

Phylogeographie moléculaire du mérrou brun de Méditerranée occidentale (*Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), Teleostei, Serranidae)

*Molecular phylogeography of Western Mediterranean dusky grouper
(Epinephelus marginatus (Lowe, 1834), Teleostei, Serranidae)*

Éric Faure*, André Gilles*, Anne Miquelis*, Mohamed Hichem Kara**, Jean-Pierre Quignard***

*UPRES 2202 Biodiversité, Hydrobiologie, ICB, Université de Provence, case 31,
Place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 3, France
mel : e_faure@hotmail.com

**Département sciences de la mer, Université d'Annaba,
BP 230, Oued Kouba, 23002 Annaba, Algérie
mel : kara_hichem@yahoo.com

***Laboratoire d'ichtyologie. Université Montpellier II,
case 102, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex, France
mel : quignard@univ-montp2.fr

Mots clés : cytochrome *b*, Serranidae, *Epinephelus marginatus*, mérrou, mer Méditerranée.

Key-words: cytochrome *b*, Serranidae, *Epinephelus marginatus*, grouper, Mediterranean Sea.

RÉSUMÉ

Faure E., A. Gilles, A. Miquelis, M.H. Kara, J.-P. Quignard, 1999 - Phylogéographie moléculaire du mérrou brun de Méditerranée occidentale (*Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), Teleostei, Serranidae). Mar. Life, 9 (1) : 31-35.

Les relations phylogéniques intraspécifiques entre vingt-neuf individus d'*Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) provenant de la Méditerranée occidentale (Algérie, France, Tunisie) ont été étudiées. Une portion du gène codant le cytochrome *b* a été séquencée (353 paires de bases) et 64 bases se sont révélées être phylogénétiquement informatives. Les arbres phylogénétiques obtenus (méthodes de parcimonie et de distance) montrent que les séquences de mérrou se séparent en deux groupes. L'un, nommé groupe A, contient une partie des mérours algériens et l'autre, nommé groupe B, comprend tous les mérours français et tunisiens, ainsi que des mérours algériens. Pour expliquer ces résultats, plusieurs hypothèses peuvent être formulées : présence en Algérie d'une espèce cryptique, ou d'hybrides ou d'individus issus d'une "population" atlantique. Dans le futur, une analyse phylogénétique plus détaillée pourrait s'avérer être utile dans le choix des décisions à prendre pour protéger le mérrou brun.

ABSTRACT

Faure E., A. Gilles, A. Miquelis, M.H. Kara, J.-P. Quignard, 1999 – [Molecular phylogeography of Western Mediterranean dusky grouper (*Epinephelus marginatus* (Lowe 1834), Teleostei, Serranidae)]. Mar. Life, 9 (1) : 31-35.

The intraspecific phylogenetic relations between twenty-nine individuals of *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) originating in the Western Mediterranean (Algeria, France, Tunisia) have been studied. A portion of the gene coding the cytochrome *b* has been sequenced (353 base pairs) and 64 bases were phylogenetically informative. The phylogenetic trees obtained (using parsimony and distance methods) show that the grouper sequences fall into two groups. One, referred to as Group A, contains part of the Algerian grouper sample, and the other, Group B, includes all the French and Tunisian grouper as well as some Algerian grouper. Several hypotheses might be proposed to explain these results: the occurrence in Algeria of a cryptic species, or of hybrids or individuals originating in an Atlantic population. In the future, a more detailed phylogenetic analysis would be helpful as an aid to decision making with regard to the protection of the dusky grouper.

INTRODUCTION

Le mérou brun (*Epinephelus marginatus*) est l'une des sept espèces de mérous dénombrées en Méditerranée. Présent sur toutes les côtes de cette mer, il est absent en mer Noire (Tortonese, 1986 ; Fischer *et al.*, 1987 ; Heemstra, 1991 ; Heemstra, Randall, 1993 ; Heemstra, Golani, 1993). En Atlantique, ce Serranidé est signalé au nord jusqu'aux îles britanniques, au sud jusqu'en Afrique du Sud et à l'ouest, jusqu'aux côtes brésiliennes (Heemstra, 1991 ; Heemstra, Randall, 1993). Les plus fortes densités de mérou brun se situent sur les côtes nord et nord-ouest de l'Afrique, de la Tunisie au Sénégal (Chauvet, 1987 ; Chauvet, Francour, 1989). Réputé sédentaire et territorial, *E. marginatus* affectionne les fonds rocheux littoraux riches en abris.

