

STRUCTURE GENETIQUE ET DEMOGRAPHIQUE DU PETONCLE *FLEXOPECTEN GLABER* DE LA LAGUNE DE BIZERTE (TUNISIE)

Khaoula TELAHIGUE^{1*}, T. HAJJI², I. RABEH¹, M. EL CAFSI¹ and C. SAAVEDRA³

¹: Université Tunis EL Manar, Faculté des Sciences de Tunis, Département de Biologie, Unité de recherche de Physiologie et d'écophysiologie des organismes aquatiques, El Manar, 2092 Tunis, Tunisie.

³: Université La Manouba, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet, Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Géo-Ressources LR11-ES31, Biotechpole Sidi Thabet, 2020 Ariana, Tunisie.

³: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ribera de Cabanes, 12595 Castellón, Spain.

* k_telahigue@yahoo.fr

ملخص

التركيب الوراثي والديموغرافي للرخوي فليكسويكتين غلابير من بحيرة بنزرت (تونس) : الرخوي فليكسويكتين غلابير (ليناوس، 1758) هو نوع متوطن في البحر الأبيض المتوسط ذو قيمة اقتصادية إقليمية هامة (خاصة في اليونان وتركيا). في البلاد التونسية، ينتشر بشكل خاص في بحيرة بنزرت. وهو نوع جيد مرشح في مشروع تربية الأحياء المائية. في هذا العمل أجرينا دراسة وراثية على أساس تسلسل الحمض النووي لميتوكوندريا فليكسويكتين غلابير. كشفت الشجرة الجينية التي تم رسمها عن ضعف تدفق الجينات وأبرزت اختلافًا وراثيًا ملحوظًا بين عينات الحمض النووي لمجموعات الرخوي التونسية والإيطالية واليونانية. وكشفت بيانات تاريخ النمو الديموغرافي عن توسع حديث مفاجئ.

كلمات مفاتيح: صدفة - توصيف جيني - حمض نووي - مجموعات - ديموغرافي.

RESUME

Le pétoncle glabre *Flexopecten glaber* (Linnaeus, 1758) est une espèce endémique de la Méditerranée. Elle a une importance commerciale régionale (Grèce et Turquie). En Tunisie, elle est particulièrement fréquente dans la lagune de Bizerte. Elle constitue une bonne candidate pour l'aquaculture. Il n'existe pas de données disponibles sur la diversité génétique des populations tunisiennes de ce pétoncle. Pour une éventuelle exploitation par élevage, une caractérisation génétique s'impose afin de déterminer l'état des lieux des ressources génétiques qui sont extrêmement utiles pour une gestion rationnelle de cette espèce. Pour ces raisons, nous avons réalisé une étude génétique basée sur le séquençage de l'ADN mitochondrial 16S de *F. glaber*. Le traçage de l'arbre phylogénétique Neighbor-joining a révélé un faible flux génique et une remarquable divergence génétique entre les populations tunisienne, italienne et grecque. Les données simulées selon le modèle d'expansion démographique de la population *F. glaber* peuplant la lagune de Bizerte ont révélé une expansion récente soudaine.

Mots clés : Pétoncle glabre – Population – caractérisation génétique – ADN 16S – Histoire démographique.

ABSTRACT

Demographic and genetic structure of the scallop *Flexopecten glaber* from the lagoon of Bizerte (Tunisia) :

The smooth scallop *Flexopecten glaber* (Linnaeus, 1758) is an endemic species of the Mediterranean. It has a regional commercial importance (Greece and Turkey). In Tunisia, it is particularly frequent in the lagoon of Bizerte. It is a good candidate species for aquaculture. There are no available data on the genetic diversity of the Tunisian populations of this scallop. For a possible exploitation by breeding, a genetic characterization is necessary in order to determine the state of the genetic resources which are extremely useful for a rational management of this species. For these reasons, we conducted a genetic study based on the sequencing of the 16S mitochondrial DNA of *F. glaber*. The Neighbor-Joining phylogenetic tree revealed a weak gene flow and a remarkable genetic divergence between the Tunisian, Italian and Greek populations. Data simulated according to the population expansion model of the *F. glaber* population in the Bizerte lagoon revealed a sudden recent expansion.

Keywords: Scallop – Population – Genetic characterization – DNA 16S – Demographic history.

INTRODUCTION

Le pétoncle glabre *Flexopecten glaber* (Linnaeus, 1758) est une espèce endémique de la Méditerranée (Fig 1 ; Fischer *et al.*, 1987). Cette espèce de pétoncle a une importance commerciale notamment en Grèce et en Turquie et connaît une surexploitation dans les eaux grecques (Tsotsios *et al.*, 2016). En Tunisie, *F. glaber* est particulièrement fréquente dans la lagune de Bizerte (Telahigue, 2012).

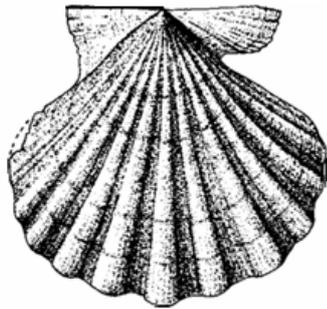


Figure 1. Le pétoncle glabre *Flexopecten glaber* (Fischer *et al.*, 1987).

Le taux de croissance de *F. glaber* est remarquable et ses stades de maturation sont rapides. Elle constitue de ce fait, une bonne candidate pour l'aquaculture (Marceta *et al.*, 2016). Toutefois, la littérature concernant la structuration génétique de cette espèce est limitée. En outre, en Méditerranée, particulièrement en Adriatique, *F. glaber* est souvent confondue avec une autre espèce de pétoncle *F. proteus*, considérée comme espèce jumelle (SIBM, 2008). Les deux espèces se distinguent morphologiquement par le nombre de plis rayonnants qui est égal à 9-13 pour *F. glaber* et 4-6 pour *F. proteus*. La distinction entre les deux espèces n'est pas universellement reconnue (SIBM, 2008).

