

Fortes différences des ADN mitochondriaux de populations de *Sardinella aurita* de la mer Méditerranée et de l'Atlantique Est

Marked mitochondrial DNA differences between Mediterranean and Eastern Atlantic populations of the round sardinella, Sardinella aurita

LOUNÈS CHIKHI^{*1,2,3}, JEAN-FRANÇOIS AGNÈSE^{2,3}, FRANÇOIS BONHOMME¹

¹Laboratoire Génome et populations, CNRS UPR 9060, Station méditerranéenne de l'environnement littoral, université Montpellier-II, 1, quai de la Daurade, 34200 Sète, France ;

²Centre de recherche océanologique d'Abidjan (CRO), rue des Pêcheurs, BP V 18, Abidjan, Côte-d'Ivoire ;

³Orstom, parc Agropolis, 34000 Montpellier, France

RÉSUMÉ

Nous avons procédé à l'analyse du polymorphisme de restriction de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial de sardinelles rondes (*Sardinella aurita*) échantillonnées dans l'Atlantique Est et la Méditerranée. Nos résultats montrent i) qu'il n'y a pas de flux génique entre les deux bassins, où l'on peut reconnaître deux groupes génétiques très différenciés malgré la continuité d'habitat, ii) que chacun des deux bassins est homogène génétiquement et iii) que la diversité haplotypique observée en Méditerranée est de deux à trois fois plus faible que celle de l'Atlantique. Ces résultats peuvent difficilement être expliqués par une entrée récente à partir de l'Atlantique Est. Ceci suggère que le bassin méditerranéen représente une entité génétiquement peu influencée par l'océan Atlantique Est, pour *S. aurita* comme pour d'autres espèces.

Mots clés : *S. aurita*, ADN mitochondrial, zoogéographie, Méditerranée, Atlantique Est, PCR-PLFR

ABSTRACT

Digestion by restriction enzymes has been carried out on polymerase chain reaction products of the mitochondrial DNA control region of round sardine (Sardinella aurita) samples coming from the Eastern Atlantic and the Mediterranean Sea. The results show i) that, though the habitat is continuous, there is no gene flow between the two basins where two genetically differentiated groups can be recognized, ii) that each basin is genetically homogeneous and, iii) that the haplotypic diversity in the Mediterranean is between two and three times smaller than that observed in the Atlantic. These results can hardly

Note présentée par Jean Rosa

Note remise le 20 janvier 1997, acceptée après révision le 18 mars 1997

*Correspondance et tirés à part

Adresse actuelle : Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via Trieste, 75, 35121 Padova PD, Italie

Courriel : chikhi@civ.bio.unipd.it

C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences
1997. 320, 289-297

Fonds Documentaire ORSTOM



010015994

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : B* 15994 Ex : 1

be explained by a recent colonization from the Eastern Atlantic. This suggests that, for *S. aurita* and some other species, the Mediterranean Sea is genetically little influenced by the Eastern Atlantic.

Key words: *S. aurita*, mitochondrial DNA, zoogeography, Mediterranean Sea, Eastern Atlantic, PCR-RFLP

Abridged version (see p. 296)

Introduction

La Méditerranée possède, malgré une relative pauvreté en nombre d'espèces et en biomasse, une grande richesse ichthyologique en termes de diversité taxinomique [1]. En effet, du fait d'une histoire complexe, tantôt ouverte sur l'océan Atlantique, tantôt fermée et presque asséchée [2–4], cette mer possède une ichthyofaune représentée aussi bien par des espèces à affinité boréale (*Sprattus*, *Platichthys*) que des espèces tropicales (*Balistes*, *Thalassoma*) ou encore cosmopolites (*Carcharodon*) [1].

Du fait de sa situation géographique, elle représente une situation intermédiaire entre des eaux froides et des eaux tropicales. Par ailleurs, comme c'est une mer fermée, sa salinité et sa température peuvent être assez différentes de celles de l'Atlantique Est avec lequel elle communique par le détroit de Gibraltar.

Parmi les espèces qui la peuplent, la sardinelle ronde, *Sardinella aurita*, est un petit clupéidé marin capable de longues migrations côtières dont la distribution est très étendue [5–7]. Elle est en effet présente dans toute la Méditerranée ainsi que le long des côtes africaines depuis le détroit de Gibraltar jusqu'en Angola. Elle est également décrite sur les côtes américaines depuis le sud du Brésil jusqu'au Massachussets [8]. Malgré cette très large répartition elle n'est véritablement abondante et d'une grande importance économique que dans les zones d'*upwellings* de la zone intertropicale où des centaines de milliers de tonnes sont pêchées chaque année [9–11]. En Méditerranée, elle est régulièrement pêchée en Israël, Égypte, Tunisie, Algérie et Maroc où les prises, plus modestes, se comptent en centaines ou milliers de tonnes chaque année [1, 5, 11, 12].

L'objectif de ce travail est de présenter quelques résultats fondés sur l'analyse de l'ADN mitochondrial d'échantillons de *S. aurita* provenant de la Méditerranée et de la côte ouest-africaine et de poser ainsi le problème de l'isolement de la Méditerranée [2, 13] par l'analyse des flux géniques avec le proche Atlantique. Un jeu de données plus important concernant la phylogéographie de l'ensemble de l'espèce *S. aurita* sera présenté ailleurs (Chikhi et al., en préparation). Par ailleurs, une méthode d'analyse du polymorphisme moléculaire développée par Hey [14] est utilisée ici et ses résultats sont comparés à ceux, plus classiques, fondés sur le F_{st} [15].