Jusqu'à ces dernières années, le mérou brun ne semblait pas se reproduire sur les côtes nord de la Méditerranée occidentale mais plus au sud (en dessous de 41°5 N), en particulier sur les côtes d'Afrique du Nord. Les côtes nord-africaines sont d'ailleurs considérées comme les "pépinières" probables de cette espèce pour la Méditerranée. Toutefois, depuis quelques années la présence sur le littoral méditerranéen français de juvéniles pesant environ dix grammes semble indiquer que l'aire de reproduction de l'espèce se serait étendue vers le nord (Harmelin, Robert, 1992 ; Lelong, 1993 ; Zaba-

la *et al.*, 1997a, 1997b). Ces observations récentes sont encourageantes car, *a contrario*, divers facteurs participent fortement à la diminution des effectifs. Ces derniers éléments, associés au fait que le développement sexuel est de type hermaphrodite successif protérogyne et que la maturité sexuelle est tardive (Chauvet, 1987), contribuent à faire d'*Epinephelus marginatus* une espèce à risque sur le plan des effectifs. Cette espèce est d'ailleurs classée comme vulnérable dans l'inventaire de la faune menacée en France (Maurin, 1994). Aujourd'hui, le mérou bénéficie officiellement d'un statut légal de protection dans certains pays riverains de la Méditerranée. En France, par exemple, le mérou brun fait l'objet d'un moratoire interdisant la pêche sous-marine sur l'ensemble du littoral méditerranéen jusqu'au 31 décembre 2002 ; en Tunisie il en est de même depuis 1994.

Notre travail s'inscrit dans le cadre des recherches menées par le Groupe d'étude du mérou (GEM) et l'utilisation de marqueurs moléculaires a pour but d'essayer de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est l'origine des mérous présents sur les côtes de la Méditerranée nord occidentale?
- Existe-t-il une ou plusieurs population(s) en Méditerranée occidentale?
- Peut-on détecter les cheminements migratoires de ce poisson ?

