



# Etude de la dynamique,de la composition biochimique et de la variabilité génétique des copépodes et des Artemia d'un écosystème extrême : la saline de Sfax (Tunisie)

Chiraz Ladhar

## ► To cite this version:

Chiraz Ladhar. Etude de la dynamique,de la composition biochimique et de la variabilité génétique des copépodes et des Artemia d'un écosystème extrême : la saline de Sfax (Tunisie). Biologie cellulaire. Université du Maine, 2014. Français. <NNT : 2014LEMA1023>. <tel-01226445>

**HAL Id: tel-01226445**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01226445>**

Submitted on 9 Nov 2015

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

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

# Thèse de Doctorat

## Chiraz LADHAR

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université du Maine  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans  
et de la faculté des Sciences de Sfax  
sous le label de L'Université de Sfax*

**Écoles doctorales :** VENAM et École doctorale de Sfax

**Discipline :** Sciences Biologiques

**Unités de recherche :** Unité de recherche UR/11ES72 Biodiversité et Écosystèmes Aquatiques, Sfax, Tunisie  
Laboratoire Mer, Molécules, Santé (EA 2160), Le Mans, France.  
UMR BOREA « Biologie des Organismes et Écosystèmes Aquatiques », Muséum National d'Histoire Naturelle, Station de Biologie Marine de Concarneau, France.

### *Étude de la dynamique, de la composition biochimique et de la variabilité génétique des copépodes et des Artemia d'un écosystème extrême : la saline de Sfax (Tunisie)*

Soutenue à Sfax le 21 novembre 2014

Président	<b>Mr Hafedh BELGHITH</b> , Professeur, Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie
Rapporteur	<b>Mr Michel DENIS</b> , Professeur, Université de la méditerranée II, France
Rapporteur	<b>Mme Faiza FAKHFAKH</b> , Professeur, Faculté des sciences de Sfax, Tunisie
Co-encadrant, Examineur	<b>Mme Françoise DENIS</b> , MCU, Muséum National d'histoire naturelle, France
Directeur de Thèse	<b>Mr Habib AYADI</b> , Professeur, Faculté des sciences de Sfax, Tunisie
Co-directeur de Thèse	<b>Mme Nathalie CASSE</b> , MCU-HDR, Faculté des sciences et Techniques Le Mans, France
Invité	<b>Mr Ridha AMDOUNI</b> , Directeur du COTUSAL

# Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes chers parents, merci pour votre soutien moral et financier et vos encouragements tout au long de mes études. Pour vos précieux conseils et l'éducation que vous m'avez apportée. Pour votre aide précieuse dans les moments difficiles. Merci infiniment.*

*J'ai une pensée toute particulière pour toi maman, tu es la personne qui me donne tous les jours la force et le courage de prendre la vie du bon côté, d'être le plus cool possible et de toujours voir la réalité de façon positive. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner.*

*A mon cher mari à qui j'exprime mon amour éternel. Ses encouragements et sa patience m'ont été précieux pour terminer ce travail.*

*A ma chère fille zannouba qui a tant supporté mon absence. Tu es l'étoile qui a éclairé ma vie, tu m'a donné la force de continuer et d'avancer juste en regardant ton beau sourire innocent.*

*A mes frères, ma belle sœur, ma nièce Ines, mon neveu Edam et ma tante, merci pour tous les moments de bonheur partagés, pour m'avoir encouragé et réconforté dans les moments de doute.*

*A ma belle famille, merci de m'avoir accueilli à bras ouverts dans votre famille.*

# Remerciements

*Cette thèse est la preuve que "l'union fait la force". C'est le résultat d'un long travail d'équipe qui a duré quatre ans, enrichi de connaissances de plusieurs personnes dans divers domaines mais surtout de soutien moral nécessaire pour continuer et pour insister et ne pas oublier que "oui c'est possible malgré toutes les contraintes".*

*Tout le travail présenté dans ce manuscrit n'aurait pas été possible sans l'aide, l'encadrement et le soutien de mon encadrant **Mr. Habib AYADI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax. Merci monsieur de m'avoir facilité beaucoup de choses, de m'avoir encouragé et aidé.*

*je voulais exprimer toute ma gratitude à **Mme. Nathalie CASSE** de m'avoir accueilli dans son laboratoire Mer Molécule Santé (MMS) à l'Université du Maine.*

*Je remercie vivement **Mr. Hafedh BELGHITH** qui me fait l'honneur de présider le jury de ma thèse. Je vous adresse mon profond respect et ma sincère gratitude.*

*Je tiens à remercier **Mme. Faiza FAKHFAKH**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax en acceptant d'être rapporteur de ma thèse. Qu'elle trouve ici l'expression et mes sincères reconnaissances.*

*Mes vifs remerciements à **Mr. Michel DENIS**, directeur de recherche au Centre d'Océanographie de Marseille, Université de la méditerranée II, Laboratoire de*

*Microbiologie, de Géochimie et Écologie marine (France), pour avoir accepté de juger mon travail et de me faire l'honneur de siéger parmi les membres du jury.*

*Je souhaite remercier Mme. Françoise DENIS pour le temps qu'elle m'a consacré au cours de ces 4 années qui sont passé en un clin d'œil, merci pour la confiance qu'elle a placé en moi, merci pour tous les encouragements, merci pour "ne t'inquiètes pas ça va marcher", merci pour "laisse tomber, ne te casses pas trop la tête" et merci pour "c'est super continues comme ça".*

*J'exprime ma reconnaissance envers la direction générale de la COTUSAL, particulièrement Mr. Ridha AMDOUNI, pour nous faciliter l'accès à la saline de Sfax,*

*Je remercie également Mr. Mohamed HAMMAMI de m'avoir accueilli dans son laboratoire de biochimie à la faculté de médecine de Monastir afin de faire les dosages d'acides gras.*

*Je remercie très chaleureusement Ikbel SELLAMI pour l'aide et le plus qu'elle a apporté dans l'article de biochimie. Je tiens à la remercier également pour sa disponibilité et sa gentillesse.*

*Un grand merci à Emmanuelle TASTARD pour ses compétences et son savoir dans l'analyse des données avec le logiciel statistique R. Merci pour ces précieux conseils, son esprit de synthèse et sa gentillesse, je tiens à t'exprimer ma plus profonde gratitude.*

*Ma plus profonde reconnaissance s'adresse à Jannet ELLOUMI, Neila ANNABI, Wassim GUERMAZI, Zaher DRIRA pour leur aide dans l'identification des espèces.*

*Je remercie toutes les personnes de la station de biologie marine et Marinarium de Concarneau (Sophie, Michel, Stéphanie...) qui sont intervenues de façon plus ou moins importante dans ce travail.*

*Un remerciement particulier est adressé à tous les collègues étrangers Fadou, Hung, Feddi, Brigitte, Sophie, Dorothée... qui ont contribué à la réalisation de cette thèse, soit par l'apport de conseils scientifiques, soit par leur soutien morale.*

*Je ne peux finir ces remerciements sans dire merci à mes chers collègues du laboratoire de Biodiversité et Écosystèmes Aquatiques qui ont su me donner du courage lorsque j'en avais besoin Amira REKIK, Hajer KHEMAKHEM, Imen HANNACHI, Khaled ATHMOUNI, Olfa MSSEDI, Rahma THABET, Rayda KOBBI, Salma KMIHA, Salma MASMOUDI, Sawssan BAYOUDH, Sawssan BOUKHRIS, Sihem GHANNAI, Thouraya BEN LTAIEF et Zohra BEN SALEEM, merci pour tous les moments agréables qu'on a passé ensemble.*

# Table des Matières

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

Introduction générale.....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique.....</b>	<b>4</b>
A. Les salines.....	4
B. Les caractéristiques de certaines communautés zooplanctoniques.....	5
I. Le zooplancton.....	6
II. Les copépodes.....	6
II.1. Classification.....	7
II.2. Abondance et distribution.....	8
II.3. Rôle trophique.....	8
II.3.a. Copépodes : proies.....	9
II.3.b. Copépodes : prédateurs.....	10
II.4. Rôle des copépodes dans les cycles biogéochimiques.....	11
III. Les <i>Artemia</i> .....	11
III.1. Répartition.....	12
III.2. Modes de nutrition et rôle trophique .....	12
C. Utilisation des acides gras pour l'étude des réseaux trophiques.....	12
I. Définition et structure.....	13
II. Rôle et utilisation des AG en tant que marqueur des relations trophiques planctoniques.....	14
III. AG et paramètres environnementaux.....	14
IV. AG et synthèse.....	15
V. AG et réserves énergétiques.....	16
D. Acquisition des données moléculaires.....	16
I. La notion d'espèce et les problèmes liés à la taxonomie.....	17
I.1. La notion de délimitation d'espèce.....	17
I.1.a. L'espèce morphologique.....	17
I.1.b. L'espèce phylogénétique.....	17

I.2. Les problèmes de taxonomie.....	18
II. Les marqueurs moléculaires.....	18
II.1. Les marqueurs utilisés.....	19
II.1.a. ADN mitochondrial <i>versus</i> ADN nucléaire? .....	19
II.1.b. Les marqueurs microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat).....	23
II.2. L'identification moléculaire par code barre ADN (DNA barcode).....	23
III. Utilisation des marqueurs moléculaires.....	25
III.1. En écologie.....	25
III.1.a. Étude de la diversité génétique et de la génétique des populations.....	25
III.1.b. La biogéographie, la phylogénie et la phylogéographie.....	26
III.2. Les espèces cryptiques.....	27
IV. Quelques exemples d'études moléculaires sur le zooplancton.....	28

**Chapitre II : Étude de la relation entre les communautés zooplanctoniques et les paramètres environnementaux de la saline de Sfax.....**

A. Introduction.....	31
B. Matériels et Méthodes.....	32
I. Présentation générale du site d'étude.....	32
I.1. Les avants pièces.....	35
I.2. Les partètements extérieurs.....	35
I.3 Les partètements intérieurs.....	35
I.4. Les avants pièces maîtresses.....	35
I.5. Les pièces maîtresses.....	36
I.6. Les tables salantes (TS) ou cristallisoirs.....	36
I.7. Les bassins réservoirs.....	36
II. Bassins et fréquence d'échantillonnage.....	37
III. Les facteurs environnementaux.....	37
III.1. La température, le pH et la salinité .....	37
III.2. Les matières en suspension.....	37
III.3. Les sels nutritifs.....	37
III.4. Les pigments chlorophylliens.....	38
IV. Les facteurs biotiques (peuplements zooplanctoniques) .....	38
IV.1. Prélèvement et conservation des échantillons.....	38



IV.2. Identification taxonomique et dénombrement.....	39
V. Techniques d'analyse statistique.....	39
C. Résultats.....	41
I. Les Paramètres physico-chimiques et biologiques.....	42
II. Abondance relative et structure des peuplements zooplanctoniques.....	43
III. Analyse des communautés zooplanctoniques et relation avec les paramètres environnementaux.....	44
D. Discussions.....	48
<b>Chapitre III : Étude de la composition biochimique en acides gras (AG) du zooplancton de la saline de Sfax couplée aux facteurs environnementaux.....</b>	<b>55</b>
A. Introduction.....	55
B. Matériels et Méthodes.....	56
I. Prélèvement et conservation des échantillons.....	56
II. Dosage des acides gras chez le zooplancton.....	56
II.1. Extraction des lipides.....	56
II.2. Méthylation et identification par Chromatographie en Phase Gazeuse.....	56
II.3. Indices trophiques.....	58
II.4. Analyse en Composantes Principales (ACP) .....	58
C. Résultats.....	59
I. Analyse de la composition lipidique.....	59
II. Analyse statistique.....	62
D. Discussion.....	64
<b>Chapitre IV: Étude génétique des espèces zooplanctoniques de la saline de Sfax.....</b>	<b>69</b>
A. Introduction.....	69
B. Matériels et Méthodes.....	70
I. Prélèvement et conservation des échantillons.....	70
II. Extraction d'ADN génomique.....	70
III. Réaction de polymérisation en chaîne.....	70
IV. L'électrophorèse.....	72
V. Éluion des fragments d'ADN à partir du gel d'agarose.....	72
VI. Clonage des fragments d'ADN.....	72

VI.1. Ligation des produits d'éluion dans le vecteur pGEM-T.....	72
VI.2. Transformation et sélection bactérienne.....	73
VI.3. Repiquage et PCR sur colonie.....	73
VI.4. Extraction plasmidique.....	74
VI.5. Séquençage des fragments d'intérêt.....	74
VII. Outils d'analyses bioinformatiques.....	74
C. Résultats.....	78
I. Caractérisation phylogénétique des communautés zooplanctoniques.....	78
I.1. Étude phylogénétique des populations d' <i>Artemia salina</i> prélevé de M2.....	78
I.1.a. Avec un fragment du gène 18S.....	78
I.1.b. Avec un fragment du gène 16S.....	81
I.2. Étude phylogénétique des copépodes.....	83
II. Génétique des populations chez <i>A. salina</i> et <i>P. grani</i> .....	85
II.1. Génétique des populations chez <i>A. salina</i> .....	86
II.2. Génétique des populations chez <i>P. grani</i> .....	88
D. Discussion .....	94
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>102</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>105</b>
<b>Annexes</b>	

# Liste des Abréviations

**Ac** : *Acartia clausii*

**ACP** : Analyse en composantes principales

**Ad** : *Acartia discaudata*

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNmt** : ADN mitochondrial

**ADNn** : ADN nucléaire

**AG** : Acides gras

**AGE** : Acides gras essentiels

**AGHI** : Acides gras hautement insaturés

**AGMI** : Acides gras monoinsaturés

**AGPI** : Acides gras polyinsaturés

**AGS** : Acides gras saturés

**ANOVA** : Analyse de variance

**ARA** : Acide arachidonique

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique

**As** : *Artemia salina*

**BET** : Bromure d'éthidium

**BF<sub>3</sub>** : Boron trifluoride

**BLAST** : Basic local alignment search tool

**BOLD** : Barcode of life data system

**Bsp** : *Bryocamptus* sp.

**Car** : Caroténoïdes

**CE** : Céride

**Chl a** : Chlorophylle a

**Chl c** : Chlorophylle c

**COI** : Sous-unités I du cytochrome oxydase

**Costatis** : Structuration des tableaux à trois indices de la statistique par co-inertie

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse

**Cs** : *Clytemnestra scutellata*

**CTAB** : Cétyle triméthyle ammonium bromide

**Cytb** : Cytochrome b

**D** : Marqueur de diatomées

**DHA** : Acide docosahexaénoïque

**DIN** : Azote inorganique dissout (somme  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ )

**DIP** : Phosphore inorganique dissout ( $\text{PO}_4^{3-}$ )

**dXTP** : Mélange des désoxyribonucléotides (A, T, C, G)

**Ea** : *Euterpina acutifrons*

**EDTA** : Acide éthylène diamine tétraacétique

**EMAG** : Esters méthyliques d'acides gras

**EPA** : Acide eicosapentaénoïque

**F** : Marqueur de flagellés

**FATMs** : Marqueurs trophiques d'acides gras

**F<sub>st</sub>** : Indice de fixation

**H'** : Indice de diversité de Shannon

**Hd** : Taux de diversité haplotypique

**IPTG** : Isopropyl-  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

**ITS** : Internal Transcribed Spacer. Régions intercalaires transcrites

**Kb** : Kilo base

**LB** : Milieux Luria Bertani

**MEGA** : Molecular evolutionary genetic analysis

**MgCl<sub>2</sub>** : Chlorure de magnésium

**MgCO<sub>3</sub>** : Carbonate de magnésium

**ML** : Maximum de vraisemblance

**Ml** : *Mesochra lilljeborgi*

**Mn** : *Microstella norvegica*

**N** : Nombre d'individus séquencés

**N:P** : Ratio DIN/DIP

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** : Ammonium

**N<sub>hap</sub>** : Nombre d'haplotypes

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Nitrites

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : Nitrates

**N<sub>sipol</sub>** : Nombre de sites polymorphes

**On** : *Oithona nana*

**Os** : *Oithona similis*

**Pb** : Paire de base

**PCR** : Réaction en chaîne de polymérisation

**Pg** : *Paracartia grani*

**pH** : Potentiel hydrogène

**PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>** : Phosphates

**PTAs** : Analyses triadiques partielles

**S** : Salinité

**Si** : Silicates

**SM** : Matières en suspension

**SSRs** : Simple Sequence Repeat. Marqueurs microsatellites

**T** : Température

**TAE** : Tris acétate EDTA

**TG** : Triglycéride

**Tm** : Température de fusion

**Tris** : Trishydroxyméthyl aminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol, Sa formule chimique est C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>

**X-Gal** : 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranoside

**Π** : Taux de diversité nucléotidique

# Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> La chaîne trophique ( <a href="http://WWW.fnh.org/SOS_mp/pedago/roy_vie/chaineal.htm">http://WWW.fnh.org/SOS_mp/pedago/roy_vie/chaineal.htm</a> ).....	9
<b>Figure 2.</b> Structure d'un acide gras (AG) .....	13
<b>Figure 3.</b> Voies de synthèse des AG chez les copépodes marins (d'après Kanazawa et al., 1979 ; Sargent et Whittle, 1981 ; Kattner et Hagen, 1995).....	15
<b>Figure 4.</b> Organisation de la molécule d'ADNmt chez <i>Paracyclopsina nana</i> (Ki et al., 2009).....	20
<b>Figure 5.</b> Cassette ribosomale (Marine Flatworms of the World, Wolfgang Seifarth 1997-2002, Trang, 2006).....	20
<b>Figure 6.</b> Vitesse d'évolution des différents marqueurs ribosomiaux nucléaires et mitochondriaux.....	22
<b>Figure 7.</b> Sel de la saline de Sfax.....	31
<b>Figure 8.</b> Localisation de la saline de Sfax et sources de pollution potentielles de ce site.....	34
<b>Figure 9.</b> Les zones hydrologiques de la saline de Sfax.....	35
<b>Figure 10.</b> Localisation des bassins d'échantillonnage (A5, A16, C41 et M2) au niveau de la saline de Sfax.....	36
<b>Figure 11.</b> Distribution des trois taxons de copépodes dans les bassins A5 (a), A16 (b) et C41 (c).....	43
<b>Figure 12.</b> Diagramme des valeurs propres (a), plan factoriel de l'analyse Costatis montrant les paramètres environnementaux (b) et les espèces zooplanctoniques (c).....	45
<b>Figure 13.</b> Projection des 18 points d'échantillonnage correspondant à chaque bassin dans le plan factoriel de l'analyse Costatis montrant (a) les variables environnementales et (b) les espèces zooplanctoniques.....	46
<b>Figure 14.</b> Projection des sites d'échantillonnage dans le plan factoriel de l'analyse Costatis pour les variables environnementales et pour les espèces.....	47
<b>Figure 15.</b> Position moyenne, par saison, des projections des échantillons dans le plan factoriel de l'analyse Costatis, pour chaque bassin, pour les variables environnementales (en haut) et pour le zooplancton (en bas).....	48
<b>Figure 16.</b> Chromatographe de type « HP 5890 séries II ».....	57