Matériels et méthodes

Échantillonnage

Six localités ont été échantillonnées, deux en Méditerranée (Algérie et France, 20 individus) et quatre sur les côtes de l'Afrique de l'Ouest (Ghana, Côte-d'Ivoire, Sénégal, Mauritanie, 35 individus) (figure 1). Tous les prélèvements ont été effectués sur les échantillons frais, sauf celui d'Algérie, envoyé congelé à Montpellier, et celui de Mauritanie, réalisé à Abidjan sur des poissons congelés auprès d'un navire de pêche revenant directement de Mauritanie. À chaque fois, un fragment de muscle a été prélevé et conservé dans l'éthanol à 95 %.

Extraction de l'ADN, amplification et digestion de la région de contrôle

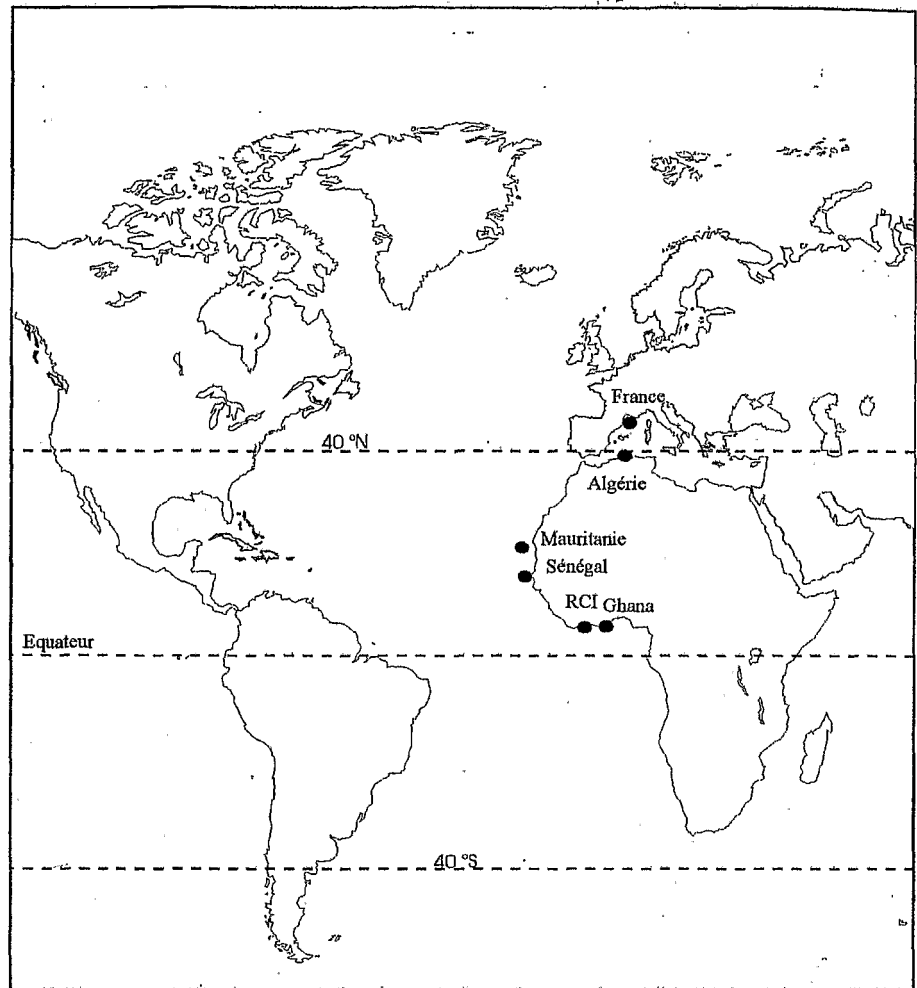
Pour chaque individu, l'ADN a été extrait d'environ 0,1 g de tissu, par une méthode classique Protéinase K / Phénol / Chloroforme-alcool isoamylique puis resuspendu dans 200 µL de tampon TE, pH 8,0. Pour l'amplification par PCR de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial, nous avons utilisé les deux amorces HN20 (5'-GTGTTA-TGCTTAGTTAAGC-3'), localisée dans le gène de l'ARNt-proline et LN20 (5'-ACCACTAGCACCCAAA-GCTA-3'), localisée dans le gène de l'ARNt-phénylalanine et définies par Louis Bernatchez (comm. pers.). La PCR a été réalisée dans 61,5 µL du milieu réactionnel suivant : $MgCl_2$ (4 mM), dNTPs (0,325 mM), HN20 et LN20 à 0,325 µM, *Taq* Polymérase (Promega) 2 U, tampon de l'enzyme 1X, entre 20 et 200 ng environ (2 µL) d'ADN. Le programme utilisé comprenait : 3 min à 94 °C, puis 35 répétitions du cycle suivant : i) 1 min à 94 °C, ii) 1 min à 50 °C et iii) 1 min à 72 °C, suivies d'un pas d'élongation de 10 min à 72 °C.

Le fragment amplifié est ensuite digéré par quatre enzymes de restriction ayant mis en évidence un polymorphisme important : *Taq* I, *Eco* RI, *Hae* III et *Alu* I. 13 µL de produit de PCR sont digérés avec cinq unités d'enzymes de restriction en suivant les recommandations du fabricant, puis soumis à électrophorèse sur gels d'agarose à 2, 3 et 4 %, suivant la taille des fragments, déterminée par comparaison avec celle d'un marqueur.

