas de l'interaction de niveau 2, par exemple, les modèles comparés sont H_0 = modèle sans interaction de niveau 2 et H_1 = modèle incluant toutes les interactions de niveau 2. La comparaison de l'ajustement des données aux deux modèles permet d'obtenir une valeur de ML Chi-carré et une valeur de *p* associée : si celle-ci est inférieure au seuil α fixé, l'ajustement du modèle aux données est meilleur lorsque l'on ajoute les interactions de niveau 2, c'est-à-dire qu'au moins une des

interactions de niveau 2 est significative et doit être incluse dans le modèle. La deuxième étape a pour but de déterminer quelles sont ces interactions significatives, à l'aide de deux tests. Le test d'association partielle compare l'ajustement aux données des modèles suivants : (1) le modèle incluant toutes les interactions de même niveau que celle testée et (2) le modèle incluant toutes les interactions de même niveau que celle testée, à l'exception de l'interaction testée. Le test d'association marginale compare l'ajustement aux données des modèles suivants : (1) le modèle sans aucune interaction du niveau de celle testée (mais incluant celles d'ordre inférieur) et (2) le modèle incluant uniquement l'interaction testée et aucune autre de même niveau. Pour ces deux tests, une valeur de $p < \alpha$ indique que l'interaction testée est significative et doit être incluse dans le modèle.

Dans le cas de tableaux de contingence à deux variables (une variable explicative et la variable de réponse), l'analyse log-linéaire revient à comparer l'ajustement du modèle d'indépendance des variables (hypothèse nulle) par rapport à celui de dépendance, et donc à tester simplement la significativité de l'interaction de niveau 2.

L'analyse log-linéaire a été utilisée pour les variables de réponse catégorielles, c'est-à-dire la survie et la maturité, toutes les deux codées de manière binaire. Les résultats montrant la présence de conditions non-réalisées (cases du tableau de contingence avec aucun individu), nous avons utilisé l'analyse log-linéaire plutôt que la régression logistique, bien que la première ne permette pas de considérer l'emboîtement des variables. Pour ces analyses avec le logiciel STATISTICA, nous avons utilisé la procédure itérative, permettant l'analyse de plus de deux variables. Le nombre d'itérations par défaut (50, avec un critère de convergence de 0,01) a été suffisant pour l'ensemble des tests réalisés pour atteindre la convergence, assurant une bonne précision de l'analyse. Comme recommandé par les auteurs du logiciel dans le cas d'échantillons de petite taille, nous avons utilisé la correction Delta, avec $\Delta = 0,5$. Cette correction consiste à ajouter cette constante à toutes les fréquences observées du tableau, avant analyse. Cette correction, analogue à celle de Yates pour la continuité, est cependant considérée comme très conservatrice par Sokal et Rohlf (1981 et références incluses).

Analyse des variables continues : tests de Kruskal-Wallis

Pour l'analyse des données de croissance, nous avons utilisé le test de Kruskal-Wallis, qui compare les médianes des échantillons, après une transformation en rangs des valeurs. Nous avons privilégié ce test non-paramétrique à l'ANOVA du fait du faible nombre d'individus dans les échantillons (entre 8 et 15). Il n'existe cependant pas de test non-

paramétrique qui permettrait de tester l'effet de deux variables explicatives et de leur interaction sur la variable de réponse dans le cas d'échantillons indépendants.

Dans le cas où plus de deux conditions sont comparées (ex : effet du site d'origine), nous avons réalisé des comparaisons multiples entre paires d'échantillons, celles-ci permettant de tester les hypothèses du groupe 3 (validité des regroupements de sites).

g) Analyse des conditions environnementales

L'expérience de transplantation a été réalisée de janvier à août 2008. D'après les relevés du Service Climatique des Etats-Unis (National Weather Service), entre janvier et juin les conditions océanographiques correspondaient à un événement La Niña d'intensité importante, avec un pic en février 2008. Les conditions sont redevenues neutres dans le courant du mois de juin, et ont persisté jusqu'à la fin de l'expérience (août). L'indice multivarié ENSO représenté dans la figure 2.C.7 est basé sur six variables principales observées dans la région tropicale du Pacifique. Ces six variables sont la pression au niveau de la mer, les composantes méridionale et zonale des vents de surface, la température de l'eau et de l'air de surface et la surface de ciel sans nuage (Wolter et Timlin, 1998).

Afin d'estimer la température de l'eau dans les sites utilisés pour l'expérience, nous avons utilisé des thermomètres installés dans le haut de l'étage subtidal. Les données de température proviennent de la « Estación Costera de Investigaciones Marinas » (ECIM, PUCCh), auxquelles nous avons ajouté des données acquises pour le site Aceitno (ACE). L'ensemble des données analysées couvre 16 sites répartis entre 28°S et 34°S (Annexe 2.C.7) et une période comprise entre le 29 août 2007 et le 3 juillet 2008. Les thermomètres sont localisés dans le site même de transplantation pour CHV et ACE, tandis que les données de Huasco (HCO, 28°27'S, situé à 50km au sud de notre site de transplantation CAR) et de Punta Talca (PTAL, 30°55'S, situé à 20km au sud de notre site de transplantation RLI, Fig. 2.C.1) seront utilisées pour inférer sur les températures de ces sites CAR et RLI. Treize des 16 sites avaient été inclus dans l'analyse de phylogéographie (Chapitre 1). Les trois sites restants ont été considérés comme des sites AI, du fait de leur latitude (31°S-33°S) et de la présence de sites AI à proximité (sites : POSC, Puerto Oscuro, Huenteláucen, HUEN, et QUINTAY, voir détail des sites en Annexe 2.C.7). L'analyse des données de températures de l'eau a eu pour objectif de déterminer si les régimes de variation de température sont similaires entre sites de transplantation, et plus généralement entre sites habités par la même espèce.

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée (procédure PROC

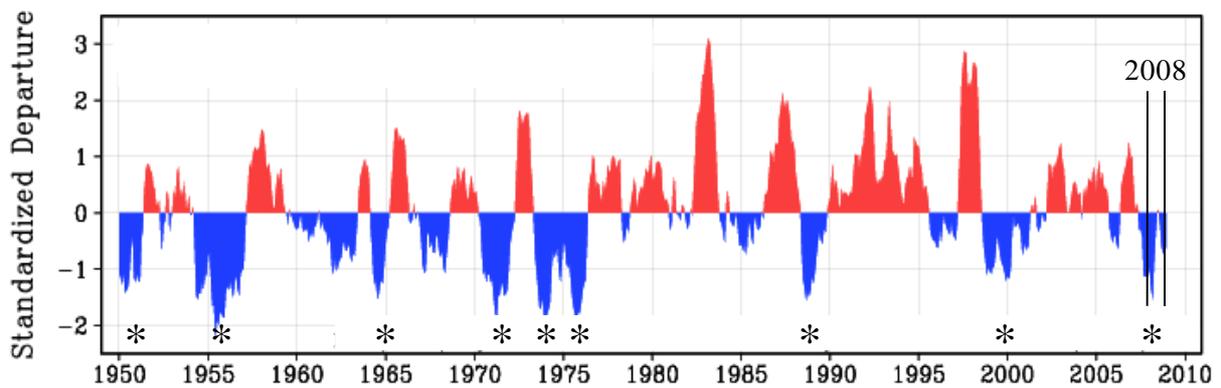


Figure 2.C.7 : Comparaison des valeurs de l'indice ENSO multivarié (prennant en compte six variables environnementales, voir texte) entre 1950 et 2008. La période de l'expérience de transplantation (janvier à août 2008) apparaît comme un évènement La Niña « historique ». Les valeurs négatives de l'indice, en bleu, représentent la phase froide de ENSO (La Niña), tandis que les valeurs positives, en rouge, représentent la phase chaude (El Niño). Les évènements La Niña considérés comme « historiques » (majeurs) sont indiqués par un astérisque. Source: NOAA/ESRL/Physical Science Division – University of Colorado at Boulder/CIRES/CDC.

PRINCOM du logiciel SAS, Cary, Etats-Unis) en considérant comme variables les moyennes thermiques journalières de chaque site, sur l'ensemble du jeu de données d'une part, et sur un jeu de données excluant les mois d'hiver d'autre part (avril à août inclus). Pour chaque paire de localités, un coefficient de corrélation non-paramétrique de Pearson a été calculé. Un test de Mantel a ensuite été réalisé avec le logiciel Arlequin v 3.1.1 (Excoffier *et al.*, 2005) pour tester l'association entre la matrice de distances géographiques entre sites et la matrice de corrélation (1000 bootstraps).

3. Résultats

a) Réalisation de l'expérience et suivis

Des exemples des états observés *V* et *E* sont présentés dans la figure 2.C.8 et un exemple d'individu montrant une croissance importante du disque est présenté dans la figure 2.C.9. L'ensemble des suivis a pu être réalisé de façon mensuelle, sauf pour ACE en juin (Tableau 2.C.2). Le détail du nombre initial d'individus inclus dans l'analyse (après remplacements dus aux imprévus de terrain) est indiqué Tableau 2.C.3 pour chacune des 16 combinaisons de sites (9 à 15 individus par combinaison).

La valeur sélective de certains individus semble avoir été affectés par la présence de l'algue verte encroûtante *Codium dimorphum* dans le site RLI (Annexe 2.C.2d). La croûte de *Codium* s'est étendue jusqu'à recouvrir les transplants A51 et A52, d'origine ACE, et V46, d'origine CHV. La présence de cette algue n'est pas considérée comme un facteur limitant pour le recrutement (à la différence d'algues calcaires) ni pour la survie de *L. nigrescens*. Cependant, pour deux de ces individus (A52 et V46), j'ai remarqué lors du premier suivi que les mailles et les frondes étaient littéralement recouvertes de *Codium*.

Les individus présents sous l'état *D* (disque seul) ont été considérés comme morts lors des analyses, aucune régénération n'ayant été observée à partir de cet état. Concernant l'état *E* (stipes et disque, sans frondes), un cas de régénération a été observé, mais l'individu est mort le mois suivant la régénération. Néanmoins, la persistance des individus dans l'état *E* peut être longue (observations allant jusqu'à six mois), ce qui suggère que ces individus sont capables de photosynthèse. En accord avec le faible taux de régénération et la mort de l'individu après régénération également décrite par Westermeier *et al.*, 1994, les individus dans l'état *E* ont été

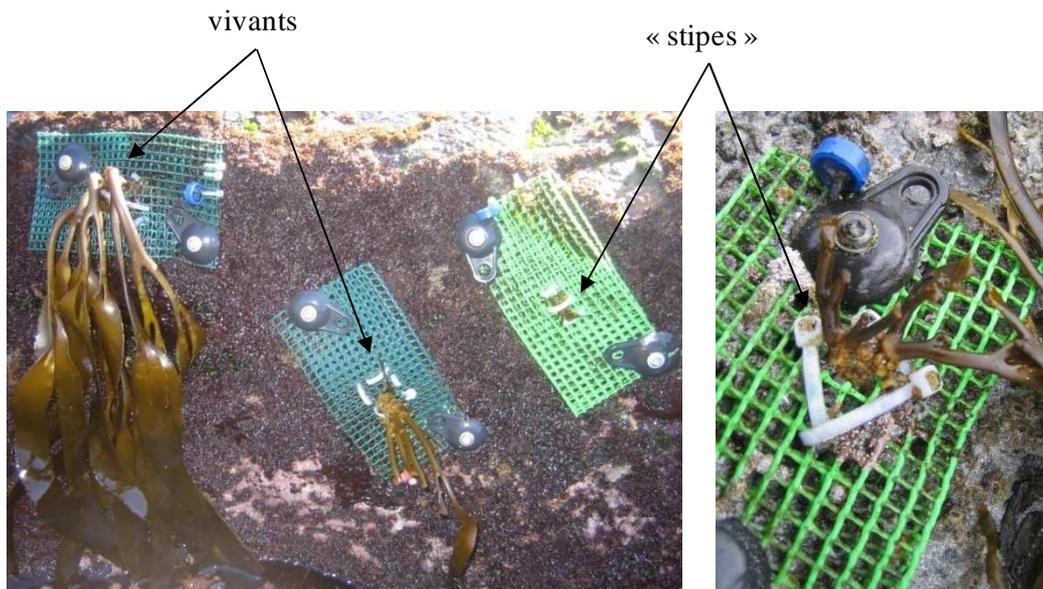


Figure 2.C.8 : Exemple d'individus vivants (V) et d'individus observés à l'état « stipes » (E, absence de frondes) deux mois après transplantation.



Figure 2.C.9 : Disque d'un individu quatre mois après transplantation, montrant une croissance importante du disque et l'adhésion à la roche.

Tableau 2.C.2 : Dates de la mise en place et des suivis de l'expérience de transplantation.

Mois	Date	Transplantation	Suivis	Sites suivis
Janvier	21-25/01/08	X	X	tous
Février	19-23/02/08	X	X	tous
Mars	07-09/03/08	X	X	tous
Avril	06-08/04/08		X	tous
Mai	03-06/05/08		X	tous
Juin	01-03/06/08		X	sites CAR, CHV et RLI
Juillet	02-03/07/08		X	sites ACE, CHV et RLI
	19/07/08		X	site CAR
Août	17-20/08/08		X	tous

considérés comme morts lors des analyses de survie.

b) Analyses préliminaires

Comparaison des tailles initiales entre sites d'origine

L'analyse de l'effet du site d'origine sur la taille initiale (avant transplantation) des individus a été réalisée en utilisant les données collectées en janvier sur 240 individus, soit 60 individus pour chacun des quatre sites d'origine.

Les tests statistiques confirment que la taille initiale des individus diffère selon les espèces ($p < 0,001$) et le site d'origine ($p < 0,001$) (détails présentés en Annexe 2.C.4a). En moyenne, les individus originaires des deux sites de l'espèce PP (CAR et CHV) sont plus grands (longueur des frondes et diamètre de disque) que ceux de l'espèce AI (Fig. 2.C.10). Lorsque les sites sont comparés au sein de chaque espèce, aucune différence de taille initiale n'a été détectée entre les deux sites AI ($p = 0,952$ pour la longueur des frondes, $p = 0,844$ pour le diamètre de disque), contrairement aux deux sites PP ($p < 0,001$ et $p = 0,002$ respectivement avec $CAR > CHV$).

Comparaison des tailles initiales entre sites de destination pour chaque site d'origine

Afin d'être surs qu'il n'y avait pas de biais expérimental, nous avons vérifié l'absence de différence significative de longueur initiale des individus entre sites de destination pour chacun des sites d'origine (valeurs de $p > 0,05$, Fig. 2.C.11). Concernant le diamètre initial du disque, aucun effet du site de destination n'a été détecté pour les sites d'origine CAR et RLI ($p > 0,05$) tandis qu'un effet marginalement significatif a été détecté pour les sites d'origine ACE ($p = 0,013$) et CHV ($p = 0,039$) (Fig. 2.C.11).

c) Analyses statistiques de l'expérience de transplants

Les résultats présentés ici concernent l'ensemble de l'expérience (temps = 5 mois après transplantation), sauf mention contraire. Les résultats après 3 et 4 mois d'expérience et le détail des tests sont présentés dans l'Annexe 2.C.5 (représentation graphique) et dans l'Annexe 2.C.6 (tests statistiques).

Lors de la mesure de la largeur du disque, il s'est avéré que ce paramètre dépendait particulièrement de conditions externes à l'expérience. Ainsi, la croissance du disque au-delà

Tableau 2.C.3 : Nombre d'individus inclus dans l'analyse pour chaque combinaison de site de destination x site d'origine après remplacements dus aux imprévus de terrain.

Destination	Origine	Date de transplantation			Total
		Janvier	Février	Mars	
CAR	CAR	0 ¹	9	3	12
CAR	ACE	7	7	0	14
CAR	CHV	2	2	9	13
CAR	RLI	1	4	8	13
ACE	CAR	9	4	0	13
ACE	ACE	7	2	0	9
ACE	CHV	1	7	4	12
ACE	RLI	1	9	0	10
CHV	CAR	14	0	0	14
CHV	ACE	8	7	0	15
CHV	CHV	14	1	0	15
CHV	RLI	15 ²	0	0	15
RLI	CAR	14	0	0	14
RLI	ACE	6	5	0	11
RLI	CHV	0 ¹	13	0	13
RLI	RLI	13	1	0	14

¹ : Tous les individus ont dû être remplacés car une forte mortalité due aux conditions expérimentales s'est produite après transplantation durant ce mois de janvier.

² : Au contraire, aucun individu n'a été remplacé car les premières conditions expérimentales de transplantation ont été excellentes.

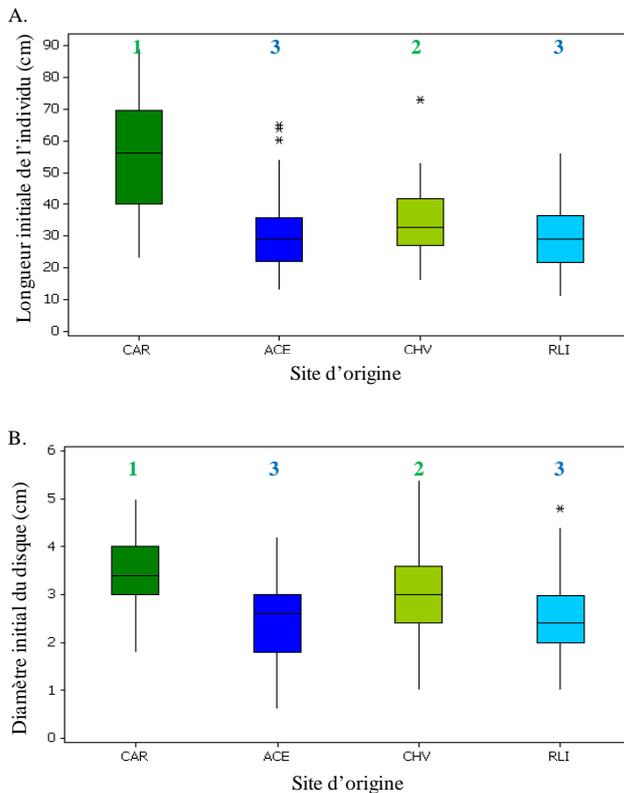


Figure 2.C.10: Distribution des valeurs de taille initiale des individus avant transplantation (janvier 2008), pour chacun des sites d'origine. A. Longueur totale des frondes, B. Diamètre maximal du disque. Les sites sont ordonnés par latitude (du nord vers le sud) et la couleur correspond à l'espèce d'appartenance (vert : PP, bleu : AI). Pour chaque graphe, les chiffres représentent les groupes statistiquement différents ($p < 0,05$).

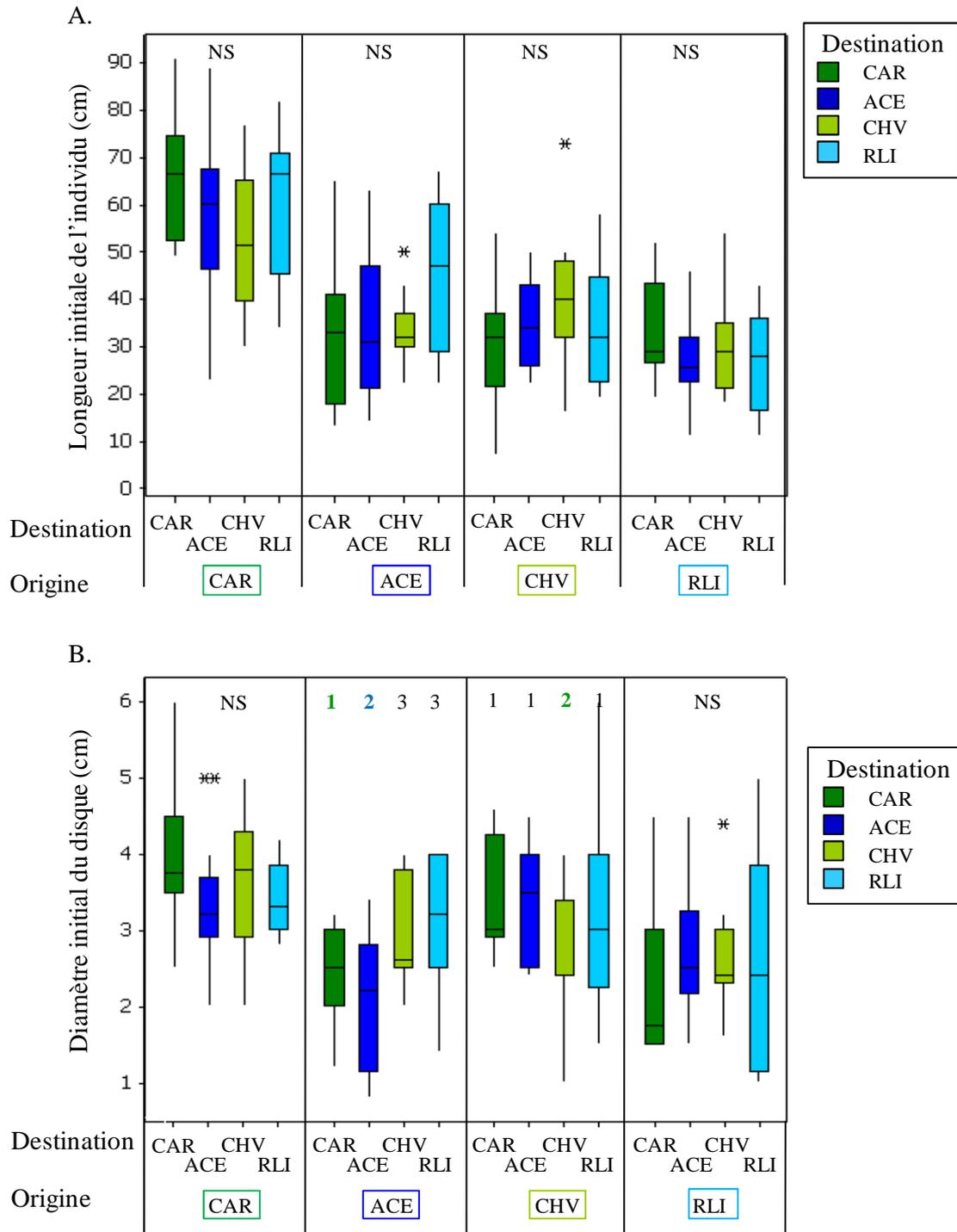


Figure 2.C.11 Distribution des valeurs de taille initiale des individus transplantés, pour chacune des 16 combinaisons site d'origine x site de destination. A. Longueur initiale, B. Diamètre maximal du disque. La couleur correspond ici au site de transplantation (destination) des individus (vert : habitat PP, bleu : habitat AI, avec des nuances correspondant à chacun des sites). Pour chaque graphe, les chiffres représentent les groupes statistiquement différents ($p < 0,05$), NS : test non significatif.

de la maille de fixation dépendait de la distance entre la maille et la roche et également de la configuration de la roche (creux ou bosses par exemple). Etant donné que le diamètre du disque semble refléter plutôt les conditions du microenvironnement du site de destination, cette variable n'a pas été retenue dans les analyses.

Des différences environnementales significatives entre destinations

Les tests montrent que, pour les trois variables considérées pour l'estimation de la valeur sélective (survie, maturité et croissance en longueur), il existe des différences significatives entre sites de destination, entre habitats et entre régions latitudinales (Tableau 2.C.4), toutes origines confondues. Dans le cas de la survie, la différence entre destinations apparaît dès le 3^{ème} mois de l'expérience, date qui correspond à la première évaluation de la survie. La différence de maturité entre destinations apparaît à partir du 4^{ème} mois lorsque l'on considère les sites ou les régions latitudinales de destination, et uniquement au 5^{ème} mois pour les habitats (Annexe 2.C.6a). Les individus transplantés dans les habitats PP ont en moyenne une meilleure valeur sélective que ceux transplantés dans les habitats AI.

Une divergence interspécifique qui s'exprime principalement dans le site RLI

Une survie plus élevée pour les individus de la même espèce que la population naturelle du site (relation POS) a été observée dans le site RLI uniquement ($p=0,0003$; Tableau 2.C.5, Fig. 2.C.12). Cette divergence interspécifique est significative pour les trois temps considérés (3, 4 et 5 mois, Annexe 2.C.6b). Les données de croissance montrent également une divergence interspécifique limitée au site RLI ($p<0,0001$; Tableau 2.C.5, Fig. 2.C.14B).

Les tests concernant la maturité ne montrent pas de différence significative entre espèces au sein des quatre sites ($p>0,05$, Tableau 2.C.5).

Une adaptation liée au site limitée aux sites RLI et CHV

Une meilleure survie des individus originaires du site par rapport à ceux provenant d'un autre site (adaptation liée au site) a été détectée uniquement dans le site RLI (relation POS, $p<0,001$: Tableau 2.C.5 et Fig. 2.C.12) pour les trois temps considérés (Annexes 2.C.5 et 6c). Aucune différence de maturité entre individus résidents et individus immigrants n'a été détectée dans les quatre sites considérés ($p>0,05$, Tableau 2.C.5, Fig. 2.C.13). Enfin, une différence significative entre résidents et immigrants a été détectée en terme de croissance dans les sites CHV et RLI ($p<0,001$, relations POS, Tableau 2.C.5).

Tableau 2.C.4 : Résultats des tests des hypothèses 1 : effet de la destination sur les variables mesurées. Le type de différences environnementales testé est indiqué, ainsi que la valeur de p correspondante. Les valeurs inférieures au seuil α de 0,05, indiquant des différences significatives entre destinations, sont en gras. Les tests réalisés sont des analyses log-linéaires dans le cas des variables survie et maturité et des tests de Kruskal-Wallis dans le cas de la variable de croissance (croissance en longueur), et concernent l'ensemble de l'expérience (5 mois). *Hyp.* : numéro de l'hypothèse testée (voir texte).

<i>Hyp.</i>	Différences environnementales testées	Valeur de p		
		Survie	Maturité	Croissance
H1a	Différences environnementales entre sites de destination	0,000001	0,000001	<0,0001
H1b	Différences environnementales entre habitats	0,000372	0,000372	<0,0001
H1c	Différences environnementales entre régions latitudinales de destination	0,000000	0,000000	<0,0001

Tableau 2.C.5 : Résultats des tests des hypothèses 2a et 2b de divergence adaptative entre espèces et d'adaptation liée au site dans chacun des sites de destination. Une valeur de $p < 0,05$ indique la présence d'une adaptation significative (relation POS dans tous les cas : résidents > immigrants). Voir le texte pour la définition des types d'adaptation et voir également la légende du Tableau 2.C.4.

Variable	<i>Hyp.</i>	Type d'adaptation testée	Valeurs de p			
			Site de destination			
			CAR	ACE	CHV	RLI
Survie	H2a	Divergence interspécifique	0,078405	0,746480	0,163163	0,000315
	H2b	Adaptation liée au site	0,591970	0,755538	0,274967	0,000499
Maturité	H2a	Divergence interspécifique	0,098378	0,447773	0,687117	0,357625
	H2b	Adaptation liée au site	0,073918	0,149184	0,354339	0,179250
Croissance	H2a	Divergence interspécifique	0,6614	0,2260	0,3243	0,0000
	H2b	Adaptation liée au site	0,1118	0,0620	0,0055	0,0000

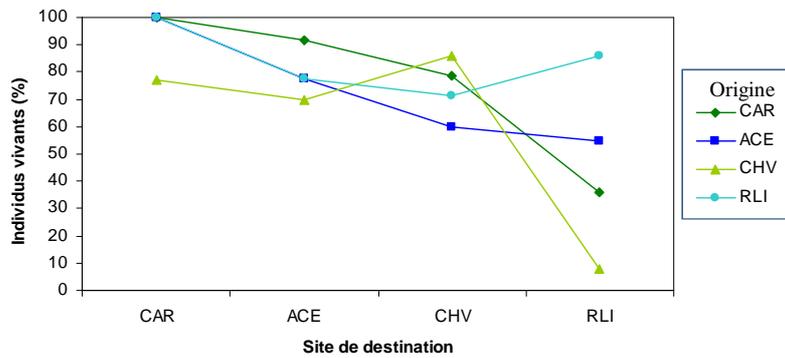


Figure 2.C.12 : Pourcentage d'individus considérés vivants à la fin de l'expérience (5 mois) pour chaque combinaison de site d'origine et site de destination. Les individus étant arrivés à maturité avant 5 mois ont été retirés mais considérés comme vivants.

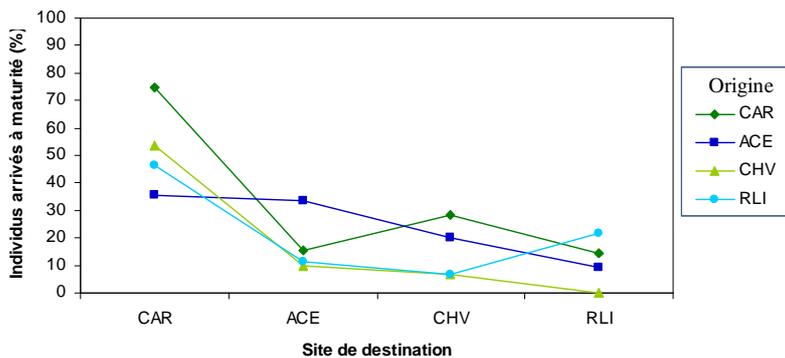


Figure 2.C.13 : Pourcentage d'individus arrivés à maturité au cours de l'expérience pour chaque combinaison de site d'origine et site de destination.

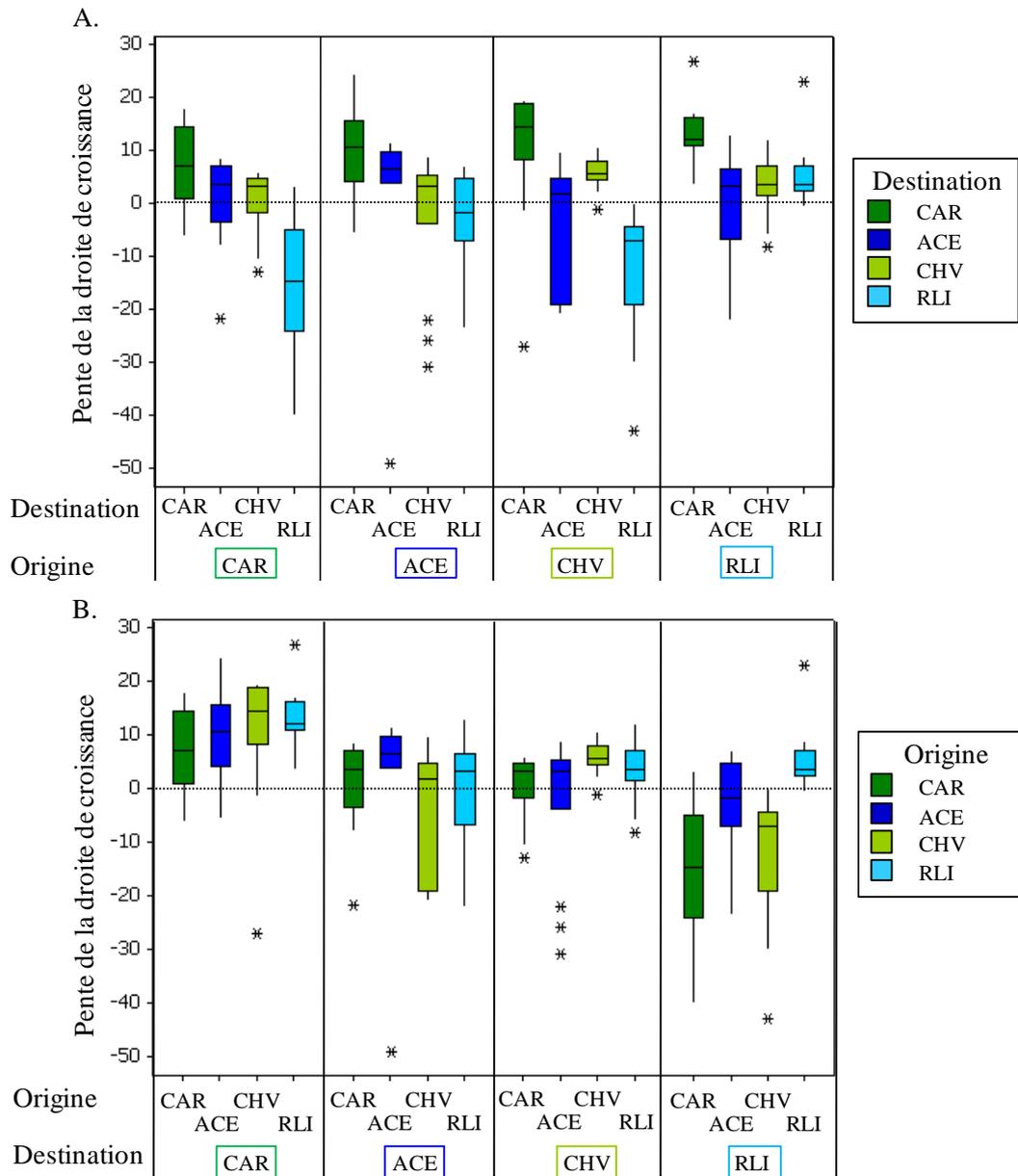


Figure 2.C.14 Distribution des valeurs de pente de croissance des individus transplantés, pour chacune des 16 combinaisons site d'origine x site de destination. Pour faciliter la lecture, les données ont été organisées par site d'origine (A) et par site de destination (B). La croissance considérée ici est la croissance en longueur.

Tableau 2.C.6 : Tests des hypothèses 3 concernant l'homogénéité entre sites au sein des habitats et de la région Centre. Voir également la légende du Tableau 2.C.4. ND : pour la croissance, l'interaction site d'origine x site de destination n'a pas pu être testée, du fait des limitations des tests non-paramétriques (voir texte).

Habitat ou Région latitudinale	Valeurs de <i>p</i>					
	Test de l'effet site de destination			Test de l'interaction site origine x site destination		
	Survie	Maturité	Croissance	Survie	Maturité	Croissance
Habitat PP	0,947660	0,000036	0,0000	0,089935	0,544872	ND
Habitat AI	0,000911	0,446594	0,0030	0,065090	0,546450	ND
Région Centre	0,490581	0,787758	0,7863	0,576262	0,718378	ND

Un gradient latitudinal de qualité de l'environnement

Des différences significatives entre régions latitudinales en terme de survie et de croissance ont été détectées (valeur de p maximale de 0,006, tests significatifs également lorsqu'on applique la correction de Bonferroni ; Annexe 2.C.6d). Les trois variables étudiées montrent globalement un gradient latitudinal avec une valeur sélective des individus supérieure dans la région Nord (CAR), intermédiaire dans la région Centre (ACE et CHV) et inférieure dans la région Sud (RLI) (Fig. 2.C.12-14). Concernant la maturité, les régions de destination Centre et Sud ne montrent pas de différence significative ($p=0,495$), tandis que chacune de ces régions montre un taux de maturité significativement inférieur à la région Nord ($p<0,001$). Au sein de la région Centre (regroupant ACE et CHV), il n'existe pas de différence significative entre sites de destination pour les taux de survie, de maturité et de croissance ($p>0,05$, Annexe 2.C.6d et f). De plus, quand l'interaction site d'origine x site de destination a pu être testée, celle-ci n'est pas significative (survie et maturité, $p>0,05$, Annexe 2.C.6f).

Enfin, afin de tester l'hypothèse d'adaptation latitudinale (H2c), nous avons testé pour chaque région de destination si les résidents avaient une meilleure valeur sélective que les immigrants. Ce n'est généralement pas le cas ($p>0,05$), sauf pour la région Sud, représentée par le seul RLI, qui montrait un taux de survie et une croissance plus importants pour les résidents que pour les immigrants (relation POS), mais pas de différence au niveau du taux de maturité (Tableau 2.C.5).

d) Caractérisation des sites : données de température de l'eau

Les Analyses en Composantes Principales réalisées sur les températures moyennes journalières sont présentées dans la Figure 2.C.15 et les valeurs de coefficients de corrélation dans l'Annexe 2.C.7. L'analyse sur des données de 2 à 10 ans, incluant tous les sites à l'exception du site ACE, permet de visualiser deux groupes, l'un comprenant les sites localisés à des latitudes de 28-30°S, l'autre regroupant des sites compris entre 31°S et 34°S cette différence étant accentuée au printemps et en été (Castillo *et al.*, en prep.). Le site PTAL (Pta Talca, 30°55'S) s'est révélé être un site intermédiaire pour certaines autres caractéristiques physiques (vents notamment, Castillo *et al.*, en prep.). L'analyse incluant ACE, mais limitée à 310 jours, montre une structuration moins prononcée (Fig. 2.C.15). Trois groupes de sites peuvent être distingués : (i) un groupe relativement homogène constitué de tous les sites de l'espèce PP sauf le site ARY ; (ii) un groupe plus hétérogène constitué par

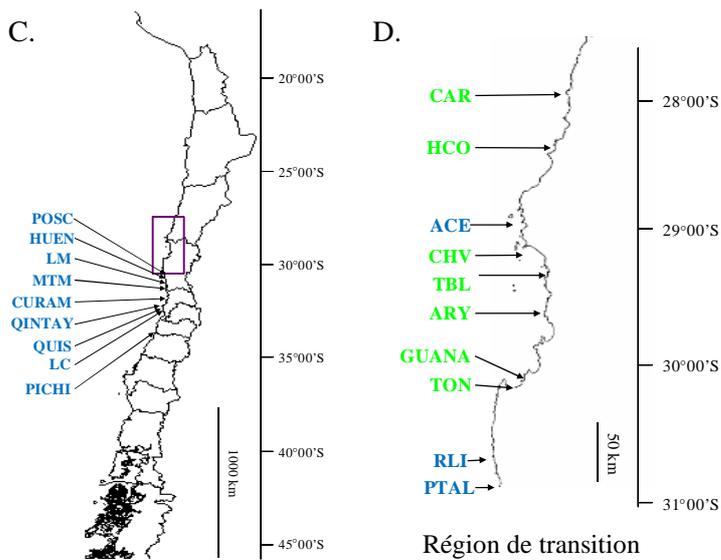
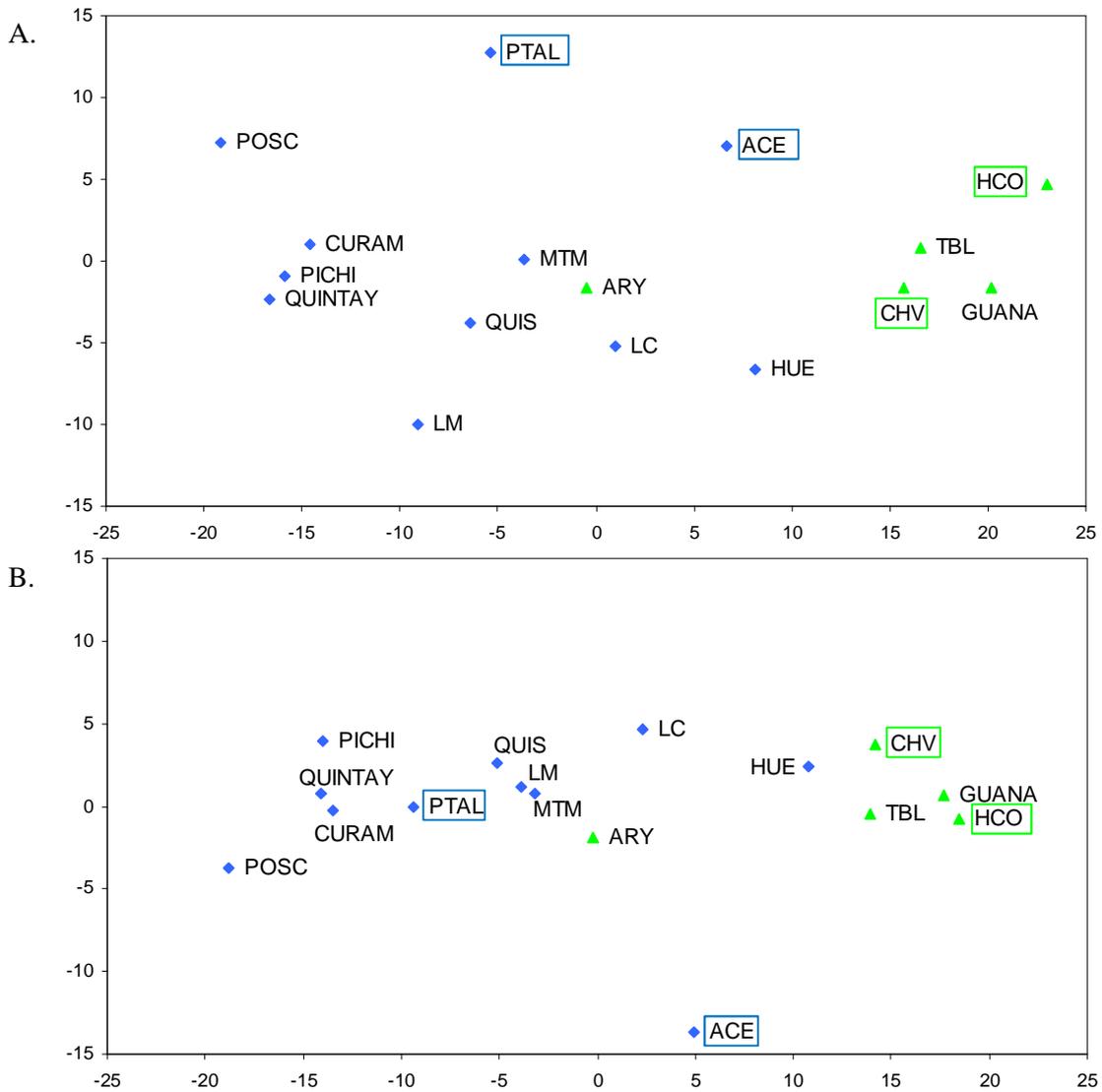


Figure 2.C.15 Analyses en Correspondances Principales (ACP) de la température journalière moyenne entre le 29 août 2007 et le 3 juillet 2008 pour 16 sites entre 28°S et 34°S. A. ACP réalisée sur l'ensemble du jeu de données (310 jours), **B.** ACP réalisée en excluant les mois d'hiver (avril à août). Les sites de transplantation (ACE et CHV) ou à proximité (RLI : Punta Talca, PTAL ; CAR : Huasco, HCO) sont indiqués en encadré. **C.** et **D.** : localisation géographique des sites. En vert : sites de l'espèce PP, en bleu : sites de l'espèce AI, d'après les résultats du Chapitre 1. Données : ECIM, PUCCh, sauf site ACE.

une majorité des sites de l'espèce AI, sauf ACE, HUE et LC ; et (iii) un groupe intermédiaire, constitué par les quatre sites restants (ACE, HUE, LC et ARY). L'axe 2 sépare principalement ACE des trois autres sites de ce groupe.

Les tests de Mantel n'ont pas montré d'autocorrélation spatiale des données de températures moyennes journalières ($p > 0,05$). Les coefficients de corrélation sont inférieurs à 0,67 pour toutes les comparaisons entre ACE et les autres sites (Annexe 2.C.7). Entre sites de l'espèce PP, les coefficients de corrélation sont très forts (supérieurs à 0,90), tandis qu'ils sont plus faibles entre sites de l'espèce AI (entre 0,68 et 0,94, ACE exclu). Les corrélations entre sites PP et sites AI sont comprises entre 0,90 et 0,61, lorsque ACE est exclu.

4. Discussion

L'expérience de transplantation réciproque a permis de montrer la présence de différences environnementales entre sites, se traduisant par des tailles d'individus différentes et des valeurs sélectives après transplantation environnement-dépendantes. Un patron de divergence adaptative caractérisé par une meilleure valeur sélective des individus du site et de l'espèce résidente que celles des individus de l'espèce immigrante n'a pu être mis en évidence que dans un seul des sites considérés (site RLI).

Un gradient latitudinal de qualité de l'environnement et de la plasticité phénotypique

Les tests statistiques ont montré des différences significatives de morphologie des individus juvéniles entre sites, habitats et régions latitudinales ainsi que des variations des valeurs sélectives moyennes dépendant de l'environnement.

Bien que nous ayons essayé de sélectionner des individus de tailles similaires entre sites d'origine pour la réalisation des transplantations, cela n'a pas toujours été possible. Ces limitations rencontrées sur le terrain semblent correspondre à des différences de qualité environnementale, et probablement à une différence de croissance ou de morphologie entre espèces. Ainsi, les individus juvéniles du site CAR sont en moyenne plus grands (longueur et diamètre de disque) que les individus provenant du site CHV. Ces deux groupes d'individus de l'espèce PP sont également plus grands en moyenne que les individus de l'espèce AI (sites d'origine ACE et RLI). L'expérience de transplantation réciproque a permis de montrer que ces différences de morphologie sont en grande partie dues à de la plasticité phénotypique, les

individus d'origines différentes mais transplantés dans un même site ne montrant plus de différence significative de taille. Le site RLI est cependant une exception notable à ce patron comme il sera discuté plus loin.

La variation de qualité de l'environnement semble corrélée à la latitude, avec un taux de survie, un taux de maturité et une croissance décroissants du nord vers le sud. L'analyse statistique a en effet montré que le regroupement des sites en habitat, en fonction de la présence d'une ou l'autre des espèces, correspondait en réalité à un regroupement de sites hétérogènes (habitat PP et habitat AI). Par opposition, le regroupement des sites ACE et CHV en une région Centre correspondait à un habitat homogène en terme de réponse des individus à l'environnement (valeur sélective après transplantation).

Contre-sélection des immigrants asymétrique : divergence adaptative entre espèces

Dans les sites ACE et CAR, aucune différence significative de valeur sélective n'a été détectée entre individus d'origines différentes ni d'espèces différentes. Dans le site CHV, le patron est similaire, exception faite pour la croissance, avec une croissance plus forte des individus résidents par rapport aux individus immigrants ($p < 0,006$). Les différentes espèces ne montrent cependant pas de différences de croissance dans ce site.

Au contraire, dans le site RLI, l'expérience de transplantation a permis de montrer la présence d'une importante contre-sélection des immigrants, avec un taux de survie et une croissance en moyenne plus importants pour les individus de l'espèce AI par rapport aux individus de l'espèce PP. Cette différence n'a pas pu être confirmée par les données de maturité, possiblement du fait de la puissance limitée du test : peu d'individus dans ce site sont arrivés à maturité

Rôle de l'adaptation dans l'isolement reproducteur et le processus de spéciation

Ces analyses montrent donc la présence d'une contre-sélection des immigrants dépendant du site d'origine des individus, mais également de l'espèce, dans le site RLI, tandis que ce processus est absent dans les autres sites ou régions (en particulier la région Centre). Ce patron asymétrique traduit la présence d'adaptations liées à l'espèce (divergence interspécifique) et au site non réciproques. Nos données ne sont donc pas concordantes avec l'hypothèse généralement faite d'une pléiotropie antagoniste, avec un coût de l'adaptation (Kawecki et Ebert, 2004), mais s'ajoutent aux nombreuses études d'adaptation locale montrant un patron asymétrique (voir pour revue Kassen, 2002 et Leimu et Fischer, 2008).

En se basant sur les résultats de l'expérience de transplantation, les individus de

l'espèce AI peuvent être considérés comme plus généralistes que les individus de l'espèce PP, considérés comme spécialistes de leur environnement. Les spécialistes écologiques se caractérisent en effet par une niche (ensemble des conditions dans lesquelles les individus peuvent survivre) plus étroite et une variance de valeur sélective plus prononcée entre environnements différents que les généralistes (Kassen, 2002). Comme décrit par Castillo *et al.*, en prep., les habitats PP (entre 28°S et 30°S) montrent une variabilité interannuelle plus importante que les habitats AI (30°S-34°S), liée aux évènements ENSO, tandis que les habitats AI montrent une variabilité temporelle à une plus petite échelle, avec des variations à l'échelle synoptique plus prononcées que dans les habitats PP. Peu d'études se sont focalisées sur le rôle des variations temporelles de l'habitat dans l'évolution vers un génotype spécialiste ou généraliste (voir pour revue Kassen, 2002). Ces études suggèrent cependant que la variation temporelle à grande échelle de temps tendrait à favoriser l'évolution vers des génotypes spécialistes se succédant dans le temps, tandis que la variation à petite échelle temporelle favoriserait l'évolution vers des génotypes généralistes. L'échelle de temps considérée dépend du temps de génération de l'espèce : dans le premier cas, les individus ont une durée de vie en moyenne inférieure à la période entre deux changements environnementaux et expérimentent donc une seule condition d'habitat, tandis que dans le second cas, les variations environnementales ont lieu plusieurs fois au cours de la vie des individus. A cela s'ajoute également un effet de la prédictibilité des variations temporelles des conditions environnementales, les généralistes étant favorisés dans les habitats à variations prédictibles et les spécialistes dans les habitats à variations non prédictibles (Kassen, 2002). L'hypothèse que l'espèce AI serait plus généraliste que l'espèce PP serait concordante avec les caractéristiques d'échelle temporelle et de prédictibilité des variations temporelles des conditions environnementales au sud et au nord de 30°S : des variations sur des temps courts (quelques jours) mais prédictibles favorisant des généralistes dans l'aire de distribution de l'espèce AI *versus* des variations fortes portant sur plusieurs années (ENSO) mais non-prédictibles favorisant des spécialistes dans l'aire de distribution de PP.

L'absence de contre-sélection des immigrants dans les sites au nord de 30°S et le fait que l'espèce AI semble plus généraliste que l'espèce PP sont également concordants avec l'observation des quelques sites AI se maintenant au nord de la limite des 30°S (sites ACE, IPA et COZ) au sein de l'aire de distribution de l'autre espèce, plutôt que l'observation contraire, c'est-à-dire des sites PP qui seraient trouvés au sud de la limite des 30°S. Le nombre de ces sites particuliers est cependant limité en nombre et en largeur latitudinale (3 sites AI, décrits entre 29°S et 30°S).

Dans le site RLI, la présence d'une forte sélection contre les individus immigrants, en particulier lorsque ces individus sont de l'espèce PP, suggère que ce processus contribue au maintien de l'intégrité des deux espèces et à la disjonction de leurs aires de distribution. Afin de distinguer un effet site particulier d'un effet commun aux sites de l'aire de distribution AI, il serait cependant nécessaire de répéter l'expérience en incluant des répliquas dans cette région. Le site RLI se caractérise en particulier par la présence d'une rivière (Río Limari, un des rares cours d'eau dans cette région semi-aride) à proximité : le patron observé à RLI pourrait être donc lié à l'influence de cette rivière sur l'écosystème côtier (apports de sédiments et d'eau douce notamment). La présence de cours d'eaux constitue une des différences observées entre les aires de distribution des espèces AI et PP : bien qu'il n'y ait pas de discontinuité abrupte, les cours d'eau au nord de 30°S sont très peu nombreux (Río Loa à 20°42'S, Río Huasco à 28°44'S), alors qu'ils deviennent plus nombreux et avec un débit plus important en allant vers le sud du Chili.

Enfin, la contre-sélection des immigrants à RLI pourrait être liée au fait que l'expérience s'est déroulée pendant une année La Niña considérée comme « historique », se traduisant par un renforcement des conditions de résurgence amenant des eaux plus froides en surface. Il serait intéressant de pouvoir répéter l'expérience durant une année El Niño pour détecter une éventuelle contre-sélection de l'espèce immigrante dans les sites plus au nord (CAR, CHV et ACE).