<b>Figure 17.</b> Analyse en composantes principales (ACP) des paramètres environnementaux et des acides gras chez les copépodes et <i>Artemia salina</i> dans les bassins A5, A16, C41 et M2 de la saline de Sfax.....	63
<b>Figure 18.</b> Alignement des séquences de 18S d' <i>A. salina</i> prélevé du bassin M2.....	80
<b>Figure 19.</b> Arbre de maximum de vraisemblance construit avec les séquences d'un fragment du gène 18S illustrant les relations existantes entre les haplotypes identifiés au sein des échantillons d' <i>A. salina</i> de la saline de Sfax prélevé du bassin M2 (pictogrammes pleins) et ceux disponibles dans GenBank (pictogrammes vides).....	81
<b>Figure 20.</b> Alignement des séquences de 16S d' <i>A. salina</i> prélevé du bassin M2.....	82
<b>Figure 21.</b> Arbre de maximum de vraisemblance construit avec le marqueur génétique 16S illustrant les relations existantes entre les haplotypes identifiés au sein des échantillons d' <i>A. salina</i> de la saline de Sfax prélevé du bassin M2 (pictogrammes pleins) et ceux disponibles dans GenBank (pictogrammes vides).....	82
<b>Figure 22.</b> Arbre de maximum de vraisemblance construit avec le 18S illustrant les relations existantes entre les haplotypes identifiés au sein des échantillons des copépodes et d'artémie et les espèces voisines.....	84
<b>Figure 23.</b> Réseau d'haplotypes construit avec le COI représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes d' <i>A. salina</i> prélevé du bassin M2 .....	86
<b>Figure 24.</b> Distribution des mésappariements chez <i>A. salina</i> prélevé du bassin M2 avec le COI.....	87
<b>Figure 25.</b> Réseau d'haplotypes construit avec le Cytb représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes d' <i>A. salina</i> prélevé du bassin M2 .....	87
<b>Figure 26.</b> Distribution des mésappariements chez <i>A. salina</i> prélevé du bassin M2 avec le Cytb.....	88
<b>Figure 27.</b> Réseaux d'haplotypes construit avec le COI représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes de <i>P. grani</i> prélevés de A5 (Figure A) et de A16 (Figure B).....	89
<b>Figure 28.</b> Distribution des mésappariements avec le COI chez <i>P. grani</i> prélevés de A5 (Figure A) et de A16 (Figure B).....	90
<b>Figure 29.</b> Réseau d'haplotypes construit avec le COI représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes de <i>P. grani</i> .....	90
<b>Figure 30.</b> Distribution des mésappariements avec le COI chez l'ensemble de <i>P. grani</i>	

prélevés de A5 et de A16.....	91
<b>Figure 31.</b> Réseaux d'haplotypes construit avec le Cytb représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes de <i>P. grani</i> échantillonnés de A5 (Figure A) et de A16 (Figure B).....	92
<b>Figure 32.</b> Distribution des mésappariements avec le Cytb chez <i>P. grani</i> prélevés de A5 (Figure A) et de A16 (Figure B).....	92
<b>Figure 33.</b> Réseau d'haplotypes construit avec le Cytb représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes de <i>P. grani</i> .....	93
<b>Figure 34.</b> Distribution des mésappariements avec le Cytb chez l'ensemble de <i>P. grani</i> prélevés de A5 et de A16.....	94



# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Caractéristiques des bassins d'échantillonnage.....	37
<b>Tableau 2.</b> Liste des espèces, des paramètres physico-chimiques et biologiques (abréviation) utilisés dans l'analyse multivariée (Costatis).....	41
<b>Tableau 3.</b> Moyenne $\pm$ S.E des paramètres physico-chimiques et biologiques dans les bassins A5, A16, C41 et M2.....	42
<b>Tableau 4.</b> Moyenne de l'indice de diversité (H') $\pm$ S.E des copépodes dans les bassins A5, A16 et C41.....	44
<b>Tableau 5.</b> Composition des acides gras (% des acides gras totaux) des différentes espèces dans A5, A16, C41 et M2.....	61
<b>Tableau 6.</b> Différences inter-spécifiques des acides gras trophiques chez les copépodes et les <i>A. salina</i> dans 4 bassins de la saline de Sfax.....	62
<b>Tableau 7.</b> Liste des couples d'oligonucléotides utilisés comme amorces lors des réactions de PCR.....	71
<b>Tableau 8.</b> Les espèces utilisées dans cette étude pour construire des arbres phylogénétiques avec les gènes 16S et 18S.....	75
<b>Tableau 9.</b> Liste des numéros d'accèsion à GenBank des séquences de 18S et 16S d' <i>Artemia salina</i> disponibles dans GenBank.....	76
<b>Tableau 10.</b> Liste des numéros d'accèsion à GenBank des séquences de 18S des copépodes disponibles dans GenBank.....	77
<b>Tableau 11.</b> Diversité génétique des <i>P. grani</i> et des <i>A. salina</i> avec le COI et le Cytb des différents sites échantillonnés.....	86
<b>Tableau 12.</b> Différentiation génétique des populations ( $F_{st}$ ) de <i>P. grani</i> .....	94

*Introduction*  
*générale*

## *Introduction générale*

La vie se développe parfois dans des biotopes pouvant être considérés comme "extrêmes" où les organismes doivent s'adapter à des conditions environnementales stressantes. Le fonctionnement de ces écosystèmes est largement influencé par les facteurs biotiques, comme la biodiversité et les interactions inter-spécifiques, eux-mêmes liés aux facteurs abiotiques. Les fortes variations des facteurs abiotiques dans les écosystèmes extrêmes permettent d'expliquer les relations de causalité entre ceux-ci et la structuration biologique, génétique et biochimique de la biocénose.

Peu de travaux ont été réalisés dans les hydrosystèmes extrêmes, malgré le rôle important des communautés qui y habitent. Parmi ces communautés, les espèces planctoniques peuvent coloniser ce type de milieu. L'étude de ces espèces, digne d'intérêt, est nécessaire pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes en général et des marais salants en particulier. Les invertébrés des milieux salins restent mal connus, cela est dû principalement aux fortes salinités et aux difficultés particulières pour collecter et identifier les formes fragiles qui peuplent cet environnement. Les aspects biologiques, biochimiques et moléculaires des peuplements zooplanctoniques de certains milieux hypersalés des zones arides en particulier restent encore peu connus. Dans ce contexte, la saline de Sfax constitue un exemple particulièrement intéressant en raison de l'agencement des différents bassins en fonction de la salinité pour une telle étude.

### **Objectifs de l'étude**

Les objectifs de ce travail s'organisent autour de trois pôles :

- ❖ Compte tenu de l'interaction entre les êtres vivants et leur environnement et l'importance du zooplancton dans la chaîne trophique, l'évolution de la composition des peuplements zooplanctoniques a été suivie au niveau de 4 stations de salinité croissante afin de comprendre l'organisation spatiale de la faune pélagique et sa modification temporelle en relation avec les variations abiotiques du milieu. L'intérêt est de déterminer la relation entre les caractéristiques physico-chimiques du milieu et la distribution des peuplements zooplanctoniques en relation avec les modifications environnementales.
- ❖ Cette étude comporte également l'étude des caractéristiques biochimiques en identifiant la qualité nutritionnelle en termes d'apports en acides gras chez le branchiopode *Artemia salina* et chez quelques espèces de copépodes, ces données sont indispensables pour une éventuelle exploitation aquacole.

- ❖ L'absence de données génétiques sur les organismes zooplanctoniques des milieux extrêmes et de la saline de Sfax, amène à soulever quelques questions directement liées à la diversité et à la variabilité génétique des espèces zooplanctoniques caractéristiques (copépodes et *Artemia*) de cet environnement. Des corrélations entre la structure génétique et la distribution des différentes espèces zooplanctoniques de la saline de Sfax ont été recherchées. Finalement, la présence d'espèces cryptiques a été identifiée.

### **Organisation du mémoire de thèse**

Cette thèse est composée d'un premier chapitre qui exposera le contexte bibliographique au sein duquel s'inscrit cette étude. Une introduction sur l'intérêt d'étudier les salines sera appréhendée. La place du zooplancton au sein des réseaux trophiques planctoniques sera examinée. L'intérêt d'utiliser les marqueurs biochimiques de type acides gras (AG) pour l'étude des relations trophiques s'établissant entre les communautés zooplanctoniques incapables de les synthétiser sera également rappelé. Les différents concepts moléculaires étudiés sont aussi présentés dans cette synthèse bibliographique.

Le second chapitre de ce manuscrit est dédié à l'étude de la relation entre les communautés zooplanctoniques et les paramètres environnementaux de la saline de Sfax. Il décrit la zone d'étude (saline de Sfax) ainsi que les différentes méthodes de prélèvement et d'analyse des paramètres physico-chimiques utilisés pour caractériser ce milieu. Ce chapitre présente, également, l'ensemble des résultats obtenus, ces derniers sont comparés à d'autres travaux et discutés.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de la composition biochimique en acides gras (AG) du zooplancton de la saline de Sfax couplée aux facteurs environnementaux. Il comprend la technique utilisée pour doser les acides gras chez les espèces zooplanctoniques clefs. Les résultats trouvés sont discutés.

Le quatrième chapitre fait le point sur les techniques de laboratoire qui ont permis l'obtention des données moléculaires, de les traiter de façon à reconstruire des phylogénies, et d'interpréter la structure génétique des populations étudiées. Les résultats obtenus de l'étude génétique des espèces zooplanctoniques de la saline de Sfax seront abordés et discutés dans ce chapitre.

Une conclusion générale fera la synthèse des résultats obtenus dans cette étude et ouvrira des perspectives en vue d'approfondir nos connaissances sur l'histoire et la diversité génétique du zooplancton des milieux extrêmes en général et de la saline de Sfax en particulier pour une meilleure compréhension de l'évolution des organismes de cet écosystème.

Au-delà des objectifs présentés ci-dessus, les questions auxquelles cette thèse tentera de répondre sont les suivantes :

- Comment le zooplancton de la saline de Sfax répond-il aux facteurs environnementaux et en particulier à la forte salinité? y a-t-il d'autres facteurs abiotiques à fortes influences? (**article 1 publié** : Strong and stable environmental structuring of the zooplankton communities in interconnected salt ponds)
- Quels sont les caractéristiques biochimiques des copépodes et des artémies de la saline? (**article 2 publié** : The effect of environmental factors on the fatty acid composition of copepods and *Artemia* in the Sfax solar saltern (Tunisia))
- Existe-il une variabilité génétique intra et inter-spécifique? (**article 3 en cours** : Population genetics and molecular phylogeny in the brine shrimp *Artemia*)
- Existe-il des espèces cryptiques de copépodes dans ce milieu? (**article 4 en cours** : Cryptic diversity and molecular phylogenetics in copepods among Sfax solar saltern (Tunisia))

*Chapitre I :*  
*Synthèse bibliographique*

## **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

### **A. Les salines**

Les salines sont considérées comme des écosystèmes particuliers et intéressants à cause de leur importance écologique et économique, ces milieux appartiennent aux zones humides. Elles constituent un refuge pour certains organismes comme les oiseaux migrateurs et contribuent à la production de la biomasse (Smith et al., 2011 ; O'Connell et al., 2012). Ces milieux sont sensibles aux activités qui les entourent (Smith et al., 2008). Leur dégradation peut engendrer des effets écologiques, économiques et sociologiques négatifs (O'Connell et al., 2012).

Ces milieux qualifiés d'extrêmes sont des écosystèmes de transition naturels, ils sont situés entre le milieu continental et le milieu marin.

Les salines se divisent en plusieurs bassins peu profonds interconnectés où la salinité augmente depuis la prise d'eau (eau de mer) jusqu'aux bassins cristallinois. C'est dans ces derniers que le sel est produit. Les bassins de faible salinité (38 à 100 psu) présentent des caractéristiques biotiques et abiotiques similaires à celles des lagunes côtières (Evagelopoulos et al., 2007). Ces bassins, en contact avec la mer, effectuent des échanges continus avec celle-ci (Dolapsakis et al., 2005).

Ces écosystèmes présentent des conditions stressantes et contraignantes, particulièrement liées au stress salin, pour les différentes formes de vie (Torrentera et Dodson, 2004). Malgré cela, la diversité de la faune et de la flore qui existent dans ce milieu reste élevée. De ce fait, les espèces qui y habitent doivent développer des stratégies d'adaptation pour survivre et se reproduire. Malgré les travaux effectués dans de tels biotopes (exemple Thiéry et Puente, 2002 ; Torrentera et Dodson, 2004 ; Dolapsakis et al., 2005 ; Abid et al., 2008 ; Khemakem et al., 2010 ; Khemakem et al., 2013), beaucoup de questions restent posées à propos de ces milieux influencés par les changements climatiques et hydrographiques.

Ces milieux présentent un grand intérêt écologique et économique, similaires des écosystèmes méditerranéens (Korovessis et Lekkas, 2000). Leur rôle économique réside dans l'extraction du sel par le biais de l'évaporation (Evagelopoulos et al., 2007). Pour cette raison, un intérêt continu est accordé à ces écosystèmes.

Ces zones humides présentent des opportunités exceptionnelles pour étudier la biodiversité associée à des conditions environnementales généralement considérées comme stressantes. Les variations de la salinité ont une influence sur la dynamique, la composition biochimique et la structure génétique des peuplements.

En plus de la richesse biotique du milieu, les salines constituent des patrimoines culturels, paysagers et des héritages industriels.

Parmi les organismes qui contribuent au bon fonctionnement de la saline, les communautés phyto et zooplanctoniques jouent un rôle crucial. Ces organismes ont une position clé dans le réseau trophique puisque le zooplancton est considéré comme une charnière entre les producteurs primaires (phytoplancton) dont il se nourrit et les niveaux trophiques supérieurs (macrofaune benthique, poissons, oiseaux...).

Dans les salines, l'extraction du sel n'est pas seulement un processus physique d'évaporation liée à l'énergie solaire mais elle est aussi favorisée par les processus biologiques et les organismes caractéristiques de ces milieux de saumure (Davis, 2000). La quantité et la qualité du sel dépendent des différentes communautés planctoniques entre autres celles qui colorent l'eau. Certaines sont pigmentées ce qui augmentent l'accumulation d'énergie solaire, et donc augmentation de la température du milieu. Ainsi, des bactéries halophiles libèrent de l'énergie et chauffent l'eau. Ces 2 processus favorisent l'évaporation. Enfin les communautés benthiques minimisent l'accumulation des substances organiques (Segal et al., 2009) et contribuent, ainsi, à augmenter la qualité du sel.

Selon les organismes considérés, les processus biologiques impliqués dans la production de sel varient. Ainsi, les *Artemia* sp. et les bactéries halophiles interviennent dans la production du sel. A des taux limités d'oxygène, les *Halobacterium*, qui se prolifèrent en se nourrissant des *Artemia* mortes, produisent un pigment protéique (bacteriorhodopsine) qui convertit l'énergie lumineuse en énergie chimique et augmente la température, par conséquent, l'évaporation et la production du sel croissent. Les protistes microscopiques, comme *Dunaliella* qui est une alimentation majeure des *Artemia*, augmentent l'absorption de l'énergie solaire. Par contre, d'autres organismes ont un effet néfaste, parmi ces organismes qui nuisent à la production du sel, le cyanobactérium *Coccochloris* sp. produit un mucus qui augmente la viscosité des saumures, et diminue ainsi l'évaporation. La présence de ces organismes est favorisée par les concentrations élevées en phosphore (Vieira et Bio, 2011).

### **B. Les caractéristiques de certaines communautés zooplanctoniques**

Les recherches impliquant le zooplancton en général et les copépodes et les *Artemia* sp. en particulier ont été et restent abondamment représentées dans la littérature. Ainsi, les processus physiques et biologiques ayant une influence sur la dynamique des communautés planctoniques, et particulièrement celles des copépodes et des *Artemia* sp., sont relativement bien connus, ces travaux soulignent l'importance de ces espèces dans l'écosystème aquatique.



Cependant, peu d'études ayant trait aux milieux saumâtres en général et aux marais salants en particulier, sont disponibles dans la littérature (Davis, 2000). Étudier ces communautés zooplanctoniques vivant dans les milieux extrêmes, comme les salines, est donc devenu indispensable pour améliorer la connaissance de ces biotopes.

### **I. Le zooplancton**

Le plancton est l'ensemble des organismes (animaux, autotrophes, archéobactéries ou bactéries) dérivant aux grés des courants dans les eaux douces, saumâtres et salées. Cette communauté s'oppose au necton pouvant nager à contre-courant et contrôler sa position dans la colonne d'eau (céphalopodes, poissons et mammifères marins). Parmi les organismes planctoniques, le compartiment hétérotrophe se nourrissant de matières organiques autochtones et allochtones issues des végétaux ou d'autres animaux constitue le zooplancton. Ce dernier peut être alors herbivore ou/et carnivore (Bougis, 1974). Ce groupe de plancton présente divers comportements alimentaires : filtration, prédation et symbiose avec le phytoplancton autotrophe.

Le zooplancton, maillon essentiel dans les réseaux trophiques aquatiques joue un rôle clé dans le transfert de la matière et d'énergie entre les petits producteurs primaires et les niveaux trophiques supérieurs (Levinsen et Nielsen, 2002). Ainsi, il est considéré comme un consommateur qui régule la biomasse phytoplanctonique, notamment lors des efflorescences. Le compartiment zooplanctonique joue également un rôle important dans les cycles biogéochimiques, notamment dans le cycle du carbone, transférant celui-ci des niveaux inférieurs vers les plus hauts niveaux trophiques tels que les larves et les juvéniles de poissons.

L'abondance et la distribution du zooplancton sont fortement influencées par les facteurs physico-chimiques, l'état physique de la colonne d'eau ainsi que la distribution et l'abondance des autres espèces.

Le zooplancton peut survivre dans les milieux à salinité extrême comme les salines. Ce plancton joue un rôle fondamental dans la chaîne alimentaire et dans l'équilibre du milieu environnant. Il est largement dominé dans la plupart des hydrosystèmes par les copépodes planctoniques.

### **II. Les copépodes**

En se basant sur leur taille, leur diversité et leur abondance, les copépodes sont considérés comme « les insectes de la mer » (Huys et Boxshall, 1991). De nombreux travaux ont eu pour objectifs d'étudier la diversité, la dynamique, les habitats, les modes de vie et le

développement larvaire de ces petits crustacés planctoniques, afin de comprendre leurs rôle dans l'écologie, la biologie trophique, la gestion des pêches et aussi dans l'aquaculture (Drillet et al., 2011).

D'autres travaux ont montré l'utilisation possible des copépodes dans l'évaluation de l'impact des contaminants dans l'écosystème marins (Forget-Leray et al., 2005). Ce modèle s'est avéré pertinent pour révéler la présence des polluants organiques comme les agents antifouling, les pesticides (Staton et al., 2002), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) (Lotufo, 1997) et les polychlorobiphényles (PCB) (Magnusson et al., 2007) dans les écosystèmes marin. De même, ce taxon sert à évaluer le risque associé à l'exposition aux perturbateurs chimiques endocriniens (EDC) (Marzio et al., 2013). Ainsi, dans certains pays, les copépodes sont utilisés pour faire des essais de réglementation toxicologique (Edmar, 2002). D'autres recherches se sont focalisées sur les copépodes comme des bio-indicateurs et un système d'alarme signalant les changements climatiques (Greene et Pershing, 2007) vue leur petite taille et leur courte durée de vie. Ces crustacés répondent rapidement aux changements environnementaux et sont considérés, de ce fait, comme des indicateurs biologiques des masses d'eaux (Hays et al., 2005) et des biomarqueurs des changements des écosystèmes aquatiques (Marques et al., 2011).

Enfin, certaines espèces de copépodes sont utilisées dans l'aquaculture. Ces copépodes sont des proies pour les larves de poissons comme les morues, les flétans, les poissons plats et les barramundis (O'Bryen et Lee, 2005).

### *II.1. Classification*

Les copépodes forment une sous-classe appartenant à la classe des maxillopodes dans le sous-embranchement des crustacés constituant une subdivision de l'embranchement des arthropodes.

Règne :	Animal
Embranchement :	Arthropodes
Sous embranchement :	Crustacés
Classe :	Maxillopodes
Sous classe :	Copépodes

Les copépodes sont considérés comme l'un des plus importants groupes d'invertébrés en nombre d'espèces dans les systèmes marins et estuariens (Ki et al., 2009). Les adultes des copépodes font partie du méso zooplancton (200 µm - 12 mm) (Bradford-Grieve et al., 1999). Ils constituent l'une des principales composantes du zooplancton métazoaire (Mauchline, 1998). Ils forment un groupe extrêmement diversifié comprenant 200 familles, 1650 genres et

11500 espèces décrites (Huys et Boxshall, 1991 ; Humes, 1994). La diversité réelle reste néanmoins encore largement sous-estimée car ce nombre couvre seulement 15 % du nombre actuel des espèces de copépodes sur la planète selon l'estimation de Machida et al. (2002), plusieurs d'entre elles n'étant pas encore identifiées.