Pour ces raisons, une étude de la structure génétique de la population tunisienne (Lagune de Bizerte) de *F. glaber* s'impose avant d'entreprendre une éventuelle exploitation par aquaculture de cette bioressource dans la lagune de Bizerte. Dans le présent travail, nous nous proposons d'étudier la structure génétique de *F. glaber* en se basant sur le séquençage de l'ADN mitochondrial 16S. En outre, afin d'étudier la relation phylogénétique entre la population tunisienne de ce pétoncle glabre, nous envisageons d'associer à cette étude des séquences publiées relatives à d'autres populations méditerranéennes de *F. glaber* et *F. proteus* en se basant sur les travaux de Chrysaëidi *et al.* (2010) et ceux d'Imsiridou *et al.* (2010). L'objectif est de situer la population tunisienne par rapport à celles d'autres localités en Méditerranée. Nous compléterons l'étude génétique par l'étude de l'histoire démographique vécue par la population tunisienne.

MATERIEL ET METHODES

Extraction des acides désoxyribonucléiques

Les acides désoxyribonucléiques (ADN) totaux utilisés comme matrices d'amplification pour les réactions Polymerase Chain Reaction (PCR) ont été extraits à partir de quatorze spécimens de *F. glaber* récoltés de la lagune de Bizerte. Afin de réaliser une analyse comparative, nous avons également utilisé des séquences de l'ADN mitochondrial 16S publiées par le National Center for Biotechnology Information (NCBI) en provenance de la Grèce et l'Italie.

Les ADN totaux utilisés ont été extraits selon la méthode de Miller *et al.* (1988) « Technique au chlorure de calcium saturé » à partir de fragments du muscle adducteur préalablement conservés dans l'éthanol 90 % à +4 °C. Cette technique consiste au relargage des protéines à force ionique élevée. Les échantillons ont été broyés manuellement à l'aide d'un piston dans des tubes Eppendorf contenant une solution hypotonique (tris-HCl 10 Mm pH 7,5 ; MgCl₂ 5 Mm ; NaCl 10 Mm) afin d'éclater les cellules. Le lysat a été par la suite incubé à 55,5°C pendant 4h dans 600 µL du mélange d'extraction contenant le Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) et une solution de protéinase très active, la protéinase K (20mg/ml) (marque Sigma P6556) qui digère les protéines cellulaires. Ces dernières ont été par la suite éliminées par l'addition de 280 µL de Chlorure de Sodium saturé. La suspension obtenue est agitée vigoureusement au vortex et centrifugée à 12000 rpm pendant 30 min à 20°C afin de précipiter les protéines. Nous avons obtenu ainsi une phase inférieure organique contenant les débris (protéines, lipides...), une phase supérieure aqueuse contenant l'ADN et l'interface contient en majorité des protéines et peu d'ADN. Le surnageant, contenant l'ADN dispersé, est récupéré puis mélangé avec 500 µL de chloroforme et centrifugé une deuxième fois pendant 5 min à 12000 rpm et à 20°C afin d'éliminer les lipides. Le surnageant est de nouveau récupéré et l'isopropanol a été ajouté à volume égal [1:1] et laissé à température ambiante pendant 30 min. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 15 min à 20°C, le surnageant a été éliminé. Le culot de l'ADN précipité a été alors condensé et lavé 3 fois tout d'abord avec 150 µL d'acétate de sodium (0,3M), puis avec 400 µL d'éthanol glacial et enfin avec 150 µL d'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sels. Le culot est par la suite séché dans une étuve à 37 °C pendant 20 min. L'ADN séché a été solubilisé dans un volume de solution Tris/EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

Dosage de l'ADN

Les concentrations des ADN ont déterminées par spectrophotométrie UV visible en mesurant la densité

optique (DO) à 260 nm. En effet, l'ADN a un spectre d'absorption en UV maximum à 260 nm. Ce spectre d'absorption est proportionnel à la concentration de l'ADN (une unité de densité optique à 260 nm correspond à 50ng d'ADN double brin ou à 25 ng ADN ou d'ARN simple brin par μL) en tenant compte de la dilution réalisée. La pureté de l'échantillon a été testée par comparaison des DO à 260 nm et à 280 nm et cela pour détecter toute contamination protéique. Les protéines absorbent à 280 tandis que l'ADN absorbe à 260nm. Une préparation d'ADN est dite pure si elle présente un rapport de DO 260/DO 280 voisin de 2.

Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

La qualité des ADN a été vérifiée par migration des échantillons sur gel d'agarose 1% (Tris-Borate-EDTA «TBE» et agarose, à raison de 0,9 g d'agarose pour 100 mL de tampon) suivie d'une visualisation sous UV après coloration au bromure d'éthidium (BET) à 0.3 mg mL^{-1} . Les échantillons analysés sont mélangés avec le tampon de dépôt $6 \times (4V/1V)$ avant d'être déposés dans les puits du gel. La migration des échantillons se fait en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire 100pb (Invitrogen). Après migration, les bandes sont visualisées sous lumière UV grâce au fluorochrome intercalant BET. Les gels sont photographiés par le gel doc (BIORAD).

Amplification de l'ADN 16S par PCR

L'amplification des ADN 16S a été réalisée par PCR. Les deux amorces utilisées sont : Pec16S-F1 (5'-GTTTTAAGGTCGGGAAAG-3') obtenue à partir de l'ARNr 16S de *Pecten maximus* (Saavedra et Pena, 2005) et 16Sbr (5'-CCGGTCTGAAGTACGATCACGT-3') (Palumbi (1996). Pour chaque PCR, nous avons utilisé 20 μL

d'une solution contenant 1 μL d'extrait d'ADN, 0,2 mM de Deoxynucleoside Triphosphate (dNTP), 0,8 μM d'amorces, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,15 U Taq polymérase (GIBCO-Life Technologies), une solution tampon et de l'eau ultra-pure. L'amplification a été effectuée en 30 cycles qui sont précédés par une étape de dénaturation de 3 mn à 94 °C qui rend la dénaturation initiale efficace. Elle consiste en 30s de dénaturation à 94 °C, 30s d'hybridation à 50 °C, 30s d'extension à 72 °C et une étape d'élongation de 2 min à 72 °C afin que la polymérase termine la synthèse des brins qu'elle n'a pas eu le temps de finir pendant les cycles précédents.