Patron à petite échelle spatiale : particularité de la zone de contact Aceituno-Choros

Le cas de la zone de contact Aceituno-Choros (ACE-CHV) est intéressant : alors que les tailles initiales des individus avant transplantation sont statistiquement différentes entre ces deux sites, la réponse des individus est d'une part similaire entre sites de destination et d'autre part indépendante de l'origine et de l'espèce. Deux hypothèses peuvent expliquer la présence de l'espèce AI à ACE et de l'espèce PP à CHV et plus généralement la présence d'une mosaïque de sites AI dans l'aire de distribution PP (Région de transition). La première hypothèse suppose que ces habitats sont effectivement similaires entre eux et que la présence d'une espèce donnée dans un site particulier de la Région de transition (29-30°S) est liée à des processus historiques (par exemple, un changement dans les conditions environnementales ayant permis la colonisation d'une des espèces hors de son aire habituelle de distribution). Les sites AI situés au nord de 30°S pourraient par exemple être des sites reliques d'une aire de distribution jadis plus étendue vers le nord ou au contraire témoigner d'évènements récents de dispersion à longue distance et de colonisation de sites non occupés par l'espèce PP. La

deuxième hypothèse est que l'espèce immigrante serait contre-sélectionnée dans les sites ACE et CHV, mais que ce processus n'aurait pas pu être détecté par notre expérience de transplantation réciproque, soit parce qu'il a lieu sur des stades du cycle de vie (gamétophytes, fécondation) non testés, soit parce que l'expérience s'est déroulée pendant une année particulière (2008, année La Niña), n'incluant donc pas l'ensemble des variations que subissent les populations naturelles (ex : années El Niño). L'analyse de la température de l'eau sur 310 jours de suivis suggère cependant que des différences thermiques existent à une petite échelle spatiale, entre les sites ACE et CHV : le coefficient de corrélation entre ces sites est de 66%, ce qui est particulièrement faible pour des sites situés à une vingtaine de kilomètres l'un de l'autre (chiffre à comparer avec les coefficients > 90% entre sites PP situés entre 28°S et 30°S, soit 250km de côte environ). L'expérience de réponse à la température des stades microscopiques du cycle de vie apparaît d'autant plus intéressante à la lumière de ces résultats (analyses en cours).

Conclusions et perspectives

L'expérience de transplantation nous a donc permis de suggérer la présence de contre-sélection des immigrants asymétrique, limitant la migration efficace d'individus de l'espèce PP dans le site RLI (30°44'S), au moins pendant des années « La Niña ». En limitant l'expansion de l'aire de distribution PP vers le sud, ce processus contribue donc à l'isolement reproducteur entre les espèces, par contre-sélection des immigrants.

Dans la zone de contact Aceituno-Choros (ACE-CHV), l'expérience de transplantation n'a pas mis en évidence de différences entre sites en termes de réponse des individus après transplantation. Ces résultats suggèrent qu'à cette échelle, d'autres mécanismes que la contre-sélection sur les sporophytes immigrants limitent la coexistence des espèces. Le régime de température particulier à ACE pourrait notamment avoir une influence sur les stades de vie microscopiques. La mesure des températures dans ce site sur le long terme permettra de confirmer la spécificité du site.

La divergence adaptative des gamétophytes en particulier est un mécanisme important à prendre en compte pour étudier la contre-sélection des immigrants de façon plus complète : ce sont en effet les spores qui constituent la principale phase de dispersion de *L. nigrescens*, et les gamétophytes sont les premiers stades de vie des migrants. L'expérience de tolérance à la température (en cours d'analyse) devrait permettre d'étudier ces étapes du cycle de vie.

D. Des adaptations liées à un réarrangement du génome mitochondrial ?

1. Introduction

a) Observations préliminaires suggérant de l'hétéroplasmie

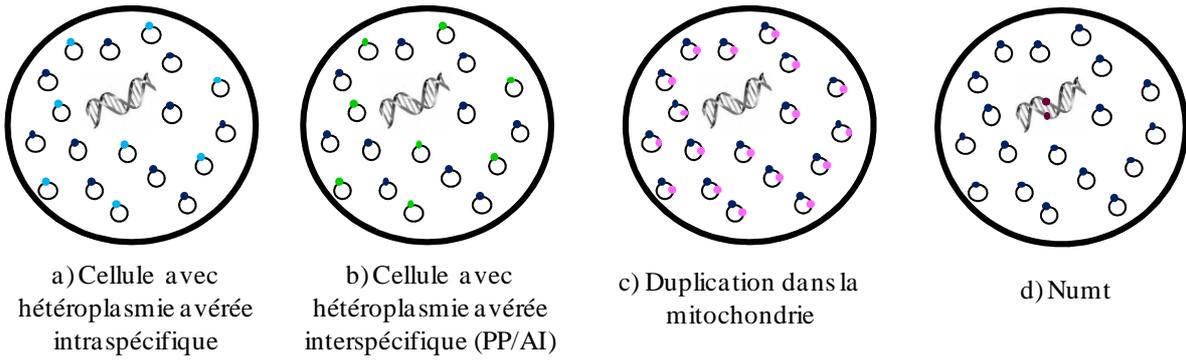
Lors de l'obtention des données pour l'étude de la phylogéographie de *L. nigrescens*, nous avons rencontré des difficultés de séquençage pour le marqueur *atp8/trnS*. Au lieu d'obtenir une seule bande pour ce locus mitochondrial, donc supposé haploïde, nous avons en effet détecté entre deux et trois bandes pour les individus dont le séquençage s'était avéré problématique. L'observation indépendante du même patron dans trois laboratoires différents (P. Martin en Nouvelle Zélande, G. Peralta à Santiago, et obs. pers. à Roscoff) montrait que ce n'était pas le résultat d'une contamination. Ces premiers échantillons provenaient de deux populations AI de la Région de transition (29-30°S), et donc en limite d'aire de distribution de l'espèce AI (sites ACE et COZ). Cette relation entre profils multibandes et zones de contact entre espèces AI et PP méritait d'être explorée plus en détail afin d'analyser les mécanismes génétiques particuliers se produisant dans ces populations en limite d'aire. D'autre part, ce patron semblait spécifique à *Lessonia nigrescens*, aucun problème de séquençage n'ayant été observé pour les autres espèces du genre *Lessonia* (*L. trabeculata*, *L. flavicans* et *L. vadosa* : voir Chapitre 1, *L. variegata*, et quatre espèces endémiques des îles subantarctiques, P. Martin, com. pers.), ni chez d'autres espèces de Laminariales (*Undaria pinnatifida* : Voisin *et al.*, 2005 ; *Macrocystis sp.*, S. Faugeron, com. pers.). Une étude d'ultrastructure réalisée chez *Laminaria angustata* a montré que les mitochondries venant du père sont en effet digérées avant la première division du zygote (Motomura, 1990).

b) Importance évolutive de l'hétéroplasmie mitochondriale apparente

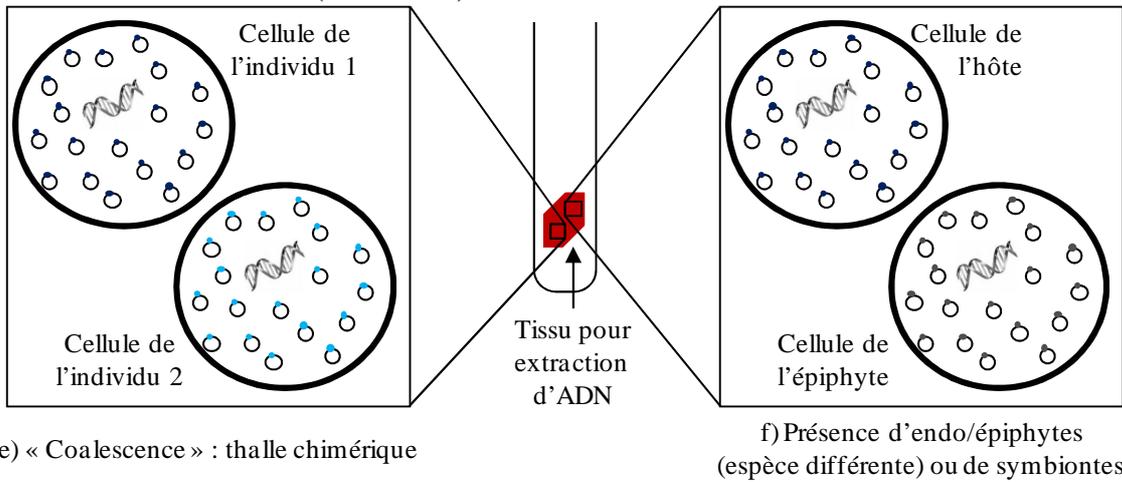
Mécanismes pouvant être à l'origine d'une hétéroplasmie apparente

La détection de différents variants du marqueur mitochondrial au sein d'un même individu sera appelée ici **hétéroplasmie apparente**, par opposition au cas d'**hétéroplasmie (avérée)**, où l'on peut certifier que les variants sont bien situés sur des molécules d'ADN

A. Processus évolutifs



B. Processus non-évolutifs (transitoires)



Loci : exemple pour un individu de l'espèce AI

ADN nucléaire ADN mitochondrial Cellule	<ul style="list-style-type: none"> • Locus d'intérêt : mitochondrial, espèce AI <p style="text-align: center;"><u>Loci orthologues :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Haplotype de l'espèce AI • Haplotype de l'espèce PP • Haplotype d'une autre espèce (hors complexe <i>L. nigrescens</i>) 	<p style="text-align: center;"><u>Loci paralogues :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Mitochondrial • Nucléaire
---	---	--

Figure 2.D.1 : Représentation schématique des différents cas menant à de l'hétéroplasmie apparente. Le cas représenté ici est celui d'un individu de l'espèce AI (espèce où ont été observés les profils multibandes).
A. Processus évolutifs : a) Hétéroplasmie avérée intraspécifique : les molécules d'ADNmt au sein d'une cellule donnée présentent des séquences différentes orthologues mais les deux haplotypes sont de la même espèce (ici espèce AI) ; b) Hétéroplasmie avérée interspécifique : présence de molécules d'ADNmt avec un haplotype AI et d'autres molécules avec un haplotype PP (loci orthologues) ; c) Duplication d'une région mitochondriale comprenant le locus d'intérêt, les loci sont alors paralogues mais situés dans le même compartiment génomique ; d) Intégration d'une copie d'une région d'ADNmt dans le noyau : ces copies nucléaires sont appelées *numts* (ou séquences mitochondriales nucléaires, Encadré 2.D.1). Les deux copies sont alors paralogues et situées dans des compartiments génomiques distincts.
B. Processus non-évolutifs (transitoires) : a) « Coalescence » : thalle chimérique, composé de plusieurs génotypes, de la même espèce (ici AI) ; b) Contamination par de l'ADN d'un autre organisme d'espèce différente (hors complexe d'espèces *L. nigrescens*) : l'utilisation d'amorces conservées (universelles) peut provoquer l'amplification de l'ADN mitochondrial de ces espèces en plus de celle d'intérêt.

mitochondrial (ADNmt) différentes.

Plusieurs processus évolutifs peuvent mener à de l'hétéroplasmie apparente détaillés dans la Figure 2.D.1A (voir pour revue : Bensasson *et al.*, 2001 ; Adams et Palmer, 2003 ; Abbott *et al.*, 2005) : (i) l'**hétéroplasmie (avérée), intraspécifique ou interspécifique**, (ii) la **duplication, au sein du génome mitochondrial**, d'une région d'ADNmt et (iii) l'**intégration d'une copie d'une région d'ADNmt dans le noyau**. (numt, voir Encadré 2.D.1). A ces trois processus évolutifs, il est nécessaire d'ajouter deux cas particuliers, considérés comme transitoires car non-transmis aux générations suivantes (Fig. 2.D.1B) : (i) le processus de « **coalescence** », décrit chez les algues (voir pour revue Santelices *et al.*, 1999) et se caractérisant par la formation de thalles chimériques composés de plusieurs génotypes, et (ii) une contamination par de l'ADN d'une autre espèce (par exemple due à la **présence d'endophytes ou d'épiphytes**, sans transfert de gènes entre ces organismes et leur hôte). Ce cas a notamment été rapporté par Lane et Saunders (2005) entre différentes espèces de kelps (espèces épi/endophytes : genres *Alaria*, *Macrocystis* et *Nereocystis*, espèce hôte : *Lessoniopsis littoralis*). L'obtention de la séquence de nucléotides pour chacun des variants du gène mitochondrial permet de déterminer de quel type d'hétéroplasmie il s'agit, et d'inférer sur l'histoire de chacun des variants.

Importance évolutive des duplications de gènes et de l'hétéroplasmie avérée

La présence de gènes dupliqués (quelque soit la localisation des copies) peut avoir une importance évolutive, et ne doivent donc pas être considérés uniquement comme des « fauteurs de trouble moléculaires » (Encadré 2.D.2). Leur rôle dans l'évolution comme mécanisme permettant l'apparition de nouvelles fonctions a été tout d'abord proposé par Bridges en 1936 chez *Drosophila melanogaster* (Bridges, 1936), puis développée par Ohno dans les années 70 (Ohno, 1970). Ce processus d'innovation génétique peut permettre une réponse rapide au changement de milieu, comme par exemple la résistance aux insecticides chez le moustique (Raymond *et al.*, 1991). Les duplications de gènes à l'intérieur du noyau ont depuis fait l'objet de nombreuses études, montrant leur importance dans l'isolement reproducteur postzygotique et dans la formation des espèces (réarrangements chromosomiques et polyplôïdie, voir Introduction générale de la thèse). En comparaison, l'importance de la duplication de gènes dans la mitochondrie et l'importance des numts dans la spéciation restent peu étudiées. Cependant, de la même façon, on peut penser que ce type de duplication de gènes ainsi que la possible perte de fonction différentielle entre espèces pourraient contribuer à la divergence entre espèces ou faciliter les processus d'adaptation

Encadré 2.D.1 :
Origine et importance évolutive des séquences mitochondriales nucléaires (numts)

La description de numts a eu lieu peu de temps après la découverte d'ADN extra-nucléaire, en 1967 : l'hybridation d'ADNmt avec l'ADN nucléaire suggérait alors une forte homologie de séquence (Du Buy et Riley, 1967). Des numts ont ensuite été identifiés dans la plupart des clades eucaryotes (voir pour revue Richly et Leister, 2004 ; Palmer *et al.*, 2000), mais, à ma connaissance, les algues brunes sont une exception, ce qui est probablement dû au fait que ces taxa sont beaucoup moins bien connus que les animaux et les plantes supérieures.

Bien que l'intégration des numts dans le génome nucléaire ait été originellement associée aux éléments transposables, l'absence de caractéristique commune entre les sites d'intégration de numts suggère l'action d'autres mécanismes (voir Bensasson *et al.*, 2001).

Formation des numts :

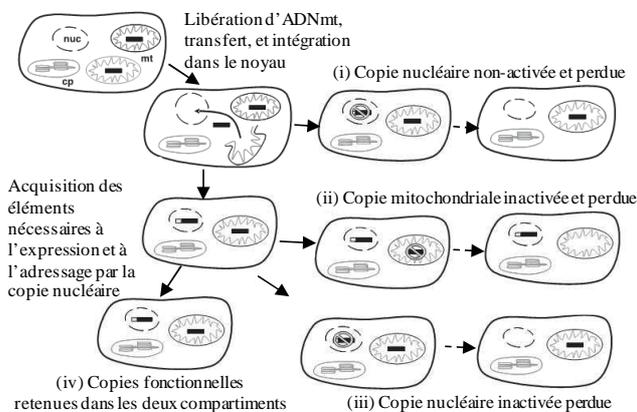


Fig. 1 : Scénarios évolutifs pour le transfert de gènes de la mitochondrie au noyau (exemple chez les plantes). Le gène d'intérêt (trait épais) s'échappe de la mitochondrie (ex : pendant la lyse ou la division de l'organelle ou lors de stress cellulaires) et cet ADN est intégré dans le génome nucléaire, par exemple lors de la réparation de cassures double-brins. Le trait épais gris juxtaposé au trait noir représente l'acquisition des signaux d'expression nucléaire et d'adressage, bien qu'ils ne soient pas forcément nécessaires à l'activation du gène.

Note : bien que cela ne soit représenté sur ce schéma, chaque cellule contient de nombreuses mitochondries, chacune contenant de nombreuses copies du génome mitochondrial. mt : mitochondrie, cp : chloroplaste, nuc : noyau. Flèches pointillées : perte d'une copie possible. Figure modifiée d'après Bonen (2006).

Quatre issues sont possibles après la duplication d'un gène mitochondrial dans le génome nucléaire (Fig. 1) : (i) La copie nucléaire ne devient pas fonctionnelle (copie mort-née), (ii) suite à l'accumulation de mutations, le gène mitochondrial dégénère en un pseudogène (non fonctionnel) et peut être perdu, (iii) la copie nucléaire dégénère (pseudogène) et peut être perdue, ou (iv) les deux copies sont retenues de façon permanente : avantage sélectif (ex : fonction spécialisée ou expression différentielle dans les différents organes de l'individu).

Evolution :

L'accumulation de numts est probablement un processus continu dans l'histoire évolutive des espèces, avec des événements de transfert pour la plupart indépendants les uns des autres (ex chez l'Homme : Gherman *et al.*, 2007 ; chez les plantes : Palmer *et al.*, 2000). L'idée que les espèces pouvaient présenter des variations de fréquence de numts a été proposée en 1996 (Blanchard et Schmidt), et a été confirmée grâce au séquençage complet de génomes d'animaux, de plantes et de champignons (Bensasson *et al.*, 2000). Les numts peuvent également montrer une fréquence variable entre populations d'une même espèce (ex : Song *et al.*, 2008). L'équilibre entre sélection, dérive et insertion/délétion de gènes dupliqués peut changer au cours de l'histoire évolutive des espèces (ex : accumulation préférentielle de numts et d'éléments répétés lors de la réduction de la taille efficace chez les primates, Gherman *et al.*, 2007). La probabilité que le numt et/ou la copie mitochondriale restent fonctionnels, voire que l'un des gènes acquière une nouvelle fonction, dépend des taxa, du fait de différences de tailles et de taux de substitutions des compartiments génomiques. Chez les animaux, les numts sont généralement délétères ou sélectivement neutres, et la conservation de la fonction des numts semble extrêmement rare, possiblement du fait des différences de codes génétiques entre la mitochondrie et le noyau (voir pour revue, Adams et Palmer, 2003). Au contraire, un nombre important de numts fonctionnels a été décrit chez les plantes (voir Adams et Palmer, 2003), et concernent majoritairement des gènes codant pour des protéines ribosomales plutôt que pour des gènes impliqués dans la respiration cellulaire (Palmer *et al.*, 2000).

particuliers à l'une des espèces.

D'autre part, l'hétéroplasmie avérée a été souvent reportée dans des études de zones d'hybridation entre espèces proches, chez les animaux comme chez les plantes (Barr *et al.*, 2005 ; Rokas *et al.*, 2003). Lorsque les barrières reproductives sont incomplètes, les mécanismes d'élimination des mitochondries paternelles peuvent ne pas être fonctionnels lors de croisements interspécifiques. L'hétéroplasmie est alors restreinte aux zones d'hybridation et est transitoire : les processus de « lineage sorting » et de dérive pendant la transmission uniparentale du génome mitochondrial devraient en effet éliminer rapidement l'hétéroplasmie (Rokas *et al.*, 2003). Cependant, les conséquences évolutives peuvent être importantes, car cette hétéroplasmie est une opportunité pour qu'il y ait recombinaison entre génomes mitochondriaux divergents et génération d'haplotypes nouveaux, pouvant ainsi faciliter l'évolution adaptative (Rokas *et al.*, 2003).

Chez les macroalgues, un premier cas d'hétéroplasmie pour la mitochondrie a été décrit récemment par Coyer *et al.* (2004). Chez *Fucus serratus*, ces auteurs ont montré que 95% des individus de deux populations des côtes de Norvège et du Danemark présentaient de l'hétéroplasmie (Coyer *et al.*, 2004), mais ce phénomène semble restreint à cette région de l'Europe (Hoarau *et al.*, 2007). L'hypothèse d'une hybridation avec d'autres espèces de *Fucus* est écartée, du fait de la similarité de séquence entre variants. Les auteurs associent cette hétéroplasmie géographique à un effet de fondation lors de la colonisation post-glaciaire, bien que la population d'origine n'ait pas été identifiée. On peut se demander alors quels sont les mécanismes qui maintiennent cette hétéroplasmie : est-ce un hasard si ces populations sont situées en limite d'aire de distribution de l'espèce ? Quelle est l'importance respective de la sélection (adaptation aux conditions environnementales locales) et de la dérive (faible taille efficace de ces populations) dans l'origine et le maintien de cette hétéroplasmie ? L'hétéroplasmie observée chez l'espèce AI de *L. nigrescens* soulevait ces mêmes questions, en particulier parce qu'elle semblait limitée aux populations de limite d'aire. A cela s'ajoutaient des questions liées au processus de spéciation entre AI et PP : quel est le rôle de l'hybridation actuelle (mais paraissant peu probable, voir Partie B de ce Chapitre 2) ou passée sur l'origine de cette hétéroplasmie ?

Hypothèses et attendus

Les croisements réalisés lors de cette thèse (Partie B de ce Chapitre 2) devraient apporter des éléments d'information sur le mode de ségrégation de ce marqueur multibande, et donc sa localisation (noyau ou cytoplasme). La comparaison des séquences des variants

Encadré 2.D.2 : Les duplications de gènes : des « fauteurs de trouble moléculaire » ?

Comme décrit dans l'introduction du Chapitre 1, l'utilisation de marqueurs mitochondriaux seuls peut mener à des inférences erronées, reflétant l'histoire du marqueur plutôt que celle des espèces, du fait de l'action de la sélection naturelle et/ou de la dérive. La duplication d'une région mitochondriale (numt ou autre) est une source additionnelle d'erreurs possibles lors de la construction de phylogénies à partir d'un seul marqueur mitochondrial. L'orthologie des caractères – la présence d'allèles dérivés d'un ancêtre commun – est en effet une hypothèse fondamentale et implicite pour reconstruire des phylogénies. Si l'hypothèse d'orthologie est violée, c'est-à-dire si des séquences paralogues – dérivées d'une séquence ancestrale par duplication – sont sans le savoir considérées comme orthologues, des inférences incorrectes sur l'histoire des espèces sont inévitables (Funk et Omland, 2003 ; ex : Song *et al.*, 2008).

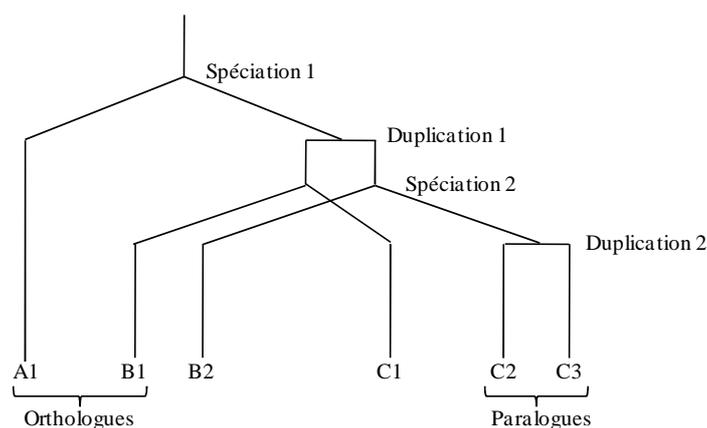


Fig. 1 : Exemple de gènes paralogues et orthologues. Sur cet arbre phylogénétique, les événements de spéciation sont indiqués par une fourche et ceux de duplication de gènes par une ligne horizontale. Trois espèces A, B et C sont représentées. Deux gènes dont l'ancêtre commun est situé à la base d'une fourche sont orthologues, tandis que deux gènes dont l'ancêtre commun est situé sur une ligne horizontale sont paralogues. Deux exemples sont indiqués. Figure d'après Finch (2000).

observés au sein d'un même individu permet cependant de discriminer entre les autres mécanismes à l'origine de l'hétéroplasmie apparente (Fig. 2.D.1). Les différents cas possibles sont les suivants :

- (1) Hétéroplasmie avérée intraspécifique (Fig. 2.D.1Aa), phénomène de thalles chimériques (« coalescence », Fig. 2.D.1Ba) ou endo/épiphytisme par un individu de même espèce (Fig. 2.D.1Bb) : les différentes séquences appartiennent alors au même clade de *L. nigrescens* (espèce PP : Nord, Z30 ou espèce AI), et ces trois hypothèses sont difficilement distinguables l'une de l'autre.
- (2) Hétéroplasmie avérée due à de l'hybridation interspécifique (Fig. 2.D.1Ab): l'une des deux séquences devrait alors appartenir à l'espèce AI, la seconde à l'espèce PP (probablement des haplotypes de la Région de transition, du fait de la proximité géographique entre espèces).
- (3) Duplication à l'intérieur du génome mitochondrial (Fig. 2.D.1Ac) ou duplication avec transfert vers le noyau (numt, Fig. 2.D.1Ad): une des séquences devrait appartenir à une des espèces cryptiques de *L. nigrescens*, tandis que la localisation de la seconde séquence sur l'arbre phylogénétique dépendrait de la date de l'évènement de duplication par rapport à la date de l'évènement de spéciation (divergence entre AI et PP) et par rapport à la divergence entre les clades Nord et Z30 au sein de l'espèce PP (Encadré 2.D.2).
- (4) Endo/épiphytisme par un individu d'une autre espèce (Fig. 2.D.1e) : les amorces atp8/trnS étant considérées universelles pour les algues brunes (Engel *et al.*, 2008), l'ADNmt d'une autre espèce aurait pu être amplifié. Les séquences devraient alors être très divergentes entre elles avec des positions contrastées sur l'arbre phylogénétique : une de ces séquences devrait appartenir à une des espèces cryptiques du complexe *L. nigrescens* (individu hôte), tandis que la seconde séquence (individu endo/épiphyte) devrait se placer hors de ce complexe *L. nigrescens*. Parmi les espèces « candidates », on peut citer en particulier *Laminariocolax* sp. (algue brune de l'ordre des Ectocarpales), épi/endophyte des espèces AI et PP de *L. nigrescens*. Parmi les algues phylogénétiquement plus proches de *L. nigrescens*, trois espèces sont présentes dans la région d'étude : les Laminariales *Macrocystis* sp. et *L.*

trabeculata et la Fucale *Durvillea antarctica*, cette dernière ayant cependant une distribution restreinte au sud de 30°S (donc sympatrie avec l'espèce AI seulement).

c) Objectifs du travail

Les deux objectifs de cette étude des profils mitochondriaux sont listés ci-dessous :

- (1) Identifier les différents fragments des profils multibandes en obtenant les séquences correspondantes, afin d'inférer sur les mécanismes à l'origine de cette hétéroplasmie apparente.
- (2) Caractériser l'étendue géographique de l'hétéroplasmie apparente : est-elle bien limitée à la lignée AI et plus particulièrement aux populations de cette espèce situées en limite d'aire (ACE et COZ) ?

2. Matériel et Méthodes

a) Identification des fragments correspondant aux bandes supplémentaires

Deux types de profils ont été détectés pour les individus de l'espèce AI : le profil « type ACE », avec trois bandes, et le profil « type PUC », avec deux bandes (Fig 2.D.2). Deux approches ont été utilisées afin d'identifier chacune des bandes : (i) la technique du clonage, décrite dans le Chapitre 1, et (ii) le séquençage après découpage des bandes sur gel d'agarose. Le clonage a été réalisé sur cinq individus, issus de la population Aceituno : ACE-A34, ACE-A35, ACE-B2, ACE-B3 et ACE-B83.

Etant donné les résultats partiellement concluant du clonage (voir Résultats), nous avons cherché à obtenir chaque bande après séparation sur gel d'agarose. L'ADN de trois individus a été utilisé : PUC3, ACE-A34 et ACE-A35. La migration des produits PCR de l'amplification *atp8/trnS* a été réalisée sur gel d'agarose à 2%, puis les différentes bandes obtenues pour chaque individu ont été découpées à l'aide d'un scalpel. La purification à l'aide du kit Nucleospin (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) a permis d'obtenir l'ADN correspondant à chacune des bandes. La réaction de séquençage a ensuite été réalisée comme indiqué dans le Chapitre 1.

Les séquences obtenues ont été alignées avec le jeu de données présenté dans l'étude

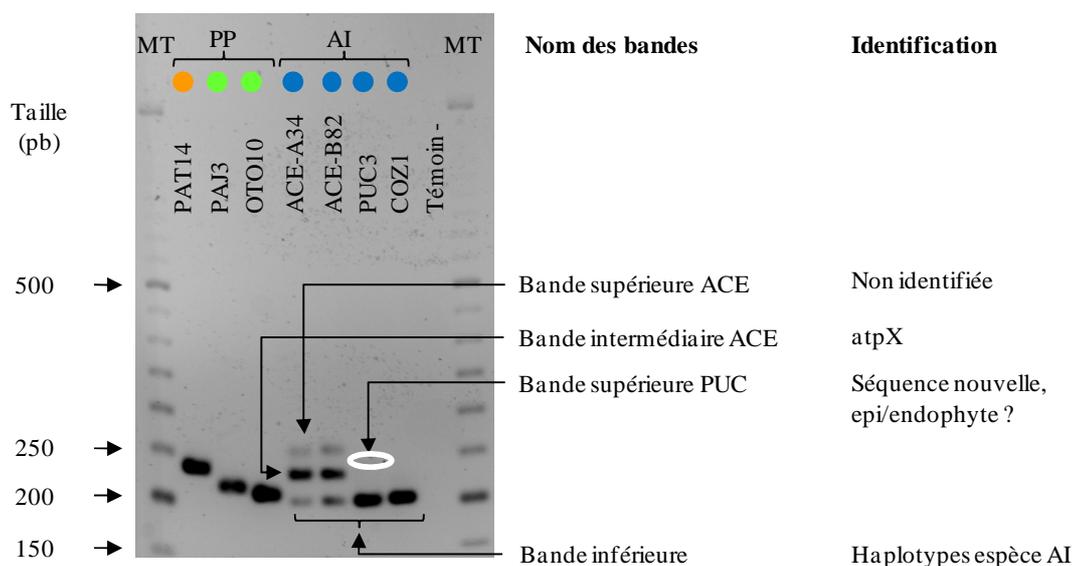


Figure 2.D.2 : Types de profils observés après migration sur gel d'agarose du produit d'amplification PCR du marqueur mitochondrial *atp8/trnS*. Les noms utilisés pour chaque type de bande sont indiqués sur la figure. Sont également notées les conclusions concernant l'identification de chacune de ces bandes. La « bande du haut PUC », de faible intensité, est peu visible sur cette photo et est indiquée par une ellipse. Les ronds de couleur indiquent les clades d'appartenance des individus (pour espèce PP : orange : clade Nord, vert : clade Z30 ; pour espèce AI : bleu). MT : marqueur de taille, Témoin - : témoin négatif de la PCR, pb : paires de bases.

de phylogéographie (Chapitre 1) et avec les séquences présentes dans GenBank. Les réseaux d'haplotypes ont été construits en considérant les indels comme un cinquième état de caractère d'une part et en les excluant de l'analyse d'autre part, avec le logiciel NETWORK v 4.5 (Bandelt *et al.*, 1999). Les arbres phylogénétiques d'inférence Bayésienne ont été reconstruits comme décrit dans le Chapitre 1 : (i) en excluant les sites d'indels de l'analyse et (ii) en considérant les indels comme des données manquantes, ce qui permet de prendre en compte le polymorphisme de substitution des sites montrant également du polymorphisme d'indels. La méthode de maximum de vraisemblance (ML) a également été utilisée, mais seule l'analyse en excluant les sites d'indels a pu être réalisée (méthode identique au Chapitre 1, sauf test de robustesse de 500 bootstraps). Les indels importants causaient en effet des problèmes d'analyse lorsque les indels étaient considérés comme « données manquantes ».

b) Etendue géographique des profils multi-bandes

La recherche de profils multi-bandes a été effectuée sur un total de 652 individus, issus de 33 populations (dont 230 individus de la zone de contact Aceituno-Choros) couvrant l'ensemble de l'aire d'étude (Tableau 2.D.1). La détection du profil multi-bandes a été réalisée par migration sur gel d'agarose, dans des conditions permettant la séparation des différentes bandes observées (1,5 à 2%) et en utilisant comme marqueurs de tailles un individu des deux clades (Nord et Z30) de l'espèce PP et un individu de l'espèce AI, ainsi qu'un individu pour chacun des profils multi-bande détectés (type PUC et type ACE).

3. Résultats

a) Séparation et amplification des différents fragments

La transformation bactérienne pour l'individu ACE-B2 n'a pas fonctionné. Pour les quatre autres individus, entre deux et cinq clones ont été séquencés, avec un total de 12 séquences obtenues. Un premier résultat surprenant est que toutes ces séquences correspondent uniquement à la taille de la « bande intermédiaire ACE », alors que les produits PCR utilisés pour le clonage comportaient les trois bandes du profil « type ACE ». Ce résultat est à rapprocher du précédent : le clonage n'a pas non plus fonctionné pour l'individu ACE-

Tableau 2.D.1 : Localisation géographique des sites et résultats de l'étude de la distribution géographique des profils multi-bandes chez *L. nigrescens*. Le nombre total d'individus analysés par site (N) est indiqué, ainsi que le nombre d'individus présentant chacun des profils identifiable sur gel d'agarose (voir Fig. 2.D.2).

Site d'échantillonnage	Abréviation	Coordonnées (Latitude/ Longitude)	N	Profil atp8/trnS				
				Nord	Z30	AI	Type ACE	Type PUC
Qda Mollendito	QMO	16°58'S / 72°07'O	27	27				
Qda Camarones	QCA/CAC	19°11'S / 70°16'O	28	28				
Pta Pichidalo	PCH	19°36'S / 70°14'O	13	13				
Pta Coloso	COL	23°46'S / 70°29'O	28	28				
Pan de Azúcar	CHA/SLD	26°09'S / 70°40'O	29	29				
Morro Copiapó	MOC	27°12'S / 70°57'O	1	1				
Cta Pajonal	PAJ	27°41'S / 71°02'O	1		1			
Cueva del Pirata	CPI	29°01'S / 71°29'O	30			28	2	0
Aceituno	ACE	29°03'S / 71°29'O	28			13	15	0
Aceituno Playa Norte	APN	29°05'S / 71°29'O	28			21	7	0
Aceituno Playa Sur	APS	29°06'S / 71°28'O	30			15	15	0
Ermitaño	ERM	29°08'S / 71°30'O	30			20	10	0
Ermitaño Sur	ERMS	29°10'S / 71°29'O	29			27	2	0
Apolillado Norte	APON	29°10'S / 71°29'O	24		24			
Apolillado	APO	29°11'S / 71°29'O	30		30			
Choros Norte	CHN	29°15'S / 71°27'O	1		1			
El Temblador	TBL	29°28'S / 71°18'O	1		1			
Isla Pájaros (île)	IPA	29°35'S / 71°31'O	25			25	0	0
Arrayan	ARY	29°41'S / 71°19'O	1		1			
Coquimbo-Cruz	COZ	29°57'S / 71°21'O	29			20	9	
Pta Lengua de Vaca 2	PTLV2	30°15'S / 71°38'O	29			21	8	
Río Limari	RLI	30°44'S / 71°42'O	30			21	9	
Montemar	MTM	32°57'S / 71°32'O	11			11		
Curamilla	CURAM	33°05'S / 71°43'O	13			13		
El Quisco	QUIS	33°23'S / 71°42'O	14			14		
Las Cruces	LC	33°30'S / 71°38'O	4			4		
Matanzas	MAT	33°57'S / 71°52'O	5			4		1
Pichilemu	PICHI	34°23'S / 72°01'O	18			10		8
Constitución	CST	35°19'S / 72°25'O	13			7		6
Concepción	CONCE	36°30'S / 72°54'O	24			7		17
Mehuín	MEH	39°25'S / 73°12'O	25			23		2
Pucatrihue	PUC	40°32'S / 73°43'O	26			25		1
Pta Guabún (Ile de Chiloé)	GBN	41°48'S / 74°01'O	27			26		1
Total	33 sites		652	126	58	355	77	36

B2, qui présentait un profil avec une « bande inférieure » d'intensité plus importante relativement aux autres bandes.

L'approche par séparation des fragments sur gel d'agarose a permis de séquencer les fragments correspondants à la « bande intermédiaire ACE » pour les individus ACE-A34, ACE5 et COZ21 et à la « bande supérieure PUC » pour l'individu PUC3. La « bande supérieure ACE » n'a pas pu être séquencée. Les profils obtenus sur gel d'agarose montrent cependant que cette bande ne correspond à aucune taille de fragment connue (Fig. 2.D.2). En utilisant la même méthode, le produit PCR correspondant à la « bande inférieure » a été séquencé pour 75 individus de profil « type ACE » et 36 individus de profil « type PUC ».

b) Identification des fragments par séquençage

Bandes inférieures ACE et PUC

L'ensemble des séquences obtenues pour la « bande inférieure » correspond bien à des haplotypes déjà observés chez les individus ayant un profil monobande de taille homologue. Ces haplotypes sont tous de l'espèce AI (c'est la raison pour laquelle ils ont été inclus dans l'étude de phylogéographie, cf. Chapitre 1).

Bande supérieure PUC

La séquence obtenue pour la « bande supérieure PUC » est très différente des séquences *atp8/trnS* déjà connues. L'alignement avec l'ensemble des séquences contenues dans GenBank indique une certaine similarité avec les séquences *atp8/trnS* des espèces de la famille des Laminariales (78-83%), la séquence la plus similaire étant celle de *Laminaria digitata*, avec 83% d'identité. Étant donné cette divergence importante, cette nouvelle séquence n'a pas été incluse dans les analyses de phylogénie. Cependant, une étude plus approfondie serait nécessaire pour explorer l'origine de ce fragment.

Bande intermédiaire ACE

Sur un total de 15 séquences obtenues, cinq haplotypes différents ont été observés, (appelés *atpX1* à *atpX5*) pour la « bande intermédiaire ACE ». Ces cinq haplotypes *atpX* diffèrent entre eux par quatre sites polymorphes (Fig. 2.D.3). L'haplotype *atpX5* a été observé chez deux individus de la population COZ (COZ21 et l'individu analysé par P. Martin), tandis que les quatre autres ont été obtenus pour les individus de la population ACE. Le clonage a permis de montrer la présence de deux séquences différentes de type *atpX* au sein d'un même

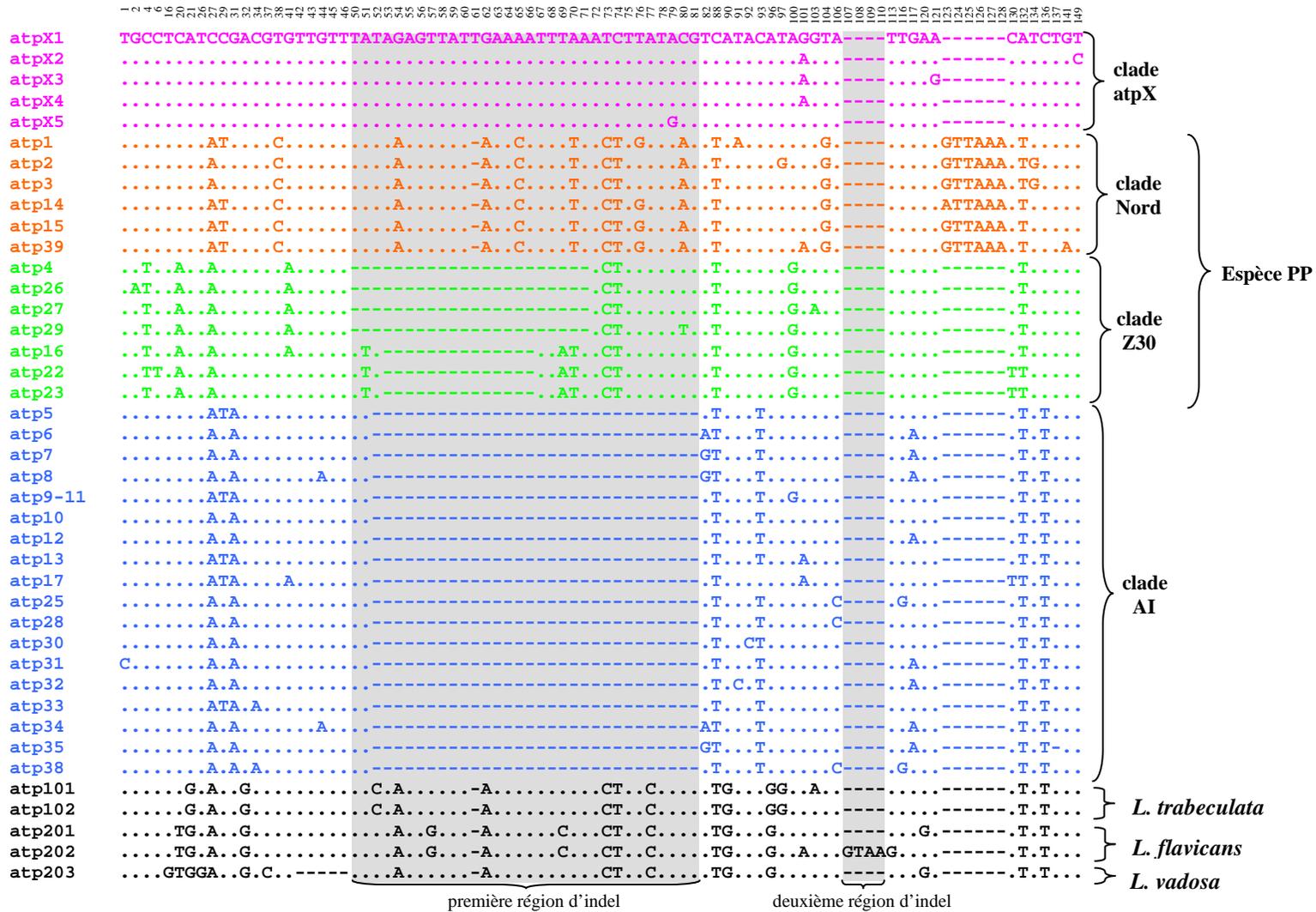


Figure 2.D.3 : Alignement des 5 haplotypes (atpX1 à atpX5) correspondant à la « bande intermédiaire ACE » avec l'ensemble des haplotypes inclus dans l'étude de phylogéographie. Seuls les sites polymorphes sont montrés et leur position dans la séquence est indiquée sur le haut de la figure. Les séquences sont groupées par similarité de polymorphisme d'indel et par appartenance aux différents clades des reconstructions phylogénétiques de la Figure 2.D.5. Les couleurs correspondent aux différents clades de la Figure 2.D.5. Les deux régions montrant du polymorphisme d'indel à l'intérieur du complexe *L. nigrescens* sont indiquées en grisé.

individu (ACE-B3).

L'alignement avec les séquences de GenBank montre que ces haplotypes atpX sont plus similaires aux séquences de *L. nigrescens* qu'à celles des autres espèces de Laminariales. A l'intérieur de notre jeu de données, les atpX présentent une structure d'indels similaire à celle des espèces outgroup *L. trabeculata* et *L. flavicans*, à l'exception d'une délétion d'une paire de base, située à l'intérieur de la première région d'indel polymorphe pour *L. nigrescens* (position 61, Fig. 2.D.3). En plus de cet indel, ces cinq haplotypes se caractérisent par la présence de neuf substitutions spécifiques au groupe des atpX, parmi lesquelles sept sont partagées entre eux.

c) Position phylogénétique des haplotypes atpX

Les arbres obtenus avec les différentes méthodes de reconstruction phylogénétique sont congruents sur la monophylie du clade regroupant tous les haplotypes atpX (valeurs de soutien entre 94 et 100, Fig. 2.D.4). La position phylogénétique de ce clade est cependant mal résolue : les arbres excluant les sites d'indels montrent une polytomie regroupant les clades Nord et Z30 de l'espèce PP et atpX, tandis que les arbres considérant les indels comme données manquantes (permettant de prendre en compte le polymorphisme de substitution dans ces sites) positionnent le clade atpX comme intermédiaire entre l'espèce AI et l'espèce PP, bien qu'avec une faible valeur de soutien (Fig. 2.D.4). La présence d'indels complique l'analyse mais deux résultats sont consistants : (i) les haplotypes atpX forment un clade monophylétique, et (ii) ce clade atpX n'est pas associé au clade de l'espèce AI, mais plutôt aux clades de l'espèce PP.

Les réseaux d'haplotypes montrent un patron complexe et partiellement congruent avec les arbres phylogénétiques : le polymorphisme d'indels rapproche les haplotypes atpX des espèces outgroups (Fig. 2.D.5A et Fig. 2.D.3). Lorsque les sites d'indels sont exclus, les haplotypes atpX sont quasiment à équidistance des clades des espèces PP et AI, ainsi que des outgroups (Fig. 2.D.5B).

d) Distribution géographique des profils multi-bandes

Sur les 652 individus analysés, les profils multi-bandes ont été observés uniquement dans des populations de l'espèce AI (Fig. 2.D.6, Tableau 2.D.1). La distribution de chacun des profils est limitée à des aires géographiques restreintes et non chevauchantes : (i) le profil

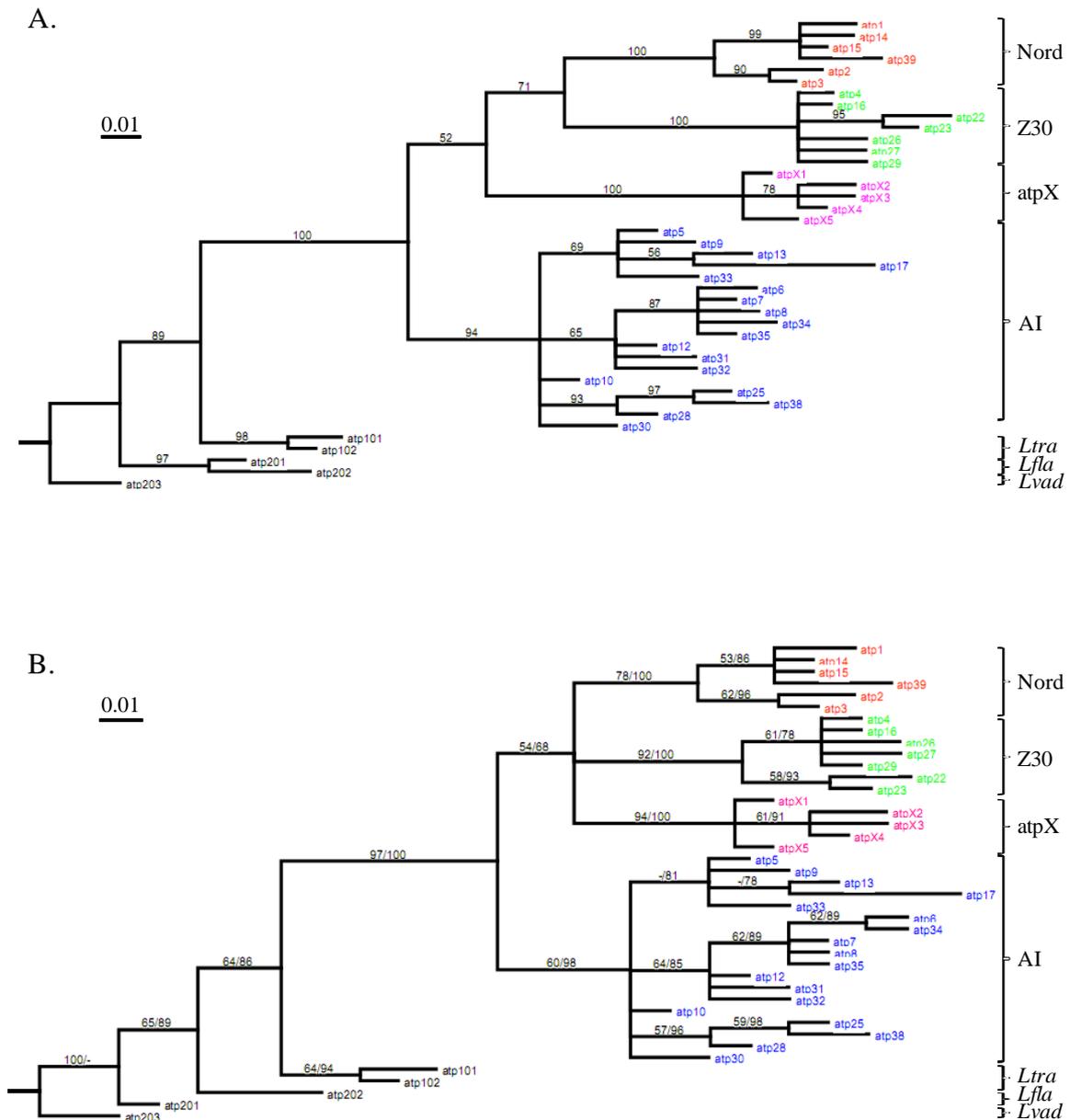


Figure 2.D.4 : Arbres phylogénétiques incluant l'ensemble des haplotypes obtenus pour *atp8/trnS* et les haplotypes nommés « *atpX* ». A. Arbre d'inférence Bayésienne, indels traités comme « données manquantes », le polymorphisme de substitutions des sites avec indels est donc pris en compte (voir texte), les probabilités postérieures sont indiquées. B. Arbre d'inférence Bayésienne, sites avec indels exclus de l'analyse. Sur cet arbre, les valeurs de soutien sont respectivement les valeurs de bootstraps de maximum de vraisemblance et les probabilités postérieures Bayésiennes. La couleur des haplotypes indique le clade d'appartenance, en ajoutant la couleur rose pour les haplotypes *atpX*.