Avec plusieurs milliers d'espèces connues, les Harpacticoida, les Calanoida et les Cyclopoida sont les groupes de copépodes les mieux représentés. Leur densité et leur dynamique sont très variables suivant les écosystèmes et la saison considérée (Drira et al., 2009).

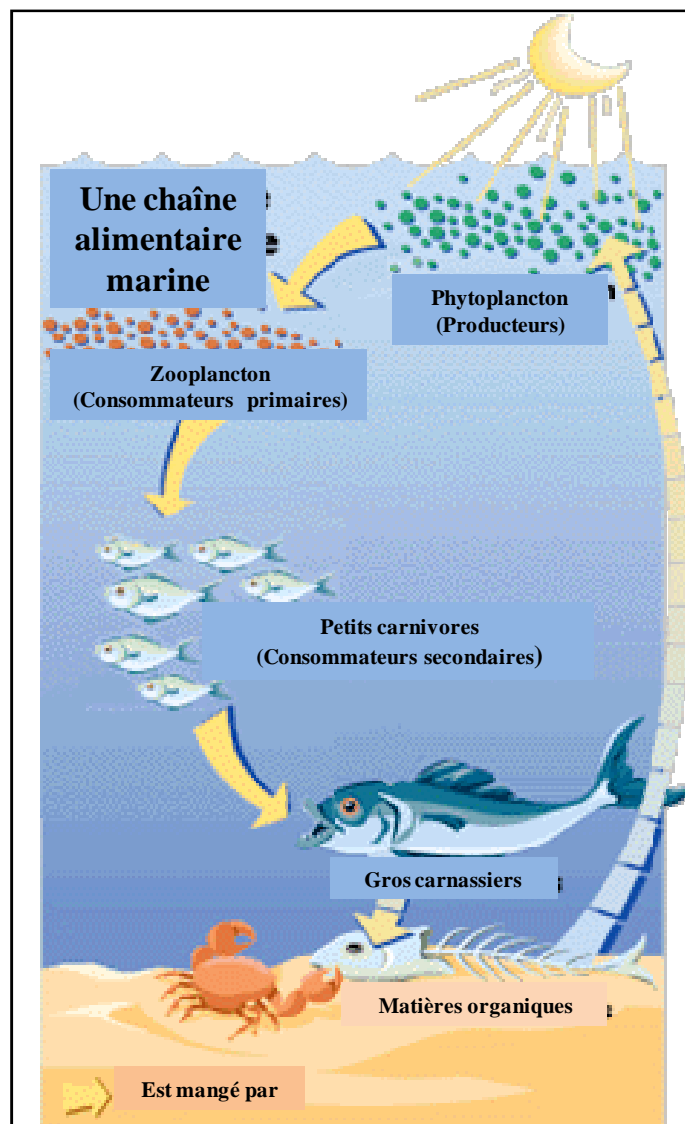
### *II.2. Abondance et distribution*

Les copépodes surclassent tout autre organisme zooplanctonique au sein de l'écosystème aquatique du point de vue abondance avec 70 à 90 % de la biomasse totale du zooplancton (Nybakken, 2001). Dans les lagunes et les estuaires, les copépodes représentent 80 à 95 % de la biomasse zooplanctonique globale (Heerkloss et al., 1990) et 70 % dans les océans (Wells, 1984).

Les copépodes ont colonisé divers écosystèmes et habitats aquatiques : des environnements d'eau douce aux environnements marins et hypersalins ; presque tous les régimes de température et donc toutes les latitudes (des écosystèmes polaires aux tropicaux en passant par les écosystèmes tempérés) et toutes les altitudes, des milieux montagneux (Elgmork et Halvorsen, 1998) aux fosses abyssales (Wolff, 1960) et sur les sites hydrothermaux (Heptner et Ivanenko, 2002). En raison de leur large distribution, les copépodes ont développé divers style de vie (Huys et Boxshall, 1991) qui leur ont permis de s'adapter aux différents milieux. Ce compartiment animal existe sous divers formes : libre ou parasite, planctonique ou benthique.

### *II.3. Rôle trophique*

De nombreuses études ont mis en évidence l'importance des copépodes dans les chaînes alimentaires marines. Ils sont considérés comme des producteurs secondaires (Figure 1) entre les producteurs primaires (phytoplancton) et les niveaux trophiques supérieurs (comme les larves de poissons et les poissons planctonivores) (Ruppert et al., 2003 ; Hays et al., 2005 ; Letessier et al., 2012). Ce sont des organismes clés participant de façon majeure au cycle de nutriments et au flux énergétique dans les écosystèmes aquatiques (De-Young et al., 2004).



**Fig.1. La chaîne trophique**  
([http://WWW.fnh.org/SOS\\_mp/pedago/roy\\_vie/chaineal.htm](http://WWW.fnh.org/SOS_mp/pedago/roy_vie/chaineal.htm))

### II.3.a. Copépodes : proies

La portée du rôle écologique des copépodes ne peut être remise en cause. Ces crustacés planctoniques ont un rôle important dans la chaîne alimentaire dans la mesure où, par leur diversité spécifique, leur abondance et leur richesse en protéines et en acides gras (McKinnon et al., 2003), constituent un aliment de choix pour différents organismes zooplanctoniques, notamment les nauplius des artémies (Watanabe et al., 1983), les chaetognathes, les crustacés, les céphalopodes (Plounevez et Champalbert, 1999) et de nombreux poissons marins (Dolbeth et al., 2008) et planctonivores (Möllmann et al., 2004 ; O'Bryen et Lee, 2005). Ainsi, ils se situent à la base de pratiquement toutes les chaînes alimentaires pélagiques. Beaucoup de poissons d'importance économique, ont un régime alimentaire basé presque exclusivement

sur les copépodes à au moins un stade de leur cycle de vie : le stade larvaire (bar, sardine, morue....) ou bien le stade juvénile (Hicks et Coull, 1983) et parfois, comme le hareng, tout au long de leur vie (Turner, 1984).

Ces prédateurs sélectionnent leur proie copépode. La taille, les stades de développement, le comportement natatoire, la visibilité, la faculté de capture, la valeur nutritive des copépodes peuvent être des facteurs impliqués dans cette sélection (Pryor et Epifano, 1993 ; Hillgruber et al., 1995 ; Kiesling et al., 2002). Très probablement, le principe de sélection ne dépend pas d'un seul facteur mais de la combinaison de plusieurs facteurs.

### II.3.b. Copépodes : prédateurs

Le régime et le comportement alimentaire des copépodes diffèrent selon l'espèce considérée (Tackx et al., 1990). Certains copépodes planctoniques sont herbivores et presque toujours des filtreurs (Graeve et al., 1994). Les proies capturées sont souvent des algues unicellulaires de petite taille (5 à 50  $\mu\text{m}$  environ) (Copin-Montaigut, 2002). Parmi ces algues, on retrouve les diatomées (Mauchline, 1998), les chrysophycées et les cryptophycées (Antajan et Gasparini, 2004).

D'autres espèces de copépodes sont carnivores et prédateurs (Calbet et al., 2007). On peut retrouver dans leur régime alimentaire des proies souvent mobiles : les radiolaires, les rotifères, les larves d'autres crustacés ou encore d'autres copépodes. Le cannibalisme n'est pas rare chez les copépodes (Basedow et Tande, 2006 ; Camus et Zeng, 2009) surtout dans les cas de culture. Ce phénomène est observé chez plusieurs espèces (*Sinocalanus tenellus*, *Centropages abdominalis*, *Tigriopus fulvus* et *Acartia sinjiensis*). Ce sont souvent les stades juvéniles des copépodes qui sont les victimes de ce phénomène (Ohman et Hirche, 2001).

Néanmoins, beaucoup de copépodes planctoniques alternent entre ces différents comportements alimentaires en fonction de la disponibilité, la taille et la valeur nutritive des proies (Adrian et Schneider-Olt, 1999). Ainsi chez ces espèces omnivores (Dalsgaard et al., 2003 ; Arts et al., 2009), on retrouve parmi leurs proies des algues ou du petit zooplancton et même des détritits. C'est le cas de *Oithona* sp. qui a une préférence alimentaire pour les ciliés et les dinoflagellés (Lonsdale et al., 2000) mais ingère également les diatomées (Hopkins et Torres, 1989). Les Calanoida, quand à eux, ingèrent préférentiellement des détritits (Dilling et al., 1998) et des protistes (Froneman et al., 1996).

Quel que soit leur régime alimentaire, les copépodes se montrent cependant souvent extrêmement sélectifs, surtout chez les omnivores (Jansen et al., 2006). Les principaux

critères de sélection mis en évidence sont principalement la taille (Troch et al., 2006) et la composition biochimique des proies (Copin-Montaigut, 2002).

#### II.4. Rôle des copépodes dans les cycles biogéochimiques

Les copépodes participent de façon majeure aux cycles biogéochimiques (Lorda et al., 2013). En effet, ce compartiment zooplanctonique constitue le premier lien majeur dans la chaîne alimentaire transférant la matière organique produite par les producteurs primaires phytoplanctoniques et les boucles microbiennes vers les niveaux trophiques plus élevés, il permet ainsi la rétention ou le transfert de certains éléments fondamentaux comme le carbone et l'azote (Gasparini, 2005).

De plus, les copépodes produisent des quantités importantes de pelotes fécales, ces dernières se déposent au fond et se re-minéralisent sous l'action des micro-organismes (Olli et al., 2007). Le flux de pelotes fécales produit par les copépodes vers les fonds océaniques a un impact significatif sur le cycle des nutriments et les taux de sédimentation, apportant de façon relativement rapide une grande part du carbone disponible dans les environnements profonds. Par exemple, ces pelotes fécales contribuent à 20 % du taux de carbone organique particulaire dans le Nord de la mer de Barents (Wexels Riser et al., 2008). Même dans les océans oligotrophes, cette fraction reste élevée et est de l'ordre de 14 à 35 % (ce pourcentage augmente avec l'augmentation de la profondeur) (Wilson et al., 2008).

Enfin, les copépodes permettent aussi le transport et la rétention de l'azote. Ils le libèrent sous différentes formes : ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et azote organique dissout (DON). A titre d'exemple, dans une expérience menée au laboratoire, *A. discaudata* et *C. helgolandicus* contribuent fortement à la production totale de DON sous forme d'excrétion directe (79 et 64 %, respectivement) (Vincent et al., 2007).

### III. Les Artemia

*Artemia* sp. appartient à l'ordre des Anostraca qui fait partie de la classe des branchiopodes constituant une subdivision de l'embranchement des arthropodes.

Règne :	Animal
Embranchement :	Arthropodes
Sous embranchement :	Crustacés
Classe :	Branchiopodes
Ordre :	Anostraca
Famille :	Artemiidae

### III.1. Répartition

*Artemia* sp. est un groupe cosmopolite qui peut survivre à des conditions environnementales stressantes : salinités extrêmes, faibles ou fortes températures et anoxie (Torretera et Dodson, 2004). Grâce à cette flexibilité, les habitats de ces organismes sont distribués partout dans le monde à l'exception de l'Antarctique (Browne et Mac-Donald, 1982). Ils vivent dans les lacs salés et hypersalés (Thiéry et Puente, 2002), les lagunes côtières et dans les étangs (Triantaphyllidis et al., 1996). L'absence de compétiteurs favorise le développement de ce branchiopode dans les bassins sursalés.

### III.2. Modes de nutrition et rôle trophique

Grâce à ses antennes, *Artemia* sp. est capable de filtrer les particules alimentaires (phytoplancton, bactéries et détritiques) dont la taille se situe entre 1 et 30 microns (Dobbeleir et al., 1980). Lorsque le phytoplancton devient rare, *Artemia* sp. se positionne sur les fonds vaseux et agite les micro-particules organiques sédimentées afin de les mettre en suspension pour les filtrer et les ingurgiter. Cependant, le phytoplancton, surtout les chlorophycées *Dunaliella salina* et *Chlamydomonas* sp., reste la nourriture préférée pour ce branchiopode en raison de leur haute valeur nutritive en protéines (Ayadi et al., 2004).

Dans les marais salants *Artemia* sp. constitue, en outre, la proie préférentielle des oiseaux vivants dans les sites hypersalins (Thiéry et Puente, 2002) tels que les flamants roses (Torretera et Dodson, 2004).

L'importance de ce crustacé réside dans sa valeur nutritive, écologique et économique.

Grâce à sa valeur nutritive en protéines et en acides gras, *Artemia* sp. est une nourriture potentielle pour les larves d'éclosion et les espèces d'aquariophilie (Guermazi et al., 2008 ; Vieira et Bio, 2011). En plus de leur qualité nutritive, la petite taille des nauplius convient parfaitement aux jeunes stades larvaires de poissons et de crustacés (De Los Santos et al., 1980).

*Artemia* sp. contribue également à la boucle microbienne. En effet, ses excréments fournissent des substances nutritives essentielles pour le développement de la flore bactérienne comme *Halobacterium* sp.

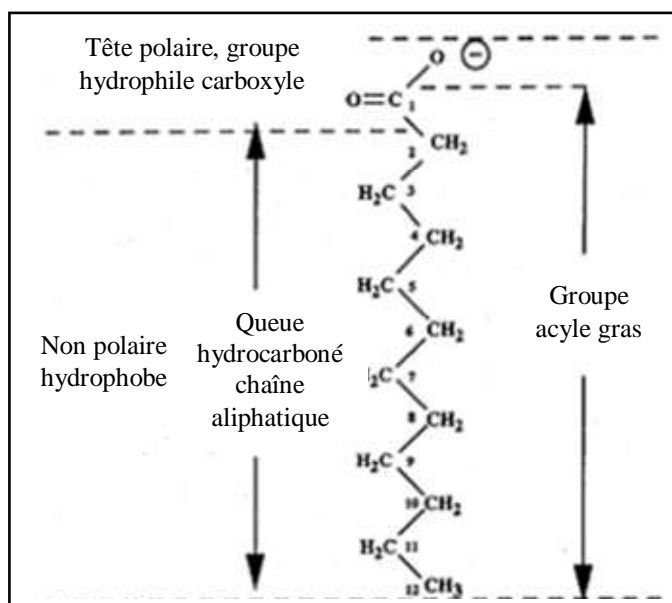
### **C. Utilisation des acides gras pour l'étude des réseaux trophiques**

Pendant longtemps, l'étude des apports alimentaires d'une espèce, passait par l'analyse du contenu stomacal (Schmidt et Atkinson, 2006). L'étude de la composition lipidique (Caramujo et al., 2008), apparue ces dernières décennies, est une méthode plus efficace. Les lipides jouent un rôle majeur dans le développement et la croissance des organismes. Ils constituent

une source d'énergie calorique pour la majorité des organismes. La quantité et la qualité nutritionnelle des aliments disponibles dans le milieu conditionnent la disponibilité des lipides. Les acides gras (AG) sont les constituants de base de la majorité des lipides, ils constituent la fraction saponifiable des lipides.

### I. Définition et structure

Les AG présentent un caractère structural commun : ils portent tous un groupement carboxyle COOH (Figure 2).



**Fig.2. Structure d'un acide gras (AG)**

Ils sont formés d'une chaîne linéaire ou ramifiée, à caractère hydrophobe, comprenant un nombre d'atomes de carbone variable de 4 à 36. Ils peuvent présenter une ou plusieurs insaturations. On distingue :

- ❖ Les AG saturés (AGS) : chaîne carbonée sans double liaison.
- ❖ Les AG monoinsaturés (AGMI) : ils possèdent une double liaison sur la chaîne carbonée.
- ❖ Les AG polyinsaturés (AGPI) : ils possèdent plusieurs doubles liaisons sur la chaîne carbonée.

La nomenclature des AG est basée sur la longueur de la chaîne de carbone, l'existence de doubles liaisons, leur nombre et leur position. La nomenclature utilisée est la suivante :

**X:Y(n-Z)**

X : nombre d'atomes de carbone sur la chaîne aliphatique

Y : nombre de doubles liaisons



Z : localisation de la première double liaison à compter à partir du groupement méthyle terminal

Exemple : acide linoléique 18:2(n-6) :  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$

## **II. Rôle et utilisation des AG en tant que marqueur des relations trophiques planctoniques**

La stabilité métabolique de certains AG lors du transfert trophique les classe comme des biomarqueurs lipidiques trophiques (Fatty Acid Trophic Markers (FATMs)) (Auel et al., 2002) permettant ainsi de les utiliser en tant que traceurs des relations proie-prédateur dans l'environnement marin (Dalsgaard et al., 2003). Ces composés sont présents chez la plupart des procaryotes et eucaryotes à l'exception des *Archae*. De plus, certains AG sont également des indicateurs de la qualité nutritionnelle d'un compartiment trophique spécifique tel que le zooplancton (Dalsgaard et al., 2003 ; Brett et al., 2006), les poissons (Piché et al., 2010) et les mammifères marins (Budge et al., 2006).

Les acides gras essentiels (AGE) constituent des composants importants durant la période de reproduction, d'embryogenèse et de croissance du zooplancton marin (Arendt et al., 2005 ; Peters et al., 2007) et d'eau douce (Boëchat et Adrian, 2006).

L'acide eicosapentaénoïque 20:5(n-3) (EPA) et l'acide docosahexaénoïque 22:6(n-3) (DHA) sont des AG oméga 3 produits par le phytoplancton; ils entrent dans la composante structurale de la membrane cellulaire agissant ainsi sur plusieurs processus physiologiques (Guschina et Harwood, 2009). Les acides gras hautement insaturés (EPA, DHA, et ARA 20:4(n-6) (acide arachidonique)) interviennent aussi dans la croissance, le succès de la reproduction et le développement neural du zooplancton et des poissons (Ravet et al., 2003 ; Brett et al., 2006).

## **III. AG et paramètres environnementaux**

La composition biochimique d'un groupe taxonomique est susceptible de varier en fonction des conditions environnementales (Guschina et Harwood, 2009). Les corps gras, en particulier, sont très sensibles aux changements environnementaux et aux facteurs de stress qui peuvent agir sur la disponibilité de la nourriture. En conséquence, la production des acides gras hautement insaturés diminue avec l'eutrophisation (Müller-Navarra et al., 2004) ou le réchauffement climatique dans les écosystèmes aquatiques (Arts et al., 2009).

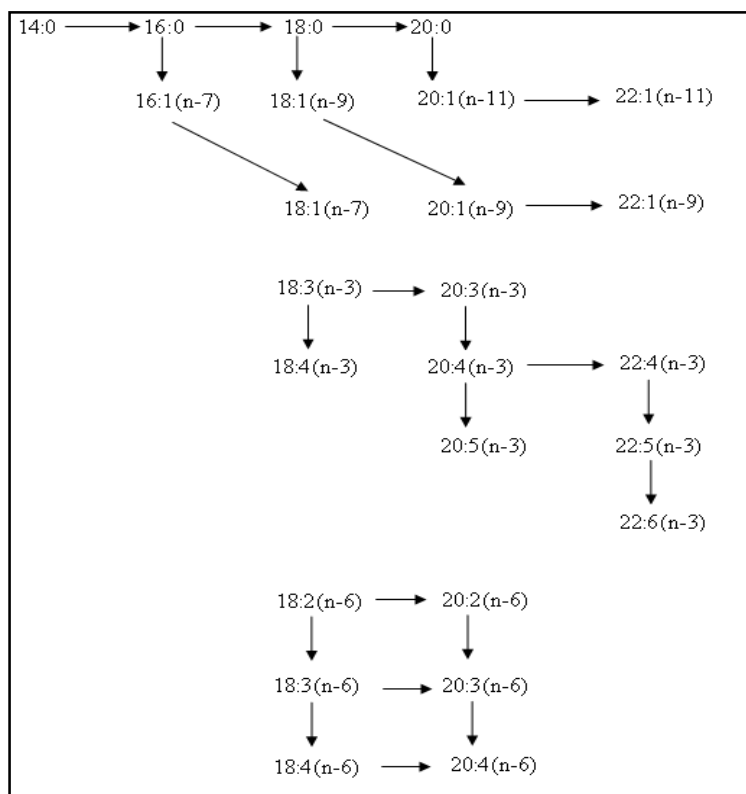
Ainsi, la température, la salinité, la lumière et les nutriments agissent sur la composition des AG chez les algues (Guschina et Harwood, 2009). Les radiations UV réduisent la quantité en AGPI chez le phytoplancton (Wang et Chai, 1994). Les teneurs en AGPI sont aussi fortement influencées par l'intensité lumineuse et les nutriments (Leu et al., 2006). Par ailleurs, la

quantité et la qualité des AG sont liées à la disponibilité de la nourriture qui varie selon les saisons et selon les milieux.