Purification des produits de PCR et séquençage

Les produits de la PCR ont été vérifiés qualitativement et quantitativement par migration des échantillons sur gel d'agarose 1% et par spectrophotométrie. Par la suite, ils ont été purifiés par l'utilisation d'un kit (QiaQuick PCR kit QIAGEN). Les produits de PCR purifiés ont été séquencés au service du séquençage de l'ADN à l'Université de Valence par l'équipe du Pr Cornet à l'aide d'un séquenceur capillaire automatique modèle ABI PRISM 3770 moyennant la méthode de Sanger (1997).

Alignement des séquences et analyses phylogénétiques

Les séquences ont été alignées avec le module CLUSTALW 1.4 (Thompson *et al.*, 1994) de l'éditeur d'alignements BIOEDIT 7.0.5.2 (Hall, 1999), puis l'alignement a été vérifié manuellement. Les séquences utilisées correspondent à des populations de *F. glaber* et *F. proteus* en provenance de la Grèce et de l'Italie (Tab I).

Tableau I. Origine et effectif des échantillons utilisés dans la présente étude.

Espèce	Origine	Nombre de séquences	Numéro d'accession	Auteurs
<i>F. glaber</i>	Tunisie (Bizerte)	14	MH490803 - MH490816	Présent travail
	Grèce (Golfe de Thessaloniki)	11	GU320272 - GU320282	Chrysaecidi <i>et al.</i> (2010)
	Grèce (Mer Egée)	12	HM627022 - HM627033	Imsiridou <i>et al.</i> (2010)
<i>F. proteus</i>	Italie (Adriatique)	6	HM627046 - HM627051	Imsiridou <i>et al.</i> (2010)
Total		43		

Les diversités haplotypique (H_d) et nucléotidique (π) ainsi que le nombre de sites de ségrégation (SS) ont été déterminés pour chaque population par le logiciel DnaSP 5.10.01 (Librado et Rozas, 2009). Les différences entre les fréquences d'haplotypes des populations analysées ont été testées au moyen du test chi-deux (Preacher, 2001). Un réseau haplotypique a été construit pour visualiser les relations génétiques entre les haplotypes de l'ADNmt avec le logiciel Network 5.0 (Bandelt *et al.*, 1999). En outre, le

logiciel DnaSP a été utilisé pour estimer les valeurs des paramètres de diversité et de différenciation génétique : H_s étant la moyenne des diversités génétiques intra-populations, l'indice de fixation F_{ST} (Ramos-Onsins et Rozas, 2002) pour chaque paire de populations ainsi que le coefficient de différenciation génétique (G_{ST}) de Nei (1973).

Nous avons également utilisé le logiciel Arlequin version 3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005) pour l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) au sein et entre

les populations de *F. glaber*. Par ailleurs, nous avons opté pour l'utilisation du modèle K2P à deux paramètres de Kimura (1980) pour calculer les distances entre les haplotypes (Nei et Kumar, 2000). Les distances calculées ont été utilisées pour tracer l'arbre phylogénétique selon la méthode du plus proche voisin (neighbor-joining) (NJ) (Saitou et Nei, 1987) par le logiciel MEGA 7 (Kumar et al., 2016). La robustesse de sa topologie a été évaluée après 1000 itérations (bootstrap) (Felsenstein, 1985).

Etude de l'histoire démographique

Deux estimations de la diversité nucléotidique ont été calculées, une basée sur la différence entre les séquences par paire (θ_{π}) et l'autre repose sur le nombre de sites de ségrégation (θ_S) (Nei et Kumar, 2000). Le logiciel DnaSP 5.10.01 a été également utilisé pour calculer différents tests de neutralité, notamment les valeurs de "D" de Tajima (1989) et le test "D*" de Fu et Li (1993).

Afin d'étudier l'histoire démographique de la population tunisienne de *F. glaber*, nous avons testé l'hypothèse d'expansion démographique grâce au modèle intégré dans le logiciel DnaSP 5.10.01 et tracé le graphe de la disparité de distribution des différences observées entre les paires de séquences nucléotidiques «Mismatch Distributions». D'après Slatkin et Hudson (1991), les distributions unimodales témoignent d'une expansion démographique soudaine, alors que les distributions multimodales signent la stabilité. Le test F_s de Fu (Fu,

1997) est également utilisé afin de tester la significativité des hypothèses précitées. En outre, nous avons testé les disparités de distribution avec Arlequin pour valider les résultats obtenus précédemment. Arlequin présente l'avantage de proposer un test de significativité lié directement aux disparités de distribution et basé sur une approche de "bootstraps" et de "Sum of Square Deviations" (SSD) entre les valeurs attendues et observées (Schneider *et al.* 2000). Pour clôturer cette étude, à l'aide du logiciel DnaSP, nous avons calculé la statistique R2, qui est un test puissant pour détecter les expansions de la population à partir de petits échantillons (Ramos-Onsins et Rozas, 2002).

RESULTATS

Diversité haplotypique et relations phylogénétiques

L'analyse partielle de l'ADN mitochondrial 16S de 43 spécimens de *F. glaber* et *F. proteus*, nous a permis d'obtenir des fragments de 381 bp. Le polymorphisme a été détecté au niveau de 18 sites avec un total de 17 substitutions et une insertion / délétion (indel). Toutes ces substitutions sont des transversions. Au total, 20 haplotypes ont été déterminés (Tab II). Parmi ces haplotypes, nous n'avons enregistré qu'un seul haplotype commun entre les deux populations italiennes de *F. glaber* et *F. proteus* (Tab III).

Tableau II. Sites de variabilité haplotypique chez les trois populations de *Flexopecten glaber* et la population de *Flexopecten proteus* étudiées.