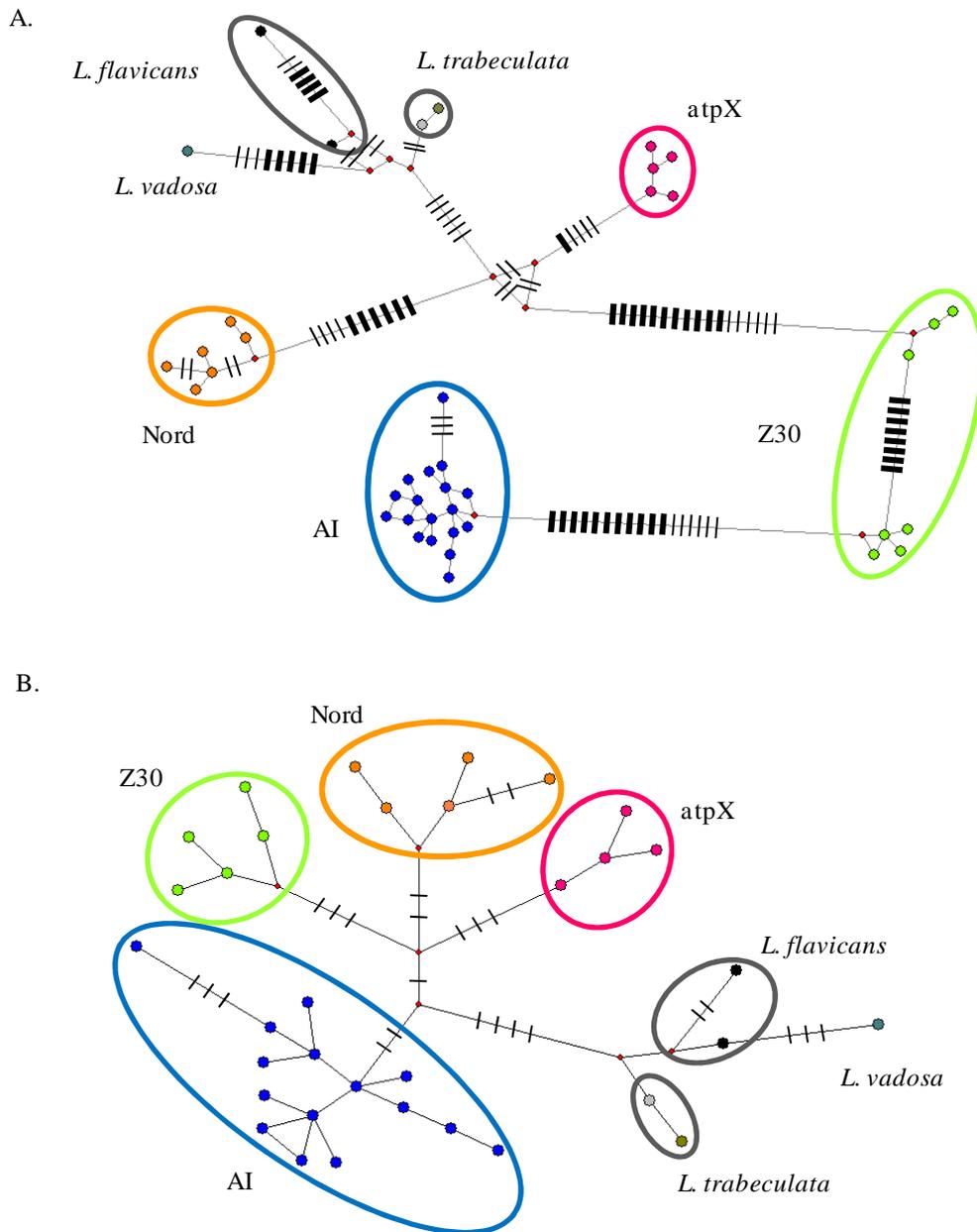


Figure 2.D.5 : Réseaux d'haplotypes incluant l'ensemble des haplotypes obtenus pour atp8/trnS en incluant les haplotypes atpX. A. Indels traités comme un cinquième état de caractère, B. Sites avec indels exclus. Les losanges rouges représentent les haplotypes non détectés dans cette étude et les barres indiquent une mutation (trait fin : substitution, trait épais : délétion ; indiqué seulement pour les haplotypes séparés par plus d'une mutation). Pour raison de clarté, la fréquence des haplotypes n'est pas représentée sur ces réseaux.

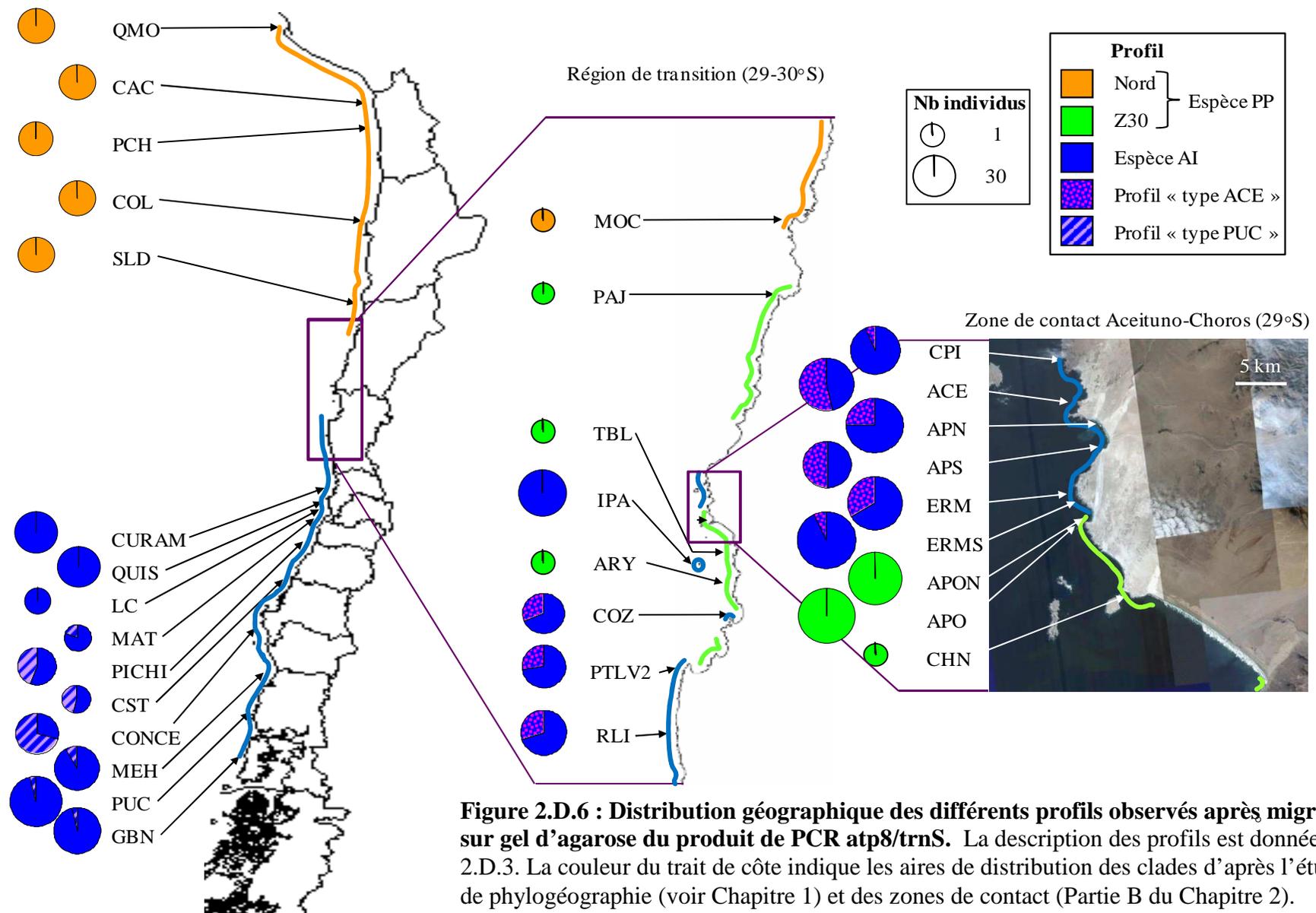


Figure 2.D.6 : Distribution géographique des différents profils observés après migration sur gel d'agarose du produit de PCR *atp8/trnS*. La description des profils est donnée Fig. 2.D.3. La couleur du trait de côte indique les aires de distribution des clades d'après l'étude de phylogéographie (voir Chapitre 1) et des zones de contact (Partie B du Chapitre 2).

« type PUC » est observé seulement entre 33°57'S et 41°48'S de latitude (c'est-à-dire entre les sites MAT et GBN, Fig. 2.D.6), (ii) le profil « type ACE » est typique du nord de l'aire de distribution de l'espèce AI (Région de transition : sites PTLV2, RLI, COZ et ACE, Fig. 2.D.6). Des différences importantes de fréquence de ce profil « type ACE » ont été observées entre sites géographiquement proches. Dans la zone de contact Aceituno-Choros, par exemple, il n'est présent que chez 6,6% des individus dans le site CPI, alors qu'il atteint 53,6% dans le site ACE, distant de 7,4km seulement du site précédent (Fig. 2.D.6).

4. Discussion

Origine endo/épiphytique probable pour la « bande supérieure PUC »

Lors de notre échantillonnage, un soin particulier a été pris pour éviter une contamination par des épiphytes, en choisissant des tissus jeunes (méristématiques) et en les nettoyant avec du tissu absorbant. Cependant, la présence d'épiphytes et plus particulièrement d'endophytes ne peut pas être écartée. L'hypothèse d'individus épi/endophytes de Laminariales peut être écartée pour l'ensemble des fragments (atpX, PUC3 et la « bande supérieure ACE », d'après la taille de ce fragment) : ces fragments ne correspondent en effet pas aux haplotypes connus de *Macrocystis sp.* et de *L. trabeculata*.

La forte divergence de séquence de la bande supérieure PUC3 de l'espèce AI suggère qu'il s'agit d'une espèce endo/épiphyte de Laminariales pour laquelle il n'existerait pas encore de séquence atp8/trnS dans la base de données GenBank (séquences présentes pour seulement des espèces de Laminariales et de *Fucus*). Aucune séquence atp8/trnS n'est actuellement disponible pour la Fucale *D. antarctica*, et une contamination par cette espèce ne peut pas être exclue pour la séquence PUC3, d'autant plus que l'abondance de l'espèce augmente vers le sud de la région d'étude (où ce profil a été observé). De même, la présence de l'Ectocarpale *Laminariocolax sp.* est une explication possible. L'obtention de séquences pour ces espèces devrait permettre de tester ces hypothèses.

Enfin, une dernière hypothèse est que la séquence PUC3 est le résultat d'une duplication (numt ou dans la mitochondrie) ancienne, et qui aurait fortement divergé, du fait d'un taux de mutation important.

La distribution géographique des séquences de type « bande supérieure PUC » est limitée aux populations AI, situées au sud de 33°S. Les effets combinés de la migration et de la dérive pourraient limiter l'expansion de ce variant dans les populations AI situées plus au

nord.

Le cas des haplotypes atpX est différent car leur séquence est similaire à celles obtenues dans le complexe d'espèces *L. nigrescens*, écartant ainsi l'hypothèse d'une origine épi/endophyte de l'hétéroplasmie apparente.

Clade atpX : duplication dans la mitochondrie ou numt ?

Les haplotypes correspondant au fragment « bande intermédiaire ACE » ont été regroupés en un clade monophylétique et bien soutenu quelque soient les méthodes de reconstruction phylogénétique utilisées (arbres phylogénétiques et réseaux d'haplotypes). Ces haplotypes ont donc une origine commune (orthologie). La nette divergence génétique de ce clade par rapport aux trois clades mitochondriaux du complexe *L. nigrescens* et aux autres espèces de *Lessonia* permet d'exclure l'hypothèse d'une hétéroplasmie liée à une l'hybridation récente entre espèces AI et PP ou entre une de ces espèces et *L. trabeculata*.

Le fait que ces haplotypes atpX constituent un clade clairement distinct de celui de l'espèce AI permet également de rejeter les hypothèses d'hétéroplasmie avérée intraspécifique et de « coalescence » entre individus de même espèce (qui se traduiraient par la présence d'haplotypes AI pour *tous* les fragments) pour expliquer la présence du profil multibande.

Restent deux hypothèses, que l'on ne peut pas distinguer du fait des méthodes utilisées : ces haplotypes atpX peuvent être le résultat d'un évènement de duplication à l'intérieur du génome mitochondrial (Fig. 2.D.1Ac) ou d'un évènement de duplication avec intégration d'une copie dans le génome nucléaire (numts). La présence de deux séquences atpX différentes détectées au sein d'un même individu par clonage est un élément qui suggère que ces séquences sont nucléaires, mais une erreur liée au clonage est aussi possible.

Afin de tester si cette duplication s'étendait à d'autres régions du génome mitochondrial, six individus de « profil ACE » ont été analysés par séquençage direct avec le marqueur rpl31-rns, situé à environ 820pb du marqueur atp8/trnS étudié (d'après la séquence du génome mitochondrial de *L. digitata* : Oudot-LeSecq *et al.*, 2002, Fig. 2.D.7). Les chromatogrammes n'ont pas montré d'ambiguïté de pics, ce qui suggère que si la duplication existe pour atp8/trnS, la région dupliquée n'inclue pas ce nouveau marqueur (données non montrées).

Position phylogénétique du clade atpX : adaptation ou recombinaison

Le groupe d'haplotypes atpX se caractérise par un nombre important de substitutions, lorsqu'on le compare au polymorphisme observé habituellement chez *L. nigrescens* : sur

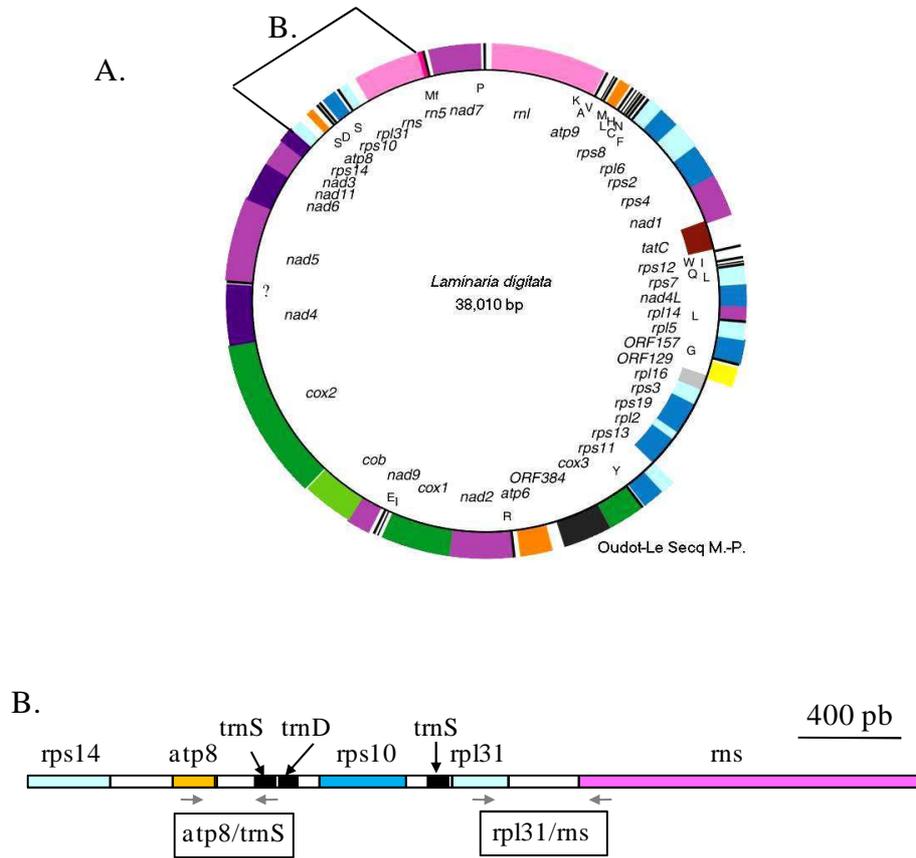


Figure 2.D.7 : Carte du génome mitochondrial de *Laminaria digitata* d'après Oudot-Le Sesq *et al.* (2001) (A) et localisation des zones intergéniques étudiées : *atp8/trnS* et *rpl31/rns* (B). Les amorces sont représentées par des flèches grises.

quatre individus du site ACE, analysés par clonage, quatre haplotypes atpX différents ont été obtenus, alors que le polymorphisme intra-population du marqueur atp8/trnS (« bande inférieure ») est très souvent faible, voire même nul dans la population ACE en particulier (Chapitre 1).

La forte divergence entre le clade atpX et les autres clades du complexe *L. nigrescens* suggère un évènement ancien de duplication, à peu près aussi ancien que la divergence entre les clades Nord et Z30 de l'espèce PP et l'espèce AI (Fig. 2.D.4). L'information apportée par les indels et par le polymorphisme de substitution est contradictoire. Ceci est clairement mis en évidence sur les réseaux d'haplotypes : tandis que le clade atpX est nettement plus proche de *L. trabeculata* lorsqu'on considère uniquement l'information donnée par les indels (traits épais, Fig. 2.D.5A), il se trouve à égale distance entre les espèces outgroup et le clade Nord en se basant sur le polymorphisme d'indels et de substitution (traits fins et épais, Fig. 2.D.5A) et enfin à égale distance entre les espèces PP et AI lorsque le réseau exclue les sites d'indels (Fig. 2.D.5B). Ce fort polymorphisme et la divergence importante des autres clades suggère que le taux de mutation est plus important pour les haplotypes atpX que pour les autres clades de *L. nigrescens*. Une autre hypothèse possible pour expliquer l'origine du clade atpX serait que l'évènement de duplication aurait eu lieu à partir d'un haplotype d'un clade aujourd'hui éteint.

Localisation géographique des haplotypes atpX : rôles de la sélection, de l'hybridation et de la dérive

Les profils « type ACE » ont été observés uniquement dans les populations situées au nord de l'aire de distribution de l'espèce AI (29-31°S, Fig. 2.D.6). Cette restriction géographique, expliquée partiellement par la faible capacité de dispersion de *L. nigrescens*, se comprend mieux dans le contexte de l'évolution des mécanismes particuliers dans les populations situées en limite d'aire. Une hypothèse possible expliquant le maintien de cette duplication de la région mitochondriale pourrait être la réponse à la sélection en limite d'aire de distribution. En particulier, la région dupliquée pourrait avoir impliqué non seulement le marqueur intergénique atp8/trnS mais également des gènes codants situés à proximité. Ceci pourrait avoir des conséquences sur la valeur sélective des individus, et en particulier être favorable dans les conditions environnementales de la limite nord de l'aire de l'espèce AI.

La présence de la région dupliquée pourrait également être avantageuse si elle limite l'hybridation entre individus des espèces AI et PP, en particulier dans le cas où les hybrides seraient non-viables. Les gènes dupliqués peuvent être impliqués dans des incompatibilités de

Dobzhansky-Muller (DMI) (Coyne et Orr, 2004). Cependant, l'étude de la zone de contact Aceituno-Choros montre une forte variation de fréquence d'individus de profil « type ACE » entre populations AI : les taux les plus importants ont été observés dans les populations ERM et ACE, et ne sont donc pas une caractéristique particulière aux populations voisines des populations PP (Fig. 2.D.6).

Enfin, l'observation du variant atpX uniquement dans les populations de l'espèce AI pourrait être liée à une différence de taille efficace entre les espèces AI et PP. L'étude de phylogéographie a montré que la divergence entre AI et PP est certainement associée à la colonisation du nord des côtes chiliennes, avec un fort effet de la dérive, par effet de fondation et par « gene surfing ». Les populations PP sont par ailleurs soumises à des régimes de perturbations importants (El Niño), avec des mortalités locales massives. Le processus de dérive pourrait avoir entraîné une perte du variant atpX dans les populations PP.

Perspectives

Afin de confirmer la duplication suggérée par ces résultats et de la localiser (génomique nucléaire ou génome mitochondrial), différentes approches pourraient être utilisées (Encadré 2.D.3). Les résultats obtenus ici ouvrent cependant de nouvelles questions. En particulier, dans le cas où la duplication aurait eu lieu à l'intérieur du génome mitochondrial, des gènes codants ont-ils été dupliqués en même temps que le marqueur atp8/trnS ? Si oui, quels sont les effets sur la valeur sélective des individus, notamment en limite d'aire de distribution ? Quelle est l'importance de cette duplication sur l'isolement reproducteur entre les espèces PP et AI ?

Encadré 2.D.3 :
Approches possibles pour déterminer le compartiment génomique des copies détectées

(d'après Bensasson *et al.*, 2001) :

- Analyses de descendance afin de déterminer le mode de ségrégation des séquences paralogues : transmission biparentale des numts *versus* transmission maternelle des séquences mitochondriales.
- Localisation des copies dans la cellule par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) : noyau (numts) ou cytoplasme (ADNmt).
- Inférence à partir des différences de mode d'évolution entre le génome nucléaire et le génome mitochondrial : cette méthode est particulièrement intéressante chez les taxa animaux, où le transfert vers le noyau s'accompagne d'un biais de mutation.
- Enrichissement en mitochondries ou en ADN nucléaire : extraction d'ADN à partir de tissus riches pour l'un de ces compartiments cellulaire ou méthodes d'enrichissement lors de l'extraction d'ADN.
- Amplification sélective : utilisation d'enzymes de restriction pour rendre non amplifiables les fragments déjà identifiés.

E. Conclusions

Ce chapitre a eu pour objectif de déterminer quels sont les mécanismes qui limitent les flux de gènes entre les espèces cryptiques AI et PP de *L. nigrescens* et gouvernent la distribution géographique de ces espèces.

- L'analyse génétique des zones de contact dans la Région de transition (29-30°S) a montré **une ségrégation géographique totale des espèces AI et PP, quelque soit l'échelle d'étude** : absence de sites de sympatrie, bien que les sites habités par chacune des espèces soient séparés par une plage de sable de seulement 1,5km de long dans une de ces zones de contact.
- L'étude de la zone de contact Aceituno-Choros avec les marqueurs microsattellites suggère **un isolement reproducteur total entre espèces en conditions naturelles** : aucune introgression ni hybridation n'a été détectée. Le concept biologique de l'espèce peut donc être appliqué aux espèces cryptiques AI et PP du complexe *L. nigrescens*. Le rôle des barrières reproductives intrinsèques reste à déterminer, en génotypant les individus obtenus par croisements en conditions contrôlées.
- L'expérience de transplantation réciproque a permis de montrer **une contre-sélection des sporophytes immigrants asymétrique**, limitée au site situé au sud de la Région de transition. Ce mécanisme pourrait limiter l'expansion de l'aire de distribution de l'espèce PP vers le sud, au moins pendant les années La Niña, comme celle pendant laquelle a été réalisée l'expérience. A l'échelle de la zone de contact Aceituno-Choros, aucune différence de réponse n'a été observée dans l'expérience de transplantation des sporophytes entre les deux sites.
- Ce dernier résultat contraste avec les différences de régimes de température identifiées entre ces sites, et d'une manière plus générale entre sites habités par l'espèce AI et sites habités par l'espèce PP. L'expérience de tolérance des stades microscopiques du cycle de vie à la température et à ses régimes de variation devrait permettre de tester spécifiquement le rôle de ce facteur environnemental comme agent de sélection contre les immigrants (analyse en cours).
- Enfin, des résultats préliminaires ont montré la présence de plusieurs variants du locus *atp8/trnS* au sein de l'espèce AI. Ceci suggère la présence d'une duplication ancienne d'une région du génome mitochondrial, soit au sein de ce génome, soit avec transfert

vers le noyau (numt). Ce variant, appelé « atpX », montre une distribution restreinte aux populations AI, situées dans la Région de transition (29-30°S). **Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives concernant les possibles rôles de ce variant et surtout des gènes codants qui ont pu être dupliqués en même temps** : ces gènes ont en particulier pu conserver leur fonction, acquérir une nouvelle fonction ou perdre la fonction originelle. Cette duplication de gènes, en apportant du matériel génétique neuf, pourrait contribuer à l'isolement reproducteur entre les espèces AI et PP et/ou être impliquée dans des processus d'adaptation de ces populations AI situées en limite d'aire.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Au départ, les travaux d'Andrés Meynard (2005) et cette thèse avaient pour objectif principal la reconstitution de l'histoire évolutive des espèces morphologiques *Lessonia nigrescens* et *Lessonia trabeculata*. Les données acquises au cours de cette thèse ont ensuite permis de proposer le complexe d'espèces « *Lessonia nigrescens* » comme un modèle d'étude des processus de spéciation et des barrières reproductives chez les Laminariales, groupe pour lequel les études de ce genre n'avaient pas encore été menées. Après une synthèse des processus inférés lors de cette thèse, nous discuterons de l'importance de ces résultats sur la gestion de la ressource naturelle et des perspectives de recherches ouvertes ou renforcées.

A. Synthèse

Identification de deux espèces cryptiques au sein du complexe « Lessonia nigrescens »

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont permis de démontrer la présence de deux espèces cryptiques au sein de l'espèce morphologique « *L. nigrescens* », répondant aux deux critères phylogénétique et biologique du concept d'espèce. Cette étude est une première chez les Laminariales : alors qu'il y a encore peu de temps, la question était de savoir si le concept biologique d'espèce même était applicable aux Laminariales (voir discussion sur le genre *Laminaria* : Bartsch *et al.*, 2008), nous avons montré ici un isolement reproducteur total entre deux espèces, qui plus est sont des espèces phylogénétiquement proches et non distinguables morphologiquement. Ce résultat contraste particulièrement avec la vision traditionnelle d'un isolement reproducteur incomplet entre espèces de Laminariales, dû à l'action d'un bouquet de phéromones commun à toutes ces espèces (Pohnert et Boland, 2002) et à la radiation rapide et récente de ce groupe de taxa (Draaisna *et al.*, 2001).

Les espèces cryptiques du complexe « *L. nigrescens* » ont été nommées *espèce AI* et *espèce PP*, en référence aux régions biogéographiques correspondant à leurs aires de distribution respectives (Aire Intermédiaire et Province Péruvienne). Une description taxonomique formelle de ces espèces est actuellement en cours de réalisation dans les équipes

de recherche de J. Correa et B. Santelices (PUCCh). Les études de taxonomie antérieures, basées uniquement sur des critères morphologiques, avaient classé ces deux espèces comme une seule espèce nominale : les espèces AI et PP peuvent donc être considérées comme des espèces cryptiques.

Processus de spéciation chez L. nigrescens : contexte spatial et forces évolutives

Dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, nous avons mentionné l'importance de trois composantes dans les processus de spéciation : le contexte spatial, les forces évolutives et les bases génétiques de l'isolement reproducteur (voir Butlin *et al.*, 2008). Nous avons également souligné que chacune de ces composantes pouvait varier au cours du temps.

Mes travaux de thèse s'intègrent dans le cadre générale de l'étude des processus à l'origine de la distribution des espèces marines le long des côtes chiliennes, afin d'inférer l'histoire de la région, et en particulier de la zone de transition biogéographique 30°S (Laboratoire International Associé « DIAMS »). L'étude comparative de phylogéographie d'espèces d'invertébrés et d'algues, impliquant les deux laboratoires d'accueil, a montré que cette zone de transition biogéographique était associée à une discontinuité génétique marquée, non seulement chez *L. nigrescens*, mais également chez des invertébrés marins. La présence d'espèces cryptiques a en particulier été suggérée chez la « macha » (*Mesodesma donacium*, Peralta, 2008). A partir des données présentées dans le Chapitre 1 pour le complexe d'espèces *L. nigrescens*, il est difficile de déterminer si la divergence a eu lieu dans un contexte géographique d'allopatrie (en particulier spéciation par bourgeonnement ou péripatrie) ou de parapatrie. De plus, les conditions environnementales n'étant pas fixes dans le temps, ce contexte géographique a pu varier lors du processus de spéciation. Cependant, la concordance entre discontinuités génétiques et discontinuités écologiques (patrons d'abondance et de limite d'aire) pour des espèces de traits d'histoire de vie divers semble indiquer que le processus de divergence a été induit par un facteur environnemental extrinsèque et ancien.

Quelque soit le mode géographique de spéciation, la colonisation du nord semble cependant être un élément commun aux différents scénarios de spéciation chez le complexe *L. nigrescens*. Cette colonisation depuis l'espèce AI ancestrale peut avoir facilité la divergence entre AI et PP par des processus de dérive (effets de fondation et « gene surfing ») et/ou par l'action de la sélection naturelle (adaptation à des conditions environnementales plus

spécifiques du nord) dans les nouvelles populations. L'expérience de transplantation réciproque et les données de régime de résurgence suggèrent que la divergence adaptative a pu effectivement contribuer au processus de spéciation.

La modification de la structure génétique du génome peut également contribuer aux processus de spéciation, voire être le mécanisme à l'origine de la divergence (voir discussion dans l'Introduction : polyploïdie, réarrangements chromosomiques (en particulier éléments transposables) et duplications de gènes). Chez le complexe d'espèces *L. nigrescens*, la découverte de variants d'une région intergénique mitochondriale, probablement liés à une duplication de cette région d'ADN, soulève la question de l'importance de cette restructuration du génome dans la divergence entre les espèces AI et PP.

Maintien de l'intégrité des espèces AI et PP et de leur ségrégation spatiale

L'étude de génétique des populations (Chapitre 2) ainsi que l'étude phylogénétique (Chapitre 1) ont montré un isolement reproducteur complet et ancien entre les espèces AI et PP. **L'isolement écogéographique (ou isolement par l'habitat) contribue certainement d'une façon importante à l'isolement reproducteur, mais n'est pas suffisant pour expliquer une absence totale de flux de gènes interspécifiques ni la ségrégation spatiale des espèces à l'échelle évolutive.** L'isolement reproducteur entre les espèces AI et PP semblerait donc dû à l'action de barrières reproductives multiples, agissant comme des filtres successifs sur les flux de gènes interspécifiques : l'isolement écogéographique limite les rencontres interspécifiques, et l'action d'autres barrières reproductives agirait sur le flux de gènes résiduel. Ces barrières pourraient être un isolement gamétique et/ou un isolement postzygotique, et l'expérience de croisements en conditions contrôlées, réalisée au cours de cette thèse, devrait permettre de distinguer les deux hypothèses.

Les zones de contact entre espèces AI et PP sont très probablement des zones de tension (ce qui n'exclue pas la présence d'un écotone), simplement du fait de la capacité de dispersion limitée des espèces, de l'isolement écogéographique et de l'absence de flux de gènes interspécifiques. Dans les zones de tension, tandis que la dispersion permet l'hybridation, la sélection intrinsèque agit soit contre les hybrides, soit contre le taxon présent en plus faible abondance (Hewitt, 1988 ; Goldberg et Lande, 2007). L'isolement écogéographique fait que les spores des deux espèces ne sont pas présentes en même

proportion dans les populations locales, avec un nombre de spores résidentes supérieur à celui des spores immigrantes. La probabilité de fécondation interspécifique est donc plus grande pour les gamétophytes immigrants que pour les gamétophytes résidents. Une létalité des hybrides ou une incompatibilité gamétique provoque donc une sélection fréquence-dépendante négative des gamétophytes : les gamétophytes immigrants, et donc en fréquence rare, auront une valeur sélective plus faible que celle des gamétophytes résidents. Ce mécanisme de sélection fréquence-dépendante contre le taxa de plus faible abondance dans la population peut ainsi conduire à terme à une ségrégation géographique des espèces. En l'absence d'autres forces, la possibilité de parthénogénèse des gamétophytes femelles devrait pourtant modifier ce patron, en favorisant au contraire la formation de sporophytes à partir de spores immigrantes isolées les unes des autres dans la population résidente. La parthénogénèse semblerait cependant, d'après notre étude de génétique des populations, être peu fréquente, voire absente, en conditions naturelles. L'étude des processus spécifiques aux populations situées en limite d'aire fait actuellement l'objet du projet de thèse de Valeria Oppliger (cotutelle UPMC/PUCCh), et intègre en particulier les sites de la Région de transition, limite nord de distribution pour l'espèce AI et limite sud pour l'espèce PP.

Les différences écologiques détectées entre deux populations de la zone de contact Aceituno-Choros suggèrent que, dans ce cas précis, la zone de contact pourrait être une zone d'écotone, avec la présence d'un gradient environnemental (zone d'écotone) associé à une divergence adaptative entre espèces. Notre expérience de transplantation de jeunes sporophytes a cependant montré aucune sélection différentielle dans ces sites. Néanmoins, une réponse différentielle entre espèces a pu être mise en évidence lors d'une expérience de tolérance à la température, incluant les sites de la zone de contact Aceituno-Choros, et se traduit par une différence en termes de sex-ratio (Oppliger *et al.*, article en préparation et dont je suis co-auteur). La seconde expérience de réponse à la température, réalisée en collaboration avec Valeria Oppliger et en cours d'analyse, devrait permettre de confirmer ce résultat, en y ajoutant un échantillonnage plus important, et en étudiant spécifiquement les régimes de variation de température.

Dans le sud de la Région de transition, nous avons pu montrer l'action de facteurs environnementaux, limitant la migration efficace d'individus de l'espèce PP vers le sud. La réalisation d'une seconde expérience de transplantation mais cette fois pendant un évènement El Niño permettrait par ailleurs de tester l'importance de ce phénomène sur la limite nord de distribution de l'espèce AI.

B. Conséquences directes des travaux présentés dans cette thèse

Gestion de la ressource et conservation

Le complexe d'espèces *L. nigrescens* constitue une ressource non négligeable pour les pêcheurs-collecteurs, particulièrement ces dernières années où la demande mondiale d'alginate a augmenté, alors que la récolte de Laminariales diminue dans d'autres pays (notamment en France). **Dans ce contexte, il est primordial que les mesures de gestion de la ressource incorporent le fait que *L. nigrescens* est constituée de deux stocks génétiques isolés reproductivement et occupant des niches écologiques distinctes.** En effet, de part leur divergence adaptative, les populations de l'espèce AI ne peuvent pas être considérées comme « refuges » pour l'espèce PP, en cas de perturbation importante, et inversement. En particulier, les expériences de restauration de populations doivent être menées uniquement entre populations de même espèce, sinon elles courent le risque de ne pas réussir. Une expérience de restauration est actuellement menée avec succès par l'équipe chilienne, près de Chañaral (26°S), et a montré une augmentation de la diversité dans les sites concernés par rapport aux sites où l'espèce PP est absente, et ce en particulier pour des espèces d'invertébrés benthiques à forte valeur commerciale.

L'espèce PP apparaît comme particulièrement menacée par plusieurs types de perturbations, naturelles et anthropiques, tandis que le risque d'extinction de l'espèce AI semble limité :

- **Evènements El Niño** : Ces évènements climatiques imprévisibles affectent particulièrement les populations du nord du Chili et du sud du Pérou, populations donc de l'espèce PP. Des mortalités massives de populations y ont en effet été enregistrées lors des deux derniers évènements majeurs (1982/83 et 1997/1998 ; Castilla et Camus, 1992) et des séquelles sont encore visibles, du fait de la capacité de colonisation réduite de l'espèce (ex : Iquique, Martínez *et al.*, 2003).
- **Pollution aux métaux lourds** : Un nombre important d'entreprises minières déchargeant, ou ayant déchargé par le passé, des métaux lourds et des sédiments sur la côte sont présentes entre les latitudes 18°S et 29°S (Fernandez *et al.*, 2000),

correspondant à l'aire de distribution de l'espèce PP. Certains sites, comme celui de Chañaral (26°S), sont hautement contaminés (une des plus fortes concentrations mondiales de cuivre dans des eaux côtières, Correa *et al.*, 1999). Les espèces cryptiques de *L. nigrescens* ont montré être particulièrement sensibles à ce type de polluants : l'accumulation très rapide (à l'échelle des heures) de cuivre dans les tissus a ainsi été observée à travers une expérience de transplantation de jeunes sporophytes dans des sites contaminés (2 mois de suivis, Andrade *et al.*, 2006). Les stades microscopiques, et en particulier les gamétophytes, sont encore plus particulièrement affectés par la présence de cuivre (expérience en laboratoire : Contreras *et al.*, 2007 ; observation sur le terrain : expérience de restauration limitée par l'absence de recrutement dans le site le plus contaminé, obs. équipe chilienne). Toujours dans cette région, il a été montré que la connectivité des populations naturelles était fortement affectée par l'extinction de populations locales (Faugeron *et al.*, 2005).

- **Influence des centrales thermoélectriques** : Ce mode de production d'énergie nécessite l'utilisation de quantités importantes d'eau pour le système de refroidissement. Dans les régions du nord du Chili (18-30°S), arides à semi-arides, ces centrales sont de ce fait construites sur la côte, plutôt que dans les terres. En conséquence de l'augmentation des besoins énergétiques du pays, et particulièrement des industries minières dans ces régions, le nombre de centrales y est important, avec de nouveaux projets en cours (ex : trois projets sur une dizaine de kilomètres de côtes à proximité de la région Aceituno-Choros). L'augmentation de température des eaux rejetées en mer par ces centrales peut avoir des conséquences importantes sur la faune et la flore marines, et en particulier sur les espèces de *L. nigrescens*, particulièrement susceptibles aux températures élevées (Martínez *et al.*, 2003, Peters et Breeman, 1993, Oppliger *et al.*, en prép.).
- **Pression de récolte** : La récolte de *Lessonia* étant réalisée de plus en plus par extraction directe, plutôt que par récolte des individus échoués, la pression de récolte a changé ces dernières années, amenant les autorités chiliennes (SERNAPESCA : *Servicio Nacional de Pesca*) à n'autoriser l'exploitation que dans les Aires de Gestion. La majeure partie de la récolte étant située entre 18°S et 32°S (Vásquez *et al.*, 2008), elle concerne plus particulièrement l'ensemble des populations de l'espèce PP, ainsi que les populations de limite nord de l'aire de distribution de l'espèce AI de *L. nigrescens*.

Toutes ces perturbations affectent l'espèce PP de *L. nigrescens*, et ce sur l'ensemble de son aire de distribution, et constituent un risque important d'extinction de l'espèce. L'espèce AI de *L. nigrescens* semblerait moins affectée par ces perturbations, soit peu importantes (El Niño), soit limitées à des parties restreintes de l'aire de distribution (pollution, centrales thermoélectriques, récolte). Plutôt que d'interdire l'extraction hors des Aires de Gestion, une mesure possible serait de limiter l'exploitation à l'espèce AI, et l'interdire ou la restreindre de façon importante, pour l'espèce PP. Des travaux sont actuellement en cours de réalisation, afin de considérer les aspects socio-économiques liés à l'exploitation des Laminariales au Chili (travaux de l'équipe de J. Vásquez : Vásquez *et al.*, 2008 notamment ; comparaison avec la récolte des algues bretonnes : S. Gelcich et K. Frangoudez, travail en cours)

La mise au point de marqueurs moléculaires hypervariables (microsatellites), à laquelle j'ai participé au cours de ma thèse, est essentielle pour mesurer l'effet de la pression anthropique sur la diversité génétique. Ces marqueurs peuvent également être utilisés pour effectuer un contrôle des mesures de protection, en permettant d'identifier la provenance des individus (traçabilité). Les expériences de restauration de l'habitat, par transplantation d'individus dans des sites anciennement dévastés par les polluants, peuvent également bénéficier de l'apport des marqueurs microsatellites, pour créer des populations avec une diversité génétique suffisante pour le maintien à long terme. Les processus démographiques de ces populations sont actuellement en cours d'analyse, par génotypage des recrues et par des suivis démographiques fréquents réalisés par l'équipe chilienne. Enfin, l'utilisation de ces nouveaux marqueurs a permis d'étudier l'impact de facteurs naturels sur la diversité génétique, à travers la caractérisation des populations de l'espèce PP de la région d'Iquique (20°S) : ces populations ont été fortement affectées par l'évènement El Niño de 1982/83, avec une mortalité massive suivie par un processus de recolonisation à partir d'une population refuge (située dans un site de résurgence) (S. Faugeron et D. Veliz, en prep.).

Etude morphologique et concept d'espèces cryptiques

La définition d'espèces cryptiques, donc non distinguables morphologiquement, pose problème pour un certain nombre d'écologues, particulièrement en phycologie. La vision traditionnelle de la définition d'espèces sur la base de critères morphologiques y est très forte,

comme j'ai pu m'en rendre compte au cours de ma thèse.

La réponse à cette question récurrente de savoir si ces espèces étaient morphologiquement différentes a été donnée par une étude de morphologie comparée, suite à mes travaux de thèse (González *et al.*, soumis). Cette étude *a posteriori* a pu montrer que, sur les 26 caractères morphologiques considérés (internes et externes), aucun n'est diagnostique, c'est-à-dire spécifique de l'une ou l'autre des deux espèces. Ces résultats contrastent avec la différenciation morphologique entre ces espèces intertidales et l'espèce subtidale *L. trabeculata* (comparaison avec AI : Villouta et Santelices, 1986, avec PP : obs. pers.). Ces différences sont probablement liées à des conditions environnementales plus contrastées entre l'étage intertidal et celui subtidal qu'entre les étages intertidaux des régions biogéographiques AI et PP. La colonisation de l'étage intertidal lors du processus de spéciation entre *L. trabeculata* et le complexe *L. nigrescens* a probablement impliqué des adaptations importantes aux conditions environnementales de cet habitat : dessiccation, radiations UV et stress thermique, notamment.

L'étude de Gonzalez *et al.* (soumis) a cependant montré que des analyses multivariées permettaient de distinguer les espèces AI et PP sur la base de six caractères morphologiques, ce qui rendrait possible l'identification des espèces sans l'utilisation d'outils moléculaires. Cette étude a porté sur quatre populations, situées dans la Région de transition (PP : 29°S) et hors de cette région (PP : 22°S, AI : 32°S et 38°S). Lors de l'expérience de transplantation réciproque, j'ai cependant observé une plasticité phénotypique importante, en particulier pour l'espèce AI. Les personnes intéressées par l'étude morphologique des espèces cryptiques devraient considérer spécifiquement les sites de la Région de transition (29-30°S), où les deux espèces sont présentes dans des habitats géographiquement proches (min. de 1,5km).

*Perspectives de recherche sur les processus évolutifs chez le complexe d'espèces *Lessonia nigrescens**

Enfin, les résultats obtenus lors de mon travail de thèse ont été considérés dans le cadre de la thèse de Valeria Oppliger (cotutelle UPMC/PUCCh). Elle étudie les processus évolutifs spécifiques aux populations de limite d'aires, en particulier en ce qui concerne les régimes de reproduction.

Dans ce cadre, la Région de transition (29-30°S) apparaît comme une opportunité, avec la présence de populations de limite d'aire pour les deux espèces AI et PP. L'étude de

génétique des populations, présentée dans ma thèse, a suggéré un mode de reproduction clonal, plutôt que parthénogénétique. Les travaux de Valeria Oppliger devraient permettre de confirmer cette observation, et de déterminer si la position géographique (limite d'aire) et/ou la proximité aux populations de l'autre espèce sont des facteurs favorisant l'évolution vers un mode de reproduction asexuée.

C. Autres perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse ont contribué à ouvrir de nouvelles voies de recherche. Ainsi, alors que les différences de régimes de température entre sites situés de part et d'autre de la latitude 30°S étaient en cours d'étude par les équipes de S. Navarrete et M. Fernandez (Estación Costera de Investigaciones Marinas, PUCCh), la découverte fortuite de l'espèce AI à Aceituno (29°S) a permis de montrer que ce site présentait des particularités intéressantes : régime de température distinct des sites voisins, observation d'espèces normalement présentes uniquement au sud de la latitude 30°S, notamment. Ces observations ont renforcé l'intérêt pour l'étude des processus et mécanismes liés à la zone de transition biogéographique 30°S : des projets en cours de réalisation concernent la phylogéographie comparée d'invertébrés (P. Haye et S. Faugeron), le succès reproducteur d'espèces d'invertébrés et d'algues (M. Fernandez et S. Navarrete), les populations marginales d'invertébrés (B. Broitman) et d'algues (V. Oppliger), et l'océanographie côtière (S. Navarrete).

D'autre part, les résultats de cette thèse montrant un isolement reproducteur complet entre deux espèces cryptiques de Laminariales pourront être comparés aux résultats en cours d'obtention par l'équipe française et par l'équipe d'Ester Serrao (projet ANR ECOKELP, coordinatrice : Myriam Valero) pour des espèces européennes. Ces espèces diffèrent par leur aire de distribution, mais sont présentes en sympatrie dans certaines régions, comme en Bretagne. Les difficultés d'identification morphologique des espèces dans certains sites soulèvent la question de l'importance de l'hybridation en conditions naturelles. Cette comparaison entre les espèces de *Lessonia* d'une part, et les espèces de *Laminaria* d'autre part permettra de mieux connaître les processus de spéciation chez ce groupe d'espèces appelées

« kelps », ainsi que les mécanismes permettant la coexistence des espèces en sympatrie ou au contraire l'exclusion compétitive des espèces. La température de l'eau semble également avoir un effet majeur sur la distribution des espèces, tantôt européennes que chiliennes. Enfin, ce projet ANR a considéré également les conséquences écologiques de la récolte : la compétition interspécifique est en particulier influencée par la récolte des Laminaires européennes.

REFERENCES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, C.L., Double, M.C., Trueman, J.W.H., Robinson, A., Cockburn, A., 2005. An unusual source of apparent mitochondrial heteroplasmy: duplicated mitochondrial control regions in *Thalassarche albatrosses*. *Molecular Ecology* 14, 3605-3613.
- Acuña, E., Moraga, J., Uribe, E., 1988. La zona de Coquimbo: un sistema nerítico de surgencia de alta productividad. Memorias del Simposio Internacional de Recursos Vivos y las pesquerías del Pacífico Sudeste. Comisión permanente del Pacífico Sur (CPPS), **Revista Pacífico Sur (número especial), Perú**, 145 - 157.
- Adams, K.L., Palmer, J.D., 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 29, 380-395.
- Ainouche, M.L., Baumel, A., Salmon, A., Yannic, G., 2004. Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). **New Phytologist** 161, 165-172.
- Andrade, S., Contreras, L., Moffett, J.W., Correa, J.A., 2006. Kinetics of copper accumulation in *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae) under conditions of environmental oxidative stress. **Aquatic Toxicology** 78, 398-401.
- Antonovics, J., Bradshaw, A.D., 1970. Evolution in closely adjacent plant populations VIII. Clinal patterns at a mine boundary. **Heredity** 25, 349-362.
- Arias, C.F., Muñoz, A.G., Jiggins, C.D., Mavárez, J., Bermingham, E., Linares, M., 2008. A hybrid zone provides evidence for incipient ecological speciation in *Heliconius* butterflies. **Molecular Ecology** 17, 4699-4712.
- Avise, J., 2000. Phylogeography: the history and formation of species, **Haward University Press, Cambridge**.
- Ayres, K.L., Overall, A.D.J., 2004. API-CALC 1.0: a computer program for calculating the average probability of identity allowing for substructure, inbreeding and the presence of close relatives. **Molecular Ecology Notes** 4, 315-318.
- Baer, C.F., Miyamoto, M.M., Denver, D.R., 2007. Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. **Nature Review Genetics** 8, 619-631.
- Ballard, J.W.O., Rand, D.M., 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. **Annual Review of Ecology and Systematics** 36, 621-642.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 16, 37-48.
- Barr, C.M., Neiman, M., Taylor, D.R., 2005. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. **New Phytologist** 168, 39-50.
- Bartsch, I., Wiencke, C., Bishop, K., Buchholz, C.M., Buck, B.H., Eggert, A., Feuerpfeil, P., Hanelt, D., Jacobsen, S., Karez, R., Karsten, U., Molis, M., Roleda, M.Y., Schubert, H., Schumann, R., Valentin, K., Weinberger, F., Wiese, J., 2008. The genus *Laminaria sensus lato*: recent insights and developments. **European Journal of Phycology** 43, 1-86.
- Bazin, E., Glémin, S., Galtier, N., 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. **Science** 312, 570-572.
- Beheregaray, L.B., 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology** 17, 3754-3777.
- Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L., Bonhomme, F., 1999. GENETIX, logiciel sous Windows pour la génétique des populations. Laboratoire Génome Populations Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bensasson, D., Zhang, D.X., Hartl, D.L., Hewitt, G.M., 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends in Ecology and Evolution** 16, 314-321.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K.,

- Das, I., 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution** 22, 148-155.
- Bierne, N., Bonhomme, F., Boudry, P., Szulkin, M., David, P., 2006. Fitness landscapes support the dominance theory of post-zygotic isolation in the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. **Proceedings of the Royal Society of London B** 273, 1253-1260
- Billard, E., Daguin, C., Pearson, G., Serrão, E., Engel, C., Valero, M., 2005. Genetic isolation between three closely related taxa: *Fucus vesiculosus*, *F. spiralis* and *F. ceranoides*. **Journal of Phycology** 41, 900-905.
- Billot, C., Engel, C., Rousvoal, S., Kloareg, B., Valero, M., 2003. Current patterns, habitat discontinuities and population genetic structure: the case of the kelp *Laminaria digitata* in the English Channel. **Marine Ecological Progress Series** 253, 111-121.
- Blanchard, J.L., Schmidt, G.W., 1996. Mitochondrial DNA migration events in yeast and humans: integration by a common end-joining mechanism and alternative perspectives on nucleotide substitution pattern. **Journal of Molecular Evolution** 13, 537-548.
- Boissin, E., Féral, J.P., Chenuil, A., 2008. Defining reproductively isolated units in a cryptic and syntopic species complex using mitochondrial and nuclear markers: the brooding brittle star, *Amphipholis squamata* (Ophiuroidea). **Molecular Ecology** 17, 1732-1744.
- Boland, W., 1995. The chemistry of gamete attraction: chemical structures, biosynthesis, and (a)biotic degradation of algal pheromones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 92, 37-43.
- Bonen, L., 2006. Mitochondrial genes leave home. **New Phytologist** 172, 379-381.
- Bos, D.H., Posada, D., 2005. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. **Developmental and Comparative Immunology** 29, 211-227.
- Bradshaw, H.D., Schemske, D.W., 2003. Allele substitution at a flower color locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. **Nature** 426, 176-178.
- Bridges, C.B., 1936. The Bar 'gene' a duplication. **Science** 83, 210-211.
- Bridle, J.R., Vines, T.H., 2007. Limits to evolution at range margins: when and why does adaptation fail? **Trends in Ecology and Evolution** 22, 140-147.
- Broitman, B.R., Navarrete, S.A., Smith, F., Gaines, S.D., 2001. Geographic variation of southeastern Pacific intertidal communities. **Marine Ecology Progress Series** 224, 21-34.
- Brown, J.H., Stevens, G.C., Kaufman, D.M., 1996. The geographic range: size, shape, boundaries, and internal structure. **Annual Review of Ecology and Systematics** 27, 597-623.
- Butlin, R.K., Galindo, J., Grahame, J.W., 2008. Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation? **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 363, 2997-3007.
- Camus, P., 2001. Biogeografía marina de Chile continental. **Revista Chilena de Historia Natural** 74, 587-617.
- Camus, P.A., 1994. Recruitment of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* Bory in northern Chile: successional constraints and opportunities. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 184, 171-181.
- Cancino, J., Santelices, B., 1984. Ecological importance of holdfasts of *Lessonia nigrescens* Bory Phaeophyta in Central Chile. **Revista Chilena de Historia Natural** 57, 23-33.
- Cárdenas, L., Castilla, J.C., Viard, F., 2009. A phylogeographic analysis across three biogeographic provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. **Journal of Biogeography**.
- Cárdenas, L., Silva, A.X., Magoulas, A., Cabezas, J., Poulin, E., Ojeda, P., soumis. The genetic population structure in the Chilean jack mackerel *Trachurus murphyi* (Nichols) across the South-Eastern Pacific Ocean. **Fisheries Research**.