#### IV. AG et synthèse

Les AG contenus dans les lipides des crustacés sont un mélange d'AG issus de l'alimentation et d'AG synthétisés de *novo* par le zooplancton (Desvillettes et al., 1997). Des bioconversions, des élongations et des désaturations de certains AG peuvent avoir lieu après leur incorporation dans un organisme. Par ces processus, des copépodes comme certains Harpacticoida sont capables de transformer une chaîne courte d'AG (exemple 18:3(n-3)) en une chaîne longue polyinsaturée (Nanton et Castell, 1999).

Il a été montré que plusieurs espèces de copépodes étaient capables de synthétiser du 20:5(n-3) et du 22:6(n-3) à partir du 18:3(n-3) provenant de la nourriture ; c'est le cas par exemple du Cyclopoida d'eau douce *Eucyclops serrulatus* (Desvillettes et al., 1997) et de l'Harpacticoida marin *Tisbe* sp. (Nanton et Castell, 1998). Plusieurs auteurs ont proposé des voies de synthèse des AG chez les copépodes marins (Kanazawa et al., 1979 ; Sargent et Whittle, 1981 ; Kattner et Hagen, 1995) (Figure 3). Lorsque l'apport lipidique alimentaire est suffisant, la synthèse et la bioconversion des AG sont ralenties voire inhibées et la majorité des AG provient de l'alimentation sans subir de modification marquée.



**Fig.3. Voies de synthèse des AG chez les copépodes marins (d'après Kanazawa et al., 1979 ; Sargent et Whittle, 1981 ; Kattner et Hagen, 1995)**

### **V. AG et réserves énergétiques**

Les copépodes ont adopté une stratégie d'accumulation de quantités considérables de réserves énergétiques qui leur permettent d'assurer leur survie en période de carence nutritive du milieu (St. John et Lund, 1996). Ces réserves sont essentiellement constituées de lipides, stockés sous la forme de cériide (CE) et/ou de triglycéride (TG) dans des gouttelettes lipidiques et/ou un "sac à huile" qui augmentent leur flottabilité (Kattner et al., 1994). Les réserves énergétiques peuvent également être stockées au niveau des œufs comme chez les Calanoida *Temora longicornis* (Evjemo et al., 2008) et *Euchaeta japonica*, les lipides de ce dernier sont, majoritairement, sous la forme d'esters et de TG (58 % et 19 % respectivement). Certaines espèces présentent d'importantes quantités de CE et peu ou pas de TG alors que d'autres stockeraient uniquement des TG. Ces lipides de réserve peuvent représenter jusqu'à 70 % du poids sec de l'adulte chez les Calanoida polaires tels que *Calanus finmarchicus*, et jusqu'à 60 % chez certains Calanoida lacustres (Vanderploeg et al., 1998). Ils assurent la survie de la population et soutiennent les mécanismes physiologiques liés au développement des stades précoces de ces espèces (Lee et al., 1971).

### **D. Acquisition des données moléculaires**

La découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick (1953) a donné naissance à la génomique, la science du génome qui étudie la structure et le fonctionnement du génome. Les progrès de ces dernières années en biologie moléculaire ont permis de grandes avancées techniques comme par exemple, le séquençage complet du génome du nématode *Caenorhabditis elegans* (Hodgkin et al., 1998) et de l'homme (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). L'assistance informatique apportée à cette science génère une nouvelle discipline : la bioinformatique. Cette discipline est appliquée dans différentes études tel que la phylogéographie, la phylogénie ou les projets génomiques. Cela a permis grâce à l'avancée de la technologie du séquençage de rendre disponible une grande quantité de données moléculaires. Ces données jouent un rôle important dans l'identification moléculaire des espèces surtout lorsque les caractères morphologiques sont considérés comme 'réduits' comme le cas des copépodes (Adamowicz et al., 2010). L'utilisation des séquences de l'ADN comme source d'information complémentaire à une classification morphologique est une des solutions adéquates dans ce cas.

## **I. La notion d'espèce et les problèmes liés à la taxonomie**

### *I.1. La notion de délimitation d'espèce*

L'espèce est le taxon de base de la systématique, qui provient du latin « species » qui signifie aspect ou apparence. Une espèce peut être définie comme étant un ensemble d'individus qui ont des traits morphologiques similaires. Les individus d'une même espèce sont interféconds et par conséquent peuvent se reproduire entre eux et engendrer une descendance féconde.

Cependant, la notion d'espèce est plus compliquée et sa définition varie selon les domaines (Lee, 2003a). Plusieurs concepts d'espèce sont définis dans la littérature scientifique (Reydon, 2004). Deux concepts différents du terme espèce, à savoir l'espèce morphologique et l'espèce phylogénétique seront employés au cours de ce travail.

#### I.1.a. L'espèce morphologique

Cette définition est la plus fréquente de tous les concepts d'espèce. Elle réunit, sous le terme espèce, tous les individus possédant des caractères morphologiques semblables (Bray, 2009).

Cette définition est la plus proche de celle donnée par Darwin puisqu'il écrivait en 1859 : « le terme espèce est donné arbitrairement pour des raisons pratiques à un groupe d'individus se ressemblant ».

Le concept morphologique reste la base de la délimitation des espèces par les taxonomistes malgré qu'il présente des limites pour classer certaines formes juvéniles qui peuvent présenter une différence morphologique considérable avec les adultes. Il en est de même pour les organismes dont les mâles et les femelles présentent un dimorphisme sexuel.

Si deux individus qui se ressemblent peuvent être classés sous la même espèce, classer deux individus qui ne se ressemblent pas sous deux espèces différentes n'est pas sans risque. Donc les différences morphologiques ne reflètent pas nécessairement des différences génétiques (Jung et al., 2006). Le phénomène le plus spectaculaire dans ce cas est le cyclomorphose (Chang et Hanazato, 2003). Bien que la morphologie soit encore la méthode la plus commune d'identification des espèces, il semble nécessaire de faire référence à d'autres critères comme les différences génomiques pour affiner la classification de certains groupes d'organismes.

#### I.1.b. L'espèce phylogénétique

En 1989 Cracraft a défini l'espèce phylogénétique comme un ensemble non réductible d'individus ayant en commun une diagnose qui les différencie des autres et comprenant les ancêtres, les individus actuels et leurs descendances. Cette définition intègre en plus des caractères morphologiques à travers le terme « diagnose », l'information génétique et la généalogie.

### *I.2. Les problèmes de taxonomie*

L'identification consiste à accorder une unité taxonomique nouvelle ou existante à un groupe taxonomique préalablement présent dans une classification déjà existante. En d'autres termes, l'identification ne peut se faire qu'en utilisant la classification existante qui constitue une base de connaissance nécessaire. Les méthodes utilisées pour l'identification (comme la dissection dans le cas des copépodes) et la robustesse de celle-ci sont donc intimement liées aux travaux réalisés auparavant. S'il est relativement facile d'identifier des organismes complexes visibles à l'œil nu, il en est tout autrement pour les organismes plus petits comme le zooplancton en général et les copépodes en particulier.

Un autre problème délicat est la définition de l'espèce que l'on veut identifier. Par exemple, dans le groupe des copépodes, il existe encore souvent plusieurs synonymes par espèce. Ces noms d'espèces peuvent varier d'une publication à l'autre c'est le cas de l'Acartidae *Acartia* (*Paracartia*) *grani* (Rose, 1933 ; Boxshall et Halsey, 2004).

De plus, grâce aux études de phylogénie moléculaire, la taxonomie de ces organismes est régulièrement modifiée. Le nom d'espèce est alors un concept très relatif, compliqué et dépendant de plusieurs paramètres.

Pour éliminer toutes ces ambiguïtés, l'outil moléculaire restera une des solutions d'aide et d'investigation, surtout que de nos jours, les données moléculaires sont de plus en plus disponibles dans les bases de données.

## **II. Les marqueurs moléculaires**

La diversité des espèces est un sujet d'extrême importance pour les scientifiques et le public en général. L'intérêt pour la biodiversité a conduit à la recherche de nouvelles approches et outils qui offrent de nouvelles visions de ce domaine. Une des approches prometteuses qui s'est développée dans les dix dernières années est celle de la génétique moléculaire (Machida et al., 2009 ; Bucklin et al., 2011) qui vise à développer de nouveaux caractères d'identification et à discriminer les espèces (Hebert et al., 2003 ; Stoeckle et Hebert, 2008). L'étude des marqueurs génétiques est l'un des outils établis dans cet objectif.

Les marqueurs moléculaires sont des marqueurs génétiques polymorphes utilisés pour décrire les variations génétiques dans des groupes d'individus et pour analyser la distribution du polymorphisme à l'intérieur des individus (intra-individuel), des populations (intra-populationnel) et entre populations (intra-spécifique). Le choix des marqueurs génétiques dépend de plusieurs critères : leur vitesse d'évolution, leur structure et leur universalité. Le niveau d'information génétique retenu pour les marqueurs moléculaires dépend du taux

d'évolution de ces derniers. On peut classer les marqueurs génétiques selon qu'ils sont codants ou non-codants, basés sur des variations de longueur ou de séquence (De Vienne, 1998). De ces critères découlent les approches utilisées pour leur développement et les méthodes moléculaires employées pour les révéler.

Le développement de marqueurs moléculaires a été réalisé pour un nombre d'espèces de plus en plus élevé, avec pour objectifs une meilleure connaissance de leurs relations généalogiques (Sunnucks, 2000), une « cartographie génétique » pour baliser le génome, ou une description plus fine de leur diversité génétique et de leur classification taxonomique (Chen et al., 2011).

Les marqueurs moléculaires ont l'avantage de révéler les flux de gènes entre taxons proches, de pouvoir séparer les espèces sœurs ou cryptiques où les taxons ne sont distinguables que par des caractères mal définis. Il est donc de plus en plus intéressant d'allier marqueurs morphologiques et marqueurs moléculaires pour étudier la délimitation entre taxons dans les complexes d'espèces.

### *II.1. Les marqueurs utilisés*

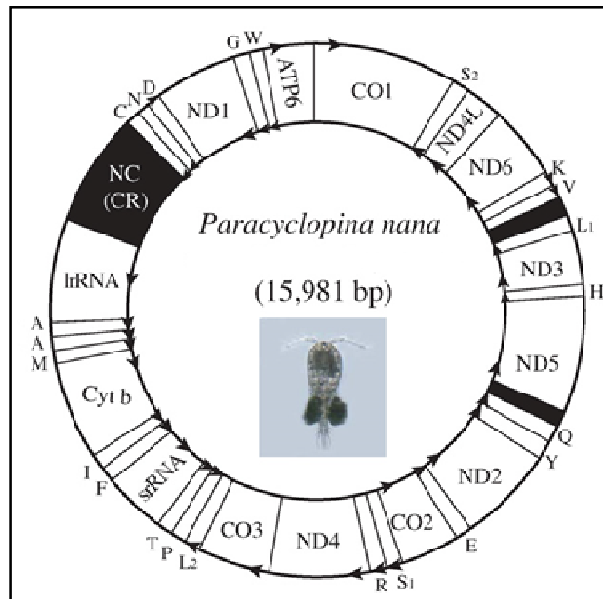
#### II.1.a. ADN mitochondrial *versus* ADN nucléaire?

Depuis les années 1980, des séquences ADN sont utilisées comme un moyen d'identification des espèces, notamment chez les organismes où l'information morphologique est insuffisante. Dans les cellules eucaryotes animales, l'ADN est réparti en deux génomes : le génome nucléaire (ADNn) et le génome mitochondrial (ADNmt).

L'ADNmt est généralement préféré à l'ADNn parce qu'il a une vitesse d'évolution plus élevée que celui du génome nucléaire [5 à 10 fois chez les mammifères (Wilson et al., 1985)] et s'affranchit des problèmes de recombinaison et de polymorphisme individuel propres à l'ADNn. Il est employé dans 70 % des études phylogéographiques (Avice, 2000). Il est constitué par une molécule d'ADN circulaire double brin (Bibb, 1981) contenue dans les mitochondries des cellules eucaryotes. Il s'agit d'un ADN abondant, puisqu'il se retrouve à des milliers d'exemplaires par cellule. Chez les métazoaires, la taille du génome mitochondrial fait environ 16 Kb et peut varier de 14 à 48 Kb (Minxiao et al., 2011).

Parmi les copépodes dont le génome est séquencé, les Cyclopoida, et plus précisément *Paracyclopina nana* présente un génome totalement séquencé. La taille du génome mitochondrial de cette espèce est de 15,981 Kb, il comprend 37 gènes : deux séquences codent les acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr), 23 codent des acides ribonucléiques de transfert (ARNt) et 12 codant des protéines (cytochrome b, sous-unités I à III de la

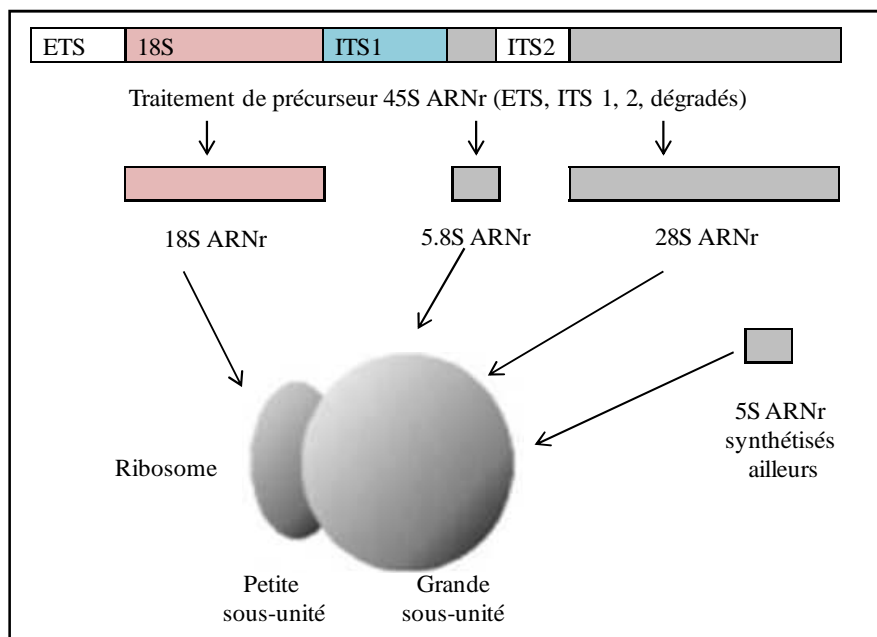
cytochrome oxydase, 6<sup>ème</sup> sous-unité de l'ATPase, 6 polypeptides de la sous unité de la NADH-déshydrogénase [ND1 à ND6 et ND4L] ) (Figure 4).



**Fig.4. Organisation de la molécule d'ADNmt chez *Paracyclopsina nana* (Ki al., 2009)**

Gènes et régions ribosomales nucléaires et mitochondriales

Une cassette ribosomale dans le génome eucaryote nucléaire (Figure 5) comprend les gènes 18S, 5.8S et 28S qui sont séparés par les régions intercalaires transcrites (Internal Transcribed Spacer : ITS1 et ITS2). Les régions bordant les cassettes correspondent aux zones transcrites externes (External Transcribed Spacer : ETS) (Harris et Crandall, 2000).



**Fig.5. Cassette ribosomale (Marine Flatworms of the World, Wolfgang Seifarth 1997-2002, Trang, 2006)**

Les gènes codant les ARNr sont conservés et sont présents dans toutes les cellules en abondance ce qui permet d'effectuer des comparaisons entre les différentes copies intracellulaires.

Les régions ITS1 et ITS2 sont beaucoup moins conservées que 18S, 5.8S et 28S car la pression sélective qui s'exerce sur ces parties non codantes (ITS1 et ITS2) est moindre. Pour ces raisons, les séquences des ITS sont employées préférentiellement pour discriminer les espèces (Imai et al., 2004 ; Zhang et Simmons, 2006). De plus, la longueur de ces séquences (ITS1 et ITS2), qui ne dépasse pas 1000 pb, les rend adéquates pour étudier la structure phylogénétique de différentes communautés autotrophes et hétérotrophes (Chen et al., 2002). ITS1 a été utilisé pour étudier la phylogénie inter-spécifique chez les polychètes *Perinereis* sp. qui se ressemblent morphologiquement (Chen et al., 2002) et pour évaluer la similarité entre quatre espèces de palourde vénéridae (Han-Liang et al., 2006). Cette dernière étude a aussi été menée avec le marqueur ITS2 qui s'est avéré plus performant qu'ITS1 pour discriminer les espèces de palourdes.

Il a été montré que d'autres marqueurs génétiques permettaient aussi des analyses au niveau intra-spécifique, c'est le cas du Cytb qui accumule suffisamment de diversité nucléotidique ; cela le rend apte à être utilisé dans les études phylogénétiques intra-spécifiques des mollusques et potentiellement, des autres invertébrés (Merritt et al., 1998).

Les séquences codant le cytochrome b (Cytb) et le COI sont d'une part plus variables que les séquences nucléaires 28S et 18S (Schwentner et al., 2009 ; Williams et al., 2010 ; Blanco-Bercial et al., 2011). Ceci est expliqué par le fait que les gènes des ARNr sont très conservés, ayant une fonction très importante et centrale dans le fonctionnement cellulaire, et ils sont très sensibles à la pression de sélection. D'autre part, le génome mitochondrial évolue beaucoup plus vite que le génome nucléaire. Ces gènes mitochondriaux (COI et Cytb) ont été utilisés essentiellement pour analyser les liens de parenté au niveau du genre et de la famille en raison de leur forte variabilité (Harrison, 2004 ; Pfeiler et al., 2005). Les analyses du polymorphisme mitochondrial fournissent également des pistes intéressantes sur l'histoire de l'expansion géographique des espèces (Muths et al., 2008).

Le gène codant la première sous unité de la cytochrome oxydase (COI) est soumis à une pression sélective importante. Il présente néanmoins un grand niveau de variabilité. En effet, étant donné que ce gène soit codant, il est affecté de nombreuses mutations silencieuses qui ne modifient pas le fonctionnement cellulaire. Contrairement à l'ITS qui est non codant, les mutations portées sur le COI sont beaucoup plus élevées que celles observées dans l'ITS



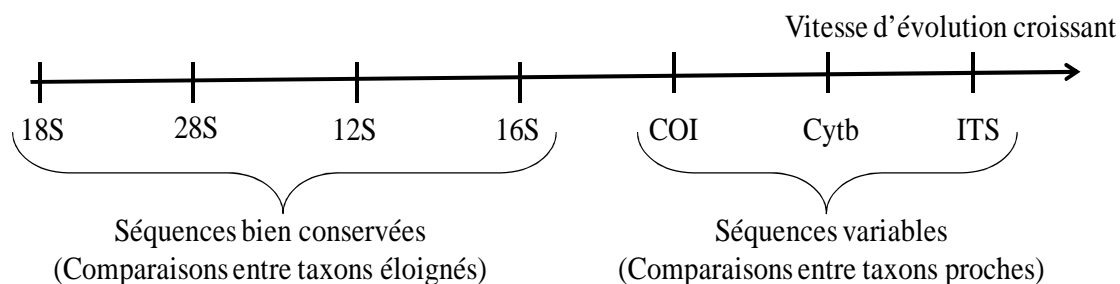
(Makino et al., 2010). Cette variabilité est une information intéressante pour la discrimination des espèces, des populations voire même des individus de la même population (Tang et al., 2003). Les séquences du gène COI ont permis de différencier génétiquement les populations zooplanctoniques et d'étudier la phylogéographie de ces groupes (Blanco-Bercial et al., 2011). De même en utilisant le COI, on a pu identifier de nouvelles espèces de crustacés branchiopodes dans les eaux douces (Jeffery et al., 2011). Ce gène a permis également une meilleure ségrégation entre les espèces de bivalves comme *C. glaucum* et *C. edule* (Freire et al., 2005), *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Kijewski et al., 2009) et *C. gigas* et *C. angulata* (Arnaud et George, 2000).