Variabilité et différence génétique entre populations

La variabilité génétique est mesurée par la diversité haplotypique H et estimée selon la formule $H = [n/(n-1)](1 - \sum x_i^2)$ où n est le nombre d'individus échantillonnés

Figure 1. Localisation des échantillons.



et x_i la fréquence du i^{e} haplotype [16]. Les paramètres F de Wright [17] permettent d'analyser la structure génétique des populations. Le F_{st} , notamment, mesure la différence entre populations en termes de fréquences alléliques sans utiliser l'information moléculaire. Le F_{st} peut être utilisé pour des données mitochondriales, en considérant chaque haplotype comme un allèle et chaque individu homozygote pour cet allèle [18]. Il varie entre 0, quand il n'y pas de différence, et 1 quand les populations sont fixées pour des allèles différents. Ce paramètre est estimé par la méthode de Weir et Cockerham [15], selon la formule $F_{st} = a/(a + b + c)$ où a , b et c sont les composantes de la variance correspondant aux sous-populations, aux individus dans les sous-populations et aux allèles dans un individu, respectivement. Pour tester un écart à l'hypothèse nulle d'absence de différence entre populations ($H_0 : F_{st} = 0$), nous avons utilisé une technique de rééchantillonnage. Pour cela on réalise une permutation aléatoire des génotypes entre populations. À chaque permutation une nouvelle valeur de F_{st} est estimée. En réalisant un grand nombre de permutations (1 000 dans notre cas), on engendre ainsi la distribution de F_{st} sous l'hypothèse nulle. La probabilité, p , d'avoir une valeur de F_{st} aussi grande ou supérieure à celle du jeu

de données non permuté sous l'hypothèse nulle peut alors être estimée par $P = (n + 1)/(N + 1)$ [19] où n est le nombre de permutations produisant des valeurs de F_{st} supérieures ou égales à la valeur réelle observée, et N est le nombre de permutations réalisées. Les estimations de H et F_{st} ainsi que les tests par permutations ont été réalisés à l'aide du logiciel Genetix 3.0 [20].

Hey [14] a récemment développé une méthode d'analyse de la différence génétique fondée sur la probabilité d'observation de différences fixées entre échantillons issus de la même population panmictique. Cette méthode utilise l'information moléculaire que le F_{st} n'utilise pas et se fonde sur la théorie de la coalescence [21]. Elle est particulièrement bien adaptée à l'analyse d'échantillons de taille réduite. L'application de cette méthode à nos données est discutée dans le texte. Nous justifions par ailleurs son utilisation en plus de celle du F_{st} .

Résultats

Profils de restriction et variabilité

Les profils de restriction des quatre enzymes utilisées et leur distributions géographiques sont présentés dans les

Tableau I. Profils de restriction par enzyme.

| Taq I | | Eco RI | | Hae III | | | Alu I | | | | | |
|-------|------------|--------|-----|------------|-----|-----|-------|-----|-----|------|-----|-----|
| A | B | A | B | A | B | C | A | B | C | D | E | F |
| | | 1000 | | | | | | | | 1000 | | |
| 580 | | | 525 | | | | | 700 | 700 | | | |
| | | | | <u>500</u> | 500 | 500 | | | | | | |
| | | | 475 | | | | | | | | | |
| 320 | <u>320</u> | | | | | | 420 | | | | 420 | 420 |
| | | | | | 300 | | 300 | 300 | | | | |
| | | | | | | 280 | 280 | | | | 280 | 280 |
| | 260 | | | | | | | | | | 220 | |
| 100 | 100 | | | | 200 | 200 | | | 200 | | | 200 |
| | | | | | | | | | 100 | | | 100 |
| | | | | | | | | | | | 80 | |

Les fragments soulignés sont des fragments inséparables sur gel d'agarose. Le profil D (*Alu I*) a été observé chez des sardinelles américaines (Chikhi et al., en préparation).

tableaux I et II. *Taq I* est une enzyme diagnostique qui permet de distinguer les échantillons atlantiques, qui sont tous de profil A, et méditerranéens qui sont tous de profil B (tableau II). Elle révèle donc, pour reprendre la terminologie de Hey [14], une différence fixée entre ces deux régions. Sans être diagnostique, *Eco RI* montre également des différences entre ces deux régions puisque tous les individus méditerranéens sont de profil B, tandis que les

individus échantillonnés en Atlantique sont majoritairement de profil A. Avec *Hae III* on met en évidence une situation similaire, car on n'observe à nouveau aucun polymorphisme chez les individus méditerranéens (profil A) tandis que les individus atlantiques présentent deux autres profils (B et C) en plus du profil A. *Alu I* révèle le plus grand nombre de profils et est, comme *Taq I*, diagnostique entre échantillons méditerranéens et atlanti-

Tableau II. Distribution géographique des haplotypes observés.