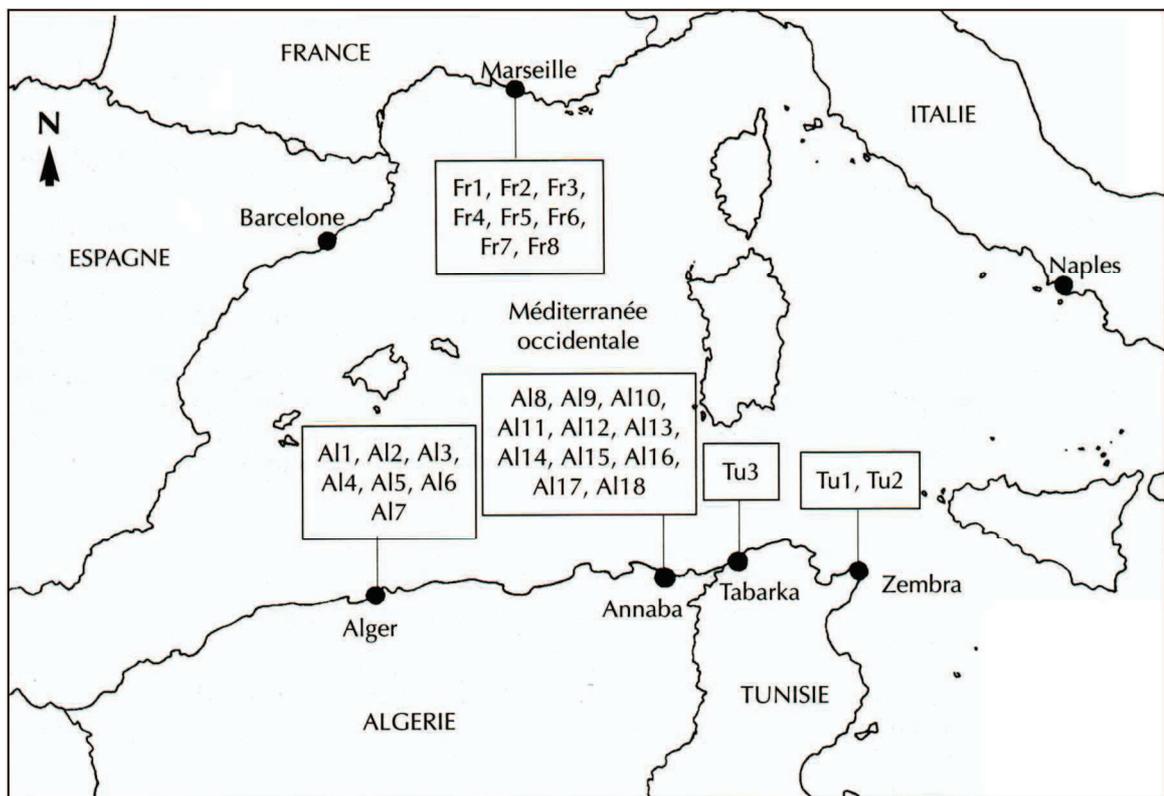


Figure 1 - Localisation géographique des divers sites de prélèvement de mérou brun en Méditerranée occidentale. / Collection locations for dusky grouper of the Western Mediterranean Sea.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Récolte des échantillons et techniques d'amplification de l'ADN

L'analyse a été effectuée sur 29 mérous bruns provenant des côtes françaises (région marseillaise, de la Côte Bleue à Sanary : Fr1 à Fr8), des côtes algériennes (Alger : Al1 à Al7 ; et Annaba : Al8 à Al18) et des côtes tunisiennes (Zembra : Tu1 et Tu2 ; et Tabarka : Tu3) (figure 1). Sur ces mérous identifiés par les collecteurs, des morceaux de nageoires caudales d'environ 1 cm² ont été prélevés et conservés dans de l'alcool éthylique à 70-90%. A partir des morceaux de nageoires, l'ADN total a été extrait par la méthode de Taberlet, Bouvet (1991), puis une portion d'environ 430 pb du gène codant le cytochrome b a été amplifiée par les techniques classiques de PCR en utilisant les amorces New-for : 5'-AGCCTAC-GAAAAACCCACCC-3' et 34-Rev : 5'-AAACTG-CAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' (Cantatore *et al.*, 1994). Lors des cycles d'amplification, le volume du mélange réactionnel était de 50 L. Le protocole utilisé lors des réactions d'amplification est le suivant : 50 ng d'ADN total ; 0,2 mM de chaque amorce ; 2,0 U HiTaq Taq polymerase (Bioprobe, France); 0,2 mM de chaque dNTP ; 5 mL du tampon de réaction Bioprobe (France). Les paramètres d'amplification étaient : 2 min à 92°C, 5 cycles (15 s à 92°C ; 45 s à 48°C ; 1,5 min à 72°C), 30 cycles (15 s à 92°C ; 45 s à 52°C ; 1,5 min à 72°C), et 8 min à 72°C. La séquence nucléotidique a été déterminée à l'aide d'un séquenceur automatique (Genome Express, Grenoble, France).

Analyses phylogénétiques

Les séquences d'ADN ont été alignées grâce au programme Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), puis vérifiées visuellement. Les séquences et l'alignement sont disponibles sur demande, voir aussi l'article de Gilles *et al.*, 1999. Deux méthodes d'analyses phylogénétiques ont été utilisées, une méthode de parcimonie (Swofford, 1993) et une de distance (Neighbour joining (NJ) (Saitou, Nei, 1987) (programme MUST ; Philippe, 1993)). La solidité de chaque noeud a été testée par bootstrapping. Plusieurs groupes extérieurs ont été testés sans qu'un changement significatif de topologie ne soit observé. En absence d'un membre de la même famille, la séquence d'un Carangidae, *Trachurus trachurus*, a été utilisée dans toutes nos analyses comme groupe extérieur (numéro d'accèsion GenBank : X81568).