Les gènes codant les ARNr sont ubiquistes, présents en copies multiples chez les eucaryotes et sont arrangés en tandem. Grâce à leur faible niveau de variabilité, ces séquences sont utiles pour des comparaisons entre taxons éloignés et sont très fréquemment utilisées comme marqueur phylogénique (Hillis et Dixon, 1991 ; Beati et al., 2004). Ils ont une structure formée d'une combinaison de domaines variables et conservés (Kiesling et al., 2002). La comparaison des domaines conservés permet de retracer les liens de parenté qui unissent des taxons éloignés, tandis que les domaines à vitesse d'évolution plus rapide permettent l'étude des relations phylogénétiques d'espèces plus proches.

Les gènes d'ARNr 28S ont été utilisés comme marqueurs de l'évolution en raison de la constance de leur structure (Woese, 1987). L'ARNr 28S est plus variable que 18S (Blanco-Bercial et al., 2011).

L'ARNr 16S est globalement plus variable que l'ARN 12S et il est appliqué pour des comparaisons entre genres, voire entre espèces (Clough et Summers, 2000). De même le 16S fournit beaucoup plus de résolution phylogénétique au niveau des espèces que le 28S (Adamowicz et al., 2010).

Le schéma ci-dessous montre le niveau d'évolution de la vitesse des différents marqueurs :



**Fig.6. Vitesse d'évolution des différents marqueurs ribosomiaux nucléaires et mitochondriaux**

### II.1.b. Les marqueurs microsatellites ou SSR

Les SSRs (*Simple Sequence Repeat*) sont formés de courtes séquences d'ADN non codantes répétées en tandem de motifs de base composés de 1 à 10 pb de nucléotides. Ces séquences forment des séquences relativement longues dispersées dans les génomes. Ces marqueurs moléculaires, présents dans le génome des végétaux et des animaux (Toth et al., 2000), sont utilisés pour des études de cartographie génétique, de génétique des populations (Goldstein et Schlotterer, 1999) et de la structure génétique spatiale à une échelle géographique locale (Born, 2007). Ces marqueurs ont également servi dans les études de populations géographiquement proches grâce à leur très haut niveau de mutation donc de polymorphisme (Jarne et Lagoda, 1996).

Chez les espèces phylogéniquement proches, la localisation de ces séquences sur le génome est relativement conservée. On observe, souvent, des variations de séquence ou bien des insertions-délétions.

Certains facteurs peuvent s'avérer limitant à l'usage des SSRs : les principaux problèmes sont liés à l'homoplasie due au taux de mutation élevé, à la nécessité de développer des amorces spécifiques à chaque espèce et à la mise au point des conditions d'amplification (Duminil et Michele, 2009).

### II.2. L'identification moléculaire par code barre ADN (DNA barcode)

Partant du principe qu'une ou plusieurs séquences ADN présentent suffisamment de divergence pour permettre de discriminer les espèces, il a été proposé de standardiser les séquences ADN utilisées pour les différents groupes d'organismes. Le but de la standardisation est d'aboutir à des bases de données globales qui permettent de « cataloguer » l'information génétique des espèces (Hebert et al., 2003 ; Savolainen et al., 2005) et de pouvoir établir des comparaisons. L'objectif est donc de pouvoir interroger les bases de données et de proposer de mettre en relation le nom d'une espèce et la séquence qui la caractérise. Cette approche s'est popularisée au cours des dernières années sous l'appellation de « code barre ADN ». C'est un projet qui vise à l'identification taxonomique de tissus (fragments, poils...) ou des individus entiers de plantes et d'animaux (à différents stades de vie) à partir d'une courte séquence d'ADN et donc de classer la totalité des êtres vivants en se basant sur un seul marqueur génétique : la cytochrome c oxydase I (COI). De ce fait, l'identification des espèces par « code barre ADN » repose sur les travaux préalables qui ont mis en relation le nom de l'espèce recherchée et la séquence qui la définit.

Cette technique est utilisée par les écologistes et les taxonomistes puisqu'elle aide à identifier les espèces dont les critères morphologiques ne sont que peu distinctifs (Valentini et al., 2008). Elle permet, en plus, de découvrir de nouvelles espèces ou bien des espèces qui ne sont pas encore décrites, de détecter les espèces cryptiques (Knowlton, 2000 ; Stoeckle et Hebert, 2008) et évalue la variation significative taxonomique entre les espèces (Bucklin et al., 2011). Si le spécimen appartient à une espèce dont une portion du génome n'a pas encore été séquencée, la séquence obtenue sera donc différente de celles déjà présentes dans la base de données. Dans ce cas, un taxonomiste peut déterminer une espèce qui n'avait pas encore été séquencée, elle sera alors ajoutée à la base de données, qui ne cesse ainsi d'être complétée. De ce fait, cette technique est considérée comme un moyen qui permet de révéler la biodiversité, de certifier l'identité d'un animal ou d'un végétal et ainsi permettre sa classification (Hebert et al., 2003).

Dans le cadre de projets « barcoding of life », lancé en 2003 par Hebert et son équipe (Hebert et al., 2003), de nombreux « barcodes ADN » ont déjà été séquencés pour des organismes de différents phylum tels que les oiseaux (Hebert et al., 2004), les poissons (Ward et al., 2009), les insectes (Burns et al., 2008) et les crustacés (Costa et al., 2007).

L'application du « code barre ADN » chez les animaux et les plantes s'est multipliée au cours des cinq dernières années, ce qui se reflète aujourd'hui dans la base de données BOLD (**B**arcode **O**f **L**ife **D**ata system) qui comptait au mois d'octobre 2014 3,422,103 séquences du marqueur cible. Une accumulation grandissante de données moléculaires sera disponible dans les années à venir. L'augmentation des informations dans la base de données est une clef pour décoder la diversité des espèces détectant ainsi leur identité et permettant de les classer en se basant sur les caractéristiques génétiques.

Cette méthode se présente comme un moyen sûr, standard, répétable et rapide de faire des identifications par correspondance avec des espèces préalablement définies. L'approche de « code barre ADN » se place donc en complément et en aide des approches traditionnelles basées sur la morphologie.

La séquence choisie dans le cadre du « code barre ADN » doit posséder suffisamment de variabilité inter-spécifique pour bien caractériser chaque espèce. De même, la séquence cible doit être facile à amplifier à l'aide d'amorces aussi "universelles" que possible et de conditions standard de PCR et de séquençage afin de faciliter l'obtention des séquences d'une façon rapide. Il est recommandé que cette séquence soit courte (< 1000 pb) afin d'éviter plusieurs séquençage.

Chez les animaux, le marquage moléculaire par « code barre ADN » s'est établi à partir d'une zone de la région mitochondriale cytochrome c oxydase I (COI). Cette région couvre environ 650 paires de bases en région 5' (Hebert et al., 2003).

Ce fragment d'ADN présente plusieurs avantages : il est présent en de nombreuses copies dans les cellules, ce qui facilite son amplification. Il présente un niveau de variabilité interspécifique adéquat. Ce sont ces propriétés qui ont permis l'utilisation de COI dans des études portant sur la discrimination des espèces.

Ce choix s'est aussi appuyé sur des critères pragmatiques. En effet, cette région présente l'avantage d'être utilisée depuis longtemps dans les études de phylogéographie et de systématique des animaux et était donc déjà largement représentée dans les bases de données publiques (Hendry et al., 2000) avant la mise en place du BOLD.

Outre les avantages du « code barre ADN », cette approche possède des inconvénients. Les problèmes auxquels on est confronté dans le cadre de l'approche « code barre ADN » est l'inexistence d'un gène « idéal » c'est à dire qui serait toujours variable entre les espèces et invariant au sein de chacune des espèces. En effet, le fragment de COI retenu ne présente pas toujours un niveau de variabilité intra-spécifique plus faible que celui de la variabilité interspécifique. Ainsi, la détermination par « code barre ADN » peut être difficile quand il s'agit de groupes soit à très faible soit à très forte diversité. La divergence récente des espèces ou des phénomènes d'hybridation ou d'introgession des populations sont aussi un frein pour l'application de cette approche.

### **III. Utilisation des marqueurs moléculaires**

#### *III.1. En écologie*

##### III.1.a. Étude de la diversité génétique et de la génétique des populations

La notion de diversité génétique évoque le degré de variété des séquences entre des individus au sein d'une même espèce (diversité intra-spécifique) ou bien d'espèces différentes (diversité inter-spécifique). La diversité génétique est l'élément important de la biodiversité, ces deux concepts sont fortement interdépendants puisque la diversité génétique au sein d'une espèce est nécessaire pour maintenir la diversité des espèces, et vice-versa.

La diversité génétique procure aux espèces et aux populations la capacité à s'adapter, à travers les générations successives, aux conditions changeantes de l'environnement et permet de les maintenir. Ce rôle fonctionnel de la diversité génétique peut, à long terme, être à l'origine

d'apparition d'espèces nouvelles par la transmission des allèles à la descendance (dérive génétique) ou bien par une sélection naturelle.

L'étude de la diversité génétique s'inscrit dans le champ de la génétique des populations. Initiée dans les années 1920 à 1931 par Fisher (1927), Haldane (1931) et Wright (1931), la génétique des populations s'intéresse à la variabilité génétique observée sur le/les marqueurs utilisés et à la distribution des gènes à l'intérieur des populations que l'on désigne sous le nom de polymorphisme (nombre et distribution des substitutions nucléotidiques). Cette discipline étudie les facteurs qui maintiennent ou modifient les fréquences alléliques d'une génération à l'autre (sélection naturelle, mutations...).

Sur le plan pratique, l'étude de l'ADN pour une population et sa comparaison avec celui d'autres populations constituent la base de la génétique des populations. Cette discipline a plusieurs applications. Par exemple, en agronomie elle permet de créer des races ou variétés plus performantes et plus résistantes à des maladies dont elle peut expliquer le mode de transmission. En biologie invasive, la génétique des populations peut expliquer l'origine des populations invasives et les routes d'invasion. Cette discipline peut aussi détecter certains taxons cryptiques. Elle permet également de comprendre les mécanismes de conservation et de disparition des populations et des espèces.

La génétique des populations aide à la compréhension de la dispersion des populations zooplanctoniques car à partir du degré de distinction génétique de ces populations on peut déduire le flux génétique. C'est le cas d'*Acartia* spp. dont on a pu tracer son comportement et son histoire de vie à partir de la différenciation génétique des populations (Bucklin et al., 2000).

### III.1.b. La biogéographie, la phylogénie et la phylogéographie

Selon Darwin (1859), l'évolution des espèces s'appuie sur l'accumulation de mutations aléatoires associée aux processus de sélection naturelle. Ces mécanismes permettent aux espèces ou aux populations de se maintenir dans leur milieu et entraînent leur diversification. Ainsi, pour comprendre l'évolution du monde vivant, il est important de connaître la façon dont les organismes se répartissent dans le temps et dans l'espace. C'est l'objectif de la biogéographie, science qui étudie la distribution géographique des taxons à l'échelle des peuplements, repère les caractères communs à ces distributions et cherche à identifier les processus et les phénomènes environnementaux biologiques et historiques impliqués (Myers et Giller, 1988). La géographie est un des facteurs déterminant les différenciations inter-

populationnelles comme il a été montré dans une étude menée par Beaugrand et al. (2002) sur les populations de copépodes Calanoida du Nord de l'Atlantique et des mers adjacents.

Pour obtenir des informations sur les relations de parenté entre les différents taxons en vue de retracer l'histoire évolutive des taxons, la démarche phylogénétique est une méthode intéressante. La phylogénie peut, en effet, être étudiée à un niveau inter-spécifique mais aussi à un niveau intra-spécifique. Les phylogénies ont tout d'abord été construites en fonction des connaissances basées majoritairement sur des données morphologiques. En revanche, actuellement, les relations entre et au sein des espèces sont estimées à l'aide des données moléculaires.

Le produit d'une analyse de phylogénie est un arbre phylogénétique qui consiste à une représentation graphique des relations de parenté entre les groupes d'organismes vivants. Le nombre de nœuds entre les branches, qui représente autant d'ancêtres communs, indique le degré de parenté entre les taxons. Plus il y a de nœuds et donc d'ancêtres entre deux espèces, plus leur parenté est éloignée, c'est-à-dire que leur ancêtre commun est ancien.

Pour toute reconstruction phylogénétique, l'approche moléculaire est la plus considérée puisqu'elle permet de construire des phylogénies à des niveaux taxonomiques variés. Le séquençage des gènes est l'un des moyens les plus utilisés pour déterminer les relations phylogénétiques inter et intra-spécifiques.

S'appuyant sur des méthodes proches, une autre discipline, issue de la biogéographie et de la phylogénie, phylogéographie, s'est développée. Elle s'intéresse aux principes et processus qui gouvernent la distribution géographique des lignées généalogiques, spécialement celles de niveau intra-spécifique. Cette discipline fournit des informations qui alimentent et testent les hypothèses biogéographiques. Elle étudie les phénomènes génétiques et démographiques, entre autres les phénomènes de spéciation (c'est le processus évolutif par lequel de nouvelles espèces vivantes apparaissent) ayant conduit à la distribution spatiale et temporelle de groupes monophylétiques animaux ou végétaux (Avice et al., 1987) et à la structuration actuelle des populations. Ainsi, la biogéographie, la phylogénie et la phylogéographie sont trois disciplines complémentaires qui étudient en premier lieu la distribution de la diversité biologique.

### *III.2. Les espèces cryptiques*

On appelle « espèces cryptiques » un groupe d'espèces qu'on ne sait pas distinguer selon des critères morphologiques (Dahms, 2004) actuellement reconnus comme discriminants. Cependant, elles peuvent être discriminées par le biais de données non morphologiques telles

que les séquences génétiques ou les traits d'histoire de vie. Le maintien de ces lignées divergentes peut s'expliquer par une adaptation écologique et/ou un isolement reproductif plus ou moins marqué des génotypes (Milligan et al., 2010).

Chez les eucaryotes, des séquences d'ADN ont permis de mettre en évidence des espèces cryptiques dans des groupes tels que les lépidoptères (Hebert et al., 2004), les amphipodes (Witt et al., 2006), les oiseaux (Kerr et al., 2007) et les crustacés (Camacho et al., 2011) en se servant de la séquence mitochondriale COI.

#### **IV. Quelques exemples d'études moléculaires sur le zooplancton**

Diverses études ont montré le potentiel des séquences ADN pour caractériser la biodiversité et pour mieux connaître les relations entre les familles, les genres, les espèces et les sous-espèces des copépodes (Caudill et Bucklin, 2004 ; Machida et al., 2006 ; Bucklin et Frost, 2009 ; Makino et Tanabe, 2009 ; Figueroa, 2011).

Chez quelques groupes de copépodes, les gènes mitochondriaux présentent une vitesse d'évolution plus rapide que celle observée chez les arthropodes (Shao et Baker, 2007). Particulièrement, le gène mitochondrial COI s'est avéré un outil puissant pour estimer la richesse spécifique des communautés zooplanctoniques (Machida et al., 2009) et pour étudier les relations phylogénétiques de 34 Calanoida appartenant à 10 genres issus de 2 familles (Bucklin et al., 2003). Ces études phylogénétiques constituent un outil pour l'identification d'espèces cryptiques qui existent au sein des crustacés en général et des copépodes en particulier (Knowlton, 2000).

Parmi les copépodes, les Acartidae semblent être sujet à la présence d'espèces cryptiques (Caudill et Bucklin, 2004), c'est le cas, par exemple, des espèces *Acartia tonsa* (Chen et Hare, 2011) et *Acartia hudsonica* (Milligan et al., 2010). De même, la variabilité génétique élevée détectée au niveau du COI chez deux espèces de Calanoida *Sinodiaptomus valkanovi* et *Sinodiaptomus sarsi* a permis de les différencier (Makino et al., 2010) et de confirmer ainsi les résultats d'une autre étude sur l'identification de ces deux espèces en se basant sur les caractéristiques morphologiques (Ueda et Ohtsuka, 1998). Des travaux ont aussi été réalisés sur le zooplancton dulçaquicole. Le « code barre ADN » a permis d'identifier deux espèces cryptiques de cladocères (Quiroz-Vazquez et Elias-Gutiérrez, 2009) et une espèce de copépode (Montiel-Martinez et al., 2008). En 2010, Dippenaar et al. ont mis en évidence, à partir de COI, 2 clades divergents chez le copépode cosmopolite *Nesippus orientalis*, symbiotique du requin hôte des côtes KwaZulu-Natal (KZN) de l'Afrique du Nord.

Le COI est considéré comme un marqueur fiable dans le cadre d'une identification morphologique de 7 groupes zooplanctoniques différents (Bucklin et al., 2010). En fait, les distances génétiques sont faibles entre les individus de la même espèce et significativement plus élevé chez les individus d'espèces différentes au sein du même groupe (Bucklin et al., 2010).

L'identification morphologique des copépodes est assez difficile à cause des convergences morphologiques présentes chez la plupart des espèces de ce groupe. Pour résoudre ce problème, différentes méthodes sont utilisées comme l'analyse des allozymes qui sont des enzymes codées par différents allèles d'un même gène (Burton et Lee, 1994), l'analyse de l'ADN mitochondrial (Bucklin et al., 2003 ; Machida et al., 2004 ; Jung et al., 2006) et l'analyse des gènes des ARN ribosomiaux nucléaires et mitochondriaux (Machida et al., 2005 ; Machida et Tsuda, 2010). Certains genres de copépodes sont connus pour être de bons modèles expérimentaux, c'est le cas du genre Harpacticoida *Tigriopus* qui est utilisé pour étudier la génétique des populations (Machida et al., 2002 ; Burton et al., 2005 ; Jung et al., 2006), la phylogéographie (Denis et al., 2009), la physiologie (Seo et al., 2006), l'écotoxicologie (Marcial et al., 2003 ; Kwok et Leung, 2005), la génomique (Lee, 2003b ; Lee et al., 2005) et la toxicogénomique (Seo et al., 2006). Cependant, bien que les copépodes occupent une grande place dans la diversité biologique, peu d'études génétiques sont faites pour séquencer leur génome mitochondrial complet ou partiel (Jung et al., 2006). Le séquençage du génome complet est concentré sur certains ordres comme les Harpacticoida : *Tigriopus japonicus* (Machida et al., 2002 ; Jung et al., 2006), *Tigriopus californicus* (Burton et al., 2007) ; les Siphonostomatoida : *Lepeophtheirus salmonis* (Tjensvoll et al., 2005) ; les Cyclopoida : *Paracyclops nana* (Ki et al., 2009) et les Calanoida : *Neocalanus* (Machida et Tsuda, 2010).

Chez les Calanoida la différenciation des espèces sur des bases morphologiques est insuffisante, les séquences de COI et de 16S ont permis une meilleure distinction entre les espèces *Pseudocalanus moultoni* et *Pseudocalanus newmani* (Bucklin et al., 1998). Chez les copépodes (Calanoida), Machida et Tsuda (2010) ont pu identifier six espèces de *Neocalanus*, à partir des séquences COI, ITS, 12S et 28S, la combinaison de ces quatre marqueurs a permis de renforcer les hypothèses morphologiques concernant l'identification de ces espèces.