- Castilla, J.C., Camus, P.A., 1992. The Humboldt-*El Niño* scenario: coastal benthic resources and anthropogenic influences, with particular reference to the 1982/83 ENSO. **South African Journal of Marine Science** 12, 703-712.
- Castillo, M., Tapia, F., Largier, J., Navarrete, S.A., en prep. Latitudinal discontinuities in the inner-shelf environment along the eastern Pacific coast.
- Chapman, A.R.O., 1993. 'Hard' data for matrix modelling of *Laminaria digitata* (Laminariales, Phaeophyta) populations. **Hydrobiologia** 260/261, 263-267.
- Cho, G.Y., Klochkova, N.G., Krupnova, T.N., Boo, S.M., 2006. The reclassification of *Lessonia laminarioides* (Laminariales, Phaeophyceae): *Pseudolessonia* gen. nov. **Journal of Phycology** 42, 1289-1299.
- Clifton, K.E., 1997. Mass spawning by green algae on coral reefs. **Science** 275, 1116-1118.
- Contreras, L., Medina, M.H., Andrade, S., Oppliger, V., Correa, J.A., 2007. Effects of copper on early developmental stages of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyceae). **Environmental Pollution** 145, 75-83.
- Coombs, J.A., Letcher, B., Nislow, K.H., 2007. Software to create and convert codominant molecular data. Available at <http://www.lsc.usgs.gov/CAFL/Ecology/Ecology/html>.
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research** 16, 10881-10890.
- Correa, J.A., Castilla, J.C., Ramirez, M.A., Varas, M., Lagos, N., Vergaras, S., Moenne, A., Roman, D., Brown, M.T., 1999. Copper, copper mine tailing and their effect on marine algae in Northern Chile. **Journal of Applied Phycology** 11, 57-67.
- Correa, J.A., Lagos, N.A., H, Medina, M.H., Castilla, J.C., Corda, M., Ramirez, M., Martinez, E., Faugeton, S., Andrade, S., Pinto, R., Contreras, L., 2006. Experimental transplants of the large kelp *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae) in high-energy wave exposed rocky intertidal habitats of northern Chile: Experimental, restoration and management applications. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 335, 13-18.
- Coyer, J., Hoarau, G., Steam, W., Olsen, J., 2004. Geographically specific heteroplasmy of mitochondrial DNA in the seaweed, *Fucus serratus* (Heterokontophyta: Phaeophyceae, Fucales). **Molecular Ecology** 13, 1323-1326.
- Coyer, J.A., Hoarau, G., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2007. Hybridization and introgression in a mixed population of the intertidal seaweeds *Fucus evanescens* and *F. serratus*. **Journal of Evolutionary Biology** 20, 2322-2333.
- Coyer, J.A., J., S.G., Andersen, R.A., 2001. Evolution of *Macrocystis* spp. (Phaeophyceae) as determined by ITS1 and ITS2 sequences. **Journal of Phycology** 37, 574-585.
- Coyne, J.A., Orr, H.A., 2004. Speciation. Sinauer Associates.
- Dawson, M., 2001. Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? **Journal of Biogeography** 28, 723-736.
- Dawson, M., 2005. Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. **Journal of Biogeography** 32, 515-533.
- Dawson, M., Louie, K., Barlow, M., Jacobs, D., Swift, C., 2002. Comparative phylogeography of sympatric sister species *Clevelandia ios* and *Eucyclogobius newberryi* (Teleostei, Gobiidae), across the California Transition Zone. **Molecular Ecology** 11, 1065-1075.
- de Reviere, B., Rousseau, F., 1999. Towards a new classification of the brown algae. Progress in Phycological Research. Round, F. E. & Chapman, D. J., Biopress Ltd, Bristol, UK, pp. 107-201.
- Destombe, C., Douglas, S.E., 1991. Rubisco spacer sequence divergence in the rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species. **Currents Genetics** 19, 395-398.
- Draaisna, S.G.A., Prud'homme Van Reine, W.F., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2001. A

- reassessment of phylogenetic relationships within the Phaeophyceae based on Rubisco large subunit and ribosomal DNA sequences. **Journal of Phycology** 37, 586-603.
- Druehl, L.D., Collins, J.D., Lane, C.E., Saunders, G.W., 2005. An evaluation of methods used to assess intergeneric hybridization in kelp using Pacific Laminariales (Phaeophyceae). **Journal of Phycology** 41, 250-262.
- Du Buy, H.G., Riley, F.L., 1967. Hybridization between the nuclear and kinetoplast DNA's of *Leishmania enriettii* and between nuclear and mitochondrial DNA's of mouse liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 57, 790-797.
- Eckert, C.G., Samis, K.E., Lougheed, S.C., 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. **Molecular Ecology** 17, 1170-1188.
- Edding, M.E., Tala, F.B., 2003. Development of techniques for the cultivation of *Lessonia trabeculata* Villouta et Santelices (Phaeophyceae: Laminariales) in Chile. **Aquaculture Research** 34, 507-515.
- Ellegren, H., 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Review Genetics** 5, 435-445.
- Engel, C., Daguin, C., Serrão, E., 2005. Genetic entities and mating system in hermaphroditic *Fucus spiralis* and its close dioecious relative *F. vesiculosus* (Fucaceae, Phaeophyceae). **Molecular Ecology** 14, 2033-2046.
- Engel, C., Destombe, C., Valero, M., 2004. Mating system and gene flow in the red seaweed *Gracilaria gracilis*: effects of haplo-diploid life history and intertidal rocky shore landscape on fine-scale genetic structure. **Heredity** 92, 289-298.
- Engel, C.R., Billard, E., Voisin, M., Viard, F., 2008. Conservation and polymorphism of mitochondrial intergenic sequences in brown algae (Phaeophyceae). **European Journal of Phycology** 43, 195-205.
- Erting, L., Daugbjerg, N., Pedersen, P.M., 2004. Nucleotide diversity within and between four species of *Laminaria* (Phaeophyceae) analysed using partial LSU and ITS rDNA sequences and AFLP. **European Journal of Phycology** 39, 243-256.
- Estoup, A., 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., 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. **Molecular Ecology**, 13, 853-864.
- 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., Ray, N., 2008. Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. **Trends in Ecology and Evolution** 23, 347-351.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131, 479-491.
- Faugeron, S., Martínez, E.A., Correa, J.A., Billot, C., 2005. Long-term copper mine waste disposal in northern Chile associated with gene flow disruption of the intertidal *Lessonia nigrescens*. **Marine Ecological Progress Series** 288, 129-140.
- Faugeron, S., Veliz, D., Peralta, G., Tapia, J., Tellier, F., Billot, C., Martínez, E., 2009. Development and characterization of nine polymorphic microsatellite markers in the Chilean kelp *Lessonia nigrescens*. **Molecular Ecology Resources** 9, 937-939.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39, 783-791.
- Féral, J.P., 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.
- Fernandez, E., Cordova, C., Tarazona, J., 1999. Condiciones de la pradera submareal de *Lessonia trabaculata* en la isla Independencia durante "El Niño 1997-98". **Revista Peruana de Biología** Vol. Extraordinario, 47-59.
- Fernandez, M., Jaramillo, E., Marquet, P., Moreno, C., Navarrete, S., Ojeda, P., Valdovinos, C., Vasquez, J., 2000. Diversity, dynamics and biogeography of Chilean benthic nearshore ecosystems: an overview and guidelines for conservation. **Revista Chilena de Historia Natural** 73.
- Fitzpatrick, B.M., Fordyce, J.A., Gavrillets, S., 2008. What, if anything, is sympatric speciation? **Journal of Evolutionary Biology** 21, 1452-1459.
- Freudenstein, J.V., Chase, M.W., 2001. Analysis of mitochondrial *nad1b-c* intron sequences in Orchidaceae: utility and coding of length-change characters. **Systematic Biology** 26, 643-657.
- Funk, D.J., Omland, K.E., 2003. Species-level parphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology and Systematics** 34, 397-423.
- Gaylord, B., Reed, D.C., Raimondi, P.T., Washburn, L., McLean, S.R., 2002. A physically based model of macroalgal spore dispersal in the wave and current-dominated nearshore. **Ecology** 83, 1239-1251.
- Gherman, A., Chen, P.E., Teslovich, T.M., Stankiewics, P., Withers, M., Kashuk, C.S., Chakravarti, A., Lupski, J.R., Cutler, D.J., Katsanis, N., 2007. Population bottlenecks as a potential major shaping force of human genome architecture. **PLoS Genetics** 3, e119.
- Giribet, G., Wheeler, W.C., 1999. On gaps. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 13, 132-143.
- Goldberg, E.E., Lande, R., 2007. Species' borders and dispersal barriers. **The American Naturalist** 170, 297-304.
- Gomez-Uchida, D., Weeman, D., Hauser, L., Galleguillos, R., Retamal, M., 2003. Allozyme and AFLP analyses of genetic population structure in the hairy edible crab *Cancer setosus* from the Chilean coast. **Journal of Crustacean Biology** 23, 486-494.
- González, A.V., Beltrán, J., Correa, J.A., Santelices, B., soumis. Morphometric and molecular studies identify cryptic species in the *Lessonia nigrescens* complex along the Chilean coast. **Journal of Phycology**.
- Gonzalez, C., Arroyo, M.T.K., Valero, M., Correa, J.A., Santelices, B., en prep. Phylogeography of *Codium sp* (Tylecodium, Chlorophyta) in Chilean coast.
- Goudet, J., 1999. PCA-GEN, a program to perform a Principal Component Analysis (PCA) on genetic data. Available from <http://www.unil.ch/ee/page36924.html>.
- Graco, M., Gutiérrez, D., Farías, L., 2006. Inter-annual variability of the Pelagic-Benthic coupling in the upwelling system off central Chile. **Advances in Geosciences** 6, 127-132.
- Gravilets, S., 2003. Models of speciation: What have we learned in 40 years? **Evolution** 57, 2197-2215.
- Gravilets, S., Losos, J.B., 2009. Adaptive radiation: contrasting theory with data. **Science** 323, 732-737.
- Hallatschek, O., Hersen, P., Ramanathan, S., Nelson, D.R., 2007. Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 104, 19926-19930.
- Hare, M.P., 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. **Trends in Ecology and Evolution** 16, 700-706.
- Harrison, R.G., Bogdanowicz, S.M., 1997. Patterns of variation and linkage disequilibrium in

- a field cricket hybrid zone. **Evolution** 51, 493-505.
- Harvey, J.B.J., Goff, L.J., 2006. A reassessment of species boundaries in *Cystoseira* and *Halidrys* (Phaeophyceae, Fucales) along the North American west coast. **Journal of Phycology** 42, 707-720.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London B** (Suppl.) 270, S96-S99.
- Hendry, A.P., Nosil, P., Rieseberg, L.H., 2007. The speed of ecological speciation. **Functional Ecology** 21, 455-464.
- Hernandez-Carmona, G., Robledo, D., Serviere-Zaragoza, E., 2001. Effects of nutrient availability on *Macrocystis pyrifera* recruitment and survival near its southern limit off Baja California. **Botanica Marina** 44, 221-229.
- Hershkovitz, M.A., Lewis, L.A., 1996. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. **Molecular Biology and Evolution** 13, 1276-1295.
- Hewitt, G., 2001. Speciation, hybrid zone and phylogeography - or seeing genes in space and time. **Molecular Ecology** 10, 537-549.
- Hewitt, G.M., 1988. Hybrid zones - Natural laboratories for evolutionary studies. **Trends in Ecology and Evolution** 3, 158-167.
- Hey, J., 2001. The mind of the species problem. **Trends in Ecology and Evolution** 16, 326-328.
- Hoarau, G., Coyer, J., Veldsink, J., Stam, W., Olsen, J., 2007. Glacial refugia and recolonisation pathways in the brown seaweed *Fucus serratus*. **Molecular Ecology** 16, 3606-3616.
- Hoffman, A., Santelices, B., 1997. Flora marina de Central Chile, Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Holder, M., Lewis, P.O., 2003. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. **Nature Review Genetics** 4, 275-284.
- Holmgren, M., Scheffer, M., Ezcurra, E., Gutiérrez, J.R., Mohren, G.M.J., 2001. El Niño effects on the dynamics of terrestrial ecosystems. **Trends in Ecology and Evolution** 16, 89-94.
- Homazabal, S., Schaffer, G., Leth, O., 2004. The coastal transition zone off Chile. **Journal of Geophysical Research** 109, C01021.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics** 17, 754-755.
- Hulton, N.R.J., Purves, R.S., McCulloch, R.D., Sugden, D.E., Bentley, M.J., 2002. The Last Glacial Maximum and deglaciation in southern South America. **Quaternary Science Reviews** 21, 233-241.
- Irwin, D.E., 2002. Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. **Evolution** 56, 2383-2304.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution** 11, 424-429.
- Jiggins, C.D., Mallet, J., 2000. Bimodal hybrid zone and speciation. **Trends in Ecology and Evolution** 15, 250-255.
- Jones, C.G., Lewton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. **Oikos** 69, 373-386.
- Kalinowski, S.T., 2005. HP-Rare: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. **Molecular Ecology Notes** 5, 187-189.
- Kassen, R., 2002. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. **Journal of Evolutionary Biology** 15, 173-190.
- Kato, Y., Kogame, K., Nagasato, C., Motomura, T., 2006. Inheritance of mitochondrial and

- chloroplast genomes in the isogamous brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). **Phycological Research** 54, 65-71.
- Kawecki, T.J., Ebert, T., 2004. Conceptual issues in local adaptation. **Ecology Letters** 7, 1225-1241.
- Keeling, P.J., Burger, G., Durnford, D.G., Lang, B.F., Lee, R.W., Pearlman, R.E., Roger, A.J., Gray, M.W., 2005. The tree of eukaryotes. **Trends in Ecology and Evolution** 20, 670-676.
- Kim, J.H., Schneider, R.R., Hebbeln, D., Müller, P.J., Wefer, G., 2002. Last deglacial sea-surface temperature evolution in the Southeast Pacific compared to climate changes on the South American continent. **Quaternary Science Reviews** 21, 2085-2097.
- Kinlan, B., Gaines, S., 2003. Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. **Ecology** 84, 2007-2020.
- Kinlan, B., Gaines, S., Lester, S., 2005. Propagule dispersal and the scales of marine community process. **Diversity and Distributions** 11, 139-148.
- Kirkpatrick, M., Ravigné, V., 2002. Speciation by natural and sexual selection: models and experiments. **The American Naturalist** 159, S22-S35.
- Knowlton, N., 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. **Hydrobiologia** 420, 73-90.
- Kraan, S., Guiry, M.D., 2000. Sexual hybridization experiments and phylogenetic relationships as inferred from Rubisco spacer sequences in the genus *Alaria* (Phaeophyceae). **Journal of Phycology** 35, 190-198.
- Kraan, S., Rueness, J., Guiry, M.D., 2001. Are North Atlantic *Alaria esculenta* and *A. grandifolia* (Alariaceae, Phaeophyceae) conspecific? **European Journal of Phycology** 56, 35-42.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics** 5, 150-163.
- Kuo, C.H., Avise, J.C., 2005. Phylogeographic breaks in low-dispersal species: the emergence of concordance among gene trees. **Genetica** 124, 179-186.
- Kusumo, H., Pfister, C., Wootton, J., 2006. Small-scale genetic structure in the sea palm *Postelsia palmaeformis* Ruprecht (Phaeophyceae). **Marine Biology** 149, 731-742.
- Lamy, F., Hebbeln, D., Röhl, U., Wefer, G., 2001. Holocene rainfall variability in southern Chile: a marine record of latitudinal shifts of the Southern Westerlies. **Earth and Planetary Sciences Letters** 185, 369-382.
- Lane, C., Mayes, C., Druehl, L., Saunders, G., 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. **Journal of Phycology** 42, 493-.
- Lane, C., Saunders, G., 2005. Molecular investigation reveals epi/endophytic extrageneric kelp (Laminariales, Phaeophyceae) gametophytes colonizing *Lessoniopsis littoralis* thalli. **Botanica Marina** 48, 426-436.
- Lane, C.E., Lindstrom, S.C., Saunders, G.W., 2007. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 44, 634-648.
- Latorre, C., Moreno, P.I., Vargas, G., Maldonado, A., Villa-Martinez, R., Armesto, J.J., Villagrán, C., Pino, M., Núñez, L., Grosjean, M., 2007. Late Quaternary environments and palaeoclimate. In: Gibbons, WTM (Ed.), *The geology of Chile*. London Geological Society Press, London, pp. 309-328.
- Le Roux, J.P., Olivares, D.M., Nielsen, S.N., Smith, N.D., Middleton, H., Fenner, J., Ishman, S.E., 2006. Bay sedimentation as controlled by regional crustal behaviour, local tectonics and eustatic sea-level changes: Coquimbo Formation (Miocene-Pliocene), Bay

- of Tongoy, central Chile. **Sedimentary Geology** 184, 133-153.
- Leimu, R., Fischer, M., 2008. A meta-analysis of local adaptation in plants. **PLoS ONE** 3, e4010-.
- Levitan, D.R., Fukami, H., Jara, J., Kline, D., McGovern, T.M., McGhee, K.E., Swanson, C.A., Knowlton, N., 2004. Mechanisms of reproductive isolation among sympatric broadcast-spawning corals of the *Montastraea annularis* species complex. **Evolution** 58, 308-323.
- Lewis, P.O., 2001. Phylogenetic systematics turns over a new leaf. **Trends in Ecology and Evolution** 16, 30-37.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology** 11.
- Liptack, M.K., Druehl, L.D., 2000. Molecular evidence for an interfamilial laminariaean cross. **European Journal of Phycology** 35, 135-142.
- Lowry, D.B., Rockwood, R.C., Willis, J.H., 2008. Ecological reproductive isolation of coast and inland races of *Mimulus guttatus*. **Evolution** 62, 2196-2214.
- Lünning, K., Müller, D.G., 1978. Chemical interaction in sexual reproduction of several Laminariales: release and attraction of spermatozoids. **Z. Pflanzenphysiol.** 89, 33-41.
- Macaya, E.C., Boltaña, S., Hinojosa, I.A., Macchiavello, J.E., Valdivia, N.A., Vasquez, N.R., Buschmann, A.H., Vásquez, J.A., Vega, J.M.A., Thiel, M., 2005. Presence of sporophylls in floating kelp rafts of *Macrocystis* spp (Phaeophyceae) along the Chilean Pacific coast. **Journal of Phycology** 41, 913-922.
- Mackas, D.L., Strub, P.T., Thomas, A., Montecino, V., 2006. Eastern Ocean Boundaries Pan-regional overview. In: Brink, AR, Robinson, KH (Eds.), *The Sea*, Harward Press Ltd.
- Maggs, C.A., Castilho, R., Foltz, D., Hensler, C., Jolly, M.T., Kelly, J., Olsen, J.L., Perez, E., Stam, W.T., Vainola, R., Viard, F., Wares, J.P., 2008. Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. **Ecology** 89, S108-S122.
- Marín, V.H., Delgado, L.E., 2007. Lagrangian observations of surface coastal flows North of 30°S in the Humboldt Current system. **Continental Shelf Research** 27, 731-743.
- Marko, P., 2004. 'What's larvae got to do with it?' Disparate patterns of post-glacial population structure in two benthic marine gastropods with identical dispersal potential. **Molecular Ecology** 13, 597-611.
- Martínez, E., Cárdenas, L., Pinto, R., 2003. Recovery and genetic diversity of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae) 20 years after El Niño 1982/83. **Journal of Phycology** 39, 504-508.
- McCarthy, C., 1997. *Chromas*. Griffith University, Brisbane, Queensland.
- Meneses, I., Santelices, B., 2000. Patterns and breaking points in the distribution of benthic algae along the temperate Pacific coast of South America. **Revista Chilena de Historia Natural** 73, 615-623.
- Meynard, A., 2005. Phylogéographie de l'algue brune *Lessonia nigrescens* (Laminariales) : étude d'une zone de transition biogéographique (30°S, Chili). Université Paris 6, Rapport de Master 2.
- Montecino, V., Strub, P.T., Chavez, F., Thomas, A., Tarazona, J., Baumgartner, T., 2006. Bio-physical interactions off western South-America. In: Brink, AR, RRKH (Ed.), *The Sea*, Harward Press Ltd.
- Morse, G.E., Farrell, B.D., 2005. Interspecific phylogeography of the *Stator limbatus* species complex: The geographic context of speciation and specialization. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 36, 201-213.
- Motomura, T., 1990. Ultrastructure of fertilization in *Laminaria angustata* (Phaeophyta, Laminariales) with emphasis on the behaviour of centrioles, mitochondria and

- chloroplasts of the sperm. **Journal of Phycology** 26, 80-89.
- Moy, C.M., Seltzer, G.O., Rodbell, D.T., Anderson, D.M., 2002. Variability of El Niño/Southern Oscillations activity at millennial timescales during the Holocene epoch. **Nature** 420, 152-165.
- Muhlin, J., Engel, C., Stessel, R., Weatherbee, R., Brawley, S., 2008. The influence of coastal topography, circulation patterns, and rafting in structuring populations of an intertidal alga. **Molecular Ecology** 17, 1198-1210.
- Müller, K., 2006. Incorporating information from length-mutational events into phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 38, 667-676.
- Navarrete, S., Wieters, A., Broitman, B., Castilla, J., 2005. Scales of benthic-pelagic coupling and the intensity of species interactions: from recruitment limitation to top down control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 102, 18046-18051.
- Navarrete, S.A., Broitman, B., Wieters, E.A., Finke, G.R., Venegas, R.M., Sotomayor, A., 2002. Recruitment of intertidal invertebrates in the southeast Pacific: Interannual variability and the 1997-1998 El Niño. **Limnological Oceanography** 47, 791-802.
- Nei, M. (Ed.), 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Nosil, P., Harmon, L.J., Seehausen, O., 2009. Ecological explanations for (incomplete) speciation. **Trends in Ecology and Evolution** 24, 145-156.
- Nosil, P., Sandoval, C.P., 2008. Ecological niche dimensionality and the evolutionary diversification of stick insects. **PLoS ONE** 3, e1907.
- Nosil, P., Vines, T.H., Funk, D.J., 2005. Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. **Evolution** 59, 705-719.
- Ohno, S., 1970. *Evolution by gene duplication*. Springer.
- Ojeda, F., Santelices, B., 1984. Ecological dominance of *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta) in central Chile. **Marine Ecology Progress Series** 19, 83-91.
- Ojeda, F.P., Labra, P.A., Muñoz, A.A., 2000. Biogeographic patterns of Chilean littoral fishes. **Revista Chilena de Historia Natural** 73, 625-641.
- Omland, K.E., Baker, J.M., Peters, J.L., 2006. Genetic signature of intermediate divergence: population history of Old and New World Holarctic ravens (*Corvus corax*). **Molecular Ecology** 15, 795-808.
- Oppliger, L.V., Correa, J.A., Peters, A.F., 2007. Parthenogenesis in the brown alga *Lessonia nigrescens* (Laminariales, Phaeophyceae) from Central Chile. **Journal of Phycology** 43, 1295-1301.
- Orti, G., Hare, M.P., Avise, J.C., 1997. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. **Molecular Ecology** 6, 575-580.
- Ortlieb, I., Guzman, N., Marquardt, C., 2003. A longer-lasting and warmer interglacial episode during isotope MIS 11: Marine terrace evidence in tropical western Americas. Earth's climate and orbital eccentricity: The marine isotope stage 11 questions. **Geophysical Monographs** 137, 157-180.
- Oudot-LeSecq, M.P., Kloareg, B., Loiseaux-DeGoër, S., 2002. The mitochondrial genome of the brown alga *Laminaria digitata*: a comparative analysis. **European Journal of Phycology** 37, 163-172.
- Palmer, J.D., Adams, K.L., Cho, Y., Parkinson, C.L., Qiu, Y.L., Song, K., 2000. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 97, 6960-6966.
- Palumbi, S., 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics** 25, 547-572.

- Palumbi, S.R., 2009. Speciation and the evolution of gamete recognition genes: pattern and process. **Heredity** 102, 66-76.
- Peralta, G., 2008. Patrones filogeográficos en el bivalvo *Mesodesma donacium* Lamarck (1918) "macha" en Chile. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile.
- Peters, A., Breeman, A., 1993. Temperature tolerance and latitudinal range of brown algae from temperate Pacific South America. **Marine Biology** 115, 143-150.
- Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., Vendramin, G.G., 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology** 14, 689-701.
- Pohnert, G., Boland, W., 2002. The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms. **Natural Products Reports** 19, 108-122.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST; testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics Application Note** 14, 817-818.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology and Evolution** 16, 37-45.
- Pulquério, M.J.F., Nichols, R.A., 2006. Dates from the molecular clock: how wrong can we be? **Trends in Ecology and Evolution**.
- Ramírez, M.E., Santelices, B., 1991. Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del Pacífico de Sudamérica. Monografías Biológicas n°5. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Ramsey, J., Bradshaw, H.D., Schemske, D.W., 2003. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). **Evolution** 57, 1520-1534.
- Raymond, M., Callaghan, A., Fort, P., Pasteur, N., 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. **Nature** 350, 151-153.
- Reed, D.C., Kinlan, B.P., Raimondi, P.T., Washburn, L., Gaylord, B., Drake, P.T., 2005. A metapopulation perspective on patch dynamics and connectivity of giant kelp. In: Sale, P., Kritzer, J (Eds.), *Marine metapopulations*. Academic Press.
- Richly, E., Leister, D., 2004. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. **Molecular Biology and Evolution** 21, 1081-1084.
- Rieseberg, L.H., 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology and Evolution** 16, 351-358.
- Rieseberg, L.H., Willis, J.H., 2007. Plant speciation. **Science** 317, 910-914.
- Rodriguez, S.R., 2003. Consumption of drift kelp by intertidal populations of the sea urchin *Tetrapygus niger* on the central Chilean coast: possible consequences at different ecological levels. **Marine Ecological Progress Series** 251, 141-151.
- Roger, A.R., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution** 9, 552-569.
- Rokas, A., Ladoukakis, E., Zouros, E., 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Trends in Ecology and Evolution** 18, 411-417.
- Romero, O.E., Kim, J.H., Hebbeln, D., 2006. Paleoproductivity evolution off central Chile from the Last Glacial Maximum to the Early Holocene. **Quaternary Research** 65, 519-525.
- Rousset, F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. **Genetics** 145, 1219-1228.
- Rundle, H.D., Nosil, P., 2005. Ecological speciation. **Ecology Letters** 8, 336-352.
- Ryu, J.J., Kim, S.H., West, J.A., Kim, G.H., 2004. Gamete recognition and sexual isolation in a red alga, *Aglaothamnion Byssoides* (Rhodophyta). **Journal of Phycology** 39, 48-48.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold

- Spring Harbor, New York.
- Santelices, B., 1990. Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review** 28, 177-276.
- Santelices, B., Castilla, J.C., Cancino, J., Schmiede, P., 1980. Comparative ecology of *Lessonia nigrescens* and *Durvillea antarctica* (Phaeophyta) in Central Chile. **Marine Biology** 59, 119-132.
- Santelices, B., Correa, J., Aedo, D., Hormazabal, M., Flores, V., Sanchez, P., 1999. Convergent biological processes among coalescing Rhodophyta. **Journal of Phycology** 35, 1127-1149.
- Santelices, B., Meneses, I., 2000. A reassessment of the phytogeographic characterization of Temperate Pacific South America. **Revista Chilena de Historia Natural** 73, 605-614.
- Santelices, B., Ojeda, F.P., 1984. Recruitment, growth and survival of *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta) at various tidal levels in exposed habitats of central Chile. **Marine Ecology Progress Series** 19, 73-82.
- Savolainen, V., Anstett, M.C., Lexer, C., Hutton, I., Clarkson, J.J., Norup, M.V., Powerll, M.P., Springate, D., Salamin, N., Baker, W.J., 2006. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. **Nature** 441.
- Schemske, D.W., Bradshaw, H.D., 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 96, 11910-11915.
- Schluter, D., 2001. Ecology and the origin of species. **Trends in Ecology and Evolution** 16, 372-380.
- Schluter, D., 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. **Science** 323, 737-740.
- Schmitz, P., Cibois, A., Landry, B., 2006. Molecular phylogeny and dating of an insular endemic moth radiation inferred from mitochondrial and nuclear genes: The genus *Galagete* (Lepidoptera: Autostichidae) of the Galapagos Islands. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 45, 180-192.
- Searles, R.B., 1978. The genus *Lessonia* Bory (Phaeophyta, Laminariales) in Southern Chile and Argentina. **British Phycological Journal** 13, 361-381.
- Simmons, M.P., Ochoterena, H., 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. **Systematic Biology** 49, 369-381.
- Slatkin, M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics** 139, 457-462.
- Slatkin, M., Hudson, R.R., 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics** 129, 555-562.
- Slekoe, K.A., Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters** 9, 615-629.
- Snaydon, R.W., 1970. Rapid population differentiation in a mosaic environment. I. The response of *Anthoxanthum odoratum* populations to soils. **Evolution** 24, 257-269.
- Snaydon, R.W., Davies, M.S., 1976. Rapid population differentiation in a mosaic environment. IV. Populations of *Anthoxanthum odoratum* at sharp boundaries. **Heredity** 37, 9-25.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1981. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Company, New York.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Tate, J.A., 2004. Advances in the study of polyploidy since *Plant speciation*. **New Phytologist** 161, 173-191.
- Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F., Crandall, K.A., 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**

- the USA 105, 13486-13491.
- Stebbins, G.L., 1940. The significance of polyploidy in plant evolution. **The American Naturalist** LXXIV, 54-66.
- Steneck, R.S., Graham, M.H., Bourque, B.J., Corbett, D., Erlandson, J.M., Estes, J.A., Tegner, M.J., 2002. Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. **Environmental Conservation** 29, 436-459.
- Sunnucks, P., Wilson, A.C.C., Beheregaray, L.B., Zenger, K., French, J., Taylor, A.C., 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and in molecular ecology. **Molecular Ecology** 9, 1699-1710.
- Swenson, N.G., Howard, D.J., 2005. Clustering of contact zones, hybrid zones, and phylogeographic breaks in North America. **The American Naturalist** 166, 581-591.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4., Sunderland, Massachusetts.
- Tala, F., Edding, M., 2005. Growth and loss of distal tissue in blades of *Lessonia nigrescens* and *Lessonia trabeculata* (Laminariales). **Aquatic Botany** 82, 39-54.
- Tala, F., Véliz, K., Gomez, I., Edding, M., 2007. Early life stages of the South Pacific kelps *Lessonia nigrescens* and *Lessonia trabeculata* (Laminariales, Phaeophyceae) show recovery capacity following exposure to UV radiation. **Phycologia** 46, 467-470.
- Teske, P., McQuaid, C., Froneman, P., Barker, N., 2006. Impacts of marine biogeographic boundaries on phylogeographic patterns of three South African estuarine crustaceans. **Marine Ecological Progress Series** 314, 283-293.
- Teske, P.R., Papadopoulos, I., Newman, B.K., Dworschark, P.C., McQuaid, C.D., Barker, N.P., 2008. Oceanic dispersal barriers, adaptation and larval retention: an interdisciplinary assessment of potential factors maintaining a phylogeographic break between sister lineages of an African prawn. **BMC Evolutionary Biology** 8, 341.
- Thiel, M., Gutow, L., 2004. The ecology of rafting in the marine environment. I. The floating substrate. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review** 42, 181-264.
- Thiel, M., Macaya, E., Acuña, E., Arntz, W., Bastias, H., Brokordt, K., Camus, P., Castilla, J., Castro, L., Cortés, M., Dumont, C., Escribano, R., Fernandez, M., Gajardo, J., Gaymer, C., Gomez, I., González, A., González, H., Haye, P., Illanes, J., Iriarte, J., Lancellotti, D., Luna-Jorquera, G., Luxoro, C., Manriquez, P., Marín, V., Muñoz, P., Navarrete, S., Perez, E., Poulin, E., Sellanes, J., Sepúlveda, H., Stotz, W., Tala, F., Thomas, A., Vargas, C., Vasquez, J., Vega, J., 2007. The Humboldt Current System of northern and central Chile. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review** 45, 195-344.
- Thomas, A.C., 1999. Seasonal distributions of satellite-measured phytoplankton pigment concentration along the Chilean coast. **Journal of Geophysical Research** 104, 25877-25890.
- Tomaiulo, M., Hansen, T.F., Levitan, D.R., 2007. A theoretical investigation of sympatric evolution of temporal reproductive isolation as illustrated by marine broadcast spawners. **Evolution** 61, 2584-2595.
- Trenberth, K.E., 1997. The definition of El Niño. **Bulletin of the American Meteorological Society** 78, 2771-2777.
- Tudhope, A.W., Chilcott, C.P., McCulloch, M.T., Cook, E.R., Chappell, J., Ellam, R.M., Lee, D.W., Lough, J.M., Shimmield, G.B., 2001. Variability in the El Niño-Southern Oscillation trough a glacial-interglacial cycle. **Science** 291, 1511-1517.
- Turner, J., 2004. The El Niño-Southern Oscillation and Antarctica. **International Journal of Climatology** 24, 1-31.
- Vanderpoorten, A., Long, D.G., 2006. Budding speciation and neotropical origin of the Azorean endemic livewort, *Leptoscyphus azoricus*. **Molecular Phylogenetics and**

- Evolution** 40, 73-83.
- Vásquez, J., 2008. Production, use and fate of Chilean brown seaweeds: re-resources for a sustainable fishery. **Journal of Applied Phycology**.
- Vásquez, J., Tala, F., Vega, A., Zuñiga, S., Edding, M., Piaget, N., 2008. Bases ecológicas y evaluación de usos alternativos para el manejo de praderas de algas pardas de las III y IV regiones. Proyecto FIP, informe final.
- Vásquez, J.A., Santelices, B., 1984. Comunidades de macroinvertebrados en discos adhesivos de *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta) en Chile central. **Revista Chilena de Historia Natural** 52, 131-154.
- Vega, J.M.A., Vásquez, J.A., Bushmann, A.H., 2005. Population biology of the subtidal kelps *Macrocystis integrifolia* and *Lessonia trabeculata* (Laminariales, Phaeophyceae) in a upwelling ecosystem of northern Chile: interannual variability and El Niño 1997-1998. **Revista Chilena de Historia Natural** 78, 33-50.
- Venegas, M., Fala, F., Fonck, E., Vásquez, J.A., 1992. Sporangial sori on stipes of *Lessonia nigrescens* Bory (Laminariales, Phaeophyta): A high frequency phenomenon in intertidal populations of Northern Chile. **Botanica Marina** 35.
- Vianna, J., Medina-Vogel, G., Ayerdi, P., Zeballos, H., Mangel, J., Apaza, M., Faugeron, S., en prep. Phylogeography of the marine otter (*Lontra felina*): recent evolutionary history and dependence on connected of the rocky seachores patches.
- Villagrán, C., Hinojosa, L.F., 2005. Esquema biogeográfico de Chile, In: Regionalización Biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines. Ediciones de la Universidad Nacional Autónoma de México, Jorge Llorente Bousquets & Juan J. Morrone Editor, México, pp. 551-577.
- Villouta, E., Santelices, B., 1986. *Lessonia trabeculata* sp. nov. (Laminariales, Phaeophyta), a new kelp from Chile. **Phycologia** 25, 81-86.
- Voisin, M., Engel, C.R., Viard, F., 2005. Differential shuffling of native genetic diversity across introduced regions in a brown alga: Aquaculture vs. maritime traffic effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 102, 5432-5437.
- Wang, J.Y., Frasier, T.R., Yang, S.C., White, B.N., 2008. Detecting recent speciation events: the case of the finless porpoise (genus *Neophocaena*). **Heredity** 101, 145-155.
- Waters, J., 2008. Marine biogeographical disjunction in temperate Australia: historical landbridge, contemporary currents, or both? **Diversity and Distributions** 14, 692-700.
- Waters, J., King, T., O'Loughlin, P., Spencer, H., 2005. Phylogeographical disjunction in abundant high-dispersal littoral gastropods. **Molecular Ecology** 14, 2789-2902.
- Waters, J.M., Roy, M.S., 2004. Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene flow? **Molecular Ecology** 13, 2797-2806.
- Westermeier, R., Müller, D.G., Gomez, I., Rivera, P., Wenzel, H., 1994. Population biology of *Durvillaea antarctica* and *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta) on the rocky shores of southern Chile. **Marine Ecology Progress Series** 110, 187-194.
- Whitfield, J., 2005. Biogeography: Is everything everywhere? **Science** 310, 960-961.
- Widmer, A., Lexer, C., Cozzolino, S., 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. **Heredity** 102, 31-38.
- Wolter, K., Timlin, M.S., 1998. Measuring the strength of ENSO events - how does 1997/98 rank? **Weather** 53, 315-324.
- Yoon, H.S., Boo, S.M., 1999. Phylogeny of Alariaceae (Phaeophyta) with special references to *Undaria* based on sequences of the RuBisCo spacer region. **Hydrobiologia** 398/399, 47-55.
- Yoon, H.S., Lee, J.Y., Boo, S.M., Bhattacharya, D., 2001. Phylogeny of Alariaceae, Laminariaceae, and Lessoniaceae (Phaeophyceae) based on plastid-encoded RuBisCo spacer and nuclear-encoded ITS sequence comparisons. **Molecular Phylogenetics and**

Evolution 21, 231-243.

Yotsukura, N., Denboh, T., Motomura, T., Horiguchi, T., Coleman, A.M., Ichimura, T., 1999. Little divergence in ribosomal DNA internal transcribed spacer -1 and -2 sequences among non-digitate species of *Laminaria* (Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan. **Phycological Research** 47, 71-80.

ANNEXES

ANNEXES 1

(CHAPITRE 1)

Annexe 1.1 : Protocole d'extraction d'ADN utilisé pour *Lessonia nigrescens* et *Lessonia trabeculata*.

Annexe 1.2 : Conditions d'amplification des marqueurs utilisés pour l'étude de la phylogéographie (atp8/trnS, RuBisCo spacer, ITS1 et ITS2) et Séquençage et détection du polymorphisme de conformation simple brin (SSCP).

Annexe 1.3 : Matrice de distances géographiques entre paires de populations pour l'étude de phylogéographie de *Lessonia nigrescens*.

Annexe 1.4 : Numéros d'accession GenBank des haplotypes et allèles obtenus lors de l'étude de phylogéographie.

Annexe 1.5 : Etude de phylogéographie, approche multilocus : distribution des haplotypes et allèles dans les populations de *Lessonia nigrescens*.

Annexe 1.6 : Etude de phylogéographie, approche populationnelle : distribution des haplotypes atp8/trnS dans les populations de *Lessonia nigrescens*.

Annexe 1.7 : Distribution des haplotypes atp8/trnS dans les populations de *Lessonia trabeculata*.

ANNEXE 1.1

Protocole d'extraction d'ADN utilisé pour *Lessonia nigrescens* et *Lessonia trabeculata*

L. nigrescens

1. Peser environ 5 mg de tissus sec.
2. Moudre le tissu à l'aide d'azote liquide ou d'une machine à broyer jusqu'à obtenir de la poudre fine.
3. Ajouter la même quantité de PVP-40 en poudre et ajouter 700 µL de tampon de lyse. Bien homogénéiser.
4. Mettre sur un rotor pendant 30 à 60 min à température ambiante.
5. Centrifuger 30 min à 14000 rpm.
6. Transférer le surnageant dans de nouveaux tubes de 1,5 mL.
7. Ajouter 700 µL de chloroforme:isoamilalcool (24 :1).
8. Bien homogénéiser pendant 1 min.
9. Centrifuger 20 min à 14000 rpm, à -4°C.
10. Transférer le surnageant (sans toucher l'interface blanche) dans de nouveaux tubes de 1,5 mL.
11. Ajouter l'isopropanol (3/4 du volume).
12. Centrifuger 14 min à 14000 rpm, à -4°C.
13. Eliminer le surnageant.
14. Faire sécher le culot.
15. Resuspendre le culot dans 60 µL d'eau ultra pure.
16. Conserver les ADN stocks à -20°C.

Lessonia trabeculata :

Protocole identique jusqu'à l'étape 5 :

6. Transférer le surnageant dans de nouveaux tubes de 2 mL.
7. Ajouter 600 µL de phénol:chloroforme:isoamilalcool et homogénéiser.
8. Incuber 20 min dans de la glace.
9. Centrifuger 20 min à 14000 rpm, à -20°C.
10. Transférer le surnageant dans de nouveaux tubes.
11. Ajouter 700 µL de chloroforme:isoamilalcool (24 :1) et homogénéiser.
12. Centrifuger 20 min à 14000 rpm, à -20°C.
13. Répéter les étapes 10 à 12.

Reprendre le protocole utilisé pour *L. nigrescens* à l'étape 10.

Tampon de lyse (pour 100mL) :

CTAM 3%	0,3 g
NaCl 1,4M	8,18 g
EDTA 20mM	0,744 g
Tris HCl 1M pH8	12,11 g

ANNEXE 1.2

Conditions d'amplification des marqueurs utilisés pour l'étude de la phylogéographie (*atp8/trnS*, RuBisCo spacer, ITS1 et ITS2) et Séquençage et détection du polymorphisme de conformation simple brin (SSCP)

Annexe 1.2-a : Loci de l'étude de la phylogéographie et références des protocoles.

Locus	Séquence des amorces (5' - 3')	Génome	Référence
<i>atp8/trnS</i>	F : TGT ACG TTT CAT ATT ACC TTC TTT AGC R : TAG CAA ACC AAG GCT TTC AAC	mitochondrial	Engel <i>et al.</i> (2008) Voisin <i>et al.</i> (2005)
RuBisCo spacer	RS1 : GCC AAA TGC ACC AAC TTC TT RS2 : AGA CCC CAT AAT TCC C	chloroplastique	Yoon et Boo (1999)
ITS1 et ITS2 ^a	LB1 : CGC GAG TCA TCA GCT CGC ATT LB2 : AGC TTC ACT CGC CGT ACT GG	nucléaire	Yoon <i>et al.</i> (2001)

^a Les marqueurs ITS1 et ITS2 sont amplifiés en utilisant les mêmes amorces, qui amplifient l'ensemble ITS1 - gène 5,8S - ITS2.

Annexe 1.2-b : Réaction de PCR.

	[C] solution mère	<i>atp8/trnS</i> Vol (µL) pour 1 ind	RuBisCo spacer Vol (µL) pour 1 ind	ITSs Vol (µL) pour 1 ind
H ₂ O		5,30	0,30	0,30
BSA	1 mg.mL ⁻¹	2,00	6,00	6,00
Tampon 10X		2,00	2,00	2,00
MgCl ₂	25mM	2,00	2,00	2,00
dNTP	2,5mM	1,60	1,60	1,60
Amorce F	5 µM	1,00	2,00	2,00
Amorce R	5 µM	1,00	2,00	2,00
Taq polymérase	5 U.µL ⁻¹	0,10	0,10	0,10
ADN	1,6ng.µL ⁻¹	5,00	5,00	5,00
<i>Volume final</i>		<i>20,00</i>	<i>20,00</i>	<i>20,00</i>

Annexe 1.2-c : Programmes d'amplification ?

atp8/trnS :

1. Dénaturation initiale de 5 min à 95°C
2. 5 cycles en « touch down » : -1°C par cycle pour la température d'appariement
 - 30 sec à 95°C
 - 30 sec à la température d'appariement (température initiale 60°C)
 - 45 sec à 72°C
3. 30 cycles avec température d'appariement fixe (55°C)
 - 30 sec à 95°C
 - 30 sec à 55°C
 - 45 sec à 72°C
4. Elongation finale : 7 min à 72°C.

RuBisCo et ITS :

1. Premier cycle :
 - 4 min à 95°C
 - 1 min à 45°C
 - 1 min à 72°C
2. 30 cycles à température d'appariement fixe (57°C pour RuBisCo spacer, 50°C pour ITSs) :
 - 30 sec à 95°C
 - 45 sec à la température d'appariement
 - 1 min à 72°C
3. Elongation finale : 10 min à 72°C.

Annexe 1.2-d : Purification des produits de PCR pour séquençage.

Protocole utilisé à la plateforme de séquençage de la Station Biologique de Roscoff (kit de montage μ PCR):

1. Ajouter 50 μ L d'eau milliQ dans chaque puits.
2. Transférer le total de chaque puits dans la plaque à membrane.
3. Filtrer par le vide à 15 mm Hg pendant 10 min ou jusqu'à ce que tous les puits soient vides.
4. Ajouter 50 μ L d'eau milliQ par puits.
5. Refaire le vide à la même pression.
6. Ajouter 40 μ L (20 μ L si les produits PCR sont peu concentrés) d'eau milliQ par puits.
7. Laisser la plaque 10 min sur un agitateur horizontal (coller un film sur la plaque).
8. Transférer le tout dans une plaque à fond V.

Protocole utilisé au laboratoire de Diversidad Molecular de la P. Universidad Católica de Chile (PUCCh): utilisation du kit de purification des produits PCR QIAGEN selon le protocole du fabricant.

Protocole utilisé dans le cas du marqueur *atp8/trnS* pour l'identification des différentes bandes :

1. Faire migrer le produit PCR sur gel d'agarose à 2%, jusqu'à ce que les différentes bandes soient nettement séparées (utiliser un contrôle positif).
2. Découper la bande d'intérêt à l'aide d'un scalpel.
3. Utiliser le kit de purification de produit PCR à partir de gel d'agarose selon le protocole du fabricant.

Annexe 1.2-e : Réaction de séquençage.

	Vol (μ L) pour 1 ind
ADN	1
Tampon 5x Applied	0,75
Amorce (5 μ M)	0,75
Big Dye Terminator 3.1	0,5
H ₂ O	1,75

Programme de séquence :

1. Dénaturation initiale : 5 min à 96°C
2. 50 cycles :
 - 30 sec à 96°C
 - 40 sec à 50°C
 - 4 min à 60°C

Les produits de la réaction de séquence sont ensuite transmis aux différents services de séquençage (plateforme de la SBR ou laboratoire de Diversidad Molecular de la PUCCh) pour purification et passage sur séquenceur à capillaires.

Annexe 1.2-f : Détection du polymorphisme de conformation simple brin (SSCP)

Protocole d'après Voisin *et al.* (2005), avec modification du temps de migration et de la quantité de produit chargée.

Pour 16 µL de produit de PCR, rajouter 32 µL de tampon de charge composé de :

- 8 µL de tampon Ficoll ⁽¹⁾
- 5,3 µL d'urée à 5 M
- 19,7 µL de TBE 1 X

⁽¹⁾ Pour 10 mL de tampon Ficoll :

- 1500 mg de Ficoll
- 25 mg de Bleu de Bromophénol
- 25 mg de Xylène Cyanol

Gel d'acrylamide à 10% (37,5 :1, acrylamide :bisacrylamide) :

Gel	10%
H ₂ O	28 mL
TBE 10 X	2 mL
Acrylamide:bisacrylamide (37,5:1)	10 mL
APS 10%	228 µL
Temed	35 µL
Volume final	40 mL

Dénaturer les échantillons 4 min à 9°C puis les stocker dans la glace jusqu'au chargement. Charger l'ensemble du mélange produit de PCR – tampon de charge.

Migration à 4°C, à voltage constant (200V) pendant 17h en utilisant du TBE 10 X comme tampon de migration.

Les gels sont révélés avec un bain de 20 min de Sybr Gold à 2,5 X et de TBE 1 X sous agitation, puis sont visualisés sous U.V.

Annexe 1.3-a : Matrice de distances géographiques (en km) entre paires de populations du clade Nord.

	QMO	CAC	PCH	PAT	COL	SLD
CAC	363					
PCH	414	51				
PAT	561	198	147			
COL	974	611	560	413		
SLD	1268	905	854	707	294	
MOC	1416	1053	1002	855	442	148

Annexe 1.3-b : Matrice de distances géographiques (en km) entre paires de populations du clade Z30.

	PAJ	CAR	HCO	CHN	CHS	TBL	ARY	TEA	OTO	GUANA
CAR	46									
HCO	94	48								
CHN	205	159	111							
CHS	221	175	127	16						
TBL	239	193	145	34	18					
ARY	261	215	167	56	40	22				
TEA	280	234	186	75	59	41	19			
OTO	321	275	227	116	100	82	60	41		
GUANA	344	298	250	139	123	105	83	64	23	
TON	353	307	259	148	132	114	92	73	32	9

ANNEXE 1.3

Matrice de distances géographiques entre paires de populations pour l'étude de phylogéographie de *L. nigrescens*

Annexe 1.3-c : Matrice de distances géographiques (en km) entre paires de populations du clade AI.

	ACE	IPA	COZ	PTLV2	RLI	PTAL	LM	MTM	CURAM	QUIS	LC	MAT	PICHI	CST	CONCE	MEH	PUC
IPA	61																
COZ	124	43															
PTLV2	197	77	73														
RLI	251	131	127	54													
PTAL	272	152	148	75	21												
LM	433	313	309	236	182	161											
MTM	534	414	410	337	283	262	101										
CURAM	567	447	443	370	316	295	134	33									
QUIS	606	486	482	409	355	334	173	72	39								
LC	620	500	496	423	369	348	187	86	53	14							
MAT	682	562	558	485	431	410	249	148	115	76	62						
PICHI	737	617	613	540	486	465	304	203	170	131	117	55					
CST	857	737	733	660	606	585	424	323	290	251	237	175	120				
CONCE	1084	964	960	887	833	812	651	550	517	478	464	402	347	227			
MEH	1474	1354	1350	1277	1223	1202	1041	940	907	868	854	792	737	617	390		
PUC	1633	1513	1509	1436	1382	1361	1200	1099	1066	1027	1013	951	896	776	549	159	
GBN	1815	1695	1691	1618	1564	1543	1382	1281	1248	1209	1195	1133	1078	958	731	341	182

ANNEXE 1.4

Numéros d'accèsion GenBank des haplotypes et allèles
obtenus lors de l'étude de phylogéographie**Annexe 1.4-a : Numéros d'accèsion des haplotypes du marqueur atp8/trnS.**

Haplotype	Accession	Haplotype	Accession	Haplotype	Accession
atp1	EU652976	atp14	FJ410107	atp31	FJ410119
atp2	EU652977	atp15	FJ410108	atp32	FJ410120
atp3	EU652978	atp16	FJ410109	atp33	FJ410121
atp4	EU652979	atp17	FJ410110	atp34	FJ410122
atp5	EU652980	atp22	FJ410111	atp35	FJ410123
atp6	EU652981	atp23	FJ410112	atp38	FJ410124
atp7	EU652982	atp25	FJ410113	atp39	FJ410125
atp8	EU652983	atp26	FJ410114	atp101	EU652984
atp9	FJ410103	atp27	FJ410115	atp102	FJ410128
atp10	FJ410104	atp28	FJ410116	atp201	EU652985
atp12	FJ410105	atp29	FJ410117	atp202	FJ410130
atp13	FJ410106	atp30	FJ410118	atp203	EU652986

Annexe 1.4-b : Numéros d'accèsion des haplotypes du marqueur RuBisCo spacer.

Haplotype	Accession	Haplotype	Accession
rs1	FJ410085	rs10	FJ410094
rs2	FJ410086	rs11	FJ410095
rs3	FJ410087	rs13	FJ410096
rs4	FJ410088	rs101	FJ410097
rs5	FJ410089	rs102	FJ410098
rs6	FJ410090	rs103	FJ410099
rs7	FJ410091	rs104	FJ410100
rs8	FJ410092	rs202	FJ410101
rs9	FJ410093	rs203	FJ410102

Haplotypes déjà présents dans GenBank :

Haplotype	Accession
rs12	AY851544
rs201	AY851543
rs204	AY851545

Annexe 1.4-c : Numéros d'accèsion des allèles du marqueur ITS1.