Haplotypes	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	
	7	2	3	0	1	1	2	4	4	6	7	8	8	9	3	5	8	0
	0	3	2	9	2	3	0	4	9	5	8	0	8	9	7	4	1	1
H1	G	T	T	A	A	A	C	G	G	T	A	A	T	C	T	T	C	T
H2	T	.	.	.	G
H3	T
H4	T	C	.	.	.
H5	G	T	C
H6	T
H7	G	.	T
H8	T	.	.	C
H9	.	C	T
H10	T	C
H11	.	.	.	G	.	.	T	T	.
H12	.	.	.	G	.	.	T
H13	.	.	.	G	.	.	T	C
H14	C	.	.	G	.	.	T
H15	.	.	C	G	.	.	T	C	.	.	.
H16	.	.	.	G	.	.	T	T
H17	.	C	.	G	.	.	T	C
H18	.	.	.	G	.	.	T	.	A
H19	.	.	.	G	.	.	T	A	.	.
H20	.	.	.	G	.	.	T	C

Tableau III. Fréquences haplotypiques de l'ADN 16S chez les populations méditerranéennes de *Flexopecten glaber* et *Flexopecten proteus* étudiées. TUN : population tunisienne, GRE : population grecque, ITA : population italienne.

Haplotypes	Populations			
	TUN	GRE1	GRE2	ITA
H1	1	1	-	-
H2	-	2	-	-
H3	10	3	-	1
H4	1	2	-	-
H5	2	1	-	-
H6	-	1	-	-
H7	-	1	-	1
H8	-	-	-	2
H9	-	-	-	1
H10	-	-	-	1
H11	-	-	1	-
H12	-	-	3	-
H13	-	-	1	-
H14	-	-	1	-
H15	-	-	1	-
H16	-	-	1	-
H17	-	-	1	-
H18	-	-	1	-
H19	-	-	1	-
H20	-	-	1	-
Groupe A	-	-	12	-
Groupe B	14	11		6
Total	14	11	12	6

L'haplotype le plus fréquent est l'haplotype H3 de *F. glaber* qui est abondant dans la lagune de Bizerte (Tab III). Les haplotypes «privés» représentent environ 44,18 % des haplotypes révélés chez les différentes populations. Parmi les haplotypes privés 63,15% sont retrouvés chez la population GRE2. Pour la population tunisienne, nous n'avons pas détecté des haplotypes privés. Le réseau de parcimonie statistique des haplotypes ADN 16S détectés dans les populations de pétoncles analysées montre la présence de deux groupes d'haplotypes phylogénétiquement distincts et fortement associés aux sites d'échantillonnage (A et B) (Fig 2). La majorité de ces haplotypes sont reliés les uns aux autres par un seul pas évolutif. Nous avons noté la présence d'un haplotype hypothétique absent dans notre échantillonnage.

Le groupe A, correspondant à la population grecque GRE2, est rassemblé autour de l'haplotype 12. Quant au groupe B, il est focalisé sur l'haplotype H3. Il représente les haplotypes détectés des populations

tunisienne (TUN) et grecque (GRE1) de *F. glaber* ainsi que de la population italienne (ITA) de *F. proteus*.

La figure 3 montre les relations phylogénétiques entre les différents haplotypes détectés chez les pétoncles *F. glaber* et *F. proteus*. L'analyse de l'arbre phylogénétique NJ tracé à l'aide de Mega 7 a indiqué l'absence de groupes phylogénétiques distincts. Les haplotypes des différentes populations sont rassemblés dans les mêmes clades et sous-clades.

Estimation de la diversité et tests de neutralité

Les estimations de la diversité génétique et les tests de neutralité des quatre populations étudiées sont donnés dans le tableau III. Les résultats ont montré que les populations de la rive nord de la Méditerranée présentent des valeurs similaires de diversité haplotypique comprises entre 0,900 et 0,950. Tandis que la population tunisienne (TUN) a révélé une diversité haplotypique plus faible de 0,494. Pareillement, la diversité nucléotidique est située

entre 0,003 et 0,004 pour GRE1 et GRE2 et ITA alors qu'elle est réduite environ à moitié chez TUN (Tab III).

Structure des populations

Les paramètres de différenciation génétique calculés pour les 3 populations de *F. glaber* et la population de *F. proteus* prises deux par deux sont donnés dans le tableau IV.

Les valeurs enregistrées de la différenciation génétique (F_{ST}) entre les populations TUN et GRE1 et entre les populations TUN et ITA sont inférieures à 0,050 qualifiant ainsi cette différenciation de faible selon l'échelle de Wright (1978). Par ailleurs, nous avons noté une différenciation génétique importante entre la population grecque GRE2 et les populations GRE1, TUN et ITA avec des valeurs de F_{ST} supérieures à 0,150 (Tab IV). Ces valeurs élevées de F_{ST} témoignent d'un important déficit en hétérozygotie résultant vraisemblablement d'une forte différenciation génétique des populations étudiées.

Par ailleurs, l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) inter et intra-populations du pétoncle *F. glaber* a révélé une valeur plus importante (66,29%) en inter-populations contre 33,71% en intra-population (33,71%) (Tab V).

Histoire démographique

La figure 4 illustre la disparité des distributions attendues et observées entre les paires des séquences nucléotidiques «Mismatch Distributions» de la population TUN.

Les données simulées selon le modèle d'expansion démographique chez la population TUN donnent une courbe unimodale. Ceci confirme que cette population a subi une expansion récente. Chez la population tunisienne, les déviations de la distribution observée des fréquences nucléotidiques ne sont pas significativement différentes de celles attendues dans le modèle d'expansion soudaine. Ceci indique que la distribution mismatch pourrait être évocatrice d'un goulot d'étranglement. La validité du mode de l'expansion démographique a été testée avec le logiciel Arlequin en utilisant la somme des carrés des différences (SSD) entre la distribution observée et attendue. Nous avons également utilisé le test F_s de Fu (1997), le test R_2 de Ramos-Onsins et Rozas (2002) ainsi que la valeur moyenne de la disparité de distribution (mismatch). Les résultats sont groupés dans le tableau VI.