RÉSULTATS

Lors des analyses phylogéographiques, 29 séquences de cyt b de mérou brun ont été alignées avec la séquence homologue d'un Carangidae (*Trachurus trachurus*). Ce dernier a été utilisé comme groupe extérieur car des essais préliminaires ont montré qu'il s'agissait d'une des séquences publiées dans GenBank parmi les plus proches de celles des

mérous bruns. L'alignement des séquences comprend 353 nucléotides alignés, dont 115 sont variables et 64 informatifs. Dans cet alignement, 56 substitutions uniques ont été observées, 34 d'entre elles sont des transitions, et 22 des transversions ; aucune saturation n'a été observée au niveau des transitions et des transversions prises séparément et ceci pour chaque position au sein des codons (Gilles *et al.*, 1999). Deux méthodes d'analyse phylogénétique ont été utilisées, chacune avec ou sans bootstrapping. Une matrice non pondérée a été utilisée lors des analyses en parcimonie. L'arbre le plus parcimonieux ainsi obtenu a la même topologie que l'arbre "bootstrappé" réalisé par la méthode du neighbour joining (NJ) sur une distance de Jukes et Cantor (figure 2A). L'arbre "bootstrappé" obtenu avec la méthode du maximum parcimonie (MP) est montré dans la figure 2B.

Les deux analyses mettent en évidence une bifurcation au sein des séquences de mérou brun de Méditerranée occidentale. Les valeurs de bootstrap supportent fortement cette séparation en un groupe nommé A, contenant des mérous algériens (100% NJ et 100% MP) et en un autre appelé B, contenant les mérous français, tunisiens et des mérous algériens (95% NJ et 99% MP). Au sein du groupe B, les multifurcations dans les analyses en NJ ou MP mettent en évidence les difficultés de positionnement des mérous français et tunisiens. De plus, dans l'arbre en NJ "bootstrappé", à l'inverse de celui en MP, les populations française et tunisienne ne sont pas différenciées. Dans l'arbre en MP (figure 2B), une séquence de mérou français se positionne avec les mérous tunisiens. Lors des analyses, les mérous algériens du groupe B constituent toujours un groupe monophylétique supporté par de fortes valeurs de bootstrap (87% NJ et 97% MP). De plus, les longueurs de branches sont similaires pour les deux groupes A et B (24 à 41 / 26 à 45) suggérant des taux d'évolution équivalents (figure 2B).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les analyses phylogénétiques suggèrent une très grande diversité génétique au sein des mérous bruns de Méditerranée occidentale. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats.

Premièrement, nous pourrions être en présence d'une espèce cryptique en Algérie. Sur les côtes algériennes, deux espèces putatives vivraient en sympatrie et ne présenteraient pas de différences morphologiques apparentes. D'autre part, en Algérie, des représentants des groupes A et B sont trouvés dans les eaux d'Annaba et d'Alger. Pour les groupes A et B, le nombre de sites variables pour chaque position des codons a été calculé ; pour la première, deuxième et troisième, il est respectivement de 15 sites (4,24%), 10 sites (2,83%) et 53 sites (15,01%), ces valeurs correspondent aux valeurs supérieures observées entre deux individus appartenant à deux espèces bien séparées de téléostéens (Johns, Avise,

1998). Il est aussi possible que le groupe B constitue un pool de mérour strictement méditerranéens, tandis que les mérour du groupe A seraient issus d'une population atlantique. L'analyse de séquences de mérour de l'Atlantique, qui est en cours, devrait apporter des éléments de réponse.