Allèle	Accession	Allèle	Accession	Allèle	Accession
its1-1	FJ410031	its1-12	FJ410041	its1-22	FJ410051
its1-2	FJ410032	its1-13	FJ410042	its1-23	FJ410052
its1-4	FJ410033	its1-14	FJ410043	its1-24	FJ410053
its1-5	FJ410034	its1-15	FJ410044	its1-25	FJ410054
its1-6	FJ410035	its1-16	FJ410045	its1-101	FJ410055
its1-7	FJ410036	its1-17	FJ410046	its1-102	FJ410056
its1-8	FJ410037	its1-18	FJ410047	its1-103	FJ410057
its1-9	FJ410038	its1-19	FJ410048	its1-104	FJ410058
its1-10	FJ410039	its1-20	FJ410049	its1-204	FJ410059
its1-11	FJ410040	its1-21	FJ410050		

Allèles supplémentaires obtenus par clonage :

Allèle	Accession
CAR1 isolat C1	FJ410060
TBL2 isolat C1	FJ410061
TBL2 isolat C3	FJ410062
TBL2 isolat C5	FJ410063
PTLV2-11 isolat C1	FJ410064
PTLV2-11 isolat C4	FJ410065
PTAL3 isolat C3	FJ410066
PTAL3 isolat C4	FJ410067

Allèles déjà présents dans GenBank :

Allèle	Accession
its1-201	AF319031
its1-202	AY857900
its1-205	AY857902

Annexe 1.4-d : Numéros d'accèsion des allèles du marqueur ITS2.

Allèle	Accession	Allèle	Accession
its2-1	FJ410068	its2-10	FJ410076
its2-3	FJ410069	its2-11	FJ410077
its2-4	FJ410070	its2-12	FJ410078
its2-5	FJ410071	its2-13	FJ410079
its2-6	FJ410072	its2-14	FJ410080
its2-7	FJ410073	its2-101	FJ410081
its2-8	FJ410074	its2-103	FJ410082
its2-9	FJ410075	its2-204	FJ410083

Allèle supplémentaire obtenu par clonage :

Allèle	Accession
PTLV2-11 isolat C1	FJ410084

Allèles déjà présents dans GenBank :

Allèle	Accession
its2-201	AF319031
its2-202	AY857900
its2-205	AY857902

ANNEXE 1.5

Etude de phylogéographie, approche multilocus :
distribution des haplotypes et allèles
dans les populations de *Lessonia nigrescens*

Annexe 1.5-a : Distribution des haplotypes atp8/trnS dans les populations de *L. nigrescens* (jeu de données de l'approche multilocus).

Clade Nord :

Localité	atp1	atp2	atp3	atp14	atp15	Total
ILO					5	5
QCA/CAC					4	4
PCH					2	2
PAT/HUA	2					2
COL					5	5
LnCHA/SLD		1	4			5
MOC			5			5
PAJ						3
CAR						5
HCO						5
CHN						2
CHS						5
TBL						2
ARY						2
TEA						5
OTO						4
GUANA						2
TON						2
Total	2	1	9	11	5	28

Clade Z30 :

Localité	atp4	atp16	atp22	atp23	atp26	atp27	Total
PAJ			3				3
CAR			5				2
HCO				5			5
CHN						2	2
CHS	2				2	1	5
TBL	2						2
ARY		2					2
TEA		5					2
OTO	4						4
GUANA	2						2
TON	2						2
Total	12	7	8	5	2	3	37

Clade AI :

Localité	atp1	atp5	atp6	atp7	atp8	atp9	atp10	atp12	atp13	atp17	atp25	atp28	Total
ACE							5						5
IPA												5	5
COZ											5		5
PTLV2							4						4
CSLO				1			1						2
RLI							3						3
PTAL							5						5
LM										2			2
MTM						2							2
CURAM		3							2				5
QUIS		2											2
LC		2											2
MAT								2					2
CST			2										2
CONCE			5										5
MEH				1	4								5
PUC				1	1								2
GBN					4								4
Total	2	7	7	3	9	2	18	2	2	2	5	5	62

Annexe 1.5-b : Distribution des haplotypes RuBisCo spacer dans les populations de *L. nigrescens*.

Lignée PP (clades mitochondriaux Nord et Z30) :

Localité	Clade Nord			Clade Z30			Total
	rs1	rs2	rs3	rs4	rs6	rs8	
ILO	5						5
QCA/CAC	2						2
PCH	2						2
PAT/HUA	2						2
COL	5						5
LnCHA/SLD		5					5
MOC			5				5
PAJ				3			3
CAR				5			5
HCO				5			5
CHN					2		2
CHS				4	1		5
TBL				2			2
ARY						2	2
TEA						5	5
OTO						4	4
GUANA						2	2
TON						2	2
Total	16	5	5	19	3	15	63

Lignée AI :

Localité	rs5	rs7	rs9	rs10	rs11	rs12	rs13	Total
ACE	5							5
IPA		5						5
COZ			5					5
PTLV2		4						4
CSLO		2						2
RLI		2						2
PTAL		4		1				5
LM					2			2
MTM					2			2
CURAM						5		5
QUIS						2		2
LC						2		2
MAT		1				1		2
CST							2	2
CONCE							5	5
MEH		5						5
PUC		2						2
GBN		4						4
Total	5	29	5	1	4	10	7	61

Annexe 1.5-c : Distribution des allèles ITS1 dans les populations de *L. nigrescens*.

Lignée PP (clades mitochondriaux Nord et Z30) :

Localité	Clade Nord					Clade Z30									Total
	its1-1	its1-2	its1-4	its1-5	its1-6	its1-7	its1-8	its1-9	its1-10	its1-12	its1-13	its1-15	its1-17	its1-18	
ILO	1														1
PCH		2													2
LnCHA/SLD			2												2
MOC				1	1										2
PAJ						1	1								2
CAR								1	1						2
HCO									2						2
CHN										1	1				2
CHS											3				3
ARY												1			1
TEA												1			1
OTO													1		1
GUANA														2	2
TON														2	2
Total	1	2	2	1	1	1	1	1	3	1	4	2	1	4	25

Lignée AI :

Localité	its1-11	its1-14	its1-16	its1-19	its1-20	its1-21	its1-22	its1-23	its1-24	its1-25	Total
ACE	1										1
IPA		2									2
COZ			1								1
PTLV2				1							1
RLI					1	1					2
PTAL					2						2
LM							1				1
MTM						1		1			2
CURAM						2					2
QUIS						2					2
LC						2					2
MAT									1		1
CONCE									2		2
MEH										2	2
PUC								2			2
GBN										2	2
Total	1	2	1	1	3	8	1	3	3	4	27

Annexe 1.5-d : Distribution des allèles ITS2 dans les populations de *L. nigrescens*.

Lignée PP (clades mitochondriaux Nord et Z30) :

Localité	Clade Nord		Clade Z30						Total
	its2-1	its2-3	its2-4	its2-5	its2-6	its2-9	its2-10	its2-12	
ILO	2								2
QCA/CAC	2								2
PCH	2								2
COL	1								1
LnCHA/SLD		1							1
MOC	1								1
PAJ			2						2
CAR			2	1					3
HCO			1		1				2
ACE									2
CHN						1	1		2
CHS						3			3
IPA									2
ARY					2				2
TEA					2				2
COZ									2
OTO						2			2
GUANA								2	2
TON								2	2
PTLV2									2
CSLO									2
RLI									3
PTAL									2
LM									2
MTM									2
CURAM									2
QUIS									2
LC									2
MAT									2
CONCE									2
MEH									2
PUC									2
GBN									2
Total	8	1	5	1	5	6	1	4	31

Lignée AI :

Localité	its2-7	its2-8	its2-11	its2-13	its2-14	Total
ACE	1	1				2
IPA			2			2
COZ	2					2
PTLV2			2			2
CSLO			2			2
RLI			2	1		3
PTAL				2		2
LM			2			2
MTM			2			2
CURAM			1		1	2
QUIS			2			2
LC			2			2
MAT			2			2
CONCE			2			2
MEH			2			2
PUC			2			2
GBN			2			2
Total	3	1	27	3	1	35

Annexe 1.5-e : Distribution des haplotypes et allèles dans les populations de *L. trabeculata*.

Haplotypes atp8/trnS, jeu de données multilocus :

Localité	atp101	atp102	Total
Lt-TRU		1	1
Lt-CAB		1	1
Lt-HCO	1		1
Lt-TOY	1		1
Lt-ALGA	1		1
Lt-EST	1		1
Lt-ANC	2		2
Total	6	2	8

Haplotypes RuBisCo spacer :

Localité	rs101	rs102	rs103	rs104	Total
Lt-TRU	1				1
Lt-CAB		1			1
Lt-HCO			1		1
Lt-TOY				1	1
Lt-ALGA				1	1
Lt-EST				1	1
Lt-ANC				1	1
Total	1	1	1	4	7

Allèles ITS1 :

Localité	its1-101	its1-102	its1-103	its1-104	Total
Lt-TRU	1				1
Lt-CAB		1			1
Lt-HCO			1		1
Lt-ALGA				1	1
Lt-EST				1	1
Lt-ANC				1	1
Total	1	1	1	3	6

Allèles ITS2 :

Localité	its2-101	its2-103	Total
Lt-TRU	1		1
Lt-CAB	1		1
Lt-HCO		1	1
Lt-TOY		1	1
Lt-ALGA		1	1
Lt-EST		1	1
Lt-ANC		1	1
Total	2	5	7

ANNEXE 1.6

Etude de phylogéographie, approche populationnelle :
distribution des haplotypes atp8/trnS
dans les populations de *Lessonia nigrescens*

Annexe 1.6-a : Distribution des haplotypes atp8/trnS dans les populations du clade nord :

Localité	atp 1	atp 2	atp 3	atp 14	atp 15	atp 39	Total
QCA						30	30
CAC				30			30
PCH				29			29
PAT	28						28
COL					30		30
SLD		13	16				29
MOC			30				30
Total	28	13	46	59	30	30	206

Annexe 1.6-b : Distribution des haplotypes atp8/trnS dans les populations du clade Z30 :

Localité	atp 4	atp 16	atp 22	atp 23	atp 26	atp 27	atp 29	profil C	Total
PAJ			30						30
CAR			30						30
HCO				8					8
CHN						2		28	30
CHS	2				2	1		25	30
TBL	2							31	33
ARY		33							33
TEA		30							30
OTO	4						1	25	30
GUANA	3							29	32
TON	2							28	30
Total	13	63	60	8	2	3	1	166	316

Annexe 1.6-c : Distribution des haplotypes atp8/trnS dans les populations du clade AI :

Localité	atp 5	atp 6	atp 7	atp 8	atp 9-11	atp 10	atp 12	atp 13	atp 17	atp 25	atp 28	atp 30	atp 31	atp 32	atp 33	atp 34	atp 35	atp 38	Total
ACE						29													29
IPA											30								30
COZ										27								1	28
PTLV2						29						1							30
RLI						27					2								29
PTAL						31													31
LM									33										33
MTM					33														33
CURAM	25							5											30
QUIS	28														2				30
LC	30																		30
MAT							30												30
PICHI		1					26						1	2					30
CST		12																	12
CONCE		28																	28
MEH			14	16															30
PUC			10	19														1	30
GBN			1	27												2			30
Total	83	41	25	62	33	116	56	5	33	27	32	1	1	2	2	2	1	1	523

ANNEXE 1.7

Distribution des haplotypes atp8/trnS
dans les populations de *Lessonia trabeculata*

Tableau 1 : Distribution des haplotypes atp8/trnS dans les populations de *L. trabeculata*.

Localité	atp101	atp102	atp103	Total
Lt-MEN			1	1
Lt-TRU		1		1
Lt-CAB		1		1
Lt-SM		4		4
Lt-PA	1			1
Lt-HCO	29			29
Lt-IPO	1			1
Lt-COQUI	14			14
Lt-OTO	1			1
Lt-TOY	1			1
Lt-ALGA	10			10
Lt-EST	1			1
Lt-ANC	3			3
Total	61	6	1	68

ANNEXES 2
(CHAPITRE 2)

ANNEXE 2.B

(Chapitre 2, Partie B)

Annexe 2.B.1 : Expérience de croisement en conditions contrôlées.

Annexe 2.B.2 : Conditions d'amplification des loci microsatellites.

Annexe 2.B.3 : Distances géographiques entre sites d'échantillonnage de la zone de contact Aceituno-Choros.

Annexe 2.B.4 : Distribution des allèles de quatre loci pour les échantillons traités dans l'article Faugeron *et al.* (2009).

Annexe 2.B.5 : Détails des analyses microsatellites de la zone de contact Aceituno-Choros.

ANNEXE 2.B.1

Expériences de croisements en conditions contrôlées

Approche utilisée

Plutôt que de réaliser des croisements à partir de gamétophytes mâles et femelles isolés, nous avons choisi de mimer l'arrivée d'un groupe de spores migrantes dans un site donné, permettant ainsi d'inclure dans l'expérience la possibilité d'isolement gamétique compétitif. Le principe de l'expérience a donc été de mélanger deux groupes de spores provenant de sporophytes d'espèces différentes. Les sporophytes obtenus peuvent être potentiellement issus d'hybridation, mais également d'autofécondation et de parthénogénèse. Les témoins de l'expérience ont consisté à mélanger deux groupes de spores provenant de sporophytes de même espèce, et à obtenir des sporophytes issus d'allofécondation (croisement intraspécifique), d'autofécondation et de parthénogénèse. Il est important de noter que, les conditions de culture ne permettant pas de compléter le cycle de vie de *L. nigrescens* en laboratoire, l'expérience a été menée jusqu'à ce que les sporophytes aient une taille suffisante pour extraction d'ADN.

Ce schéma d'expérience a été rendu possible par l'utilisation des marqueurs microsatellites, permettant de génotyper les sporophytes parentaux (producteurs des spores utilisées) et les sporophytes juvéniles (obtenus après culture), pour déterminer l'origine des sporophytes juvéniles (hybridation, allo ou autofécondation, parthénogénèse). Dans le cas d'hybrides, l'utilisation du marqueur mitochondrial *atp8/trnS* permet d'identifier le sens du croisement.

Les méthodes de croisements et de culture seront présentées ici, tandis que les résultats des analyses moléculaires ne sont pour l'instant pas disponibles. Les cultures ont été réalisées grâce à l'aide précieuse de Carolina Olivares (Universidad Católica del Norte).

Choix des sites d'étude

Quatre sites ont été choisis pour ces expériences de croisement : Las Cruces (LC, 33°30'S, AI) et Chañaral (CHA, 26°09'S, PP) d'une part, et Aceituno (ACE, 29°03'S, AI) et Choros Ventana (CHV, 29°12'S, PP) d'autre part. Ce choix permet de tester si l'isolement reproducteur entre les espèces AI et PP est de même importance lorsque les espèces ont la possibilité d'interagir (zone de contact d'Aceituno-Choros) que lorsque les populations sont géographiquement distantes.

1) Echantillonnage et méthodes de sporulation :

L'échantillonnage a considéré l'unité « individu » comme étant un stipe principal et les frondes correspondantes, les stipes d'un même disque pouvant en effet constituer des génotypes distincts. L'échantillonnage à CHA (individus CHA1 à CHA5) et à LC (individus LC2 à LC6) a été réalisé le 13/08/2007, l'échantillonnage à CHV (individus XCHV1 à XCHV5) et à ACE (individus ACE-A34 et ACE-A35) a été réalisé le 28/08/2007. En plus des sores nécessaires à la sporulation, un fragment de fronde non reproductive a été échantillonné pour chaque individu, pour génotypage, et conservé en silica gel.

La sporulation a été réalisée soit sur le terrain (< 5h après échantillonnage), soit après retour au laboratoire (24h de transport). Dans ce cas, deux modes de conservation ont été testés, appelés en « sachet » et en « glacière ». Dans le premier cas, les portions fertiles de

frondes ont été découpées, essuyées et placées dans un sachet plastique hermétique, placé au frais et à l'obscurité. Dans le second cas, le stipe principal et les frondes associées ont été placés directement dans une glacière fraîche.

La sporulation a été réalisée en mettant quatre à six cercles de sores de 1 cm de diamètre rincés à l'eau douce dans des tubes de 50 mL d'eau de mer filtrée. Après une nuit, les cercles de sores ont été enlevés et l'eau de mer changée par du milieu de culture.

2) Méthodes de croisements et culture

Trois méthodes de croisements ont été testées :

- la méthode dite « directe » : les deux cercles de sores introduits dans un même tube de sporulation proviennent de deux individus différents, la culture se fait dans le tube de sporulation.
- la méthode dite « de plaques jointes » : la sporulation est réalisée dans un tube distinct pour chaque individu. Chaque tube contient un porte-objet sur lequel se fixent les spores et germent les gamétophytes. Après trois jours de culture, deux porte-objets sont placés face-à-face et fixés à l'aide d'élastiques à 2 mm de distance l'un de l'autre et la culture est poursuivie dans un récipient adéquat.
- la méthode dite de « tube/corde » : la sporulation est réalisée dans un tube distinct pour chaque individu, chaque tube contenant une cordelette de nylon. Après trois jours de culture, la cordelette est retirée et remplacée par une cordelette d'un tube de sporulation différent (dépendant du croisement testé).

Lorsque les sporophytes sont visibles à l'œil nu, ils sont détachés du porte-objet ou de la corde et mis en culture avec un système d'agitation et de bulleur jusqu'à ce qu'ils soient suffisamment grands pour qu'une extraction d'ADN soit possible.

3) Croisements réalisés et sporophytes obtenus

Tableau 1 : Présentation des croisements réalisés pour les populations LC et CHA. Pour chaque croisement, les deux individus sporophytes parentaux sur lesquels ont été échantillonnés les sores sont indiqués (parent1 et parent2), un seul parent est indiqué dans le cas d'une culture témoin. Pour chaque méthode de croisement (direct, plaques jointes et tube/corde) et de sporulation (Terrain, Sachet et Glaciaire) sont indiqués les codes des individus sporophytes juvéniles conservés en silica gel (seules les cultures ayant réussi sont présentées). Enfin, l'origine possible des sporophytes obtenus est indiquée : parthénogénèse (parth), autofécondation (autof), allofécondation intraspécifique (allof) et hybridation (hyb).

Parent 1	Parent 2	Direct			Plaques jointes	Tube/Corde	Origine possible des sporophytes obtenus			
		Terrain	Sachet	Glaciaire			Terrain	Terrain	Parth	Autof
Cultures arrêtées en février 2008										
LC2		B1-B50					x	x		
LC2	LC3		G1-G20		E1-E40	F21-F40	x	x	x	
LC3		B51-B100					x	x		
LC4				B301-B350			x	x		
LC5		B101-B150					x	x		
LC5	LC6		G21-G40				x	x	x	
LC6		B150-B200					x	x		
CHA1			C1-C50				x	x		
CHA1	CHA4			H1-H20	E41-E80	F1-F20	x	x	x	
CHA2				C51-C100			x	x		
CHA3			C101-C150				x	x		
CHA4			C201-C250				x	x		
CHA5		C151-C200					x	x		
LC2	CHA1	D151-D200					x	x		x
LC2	CHA2			D51-D100			x	x		x
LC2	CHA5			D401-D450			x	x		x
LC3	CHA1		D1-D50				x	x		x
LC3	CHA4			D251-D300			x	x		x
LC3	CHA5			D201-D250			x	x		x
LC4	CHA1			D451-D500			x	x		x
LC4	CHA2		D101-D150				x	x		x
LC4	CHA5			D301-D350			x	x		x
LC6	CHA2			D351-D400			x	x		x
Cultures arrêtées en juin 2008										
LC2	CHA1		50 individus				x	x		x
LC2	CHA2			50 individus			x	x		x
LC2	CHA5			100 individus			x	x		x
LC3	CHA1		50 individus				x	x		x
LC3	CHA4			50 individus			x	x		x
LC4	CHA1			50 individus			x	x		x

Tableau 2 : Présentation des croisements réalisés pour les populations ACE et CHV. Le numéro du tube de culture est indiqué ainsi que la proportion de sore de chaque population utilisée pour la sporulation. Les codes des individus placés en silica gel sont également mentionnés et l'origine possible des individus (parth : parthénogénèse, autof : autofécondation, allof : allofécondation, hyb : hybridation). Les croisements ont été réalisés avec la méthode « directe », sur le terrain.

Tube de culture	Superficie de sores	Codes individus	parth	autof	allof	hyb
Cultures arrêtées en février 2008						
1	100% CHV	A1-A10	x	x	x	
2	100% CHV	A11-A20	x	x	x	
5	100% ACE	A21-A30	x	x	x	
6	100% ACE	A31-A40	x	x	x	
7	50% ACE 50% CHV	A41-A60	x	x	x	x
8	50% ACE 50% CHV	A61-A80	x	x	x	x
9	50% ACE 50% CHV	A81-A100	x	x	x	x
10	50% ACE 50% CHV	A101-A120	x	x	x	x
Cultures arrêtées en juin 2008						
7	50% ACE 50% CHV	50 individus	x	x	x	x
8	50% ACE 50% CHV	50 individus	x	x	x	x

ANNEXE 2.B.2

Conditions d'amplification des loci microsatellites

Annexe 2.B.a : Réaction de PCR.

	[C] solution mère	Locus P3 Vol (μL) pour 1 ind	Locus P9 Vol (μL) pour 1 ind	Locus LESS1 Vol (μL) pour 1 ind	Locus LESS22 Vol (μL) pour 1 ind
H ₂ O		7,9	8,8	10,5	10,2
BSA	10mg.mL ⁻¹	0,5	0,9	0,9	0,9
Tampon 10X		2 ²	2	2	5
MgCl ₂	25mM	3	1,5	1	1,3
dNTP	2mM	3	3	2	2
Amorce F	10 μM	0,2 (NED)	0,2	0,2 (FAM)	0,2 (PET)
Amorce R	10 μM	0,2	0,2	0,2	0,2
M13 marquée		-	0,2	-	-
Taq polymérase	5U. μL^{-1}	0,2	0,2	0,2	0,2
ADN	10ng. μL^{-1}	3	3	3	3
<i>Volume final</i>		<i>20,00</i>	<i>20,00</i>	<i>20,00</i>	<i>20,00</i>

Annexe 2.B.b : Passage sur séquenceur à capillaire.

Mélange des réactions de PCR avant passage sur séquenceur à capillaire selon les proportions suivantes :

Pour AI : 1,0 μL P3, 1,5 μL P9, 1,0 μL LESS1, 2,0 μL LESS22

Pour PP : 1,0 μL P3, 2,5 μL P9, 1,0 μL LESS1, 2,0 μL LESS22

ANNEXE 2.B.3

Distances géographiques entre sites d'échantillonnage
de la zone de contact Aceituno-Choros**Tableau 1 : Distances géographiques entre paires de sites d'échantillonnage de la zone de contact Aceituno-Choros.** Les distances sont exprimées en km, et suivent les principaux traits de côte.

	ACE	APN	APS	ERM	ERMS	APON	APO	CHV	CHB	CHN	CHS
CPI	7,4	10,9	17,2	22,2	25,2	26,8	27,8	31,2	34,2	37,8	54,7
ACE		3,5	9,8	14,8	17,8	19,4	20,4	23,8	26,8	30,4	47,3
APN			6,3	11,3	14,3	15,9	16,9	20,3	23,3	26,9	43,8
APS				5,0	8,0	9,6	10,6	14,0	17,0	20,6	37,5
ERM					3,0	4,6	5,6	9,0	12,0	15,6	32,5
ERMS						1,6	2,6	6,0	9,0	12,6	29,5
APON							1,0	4,4	7,4	11,0	27,9
APO								3,4	6,4	10,0	26,9
CHV									3,0	6,6	23,5
CHB										3,6	20,5
CHN											16,9

ANNEXE 2.B.4

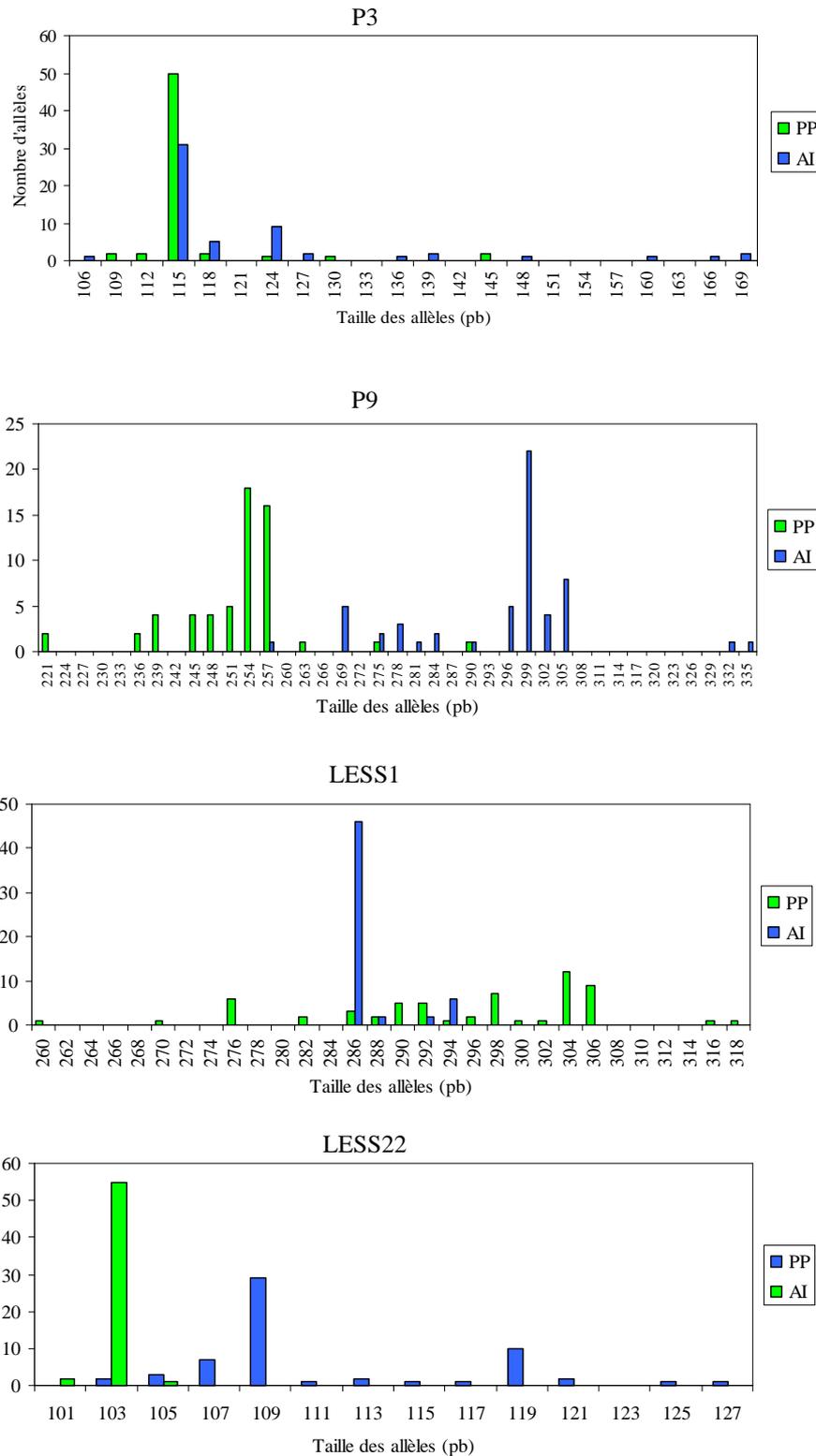
Distribution des allèles de quatre loci pour les échantillons traités dans l'article Faugeron *et al.* (2009)

Figure 1 :
Distribution des tailles d'allèles obtenus pour quatre loci microsatellites dans un échantillonnage réduit de 60 individus, dont 24 issus de la population LC (espèce AI, 33°S) et 24 de la population PAz (espèce PP, 26°S). Les distributions alléliques montrent des allèles partagés entre espèces. Le cas du marqueur P3 est particulier, les deux populations LC et PAz montrant le même allèle majoritaire (115).

Article présenté en Annexe 3.2

ANNEXE 2.B.5

Détails des analyses microsatellites de la zone de contact Aceituno-Choros

Annexe 2.B.5-a : Analyses intrapopulations.

Tableau 1 : Valeurs de F_{IS} par locus et moyenne pour chaque population de la zone de contact Aceituno-Choros. N.D. : non calculé (population monomorphe pour le locus considéré).

Espèce	Site	Locus			Moyenne sur les 3 loci
		P3	P9	LESS1	
AI	CPI	0,71200	0,10609	0,23835	0,29973
	ACE	0,89655	0,02941	1,00000	0,43969
	APN	0,61111	0,02452	0,20482	0,28409
	APS	0,76204	0,00568	0,79138	0,36560
	ERM	0,63203	-0,08584	0,62633	0,26030
	ERMS	0,87879	-0,09615	0,50413	0,36882
	PP	APON	0,57669	0,57494	N.D.
APO		-0,05556	0,72358	N.D.	0,55667
CHV		-0,21429	0,33852	N.D.	0,18592
CHB		0,06863	0,71106	N.D.	0,47141
CHN		0,00000	0,12139	N.D.	0,11311
CHS		-0,05556	0,39286	N.D.	0,25490

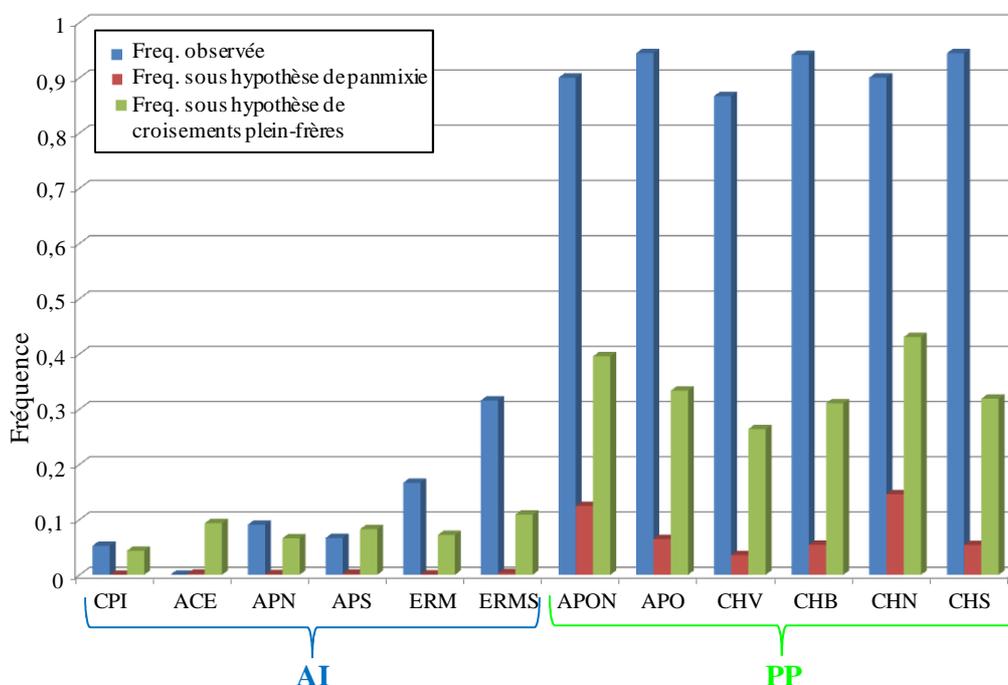


Figure 1 : Fréquence des génotypes multilocus répétés dans les populations AI et PP de la zone de contact Aceituno-Choros. Cette fréquence observée est comparée avec celle attendue sous l'hypothèse de panmixie et sous l'hypothèse de croisements pleins-frères.

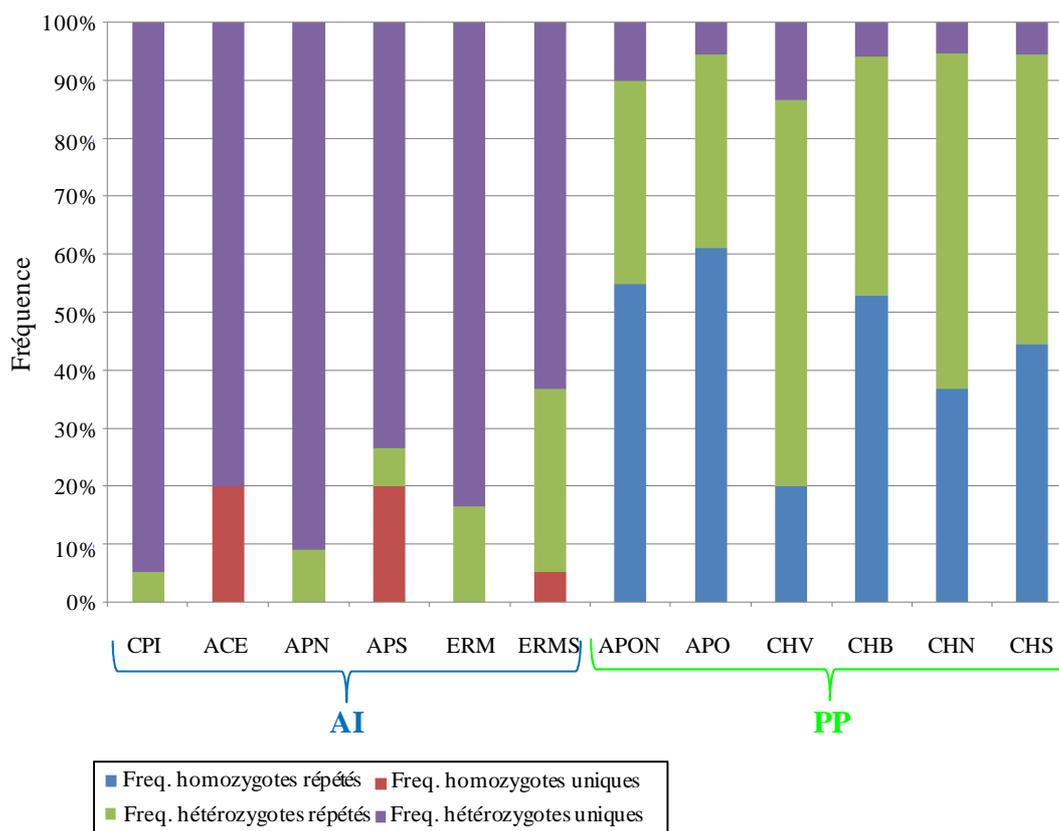


Figure 2 : Fréquence des différents types de génotypes dans chaque population AI et PP : homozygotes à tous les loci ou hétérozygotes pour au moins l'un des trois loci, génotype répété ou unique.

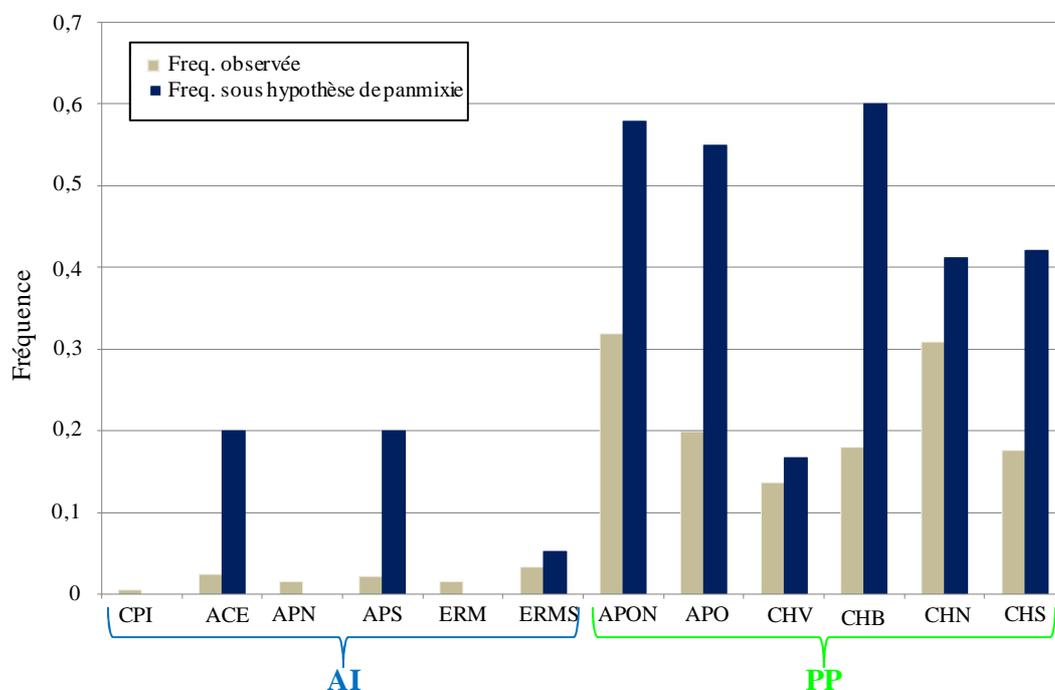


Figure 3 : Fréquence des génotypes homozygotes aux trois loci observés dans les populations AI et PP par rapport aux fréquences attendues sous l'hypothèse de panmixie.

Annexe 2.B.5-b : Analyses interpopulations.

Tableau 2 : Valeurs de l'estimateur de la statistique F_{ST} entre paires de populations et valeurs de p associées. Au-dessus de la diagonale : p , en-dessous de la diagonale : estimateur du F_{ST} . Les valeurs de p inférieures au seuil α fixé (0,05) après correction de Bonferroni sont indiquées en gras ($p < 0,00075$).

		Espèce AI						Espèce PP					
		CPI	ACE	APN	APS	ERM	ERMS	APON	APO	CHV	CHB	CHN	CHS
Espèce AI	CPI		0,36133	0,80371	0,28320	0,00684	<0,00001						
	ACE	0,01573		0,01758	0,28320	<0,00001							
	APN	-0,00370	0,05587		0,84961	0,02637	<0,00001						
	APS	0,01228	0,08704	-0,00646		0,21484	0,37891	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
	ERM	0,04293	0,11993	0,03466	0,01663		0,76953	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
	ERMS	0,07215	0,16961	0,06754	0,01009	-0,00395		<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
Espèce PP	APON	0,44815	0,50056	0,47372	0,50865	0,51060	0,54778		0,06445	0,00684	<0,00001	<0,00001	0,00586
	APO	0,44121	0,49672	0,46815	0,50288	0,50555	0,54452	0,06143		0,47852	0,10742	0,00781	0,63281
	CHV	0,35589	0,40001	0,38722	0,41542	0,42310	0,46466	0,09699	0,00549		0,38477	0,00586	0,34473
	CHB	0,41980	0,46879	0,44830	0,48105	0,48489	0,52502	0,16263	0,04681	0,00990		0,35156	0,18359
	CHN	0,45921	0,52381	0,48481	0,52104	0,52312	0,56103	0,25005	0,09710	0,07637	0,01145		0,00293
	CHS	0,43742	0,49120	0,46453	0,49888	0,50171	0,54072	0,09137	-0,00124	0,01055	0,03041	0,08474	

Tableau 3 : Valeurs de l'estimateur de la statistique R_{ST} entre paires de populations et valeurs de p associées. Au-dessus de la diagonale : p , en-dessous de la diagonale : R_{ST} . Les valeurs de p inférieures au seuil α fixé (0,05) après correction de Bonferroni sont indiquées en gras ($p < 0,00075$).

		Espèce AI						Espèce PP					
		CPI	ACE	APN	APS	ERM	ERMS	APON	APO	CHV	CHB	CHN	CHS
Espèce AI	CPI		0,89258	0,11816	0,08691	0,08203	0,13770	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
	ACE	-0,03758		0,03613	0,11133	0,05859	0,17676	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
	APN	0,04665	0,16216		0,28125	0,18555	0,14941	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
	APS	0,06071	0,09452	0,02173		0,95508	0,98828	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
	ERM	0,05799	0,10556	0,03795	-0,05550		0,70312	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
	ERMS	0,04164	0,05892	0,05369	-0,07406	-0,01468		<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
Espèce PP	APON	0,90929	0,94358	0,95287	0,96313	0,94985	0,94594		0,40820	0,19922	0,02246	0,16895	0,37891
	APO	0,90320	0,93730	0,94941	0,95931	0,94570	0,94164	0,00575		0,36621	0,09570	0,22656	0,78027
	CHV	0,90239	0,93599	0,94760	0,95874	0,94493	0,94051	0,03263	0,01237		0,01270	0,01270	0,24609
	CHB	0,89488	0,93111	0,94589	0,95576	0,94125	0,93691	0,15066	0,09395	0,19067		0,19434	0,09180
	CHN	0,90658	0,94127	0,95158	0,96165	0,94824	0,94426	0,03362	0,03391	0,14042	0,04075		0,25293
	CHS	0,90288	0,93722	0,94936	0,95927	0,94560	0,94153	0,00464	-0,02428	0,02514	0,07666	0,01836	

ANNEXES 2.C

(Chapitre 2, Partie C)

Annexe 2.C.1 : Protocole détaillé de l'expérience de réponse à la température des stades microscopiques des espèces AI et PP.

Annexe 2.C.2 : Carte de localisation des individus transplantés au sein de chaque site.

Annexe 2.C.3 : Calcul de la variable de croissance pour l'analyse de l'expérience de transplantation réciproque.

Annexe 2.C.4 : Analyses préliminaires de l'expérience de transplantation réciproque : tailles initiales.

Annexe 2.C.5 : Graphiques des taux de survie et de maturité après 3 et 4 mois d'expérience de transplantation réciproque.

Annexe 2.C.6 : Résultats des analyses statistiques de l'expérience de transplantation réciproque.

Annexe 2.C.7 : Analyse de la température de l'eau pendant la durée de l'expérience de transplantation réciproque.

ANNEXE 2.C.1

Protocole détaillé de l'expérience de réponse à la température des stades microscopiques des espèces AI et PP

Les données de l'expérience de réponse à la température apparaissent d'autant plus importantes que le régime de variation de température de l'eau semble distinct entre les sites habités par l'une ou l'autre des espèces cryptiques de *L. nigrescens*, y compris à petite échelle spatiale (zone de contact Aceituno-Choros) (voir données de l'expérience de transplantation réciproque, Chapitre 2.C). Seules les informations concernant la mise en place de cette expérience seront présentées ici, les analyses sont actuellement en cours. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec Valeria Opliger, pour son projet de thèse de doctorat, et avec l'aide technique de Paula Ayerdi.

a) Hypothèses testées et approche utilisée

L'expérience de transplantation pour des raisons techniques ne pouvait pas être réalisée sur les stades microscopiques, nous avons donc fait le choix d'étudier les effets d'un facteur environnemental particulier en conditions contrôlées. Comme évoqué dans l'Introduction générale et le Chapitre 2.C, les côtes chiliennes ne montrent pas de gradient prononcé de température moyenne de l'eau de mer, mais des différences de régimes de variation de température ont été observées (Castillo *et al.*, en prép.). Tandis qu'au sud des latitudes 30-31°S des variations de température à l'échelle synoptique (2-5 jours) sont observées, les températures au nord de cette limite sont beaucoup plus stables. **La température, et ses régimes de variation, semblaient donc un facteur environnemental intéressant à tester pour expliquer le maintien de la ségrégation géographique des espèces PP et AI. L'expérience de réponse à la température a donc consisté à tester la tolérance des stades microscopiques pour cinq conditions de températures : trois stables et deux variant à l'échelle synoptique.**

Les hypothèses testées sont :

- i. Les individus de l'espèce AI ont une meilleure valeur sélective que ceux de l'espèce PP dans des conditions de température variable, tandis que les individus de PP ont une meilleure valeur sélective que ceux de AI pour des températures élevées.
- ii. Il y a un gradient latitudinal de réponse à la température moyenne et aux variations de température.

b) Choix des sites

Huit sites ont été choisis pour réaliser cette expérience de tolérance à la température : 3 sites PP, 3 sites de l'aire de distribution continue de l'espèce AI et 2 sites AI isolés (ACE et COZ, Fig. 1). Les sites de IQ (Iquique, 20°10'S, espèce PP) et VAL (Valdivia, 39°45'S, espèce AI) ont été choisis comme témoin pour chacune des espèces : ils permettent de faire des comparaisons intraspécifiques et de maximiser la variation intraspécifique de réponse à la température éventuellement liée à la latitude. Ces sites sont situés à environ 1300km au nord et au sud, respectivement, de la Région de transition (29-30°S).

c) Réalisation de l'expérience

Dans chaque site, 15 individus matures ont été collectés et regroupés en trois séries de cinq individus. Pour chaque individu, un fragment de fronde non fertile a été conservé en silica gel pour analyse moléculaire. Les sores ont été rincés à l'eau douce et découpés en cinq portions de 1cm de diamètre. La sporulation a été réalisée en mettant cinq demi-portions de sores provenant des cinq individus d'une même série dans un même tube de 50 mL contenant un porte-objet et de l'eau de mer filtrée. Ce même traitement a été réalisé dix fois pour chaque série de cinq individus. Les tubes ont été conservés à l'obscurité et au frais jusqu'à arrivée au laboratoire (15h de transport) et mise à température d'expérience. Chacune des cinq conditions de température a consisté en deux répliques (deux tubes avec les spores issues des mêmes cinq individus), l'observation de chaque réplique ayant été réalisée par Valeria Oppliger et Paula Ayerdi, respectivement. L'eau de mer des tubes a été remplacée par de l'eau de mer enrichie à l'arrivée au laboratoire, puis tous les cinq jours. L'expérience a été menée sur 25 jours.

Cinq conditions de températures ont été définies : (i) des conditions de température fixe : T1 = 10°C, T3 = 15°C et T5 = 20°C ; (ii) des conditions de température variant tous les trois jours (sporulation à la température basse) : T2 = 10-15°C et T4 = 15-20°C.

Les observations ont consisté à déterminer pour trois champs visuels par porte-objet le nombre de spores totales et de spores germées, le sex-ratio, la proportion de gamétophytes femelles matures et de gamétophytes femelles fécondés.

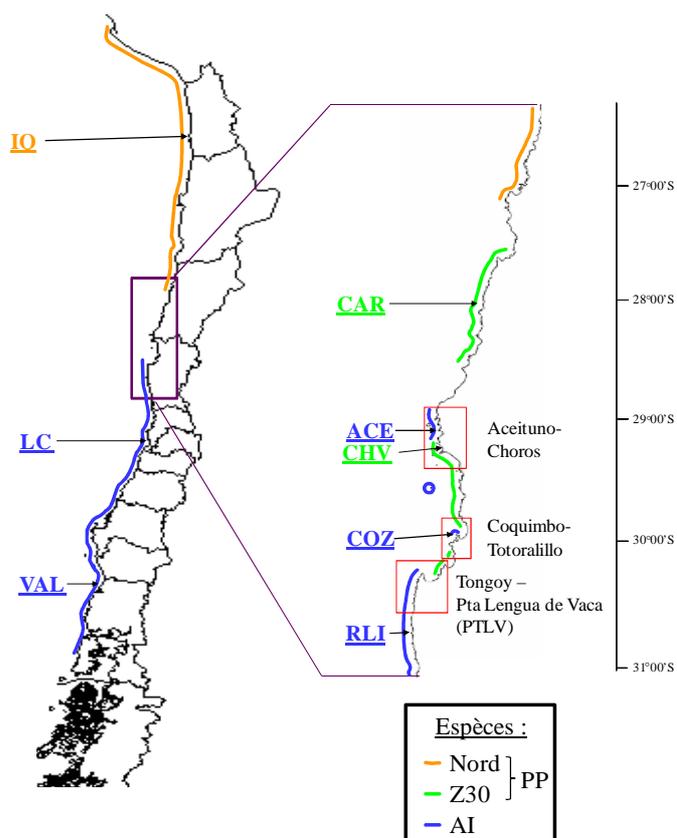
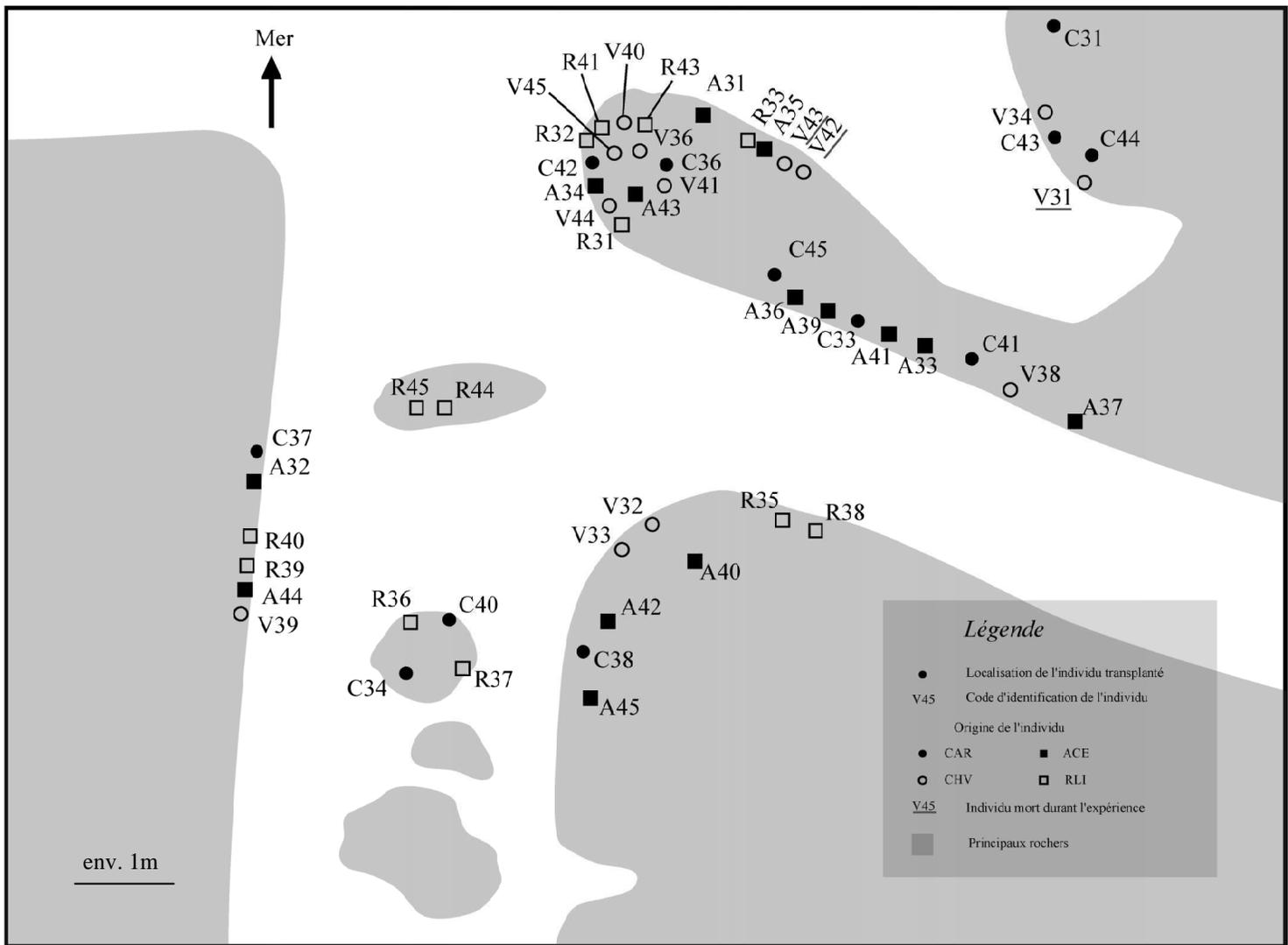


Figure 1 : Localisation des sites de l'expérience de réponse à la température et à ses régimes de fluctuation. Les aires de distribution des espèces sont basées sur les résultats obtenus avec le marqueur mitochondrial (Chapitres 1 et 2.B).