La valeur non significative du test SSD enregistrée pour TUN confirme le modèle de l'expansion récente. Cette dernière a été également consolidée par la valeur significativement négative du test F_s . Pareillement, le test R_2 rejette l'hypothèse nulle de population stable (0,1246 ; $p < 0,05$) et confirme le modèle d'expansion récente.

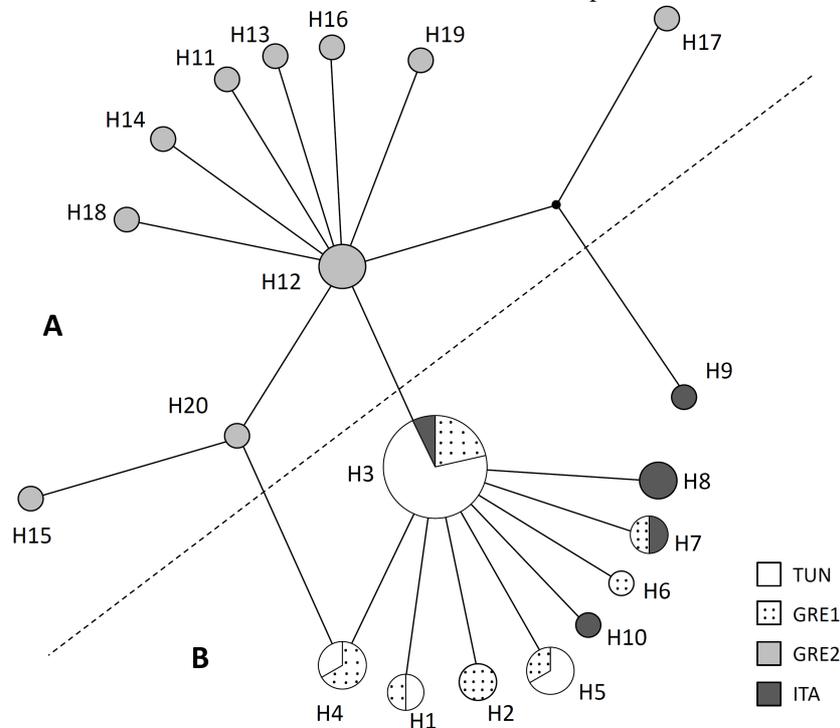


Figure 2. Réseau haplotypique des ADN 16S détectés dans les quatre populations de pétoncle glabre analysés (TUN : Tunisienne, GRE : Grecque, ITA : Italienne). Les tailles des cercles sont proportionnelles aux fréquences des haplotypes. Le point noir représente un haplotype manquant.

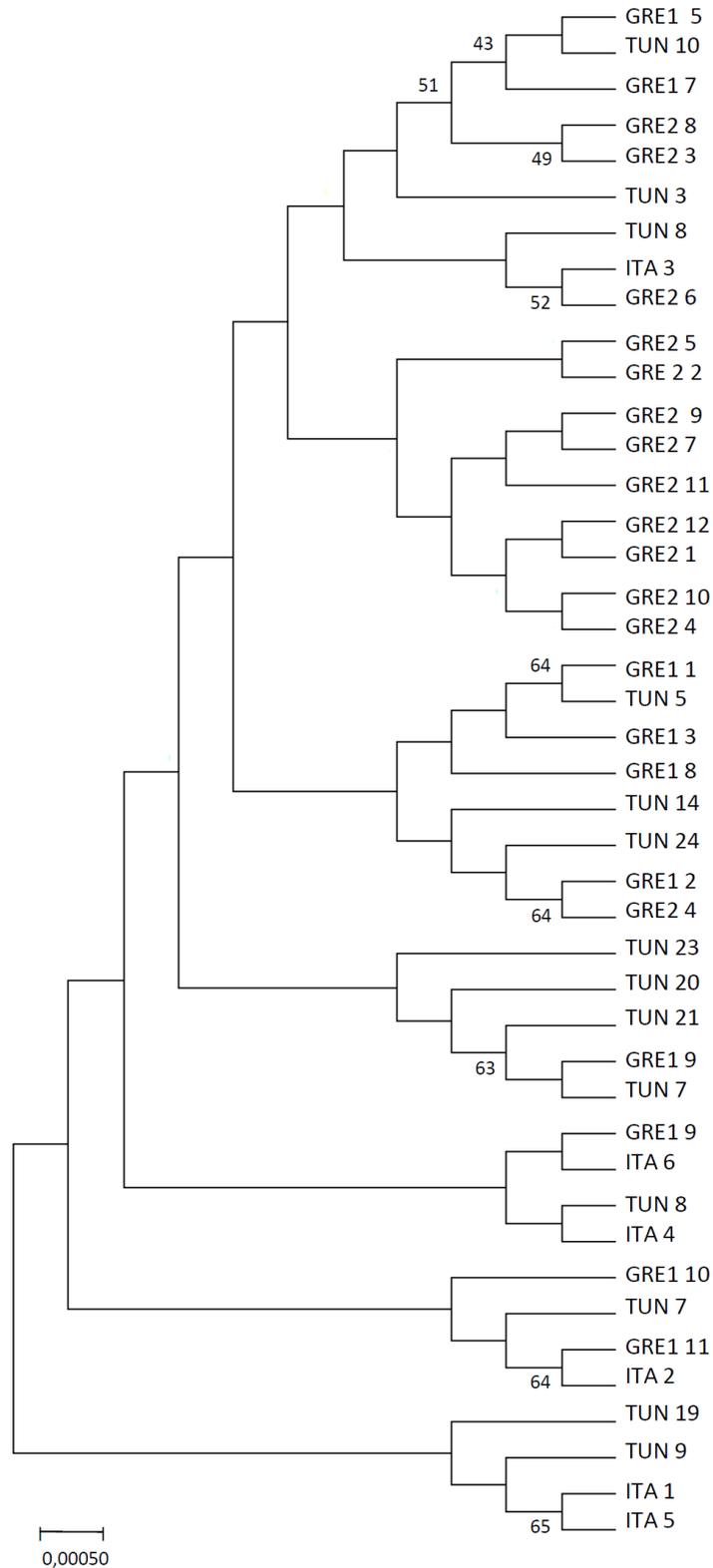


Figure 3. Arbre phylogénétique Neighbor-joining montrant la relation évolutive des haplotypes entre les populations de *Flexopecten glaber* et *Flexopecten proteus* analysées. GRE : population grecque, ITA : population italienne, TUN : Population tunisienne.