L'absence de barrière géographique entre les deux groupes laisse supposer que d'autres hypothèses sont envisageables. Par exemple, il est impossible d'exclure la présence d'hybrides puisqu'expérimentalement il a été montré que l'hybridation était possible (Rumbold, Snedaker, 1997). Des phénomènes d'introggression ne sont peut-être pas impossibles dans le milieu naturel. Parmi les espèces de mérour présentes en Méditerranée, trois coexistent sur les côtes algériennes avec le mérour brun (*E. costae* ou badèche ; *E. aeneus* ou mérour blanc ; et *E.*

caninus ou mérour gris). Les travaux de Tortonese (1986) et de Bruslé (1985) ont montré que les périodes de frai du mérour brun et de la badèche ne sont pas exactement identiques bien que ces deux espèces soient sympatriques. De plus, sur les côtes algériennes, le mérour blanc (Derbal, Kara, 1996) et le mérour gris, qui sont très rares, n'ont pas les mêmes biotopes que le mérour brun. En Algérie, le mérour brun coexisterait avec le mérour d'Haïfa (*E. haifensis*) (Heemstra, Randall, 1993) mais leurs biotopes sont relativement distincts (Tortonese, 1986 ; Heemstra, Randall, 1993). Soulignons qu'*Epinephelus marginatus* a été longtemps confondu avec le mérour d'Haïfa (*E. haifensis*) sous l'appellation d'*E. guaza*.

L'analyse du groupe B suggère que les mérour tunisiens et français sont plus proches entre eux que des mérour algériens du même groupe. De plus, une