| | AAAA | AAAF | AABA | AABE | AACA | ABAA | ABBA | ABCA | BBAB | BBAC | n | H |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|------|
| France (11) | | | | | | | | | 9 | 2 | 2 | 0.33 |
| Algérie (9) | | | | | | | | | 8 | 1 | 2 | 0.22 |
| Mauritanie (4) | 1 | | 3 | | | | | | | | 2 | 0.50 |
| Sénégal (11) | 3 | | 5 | 1 | | | 2 | | | | 4 | 0.75 |
| Côte-d'Ivoire (10) | 3 | 1 | 4 | | 1 | 1 | | | | | 5 | 0.80 |
| Ghana (10) | | | 6 | | | | 3 | 1 | | | 3 | 0.60 |
| Méditerranée (20) | | | | | | | | | 17 | 3 | 2 | 0.27 |
| Atlantique (35) | 7 | 1 | 18 | 1 | 1 | 1 | 5 | 1 | | | 8 | 0.69 |
| Total (55) | 7 | 1 | 18 | 1 | 1 | 1 | 5 | 1 | 17 | 3 | 10 | 0.78 |

L'ordre des lettres correspondant à celui des enzymes *Taq I*, *Eco RI*, *Hae III* et *Alu I*. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre total d'individus analysés par échantillon. *n* est le nombre d'haplotypes observés et *H* est la diversité haplotypique.

Tableau III. Différence génétique par paires de populations.

| | Algérie | Mauritanie | Sénégal | Côte-d'Ivoire | Ghana |
|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| France | -0.091 NS | 0.621 *** | 0.464 *** | 0.443 *** | 0.541 *** |
| Algérie | | 0.689 *** | 0.499 *** | 0.479 *** | 0.581 *** |
| Mauritanie | | | -0.083 NS | -0.073 NS | -0.014 NS |
| Sénégal | | | | -0.049 NS | -0.001 NS |
| Côte-d'Ivoire | | | | | 0.079 NS |

Les valeurs de F_{st} estimées selon la méthode de Weir et Cockerham [15] peuvent être négatives et correspondent alors à des valeurs nulles ou très faibles de F_{st} . Cela peut arriver lorsque la variance de l'estimateur est importante par rapport à la valeur estimée. NS : non significatif ; *** $P < 0,001$.

ques puisqu'aucun haplotype ne se trouve dans deux régions. Les profils B et C ne sont présents qu'en Méditerranée tandis que les profils A, E et F ne le sont que dans l'Atlantique.

Les tableaux II et III montrent que la diversité haplotypique des échantillons méditerranéens ($H < 0,33$) est toujours inférieure à celle des échantillons atlantiques ($H > 0,5$). Ceci est vrai quelle que soit l'enzyme de restriction (à l'exception de *Taq I*). Par ailleurs, quand on regroupe les échantillons méditerranéens ($H = 0,27$, tableau II), la diversité reste inférieure à celle de n'importe quel échantillon atlantique.

Différence

La différence entre l'Atlantique et la Méditerranée est très importante et très significative ($F_{st} = 0,49$, $P < 0,001$). Ces deux régions n'ont ainsi aucun haplotype en commun (tableau II). En outre, il n'y a aucune différence entre échantillons atlantiques ($F_{st} = -0,001$, c'est-à-dire $F_{st} = 0$, NS), ou entre échantillons méditerranéens ($F_{st} = -0,091$, NS), tandis que toutes les comparaisons par paires entre échantillons méditerranéens d'une part et atlantiques de l'autre produisent des valeurs très importantes et très significatives de F_{st} (tableau III).

Hey [14] s'est intéressé à une mesure particulière du polymorphisme moléculaire : les différences fixées, c'est-à-dire les sites pour lesquels toutes les molécules d'un échantillon sont différentes de toutes celles d'un autre échantillon, comme celles mises en évidence par *Taq I*. En se fondant sur la théorie de la coalescence, cet auteur a déterminé la probabilité d'apparition de généalogies séparant tous les individus d'un échantillon de tous ceux d'un autre échantillon tirés tous deux de la même population panmictique. Il a ainsi montré que cette probabilité est très faible même pour des échantillons de taille réduite. La puissance de cette approche tient donc au fait que des tailles d'échantillons extrêmement faibles suffi-

sent à rejeter l'hypothèse que les deux échantillons proviennent de la même population. Ainsi, la simple comparaison des échantillons mauritanien ($n = 4$) et algérien ($n = 9$) montre qu'on peut rejeter l'hypothèse de panmixie au seuil $P < 1,5\%$ (voir tableau I de Hey [14]). Si on regroupe les données méditerranéennes d'une part ($n = 20$) et atlantiques d'autre part ($n = 35$), l'absence de structure est rejetée au seuil $P < 10^{-5}$. Cela montre que, si les tailles de nos échantillons peuvent sembler réduites, elles sont plus que suffisantes pour le niveau de différence observé entre les deux bassins. Le test de Hey bien que fondé sur une approche totalement différente du F_{st} confirme donc l'existence d'une très forte différence.

Discussion

Niveau de variabilité

Les résultats présentés montrent que la diversité observée en Méditerranée ($H \approx 0,27$) est très inférieure à celle observée dans n'importe quel échantillon atlantique ($H > 0,5$). Cela suggère que les tailles efficaces des populations méditerranéennes sont plus faibles et semble en accord avec les données d'abondance relatives de *S. aurita* en Méditerranée et dans l'Atlantique Est. Cependant, même si les populations méditerranéennes sont moins abondantes que les populations atlantiques, on peut considérer qu'avec plusieurs milliers de tonnes ce sont des dizaines de millions d'individus qui sont pêchés chaque année ($N \approx 10^7-10^8$). Pour un taux de mutation donné μ , la diversité haplotypique attendue à l'équilibre pour un gène mitochondrial est donnée par $H = (2N\mu)/(2N\mu + 1)$ [22]. Étant donné le taux de divergence nucléotidique proposé pour la région de contrôle [23], il est raisonnable de penser que, pour la longueur de molécule analysée, on a $\mu > 10^{-6}$. Ainsi, avec une taille efficace de l'ordre de $N = 10^7$, et en prenant la valeur $\mu = 10^{-6}$ (c'est-à-dire en minimisant N et μ), on devrait observer des valeurs de

l'ordre $H \approx 0,95$. Cela signifie donc que les tailles efficaces sont très nettement inférieures à celle suggérées par les données de l'abondance [24], aussi bien en Méditerranée que dans l'Atlantique.