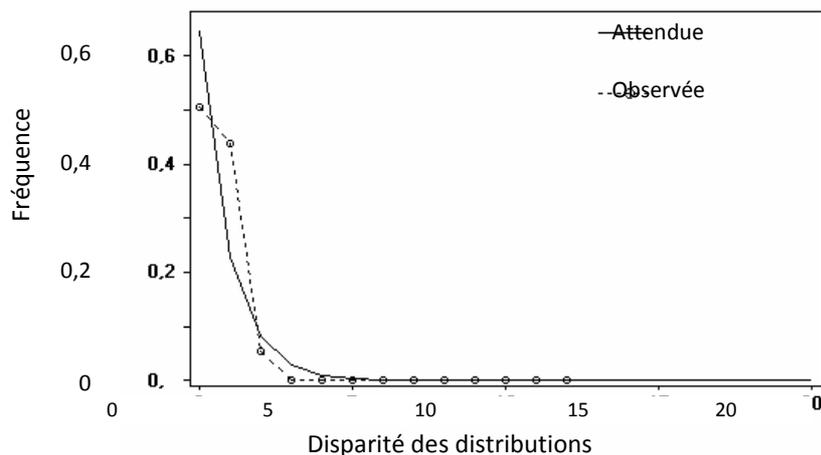


Figure 4. Disparités des distributions attendues et observées entre les paires de séquences nucléotidiques «Mismatch Distributions» chez la population tunisienne de *Flexopecten glaber* (TUN).

Tableau IV. Estimation de la diversité génétique et test de neutralité au niveau de l'ADN 16S des quatre populations de pétoncles étudiées. N : effectif, s. ségr : sites de ségrégation, H : haplotype, Hp : diversité haplotypique, θ_π : diversité nucléotidique, TUN : Population tunisienne, GRE : population grecque, ITA : population italienne.

Population	N	s. ségr.	H	Hp	θ_π
TUN	14	3	4	0,49451	0,00144
GRE1	11	6	11	0,90909	0,00363
GRE2	12	10	10	0,95455	0,00473
ITA	6	4	5	0,93333	0,00402

DISCUSSION

Diversité génétique

Les 4 haplotypes détectés chez la population tunisienne de *F. glaber* (TUN) sont tous communs avec GRE1 dont un est partagé également avec ITA (*F. proteus*). En effet, en se basant sur la diversité haplotypique de l'ADN mitochondrial 12S et 16S, de l'histone H3 et du Cytochrome Oxydase I (COI), Pujolar *et al.* (2010) ont démontré qu'il n'y a pas de différences génétiques entre les deux espèces de pétoncles. Ils ont suggéré la capacité de ces deux espèces de se croiser et peuvent être considérées comme espèces jumelles.

Par ailleurs, d'après nos résultats la majorité des haplotypes sont privés chez les populations de pétoncles étudiées. Ceci indique que les flux génétiques actuels entre les populations des différentes localités sont qualifiés de bas à modérés. Ces faibles flux génétiques pourraient être une conséquence d'homogamie avec isolement reproducteur partiel (Condé-Padin *et al.*, 2007).

Le réseau de parcimonie statistique des haplotypes des ADN 16S détectés a montré la présence de deux groupes d'haplotypes phylogénétiquement distincts. Le premier groupe est constitué des haplotypes

détectés chez les populations de pétoncles TUN, ITA et GRE1 et le second regroupe les haplotypes détectés chez la population de pétoncles GRE2. Ce résultat témoigne d'un flux génique extrêmement réduit entre la population GRE2 et les trois autres populations de pétoncles et souligne l'existence d'une barrière aux échanges génétiques entre les deux groupes identifiés. L'analyse du polymorphisme chez les populations de pétoncles étudiées a révélé des valeurs élevées de diversité haplotypique et de très faibles valeurs de diversité nucléotidique. Ceci peut correspondre à une croissance rapide des populations et une accumulation de mutations à partir d'une population d'effectif efficace faible comme suggéré par Avise (2000) dans son étude portant sur l'histoire et la formation des espèces.

Les valeurs faibles de diversité nucléotidique reflètent des effectifs relativement faibles. Ceci pourrait être expliqué par deux hypothèses. La première hypothèse suggère que les faibles effectifs sont dus à des isolements relatifs des gisements de pétoncles étudiés. La deuxième hypothèse attribue les faibles effectifs à l'instabilité démographique des populations ciblées. L'élargissement de l'aire d'investigation et la multiplication du nombre d'individus analysés pourront apporter d'amples

précisions. Par ailleurs, l'arbre phylogénétique a révélé une nette structuration géographique dans la distribution des différents haplotypes en fonction du site d'échantillonnage. Un tel résultat ne peut qu'affirmer le faible flux génique et l'importante différenciation génétique de ces populations.

Chez les pétoncles, les valeurs calculées de l'indice de différenciation (F_{ST}) ont montré une remarquable divergence génétique entre les différentes populations étudiées. Cette hétérogénéité génétique semble être due à une fragmentation géographique d'une population initiale et des recolonisations successives à partir de refuges multiples comme signalé par Muths *et al.* (2006) qui ont étudié l'ophiure *Acrocrida brachiata*.

L'analyse hiérarchique de la variance moléculaire (AMOVA) a également confirmé cette divergence génétique entre les populations de pétoncles étudiées. En effet, les valeurs significativement positives de l'indice de fixation témoignent d'une déviation par rapport aux proportions de Hardy-Weinberg et traduit un déficit en hétérozygotie.