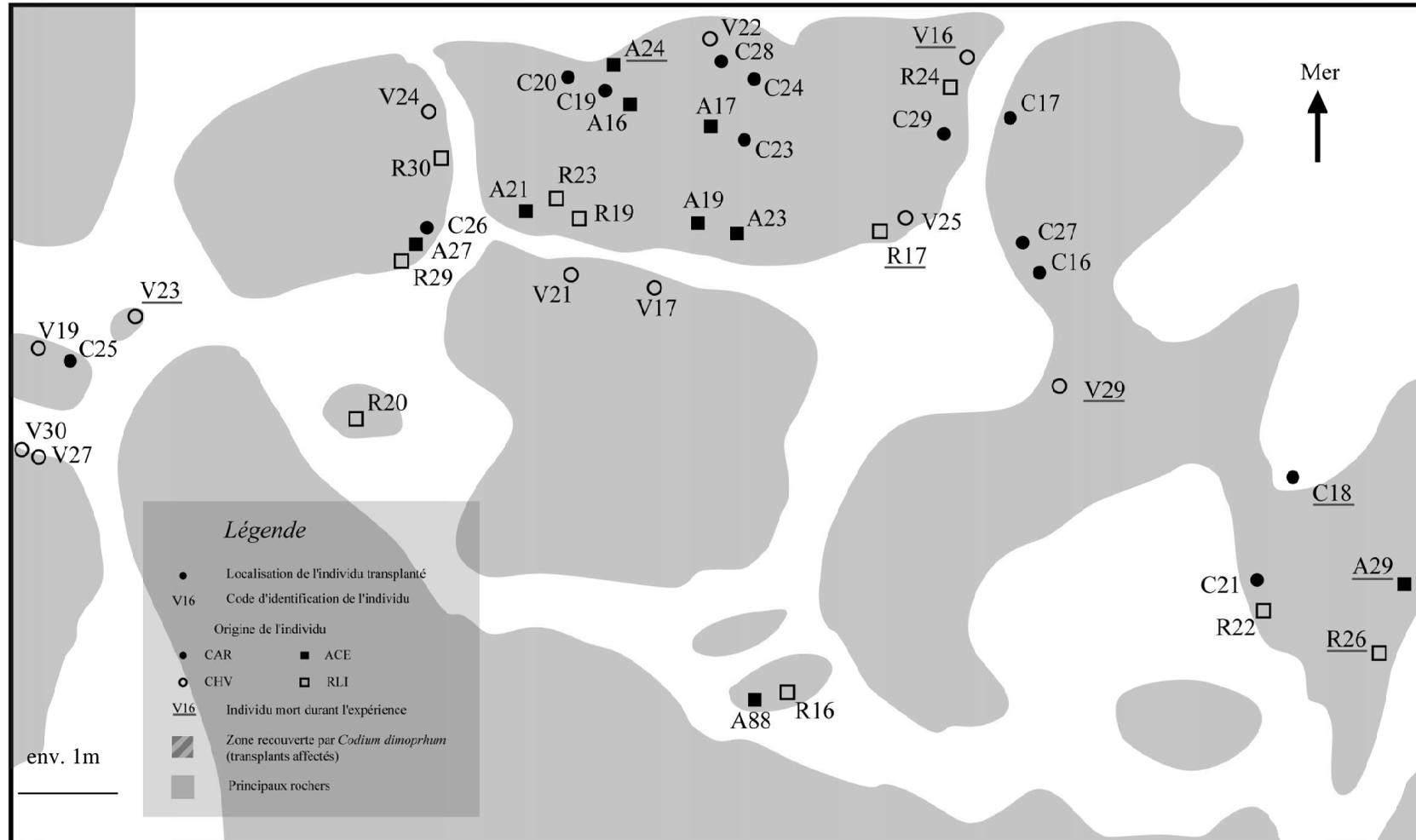
ANNEXE 2.C.2

Cartes de localisation des individus transplantés au sein de chaque site

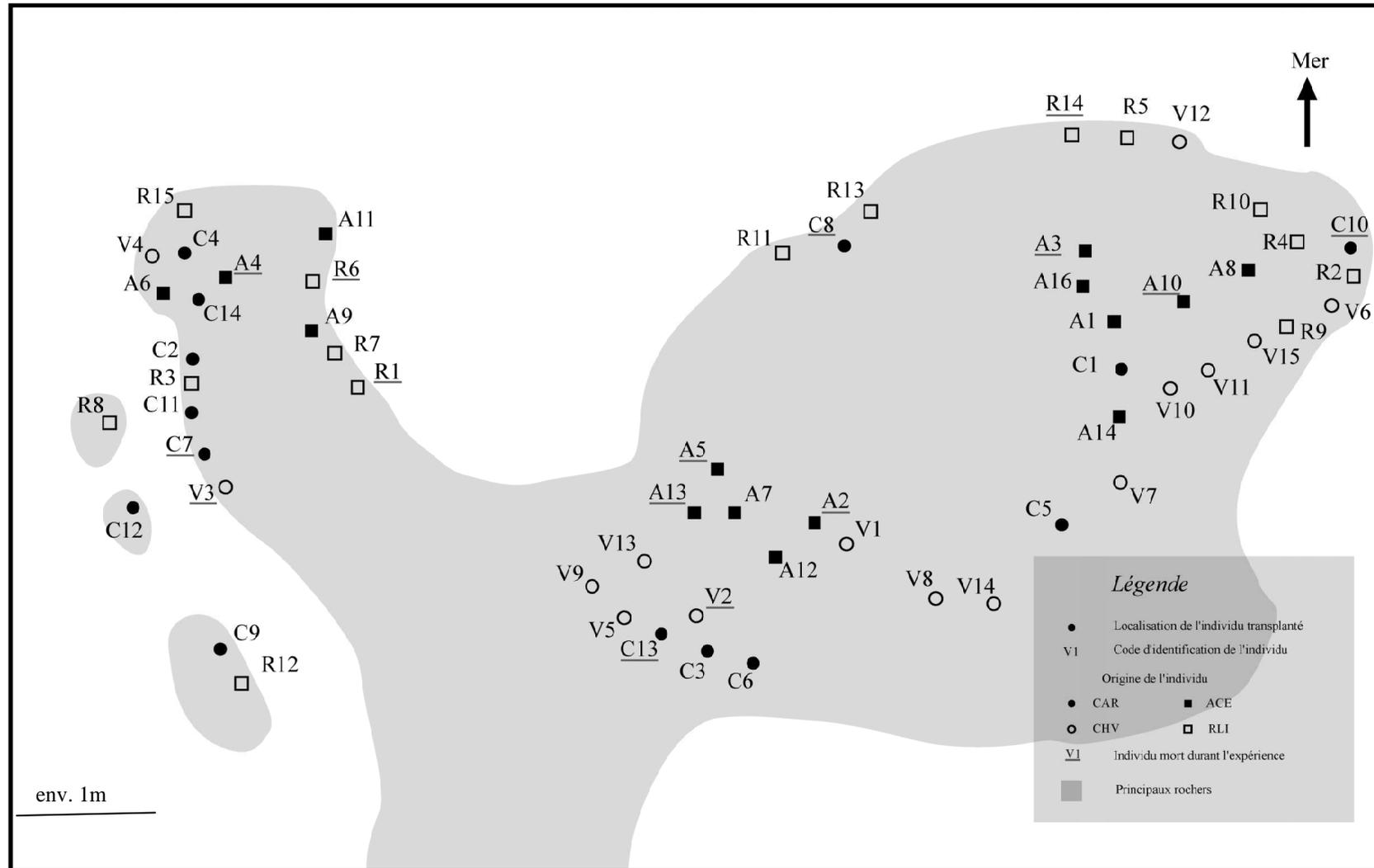
ANNEXE 2.C.2a Site Carrizal Bajo (CAR). La population naturelle du site est de l'espèce PP de *L. nigrescens*. Site localisé à 28°04'S.



ANNEXE 2.C.2b Site Aceituno (ACE). La population naturelle du site est de l'espèce AI de *L. nigrescens*.
Site localisé à 29°03'S.



ANNEXE 2.C.2c Site Choros-Ventana (CHV). La population naturelle du site est de l'espèce PP de *L. nigrescens*.
 Site localisé à 29°12'S.



ANNEXE 2.C.3

Calcul de la variable de croissance pour l'analyse de l'expérience de transplantation réciproque

Afin de détecter des différences de croissance entre individus en fonction des sites d'origine et de destination, nous avons calculé la pente de croissance au cours du temps de chaque individu. Les étapes ont été les suivantes :

1. Réalisation du graphique représentant la longueur de l'individu en fonction du temps en incluant l'ensemble des mesures (mesure initiale jusqu'à mesure à 5 mois).
2. Réalisation du graphique représentant la longueur de l'individu en fonction du temps, en excluant la mesure initiale (mesure à 1 mois jusqu'à mesure à 5 mois).
3. Réalisation d'une régression linéaire pour chaque jeu de données (mesure initiale incluse ou non), pour déterminer l'ajustement des modèles aux données.
4. Le meilleur modèle (valeur de R^2 la plus importante) est choisi pour estimer la pente de la droite de croissance. Les tests ont été réalisés en utilisant cette valeur (après transformation en rangs).

Exemple de courbes obtenues :

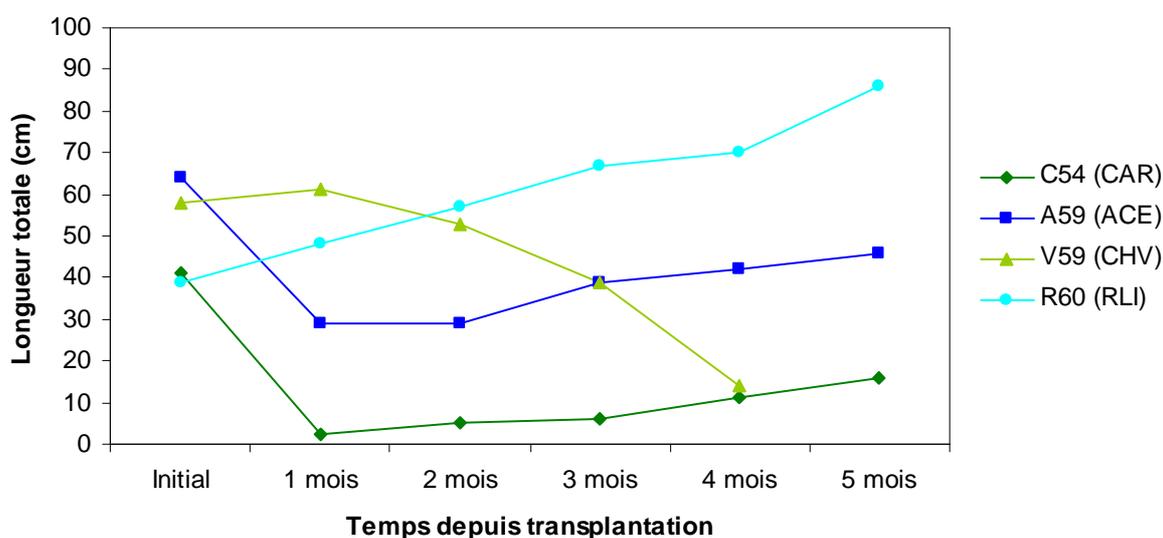


Figure 1 : Courbes de croissance obtenues pour quatre individus d'origines différentes transplantés dans le site RLI. L'individu V59 est mort entre les observations à 4 et 5 mois. Pour A59 et C54, la croissance est d'abord négative entre l'installation et l'observation à 1 mois, puis devient positive ensuite, suggérant une période d'acclimatation. La pente de croissance, utilisée ensuite pour les tests a été utilisée en incluant la taille initiale pour l'individu R60, en l'excluant pour les trois autres individus.

ANNEXE 2.C.4

Analyses préliminaires de l'expérience de transplantation réciproque :
tailles initiales**Annexe 2.C.4a : Comparaison des tailles initiales entre sites d'origine et entre espèces (individus de janvier).**

Analyses réalisées sur le jeu de donnée des tailles initiales des individus prélevés en janvier, qu'ils aient été ou non inclus dans les analyses de l'expérience de transplantation proprement dite (60 individus par combinaison site d'origine x site de destination).

Tests réalisés : tests de Kruskal-Wallis réalisés sur les variables (longueur et diamètre du disque) après transformation en rangs. *d.l.* : degrés de liberté. Valeurs de $p < 0,05$ indiquées en gras.

Analyse 1 : Comparaison des longueurs des individus prélevés en janvier entre sites d'origine. Test global des différences entre sites d'origine : $d.l.=3$, $H=76.01524$, $p < 0.0001$. Comparaison entre paires de sites : valeurs de z' (en-dessous de la diagonale) et valeurs de p (au-dessus de la diagonale) :

	CAR	ACE	CHV	RLI
CAR		<0,000001	0,000001	<0,000001
ACE	7,475746		0,183258	1,000000
CHV	5,312769	2,162976		0,131264
RLI	7,605261	0,129516	2,292492	

Analyse 2 : Comparaison des diamètres de disque des individus prélevés en janvier entre sites d'origine. Test global des différences entre sites d'origine : $d.l.=3$, $H=52.2611$, $p < 0.0001$. Comparaison entre paires de sites : valeurs de z' (en-dessous de la diagonale) et valeurs de p (au-dessus de la diagonale) :

	CAR	ACE	CHV	RLI
CAR		<0,000001	0,025063	<0,000001
ACE	5,885399		0,015120	1,000000
CHV	2,864464	3,020935		0,003344
RLI	6,316022	0,430623	3,451558	

Analyse 3 : Comparaison des longueurs d'individus et des diamètres de disque des individus prélevés en janvier entre lignées.

Variable	<i>d.l.</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
Longueur	1	47,74925	<0,0001
Diamètre du disque	1	43,7874	<0,0001

Annexe 2.C.4b : Analyse des tailles initiales des individus inclus dans l'analyse de l'expérience de transplantation proprement dite.

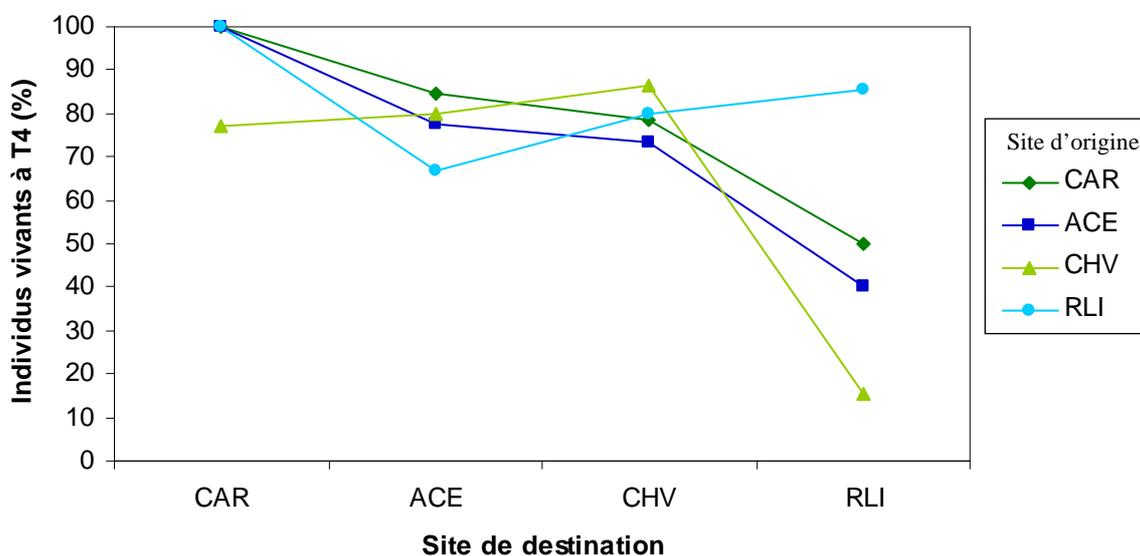
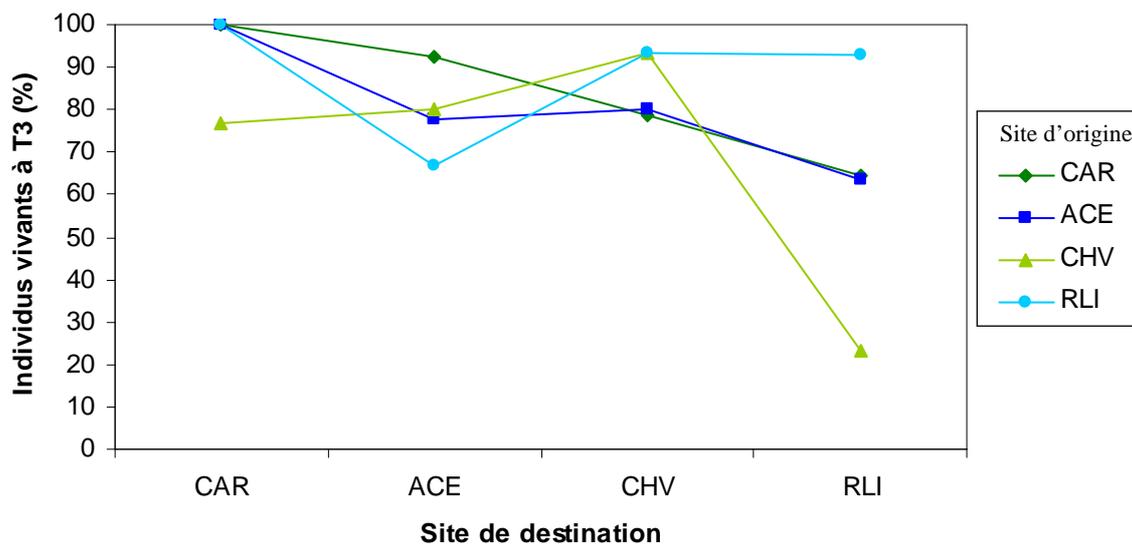
Objectif : vérifier l'absence de différences entre sites de destination pour les tailles initiales des individus transplantés issus de chacun des quatre sites d'origine.

Tests réalisés : tests de Kruskal-Wallis réalisés sur les variables (longueur et diamètre du disque) après transformation en rangs. Variable explicative = site de destination. *d.l.* : degrés de liberté. Valeurs de $p < 0,05$ indiquées en gras.

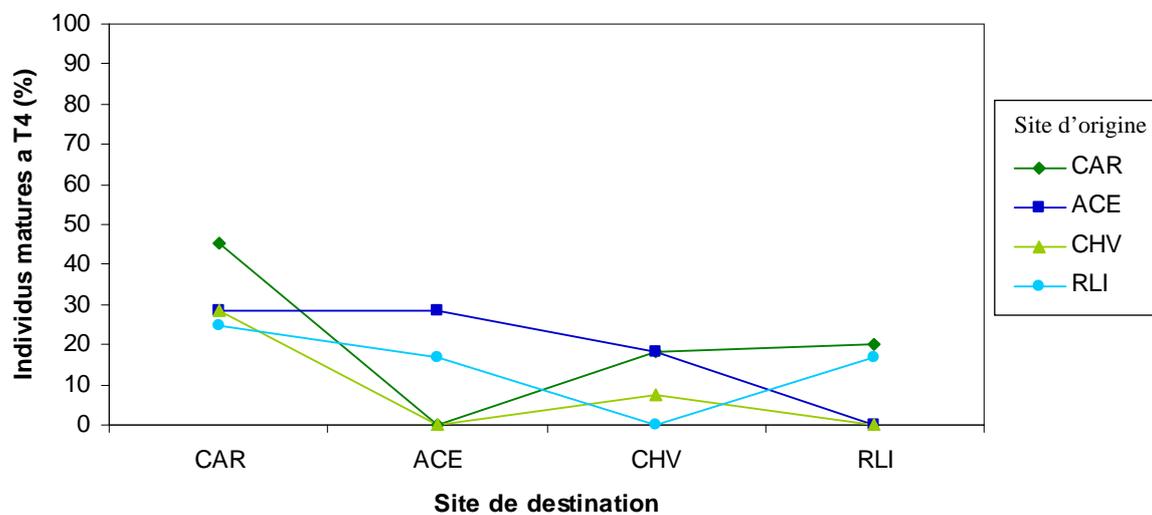
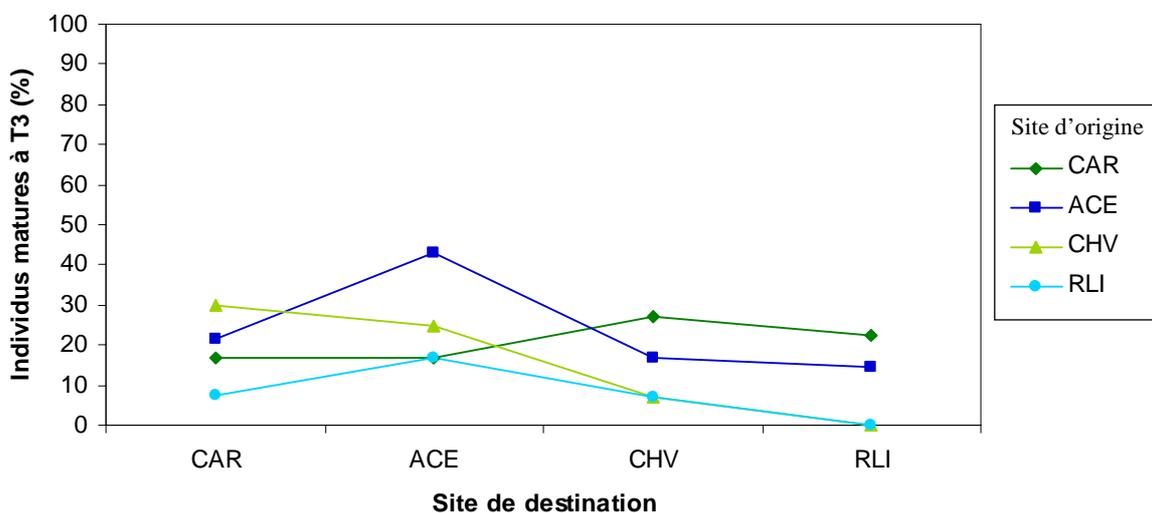
Site d'origine	Variable	<i>d.l.</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
CAR	Longueur	3	4.390608	0.2223
ACE	Longueur	3	3.116958	0.3277
CHV	Longueur	3	2.741394	0.4332
RLI	Longueur	3	1.954695	0.5819
CAR	Diamètre du disque	3	4.162624	0.2444
ACE	Diamètre du disque	3	10.96710	0.0119
CHV	Diamètre du disque	3	7.227680	0.0650
RLI	Diamètre du disque	3	2.41138	0.4816

ANNEXE 2.C.5

Graphiques des taux de survie et de maturité après 3 et 4 mois d'expérience de transplantation réciproque



Annexe 2.C.5a : Taux de survie des transplants A. après 3 mois (T3) et B. après 4 mois (T4) d'expérience pour chaque combinaison de site d'origine et site de destination.



Annexe 2.C.5b : Taux de maturité des transplants A. après 3 mois (T3) et B. après 4 mois (T4) d'expérience pour chaque combinaison de site d'origine et site de destination.

ANNEXE 2.C.6

Résultats des analyses statistiques
de l'expérience de transplantation réciproqueLégende commune à l'ensemble des tableaux de cette annexe

Les tests concernant les variables survie et maturité ont été réalisés par analyse log-linéaire, ceux des données de croissance (croissance en longueur) par des tests de Kruskal-Wallis. En gras sont indiquées les valeurs de p inférieures au seuil α de 0,05. *Hyp.* : numéro de l'hypothèse testée, *d.l.* : nombre de degrés de liberté, *ML Chi-carré* : valeur de la statistique ML Chi-carré (ou statistique-G, analyse log-linéaire), *H (KW)* : valeur de la statistique *H* (tests de Kruskal-Wallis). ND : test concernant la croissance non réalisés, soit pour des raisons statistiques (absence de tests non-paramétriques de l'interaction entre deux variables de réponse), soit parce que la croissance a été calculée sur l'ensemble de l'expérience (5 mois).

Annexe 2.C.6a : Test des effets des destinations (hypothèses 1) sur les variables mesurées pour les données après 5, 4 et 3 mois après transplantation.

Temps Hypothèse	Destinations comparées	Survie			Maturité			Croissance (en longueur)		
		<i>d.l.</i>	<i>ML Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>H (KW)</i>	<i>p</i>
Temps 5 mois										
H1a	Sites	3	31,77031	0,000001	3	27,01989	0,000006	3	62,37424	0,0000
H1b	Habitats	1	12,66780	0,000372	1	9,57430	0,001973	1	32,77993	0,0000
H1c	Régions latitudinales	2	31,37852	0,000000	2	27,24074	0,000001	2	62,2132	0,0000
Temps 4 mois										
H1a	Sites	3	30,14890	0,000001	3	8,43357	0,037852	ND	ND	ND
H1b	Habitats	1	16,85383	0,000040	1	2,45963	0,116807	ND	ND	ND
H1c	Régions latitudinales	2	30,22439	0,000000	2	8,82863	0,012103	ND	ND	ND
Temps 3 mois										
H1a	Sites	3	18,70691	0,000314	3	2,69298	0,441422	ND	ND	ND
H1b	Habitats	1	13,32030	0,000263	1	0,00996	0,920521	ND	ND	ND
H1c	Régions latitudinales	2	18,1950	0,000112	2	1,25330	0,534376	ND	ND	ND

Annexe 2.C.6b : Test de la divergence interspécifique (hypothèses 2a) en fonction des sites et du temps.

Temps Site de destination	Survie			Maturité			Croissance (en longueur)		
	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>
Temps 5 mois									
CAR	1	3,09766	0,078405	1	2,731643	0,098378	1	0,19183	0,6614
ACE	1	0,10451	0,746480	1	0,57628	0,447773	1	1,46557	0,2260
CHV	1	1,94466	0,163163	1	0,16222	0,687117	1	0,97149	0,3243
RLI	1	12,97962	0,000315	1	0,84622	0,357625	1	22,07151	<0,0001
Temps 4 mois									
CAR	1	3,09766	0,078405	1	0,689661	0,406280	ND	ND	ND
ACE	1	0,61446	0,433115	1	4,00629	0,045331	ND	ND	ND
CHV	1	0,31336	0,575627	1	0,14704	0,701383	ND	ND	ND
RLI	1	11,00336	0,000909	1	0,13453	0,713784	ND	ND	ND
Temps 3 mois									
CAR	1	2,95776	0,085466	1	0,49039	0,483752	ND	ND	ND
ACE	1	1,31700	0,251131	1	0,53375	0,465034	ND	ND	ND
CHV	1	0,00284	0,957516	1	0,19538	0,658479	ND	ND	ND
RLI	1	6,845268	0,008888	1	1,09459	0,295457	ND	ND	ND

Annexe 2.C.6c : Test de l'adaptation liée au site (hypothèse 2b) en fonction des sites et du temps.

Temps Site de destination	Survie			Maturité			Croissance (en longueur)		
	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>
Temps 5 mois									
CAR	1	0,28728	0,591970	1	3,19380	0,073918	1	2,52850	0,1118
ACE	1	0,09694	0,755538	1	2,08058	0,149184	1	3,48177	0,0620
CHV	1	1,19180	0,274967	1	0,85786	0,354339	1	7,71097	0,0055
RLI	1	12,12057	0,000499	1	1,80384	0,179250	1	22,12682	<0,0001
Temps 4 mois									
CAR	1	0,28728	0,591970	1	1,25120	0,263323	ND	ND	ND
ACE	1	0,02196	0,882205	1	3,09023	0,078764	ND	ND	ND
CHV	1	0,43932	0,507453	1	0,04373	0,834349	ND	ND	ND
RLI	1	10,95638	0,000933	1	0,38976	0,532426	ND	ND	ND
Temps 3 mois									
CAR	1	0,36101	0,547947	1	0,00158	0,968281	ND	ND	ND
ACE	1	0,12655	0,722037	1	1,69986	0,192306	ND	ND	ND
CHV	1	0,54058	0,462193	1	0,45386	0,500509	ND	ND	ND
RLI	1	8,35286	0,003851	1	1,76713	0,183738	ND	ND	ND

Annexe 2.C.6d : Test de l'adaptation liée à la latitude (hypothèse 2c) pour la Région Centre en fonction du temps. Concernant les régions Nord et Sud, l'adaptation liée à la latitude ne peut pas être distinguée de l'adaptation liée au site, du fait de la présence d'un seul site par région.

Temps	Survie			Maturité			Croissance (en longueur)		
	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>H (KW)</i>	<i>p</i>
5 mois	1	0,57932	0,446581	1	0,00785	0,929422	1	0,87210	0,3504
4 mois	1	0,01875	0,891079	1	0,50452	0,477520	ND	ND	ND
3 mois	1	0,00785	0,929422	1	0,09862	0,753491	ND	ND	ND

Annexe 2.C.6e : Test de la différence entre sites de destination au sein de l'habitat PP (sites CAR et CHV) et au sein de l'habitat AI (sites ACE et RLI). L'effet site de destination sur les variables d'intérêt est testé seul (effet principal) et en interaction avec le site d'origine à l'aide de l'analyse log-linéaire. L'interaction n'a pas pu être testée pour la croissance du fait des limitations des tests non-paramétriques.

Variable	Survie						Maturité						Croissance (en longueur)		
	Effet principal			Effet interaction			Effet principal			Effet interaction			Effet principal		
Temps	<i>d.l.</i>	<i>ML</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>H (KW)</i>	<i>p</i>
Habitat		<i>Chi-carré</i>			<i>Chi-carré</i>			<i>Chi-carré</i>			<i>Chi-carré</i>				
Temps 5 mois															
Habitat PP	3	6,49310	0,089935	1	0,00430	0,947660	1	17,08465	0,000036	3	2,13497	0,544872	3	7,116615	0,0683
Habitat AI	3	7,22402	0,065090	1	11,00104	0,000911	1	0,57928	0,446594	3	2,12710	0,546450	3	15,309530	0,0016
Temps 4 mois															
Habitat PP	3	5,09555	0,164933	1	0,00010	0,991729	1	0,38493	0,534978	3	1,11048	0,774545	ND	ND	ND
Habitat AI	3	9,02455	0,028966	1	8,71008	0,003165	1	2,29069	0,130152	3	3,30264	0,347275	ND	ND	ND
Temps 3 mois															
Habitat PP	3	5,49161	0,139141	1	1,75394	0,185382	1	6,08393	0,013642	3	2,04937	0,562223	ND	ND	ND
Habitat AI	3	8,86031	0,031207	1	3,85653	0,049553	1	0,08572	0,769693	3	1,93929	0,585102	ND	ND	ND

Annexe 2.C.6f : Test des différences entre sites de destination à l'intérieur de la région Centre et entre régions latitudinales : test de l'effet site de destination seul (effet principal) ou en interaction avec le site d'origine sur les variables survie et maturité (hypothèse 3b).

Variable	Survie						Maturité					
	Effet principal			Effet interaction			Effet principal			Effet interaction		
Effet testé	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>	<i>d.l.</i>	<i>ML</i> <i>Chi-carré</i>	<i>p</i>
Temps												
Région de destination ou groupe de régions												
Temps 5 mois												
Centre	7	2,82034	0,901110	3	1,98147	0,576262	7	4,54792	0,714940	3	1,34542	0,718378
Nord + Centre	11	10,14006	0,517834	6	6,96144	0,324428	11	23,84387	0,013408	6	5,35411	0,499262
Centre + Sud	11	18,83650	0,064092	6	16,51312	0,011249	11	5,34001	0,913589	6	4,01270	0,674958
Nord + Sud	7	50,37838	0,000000	3	0,76657	0,857446	7	22,63707	0,001971	3	3,28259	0,350073
Temps 4 mois												
Centre	7	1,69247	0,974890	3	0,80832	0,847477	7	3,39095	0,846637	3	3,41819	0,331529
Nord + Centre	11	7,13063	0,788408	6	6,11156	0,410810	11	11,66703	0,389184	6	5,41778	0,491449
Centre + Sud	11	17,95118	0,082720	6	12,81914	0,046000	11	8,74468	0,645447	6	5,68833	0,458993
Nord + Sud	7	45,06282	0,000000	3	0,88525	0,828986	7	6,57311	0,474637	3	0,55803	0,905969
Temps 3 mois												
Centre	7	2,13894	0,951751	3	3,56543	0,312375	7	7,04609	0,424097	3	2,21827	0,528358
Nord + Centre	11	5,21901	0,920098	6	8,64561	0,194511	11	8,13011	0,701604	6	3,47174	0,747725
Centre + Sud	11	14,60755	0,201178	6	13,33792	0,037973	11	13,17457	0,282069	6	3,19106	0,784513
Nord + Sud	7	33,81496	0,000019	3	0,64178	0,886806	7	6,89488	0,439907	3	1,02167	0,796009

Annexe 2.C.6g : Comparaisons multiples entre sites de destination pour la croissance des individus toutes origines confondues, montrant que les sites ACE et CHV peuvent être regroupés en un habitat Centre (hypothèse 3b). Les valeurs de la statistique z' sont indiquées en-dessous de la diagonale, les valeurs de p associées au-dessus de la diagonale.

	CAR	ACE	CHV	RLI
CAR		0,000013	0,000015	0,000000
ACE	4,733676		1,000000	0,037576
CHV	4,703186	0,401260		0,004265
RLI	7,815462	2,733702	3,385389	

Annexe 2.C.6h : Comparaisons multiples entre sites d'origines pour la croissance (en longueur) dans le site RLI (site de destination). Les valeurs de la statistique z' sont indiquées en-dessous de la diagonale, les valeurs de p associées au-dessus de la diagonale.

	CAR	ACE	CHV	RLI
CAR		0,149239	1,000000	0,000010
ACE	2,243366		0,571058	0,149445
CHV	0,571847	1,668703		0,000226
RLI	4,782306	2,242835	4,121062	

ANNEXE 2.C.7

Analyse de la température de l'eau pendant la durée de l'expérience de transplantation réciproque (janvier-août 2008)

Tableau 1 : Distances et coefficients de corrélation entre sites. Pour chaque paire de site, le coefficient de corrélation de Pearson est indiqué en-dessous de la diagonale (valeurs toutes significativement différentes de zéro, $p < 0,001$) et la distance géographique en kilomètres au-dessus de la diagonale (distance en suivant les principales lignes du trait de côte). Abréviation des sites et espèces cryptiques de *L. nigrescens* présentes dans ces sites : voir Chapitre 1, sauf HUEN : Huenteláucen, POSC : Puerto Oscuro, QUINTAY : Quintay (* : espèce supposée d'après la localisation géographique : ici espèce AI). La couleur indique l'importance du coefficient de corrélation : rouge : $\geq 0,9$; orange foncé : $\geq 0,8$ et $< 0,9$; orange clair : $\geq 0,7$ et $< 0,8$; jaune : $\geq 0,6$ et $< 0,7$, blanc : $< 0,6$. Données de ECIM, PUCCh.

Site	HCO	ACE	CHV	TBL	ARY	GUANA	PTAL	POSC	HUEN	LM	MTM	CURAM	QUINTAY	QUIS	LC	PICHI
Latitude	28°27'S	29°03'S	29°12'S	29°28'S	29°41'S	30°11'S	30°55'S	31°37'S	31°25'S	32°14'S	32°57'S	33°06'S	33°11'S	33°23'S	33°30'S	34°23'S
Espèce	PP	AI	PP	PP	PP	PP	AI	AI*	AI*	AI						
HCO		86	107	143	169	245	350	434	410	511	607	639	652	679	694	810
ACE	0,64826		21	57	83	159	264	348	324	425	521	553	566	593	608	724
CHV	0,91789	0,66028		36	62	138	243	327	303	404	500	532	545	572	587	703
TBL	0,94082	0,66148	0,93849		26	102	207	291	267	368	464	496	509	536	551	667
ARY	0,93483	0,64968	0,91676	0,97010		76	181	265	241	342	438	470	483	510	525	641
GUANA	0,93059	0,67831	0,91602	0,94495	0,93533		105	189	165	266	362	394	407	434	449	565
PTAL	0,66902	0,45540	0,70585	0,63636	0,64188	0,61806		84	60	161	257	289	302	329	344	460
POSC	0,66249	0,49684	0,71023	0,63332	0,63770	0,61488	0,87697		24	77	173	205	218	245	260	376
HUEN	0,85588	0,59423	0,90333	0,85474	0,82851	0,87139	0,67953	0,71043		101	197	229	242	269	284	400
LM	0,80748	0,59934	0,86670	0,82419	0,81047	0,84980	0,71069	0,67902	0,89064		96	128	141	168	183	299
MTM	0,80476	0,54416	0,83695	0,79775	0,80999	0,82375	0,80554	0,76914	0,84106	0,88376		32	45	72	87	203
CURAM	0,65646	0,48172	0,72130	0,65664	0,67239	0,68939	0,84209	0,77753	0,73760	0,82016	0,88788		13	40	55	171
QUINTAY	0,69062	0,54218	0,74270	0,69448	0,70157	0,69878	0,82946	0,79823	0,76654	0,84166	0,87880	0,93245		27	42	158
QUIS	0,79021	0,62246	0,82067	0,79982	0,80689	0,83180	0,78782	0,76397	0,84122	0,89698	0,90684	0,90208	0,94489		15	131
LC	0,82709	0,60879	0,88240	0,83627	0,83240	0,86931	0,75592	0,74721	0,89410	0,91071	0,89308	0,82964	0,86848	0,93657		116
PICHI	0,76336	0,48153	0,79009	0,73107	0,74701	0,75793	0,85090	0,81967	0,82138	0,80298	0,87310	0,82855	0,87026	0,89918	0,90001	

ANNEXES 3

ARTICLES

ANNEXES 3.1

Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: vicariance or parapatry?

F. Tellier, A.P. Meynard, J.A. Correa, S. Faugeron et M. Valero

Article accepté dans la revue *Molecular Phylogenetics and Evolution*

Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: vicariance or parapatry?

Florence Tellier^{a,b,c}, Andrés P. Meynard^{a,b,c}, Juan A. Correa^c, Sylvain Faugeron^{c,*} and Myriam Valero^{a,b}

^a UPMC Université Paris VI, UMR 7144, Equipe Evolution et Génétique des Populations Marines, LIA “DIAMS”, Station Biologique de Roscoff, B.P. 74, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France

^b CNRS, UMR 7144, Equipe Evolution et Génétique des Populations Marines, LIA “DIAMS”, Station Biologique de Roscoff, B.P. 74, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France

^c Departamento de Ecología and Center for Advanced Studies in Ecology and Biodiversity, LIA “DIAMS”, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile

* Corresponding author: Sylvain Faugeron,
Departamento de Ecología and Center for Advanced Studies in Ecology and Biodiversity,
LIA “DIAMS”, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile,
Casilla 114-D, Santiago, Chile

Phone number: 56-23 54 26 47

Fax number: 56-23 54 26 21

email: sfaugeron@bio.puc.cl

Abstract

Phylogeographic studies are lacking in the Southern Hemisphere, and in particular in the southeastern Pacific. To infer on the possible scenario for the debated biogeographic transition zone located at 30-33°S along the Chilean coast, we investigated whether there is a concordance between the phylogeographic pattern and the biogeographic transition in the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* whose distribution is continuous across this transition zone. Using a combination of four markers located in the three genomic compartments (chloroplast, mitochondria and nucleus), we demonstrated the presence of two main divergent lineages, possibly cryptic species. There was an exact match of the phylogeographic break with the 30°S biogeographic transition zone, suggesting a common origin. The combined information given by the multilocus approach and by the population analysis suggested the occurrence of a budding speciation, with a northward range expansion that likely followed the establishment of the Humboldt Current System.

Keywords: coastal biogeographic transition, kelp, phylogeography, south-east Pacific, budding speciation, ITS, RuBisCo spacer, atp8/trnS

1. Introduction

In the current context of global change, it has become of primary interest to understand the processes affecting the species' range as well as the factors influencing the speciation processes. The distribution of species is the result of both historical and contemporary processes that often lead to patterns of distribution similar among species separated by biogeographic transition zones. The role of demographic history versus selection for creating these patterns has always puzzled evolutionists and the debate about sympatric and allopatric speciation remains controversial (Bolnick and Fitzpatrick, 2007; Fitzpatrick et al., 2008). Phylogeography, the study of the geographic distribution of gene lineages within species, allows understanding the evolution of diversity and in particular, testing for the congruence between patterns of geographic boundaries, such as a biogeographic transition zone, and genetic discontinuities for species whose distribution cross those transition zones (Avice, 2000). Theoretical expectations are, however, not straightforwardly met by genetic data because genetic discontinuities can arise from a number of scenarios that include variable levels of selection, drift and gene flow. For instance, for species showing restricted dispersal capacities, local genetic drift can promote the emergence of highly differentiated clades that are geographically separated even in the absence of any physical or ecological barrier to dispersal (Irwin, 2002). In addition, the recent work of Hallatschek et al. (2007) proved experimentally that the neutral process of genetic drift combined with demographic expansion can also lead to a strong spatial structure of genetic diversity. Consideration of the stochastic nature of genetic processes through the implementation of the coalescent theory and the development of statistical phylogeography (Knowles, 2004) allows in-depth analyses and test

of the possible scenarios that can be inferred from a particular set of genetic patterns of distribution.

Coastal marine biogeographic transition zones have been described in all oceans and the concordance with phylogeographic breaks have been shown for a great variety of organisms (e.g. north-eastern American coast: Avise, 2000; north-western American coast: Dawson, 2001; south-eastern Australian coast: Dawson, 2005; northern Atlantic: Maggs et al., 2008). These genetic discontinuities generally result from cyclical variations in sea level and surface temperatures that occurred during the Pleistocene glacial episodes which caused extended and important changes in coastal topology, creating effective barriers to dispersal. These past physical barriers resulted in vicariant processes that are easily detectable by phylogeographic analyses, in particular for species characterized by short distance dispersal. Other known biogeographic transitions are associated with oceanographic conditions that create present day barrier to dispersal such as Point Conception along the north-western American coast (Wares et al., 2001) or South Africa (von der Heyden et al., 2008).

Along the Chilean coast (18°S – 56°S), three biogeographic regions are recognized (Camus, 2001; Thiel et al., 2007): (1) the Peruvian Province (PP) includes warm-temperate biota and ranges from Peru to 30°S, (2) the Magellanic Province (MP) with a sub-Antarctic cold-temperate biota extending from 40-42°S to 56°S, and (3) the Intermediate Area (IA), made of mixed components of the two former Provinces, extends from 30°S to 40-42°S. The significance of the 30°S transition zone is, however, still controversial as it is not observed for all taxa and its geographic location is less clear (between 30-33°S) and varies depending on the authors and the taxa (reviewed by Camus, 2001 and Thiel et al., 2007). One of the unanswered questions regarding the 30°S biogeographic transition is whether it is the result of current ecological conditions (Navarrete et al., 2005; Broitman et al., 2001) or has an ancient origin, linked to either major ecological changes or to some physical barriers that no longer

exist. Present day coastal oceanographic features are likely to effectively limit dispersal around 30°S, as it has been shown for Cape Blanco, Oregon (Connolly et al., 2001), a region affected by similar shifts in upwelling regimes, favoring strong reduction in recruitment and genetic clines in invertebrate species (Sotka et al., 2004). Such ecological limitations to dispersal are likely to contribute to the maintenance of the biogeographic transition. However, a vast number of species have a distribution that crosses 30°S without any apparent change in density (Broitman et al., 2001). This has been interpreted as a consequence of an inefficient ecological transition, i.e. it allows phenotypically plastic species or those having certain life history traits to survive and reproduce in both biogeographic regions (Camus, 2001; Thiel et al., 2007). Indeed, it has been shown for the gastropod *Concholepas concholepas*, a species present from Cape Horn to Northern Peru and characterized by a high dispersal potential, that the 30°S region does not represent any effective barrier to dispersal neither in the present nor in the past, as indicated by a total absence of genetic structure (Cárdenas et al., In press). The authors proposed two complementary hypotheses for the lack of a phylogeographic structure: i) gene flow is so large that there is no effective barrier to dispersal and *C. concholepas* crosses whatever barrier exists around 30°S, and ii) the genetic diversity of *C. concholepas* shows evident signals of a past and important demographic expansion coinciding with sudden change in climatic conditions 400,000 years before present (BP). Under this particular scenario, species ranges that cross the 30°S biogeographic transition in Chile could result from past shifts in their previously restricted distribution in one or the other biogeographic region.

Considering the above, we investigated whether there is a concordance between the phylogeographic pattern and the biogeographic transition in a species characterized by short distance dispersal, the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* (Faugeron et al., 2005; Martínez et al., 2003). The distribution of this kelp ranges from 17°S (Peru) to 56°S (Cape Horn) (Searles,

1978) and therefore covers the 3 major biogeographic units described along the Chilean coast. The wide range of latitudinal distribution of this species makes it a good model to test for the hypothesis of a genetic continuity across the 30°S transition zone. On the other hand, its limited dispersal capacity should make it particularly sensitive to processes such as vicariance or founder effects.

In order to properly infer the processes likely shaping the phylogeographic structure, we first used a combination of four different markers characterized by different mutation rates and different effective sizes: the recently developed mitochondrial marker *atp8/trnS* (Engel et al., 2008), the chloroplastic *RuBisCo* spacer, and the nuclear rDNA Internal Transcript Spacers, ITS1 and ITS2. As a consequence of the difference in ploidy level and the generally uniparental inheritance pattern, mitochondrial and chloroplastic markers are characterized by a reduced effective size and are therefore more susceptible to be affected by genetic drift than nuclear markers (Ballard and Rand, 2005). Cytoplasmic markers are thus more likely than nuclear ones to show a pronounced phylogeographic structure, either of deterministic origin (i.e. caused by an historical barrier to gene flow) or of stochastic origin (i.e. caused haphazardly by the genetic drift) (Irwin, 2002; Kuo and Avise, 2005). Furthermore ITS2 and *RuBisCo* spacer are generally considered to have lower mutation rates than ITS1 and mitochondrial markers (e.g. for brown algae: Coyer, 2001; Yoon and Boo, 1999; Harvey and Goff, 2006; Engel et al., 2008), potentially enabling the detection of different processes occurring at different time scales. Finally, it has been shown that using a single locus to infer the phylogeographic structure of a species can be misleading because of the potential consequences of the selective processes on mitochondrial DNA, such as selective sweep and background selection, in shaping intraspecific diversity (Ballard and Whitlock, 2004; Bazin et al., 2006). Comparison of these diverse and independent markers from different genomic regions facilitates the distinction of the different processes (selection, drift and history) when

interpreting the phylogeographic structure. Furthermore, we also aimed at investigating more in detail the processes acting both around the 30°S transition and within each biogeographic region. In addition to the multilocus approach, we analyzed 1,045 individuals from 36 populations using the mitochondrial marker, in order to determine accurately the geographic distribution of lineages and to assess the variability within populations.

2. Materials and Methods

2.1. Model species

The genus *Lessonia* is defined by Santelices and Meneses (2000) as a sub-Antarctic component of the marine flora whose distribution includes (besides the Chilean and Peruvian coast) New Zealand, sub-Antarctic islands, and Tasmania. As all the Laminariales, *Lessonia nigrescens* has a heteromorphic haploid-diploid life cycle in which the diploid sporophyte is the macrophyte (up to 4 m long) and the haploid phase is a dioecious microscopic filament. The encounter of gametes is likely under the control of pheromones (Lünning and Müller, 1978) and fertilization occurs on the female gametophytes. Dispersal is thought to be achieved mainly by haploid spores emerging after meiosis from the sporophyte, although some long-distance dispersal event may occur (Faugeron, 2005). However, these motile spores have a short lifespan, with a limited capacity to adhere to the substratum (less than 24 h, E. Martínez, com. pers.), thus limiting the dispersal capacity of the species.

2.2. Sampling

For the multilocus approach, a total of 127 individuals of *L. nigrescens* was sampled in 36 rocky intertidal locations, with 2-6 individuals collected per location (Table 1, Fig. 1) ranging from 17°37'S (Peru) to 41°38'S (Chiloé Island, Chile), thereby covering 3/4th of the known species distribution range (Searles, 1978). A more intensive sampling was done between 27°S and 34°S, in an effort to examine with higher resolution the biogeographic transition zone. Samples of *Lessonia trabeculata* (eight individuals), *Lessonia flavicans* (two individuals) and *Lessonia vadosa* (one individual) were also collected (Table 1). The first species is present from 12°S (Peru) to 41°S (Chiloé Island), whereas the two other species are restricted to the southern tip of South America (47-56°S). All these latter species are subtidal.

In order to infer the structure within lineages and within populations, an additional sampling of 28-33 individuals per location (with the exception of HCO: 8 individuals, and CST: 12 individuals) was done in 36 locations (Table 1). Individuals were sampled by collecting a fragment of frond along a transect of 100-150m long. Each sample consisted of a cleaned meristematic tissue excised from fresh thalli and immediately placed into a plastic bag filled with silica gel beads for rapid dehydration.

2.3. DNA extraction and sequencing for the multilocus approach

Dried material was grounded in liquid nitrogen, and 50 µL of tissue powder were used for DNA extraction. The extraction procedure combined a standard CTAB extraction with the addition of PVP to extract polyphenols (Martínez et al.; 2003). The precipitated DNA pellet was diluted in 60 µL of MilliQ water and quantified by NanoDrop (NanoDrop Technologies Wilmington, Delaware, USA).

One to five individuals per location were analyzed using the four markers *atp8/trnS*, *RuBisCo* spacer, *ITS1* and *ITS2*. The mitochondrial marker *atp8/trnS* was amplified with the

primers developed by Engel et al. (2008); using the PCR reaction and program from Voisin et al. (2005). The plastid marker RuBisCo spacer, developed first in algae by Destombe and Douglas (1991), is composed of the RuBisCo spacer and part of the sequences coding for the large and for the small subunits of RuBisCo. The amplification of this plastid region was done using the primers RS1 and RS2 designed by Yoon and Boo (1999). Primers LB1 and LB2 (Yoon et al., 2001) were used to amplify ITS1 and ITS2. For RuBisCo spacer and ITSs markers, reaction mix followed the same protocols, with the exception of the bovine serum albumin (0.3 mL.mL^{-1}) and PCR conditions were adapted from Yoon and Boo (1999) with some modifications (30 cycles, elongation for 45 sec at 57°C for ITSs and at 50°C for RuBisCo spacer). PCR products were purified and sequenced on an ABI PRISM® 3100 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster city, California, USA).

Due to some sequencing difficulties, polymorphism within some individuals was suspected for ITS markers. These sequences were discarded from the data set. However, the DNA from five individuals originated from the 30°S biogeographic transition zone and showing such a polymorphism (SLDN6, CAR1, TBL2, PTLV2-11, PTAL3) was cloned in order to detect whether this within-individual polymorphism could be explained by hybridization between entities located on both sides of the 30°S biogeographic transition. The PCR products were cloned using the pGEM®-T Vector System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) following the manufacturer's protocol. Up to five clones were sequenced per individual.

2.4. SSCP and sequencing for the population-level study

To investigate the polymorphism of the *atp8/trnS* marker at the population level, we completed the previous data set obtained by the sequencing method with the rapid screening method of single-strand conformation polymorphism (SSCP) (Orita et al., 1989; Sunnucks et

al., 2000). Using the same PCR reaction as previously described, PCR products were loaded in non-denaturing polyacrylamide gels in order to identify mutations affecting the conformation of single-strand DNA. 16 μ L of PCR product were mixed with 32 μ L of denaturing/loading buffer containing 8 μ L of 15% ficoll loading buffer (with 0.25% bromophenol blue and 0.25% xylene cyanol), 5 μ L urea 5 M and 19.7 μ L TBE 1 x buffer. After denaturing 4 min at 94 °C, amplification products were separated using 10% polyacrylamide (37.5:1 acrylamide:bisacrylamide) gels run in 0.5 x TBE at 200 V during 17 h at 4 °C on a vertical electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, California, USA). After electrophoresis, SSCP gels were stained for 20 min with a 2.5 x Sybr Gold solution and bands were visualized under UV light.