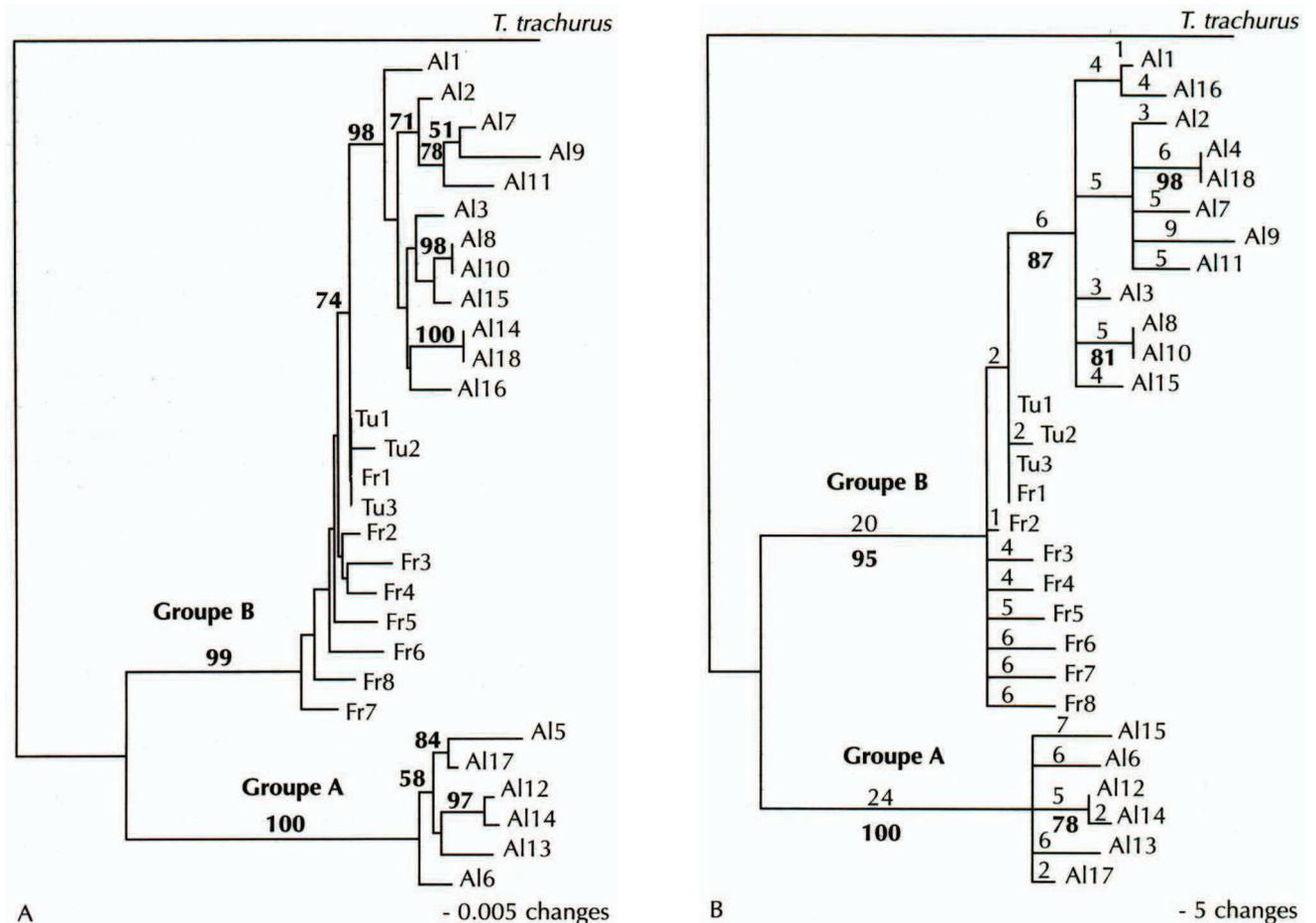


Figure 2 - Relations phylogénétiques au sein des mérour bruns de Méditerranée occidentale. Les analyses de bootstrap ont été réalisées sur 1 000 répétitions avec *T. trachurus* comme groupe extérieur. A : arbre "bootstrappé" réalisé avec une méthode de distance (NJ) sur une matrice basée sur le modèle de Jukes et Cantor. Les valeurs de bootstrap sont indiquées au-dessus des branches. B : consensus strict de 1 000 arbres équiparsimonieux, le nombre de pas est de 211, l'index de cohérence (CI) varie de 0,699 à 0,706 et l'index de rétention (RI) varie de 0,834 à 0,840. Une matrice non pondérée a été utilisée lors des analyses en parcimonie. Le nombre de pas est indiqué au dessus des branches et les valeurs de bootstrap en dessous et en gras. *Phylogeographical relationships within dusky grouper from Western Mediterranean Sea. Bootstrap analyses carried out with 1,000 iterations with T. trachurus as an outgroup. A: Neighbor Joining on a matrix of the Jukes and Cantor model. (bootstrap proportion on the top). B: Strict consensus of 1,000 equiparsimonious trees of 211 steps with a consistency index (CI) from 0.699 to 0.706 and a retention index (RI) from 0.834 to 0.840, using an Unweighted Maximum Parsimony (number of steps on the top of the branches and bootstrap proportion at the bottom in bold).*

séquence de mérour français présente de fortes homologies avec celles des mérour tunisiens. Ces résultats sont en accord avec le travail d'Oliver (1992) qui a montré que la parasitofaune branchiale des mérour tunisiens présente des affinités avec celle des individus des côtes françaises. D'autre part, dans les arbres phylogénétiques montrés dans la figure 2, les mérour français sont à la partie basale du groupe B. Étant donné que nous n'avons pas de juvéniles dans notre échantillonnage et que, jusqu'à ces dernières années, il n'y avait pas de reproduction sur les côtes françaises, on aurait pu s'attendre à trouver les mérour français (Provence) en position apicale. Ce résultat suggérerait qu'une population existe depuis longtemps sur les côtes françaises, ce qui reste à confirmer.

Afin d'essayer de répondre aux questions soulevées par cette étude, nous allons d'une part, analyser des mérour bruns de l'Atlantique pour vérifier l'hypothèse de l'origine atlantique du groupe A. D'autre part, afin de confirmer ou d'infirmer les hypothèses d'une colonisation des régions septentrionales par des mérour originaires du sud, des analyses d'individus de Corse, Sardaigne, Sicile, Baléares et des côtes continentales italiennes et espagnoles seront réalisées. De plus, il est nécessaire d'étudier d'autres espèces d'*Epinephelus* afin de détecter d'éventuels hybrides.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont au GEM et à Nausicaà qui ont partiellement financé cette étude, ainsi qu'à Mme K. Boubezari et MM. F. Bachet, A. El Hili, A. Marc qui nous ont fourni des échantillons.