Bien que le mode de reproduction des bivalves semble être idéal pour représenter le modèle panmictique, des déficits en hétérozygotes ont été fréquemment décrits chez les mollusques marins. A titre d'exemples, nous pouvons citer les huîtres (Saavedra et Querra, 1996 ; Dridi, 2009) ; les peignes (Zouros et Pogson, 1994); les moules (Gaffney, 1990) ; les palourdes (Borsa *et al.*, 1991) et les littorines (Andrade *et al.*, 2005).

Quatre hypothèses sont envisagées pour expliquer ces déficits en hétérozygotes:

(i) Une mauvaise détection du polymorphisme liée à l'existence d'allèles nuls (Gardner, 1992) introduisant une sous estimation de l'hétérozygotie observée. Ces problèmes sont rencontrés aussi bien avec les loci enzymatiques qu'avec les marqueurs ADN amplifiés par la technique PCR notamment les microsatellites (Li *et al.*, 2003).

(ii) Effet Wahlund ou structuration des populations qui repose sur le polymorphisme variétal et une reproduction préférentielle entre morphes (Tarjuelo *et al.*, 2004). Cet effet peut provenir de deux situations, soit un effet spatial où les échantillons recouvrent une région contenant des populations différenciées génétiquement, soit un effet temporel où l'échantillon regroupe des individus recrutés à différentes dates et qui correspondent à des cohortes génétiquement différenciées (David et Jarne, 1998).

(iii) Événements sélectifs pendant les phases larvaires ou embryonnaires contre les hétérozygotes. Toutefois, plusieurs auteurs en étudiant les mortalités différentielles pendant les stades précoces du cycle de vie ont montré qu'au contraire ce sont les homozygotes qui sont contre-sélectionnés dès ces stades (Launey et Hedgecock, 2001).

(iv) Consanguinité ou accouplement entre un individu et ses ascendants, ses collatéraux et/ou ses descendants. Elle modifie les fréquences génotypiques et par conséquent en est une perte de variabilité génétique au cours des générations.

Dans cette étude, l'hypothèse d'allèles nuls n'est pas exclue. Cependant, pour pouvoir vérifier l'hypothèse de l'effet wahlund, une bonne connaissance du fonctionnement démographique des populations étudiées est nécessaire. De même, pour l'hypothèse de la consanguinité, une étude de la diversité génétique d'autres fragments de l'ADN mitochondrial est indispensable puisque la consanguinité affecte tout le génome.

Histoire démographique

L'histoire des populations et des espèces laisse des empreintes dans leur structure génétique actuelle. L'analyse de la composition génétique des populations permet ainsi d'en retracer les événements majeurs, notamment les variations démographiques (expansion ou déclin des populations) et les événements de dispersion. Concernant la population tunisienne de *F. glaber*, les données simulées selon le modèle d'expansion démographique ont révélé une expansion récente soudaine. Ce résultat est consolidé par la topologie étoilée du réseau des haplotypes, par les valeurs non significatives du test SSD et les valeurs significativement négatives du test F_s et le test R2.

Par ailleurs, la distribution mismatch de la population tunisienne a évoqué l'hypothèse d'un goulot d'étranglement. Cette hypothèse est rejetée par la valeur négative non significative du test de Tajima. En effet, selon Santiago et Caballero (2005), des valeurs négatives significatives du test D de Tajima sont évocatrices d'un balayage sélectif "selective sweep". L'hypothèse du balayage sélectif pourrait être consolidée par l'analyse d'un nombre plus large d'échantillons surtout en présence de la faible diversité génétique et par l'excès d'haplotypes rares qui ont caractérisé les populations de pétoncles étudiés.

CONCLUSION

Dans le présent travail, nous avons enregistré une remarquable divergence génétique entre les différentes populations de pétoncles étudiées avec un faible flux génique entre les gisements de ces pectinidés. Ceci est vraisemblablement dû à une fragmentation géographique d'une population initiale et des recolonisations successives à partir de refuges multiples. D'après l'interprétation des divers paramètres calculés, nous avons pu conclure que la croissance rapide des pétoncles a permis aux populations formées d'accumuler des mutations à partir d'une population d'effectif efficace faible.