Previously sequenced haplotypes were used as profile references in each SSCP gel. To check for the accuracy of the SSCP typing, we sequenced at least two individuals for each different SSCP profile and for each location whenever possible. For profiles corresponding to more than one haplotype, we did an additional screening by RFLP using the restriction enzymes DraI and AseI. Discrimination of the different restriction profiles was done by migration on 12% acrylamide gels.

2.5. Sequences alignment and polymorphism of the four markers

Sequences were edited using Chromas (McCarthy, 1997) and multiple sequence alignments were constructed with Multalin (Corpet, 1988). Sequences from GenBank of another *L. flavicans* individual from Falkland Islands and of an individual of *Lessonia corrugata* (only present in Tasmania) were included (Table 1). Only the spacer region was considered for ITS1 and ITS2 analyses. For *atp8/trnS*, we considered 13 bp of the 3' end of the *atp8* gene, the *atp8/trnS* intergenic region and 23 bp of the 5' end of the *trnS* gene. The

RuBisCo spacer alignment consisted of 198 bp of the 3' end of the *rbcL*, the RuBisCo spacer, and 121 bp of the 5' end of the *rbcS*. For each marker we computed the number of polymorphic sites (s) considering only nucleotide substitution and the gene diversity index (H), based on allele frequency (Nei, 1987), using Arlequin v 3.11 software (Excoffier et al., 2005).

2.6. Phylogenetic analyses for the multilocus data sets

Indels in the ITSs and RuBisCo spacer data sets did not provide any phylogenetic information and were treated as missing data. In contrast, indels were informative for the *atp8/trnS* data set and thus were treated using three methods: considering indel sites as missing data, excluding indel sites and coding indels as present or absent. The automated coding of indels was implemented using the “IndelCoder” menu available in SeqState (Müller, 2006). We applied the Simple Indel Coding or SIC, a method that considers stretches of indel sites as non-independent characters and treats each indel as a separate binary character (Simmons and Ochoterena, 2000).

The ITS1 and ITS2 sequences were treated independently because each may evolve at different rates (Hershkovitz and Lewis, 1996) and phylogenetic analyses of these markers were done with and without cloned sequences. For ITSs and RuBisCo spacer analyses, sequences of *L. corrugata* were considered as outgroup, whereas for *atp8/trnS* analyses, *L. vadosa* was used as outgroup.

The different alignments were analyzed using maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) methods using PAUP* v 4.0b10 (Swofford, 2002) and Bayesian inference (BI) using MrBayes v 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Under parsimony, heuristic searches included 100 random addition sequence replicates, tree-bisection-and-reconnection

(TBR) option for branch swapping and the maximum number of trees was fixed to 100,000. Nodal support was assessed using non-parametric bootstrap (Felsenstein, 1985) with 1,000 pseudo-replicates using a heuristic search with the TBR option for branch swapping. For each marker, we used the Akaike Information Criterion (AIC) implemented in ModelTest v 3.7 (Posada and Crandall, 1998) to estimate the best fit model parameters for the ML reconstruction method. The selected models were K81uf + I for the RuBisCo spacer and the atp8/trnS data sets, TnEf + I for the ITS1 data and HKY for the ITS2 data. ML analyses were performed with heuristic searches with 100 random sequence addition replicates and nodal support was assessed using non-parametric bootstrap analyses with 1,000 pseudo-replicates. Bayesian inference was performed using the general type of the best fit model parameters defined for each data set, in which four independent analyses were run with four chains each, for five million generations. Trees and parameters were sampled every 1,000 generations and the default parameters were used to fit temperature and swapping. The first 25% of sampled trees were discarded to ensure stabilization and the remaining used to compute a consensus tree. The split frequency (variance between the four independent runs) in all cases was below 0.005, confirming that sampling was from the posterior probability distribution. In the case of the atp8/trnS partition in which indels were coded with the SIC method, the mixed matrix obtained with IndelCoder was used as an input file in MrBayes. Here the nucleotide sequences were analyzed with the selected model, whereas the matrix of presence/absence of indels was treated as restriction site data.

2.7. Sequences divergence and estimation of divergence time

The sequence divergence between the different sets of sequences grouped accordingly to their phylogenetic affinities (i.e. lineages) was obtained as uncorrected p -distances (i.e. the

proportion p of nucleotide sites at which two compared sequences are different) calculated with MEGA v 4.0 (Kumar et al., 2004), with 1,000 replicates excluding indels from data analyses.

The rate of molecular evolution was estimated following Hoarau et al (2007), who estimated the mutation rate for the photosystem II chloroplast protein D1 (*psbA*) in diatoms from 0.08% to 0.12% per million years (Myr), based on their fossil record. Given the sequence divergence for *psbA* gene (1.2%) between the two Laminariales species, *Laminaria digitata* (AY528849) and *Alaria crassifolia* (AY528847), their divergence time was estimated to be 10 to 15 Myr BP ($1.2/0.12$ and $1.2/0.08$, respectively). These two species showed 8% of divergence for the RuBisCo spacer (sequences AY851559 and AF109802, only the region used for *L. nigrescens* was considered). The divergence rate for RuBisCo spacer was therefore estimated between 0.53 and 0.80%.Myr⁻¹ ($8/15$ and $8/10$, respectively). Generation time effects could be neglected in our calculations since they were equivalent between diatoms, *Laminaria* and *Lessonia nigrescens*, that is from one to few years (Hoarau et al., 2007; Chapman, 1993; S. Faugeron, pers. obs.). We could verify that this estimate of the molecular clock was relatively insensitive to the selected *Lessonia* species or haplotype within species (data not shown). The divergence time between the different *Lessonia* lineages was then estimated as a range between minimum and maximum coalescent times between haplotypes with MEGA v 4.0 (Kumar et al., 2004), with 1,000 replicates excluding indels from data analyses.

2.8. Network reconstructions

As they assume bifurcating trees, traditional phylogenetic methods may not be appropriate for inferring intraspecific phylogenetic relationships. The representation of ancestral

haplotypes as occupying branches of zero-length at the basal node of a cluster relies, therefore, on an inappropriate model (Posada and Crandall, 2001). In contrast, network reconstructions are more appropriate at the intraspecific level and particularly they specifically incorporate the possibility for the persistence of ancestral haplotypes in the data. We therefore constructed haplotypes networks using the median-joining method implemented in NETWORK v 4.5 (Bandelt et al., 1999).

2.9. Analyses of the population-level study

Molecular diversity indices as gene diversity (H , the probability that two randomly chosen haplotypes/ribotypes are different) and nucleotide diversity (π , the probability that two randomly chosen homologous nucleotide sites are different) were calculated for each sampled locations and for each phylogenetic lineage using Arlequin v 3.11 (Excoffier et al., 2005). The number of polymorphic locations and the mean H and π over locations were also calculated excluding the two locations with less than 28 individuals (HCO and CST locations).

To test for the occurrence of genetic divergence on both sides of the transition zone, populations were grouped according to their geographic location. As the precise location of the biogeographic transition zone remains controversial among authors (between 30°S and 33°S), we tested for a discontinuity both at 30°S and at 33°S. A hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) was implemented in Arlequin v 3.11 (Excoffier et al., 2005) to analyze the partition of genetic variance among and within these geographic regions. The ϕ -statistics were calculated as pairwise differences among locations and their significance was computed using a non-parametric permutation test with 10,000 permutations.

Isolation by distance (Slatkin, 1993) was tested by plotting pairwise genetic distances against pairwise geographical distances using Mantel test implemented in Arlequin v 3.11

(Excoffier et al., 2005; 1,000 permutations and excluding HCO and CST locations). To compute a linear relationship, genetic distances were measured as $\pi/(1-\pi)$, where π is the mean pairwise difference among locations following the recommendations of Rousset (1997). Geographical distances were measured as distances along the coast for continental locations and taken as the straight-line distance for the island IPA and GBN locations.

Mismatch distribution analyses were done for each phylogenetic lineage using Arlequin v 3.11 to infer demographic history. Both sudden demographic expansion (Rogers and Harpending, 1992) and spatial expansion (Excoffier, 2004) models were fitted to the observed mismatch distribution and tested using 1,000 bootstraps.

A median-joining network of haplotypes was constructed for the complete atp8/trnS data set using NETWORK v 4.5 (Bandelt et al., 1999).

3. Results

3.1. Multilocus approach: polymorphism of the four markers

The principal characteristics of the four markers are given in Table 2. The length of the alignments was 159 bp for atp8/trnS (GenBank accession numbers EU652976 to EU652987, FJ410103 to FJ410116, FJ410128 and FJ410130), 349 bp for ITS1 (GenBank accession numbers FJ410031 to FJ410059), 237 bp for ITS2 (GenBank accession numbers FJ410068 to FJ410083) and 555 bp for the RuBisCo spacer (GenBank accession numbers FJ410085 to FJ410102, see also Supplementary Material for details). The alignments of all markers required the introduction of indels, of 1 to 46 bp, leading to important variation in sequence length within and between species (Table 2). Two classes of markers could be distinguished based on their polymorphism patterns within *L. nigrescens*: the atp8/trnS and ITS1 markers

presented 22 haplotypes and 24 ribotypes respectively, whereas 13 ribotypes and 13 haplotypes were recovered for ITS2 and RuBisCo spacer (Table 2). The proportion of polymorphic sites was also higher in the first two markers (18% and 10%) than in the other ones (6% and 2%). Most of the *atp8/trnS* and ITS1 alleles (i.e. either haplotypes or ribotypes) presented a geographically restricted distribution, whereas some ITS2 alleles showed a wide geographic distribution, such as the southern *its2-11* allele (from IPA to GBN, 1,680 km) and the northern *its2-1* allele (from ILO to MOC, 1,300 km) (Fig. 1, for details of the geographic distribution of alleles, see also Supplementary Material). Likewise, RuBisCo spacer haplotypes were shared among populations geographically distant, such as the southern haplotype *rs7* (from IPA to GBN, 1,680 km) or the northern haplotype *rs1* (from ILO to COL, 850 km) (Fig. 1 and Supplementary Material). Whatever the marker used, no allele was shared between the northernmost and the southernmost locations.

Depending on the marker, the size and polymorphism of indels were highly variable. The ITS1 alignment required the insertion of 53 bp (indels of 1 to 14 bp length), of which 16 bp were needed for the *L. nigrescens* alleles only (Table 2). The insertion of 11 bp and 7 bp was necessary for the ITS2 and the RuBisCo spacer alignments respectively (Table 2). The *atp8/trnS* marker presented a distinct pattern in terms of indels distribution, as most of the indels were included in the *L. nigrescens*-only alignment (37 of 46 bp). A polymorphism of indels was observed in two distinct regions of the *atp8/trnS* sequence (region 1: from 50 to 80 bp position and region 2: from 122 to 127 bp position, Fig. 2). The first indel region exhibited both a polymorphism in length and substitutions (three different indel lengths: 13, 21 and 29 bp were recognized, Fig. 2) whereas the second indel region was 6 bp long and did not present any length polymorphism.

3.2. *Lessonia nigrescens* divided into two main lineages

The phylogenetic reconstructions were congruent among markers to confirm that *L. nigrescens* forms a monophyletic group, with *L. trabeculata* being the closest outgroup species. The monophyly of *L. nigrescens* was consistently supported by high bootstrap and posterior probability values regardless the marker and the method for phylogenetic reconstruction (Fig. 3 for *atp8/trnS* and *ITS1* & Fig. 4 for *RuBisCo* spacer and *ITS2*). In addition, two distinct groups of alleles were retrieved: a northern group corresponding to the Peruvian Province region ranging from 17°37'S to 30°14'S (PP lineage) and a southern group corresponding to the Intermediate Area region ranging from 29°03'S to 41°48'S (IA lineage). Support values for the PP lineage showed variation depending on the marker and on the phylogenetic reconstruction method used (Figs 3 & 4). While the PP lineage was always monophyletic regardless of the marker, the monophyly of the IA lineage was observed only with *atp8/trnS* and *ITS1* (Fig. 3). *ITS2* and *RuBisCo* spacer markers presented a similar pattern, with a PP lineage supported by weak statistical support and, more generally, weak support values within the *L. nigrescens* clade and a polytomy for the IA alleles (Fig. 4). These two phylogenetic trees suggested incomplete lineage sorting due to the presence of ancestral alleles within the data set, with the presence of zero-length branches. This was confirmed by the structure of the ribotype and haplotype networks which showed a separation between alleles in individuals from the PP lineage and those encountered in the IA lineage (Fig. 4). Haplotype *rs7* and ribotype *its2-11* were considered as ancestral based on their position on the phylogenetic trees and on the networks, and also because they were the most frequent and most widely distributed alleles. These ancestral alleles for both markers were observed in the IA lineage only (Figs 1 & 4).

In addition to the IA lineage, the *atp8/trnS* marker showed a supplementary sub-division of the PP lineage into a “Northern clade” and a “30°S Zone clade” (Z30 clade) with high support

values for each of the three clades (71 to 100%, Fig. 3). These two last clades presented disjoint distribution ranges: the Northern clade was observed north from 27°S whereas the Z30 clade was restricted to a narrower region between 27°S and 30°S (Fig. 1, see also population-level analysis). Such a subdivision of the PP lineage in two clades was not detected for any of the other three markers, although no allele was found shared between these two sub-regions (Z30 and north from 27°S, Figs 3 & 4).

When indel polymorphism information was used alone, four groups of *atp8/trnS* haplotypes could be distinguished which corresponded to the three clades previously described, with the Z30 clade grouping two different indel lengths haplotypes (first indel of 13 and 21 bp, Fig. 2). The inclusion of recoded indels in the data analyses did not modify the topology of the MP and Bayesian trees for *atp8/trnS* marker, except that branch lengths were consistently longer than when excluding them or treating them as missing data (data not shown). Because indel recoding is generally considered less parsimonious than indel exclusion, we chose to show only ML trees with indels treated as missing data for comparisons among the four study markers (Figs 3 & 4).

The occurrence of within-individual polymorphism, with up to three different sequences per individual, was detected between ITS clones. Several of these sequenced clones corresponded to new sequences (GenBank accession numbers FJ410060 to FJ410067 and FJ410084). However, each individual contained alleles either from the PP or the IA lineage, but never from both lineages, indicating that the within-individuals' polymorphism was not the result of hybridization. Moreover, the addition of the sequenced clones in the data set did not modify the topology of the phylogenetic trees (data not shown).

For ITS1 and ITS2 markers, the diversity in terms of number of alleles, number of polymorphic sites (s) and gene diversity (H), was generally higher for the PP lineage than for the IA lineage (Table 2). For instance, the most polymorphic marker, ITS1, had almost twice

substitutions sites in PP ($s= 20$) than in IA ($s= 11$). The *atp8/trnS* marker showed exactly the same number of haplotypes in the PP and IA lineages for the multilocus data set, whereas the number of polymorphic sites observed within PP doubled those within IA (Table 2).

3.3. Sequence divergence among *Lessonia nigrescens* lineages and divergence timing

When sequence divergences was calculated for markers showing monophyletic clades, the divergence between lineages PP and IA was similar or higher than the divergence between recognized sister species. For ITS1, the divergence was of the same order of magnitude between the IA and PP lineages (2.7%) as between *L. trabeculata* and any *L. nigrescens* lineage (2,5-3%) or even between *L. vadosa* and *L. corrugata*, two species separated by the South Pacific (2.7%, Fig. 3). For *atp8/trnS*, the divergence (calculated excluding indel sites) among clades within *L. nigrescens* was nearly twice as high as the divergence between *L. flavicans* and *L. trabeculata* (6.3-7.5% versus 3.8%, respectively; Fig. 3) or the divergence between *L. flavicans* and *L. vadosa* (4.0%, Fig. 3). All phylogenetic reconstructions showed consistently larger branches for *L. nigrescens* alleles than for other species of *Lessonia* (Figs 3 & 4). Within *L. nigrescens*, the IA alleles were consistently closer to the outgroup species than the PP alleles (Figs 3 & 4).

Divergence time between PP and IA was estimated using the indirect calibration of the molecular clock calculated for the RuBisCo spacer (ranging from 0.53% to 0.80%.Myr⁻¹). As sequence divergence varied from 0.2% to 0.9% between PP and IA haplotypes, the divergence time between the two lineages was estimated to range between 0.250 to 1.698 Myr.

3.4. Lineages with geographically restricted distributions and absence of admixture

The multilocus approach allowed detecting the presence of three clades for the mitochondrial marker, each clade showing a distinct distribution range (Fig. 1). However, by increasing the sample size to about 30 individuals per location, we defined more precisely the distribution of each clade. Nine new haplotypes were detected, but the phylogenetic relationships described previously did not change. Each of these new haplotypes (atp29 to atp35, atp28 and atp39) differed from known haplotypes by only one or two base pairs (Fig. 5; GenBank accession numbers: FJ410117 to FJ410125).

The distribution ranges of the Northern and the Z30 clades did not overlap, and displayed a narrow and abrupt genetic discontinuity zone located between 27°12'S and 27°41'S (Figs. 1 & 5). In contrast, the ranges of Z30 and IA clades overlapped in a region located between 29°03'S and 30°14'S (Figs. 1 & 5). This overlapping region was characterized by the occurrence of several patches composed exclusively of IA haplotypes (COZ at 29°57'S, IPA at 29°35'S and ACE at 29°03'S, Fig. 5) scattered within the geographic area of the Z30 clade. It is important to notice that, in both transition zones, all populations were made of haplotypes from just one clade (Fig. 5). This absence of admixture among clades was retrieved for each of the three other markers used in the multilocus approach (Fig. 1).

*3.5. Polymorphism within *Lessonia nigrescens* clades and populations*

Globally, the SSCP method was able to clearly discriminate between different sequences, i.e. atp8/trnS mitochondrial haplotypes, within and among populations. Indeed, most SSCP profiles (15 over 18) corresponded to a single sequence. Two of the three remaining profiles corresponding to more than one haplotype could be subsequently identified as atp5 from atp10 and atp12 from atp13 using RFLP screening. Only one profile (profile C) was difficult

to identify. This profile, exclusively found in the Z30 region, corresponded to three distinct haplotypes, differing by one base pair (haplotypes atp4, atp27 and atp29). However, as the atp4 haplotype was the most frequent (observed in 13 out of 19 sequences analyzed for this profile), and occupied a central position on the network reconstruction (Fig. 5), we considered all individuals having this particular profile as having the atp4 haplotype for the calculation of the diversity indices. This approach certainly underestimated the polymorphism within this region.

A total of 31 haplotypes were recovered from the 1,051 analyzed individuals. Northern and IA clades were sampled along a comparable coastline distance (1,416 and 1,815 km respectively). The IA clade presented a larger number of haplotypes and higher nucleotide (π) and gene (H) diversity than the Northern clade (Table 3). However, since sampling effort was not equivalent in both regions, we used a re-sampling method to estimate the diversity indices within the IA clade (100 random re-sampling of seven out of 17 locations). Re-sampling showed that Northern and IA clades were similar in terms of gene diversity (the higher gene diversity of IA clade can only be explained by the higher sampling effort; data not shown). The nucleotide diversity remained slightly higher for IA clade than for Northern clade but both values showed a high standard variation (Table 3, data not shown for re-sampling). This reflected the high structure in both clades with the presence of rare haplotypes only in the IA clade (Fig. 5). Lowest gene diversity was observed for the Z30 clade. This, however, may be the consequence of an underestimation of polymorphism, as rare haplotypes (atp27 and atp29) were not detected by SSCP. When considering the contiguous stretch of eight indels observed within Z30 clade haplotypes as a unique mutation event, the nucleotide diversity was lower than for the two other clades (Table 3).

For the AMOVA analyses, different hierarchical models were tested: populations were grouped accordingly to their geographic locations (i.e. localizing the transition zone at 30°S

or at 33°S) or to their phylogenetic affinities (i.e. the three phylogenetic clades observed for *atp8/trnS*). Since phylogenetic clades presented a higher significance and explained a most important part of the variance, we chose to use this last model of grouping. Most of the mitochondrial genetic variation in *L. nigrescens* was explained by the differentiation between clades (88.9%, Table 4; 90.2% when indels were excluded, data not shown). However, differentiation among locations within clade was also highly significant and accounted for more than 10% of the observed genetic variation at *atp8/trnS* (Table 4). Taking in account the substitution model obtained with ModelTest did not change the results (data not shown).

In contrast to the relatively high polymorphism values observed at the clade level, the polymorphism within locations was surprisingly low. The number of locations showing more than one mitochondrial haplotype was very limited (11 out of 34 locations, Table 3). In addition, most of the polymorphic locations exhibited a predominant haplotype, with generally one, and up to three, rare haplotypes differing by one base pair from the common haplotype (Fig. 5). This was reflected by the low within-location gene and nucleotide diversity values combined with high standard deviations (Table 3). However, three locations showed a distinct pattern exhibiting two haplotypes with similar frequencies: SLD in the Northern clade, and MEH and PUC from the southern part of the IA region (Table 3 and Fig. 5). In addition to the low polymorphism within populations, *L. nigrescens* was characterized by an important proportion of private haplotypes, found in only one location (4 out of 6 haplotypes in the Northern clade, 3 out of 7 haplotypes in Z30 clade and 11 out of 18 haplotypes in IA clade). Distances among locations sharing haplotypes were generally low, being less than 150 km of coastline in most cases. The four exceptions concerned haplotypes from the southern part of the IA clade distribution: *atp6*, *atp7* and *atp8* were shared among locations separated by 270-347 km (PACHI to GBN, Fig. 5). Within the Z30 clade, the *atp4* haplotype was shared between populations separated by 132 km, and this was verified by the

sequencing approach. It was the only case of haplotype shared among non-adjacent locations (the TON/GUANA/OTO group of locations is separated from the TBL/CHS/CHN group by TEA, ARY and COZ, Fig. 5). Within each clade, Mantel tests were significant (P-value of 0.009, 0.004 and 0.014 for Northern, Z30 and IA clades, respectively, Fig. 6). An isolation by distance pattern explained a larger part of the variance in the Northern clade ($R^2 = 0.55$) than in the IA clade ($R^2 = 0.15$, Fig. 6). LM was highly differentiated from all other locations, greater than expected by the isolation-by-distance pattern among the other locations of the IA clades. Removing this location increased the R^2 to 0.44 (P-value < 0.001).

Mismatch distributions were clearly unimodal for the IA haplotypes, whereas the Northern clade showed a bimodal mismatch distribution (Fig. 7). Both sudden demographic expansion and spatial expansion models fitted to the observed IA mismatch with reasonably high bootstrap support (0.795 and 0.781 respectively), with $\tau = 1.4$ and 1.3 respectively. For the Northern clade, the sudden demographic expansion had negligible bootstrap support (0.37), but higher support was found for the spatial expansion model (0.63), with $\tau = 3.0$.

4. Discussion

Our study demonstrates the presence of two main divergent lineages within the kelp *Lessonia nigrescens*, one on each side of the debated biogeographic 30°S transition zone. Based on a sampling scheme that covered most of the distribution range of the species, the genetic markers from the three genomic compartments revealed that this southern Pacific transition zone corresponds to a phylogenetic break. However, in spite of their congruent response on the phylogeographic structure, important differences between markers became apparent in relation to the intensity of the genetic divergence. Furthermore, we found

discrepancies among markers regarding the putative presence of a second genetic discontinuity at 27°S. The possible scenarios responsible for the origin of these phylogeographic patterns and the mechanisms that might be involved in maintaining the geographic distribution of lineages, and of alleles within lineages, are discussed below.

4.1. Genetic discontinuity at 30°S

All markers consistently showed the presence of a genetic break within *L. nigrescens* differentiating the Peruvian Province (PP) from the Intermediate Area (IA) despite some difference in the topologies. This consistency among markers strongly supports the involvement of an external factor as the main cause of divergence among lineages. Selective or drift effects on a particular part of the genome can thus be discarded as putative mechanisms (see Ballard and Rand, 2005; Irwin, 2002; Kuo and Avise, 2005) responsible for the detected genetic discontinuity between the two south-eastern Pacific biogeographic regions.

The genetic discontinuity was supported by high bootstrap values and posterior probabilities and long branches for all markers, and a reciprocal monophyly for the faster evolving markers (*atp8/trnS* and *ITS1*). This topology suggests that a vicariant process is probably at the origin of the phylogeographic break between PP and IA. However, the slower evolving markers (*ITS2* and *RuBisCo* spacer) showed a slightly different topology, with a monophyletic PP lineage embedded in the IA lineage. The complementary information given by the network of haplotypes/ribotypes indicates that the absence of reciprocal monophyly is almost certainly linked to the retention of ancestral alleles in the IA lineage. The monophyletic PP lineage nested within the other group of alleles may thus be an intermediate stage prior to a complete reciprocal monophyly (Omland et al., 2006). This kind of pattern

can emerge by genetic drift that progressively eliminates ancestral alleles in some populations faster than in others due to either smaller population size or to demographic fluctuations. In this study, we interpreted the difference in tree topology as the consequence of differential mutation rates. Indeed, data from the literature suggest that ITS1 has a higher mutation rate than ITS2 (e.g. for the kelp *Macrocystis* sp.; Coyer et al., 2001). Furthermore, RuBisCo spacer is generally described as more conserved than ITSs, as demonstrated for the kelp *Undaria* (Yoon and Boo, 1999) and in other species of Phaeophyceae (Harvey and Goff, 2006). In addition, comparison of sequence variation among nine Laminariales and three fucoid species confirmed that RuBisCo spacer was also more conserved than *atp8/trnS* (Engel et al., 2008).

4.2. Timing of the divergence among L. nigrescens lineages and possible scenarios

For the two reciprocally monophyletic markers, the distances among lineages were of the same order than the distances among other *Lessonia* species included in this study. For instance, the ITS1 sequence divergence was as high between IA and PP lineages as between species from both sides of the Pacific Ocean, *L. vadosa* and *L. corrugata*. More generally, ITS1 divergence among PP and IA lineages was of similar importance as what has been described between closely related kelp species, such as between the European *Laminaria digitata* and *Laminaria hyperborea* (3.1% of divergence for ITS1 and ITS2; Erting, 2004), or between the Japanese *Laminaria* (3.4 to 4.2% for ITS1; Yotsukura et al., 1999). Moreover, we neither observed introgression between PP and IA lineages nor mixture of lineages within a single location, regardless the number of individuals. Even in the common case of multiple copies of the ITS region observed after cloning (Coyer et al., 2001; Lane et al., 2007), the different sequences recovered within individuals were always from the same lineage. This

absence of gene flow among lineages strongly supports the occurrence of two cryptic species that diverged long time ago.

Unfortunately, our capacity to estimate the time since these two lineages within *L. nigrescens* separated is limited due to the absence of fossil records or other recorded geological or paleontological events. The indirect estimation of a molecular clock for the RuBisCo spacer marker suggests that the divergence arose 0.250-1.698 Myr BP. Despite the low precision of the estimated timing, we can conclude that the divergence among lineages within *L. nigrescens* is ancient, close to the divergence from the sister species *L. trabeculata*, and that it originated long before the Last Glacial Maximum, which is the most common historical factor investigated in marine phylogeography (Avice, 2000; Dawson, 2005; Maggs et al., 2008). What is the scenario for such a genetic divergence? The hypothesis of vicariance is hardly supported because, contrary to most coastal biogeographic transitions studied around the world where either historical or contemporary barriers to dispersal have been reported as the main cause of genetic discontinuities, there is no consistent geological or paleontological evidence for a historical scenario accounting for the origin of the 30-33°S south-eastern Pacific transition zone that could separate the PP from the IA (Camus, 2001).

An alternative hypothesis can be proposed to account for the observed pattern of embedded lineages within an ancestral group of alleles. We hypothesize that this tree topology could correspond to a sudden range expansion from a reduced, marginally distributed group of alleles. In this case, strong genetic drift could have occurred not only because of the founder effect, but also during the range expansion by gene surfing (Excoffier and Ray, 2008), resulting in strong genetic differentiation between the source southern population and the newly colonized areas. This hypothesis is further supported by ecological and physiological features of the genus *Lessonia*, for which it is considered as a sub-Antarctic taxon (Santelices

and Meneses, 2000). Mismatch analyses at the population-level for *atp8/trnS* further supports a past spatial expansion in the Northern clade, likely linked to the northward colonization.

Two scenarios can explain how colonization of the northern region may have originated the current genetic discontinuity: (1) a change in environmental conditions, and (2) an adaptation to the environmental conditions of the northern region. Paleo-oceanographic data are needed to determine the date, frequency and magnitude of environmental changes that might have occurred along the Chilean coast between 0.250 and 1.698 Myr ago. Currently, the 30°S region is exposed to one of the two maximum wind stress for upwelling conditions present along the Chilean coast (Thiel et al., 2007), which has been used as a potential explanation for important changes in recruitment patterns of several invertebrate species between 30-32°S (Broitman et al., 2001; Navarrete et al., 2005). The 30°S region (29-32°S) separates a wide northern zone (800–1,000 km) with weak but persistent winds that favor upwelling, from a southern zone where winds, though stronger, are more variable (Hormazabal et al., 2004). There is also evidence of a global persistence in the currents pattern since the establishment of the Humboldt Current System (HCS), in particular regarding the presence of upwelling regimes that bring cold and nutrient-rich waters to coastal areas (Thiel et al., 2007) and favor the presence of kelp populations. The emergence of the HCS is therefore a potential factor allowing the range expansion of cold-temperate species towards the North. There are, however, strong discrepancies among authors regarding the establishment of this complex oceanographic system, situating it between 1.6 and 35 Myr BP (reviewed in Camus, 2001). This provides only a marginal overlap with the estimated timing for the origin of the genetic divergence in *L. nigrescens*.

The only other species studied for its phylogeography in this region, the benthic gastropod *Concholepas concholepas*, showed no genetic discontinuity along its entire range of distribution (Cárdenas et al., in press). However, in this invertebrate characterized by long

distance larval dispersal, the authors suggested that a demographic expansion from only one haplotype likely erased the signature of any pre-existent genetic structure. The onset of the demographic expansion of *C. concholepas* has been estimated at around 400,000 years BP based on mtDNA COI mismatch distribution (Cárdenas et al., in press). This expansion was likely contemporary to the favorable climatic conditions during the period of the marine isotope stage MIS 11 (Ortlieb et al., 2003), the longer and warmer interglacial period that occurred in the Pleistocene. It is thus probable that the emergence of divergent lineages in *L. nigrescens* occurred earlier than 400,000 years BP.

On the other hand, an adaptation to particular environmental conditions north of 30°S is a scenario that requires the assumption of strong selective factor(s) that would have affected the entire genome. Selection is generally considered too weak in marginal populations to lead to adaptation because of strong effects of genetic drift and immigration load from central populations (Bridle and Vines, 2007). A selective sweep associated with a particularly beneficial mutation in a northern population is a hypothesis that cannot be ruled out as this phenomenon is, indeed, expected to affect the entire genome due to strong founder effects. Certainly such a situation would not be exclusive of the colonization scenario, in particular if the selective sweep occurred in a marginal population at the northern limit of IA lineage. The adaptation hypothesis needs to be tested using markers or traits that respond to the environmental factors potentially causing ecological differentiation on both sides of the 30°S transition (i.e. temperature, upwelling regimes, etc.).

Regardless the specific circumstances that led to range expansion towards the north, this scenario is an interesting case of probable budding speciation, leading to a genealogically nested PP lineage within IA lineage for low-evolving markers. Such parapatric evolutionary process may be common (see for review Funck and Omland, 2003) and is expected to result from a combination of drift and selection in marginal populations at the species range limits.

The examples generally concern speciation after colonization of islands distant from the continent (e.g. in Macaronesia for a plant species: Vanderpoorten and Long, 2006) or from other islands (e.g. for a Lepidoptera species in Galapagos Islands: Schmitz et al., 2007), or the case of a generalist species budding off a specialist phytophagous insect species (Morse and Farrell, 2005). To our knowledge, this process has not been described in the marine environment.

4.3. Discordant patterns: a second genetic discontinuity at 27°S?

In addition to the major phylogenetic break present in all markers, *atp8/trnS* showed a second phylogenetic discontinuity around 27°S, as seen by a split of the PP lineage into a Z30 clade and a Northern clade, both statistically well-supported. These two sub-clades diverge in terms of both indel polymorphism and substitution polymorphism. Moreover, the divergence between these two sub-clades was of the same order as the divergence between IA and each PP sub-clade, suggesting also an ancient origin of this discontinuity. The geographic distribution of the two sub-clades was disjoint, with an abrupt discontinuity between 27°12'S and 27°41'S, but corresponds neither to a known biogeographic nor ecological transition zone (Camus, 2001; Thiel et al., 2007).

The discrepancy between the mitochondrial marker and markers from other cell compartments raises the question whether this second genetic discontinuity is the consequence of evolutionary forces that affected only the mitochondrial genome. There are indeed increasing evidence on how selection can shape the evolution of mitochondrial genome (Ballard and Rand, 2005; Bazin et al., 2006). In particular, because mitochondria are involved in important physiological functions, such as cellular respiration, selective forces acting on specific genes also affect by hitchhiking the *atp8/trnS* intergenic spacer. In this

context, the 27°S discontinuity could reflect some kind of adaptation to an environment more influenced by ENSO, or to higher sea surface temperature (Castilla and Camus 1992; Thiel et al., 2007). Studies on kelp physiology in different environments and on the role of the mitochondrial genome in potential adaptations to specific environments are needed at this point. An alternative hypothesis is that this phylogeographic discontinuity at 27°S is of stochastic origin, i.e. determined by genetic drift in a species of very low dispersal capacity. It has been shown that the mitochondrial markers, because of their smaller effective size, are more susceptible to show ‘haphazard’ phylogeographic discontinuity than nuclear markers, particularly for low dispersal species (Irwin, 2002; Kuo and Avise, 2005). The absence of alleles shared between the Z30 and Northern sub-clades for *atp8/trnS* but also for the other three markers, and the high number of individuals analyzed in this region, suggest an absence of gene flow across the 27°S.

4.4. Limited gene flow within lineages and a particular structure in the transition zone

Within each mitochondrial clade, the population-study analyses confirmed a previous report (Faugeron et al., 2005) that dispersal is very limited in this species complex. In the transition zone dominated by individuals belonging to the PP lineage, several patches (populations) were found to be exclusively made of individuals of the IA lineage. We hypothesize that rare long distance dispersal events from the IA zone are at the origin of the colonization of these new locations. This is consistent with the general northward trend of coastal currents and the presence close to the shore of the Humboldt Current (also of northward direction) in this area (Thiel et al., 2007). It is difficult however to discriminate the effect of this scenario from range shifts that likely occurred during the history of the species. What remains surprising is that, probably limited by the reduced dispersal capacity of the

species, both lineages did not expand their range beyond the narrow overlapping area (29°03'-30°14'S).

Such a low gene flow is an important force that may have contributed to the maintenance of the genetic signature for a long period of time (Irwin, 2002). It might also have contributed to the reinforcement of the genetic divergence by limiting the possibility of hybridization and introgression. Indeed, no mixed multilocus genotypes (i.e. those containing alleles from both PP and IA) have been observed despite the intensive sampling of the transition area. In addition, and consistent with the general pattern of monomorphism within populations, each sampled location of the transition area was either fixed for the PP or the IA alleles. Thus, this transition area does not correspond to a hybrid zone, but rather to a contact zone with an overlapping area between two completely isolated species. Whether this isolation is due to restricted gene flow and/or to reproductive isolation remains to be tested. Our study however strongly ascertains that the two lineages correspond operationally to two fully isolated species.

4.5. Conclusions and perspectives on the maintenance of the 30°S biogeographic transition

The PP and IA lineages of *L. nigrescens* show a disjoint distribution, with a narrow patchy overlapping area between 29°03'S and 30°14'S, and this genetic discontinuity matches exactly the location of the biogeographic transition proposed for the marine flora and fauna. The presence of the 30°S biogeographic transition appears to be the result of both historical and contemporary processes. Among the possible historical scenarios for such a genetic discontinuity, vicariance is poorly supported because of a lack of known barrier to dispersal and the tree topology obtained for two of the four markers. Rather, genetic data support a

scenario of budding speciation, with a northward range expansion that followed the establishment of the HCS. The deep genetic divergence and the lack of evidence for introgression or hybridization demonstrate the occurrence of two cryptic *L. nigrescens* species that likely evolved through parapatric speciation. The occurrence of such evolutionary processes in the biogeographic transition strongly suggests that major ecological shifts may have taken place in this region, and likely limited the range distribution of many species. The exact geographic match between the 30°S biogeographic transition and the genetic discontinuity observed in *L. nigrescens* sheds light to our understanding of the biogeography of the southeastern Pacific. Some ecological or oceanographic constraints to dispersal and colonization across the 30°S seem to remain affecting many species, as indicated by breaks in recruitment patterns in several invertebrate species (Broitman et al., 2001; Navarrete et al., 2005). While located at easily-reached dispersal distances in the contact zone, the two cryptic species of *L. nigrescens* were never observed together within the same site. The absence of mixed populations raises stimulating lines of research on the maintenance of each exclusive pattern between the two genetic entities.

Acknowledgments

This research was supported by a doctoral grant from the French Ministry of Education and Research (MENRT) to F. Tellier, FONDECYT grant 1060493 to S. Faugeron and ANR-ECOKEP (ANR 06 BDIV 012) to M. Valero. A. Meynard received a pre-doctoral grant from the Master Program Region Metropolitana (Chile)-Region Ile de France (France). Additional support from the programs “Collège Doctoral Franco-Chilien” and “ARCUS” of the French Ministry of Foreign Affairs, by the ECOS-CONICYT C03B04, FONDAP-FONDECYT 1501-0001 and by the Laboratoire International Associé “Dispersal and Adaptation of Marine Species (LIA DIAMS) is also acknowledged. We are particularly

grateful to all who helped with collecting samples: J. Beltran, C. Camus, A. Gamarra, M.-L. Guillemin, E. Martínez, S. Navarrete, C. Olivares, A. Peters, J. Plana, J. Vásquez and A. Vega. We also thank C. Daguin, G. Peralta, and J. Tapia for their assistance in the lab, C.R. Engel and M. Voisin for the development of SSCP method on the study species and S. Plouviez for her assistance with ITS cloning. Finally we are grateful to C. Destombe and S. Krueger for their constructive comments and for improving the English.

References

- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*, Harvard Univ. Press, Cambridge.
- Ballard, J.W.O., Rand, D.M., 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 36, 621-642.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.* 13, 729-744.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37-48.
- Bazin, E., Glémin, S., Galtier, N., 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312, 570-572.
- Bolnick, D.L., Fitzpatrick, B.M., 2007. Sympatric speciation: models and empirical evidences. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 38, 459-487.
- Bridle, J.R., Vines, T.H., 2007. Limits to evolution at range margins: when and why does adaptation fail? *Trends Ecol. Evol.* 22, 140-147.
- Broitman, B.R., Navarrete, S.A., Smith, F., Gaines, S.D., 2001. Geographic variation of southeastern Pacific intertidal communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 224, 21-34.
- Castilla, J.C. & Camus, P.A. 1992. The Humboldt-El Niño scenario: Coastal benthic resources and anthropogenic influences, with particular reference to the 1982/83 ENSO. *In* A.I.L. Payne, K.H. Brink, K.H. Mann and R. Hilborn (eds.). *Benguela trophic functioning*, *S. Afr. J. Mar. Sci.* 12:703–12.
- Camus, P.A., 2001. Biogeografía marina de Chile continental. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 74, 587-617.

- Cárdenas, L., Castilla, J.C., Viard, F., In press. A phylogeographic analysis across three biogeographic provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. *J. Biogeography*.
- Chapman, A.R.O., 1993. 'Hard' data for matrix modelling of *Laminaria digitata* (Laminariales, Phaeophyta) populations. *Hydrobiologia* 260/261, 263-267.
- Connolly, S.R., Menge, B.A., Roughgarden, J., 2001. A latitudinal gradient in recruitment of intertidal invertebrates in the northeast Pacific Ocean. *Ecology* 82, 1789-1813.
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881-10890.
- Coyer, J.A., Smith, S.J., Andersen, R.A., 2001. Evolution of *Macrocystis* spp. (Phaeophyceae) as determined by ITS1 and ITS2 sequences. *J. Phycol.* 37, 574-585.
- Dawson, M.N., 2001. Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? *J. Biogeography* 28, 723-736.
- Dawson, M.N., 2005. Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. *J. Biogeography* 32, 515-533.
- Destombe, C., Douglas, S.E., 1991. Rubisco spacer sequence divergence in the rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species. *Curr. Genet.* 19, 395-398.
- Engel, C.R., Billard, E., Voisin, M., Viard, F., 2008. Conservation and polymorphism of mitochondrial intergenic sequences in brown algae (Phaeophyceae). *Eur. J. Phycol.* 43, 195-205.
- Erting, L., Daugbjerg, N., Pedersen, P.M., 2004. Nucleotide diversity within and between four species of *Laminaria* (Phaeophyceae) analysed using partial LSU and ITS rDNA sequences and AFLP. *Eur. J. Phycol.* 39, 243-256.

- Excoffier, L., 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol. Ecol.* 13, 853-864.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- Excoffier, L., Ray, N., 2008. Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends Ecol. Evol.* 23, 347-351.
- Faugeron, S., Martínez, E.A., Correa, J.A., Billot, C., 2005. Long-term copper mine waste disposal in northern Chile associated with gene flow disruption of the intertidal *Lessonia nigrescens*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 288, 129-140.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Fitzpatrick, B.M., Fordyce, J.A., Gavrillets, S., 2008. What, if anything, is sympatric speciation? *J. Evol. Biol.* 21, 1452-1459.
- Funck, D.J., Omland, K.E., 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 34, 397-423.
- Hallatschek, O., Hersen, P., Ramanathan, S., Nelson, D.R., 2007. Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104, 19926-19930.
- Harvey, J.B.J., Goff, L.J., 2006. A reassessment of species boundaries in *Cystoseira* and *Halidrys* (Phaeophyceae, Fucales) along the North American west coast. *J. Phycol.* 42, 707-720.
- Hershkovitz, M.A., Lewis, L.A., 1996. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1276-1295.

- Hoarau, G., Coyer, J.A., Veldsink, J.H., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2007. Glacial refugia and recolonisation pathways in the brown seaweed *Fucus serratus*. *Mol. Ecol.* 16, 3606-3616.
- Hormazabal, S., Shaffer, G., Leth, O., 2004. Coastal transitions zone off Chile. *J. Geophysical Res.* 109, 1-13.
- Huelsenbeck, J.L., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Irwin, D.E., 2002. Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. *Evolution* 56, 2383-2304.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.
- Knowles, L.L., 2004. The burgeoning field of statistical phylogeography. *J. Evol. Biol.* 17, 1-10.
- Kuo, C.H., Avise, J.C., 2005. Phylogeographic breaks in low-dispersal species: the emergence of concordance among gene trees. *Genetica* 124, 179-186.
- Lane, C.E., Lindstrom, S.C., Saunders, G.W., 2007. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 634-648.
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D., Saunders, G.W., 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *J. Phycol.* 42, 493-512.
- Lünning, K., Müller, D.G., 1978. Chemical interaction in sexual reproduction of several Laminariales: release and attraction of spermatozoids. *Z. Pflanzenphysiol.* 89, 33-41.

- Maggs, C.A., Castilho, R., Foltz, D., Hensler, C., Jolly, M.T., Kelly, J., Olsen, J.L., Perez, E., Stam, W.T., Vainola, R., Viard, F., Wares, J.P., 2008. Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology* 89, S108-S122.
- Martínez, E.A., Cardenas, L., Pinto, R., 2003. Recovery and genetic diversity of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae) 20 years after El Niño 1982/83. *J. Phycol.* 39, 504-508.
- McCarthy, C., 1997. *Chromas*. Griffith Univ., Brisbane, Queensland.
- Morse, G.E., Farrell, B.D., 2005. Interspecific phylogeography of the *Stator limbatus* species complex: The geographic context of speciation and specialization. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36, 201-213.
- Müller, K., 2006. Incorporating information from length-mutational events into phylogenetic analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 667-676.
- Navarrete, S.A., Wieters, E.A., Broitman, B.R., Castilla, J.C., 2005. Scales of benthic-pelagic coupling and the intensity of species interactions: From recruitment limitation to top-down control. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102, 18046-18051.
- Nei, M. (Ed.), 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York, NY, USA.
- Omland, K.E., Baker, J.M., Peters, J.L., 2006. Genetic signature of intermediate divergence: population history of Old and New World Holarctic ravens (*Corvus corax*). *Mol. Ecol.* 15, 795-808.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86, 2766-2770.
- Ortlieb, I., Guzman, N., Marquardt, C., 2003. A longer-lasting and warmer interglacial episode during isotope MIS 11: Marine terrace evidence in tropical western Americas.

- Earth's climate and orbital eccentricity: The marine isotope stage 11 questions. *Geophysical Monographs* 137, 157-180.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST; testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Application Note* 14, 817-818.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* 16, 37-45.
- Rogers, A.R., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552-569.
- Rousset, F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145, 1219-1228.
- Santelices, B., Meneses, I., 2000. A reassessment of the phylogeographic characterization of Temperate Pacific South America. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 73, 605-614.
- Schmitz, P., Cibois, A., Landry, B., 2006. Molecular phylogeny and dating of an insular endemic moth radiation inferred from mitochondrial and nuclear genes: The genus *Galagete* (Lepidoptera: Autostichidae) of the Galapagos Islands. *Mol. Phylogenet. Evol.* 45, 180-192.
- Searles, R.B., 1978. The genus *Lessonia* Bory (Phaeophyta, Laminariales) in Southern Chile and Argentina. *Br. Phycol. J.* 13, 361-381.
- Simmons, M.P., Ochoterena, H., 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* 49, 369-381.
- Slatkin, M., 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47, 264-179.
- Sotka, E.E., Wares, J.P., Barth, J.A., Grosberg, R.K., Palumbi, S.R., 2004. Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandulata*. *Mol. Ecol.* 13, 2143-2156.

- Sunnucks, P., Wilson, A.C.C., Beheregaray, L.B., Zenger, K., French, J., Taylor, A.C., 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 9, 1699-1710.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4., Sunderland, Massachusetts.
- Thiel, M., Macaya, E.C., Acuña, E., Arntz, W.E., Bastias, H., Brokordt, K., Camus, P.A., Castilla, J.C., Castro, L.R., Cortés, M., Dumont, C.P., Escribano, R., Fernandez, M., Gajardo, J.A., Gaymer, C.F., Gomez, I., González, A.E., González, H.E., Haye, P.A., Illanes, J.E., Iriarte, J.L., Lancellotti, D.A., Luna-Jorquera, G., Luxoro, C., Manriquez, P.H., Marín, V., Muñoz, P., Navarrete, S.A., Perez, E., Poulin, E., Sellanes, J., Sepúlveda, H.H., Stotz, W., Tala, F., Thomas, A., Vargas, C.A., Vasquez, J., Vega, J.M.A., 2007. The Humboldt Current System of northern and central Chile. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 45, 195-344.
- Vanderpoorten, A., Long, D.G., 2006. Budding speciation and neotropical origin of the Azorean endemic liverwort, *Leptoscyphus azoricus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40, 73-83.
- Voisin, M., Engel, C.R., Viard, F., 2005. Differential shuffling of native genetic diversity across introduced regions in a brown alga: Aquaculture vs. maritime traffic effects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102, 5432-5437.
- von der Heyden, S., Prochazka, K., Bowie, R.C.K., 2008. Significant population structure and asymmetric gene flow patterns amidst expanding populations of *Clinus cottoides* (Perciformes, Clinidae): application of molecular data to marine conservation planning in South Africa. *Mol. Ecol.* 17, 4812-4826.
- Wares, J.P., Gaines, S.D., Cunningham, C.W., 2001. A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution* 55, 295-306.

- Yoon, H.S., Boo, S.M., 1999. Phylogeny of Alariaceae (Phaeophyta) with special references to *Undaria* based on sequences of the RuBisCo spacer region. *Hydrobiologia* 398/399, 47-55.
- Yoon, H.S., Lee, J.Y., Boo, S.M., Bhattacharya, D., 2001. Phylogeny of Alariaceae, Laminariaceae, and Lessoniaceae (Phaeophyceae) based on plastid-encoded RuBisCo spacer and nuclear-encoded ITS sequence comparisons. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21, 231-243.
- Yotsukura, N., Denboh, T., Motomura, T., Horiguchi, T., Coleman, A.M., Ichimura, T., 1999. Little divergence in ribosomal DNA internal transcribed spacer -1 and -2 sequences among non-digitate species of *Laminaria* (Phaeophyceae) from Hokkaido. *Japan Phycol. Res.* 47, 71-80.

Table 1. Geographical location of the sampled sites. N, number of individuals analyzed per site and for each marker; N_{TOTAL}, total number of individuals analyzed per site for the *atp8/trnS* population-level analysis; N_{SEQ}, number of samples analyzed by sequencing; N_{SSCP}, number of samples analyzed by SSCP.