BIBLIOGRAPHIE

- Bruslé J., 1985 - *Exposé synoptique des données biologiques sur les mérour Epinephelus aeneus (Geoffroy Saint Hilaire, 1809) et Epinephelus guaza (Linnaeus, 1758) de l'océan Atlantique et de la Méditerranée*. FAO, Synopsis sur les pêches, **129**, 64 pp.
- Cantatore P., M. Roberti, G. Pesole, A. Ludovico, F. Milella, M.N. Gadaleta, C. Saccone, 1994 - Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J. mol. Evol.*, **39** (6) : 589-597.
- Chauvet C., 1987 - Croissance et sexualité du mérour : l'avis d'un scientifique. *Apnea*, **10** : 8-9.
- Chauvet C., P. Francour, 1989 - Les mérour *Epinephelus guaza* du Parc National de Port-Cros (France) : Aspects socio-démographiques. *Bull. Soc. zool. Fr.*, **114** (4) : 5-13.
- Derbal F., M.H. Kara, 1996 - Alimentation estivale du mérour, *Epinephelus marginatus* (Serranidae), des côtes est algériennes. *Cybium*, **20** (3) : 295-301.
- Fischer W., M.L. Bauchot, M. Schneider, (eds), 1987 - *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. (Révision 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Vol. II Vertébrés, pp : 760-1529.
- Gilles A., A. Miquelis, J.P. Quignard, E. Faure, 1999 - Phylogéographie moléculaire du mérour brun de Méditerranée occidentale (*Epinephelus marginatus*). *C. r. Acad. Sci., Paris*, **322** (12) : 799-810.
- Harmelin J.G., P. Robert, 1992 - Mérour brun. Ses origines, sa vie, sa protection. *Océanorama*, **18** : 3-7.
- Heemstra P.C., 1991 - A taxonomic revision of the eastern atlantic groupers (Pisces : Serranidae). *Bolm Mus. munic. Funchal*, **43** (226) : 5-71.
- Heemstra P.C., D. Golani, 1993 - Clarification of the Indo-pacific groupers (Pisces, Serranidae) in the Mediterranean sea. *Israël J. Zool.*, **39** (4) : 381-390.
- Heemstra P.C., J.E. Randall, 1993 - *Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date*. FAO Fisheries Synopsis, **16** (125), 382 pp.
- Johns G.C., J.C. Avise, 1998 - A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Mol. Biol. Evol.*, **15** (11) : 1481-1490.
- Lelong P., 1993 - Présence de juvéniles du mérour brun (*Epinephelus guaza*) sur le littoral méditerranéen français. In : *Qualité du milieu marin – Indicateurs biologiques et physicochimiques*. C.F. Boudouresque, M. Avon, C. Pergent-Martini (eds), GIS Posidonie Publ., Marseille, pp : 237-242.
- Maurin H., 1994 - *Inventaire de la faune menacée de France*. Nathan, Paris, 287 pp.
- Oliver G., 1992 - Ectoparasites branchiaux du mérour *Epinephelus guaza* (Linnaeus, 1758) (Pisces, Serranidae) des côtes de Corse (Méditerranée occidentale). *Trav. sci. Parc nat. rég. Rés. nat. Corse*, **37** : 101-112.
- Phillipe H., 1993 - Must: a computer package of management utilities for sequences and trees. *Nuc. Acids Res.*, **21** : 5264-5272.
- Rumbold D.G., S.C. Snedaker, 1997 - Evaluation of bioassays to monitor surface microlayer toxicity in tropical marine waters. *Archs environ. Contamin. Toxicol.*, **32** : 135-140.
- Saitou N., M. Nei, 1987 - The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4** : 406-425.
- Swofford D.L., 1993 - Phylogenetic analysis using parsimony (PAUP), version 3.1.1, Illinois Natural History Survey, Champaign.
- Taberlet P., J.A. Bouvet, 1991 - Single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *Auk*, **108** : 58.
- Tortonese E., 1986 - Serranidae. In : *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. Vol. II*. P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen, E. Tortonese (eds), UNESCO, Paris, pp : 780-792.
- Zabala M., A. Garcia-Rubies, P. Louisy, E. Sala, 1997a - Spawning behaviour of the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci. mar.*, **61** (1) : 65-77.
- Zabala M., P. Louisy, A. Garcia-Rubies, V. Gracia, 1997b - Socio-behavioural context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Sci. mar.*, **61** (1) : 79-98.

Reçu en novembre 1999 ; accepté en janvier 2000.
Received November 1999; accepted January 2000.