Par ailleurs, la distribution de *F. proteus* est limitée à l'Adriatique et la Mer Ionienne. D'après les résultats obtenus dans le présent travail et en tenant compte de toutes les considérations existantes ainsi que le statut systématique incertain des deux "formes" *Flexopecten* communes, il s'avère indispensable d'entreprendre une étude développée des deux espèces de pétoncle dans diverses localités représentatives des deux rives méditerranéennes moyennant divers marqueurs génétiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Andrade S.C.S., Medeiros H.F. and Solferini V.N., 2005. – Homogeneity test of Hardy-Weinberg deviations in Brazilian littorinids: evidence for selection? *J. Molluscan Stud.*, 71: 167-174.
- Avise J.C., 2000. - Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA, 464p.
- Bandelt H.J., Forster P. and Röhl A., 1999. – Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 37-48.
- Borsa P., Zainuri M. and Delay B., 1991. – Hétérozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussates*. *Heredity*, 66: 1-8.
- Chrysaëidi S.C., Imsiridou A., Katsares V. and Galinou S., 2010. - Genetic identification of the species *Flexopecten glaber* (Linnaeus 1758) and *Flexopecten proteus* (Dillwyn 1817) (Mollusca: Bivalvia) with mitochondrial genes. Mitsoudi. 14th Panhellenic Conference of Ichthyologists. Piraeus.
- Conde-Padin P., Carvajal-Rodríguez A., Carballo M., Caballero A. and Rolan-Alvarez E., 2007. – Genetic variation for shell traits in a direct-developing marine snail involved in a putative sympatric ecological speciation process. *Evol. Ecol.*, 21: 635-650.
- David P. and Jarne P., 1998. – Context-dependent survival differences among electrophoretic genotypes in natural populations of the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Genetics*, 146: 335-344.
- Dridi S., 2009. - Etude écobioécologique et physiologique de l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) dans la lagune de Bizerte et au Port aux Princes (Cap bon) – Tunisie. *Thèse doctorat. Faculté des sciences de Tunis*, 229 pp.
- Excoffier L., Laval G. and Schneider S., 2005. – Arlequin 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Felsenstein J., 1985. – Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fischer W., Bauchot M.L. and Schneider M., 1987. - Méditerranée et mer Noire (Fishing Area 37). Fiches FAO d'identification des espèces pour le besoins de la pêche. Vols. 1-2. FAO, Rome.
- Fu Y.X. and Li W.H., 1993. – Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693-709.
- Fu Y.X., 1997. – Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Gaffney P.M., 1990. – Enzyme heterozygosity, growth rate and viability in *Mytilus edulis*: another look. *Evolution*, 44: 204-210.
- Gardner I.P.A., 1992. – Null Alleles and Heterozygote Deficiencies among Mussels (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) of two sympatric Populations. *Malacologia*, 34 (1-2): 99-106.
- Hall T.A., 1999. – BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Imsiridou A., Karaiskou N., Aggelidou E., Katsares V. and Galinou-Mitsoudi S., 2012. Mitochondrial DNA Variation as a Tool for Systematic Status Clarification of Commercial Species – The Case of Two High Commercial *Flexopecten* Forms in the Aegean Sea. Aquaculture, Dr. Zainal Muchlisin (Ed.), InTech: 109-126.
- Telahigue K., Hajji T., El Cafsi M. and Saavedra C., 2018. – Genetic structure and demographic history of the endemic Mediterranean scallop *Pecten jacobaeus* inferred from mitochondrial 16S DNA sequence analysis. *Anim. Biodiv. Conserv.*, 41(1): 61-73.
- Kimura M., 1980. – A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of DNA sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.
- Kumar S., Stecher G. and Tamura K., 2016. – MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33: 1870-1874.
- Launey S. and Hedgecock D., 2001. High genetic load in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 159: 255-262.
- Li G., Hubert S., Bucklin K., Ribes V. and Hedgecock D., 2003. – Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Ecol. Notes*, 3: 228-232.
- Librado P. and Rozas J., 2009. – DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.

- Marceta T., Da Ros L., Marin F.V., Codognotto M.G., and Bressan M., 2016. – Overview of the biology of *Flexopecten glaber* in the North Western Adriatic Sea (Italy): A good candidate for future shellfish farming aims? *Aquaculture* 462(1): 80-91.
- Miller S.A., Dykes D.D. and Polesky H.F., 1988. – A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16(3): 1215.
- Muths D., Davoult D., Gentil F. and Jollivet D., 2006. – Blackwell Publishing Ltd Incomplete cryptic speciation between intertidal and subtidal morphs of Acrocnida brachiata (Echinodermata: Ophiuroidea) in the Northeast Atlantic. *Mol. Ecol.*, 15: 3303-3318.
- Nei M. and Kumar S., 2000. - Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York, p 333.
- Palumbi S.R., 1996. - Nucleic acids: II. The polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), Molecular Systematics, 2nd ed. Sinauer, Sunderland : 205-247.
- Preacher K.J., 2001. - Calculation for the chi-square test: An interactive calculation tool for chi-square tests of goodness of fit and independence [Computer software]. Available from <http://quantpsy.org>.
- Pujolar J.M., Marceta T., Saavedra C., Bressan M. and Zane L., 2010. – Inferring the demographic history of the Adriatic *Flexopecten* complex. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 57: 942-947.
- Ramos-Onsins S.E. and Rozas J., 2002. – Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 2092-2100.
- Saavedra, C. and Pena, J.B., 2005. – Nucleotide diversity and Pleistocene population expansion in Atlantic and Mediterranean scallops (*Pecten maximus* and *P. jacobaeus*) as revealed by the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 323: 138-150.
- Saavedra C. and Querra A., 1996. – Allozyme heterozygosity and fitness traits in a cultivated population of the European oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 139: 203-224.
- Saitou N. and Nei M., 1987. – The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74(12): 5463-5467.
- Santiago E. and Caballero A., 2005 – Variation after a selective sweep in a subdivided population. *Genetics*, 169: 475-483.
- Schneider S., Roessli D. and Excoffier L., 2000. - Arlequin: a software for population genetics data analysis User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva; Geneva
- SIBM (Società Italiana di Biologia Marina, Genova), 2008. - Checklist della flore e della faune dei mari italiani. Biologia Marina Mediterranea, 15, suppl. 1. Erredi Grafiche Editoriale, Genoa, Italy.
- Slatkin M. and Hudson R.R., 1991. – Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129: 555-562.
- Tajima F., 1989. – Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tarjuelo I., Posada D., Crandall K.A. and Pascual M., 2004. Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. *Mol. Ecol.*, 13: 3125-3136.
- Telahigue K., Chetoui I., Rabeh I., Rmodhane M.S. and El Cafsi M., 2010. – Comparative fatty acid profiles in edible parts of wild scallops from the Tunisian coast, *Food Chem.*, 122: 744-746.
- Telahigue K., 2012. Biologie et écophysiologie des Pectinidés des côtes tunisiennes. Thèse de doctorat de Biologie, *Faculté des Sciences de Tunis*, 202p.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Tsotsios D., Tzovenis I., Katselis G., Geiger S.P. and Theodorou J.A., 2016. Spat Settlement of the Smooth Scallop *Flexopecten glaber* (Linnaeus, 1758) and Variegated Scallop *Chlamys varia* (Linnaeus, 1758) in Amvrakikos Gulf, Ionian Sea (Northwestern Greece). *BioOne* 35(2): 467-474.
- Wright S., 1978. - Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. Chicago, IL, USA: University of Chicago Press.
- Zouros E. and Pogson G.H., 1994. - The present status of the relationship between heterozygosity and heteroses. In: *Genetics and evolution of aquatic organisms* (A.R. Beaumont, ed), 135-146. Chapman & Hall, London