Ce type de résultats a déjà été observé sur des données mitochondriales chez plusieurs espèces de poissons marins [25] ainsi que sur des données allozymiques de *S. aurita* et d'autres espèces de clupéidés [26] ou encore d'espèces très diverses [24]. Un tel écart entre abondance et taille efficace est souvent attribué au fait que les populations n'ont pas encore eu le temps d'atteindre l'équilibre mutation-dérive [24]. La faible variabilité observée serait alors due à un effondrement de population ancien tel ceux qui ont pu avoir lieu au cours des nombreuses glaciations du Pléistocène [25, 27]. Une autre cause possible évoquée chez les organismes marins est l'existence d'une importante variance du succès reproducteur [25, 26, 28, 29]. Hedgecock [29] a ainsi montré que la variance du succès reproducteur chez l'huître *Crassostrea gigas* pourrait engendrer une réduction de la taille efficace de plusieurs ordres de grandeur. Chez les clupéidés ainsi que chez d'autres organismes marins, l'instabilité démographique pourrait également être la cause de très importantes réductions de taille efficace [26]. Il est toutefois généralement difficile de déterminer laquelle des ces trois principales causes peut être à l'origine de la faible variabilité observée chez une espèce particulière. L'analyse de la différence génétique des populations permet cependant d'apporter un élément de réponse.

Différence génétique

Deux bassins indépendants

Le résultat le plus frappant est la très forte différence génétique entre les échantillons méditerranéens et atlantiques. Ce résultat est d'autant plus significatif que chacun de ces deux groupes est très homogène ($F_{st} \approx 0$). Observer de faibles valeurs de F_{st} peut cependant être artificiel. Ainsi, lorsqu'on n'observe qu'une faible variabilité, les F_{st} sont forcément faibles mêmes si les populations sont isolées [15]. Dans le cas de l'Atlantique Est, et peut-être dans une moindre mesure entre nos deux échantillons méditerranéens également, les faibles valeurs de F_{st} observées ne sont pas dues à un manque de variabilité et reflètent donc bien l'homogénéité génétique de *S. aurita* sur les côtes de l'Afrique de l'Ouest. Cette absence de différence n'est pas très étonnante car *S. aurita* est une espèce très mobile et capable de longues migrations côtières de l'ordre de 3 000 km aller-retour dans la région sénégal-mauritanienne [30]. Par ailleurs, cela est en accord avec les faibles niveaux de différence génétique généralement observés chez les poissons marins [31–33].

En revanche, tout indique que les flux géniques sont nuls ou extrêmement réduits entre les populations méditerranéennes et atlantiques (nous n'avons détecté sur notre échantillonnage aucun haplotype en commun). Ce résultat ne peut pas être dû aux tailles apparemment

réduites des échantillons car il se retrouve dans plusieurs échantillons indépendants. Eût-il été observé sur deux échantillons méditerranéen et atlantique de 20 et 35 individus, respectivement, qu'il n'aurait pas permis de déterminer si la forte différence était bien liée aux deux bassins. Par ailleurs, la méthode proposée par Hey [14] est adaptée aux échantillons de taille réduite comme le montre la comparaison entre les échantillons mauritanien et algérien ($P < 1,5\%$). Ce résultat témoigne donc de l'existence d'une barrière aux échanges génétiques entre les deux groupes. Plusieurs causes peuvent être invoquées pour expliquer cet isolement génétique. La température des eaux marocaines atlantiques est légèrement plus faible que celles des eaux méditerranéennes. On observe ainsi une réduction des populations de sardinelles dans les eaux marocaines où la sardine, *Sardina pilchardus*, devient l'espèce majoritaire [34]. Les conditions hydrologiques et hydroclimatiques peuvent particulièrement influencer la distribution relative de ces deux espèces. Ainsi, lorsque le courant des Canaries est particulièrement fort, les sardines peuvent devenir plus abondantes que les sardinelles au niveau de Dakar [35]. À l'inverse, Belvèze [36] rappelle que ce n'est que depuis les années 1970 que la sardine est devenue prépondérante dans les eaux marocaines. En Méditerranée, *S. aurita* est principalement pêchée dans les eaux méridionales, plus chaudes tandis que la sardine reste plus abondante partout ailleurs. La courantologie pourrait également jouer un rôle de barrière. Pérès et Picard [37] ont montré que la distribution de certains mollusques autour du détroit de Gibraltar peut être largement expliquée par la courantologie de cette zone. Le décalage des périodes de reproduction des différentes populations de sardinelles, qui sont conditionnées par la température de l'eau, pourrait également participer à cet isolement. Ainsi, la période de reproduction a lieu de juillet à septembre en Méditerranée occidentale tandis qu'elle a lieu principalement de mai à juillet entre le Sénégal et la Mauritanie [5].