Plusieurs autres travaux se sont focalisés sur les Calanoida. C'est le cas de l'étude réalisée par Blanco-Bercial et collaborateurs (2011). Les principaux objectifs de cette étude étaient de développer des marqueurs moléculaires adéquats pour étudier la phylogénie des Calanoida,



quatre marqueurs ont été utilisés : 18S, 28S, Cyt b et COI. Le choix de ces marqueurs présente l'avantage d'être utilisés dans de nombreuses études de phylogénie chez cet ordre (Mallatt et al., 2004 ; Mallatt et Giribet, 2006 ; Toon et al., 2009), ce qui a permis d'effectuer des comparaisons.

Dans ce contexte, les études de génétique des populations et de phylogénie apparaissent alors comme l'un des moyens et outils puissants pouvant apporter des réponses aux questions concernant les différenciations et les divergences intra et inter-spécifiques des populations caractéristiques au niveau de quatre bassins de la saline de Sfax. Dans le cas des copépodes et des artémies de cet écosystème, nous avons choisi quatre marqueurs moléculaires qui apportent des réponses à différents niveaux de variabilité génétique d'autant plus intéressantes que cet aspect des organismes peuplant les salines en général et plus particulièrement la saline de Sfax a fait l'objet de peu d'études dignes d'intérêt.

*Chapitre II :*  
*Étude de la relation entre*  
*les communautés zooplanctoniques*  
*et les paramètres environnementaux*  
*de la saline de Sfax*

## **Chapitre II : Étude de la relation entre les communautés zooplanctoniques et les paramètres environnementaux de la saline de Sfax**

### **A. Introduction**

En dehors des conditions physico-chimiques et biologiques normales, la vie peut exister. Les organismes qui ont pu résister et s'adapter à de telles conditions sont qualifiés d'extrémophiles. On peut citer par exemple les halophiles qui s'accommodent à de fortes concentrations en sel. Parmi les biotopes les plus connus de l'extrémophilie on évoque la saline de Sfax. Cette dernière a connu depuis un certain temps des activités industrielles et économiques croissantes sans cesse liées à une importante production de sel de bonne qualité utilisé dans l'alimentation (Figure 7). Cette saline figure parmi les milieux les plus étudiés puisqu'elle renferme une faune et une flore diversifiées, bien que plus faibles que les milieu marin, mais cependant importantes en nombre d'espèces et en biomasse (Elloumi et al., 2006). Ces études ont permis de connaître les limites de possibilité de la vie et ainsi d'élargir les connaissances sur les stratégies d'adaptation du zooplancton (Ayadi et al., 2002 ; Toumi et al., 2005 ; Guermazi et al., 2009) et du phytoplancton (Elloumi et al., 2006 ; Abid et al., 2008) aux conditions extrêmes notamment au stress salin.

Dans ce type de milieu, la salinité a généralement été considérée comme un facteur abiotique crucial qui module la distribution des peuplements (Sacchi, 1967 ; Kiener, 1978).



**Fig.7. Sel de la saline de Sfax**

Cette étude présente l'avantage de donner une vision de l'interaction de plusieurs facteurs abiotiques avec les facteurs biotiques ainsi que la possibilité d'établir des relations de cause à effet entre les divers maillons trophiques de la saline de Sfax.

## **B. Matériels et Méthodes**

### **I. Présentation générale du site d'étude**

La saline de Sfax est gérée par la compagnie générale des salines de Tunisie : COTUSAL. La COTUSAL est une société résidente de droit tunisien à capitaux internationaux, dont le principal actionnaire est le groupe salin. Ce dernier est le premier groupe privé salinier en Europe. Cette société exploite et valorise du sel gemme, igné, marin et solaire sur de nombreux sites en Europe et en Afrique (France, Espagne, Italie, Tunisie, Maroc, Sénégal, Cap-vert). Créée en 1949 de la fusion de quatre sociétés salicoles, la COTUSAL, dont le siège est situé au centre de Tunis, exploite aujourd'hui trois sites de production (saline de Sahline à Monastir, saline de Sfax et la saline de Zarzis). Elle est le premier producteur du sel en Tunisie. Elle est concessionnaire de 15 000 hectares pour l'exploitation de ses besoins. Depuis sa création, la COTUSAL a expédié son sel sur l'ensemble des continents avec pour principal produit exporté le sel en vrac sous différentes qualités (alimentaire, industriel et déneigement). La production annuelle représente environ 1 000 000 tonnes de sel (Essahline : 150 000 tonnes, Sfax : 320 000 tonnes et Zarzis 530 000 tonnes), destinée essentiellement à l'exportation (90 % environ du total des ventes) après avoir satisfait les besoins du marché local.

La saline de Sfax (34° 39' N et 10° 42' E) est un milieu paralique (situé à la frontière mer-terre) artificiel, lagunaire complexe situé au centre Est de la Tunisie. Connue sous le nom de la saline de Sfax, cette dernière est située dans les zones humides de Thyna, zone RAMSAR et appartenant aux aires protégées. Elle jalonne la côte méridionale de Sfax, en front de mer depuis la zone portuaire jusqu'au village de Gargour (Figure 8). L'implantation de cette saline est favorisée par la présence d'une surface plane et étendue qui longe la côte marine sur une distance d'environ 12 Km et par une balance hydrique largement déficitaire sur toute la période de l'année. Cette saline couvre environ 1700 ha de surface, partagée en plusieurs circuits et bassins qui communiquent entre eux par des portes en diagonales permettant à l'eau de mer initiale de parcourir le maximum de trajet et par conséquent, subir le maximum d'évaporation. Elle est divisée en deux parties par l'Oued El Maou : celle du Nord appartient à la commune de Sfax et celle du Sud fait partie à la commune de Thyna.

La période d'activité, pendant laquelle les eaux marines se concentrent, est fixée par les conditions météorologiques qui doivent être optimales vis à vis de l'évaporation (faible pluviosité, vent fort et constant). A partir d'une porte communicante avec la mer (prise d'eau en mer), les saumures se concentrent progressivement de sorte qu'un champ de salinité

stationnaire (41 – 400 psu) couvre l'ensemble de la saline. Les mouvements des masses d'eaux se font par gravité ou par pompage et leurs concentrations sont contrôlées quotidiennement par mesure de densité. Le transfert des masses d'eaux d'un circuit à un autre, ne se fait que lorsqu'elles atteignent une certaine densité.

Le biotope d'étude est l'un des plus importants hydrosystèmes de production de sel en Tunisie, la production annuelle de la saline avoisine les 320 000 tonnes d'halite commercialisable et 30000 tonnes de saumure chlorurée magnésienne. Cet sel est de première qualité et ceci en comparaison avec les limites tolérables fixées par la FAO (norme de qualité NT 117.05 édité et diffusé par l'Institut National de la Normalisation et de la Propriété Industrielle (INNORPI) et par le CODEX alimentaire en 2011). L'essentiel de cette production est destiné à l'exportation. Le chlorure de sodium est utilisé pour la consommation, l'industrie alimentaire, l'industrie chimique et le déneigement. Les solutions chlorurées magnésiennes sont utilisées dans différents secteurs industriels employant des solutions concentrées en chlorure de magnésium comme additifs. On cite en particulier l'industrie sucrière qui consomme des tonnages importants de solutions très concentrées en ion magnésium pour le traitement des mélasses.

D'un point de vue biologique, les marais salants sont décrits comme des écosystèmes très productifs (Boorman, 1999). La faune et la flore de la saline de Sfax s'organisent en fonction du confinement progressif des eaux. Les premiers bassins sont colonisés par des formes de type marines à lagunaires qui comprennent un nombre restreint de groupes génériques incluant quelques formes de mollusques, de poissons représentés par la daurade royale (*Sparus auratus*), le loup ou bar (*Dicentrarchus labrax*), le sparidé *Cyprinodon fasciatus* et l'anguille *Anguilla anguilla*, des algues vertes, des algues brunes et des bactéries, principalement des formes hyperhalophiles paraliques. Dans les masses d'eaux les plus salées (salinité supérieure à 75 psu) seuls des organismes à structure simple, dont la physiologie montre une très grande tolérance à ce type de milieu, parviennent à proliférer. Il s'agit surtout des tapis algaires pouvant former des tapis ou feutrages à la surface des sédiments, des crustacés (*Artemia salina*), puis des bactéries halophiles et hyperhalophiles qui colonisent les eaux des tables salantes (Ayadi et al., 2002 ; Ayadi et al., 2004 ; Toumi et al., 2005).

Une grande variété d'oiseaux migrateurs est rencontrée dans les salines (Raybould, 2005), des oiseaux aquatiques hivernants et nicheurs montrent de fortes densités principalement en raison d'une importante production d'invertébrés planctoniques utilisés comme ration alimentaire. Plus de 100 espèces d'oiseaux hivernent dans la saline de Sfax notamment le flamant rose

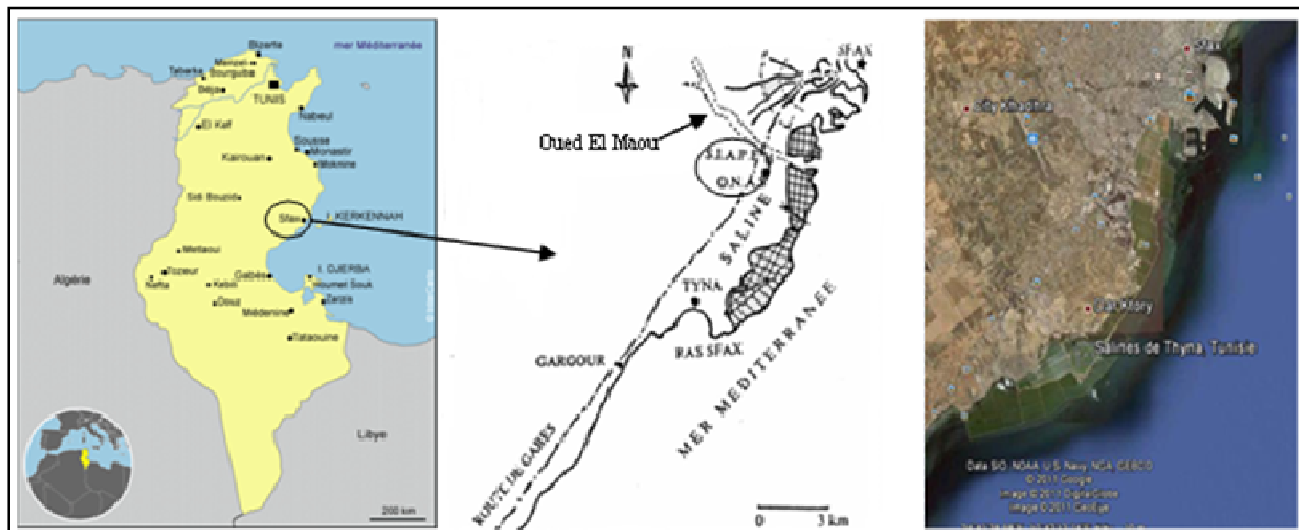
(*Phoenicopterus ruber*), l'avocette (*Recurvirostra avosetta*), le becasseau cocorli (*Calidris ferruginea*) et la sterne naine (*Sterna albifrons*).

Cette saline présente, par conséquent, un fort potentiel pour l'écotourisme, la recherche scientifique et surtout pour l'économie, mais la pollution environnante liée à la proximité de plusieurs industries constitue un éventuel handicap pour une mise en valeur complète de ce site.

La saline de Sfax est potentiellement soumise à plusieurs sources d'agressions anthropiques (Figure 8) :

- ❖ **Pollution industrielle** (solide et liquide) qui se développe sur le ruban littoral Sud de la ville de Sfax.
- ❖ **Rejets liquides** issus de l'Office National d'Assainissement (ONAS).
- ❖ **Rejets liquides** (eaux chimiques fortement chargées) issus de la Société Industrielle d'Acide Phosphorique et d'Engrais (SIAPE) ainsi que des **rejets solides** (phosphogypse) de même origine.

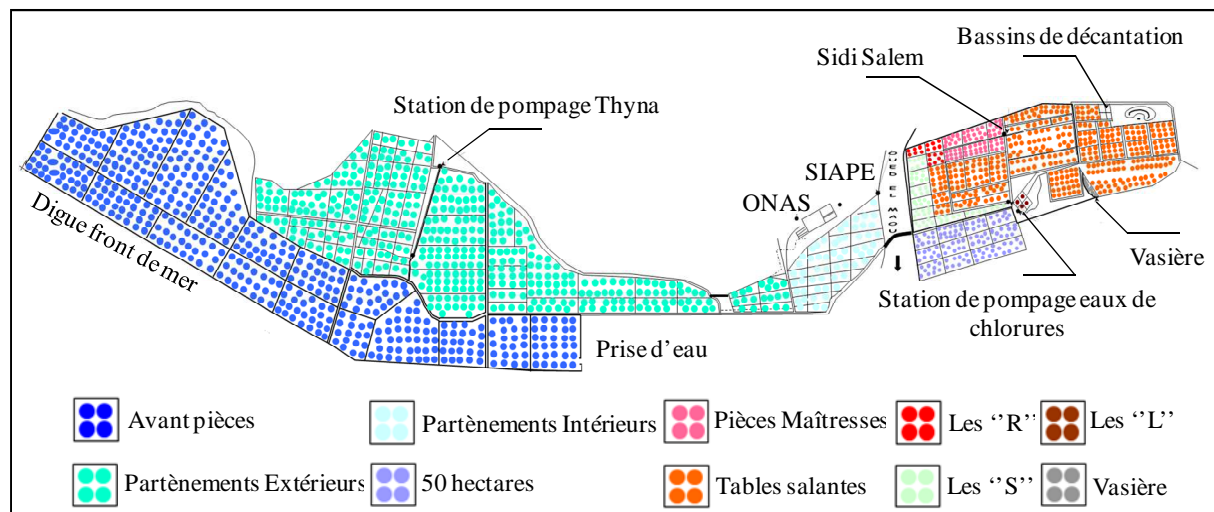
Cependant, la SIAPE et l'ONAS situés à proximité immédiate de la saline évacuent leurs eaux par un canal qui traverse la saline avant de se jeter en mer (à quelques centaines de mètres de la prise d'eau), ce qui a pour but de limiter l'impact des rejets au niveau de la saline.



**Fig.8. Localisation de la saline de Sfax et sources de pollution potentielles de ce site**

La saline est partagée en plusieurs bassins peu profonds interconnectés et séparés de la mer par un barrage de limon rouge d'environ 4 m de hauteur. Dans cet ensemble de bassins, 6 zones hydrologiques artificielles se répartissent (Figure 9), elles sont entretenues par les sauniers qui ajustent la distribution de l'eau d'un bassin à un autre. L'eau suit un gradient

croissant de salinité en allant depuis la prise d'eau (38 psu) jusqu'aux tables salantes (400 psu), gradient associé à une forte évaporation.



**Fig.9. Les zones hydrologiques de la saline de Sfax**

### *1.1. Les avants pièces*

A partir de la prise d'eau, l'eau de mer s'étale dans les 17 premiers bassins appelés « les avants pièces » qui couvrent 640 hectares et communiquent entre eux par des portes en diagonale. A l'entrée, la salinité est d'environ 38 psu. Elle s'élève graduellement à 75 psu à la sortie. Par la suite, ces eaux seront pompées pour être distribuées dans 5 circuits indépendants « les partènements extérieurs ».

### *1.2. Les partènements extérieurs*

Il s'agit de 5 circuits parallèles occupant une surface totale de 450 hectares. A la sortie (unique pour les 5 circuits), les eaux atteignent une salinité de 130 psu. Elles sont rassemblées dans un canal débouchant sur une station pour être de nouveau distribuées dans un réseau de 3 circuits parallèles constituants « Les partènements intérieurs ».

### *1.3 Les partènements intérieurs*

Ces trois circuits parallèles ont une superficie de 160 hectares. A leur sortie, les eaux auront atteint une salinité de 200 à 210 psu. Par la suite, ils sont rassemblés dans un canal pour être répartis dans trois circuits parallèles appelés « les avants pièces maîtresses » ou « les 50 hectares ».

### *1.4. Les avants pièces maîtresses*

Ils sont séparés des partènements intérieurs par l'Oued El Maou. A la sortie, la salinité est de l'ordre de 271 psu. Ces eaux sont ensuite récupérées par les stations de pompage de Sidi Salem pour être redistribuées dans six bassins appelés « les pièces maîtresses ».

### *1.5. Les pièces maîtresses*

Elles couvrent 20 hectares et sont partagées en 6 bassins communicants. Lorsque la salinité atteint 300 psu à 310 psu, les eaux peuvent alors être utilisées pour l'alimentation des « tables salantes ».

### *1.6. Les tables salantes (TS) ou cristallisoirs*

Elles occupent 141,3 hectares. Chaque table salante peut mesurer entre 0,7 à 7 hectares. La dimension et l'orientation sont choisies afin que les bassins restent couverts de saumures ( $40 \text{ g L}^{-1}$  < concentration en magnésium ( $\text{Mg}$ ) <  $110 \text{ g L}^{-1}$ ). Ces eaux, débarrassées du chlorure de sodium par précipitation, sont évacuées vers « les bassins de réserves » et sont utilisées pour la fabrication des saumures magnésiennes.

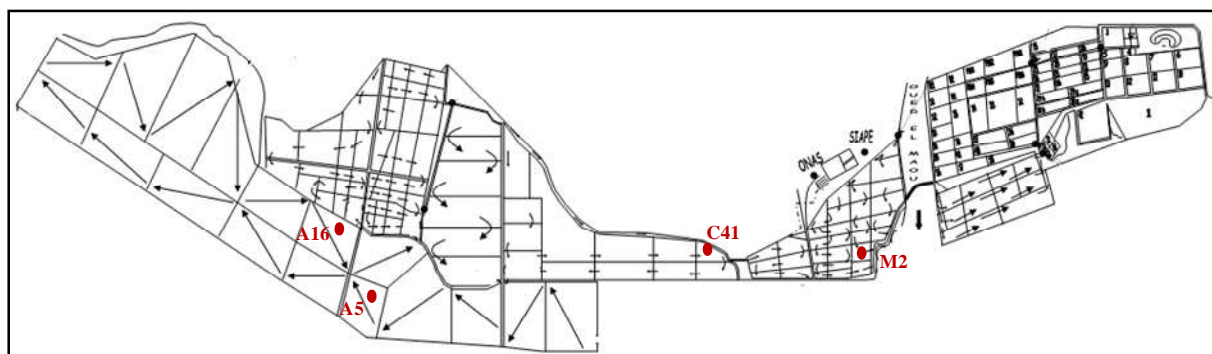
### *1.7. Les bassins réservoirs*

Les eaux sortantes des tables salantes seront stockées dans trois bassins appelés bassins réservoirs "R" où elles vont passer l'hiver.

A partir du mois de mai, les saumures quittent ces bassins et s'étalent sur de nouveaux bassins, appelés bassins de fabrication de saumures "S". Lorsque, suite à l'évaporation, les saumures atteignent une concentration en magnésium de  $110 \text{ g L}^{-1}$  (saumures matures), elles passent dans les bassins de stockage "L".

Ainsi, la circulation de l'eau et le circuit de fabrication du sel commencent par le pompage d'eau de mer et se terminent par la période de récolte selon le schéma suivant (Figure 10) :

Prise d'eau → Avants pièces → Partènements extérieurs → Partènements intérieurs → 50 hectares → Pièces maîtresses → Tables salantes → Bassins de réserve.



**Fig.10. Localisation des bassins d'échantillonnage (A5, A16, C41 et M2) au niveau de la saline de Sfax (les flèches indiquent le sens général de circulation de l'eau dans la saline)**



## **II. Bassins et fréquence d'échantillonnage**

Les prélèvements ont été réalisés régulièrement tous les quinze jours à partir du 15 juin 2010 au 15 mai 2011 (à l'exception de quelques dates quand l'accès à la saline était impossible) au niveau de 4 bassins de la saline (Figure 10).