Sampled sites	Abbreviation	Coordinates (Latitude/Longitude)	N atp8/ trnS	N RuBisCo spacer	N ITS1	N ITS2	Population analyse (atp8/trnS)		
							N _{TOTAL}	N _{SEQ}	N _{SSCP}
<i>L. nigrescens</i>									
Qda Mollendito-Perú	QMO	16°58'S / 72°07'W	0	0	0	0	30	2	30
Ilo-Perú	ILO	17°37'S / 71°20'W	5	5	1	2	0	-	-
Qda Camarones	CAC	19°11'S / 70°16'W	4	2	0	2	30	2	30
Pta Pichidalo	PCH	19°36'S / 70°14'W	2	2	2	2	29	3	27
Pta Patache	PAT	20°48'S / 70°12'W	2	2	0	0	28	3	26
Pta Coloso	COL	23°46'S / 70°29'W	5	5	0	1	30	5	30
Pan de Azúcar	SLD	26°09'S / 70°40'W	5	5	2	1	29	2	28
Morro Copiapó	MOC	27°12'S / 70°57'W	5	5	2	1	30	5	30
Cta Pajonal	PAJ	27°41'S / 71°02'W	3	3	2	2	30	3	30
Carrizal Bajo	CAR	28°04'S / 71°08'W	5	5	2	3	30	5	30
Huasco	HCO	28°27'S / 71°13'W	5	5	2	2	8	5	8
Aceituno	ACE	29°03'S / 71°29'W	5	5	1	2	29	29	0
Choros Norte	CHN	29°15'S / 71°27'W	2	2	2	2	30	2	30
Choros Sur	CHS	29°21'S / 71°19'W	5	5	3	3	30	5	30
El Temblador	TBL	29°28'S / 71°18'W	2	2	0	0	33	2	33
Isla Pájaros (Island)	IPA	29°35'S / 71°31'W	5	5	2	2	30	30	0
Arrayan	ARY	29°41'S / 71°19'W	2	2	1	2	33	3	33
Teatinos	TEA	29°49'S / 71°17'W	5	5	1	2	30	5	30
Coquimbo-Cruz	COZ	29°57'S / 71°21'W	5	5	1	2	28	28	0
Totoralillo	OTO	30°04'S / 71°22'W	4	4	1	2	30	5	30
Guaqueros	GUANA	30°11'S / 71°27'W	2	2	2	2	32	3	32
Tongoy	TON	30°14'S / 71°29'W	2	2	2	2	30	2	30
Pta Lengua de Vaca 2	PTLV2	30°15'S / 71°38'W	4	4	1	2	30	30	0
Cta San Lorenzo	CSLO	30°20'S / 71°40'W	2	2	0	2	0	6	-
Río Limari	RLI	30°44'S / 71°42'W	3	2	2	3	29	29	0
Pta Talca	PTAL	30°55'S / 71°40'W	5	5	2	2	31	8	31
Los Molles	LM	32°14'S / 71°31'W	2	2	1	2	33	2	33
Montemar	MTM	32°57'S / 71°32'W	2	2	2	2	33	12	33
Curauilla	CURAM	33°05'S / 71°43'W	5	5	2	2	30	16	30
El Quisco	QUIS	33°23'S / 71°42'W	2	2	2	2	30	18	14
Las Cruces	LC	33°30'S / 71°38'W	2	2	2	2	30	16	27
Matanzas	MAT	33°57'S / 71°52'W	2	2	1	2	30	8	25
Pichilemu	PICHI	34°23'S / 72°01'W	0	0	0	0	30	19	14
Constitución	CST	35°19'S / 72°25'W	2	2	0	0	12	12	0
Concepción	CONCE	36°30'S / 72°54'W	5	5	2	2	28	27	5
Mehuín	MEH	39°25'S / 73°12'W	5	5	2	2	30	30	0
Pucatrihue	PUC	40°32'S / 73°43'W	2	2	2	2	30	30	0
Pta Guabún (Chiloé Island)	GBN	41°48'S / 74°01'W	4	4	2	2	30	30	0
Total <i>L. nigrescens</i>	38 locations		127	124	52	66	1045	434	729
<i>L. trabeculata</i>									
Trompa del elefante - Perú	Lt-TRU	15°23'S / 75°09'W	1	1	1	1			
Cabañas	Lt-CAB	20°18'S / 70°08'W	1	1	1	1			
Huasco	Lt-HCO	28°27'S / 71°13'W	1	1	1	1			
Tongoy	Lt-TOY	30°14'S / 71°29'W	1	1	0	1			
Algarrobo	Lt-ALGA	33°21'S / 71°40'W	1	1	1	1			
Pta Estaquilla	Lt-EST	41°23'S / 73°44'W	1	1	1	1			
Ancud (Chiloé Island)	Lt-ANC	41°48'S / 74°01'W	2	1	1	1			
Total <i>L. trabeculata</i>	7 locations		8	7	6	7			
<i>L. flavicans</i>									
Fuerte Bulnes	Lfla-FBA	53°35'S / 73°41'W	1	1	1	1			
Isla Elisa	Lfla-ELI	54°19'S / 71°37'W	1	1	1	1			
Falkland Islands, U.K.		51°43'S / 57°54'W	0	1 ^a	1 ^a	1 ^a			
<i>L. vadosa</i>									
Fuerte Bulnes	Lvad-FBA	53°35'S / 73°41'W	1	1	1	1			
<i>L. corrugata</i>									
Tasmania		41°52'S / 148°18'E	0	1 ^b	1 ^b	1 ^b			

Data from GenBank (from Lane, 2006):

^a *L. flavicans*: accession numbers AY851543 (RuBisCo spacer) and AY857900 (ITSs).

^b *L. corrugata*: accession numbers AY851545 (RuBisCo spacer) and AY857902 (ITSs).

Table 2. Characteristics of the markers used for the multilocus approach. No ind, number of individuals; No alleles, number of alleles; *bp*, the length in base pairs of the sequenced region; *s*, number of polymorphic sites for substitution; *Indels*, number of polymorphic sites for indels; *H*, within-group mean gene diversity. Groups were defined with reference to the three *atp8/trnS* clades (Northern, Z30 and IA) and with reference to the two ITS1 clades (PP and IA).

	No ind	No alleles	<i>bp</i>	<i>s</i>	<i>Indels</i>	<i>H</i>
atp8/trnS						
PP	65	11	155	19	27	0.888 ± 0.014
Northern	28	5	155	6	0	0.730 ± 0.047
Z30	37	6	136	5	8	0.806 ± 0.032
IA	62	11	120	11	0	0.863 ± 0.025
<i>Lnig</i>	127	22	155	28	37	0.938 ± 0.007
All	138	27	159	42	46	0.946 ± 0.006
RuBisCo spacer						
PP	63	6	555	5	0	0.785 ± 0.022
Northern	26	3	555	2	0	0.569 ± 0.083
Z30	37	3	555	3	0	0.581 ± 0.042
IA	61	7	555	5	1	0.727 ± 0.048
<i>Lnig</i>	124	13	555	11	1	0.879 ± 0.013
All	136	21	555	24	7	0.899 ± 0.012
ITS1						
PP	25	14	330	20	10	0.940 ± 0.025
Northern	7	5	330	8	9	0.904 ± 0.103
Z30	18	9	325	13	3	0.895 ± 0.043
IA	27	10	329	11	6	0.874 ± 0.040
<i>Lnig</i>	52	24	336	34	16	0.953 ± 0.013
All	63	32	349	52	53	0.966 ± 0.009
ITS2						
PP	31	8	231	10	2	0.851 ± 0.028
Northern	9	2	229	5	0	0.222 ± 0.166
Z30	22	6	231	5	2	0.822 ± 0.037
IA	35	5	231	4	2	0.400 ± 0.100
<i>Lnig</i>	66	13	233	15	6	0.801 ± 0.041
All	78	19	237	28	11	0.854 ± 0.032

PP: Peruvian Province (composed of the Northern and Z30 groups), IA: Intermediate area. *Lnig*: *L. nigrescens* (composed of the PP and IA groups), All: all samples studied, including outgroup species.

Table 3. Genetic diversity within *L. nigrescens*. $\% \pi$, percentage of nucleotide diversity; H , mean (and standard deviation) gene diversity calculated overall individuals belonging to each clade, over location within clade and within each location (excluding those with less than 28 individuals, i.e. HCO and CST). Only polymorphic locations are shown. Within Z30 clade, the eight contiguous indels are considered as a unique mutation event.

atp8/trnS clade and polymorphic location	No individuals (No locations)	No haplotypes	$\% \pi$ (SD)	H (SD)
Northern clade	206 (7)	6	1.6116 ± 0.9658	0.8072 ± 0.0101
<i>SLD</i>	29	2	0.3305 ± 0.3198	0.5123 ± 0.0311
Mean over Northern locations	29.4	1.14	0.0472 ± 0.1249	0.0732 ± 0.1936
Z30 clade	308 (10)	6	1.1151 ± 0.7537	0.5690 ± 0.0224
<i>CHS</i>	30	2	0.1006 ± 0.1744	0.1287 ± 0.0792
Mean over Z30 locations	30.8	1.30	0.0101 ± 0.0318	0.0129 ± 0.0407
IA clade	511 (17)	18	2.0360 ± 1.2217	0.8762 ± 0.0060
<i>COZ</i>	28	2	0.0595 ± 0.1364	0.0714 ± 0.0652
<i>PTLV2</i>	30	2	0.0556 ± 0.1313	0.0667 ± 0.0613
<i>RLI</i>	29	2	0.1108 ± 0.1895	0.1330 ± 0.0814
<i>CURAM</i>	30	2	0.2395 ± 0.2912	0.2874 ± 0.0917
<i>QUIS</i>	30	2	0.1073 ± 0.1860	0.1287 ± 0.0792
<i>PICHI</i>	30	4	0.2184 ± 0.2761	0.2506 ± 0.1017
<i>MEH</i>	30	2	0.4291 ± 0.4139	0.5149 ± 0.2680
<i>PUC</i>	30	3	0.4559 ± 0.4300	0.5034 ± 0.0642
<i>GBN</i>	30	3	0.1628 ± 0.2338	0.1908 ± 0.0928
Mean over IA locations	30.1	1.72	0.1397 ± 0.1892	0.1263 ± 0.1694

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) for *atp8/trnS* population analysis excluding locations with less than 28 individuals (i. e. HCO and CST).

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation (%)	P-value
Among Northern, Z30 and IA clades	2	8860.756	13.76594	88.86	< 0.00001
Among populations within clades	31	1624.550	1.68507	10.88	< 0.00001
Within populations	961	40.899	0.04127	0.27	< 0.00001
Total	1024	10477.782	15.49227		

Figure legends:

Fig. 1: Geographic distribution of *L. nigrescens* alleles for each of the four markers. The transition zone is detailed at the right of the figure. The size of the circles is proportional to the number of individuals analyzed in each location (1 to 5). The color of the circles represents the different clades: orange-red corresponds to Northern clade (17°37'S-27°12'S), green to Z30 clade (27°41'S-30°14'S with the exception of ACE, IPA and COZ locations), blue to IA clade (30°15'-41°48'S with addition of ACE, IPA and COZ). For *atp8/trnS*, data correspond to the multilocus approach.

Fig. 2: Alignment of the 22 *atp8/trnS* haplotypes obtained for *L. nigrescens* and the outgroup species (multilocus approach data set). Only polymorphic sites are shown. The sequences are grouped by similarity for indel polymorphism, and lineages within *L. nigrescens* are indicated based on the phylogenetic tree (see Fig. 3). The two indel regions showing polymorphism within *L. nigrescens* are indicated by shaded area.

Fig. 3: Maximum likelihood trees based on *atp8/trnS* and ITS1 for *L. nigrescens* and corresponding *p*-distances. (A) *atp8/trnS*, data set of the multilocus approach, indels considered as missing data, (B) ITS1 data set. Support values are presented as maximum parsimony bootstraps, maximum likelihood bootstraps and Bayesian posterior probabilities, respectively, and “-“ indicates <50% support in a particular analysis. The color of allele names represents the *atp8/trnS* clade of the individuals showing these alleles (see Fig. 1) and the outgroup species are indicated. The matrices show the *p*-distances calculated among clades excluding indels, for both *atp8/trnS* and ITS1 markers.

Fig. 4. Maximum likelihood trees and unrooted networks for RuBisCo spacer haplotypes (A) and ITS2 ribotypes (B) within *L. nigrescens*. For tree legend, see Fig. 3. In networks, red squares represent hypothetical haplotypes or ribotypes not detected in this study and red bars indicate mutations (narrow bars: substitutions, large bars: deletion). The size of the circle is proportional to the number of individuals bearing a given allele. The colors of pie-charts correspond to the atp8/trnS clade of the individuals (see Fig. 3). Arrows indicate the ancestral alleles for each network (ancestrally determined with rooted networks, not shown).

Fig. 5. Haplotype networks of atp8/trnS marker within each clade, for the population-level study. (A) Northern clade, (B) Z30 clade and (C) IA clade. Relations among clades are shown in unrooted networks including (D) and excluding (E) indel sites. Location of the haplotypes on the map is indicated by arrows and with the location names (see Table 1 for abbreviations). See also legend of Fig. 4 for network components. Individuals showing a profile “C” on SSCP gels are represented as individuals having the atp4 haplotype (bold letters).

Fig. 6: Genetic differentiations of *L. nigrescens* locations within the three mitochondrial clades (IA, Z30 and Northern clades in blue, green and orange, respectively). Pairwise genetic distances, represented as $\pi/(1-\pi)$ are plotted against geographic distances.

Fig. 7: Mismatch distributions showing demographic history of the Northern and IA mitochondrial clade of *L. nigrescens*. The observed distributions (bars) are contrasted to their expected distribution under a model of spatial expansion (solid lines).

Supplementary Material

Table S1: Number of *atp8/trnS* haplotypes in each population of *L. nigrescens* for the multilocus data set.

Table S2: Number of RuBisCo haplotypes in each population of *L. nigrescens*.

Table S3: Number of ITS1 ribotypes in each population of *L. nigrescens*.

Table S4: Number of ITS2 ribotypes in each population of *L. nigrescens*.

Table S5: Sequences obtained for outgroup species.

Table S6: Number of *atp8/trnS* haplotypes in each population of *L. nigrescens* for the population-level study.

Table S7: GenBank accession numbers for each allele.

Fig. 1

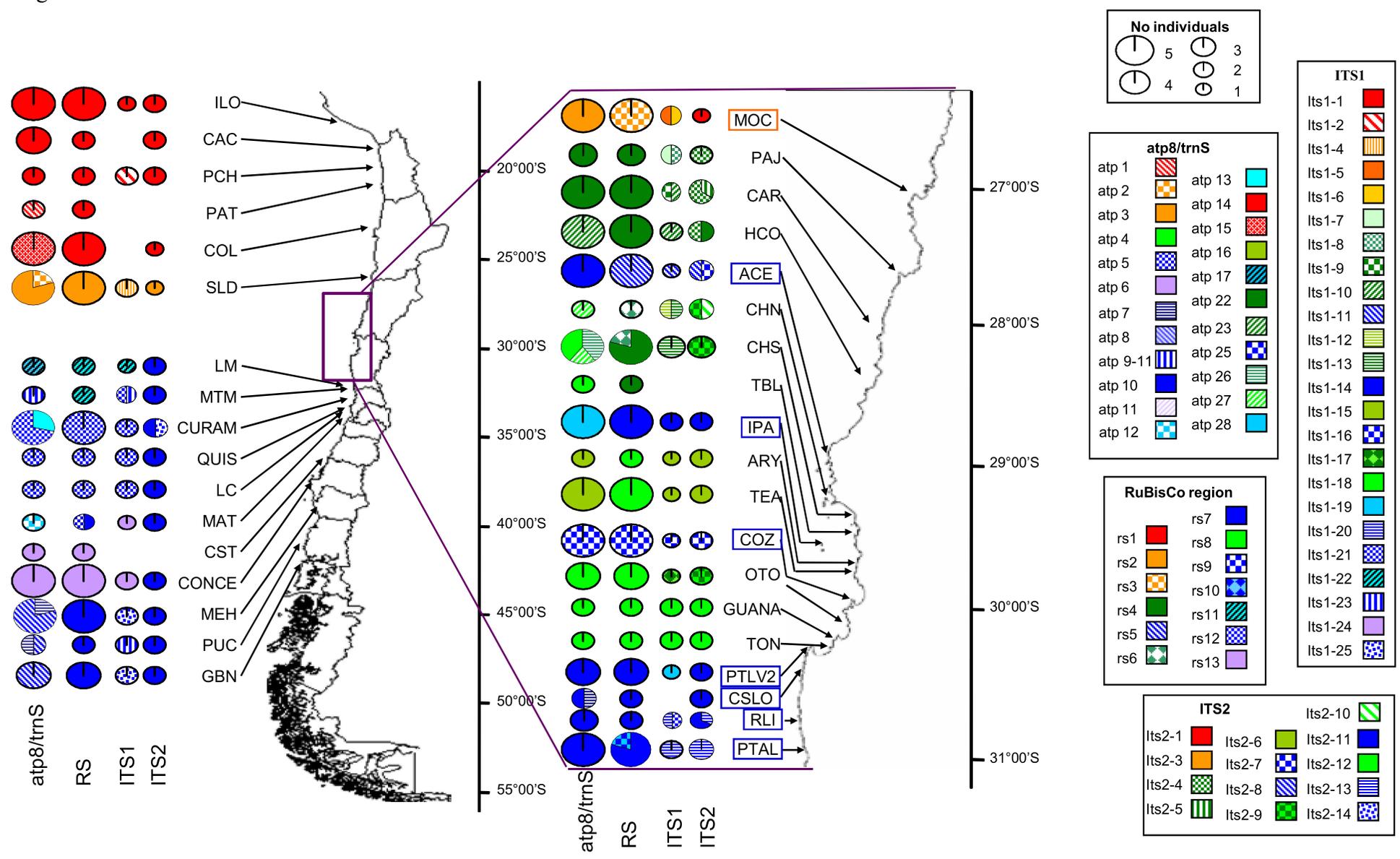
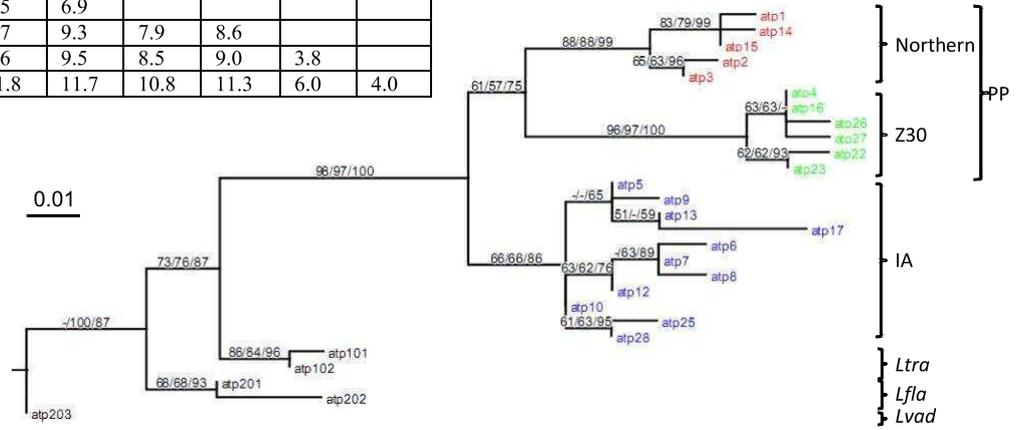


Fig. 3

A

atp8/trnS	Northern	Z30	PP	IA	<i>Lnig</i>	<i>Ltra</i>	<i>Lfla</i>
Z30	6.6						
IA	6.3	7.5	6.9				
<i>Ltra</i>	8.7	9.7	9.3	7.9	8.6		
<i>Lfla</i>	9.4	9.6	9.5	8.5	9.0	3.8	
<i>Lvad</i>	11.6	11.8	11.7	10.8	11.3	6.0	4.0



B

ITS1	PP	IA	<i>Lnig</i>	<i>Ltra</i>	<i>Lfla</i>	<i>Lvad</i>
IA	2.7					
<i>Ltra</i>	3.0	2.5	2.8			
<i>Lfla</i>	4.3	4.3	4.5	2.3		
<i>Lvad</i>	5.1	5.1	5.3	3.1	2.5	
<i>Lcorr</i>	5.1	5.1	5.7	3.8	3.2	2.7

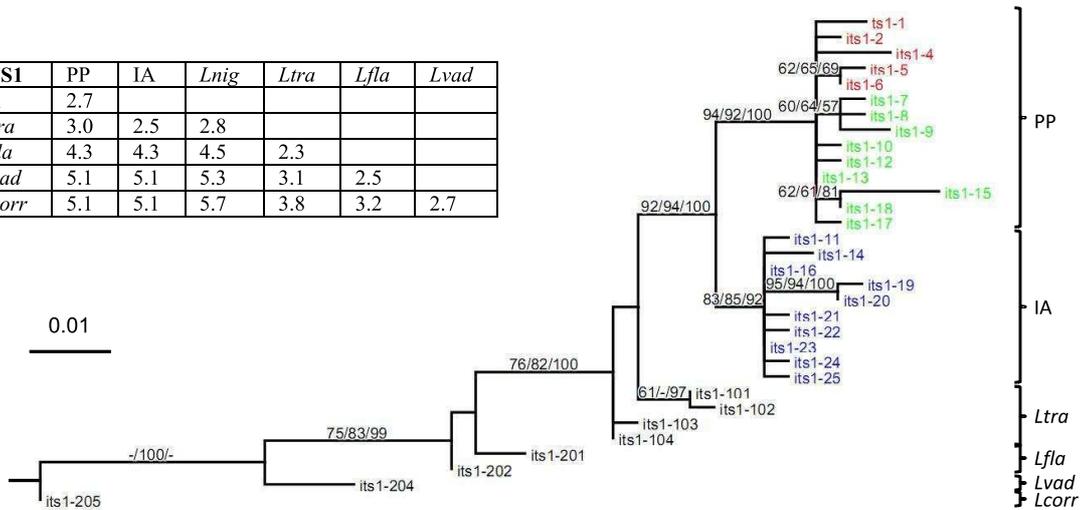
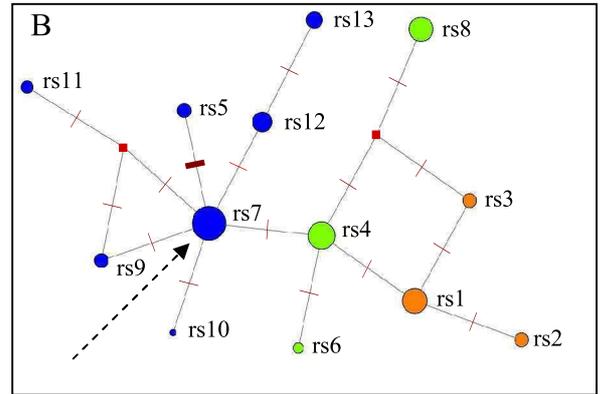
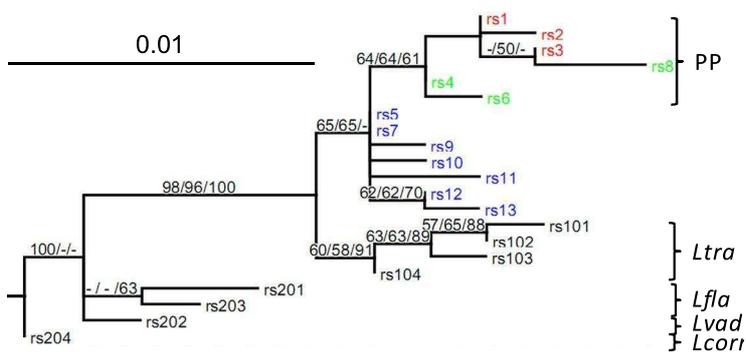


Fig. 4

A



C

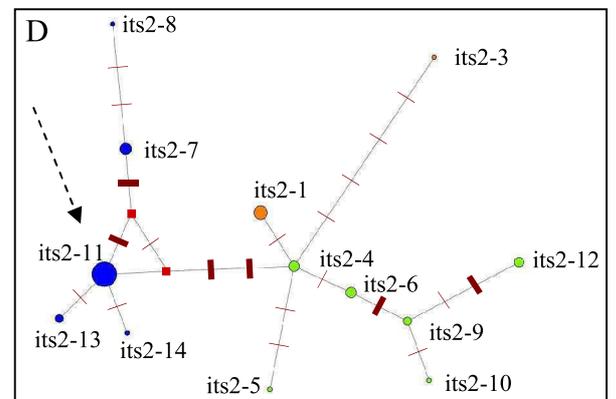
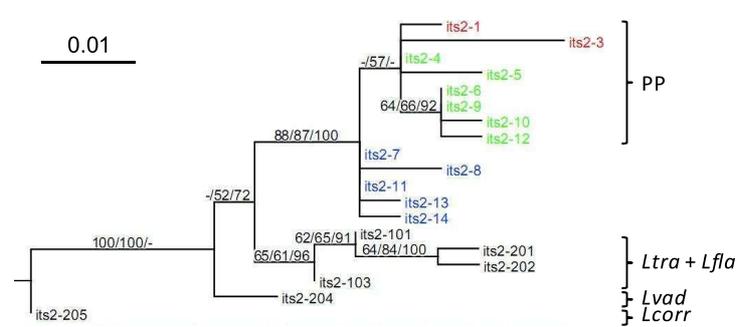


Fig. 5

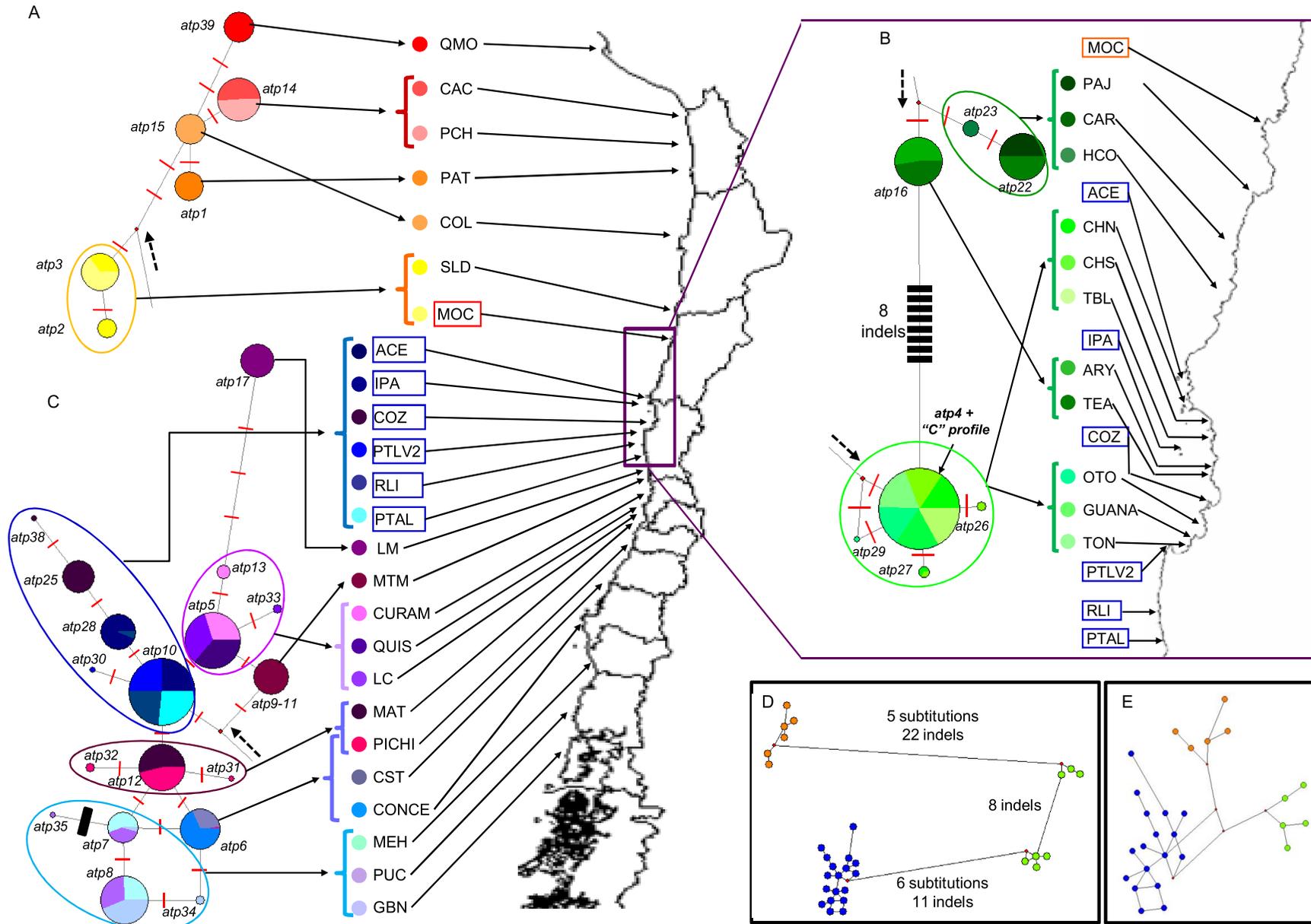


Fig. 6

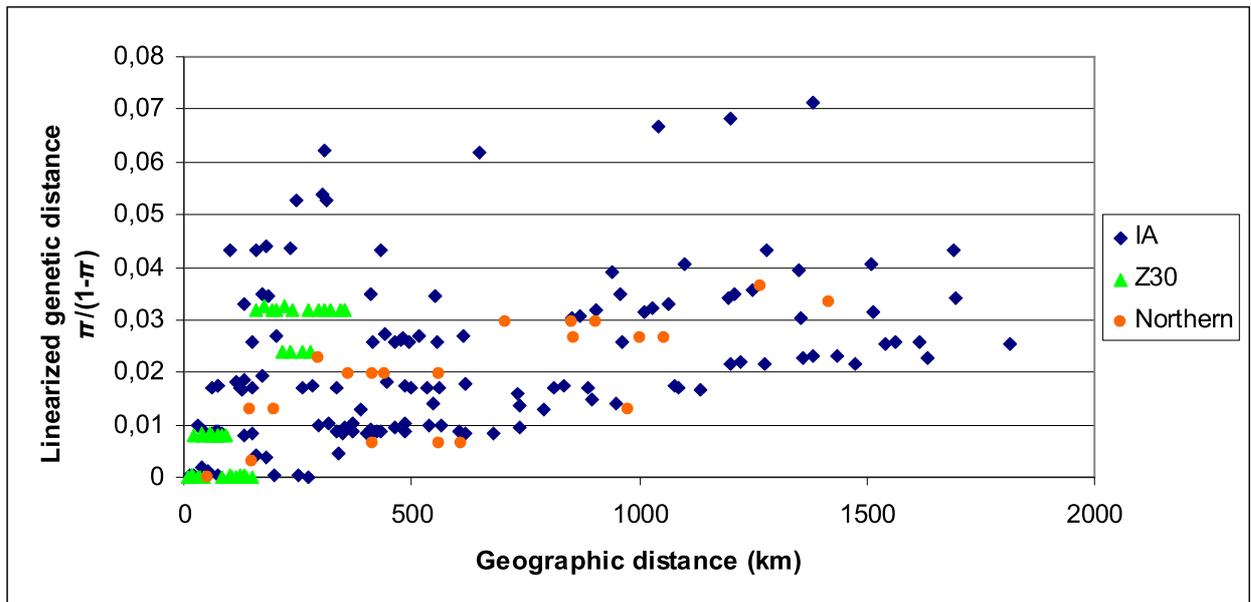
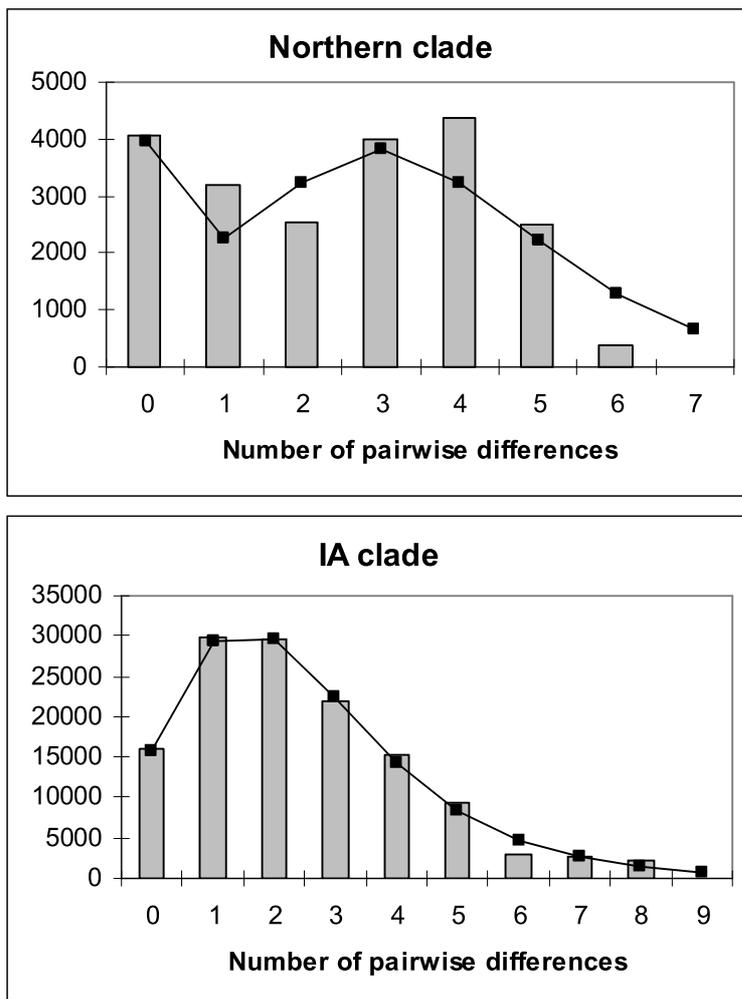


Fig. 7



ANNEXES 3.2

Development and characterization of nine polymorphic microsatellite markers in
the Chilean kelp *Lessonia nigrescens*

S. Faugeron, D. Veliz, G. Peralta, J. Tapia, F. Tellier, C. Billot et E. Martinez

Article paru dans la revue *Molecular Ecology Resources*

2009, 9 : 937-939

Koch RL (2003) The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science*, **3**, 1–16.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.

Poutsma J, Loomans AJM, Aukema B, Heijerman T (2008) Predicting the potential geographical distribution of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, using the CLIMEX model. *Biocontrol*, **53**, 103–125.

Raymond M, Rousset F (1995) GenePop, Version 1.2: population

genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity* **86**, 248–249.

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*, **4**, 535–538.

doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02517.x

© 2009 Blackwell Publishing Ltd

No claim to original US government works

Development and characterization of nine polymorphic microsatellite markers in the Chilean kelp *Lessonia nigrescens*

SYLVAIN FAUGERON,* DAVID VELIZ,† GIOCONDA PERALTA,* JAVIER TAPIA,* FLORENCE TELLIER,*‡ CLAIRE BILLOT§ and ENRIQUE MARTINEZ¶

*Center for Advanced Studies in Ecology and Biodiversity, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile, †Instituto de Ecología y Biodiversidad, Departamento de Ciencias Ecológicas, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile, ‡UMR7144 CNRS-Université Pierre et Marie Curie, Station Biologique, 29680 Roscoff, France, §UMR DAP, CIRAD, TA A-96/03, Av. Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France, ¶Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas, Universidad de La Serena, Casilla 559, La Serena, Chile

Abstract

A total of nine microsatellite loci were isolated and characterized in the Chilean kelp *Lessonia nigrescens* Bory. Using two different enriched libraries, we observed 1–14 alleles per locus in two samples of 21 kelp individuals each. The observed heterozygosities ranged from 0.05 to 0.80 and all loci are in Hardy–Weinberg equilibrium for one or both samples. Seventeen samples collected from different sites showed high allele diversity along the species distribution. The variation detected at these markers is currently being used for the study of populations of *Lessonia nigrescens* at different geographical scales.

Keywords: genetic variability, kelp, *Lessonia nigrescens*, microsatellite markers

Received 28 August 2008; revision accepted 26 October 2008

Lessonia nigrescens Bory is an intertidal kelp inhabiting the southeast Pacific coasts, from Cape Horn to southern Peru. It is a keystone species and a bioengineer of the intertidal communities. In order to establish kelp stocks, estimate some important demographic parameters and design effective conservation plans, the study of the distribution of the genetic diversity became a main concern. However, the progress of such research was severely limited by the poor quality and reduced statistical power of the random amplified polymorphic DNA markers used so

far (Martínez *et al.* 2003; Faugeron *et al.* 2005), highlighting the need for highly polymorphic, codominant and reliable molecular markers. Microsatellite markers have been developed in only one kelp species, *Laminaria digitata* (Billot *et al.* 1998), and cross-amplification in different kelp species within the order Laminariales has been unsuccessful, in particular with *L. nigrescens* (Martínez *et al.* 2005). For all these reasons, species-specific microsatellites markers were developed.

We describe here the isolation and characterization of nine polymorphic microsatellites markers for *L. nigrescens* using two enriched libraries. Genomic DNA was extracted from a bulk of immature and healthy fronds of *L. nigrescens*

Correspondence: Sylvain Faugeron.

E-mail: sfaugeron@bio.puc.cl

Table 1 Characteristics of the nine polymorphic microsatellite markers, including their polymorphism in two populations (PAz, Pan de Azucar, 26°07'S; 70°39'W and LC, Las Cruces, 33°30'S, 71°38'W) and for a sample of individuals from most of the species range (SR). T_m , annealing temperature; N , number of analysed individuals; N_A , number of alleles; ** $P < 0.01$ for significant departures from HWE, tested after 1000 permutation in Genetix (Belkhir *et al.* 1996)

Locus	Repeat motif (cloned allele)	Primer sequence (5'–3')	T_m (°C)	GenBank Accession no.	Sample	N	Size range (bp)	N_A	H_O/H_E
First Library									
LESS1T3	(GCA) ₈	F: CTCTAAACCAATGGGAAACA R: TTTTGGTTCGTCCTCTC	55	AY787003	SR	17	106–169	14	—
					PAz	21	115	1	—
					LC	20	106–124	5	0.60/0.53
LESS1D4	(CT) ₂₉	F: ACTTTGTGAAGCGGCATA R: CGTGCAATCATTATGTGTCC	55	AY787004	SR	17	160–200	11	—
					PAz	20	168–200	5	0.40/0.35
					LC	21	166–168	2	0.05/0.13
LESS1T9	(AAC) ₁₈ AAA(AAC) ₇	F: TATTCATGCCCGCATCTA R: ATTCCCACTACATACCACCA	55	AY787009	SR	17	221–335	19	—
					PAz	20	239–263	8	0.80/0.75
					LC	20	270–306	7	0.80/0.71
LESS1T11	(CAA) ₂ N ₂₉ (CAA) ₇	F: TAGGGCTAGTCGCCCACT R: TAGTTCGTTGGCGTGTGTT	58	AY787011	SR	11	152–164	5	—
					PAz	20	158–164	3	0.25/0.37
					LC	21	—	—	—
LESS1D17	(CAA) ₂ AAA(CAA) ₂ N ₂₀ (CAA) ₆ A(CAA) ₂ N ₁₅ (CAA) ₅ CAG (CAA) ₅	F: TTGACCACCAACATGTAAA R: CGATAGATGCTTTGCTCTTC	55	AY787019	SR	15	281–451	16	—
					PAz	20	281–317	9	0.75/0.76
					LC	21	302	1	—
Second Library									
LESS2D1	(TC) ₅ TT(TC) ₂ CC(TC) ₂ TT(TC) ₅ CC(TC) ₁₅	F: TTGTTTCACACCCTGGGATG R: CGGGGATAGCGGATGTTTC	54	FJ161703	SR	17	259–317	13	—
					PAz	21	259–317	11	0.71/0.78
					LC	21	287	1	—
LESS2D22	(GA) ₁₄ N ₆ (GA) ₃ AA(GA) ₃	F: TCCGATACGGGAGTCATC R: AATTTGTTTTTCGTCGTTGC	51	FJ161704	SR	17	101–127	13	—
					PAz	21	105–121	7	0.57/0.63
					LC	21	103	1	—
LESS2D25	(GA) ₂₈	F: TCCGCAAGGCAAGATTCCG R: GGCCTAGATTTGGTGGGC	54	FJ161705	SR	17	218–279	17	—
					PAz	21	220–266	14	0.67/0.88**
					LC	20	220–256	6	0.45/0.42
LESS2D26	(GA) ₁₂ AA(GA) ₅	F: AGACCCTCGCATCACCAC R: AGCAGTTTTAGACCCATAGC	52	FJ161706	SR	17	126–158	8	—
					PAz	21	134–138	3	0.50/0.46
					LC	21	132–136	3	0.43/0.52

using the phenol-chloroform method described by Sambrook *et al.* (1989). A first genomic library enriched for CA_n, GA_n and CAA_n microsatellite motifs was produced according to the protocol previously described (Billotte *et al.* 1999) with the following modifications: total DNA of *L. nigrescens* was restricted with the endonuclease *RsaI*; the selection of microsatellite sequences was performed using two biotin-labelled oligoprobes in a mix for simultaneous selection of CA, GA and CAA repeats, 5'-I*IIITCTCTCTCTCTCTCTC-3' and 5'-I*IIITGTGTGTGTGTGTGTG-3' where I* is a biotinylated Inosine. After ligation, transformation was made in Epicurian XL1-blue *Escherichia coli* strain. A total of 192 clones were transferred to microplates containing 150 µL of LB/Ampicilin solution. Insert sizes were estimated by agarose gel electrophoresis of insert PCR products using M13 universal primers. Gels were alkaline Southern transferred to Hybond N + nylon membrane (Amersham) and hybridized with a ³²P radiolabelled (GA)₁₅, (GT)₁₅ and (CAA)₁₀ probes. About 71% (136) of the clones contained a microsatellite region. From these, 42

were correctly sequenced, 17 presented a truly unique sequence, with motifs longer than 11 bp and flanking regions longer than 20 bp. Seventeen primer pairs were designed using Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Oligonucleotides were synthesized with an M-13 tail at the 5'-end of the forward primers. Of these 17 loci, only six gave reliable amplifications and five were polymorphic for 17 sampled across the species' range, with 5–19 alleles per locus (Table 1).

In order to increase the number of available loci, a second library was developed by ATG Genetics (Vancouver, BC, Canada). Template DNA was digested by the restriction enzyme *HaeIII* and the microsatellite enrichment by biotin capture of dinucleotide (TC_n and GA_n) microsatellites. The first 36 plasmid clones containing a dinucleotide motif were purified and amplified by PCR. Twelve primer pairs were designed using Primer3 and tested in our laboratory, of which four gave reliable amplifications and polymorphic markers with 13–17 alleles per locus (Table 1).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification mixtures (12.5 μ L) contained 25 ng of template DNA, 0.2 μ M of each primer (Table 1), 100 μ M of each dNTP, 2 mM of $MgCl_2$, 1.25 μ L 10 \times PCR buffer and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). Cycling conditions consisted of an initial denaturing step of 5 min at 94 $^{\circ}$ C, followed by 30 cycles of 45 s at 94 $^{\circ}$ C, 45 s at the specific temperature (Table 1), 2 min at 72 $^{\circ}$ C, and a final elongation step at 72 $^{\circ}$ C for 5 min. PCR products were run in ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer) using 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems) for allele identification with GeneScan (Applied Biosystems).

Intrapopulation analyses based on 42 individuals from two different sites separated by approximately 1000 km revealed 1–14 alleles per locus and population, showing observed heterozygosities from 0.05 to 0.80 at the polymorphic loci. No departure from Hardy–Weinberg equilibrium was observed in all but one case (Table 1), based on permutation tests implemented in Genetix software (Belkhir *et al.* 1996). However, several loci showed a pattern of diversity dependent of the geographical origin of the samples: LESS1T11 could not amplify samples from sites located at the south of 30 $^{\circ}$ S, while LESS1D17, LESS2D1 and LESS2D22 were monomorphic in Las Cruces, also located south of 30 $^{\circ}$ S. Finally, linkage equilibrium was rejected for only 2 out of 72 comparisons after Bonferroni correction (Rice 1989), indicating that each loci could be considered as independent markers. These preliminary results indicate that those loci will be useful for investigating the population genetic structure of *L. nigrescens*.

Acknowledgements

The present study is a joint effort under the framework of the LIA-DIAMS. It was supported by FONDECYT Grant 1060493. This work was also carried out as part of ECOS-CONICYT C02B02,

FONDAP-FONDECYT 1501-0001 Program 7; Financiamiento Basal Contrato PFB 023 Conicyt Chile and Contrato ICM-P05-002. We thank Claire Daguin for thorough help in primer design and polymorphism assessment of loci from the second bank.

References

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996) *Genetix 4.05, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Billot C, Rousvoal S, Estoup A *et al.* (1998) Isolation and characterization of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown alga *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Molecular Ecology*, **7**, 1778–1780.
- Billotte N, Lagoda P, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, **54**, 277–288.
- Faugeron S, Martínez EA, Correa JA, Billot C (2005) Long-term copper mine waste disposal in northern Chile associated with gene flow disruption of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens*. *Marine Ecology Progress Series*, **288**, 129–140.
- Martínez EA, Cárdenas L, Figueroa C, Vidal RU, Billot C (2005) Microsatellites of *Laminaria digitata* tested in *Lessonia nigrescens*: evaluation and improvement of cross amplification between kelps of two different families. *Journal of Applied Phycology*, **17**, 245–253.
- Martínez EA, Cárdenas L, Pinto R (2003) Recovery and genetic diversity in the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* 20 years after El Niño 1982/83. *Journal of Phycology*, **39**, 504–508.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical test. *Evolution*, **43**, 223–225.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02523.x

Published 2009. This article is a US Government work and is in the public domain in the USA.

Isolation and characterization of microsatellite loci in western North American *Anodonta* species

JER PIN CHONG,* JAYNE C. BRIM BOX,† DONNA A. NEZ† and KAREN E. MOCK*

*Department of Wildland Resources, Utah State University, Logan, UT 84322-5230, USA, †Confederated Tribes of the Umatilla Indian Reservation, Department of Natural Resources, Pendleton, OR 97801, USA

Abstract

We have developed and characterized 13 microsatellite loci from a group of *Anodonta* species in western North America, and demonstrated their utility in populations representing two major clades in this genus. Allelic diversity and polymorphic information content were high for all loci, although these characteristics varied across populations. Deviations from Hardy–Weinberg genotypic ratios were not detected, although the estimated frequency of

Estudio de los procesos de especiación asociados a una zona de transición biogeográfica: ejemplo del alga parda *Lessonia nigrescens*.

Resumen:

El entendimiento de los mecanismos que limitan el área de distribución natural de las especies es un desafío mayor en biodiversidad, porque se inscribe en la descripción de los cambios ambientales y en el análisis de su evolución. Utilizando una combinación de aproximaciones tanto ecológicas como genéticas, esta tesis tuvo como objetivo entender los mecanismos responsables del origen de la distribución de la diversidad genética, y los que contribuyen a su mantención en el alga parda *Lessonia nigrescens*. Esta gran alga parda forma verdaderos bosques y domina el intermareal rocoso a lo largo de la costa chilena. El primer objetivo de esta tesis fue el estudio de la filogeografía de esta especie, y la comparación con la especie filogenéticamente más cercana, pero presente en el submareal, *Lessonia trabeculata*. A través de una aproximación que utilizó marcadores provenientes de cada uno de los compartimentos genómicos, se puso en evidencia una concordancia entre la zona de transición biogeográfica descrita a los 30°S y una discontinuidad genética mayor en *L. nigrescens*, mientras que *L. trabeculata* no mostró estructuración genética alguna. La combinación de la aproximación filogeográfica con la genética de poblaciones permitieron demostrar que los dos linajes descritos para *L. nigrescens* constituyen especies crípticas, aislados reproductivamente y que, aunque tengan áreas de distribución que se sobreponen, nunca se encuentran en simpatría. Para entender mejor los procesos que actúan en la zona de contacto, experimentos de trasplantes recíprocos y de respuesta a la temperatura fueron realizados. Los resultados mostraron que la distribución de estas especies crípticas en la costa chilena está sin duda determinada por el efecto de factores ambientales. No obstante, la ausencia de simpatría a escala local no puede explicarse sin invocar mecanismos ligados al aislamiento reproductivo y/o a una interacción competitiva entre ambas especies. Este trabajo de tesis constituye un avance importante en la comprensión de los procesos de especiación en Laminariales, organismos poco estudiados. Además, la presencia de especies crípticas que tienen nichos ecológicos distintos tiene consecuencias directas sobre la gestión del recurso natural. En particular, la especie presente al norte de los 30°S (especie PP) parecería estar en gran peligro de extinción, debido a las importantes perturbaciones antrópicas y naturales que la afectan.

Palabras claves: aislamiento reproductivo, algas, divergencia adaptativa, especiación, filogeografía, Laminariales.

Study of speciation processes associated with a biogeographic transition zone: example of the brown alga *Lessonia nigrescens*.

Abstract:

Understanding the mechanisms that limit the natural range of species distribution is a major challenge in biodiversity, because it falls within the description of global change and the analysis of its evolution. Using a combination of both ecological and genetic approaches, this thesis aimed to understand the mechanisms responsible for the origin of the distribution of genetic diversity, and those that contribute to their maintenance in the brown algae *Lessonia nigrescens*. This large brown alga (kelp) forms veritable forests and dominates the intertidal rocky shore along the Chilean coast. The first objective of this thesis was to study the phylogeography of this species, and compared it with that of the phylogenetically closest species, *Lessonia trabeculata*, which is present at the subtidal level. Through an approach that used markers from each of the genomic compartment, it has been revealed a concordance between the biogeographic transition zone described at 30°S and a major discontinuity in *L. nigrescens*, whereas *L. trabeculata* did not show such any genetic structuring. The combination of the phylogeographic approach with population genetics have shown that the two lineages described in *L. nigrescens* constitute cryptic species, reproductively isolated and, although have overlapping distribution ranges, they are never observed in sympatry. In order to better understand the processes acting in the contact zone, reciprocal transplants and response to temperature experiments were made. The results show that the distribution of these cryptic species along the Chilean coast is undoubtedly under the effect of some environmental factors. However, the absence of sympatry at a local scale cannot be explained without including mechanisms linked to reproductive isolation and/or a competitive interaction between both species. Moreover, the presence of cryptic species having distinct ecological niches has a direct consequence on the management of the natural resource. Particularly, the species distributed northern of the 30°S (PP species) seems to have a high risk of extinction, because of the important anthropic and natural perturbations at which it is exposed.

Key words: reproductive isolation, algae, adaptive divergence, speciation, phylogeography, Laminariales.

Etude des processus de spéciation associés à une zone de transition biogéographique : exemple de l'algue brune *Lessonia nigrescens*.

Résumé :

La compréhension des mécanismes limitant l'aire de distribution naturelle des espèces est un enjeu majeur en biodiversité car elle s'inscrit dans la description des changements environnementaux et l'analyse de leur évolution. En utilisant une combinaison d'approches à la fois écologiques et génétiques, cette thèse a eu pour objectif de comprendre quels sont les mécanismes qui sont à l'origine de la distribution de la diversité génétique et ceux qui contribuent à son maintien chez l'algue brune *Lessonia nigrescens*. Cette grande algue brune forme de véritables forêts et domine l'étage intertidal rocheux le long des côtes chiliennes. Le premier objectif de cette thèse a été d'étudier la phylogéographie de cette espèce, et de comparer avec l'espèce phylogénétiquement proche mais présente sur l'étage subtidal, *Lessonia trabeculata*. Avec une approche utilisant des marqueurs issus de chacun des compartiments génomiques, il a été mis en évidence une concordance entre la zone de transition biogéographique décrite à 30°S et une discontinuité génétique majeure chez *L. nigrescens*, tandis que *L. trabeculata* ne montre pas de structuration génétique. La combinaison de l'approche de phylogéographie avec la génétique des populations a permis de montrer que les deux lignées décrites au sein de *L. nigrescens* constituent des espèces cryptiques qui sont isolées reproductivement et qui, bien qu'elles aient des aires de distribution chevauchantes, ne sont jamais observées en sympatrie. Afin de mieux comprendre les processus agissant dans la zone de contact, des expériences de transplantations réciproques et de réponse à la température ont été menées. Les résultats montrent que la distribution de ces deux espèces cryptiques le long des côtes chiliennes est sans doute sous l'effet de certains facteurs environnementaux, Cependant, l'absence de sympatrie à l'échelle locale ne peut pas s'expliquer sans invoquer des mécanismes liés à l'isolement reproducteur et/ou à une interaction compétitive entre espèces. Ces travaux de thèse constituent une avancée importante dans la compréhension des processus de spéciation chez les Laminariales, organismes peu étudiés. De plus, la présence d'espèces cryptiques ayant des niches écologiques distinctes a des conséquences directes sur la gestion de la ressource naturelle. En particulier, l'espèce présente au nord de 30°S (espèce PP) semblerait courir un risque d'extinction important, car soumise à des perturbations anthropiques et naturelles importantes.

Mots clés : isolement reproducteur, algues, divergence adaptative, spéciation, phylogéographie, Laminariales.