Aucun des obstacles que nous avons évoqués jusqu'à présent, température, hydroclimatologie, courantologie, présence des sardines, périodes de reproduction décalées, n'est absolu. Cependant leur conjugaison peut représenter un sérieux frein aux échanges génétiques. L'absence d'haplotype commun entre ces deux régions indique que, quelle que soit la cause récente ou ancienne de cet isolement, elle doit être particulièrement forte. Notre échantillonnage ne permet cependant pas de déterminer où se trouve la frontière entre les deux groupes génétiques indépendants. Un échantillonnage plus fin sur l'ensemble des côtes marocaines, algériennes et espagnoles permettrait d'approfondir ces résultats.

Il est intéressant de noter que l'absence ou la limitation des flux géniques entre ces deux régions contiguës se retrouve chez un certain nombre d'autres espèces. Chez le muge *Mugil cephalus*, Crosetti et al. [38] n'ont observé aucune différence entre trois échantillons méditerranéens allant de l'Italie à la Turquie tandis que leur échantillon de

Mauritanie ne possédait aucun haplotype méditerranéen. Une différence importante entre échantillons méditerranéens et atlantique a également été observée chez l'espadon *Xiphias gladius* [39], qui est pourtant capable de migration transocéaniques ou chez le flet, *Platichthys flesus*, [40]. Chez la moule *Mytilus galloprovincialis* enfin, Quesada et al. [41] ont observé une différence très nette entre un groupe méditerranéen et un autre majoritairement atlantique. Il est intéressant de noter que, dans ce cas, l'échantillonnage a permis de déterminer que la frontière ne se trouvait pas au niveau de Gibraltar mais à l'intérieur de la Méditerranée, au niveau du front océanique d'Almeria-Oran. Ce front marque la rencontre des eaux de surface atlantiques et méditerranéennes et est caractérisé par l'existence de très forts gradients de salinité et de température. Cependant, il est possible également de trouver des cas d'espèces où la différence génétique n'est pas aussi marquée telle la barbue *Scophthalmus rhombus* [42], la sole *Solea vulgaris* [43] ou la palourde *Ruditapes decussatus* [44].

Le fait que les deux bassins échantillonnés ne comportent aucun haplotype en commun semble indiquer que la réduction de variabilité génétique observée en Méditerranée n'est probablement pas due à un effet fondateur récent à partir de sardinelles des côtes d'Afrique de l'Ouest. Si les sardinelles méditerranéennes sont bien issues de sardinelles « africaines », directement ou à travers des populations intermédiaires, on ne peut expliquer l'absence d'haplotypes commun que par l'ancienneté de cet événement. En effet, la théorie de la coalescence montre que l'on n'observera aucun haplotype en commun entre deux populations totalement isolées que si la séparation est ancienne : de l'ordre de $2N$ générations pour des gènes mitochondriaux, N étant la taille efficace [21, 45]. Même si celle-ci est plus faible qu'on ne le suppose en général comme discuté ci-dessus, cela représente tout de même plusieurs milliers et probablement dizaines de milliers de générations.

Deux espèces jumelles ?

Jusqu'à présent nous avons implicitement considéré qu'il n'y a qu'une seule espèce. Pourtant, une autre interprétation pourrait également faire appel à la présence de deux espèces jumelles, c'est-à-dire l'existence de deux taxons morphologiquement identiques mais non interféconds. En fait, cette hypothèse n'explique pas plus pourquoi et comment la séparation entre les deux bassins a pu se faire. En d'autres termes, elle ne ferait donc que rajouter un mécanisme de plus (l'isolement reproducteur) pour expliquer la différence observée, sans résoudre vraiment le problème des échanges entre la Méditerranée et l'Atlantique. D'un point de vue pratique, elle est cependant difficile à réfuter.

Limites du F_{st}

Nous avons vu que deux approches différentes montrent l'existence d'une différence très nette entre les échan-

tillons méditerranéens et atlantiques. Étant donné le niveau de différence observé, cela n'est guère étonnant et il peut sembler inutile d'utiliser diverses approches. Cependant, l'existence de la méthode de Hey permet de revenir ici sur les limites inhérentes à l'estimation des F_{st} .

Pour cela on peut prendre le cas de populations fixées chacune pour un haplotype différent A et B. Il est clair que par définition le F_{st} sera égal à 1. Si les deux haplotypes peuvent être analysés plus finement (par séquençage ou en augmentant le nombre d'enzymes de restriction) on pourra montrer que, par exemple, A est subdivisé en A1, A2 et A3 et B en B1 et B2. Il apparaît alors que le F_{st} entre deux populations initialement fixées pour A et B respectivement ne sera plus égal à 1, alors que les populations seront toujours aussi différenciées. C'est exactement ce que nous observons avec nos données : la Méditerranée et l'Atlantique n'ont aucun haplotype en commun et pourtant nous obtenons une valeur de F_{st} de 0,49. Quand il existe des différences fixées, l'approche de Hey a l'avantage de permettre de comparer des probabilités, à la différence des valeurs de F_{st} .