Ces bassins de la saline sont caractérisés essentiellement par une faible profondeur des eaux (Tableau 1).

**Tab.1. Caractéristiques des bassins d'échantillonnage**

Bassin	Localisation	Épaisseur de la tranche d'eau	Salinité moyenne
A5	Avants pièces	Environ 50 cm	42 psu
A16	Avants pièces	Environ 30 cm	61 psu
C41	Partènements extérieurs	Environ 35 cm	96 psu
M2	Partènements intérieurs	Environ 30 cm	193 psu

## **III. Les facteurs environnementaux**

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau ont été étudiées *in situ* (température) et au laboratoire (salinité, pH, sels nutritifs, pigments photosynthétiques et matière en suspension).

### *III.1. La température (°C), le pH (unité pH) et la salinité (psu)*

La température de la colonne d'eau des bassins étudiés est mesurée à l'aide d'un thermomètre de terrain classique. Le potentiel Hydrogène et la salinité de l'eau sont déterminés avec un pH-mètre de type Met Rhom et un réfractomètre à main Zuzi C39545, respectivement, au laboratoire.

### *III.2. Les matières en suspension (mg L<sup>-1</sup>)*

L'estimation des matières en suspension (SM) est faite par la pesée de la matière retenue sur un filtre GF/C de porosité 0,45 µm et séchée à l'étuve (jusqu'à poids constant à 120°C) après filtration sous vide d'un volume d'eau (V), ce volume dépend de la qualité de l'eau.

Les SM sont calculées suivant la formule suivante :

$$SM = [(m_1 - m_0) / V] * 1000$$

$m_0$  : masse initiale du filtre GF/C (mg)

$m_1$  : masse finale (filtre GF/C + matières retenues) après filtration et séchage (mg)

V : volume d'eau filtrée (ml)

### *III.3. Les sels nutritifs (µM)*

Les dosages, réalisés par un auto-analyseur (BRAN+LUEBBE) de type 3 ont permis ainsi de déterminer les concentrations en ions nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ions nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), ions ammoniums (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), orthophosphates (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) et silicates (Si(OH)<sub>4</sub>).

La moyenne annuelle N:P représente le ratio DIN/DIP où DIN est l'azote inorganique dissous (somme  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ ) et DIP est le phosphore inorganique dissous ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Cette valeur est comparée au rapport de Redfield (16N:1P) pour déduire le potentiel limitant des nutriments.

#### *III.4. Les pigments chlorophylliens ( $\text{mg m}^{-3}$ )*

Pour le dosage de ces pigments, on procède à une filtration d'un volume d'eau, avec addition d'une pincée de carbonate de magnésium ( $\text{MgCO}_3$ ) pour fixer les pigments, sur un filtre GF/C de  $0,45 \mu\text{m}$  de porosité. Le filtre est conservé à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à l'extraction.

L'extraction des pigments est réalisée dans 10 ml d'acétone 90 % pendant 5 heures à l'obscurité et à  $4^\circ\text{C}$ . Après centrifugation, on récupère le surnageant et son absorbance est mesurée à l'aide d'un spectromètre (Lorenzen, 1967) aux longueurs d'ondes suivantes : 480, 630, 645, 663 et 750 nm.

Les concentrations en chlorophylle *a* et *c* sont calculées à partir des équations proposées dans le rapport du groupe de travail Scor-Unesco (1966).

$$\begin{aligned} [\text{Cha}] &= [(11,64 \text{ DO}_{663\text{nm}} - 2,16 \text{ DO}_{645\text{nm}} - 0,1 \text{ DO}_{630\text{nm}}) \times v] / (V \times L) \\ [\text{Chc}] &= [(54,22 \text{ DO}_{630\text{nm}} - 5,53 \text{ DO}_{663\text{nm}} - 14,81 \text{ DO}_{645\text{nm}}) \times v] / (V \times L) \end{aligned}$$

Les concentrations en caroténoïdes sont calculées suivant l'équation proposée par Parsons et Strickland (1963).

$$[\text{Caroténoïdes}] = [10 (\text{DO}_{480\text{nm}} - 3 \text{ DO}_{750\text{nm}}) \times v] / (V \times L)$$

V = volume de l'échantillon filtré (ml)

v = volume de l'extrait acétonique (10 ml)

L = longueur du trajet optique (1 cm)

DO = absorbance

### **IV. Les facteurs biotiques (peuplements zooplanctoniques)**

#### *IV.1. Prélèvement et conservation des échantillons*

Tous les échantillons de zooplancton ont été collectés après filtration de 100 L d'eau de chaque bassin.

Les échantillons destinés à l'évaluation qualitative et quantitative ont été prélevés à l'aide d'un filtre de  $80 \mu\text{m}$  de maille et sont conservés dans une solution de formaldéhyde (concentration finale = 4 %).

#### *IV.2. Identification taxonomique et dénombrement*

L'identification et le dénombrement des différents taxons zooplanctoniques sont effectués dans une cuve de Dolfuss sous une loupe binoculaire de type Olympus TL2. L'identification morphologique des différentes unités fonctionnelles de copépodes et d'*Artemia* prélevées a été réalisée sur la base de la littérature de références (Rose, 1933 ; Bradford-Grieve, 1994 ; Boxshall et Halsey, 2004).

Après avoir concentré les échantillons lors des prélèvements dans un volume convenable (V), le comptage se fait dans un volume (v). Ainsi, le nombre d'individus par m<sup>3</sup> d'eau de la saline (X) est calculé selon la formule suivante

$$X = [(V \cdot n_i) / v] \cdot 10$$

avec  $n_i$  : nombre d'individus comptés dans le volume v.

La structure des communautés de copépodes est estimée en calculant l'indice de diversité spécifique  $H'$  (Shannon, 1948). Cet indice mesure la composition en espèces d'un écosystème tout en tenant compte de la distribution de leurs abondances relatives (Harris et al., 2000). Il est mesuré en bits/individu selon l'équation :

$$H' = - \sum_{n_i=1}^s \frac{n_i}{N} \log_2 \frac{n_i}{N}$$

$n_i/N$  = fraction de la communauté entière composée de l'espèce i

S = nombre d'espèces identifiées

$H'$  est un indice qui traduit le degré de diversité d'une communauté, ainsi plus le milieu est riche en espèces plus cet indice est élevé.

#### **V. Techniques d'analyse statistique**

Les moyennes et les écarts types ont été calculés pour voir la différence entre les quatre bassins étudiés.

Les différences de l'indice de diversité de Shannon ( $H'$ ) entre les bassins A5, A16 et C41 sont évaluées avec le test statistique ANOVA en utilisant le logiciel XLSTAT.

Pour étudier les relations entre les paramètres environnementaux et la structure des communautés zooplanctoniques de la saline, une analyse multivariée est effectuée. Pour choisir la méthode statistique la plus appropriée, on évalue en premier lieu l'influence de la variation saisonnière sur les variables environnementales et sur l'abondance des espèces étudiées dans chaque bassin en utilisant le test de Wallis Kruskal. Parmi 75 combinaisons (variables \* bassins et espèces \* bassins), seulement 23 représentent l'influence des saisons.

Cela suggère que la structure environnementale et la structure des espèces sont assez stables tout au long de la période annuelle pendant laquelle s'est réalisée cette étude. Par conséquent, Costatis représente la méthode statistique la plus adéquate pour notre base de données (Thioulouse, 2011). Costatis signifie "**CO**-inertie et **STATIS**", STATIS étant l'abréviation pour "**Structuration des Tableaux à Trois Indices de la Statistique**". Cette méthode permet d'analyser les paramètres environnementaux et l'abondance des espèces dans différents sites d'échantillonnage tout en tenant compte de la variation temporelle. Pour cette analyse, on a construit deux séries de tableaux avec en lignes les bassins étudiés et en colonnes les données analysées : la première avec 13 variables environnementales et la deuxième avec l'abondance de 11 espèces zooplanctoniques. Seules les espèces les plus fréquentes sont prises en compte pour limiter le nombre de zéro dans le tableau. Chaque série de tableaux contient 18 tableaux correspondant aux 18 dates d'échantillonnage. Une transformation de  $\log(x+1)$  est appliquée à l'abondance des espèces.

Costatis (le package ade 4 est disponible sur le site web du logiciel R) est un moyen pour analyser la structure stable de la relation entre la communauté zooplanctonique et les variables environnementales à travers la variation temporelle. Cette analyse comporte deux étapes : d'abord deux analyses triadiques partielles (PTAs) sont effectuées indépendamment : une sur la série de tableaux avec les variables environnementales et l'autre sur la série de tableaux avec l'abondance des espèces. Le compromis de ces PTAs représente la structure stable des conditions environnementales en premier lieu et de celui de la communauté zooplanctonique en deuxième lieu. Ces 2 premières analyses sont suivies d'une analyse de co-inertie réalisée sur les compromis.

Les résultats sont donnés sous forme de deux figures décrivant la co-structure entre les structures stables et extraits de chaque série de tableaux : une figure montre les variables environnementales et l'autre les espèces. Les deux figures partagent les mêmes axes ce qui maximise la covariance entre les coordonnées du compromis environnemental et celui des espèces.

Cette méthode statistique met en évidence la relation stable entre les deux structures tout en éliminant les variations ambiguës. Costatis permet aussi de projeter les échantillons correspondant à chaque date et à chaque bassin dans la co-structure, en donnant une vue globale sur les caractéristiques de chaque site en considérant en même temps les paramètres environnementaux et la distribution des espèces.

Des trajectoires (projection par date) donnent un aperçu sur la variation temporelle tout en considérant les conditions environnementales et la composition des communautés zooplanctoniques dans chaque bassin.

### **C. Résultats**

Les relations entre les variables environnementales (paramètres physico-chimiques et biologiques) et la structure des communautés zooplanctoniques de la saline de Sfax ont été étudiées. Les variables environnementales et les espèces utilisées dans cette étude sont indiquées dans le tableau 2.

**Tab.2. Liste des espèces, des paramètres physico-chimiques et biologiques (abréviation) utilisés dans l'analyse multivariée (Costatis)**

Taxons	
<b>Calanoides</b>	
<i>Paracartia grani</i>	Pg
<i>Acartia discaudata</i>	Ad
<i>Acartia clausii</i>	Ac
<b>Cyclopoides</b>	
<i>Oithona nana</i>	On
<i>Oithona similis</i>	Os
<b>Harpacticoides</b>	
<i>Bryocamptus</i> sp.	Bsp
<i>Euterpina acutifrons</i>	Ea
<i>Clytemnestra scutellata</i>	Cs
<i>Mesochra lilljeborgi</i>	Ml
<i>Microsetella norvegica</i>	Mn
<b>Anostracés</b>	
<i>Artemia salina</i>	As
<b>Paramètres physiques</b>	
Salinité	S
Température	T
pH	pH
Matière en suspension	SM
Densité	DE
<b>Paramètres chimiques</b>	
Nitrites	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Nitrates	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Ammonium	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Phosphates	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
Rapport N:P	N:P
Silicates	Si
<b>Paramètres biologiques</b>	
Chlorophylle <i>a</i>	Chl <i>a</i>
Chlorophylle <i>c</i>	Chl <i>c</i>
Carotenoides	Car

### **I. Les Paramètres physico-chimiques et biologiques**

Les valeurs moyennes et les écarts types des paramètres physico-chimiques et biologiques dans les quatre bassins (A5, A16, C41 et M2) sont indiqués dans le tableau 3.

**Tab.3. Moyenne  $\pm$  S.E des paramètres physico-chimiques et biologiques dans les bassins A5, A16, C41 et M2**

	Bassins			
	A5	A16	C41	M2
<b>Paramètres physiques</b>				
Salinité (psu)	42.11 $\pm$ 0.14	60.83 $\pm$ 0.50	96.47 $\pm$ 0.50	193.38 $\pm$ 0.53
Température (°C)	26.58 $\pm$ 0.37	25.91 $\pm$ 0.36	25.88 $\pm$ 0.37	27.33 $\pm$ 0.37
pH	8.12 $\pm$ 0.03	8.23 $\pm$ 0.03	8.07 $\pm$ 0.02	8.02 $\pm$ 0.03
Matière en suspension (mg L <sup>-1</sup> )	499.09 $\pm$ 35.39	586.62 $\pm$ 31.22	793.86 $\pm$ 62.70	2481.50 $\pm$ 129.59
<b>Paramètres chimiques</b>				
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µM)	0.57 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.02	0.54 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.03
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µM)	3.89 $\pm$ 0.15	4.52 $\pm$ 0.21	6.01 $\pm$ 0.42	4.9 $\pm$ 0.23
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µM)	2.22 $\pm$ 0.07	2.1 $\pm$ 0.06	3.08 $\pm$ 0.11	2.57 $\pm$ 0.1
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (µM)	2.69 $\pm$ 0.20	1.09 $\pm$ 0.07	2.32 $\pm$ 0.14	3.14 $\pm$ 0.21
rapport N:P	9.63 $\pm$ 0.52	12.68 $\pm$ 0.5	14.34 $\pm$ 0.88	9.85 $\pm$ 0.81
Si (µM)	36.22 $\pm$ 2.29	22.28 $\pm$ 0.77	28.44 $\pm$ 2.69	39 $\pm$ 2.52
<b>Paramètres biologiques</b>				
Chlorophylle <i>a</i> (mg m <sup>-3</sup> )	0.05 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00
Chlorophylle <i>c</i> (mg m <sup>-3</sup> )	0.06 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00
Caroténoïdes (mg m <sup>-3</sup> )	0.07 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.00	0.12 $\pm$ 0.01

La salinité montre une importante variation entre les quatre bassins. Elle varie entre 38 psu dans le bassin A5 (août 2010) et 210 dans M2 (janvier 2010). Ce gradient de salinité est lié à l'évaporation de l'eau. Au sein de chaque bassin, peu de variations temporelles ont été observées.

La température fluctue légèrement d'un bassin à un autre avec une variation saisonnière similaire dans tous les bassins. La plus faible valeur enregistrée est 16 °C mesurée pendant le mois de décembre 2010 en C41 ; la plus forte température voisine de 39°C a été observée au mois d'août 2010 dans le bassin M2.

Le pH varie entre 8,92 (A5, décembre 2010) et 6,34 (M2, octobre 2010), la valeur moyenne de ce paramètre est homogène dans les quatre bassins.

La moyenne annuelle de N:P oscille entre 9,85 dans M2 et 14,34 dans C41. Ces valeurs sont inférieures au rapport de Redfield (16) indiquant un excès de phosphore dans tous les bassins.

Les concentrations moyennes les plus importantes en Chlorophylle *a* et Chlorophylle *c* sont enregistrées au niveau du bassin A5 (0,053 et 0,056 mg m<sup>-3</sup>, respectivement). La concentration en caroténoïdes augmente avec la salinité pour atteindre une valeur maximale dans M2.

## II. Abondance relative et structure des peuplements zooplanctoniques

L'examen quantitatif de la communauté zooplanctonique nous a permis de constater que les espèces de copépodes constituent la composante la plus représentative du compartiment zooplanctonique avec 82 ; 96 et 93 % de l'abondance totale du zooplancton dans les bassins A5, A16 et C41 respectivement. Par contre, ce groupe est absent dans le bassin du partènement intérieur (M2). Ce dernier est monozoïque, on y trouve une seule espèce d'anostracé *Artemia salina*.

Les bassins A5, A16 et C41 abritent 10 espèces de copépodes (Tableau 2) représentant 9 genres, 7 familles et 3 ordres différents (Calanoida, Cyclopoida et Harpacticoida).

Des différences sont observées dans la composition de la communauté de copépodes entre les différents bassins. En effet, dans le bassin A5, les Cyclopoida dominent et représentent 50 % de l'abondance totale des copépodes, alors que les Calanoida sont les plus abondants dans A16 avec 55 % de l'abondance totale des copépodes. Les Harpacticoida sont faiblement représentés dans ces deux bassins (13 % dans A5 et 11 % dans A16). Par contre on observe une présence exclusive des Harpacticoida dans le bassin C41 (100 %) (Figure 11).

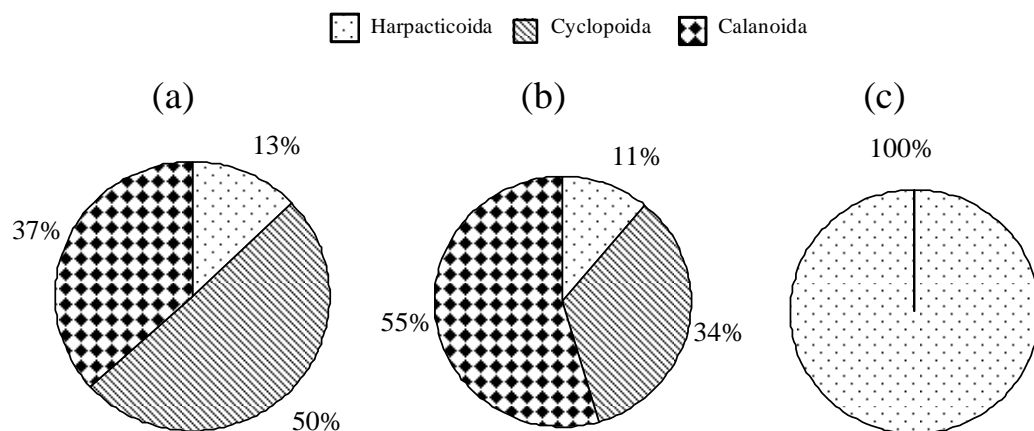


Fig.11. Distribution des trois taxons de copépodes dans les bassins A5 (a), A16 (b) et C41 (c)

L'indice de diversité de Shannon a été calculé afin d'estimer la structure des communautés de copépodes dans ces 3 bassins (Tableau 4). Cet indice souligne que la diversité des copépodes diminue significativement de A5 à C41 ( $F = 3,42$  ;  $p < 0,05$ ) selon un gradient de salinité.

**Tab.4. Moyenne de l'indice de diversité (H') ± S.E des copépodes dans les bassins A5, A16 et C41**

	Bassins			F values (df)
	A5	A16	C41	
Indice de diversité (H') bits ind <sup>-1</sup>	1,04 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,55 ± 0,02	3,42 (57)*

La *F*-value a été déterminée par ANOVA. \* L'astérisque indique une différence significative entre les bassins ( $p < 0,05$ )

### **III. Analyse des communautés zooplanctoniques et relation avec les paramètres environnementaux**

Les résultats de l'analyse Costatis sont représentés sur la figure 12. Le premier et le second axes du plan factoriel expliquent respectivement 68,7 et 27,7 % de l'inertie totale (Figure 12a). Les figures 12b et 12c montrent respectivement les projections des paramètres environnementaux et celles des abondances des espèces zooplanctoniques étudiées sur le plan factoriel. Ces deux figures sont superposables. Le premier axe décrit un gradient de salinité (croissant de droite à gauche) face à un gradient de qualité de l'eau (croissant de gauche à droite) avec de fortes valeurs de salinité, caroténoïdes et matières en suspension dans la partie gauche, et d'importantes valeurs de chlorophylle *a* et de pH dans la partie droite du plan factoriel (Figure 12b). Cette opposition différencie les bassins hypersalés en aval (à gauche) de celles à tendance marine en amont (à droite).

Le deuxième axe montre un gradient du rapport N:P (croissant du haut vers le bas) avec le phosphore assimilable (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) dans la partie supérieure du plan factoriel et le rapport azote inorganique dissous /phosphore inorganique dissous dans la partie inférieure du plan factoriel. Le second axe montre également un gradient de concentration de la chlorophylle *c* et des silicates, avec de fortes valeurs de ces deux variables dans la partie supérieure du plan factoriel, associées aux faibles valeurs de N:P.