Conclusion

L'analyse de l'ADNmt de *S. aurita* a permis de poser pour cette espèce d'un point de vue génétique le problème du statut zoogéographique de la Méditerranée par rapport à l'océan Atlantique. Ekman [13] a favorisé l'idée que le détroit de Gibraltar ne représentait pas une frontière zoogéographique importante tandis que Klausewitz [2] a considéré que la Méditerranée était une unité zoogéographique à part entière, sur la base du grand nombre d'espèces endémiques. À la question « La Méditerranée est-elle juste un appendice de l'Atlantique Est (78 % des poissons méditerranéens sont d'origine atlantique, [1]) ou fonctionné-t-elle comme un bassin autonome présentant un faible niveau d'échange au niveau de Gibraltar ? », nos données répondent en faveur d'une situation d'autonomie génétique. Cette situation d'autonomie reflète des causes probablement complexes puisqu'elle touche des organismes aux capacités migratrices très diverses. Les résultats obtenus par Quesada et al. [41] sur *M. galloprovincialis* semblent indiquer que pour cette espèce la différence de part et d'autre de Gibraltar soit très ancienne. Cela pourrait également être le cas pour *S. aurita* comme le suggère la très forte différence génétique et notamment l'absence d'haplotypes en commun entre les deux bassins. Il va donc devenir intéressant d'accumuler les données sur un nombre grandissant d'espèces, pour savoir quelle est la part des différents facteurs intervenant pour limiter les échanges d'individus, ou tout au moins leur impact génétique, et pouvant ainsi expliquer le fonctionnement particulier de la Méditerranée par rapport à son grand voisin.

ABRIDGED VERSION

The round sardinella (*Sardinella aurita*) is a small migratory pelagic fish that is widely distributed. It is present in the Mediterranean Sea, off West Africa from the Strait of Gibraltar to southern Angola and off the American coasts from southern Brazil to Massachusetts. The distribution is continuous with no gap between the Mediterranean and East Atlantic populations. Fishes from the Mediterranean Sea (Algeria and France) and the Eastern Atlantic (Mauritania, Senegal, Côte-d'Ivoire and Ghana) were sampled in order to determine whether there was gene flow between the two basins. We amplified the control region by polymerase chain reaction (PCR) and digested the 1000-bp long amplified fragment by restriction enzymes. The analysis by four informative enzymes revealed eight different haplotypes among Atlantic samples and two in Mediterranean ones. The haplotype diversity was much smaller in Mediterranean (0.22 and 0.33) than in Atlantic (range 0.50–0.80) samples. We also observed fixed restriction sites relative to either basin. As a consequence the two basins had no common haplotype. Population structure as measured by F_{st} was high and significant ($F_{st} = 0.49$, $P < 0.001$). Taking into account the fixed

differences observed, a molecular information not used when estimating F_{st} , we find even higher levels of significance ($P < 10^{-5}$). On the contrary, each basin was found to be genetically homogeneous ($F_{st} \sim 0$) which can be explained by the high migratory ability of *S. aurita*. This suggests the existence of some barrier to gene flow between Mediterranean and Atlantic samples. Differences in temperature, salinity, reproduction period as well as importance of the currents could contribute to the isolation between the two basins but do not represent absolute barriers.

The low level of genetic variability of Mediterranean samples as compared to Atlantic ones could be due to either a colonization event or by smaller effective sizes. The fact that the two contiguous regions share no haplotype suggests that the foundation from Eastern Atlantic population is ancient. Some other marine species also show high genetic differentiation between Atlantic and Mediterranean samples. This argues in favor of the genetic independence of the Mediterranean Sea. The absence of gene flow could also be explained by the presence of two sibling species. Though this hypothesis cannot be rejected on the basis of our data it is not contradictory with the previous conclusion.

Remerciements : Nous tenons à remercier F. Djabali et R. Chalabi pour les échantillons algériens, P. Sacchi pour l'échantillon sétois et les personnels des CRO et Centres Orstom d'Abidjan et Dakar pour leur accueil chaleureux. Nous remercions également P. Borsa pour ses critiques et remarques et D. Anxolabéhère et E. Marchal pour leur soutien continu. L. Chikhi a été financé par une bourse du ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur accordée à l'Orstom.

RÉFÉRENCES

- Quignard J.P. 1978. La Méditerranée creuset ichthyologique. *Bull. Zool.* 45 (Suppl. 11), 23-36
- Klausewitz W. 1968. Remarks on the zoogeographical situation of the Mediterranean and the Red Sea. *Ann. Mus. Civ. St. Nat. Genova* 77, 323-328
- CLIMAP Project Members 1976. The surface of the Ice-Age earth. *Science* 191, 1131-1137
- Hsü K.J., Montadert L., Bernoulli D., Cita M.B., Erickson A., Garrison R.E., Kidd R.B., Mèlières F., Müller C., Wright R. 1977. History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature* 267, 399-403
- Ben-Tuvia A. 1960. Synopsis of biological data on *Sardinella aurita* of the mediterranean sea and other waters. In : *FAO Fisheries Biology Synopsis* 14, 287-312
- Postel E. 1960. Rapport sur la sardinelle (*Sardinella aurita* Valenciennes) (Atlantique africain). In : *FAO Fisheries Biology Synopsis* 6, 55-95
- Whitehead P.J. 1985. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidel). *Fish. Synopsis* 125, 1-303
- Kinsey S.T., Orsoy T., Bert T.M., Mahmoudi B. 1994. Population structure of the Spanish sardine *Sardinella aurita*: natural morphological variation in a genetically homogeneous population. *Marine Biology* 118, 309-317
- Longhurst A.R., Pauly D. 1987. *Ecology of Tropical Oceans*. Academic Press, San Diego, 407 p.
- Lowe-McConnell R.H. 1987. *Ecological Studies in Tropical Fish Communities*. Cambridge Univ. Press, Cambridge (Tropical Biology series), 382 p.
- Anonyme. 1992. Fishery statistics, catches and landings. FAO yearbooks, Vol. 74
- Bounhiol J.-P. 1921. Sur la biologie de l'allache (*Sardinella aurita*, Valenciennes) des côtes de l'Algérie. Rapport présenté au Congrès de Starsbourg de l'Association française pour l'avancement des sciences le mardi 27 juillet 1920
- Ekman S. 1967. *Zoogeography of the Sea*. New Ed., Londres
- Hey J. 1991. The structure of genealogies and the distribution of fixed differences between DNA sequence samples from natural populations. *Genetics* 128, 831-840
- Weir B.S., Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15, 323-354
- Weir B.S. 1990. *Genetic Data Analysis*. Sinauer, Sunderland, MA
- Noreen E. 1989. Computer-intensive methods for testing hypotheses: an introduction. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L., Bonhomme F. 1996. Genetix 3.0. Logiciel d'analyse de données de génétique des populations
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105, 437-460
- Crow J., Kimura M. 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper and Row Publishers
- Harpending H.C., Sherry S.T., Rogers A., Stoneking M. 1993. The genetic structure of human populations. *Curr. Anthr.* 34, 483-496
- Nei M., Graur D. 1984. Extent of polymorphism and the neutral mutation theory. *Evol. Biol.* 17, 73-118
- Bowen R.W., Avise J.C. 1990. Genetic structure of Atlantic and Gulf of Mexico populations of sea bass, menhaden, and sturgeon: influence of zoogeographic factors and life-history patterns. *Mar. Biol.* 107, 371-381

26. Chikhl L., Bonhomme F., Agnès J.-F. (soumis). Reduced genetic variability in a widely distributed and abundant clupeid species, *Sardinella aurita*. New empirical results and interpretations
27. Roberts N. 1984. Pleistocene environments in time and space. In : *Hominid Evolution and Community Ecology, Prehistoric Human Adaptation in Biological Perspective* (R. Foley, ed.), Academic Press, Londres, 25-53
28. Hedgecock D., Sly, F. 1990. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 88, 21-39
29. Hedgecock D. 1994. Does variance in reproductive success limit the effective population sizes of marine organisms ? In : *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (A.R. Beaumont, ed.), Chapman & Hall, Londres, 122-134
30. Fréon P. 1986. Réponses et adaptations des stocks de clupéidés d'Afrique de l'Ouest à la variabilité du milieu et de l'exploitation : analyse et réflexion à partir de l'exemple du Sénégal, Tome I. Ph-D thesis, université de Marseille-II
31. Gyllensten U. 1985. The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous and freshwater species. *J. Fish. Biol.* 26, 691-699
32. Hedgecock D. 1994. Population genetics of marine organisms. U.S. GLOBEC News, N°6, 1-11
33. Ward R.D., Woodward M., Skibinski D.O.F. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. *J. Fish Biol.* 44, 213-232
34. Copace (Comité des pêches pour l'Atlantique Centre-Est), FAO, 1994. Groupe de travail ad hoc sur les sardinelles et autres espèces de petits pélagiques côtiers de la zone nord du Copace
35. Binet D. 1988. Rôle possible d'une intensification des alizés sur le changement de répartition des sardines et sardinelles le long de la côte ouest africaine. *Aquat. Living Resour.* 1, 115-132
36. Belveze H. 1991. Influence des facteurs hydroclimatiques sur la pêche marocaine des petits pélagiques côtiers. In : *Pêches ouest-africaines. Variabilité, instabilité et changement* (Cury P., Roy C., eds.), Éditions de l'Orstom, Paris, 187-191
37. Pérès J.M., Picard J. 1980. Faunes « froides » et faunes « chaudes » de la Méditerranée quaternaire. Explor. Sci. Mer Médit., Station marine d'Endoume, faculté des sciences de Marseille, 509-514
38. Crosetti D., Nelson W.S., Avise J.C. 1994. Pronounced genetic structure of mitochondrial DNA among populations of the circumglobally distributed grey mullet (*Mugil cephalus*). *J. Fish Biol.* 44, 47-58
39. Kotoulas G., Magoulas A., Tsimenides N., Zouros E., 1995. Marked mitochondrial DNA differences between Mediterranean and Atlantic populations of the swordfish, *Xiphias gladius*. *Mol. Ecol.* 4, 473-481
40. Borsa P., Blanquer A., Berrebi P. 1997. Genetic structure of the founder (*Platichthys flesus* and *P. stellatus*) at different geographic scales. *Mar. Biol.* (sous presse)
41. Quesada H., Beynon C.M., Skibinski D.O.F. 1995. A mitochondrial DNA discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk: Pleistocene vicariance biogeography and secondary intergradation. *Mol. Biol. Evol.* 12, 521-524
42. Blanquer A., Alayse J.-P., Berrada-Rkhamli O., Berrebi P. 1992. Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus rhombus*) (Osteichthyes, Pleuronectiformes, Scophthalmidae) throughout their range in Europe. *J. Fish Biol.* 41, 725-736
43. Kotoulas G., Bonhomme F., Borsa P., 1995. Genetic structure of the common sole, *Solea vulgaris*, at different geographic scales. *Mar. Biol.* 122, 361-375
44. Borsa P., Jarne P., Belkhir K., Bonhomme F., 1994. Genetic structure of the Palourde *Ruditapes decussatus* L. in the Mediterranean. In : *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (A.R. Beaumont, ed.), Chapman & Hall, Londres, 102-113
45. Avise J.C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution* 43, 1192-1208