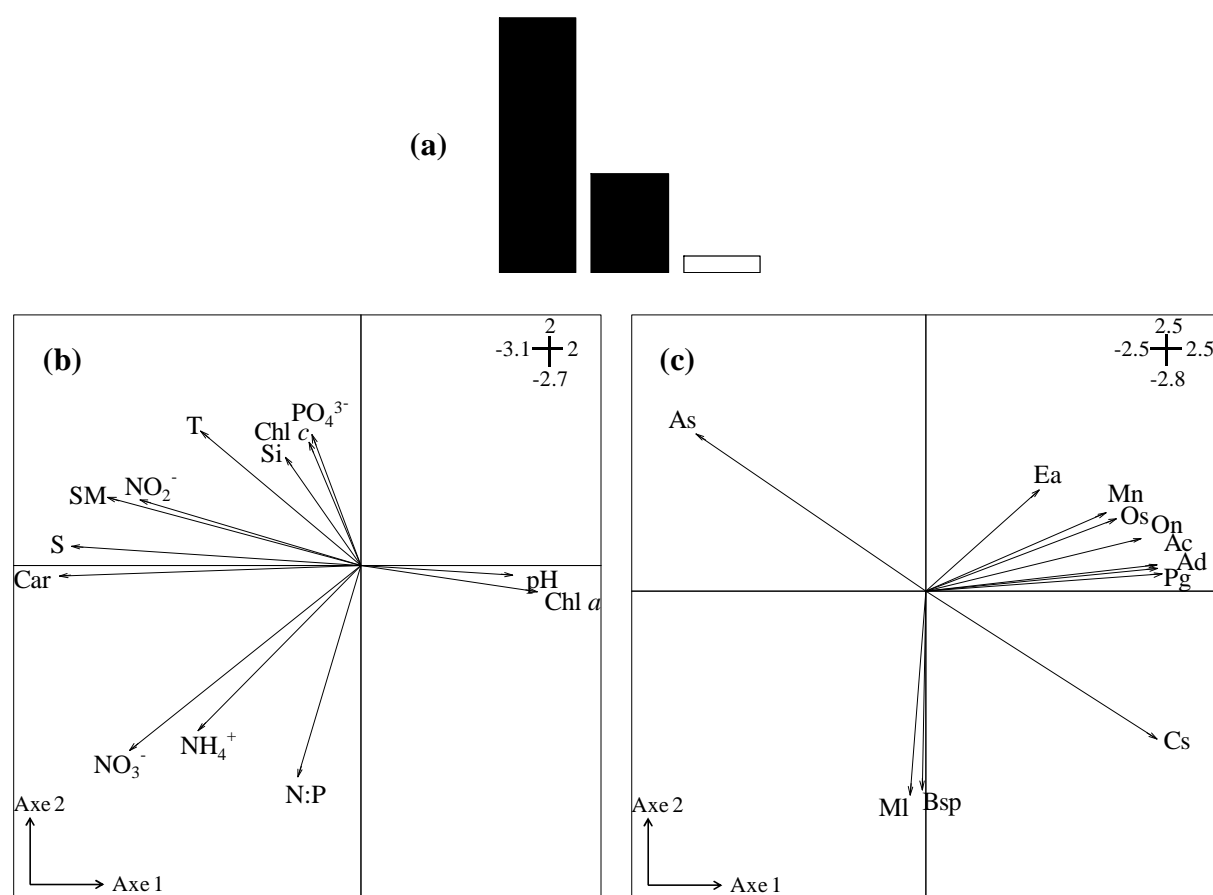
Les ions azotés, qui sont reliés à la qualité de l'eau et interviennent dans le rapport N:P, ont une position intermédiaire sur les deux axes ; c'est le cas aussi de la température. Les silicates, la chlorophylle *c* et les ions orthophosphates sont plus proches du centre que les autres variables, cela indique la faible contribution de ces paramètres à la distribution du zooplancton.

La projection des espèces sur le plan factoriel montre une structuration le long du premier axe (Figure 12c), avec les espèces thalassophiles (Ea, Mn, Cs, Pg, Ad, Ac, On et Os) situées dans la partie droite du plan factoriel, l'espèce la plus halophile (As) située dans la partie gauche et



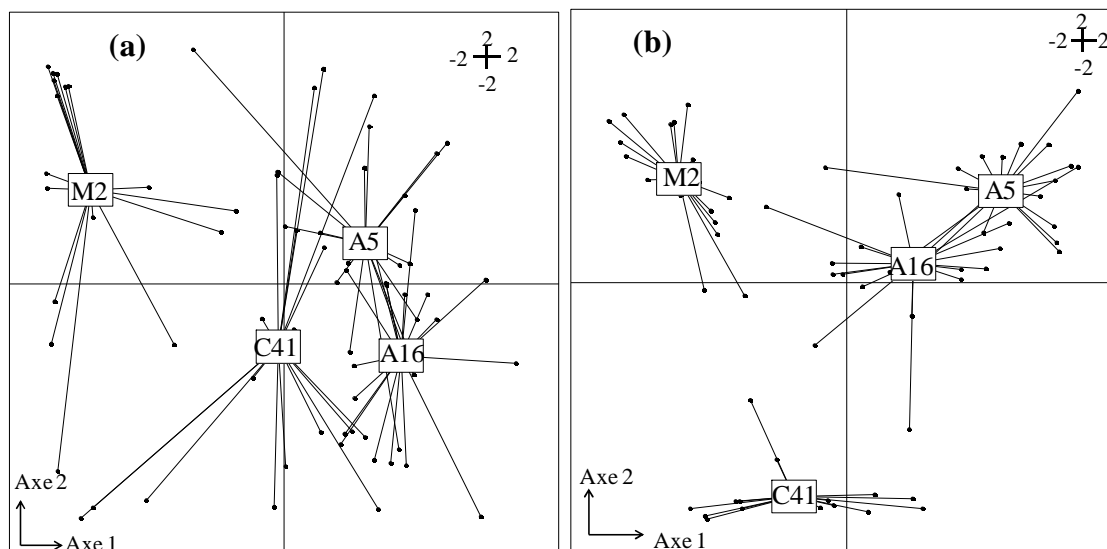
les autres espèces halophiles (MI et Bsp) en position intermédiaire. Donc la distribution des copépodes et des *A. salina* se fait selon leur affinité au sel. La distribution des espèces selon le second axe suggère que MI et Bsp sont associés à de fort ratio N:P, en revanche, les autres espèces sont liées à de faibles ou moyens ratios N:P. Par conséquent, la relation espèce-environnement consiste principalement en un gradient salinité-qualité de l'eau lié à un gradient espèces hypersalines - espèces marines.

Globalement, on constate que les Cyclopoida et les Calanoida sont associés à de faibles concentrations de sel et de N:P, les Harpacticoida sont associés à de fortes salinités et ratios N:P, les artémies sont liés à de très fortes salinités et de faibles ratios N:P.



**Fig.12. Diagramme des valeurs propres (a), plan factoriel de l'analyse Costatis montrant les paramètres environnementaux (b) et les espèces zooplanctoniques (c)**

La projection de chaque échantillonnage (c'est-à-dire de chaque date) sur le plan factoriel pour les variables environnementales d'une part (Figure 13a) et pour l'abondance des espèces d'autre part (Figure 13b) permet de visualiser la position moyenne de chaque site sur le plan factoriel et les principales caractéristiques qui les différencient. Elle souligne, de plus, l'importance de la variation temporelle des relations espèces - environnement.



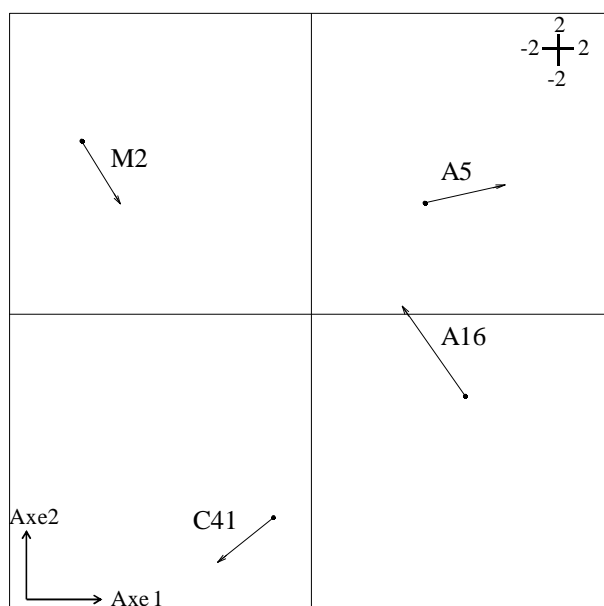
**Fig.13. Projection des 18 points d'échantillonnage correspondant à chaque bassin dans le plan factoriel de l'analyse Costatis montrant (a) les variables environnementales et (b) les espèces zooplanctoniques**

L'emplacement des bassins dans le plan factoriel met en évidence leurs caractéristiques. Sur le plan factoriel montrant la structure environnementale (Figure 13a), les bassins (A5 - A16), C41 et M2 sont distribués de la droite vers la gauche le long du premier axe ce qui est cohérent avec l'augmentation de la salinité de A5 à M2. A5 localisé en haut et à droite, est caractérisé par une importante concentration en chlorophylle *a*, *c* et en silicates. A16, situé en bas à droite, est par contre associé à une faible concentration en chlorophylle *c* et en silicates. C41 situé en bas à proximité de l'axe 2, est lié à une forte concentration en nitrates, ammonium et un fort rapport N:P. Finalement M2, situé en haut à gauche, est défini par une forte concentration en orthophosphates, nitrites, caroténoïdes et matière en suspension.

Sur le plan factoriel montrant les espèces (Figure 13b), A5 et A16 apparaissent dans la partie droite du plan factoriel, ils sont associés à la dominance des espèces de copépodes thalassophiles. C41 et M2 situés à gauche du plan factoriel sont en relation avec la dominance des espèces zooplanctoniques halophiles comme les Harpacticoida *M. lilljeborji* et *Bryocamptus* sp. dans C41 (en bas à gauche) et le branchiopode *A. salina* dans M2 (en haut à gauche).

Pour chaque bassin, les points d'échantillonnage sont plus dispersés sur le plan factoriel lorsqu'ils sont projetés d'après les valeurs des variables environnementales (Figure 13a) que lorsqu'ils sont projetés d'après l'abondance des espèces (Figure 13b). Cela indique que l'assemblage des espèces est relativement stable en dépit des variations temporelles dans les conditions environnementales.

La projection moyenne des variables environnementales et des espèces des quatre bassins sur le plan factoriel (Figure 14) met en évidence les différences entre les bassins et souligne l'importance de la relation entre les caractéristiques environnementales et la distribution des espèces zooplanctoniques. Chaque bassin est représenté par 2 points liés par une flèche. L'origine de la flèche correspond aux variables environnementales et l'extrémité de la flèche correspond aux espèces zooplanctoniques. Plus ces deux points sont proches, plus la relation entre composition de la communauté et conditions environnementales dans le bassin est étroite. On remarque que les longueurs des flèches sont courtes par rapport aux distances entre les bassins, indiquant un lien fort entre la composition des communautés zooplanctoniques et les conditions environnementales.



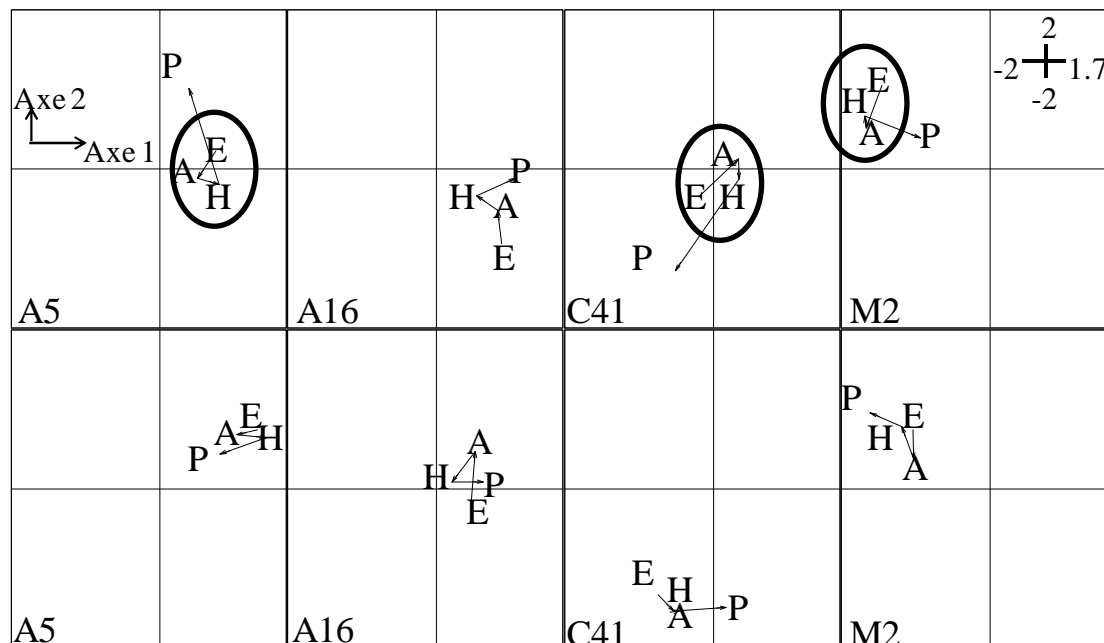
**Fig.14. Projection des sites d'échantillonnage dans le plan factoriel de l'analyse Costatis pour les variables environnementales et pour les espèces**

Chaque site est représenté par deux points : l'un correspond aux variables environnementales (origine de la flèche) et l'autre correspond à l'abondance des espèces (extrémité de la flèche).

Les trajectoires (Figure 15) montrent la position moyenne, par saison, des projections des échantillons collectés dans chaque bassin, pour les variables environnementales (en haut) et pour les espèces (en bas). Cela permet de visualiser des variations saisonnières bien que les structures soient dans l'ensemble assez homogènes.

Les échantillons collectés au printemps sont ceux qui diffèrent le plus des autres. Au niveau de trois bassins, les prélèvements du printemps sont caractérisés par des valeurs exceptionnelles de certains paramètres environnementaux, avec un excès de  $\text{PO}_4^{3-}$  dans A5 et M2, et un excès de  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$  dans C41. Les trajectoires ne montrent pas de variation

saisonnaire importante concernant la composition des communautés zooplanctoniques. Globalement, les différences saisonnières au sein de chaque bassin sont beaucoup plus faibles que les différences entre les bassins.



**Fig.15. Position moyenne, par saison, des projections des échantillons dans le plan factoriel de l'analyse Costatis, pour chaque bassin, pour les variables environnementales (en haut) et pour le zooplancton (en bas)**

Quand c'est nécessaire, une ellipse est dessinée autour des points montrant une structure similaire, soulignant ainsi le point situé à l'extérieur qui montre une variation remarquable.

E: Été, A: Automne, H: Hiver, P: Printemps

#### **D. Discussion**

Les résultats obtenus fournissent des informations concernant les processus impliqués dans la distribution des espèces zooplanctoniques dans la saline. Cette distribution semble fortement liée aux caractéristiques environnementales spécifiques de chaque bassin.

L'analyse montre que la distribution du zooplancton est principalement liée au gradient de salinité. Cette étude confirme que parmi les facteurs environnementaux la salinité a un effet prononcé sélectif sur la composition et la distribution du zooplancton (Hammer, 1986 ; Ayadi et al., 2002 ; Toumi et al., 2005). La diversité des espèces diminue avec l'augmentation de la salinité, cela est montré dans divers environnements salins, allant des estuaires aux salines (Colburn, 1988 ; Williams, 1998 ; Thiéry et Puente, 2002 ; Tripp et Collazo, 2003 ; Sánchez et al., 2006 ; Horváth et al., 2014). En outre, la salinité est le principal facteur qui influence la composition des invertébrés dans les autres systèmes (Wollheim et Lovvorn, 1995 ; Hart et al., 1998).

Les premiers bassins (A5 et A16) maintiennent des caractéristiques typiques d'un milieu marin alors que C41 et M2 sont caractérisés par un environnement hypersalé où les conditions sont particulièrement stressantes (Sánchez et al., 2006).

Les copépodes dominent le zooplancton dans A5, A16 et C41. Ces crustacés sont absents dans le bassin à très forte salinité (M2, 193 psu). L'indice de diversité de Shannon (H') calculé pour les copépodes diminue avec l'augmentation de la salinité de A5 à C41. L'augmentation de la salinité peut donc être considérée comme un facteur limitant pour la diversité de la faune aquatique. Ce résultat est en accord avec ceux d'autres études réalisées dans d'autres salines (Britton et Johnson, 1987 ; Colburn, 1988 ; Williams, 1998 ; Amaral et Costa, 1999 ; Thiéry et Puente, 2002 ; Evagelopoulos et al., 2007).

L'influence de la salinité montre qu'il existe une valeur seuil au-dessus de laquelle seules les espèces tolérantes aux fortes teneurs en sel survivent (Williams, 1998 ; Toumi et al., 2005). La tolérance au sel varie non seulement d'une espèce à une autre mais aussi d'un ordre à l'autre. Les Cyclopoida et les Calanoida sont présents uniquement dans les bassins les moins salés (entre 40 et 65 psu). Ces copépodes thalassophiles, comme *O. nana*, *O. similis* et *P. grani*, sont plutôt associés aux faibles salinités (Kobbi-Rebai et al., 2013). Au contraire, C41 est marqué par la présence exclusive d'Harpacticoida comme *M. lilljeborgi* et *Bryocamptus* sp. Ce résultat est cohérent avec les études précédentes qui ont montré qu'entre 77 et 120 psu, seuls ces deux taxa de copépodes étaient présents dans la saline de Sfax (Khemakhem et al., 2010 ; Kobbi-Rebai et al., 2013). Ces Canthocamptidae, adaptés au stress osmotique sont considérés comme des organismes halophiles. Dans M2, le branchiopode *A. salina* est la seule espèce zooplanctonique présente. Cela corrobore les études précédentes sur la saline de Sfax (Toumi et al., 2005 ; Elloumi et al., 2009).

La tolérance ou l'intolérance des espèces à la salinité est probablement liée à leur capacité ou à leur inaptitude à réagir métaboliquement aux fortes teneurs en sel. Seuls les organismes halophiles ont des caractéristiques écophysiologiques et biologiques spécifiques qui leur permettent de résister à un tel stress (Elevi Bardavid et Oren, 2008). Les copépodes répondent à ce stress en activant une série de mécanismes de défense (Lauritano et al., 2012). Ces mécanismes incluent l'accumulation d'osmolytes organiques intracellulaires comme les prolines (Willett et Burton, 2002) et l'induction de la glutathion-réductase qui est une enzyme qui lutte contre les radicaux libres en transformant le disulfure de glutathion en glutathion (Lauritano et al., 2012 ; Seo et al., 2006). Les *Artemia* sp. peuvent synthétiser les heat shock

protéines (hsp), l'artémine et le p26 pour résister au stress créé par l'environnement extrême (Clegg et al., 1999 ; Tanguay et al., 2004).

Cependant l'analyse montre que d'autres paramètres environnementaux, plus ou moins corrélés avec la salinité, influencent aussi la distribution du zooplancton.

La chlorophylle *a* est le principal pigment photosynthétique présent dans toutes les espèces phytoplanctoniques eucaryotes et procaryotes (cyanobactéries). Ce composant constitue le facteur estimatif de la biomasse phytoplanctonique le plus connu et le plus utilisé (Gregor et Marsalek, 2004). La concentration de la chlorophylle *a*, qui est un indicateur de l'abondance du phytoplancton, favorise le développement du zooplancton. En effet, l'abondance de la plupart des espèces de copépodes est positivement corrélée avec la chlorophylle *a*.

Les algues, les plantes et plusieurs fungi et bactéries (y compris les cyanobactéries) accumulent les caroténoïdes (Borowitzka et al., 1990 ; Gomez et al., 2003). Ces pigments sont souvent impliqués dans la réponse au stress chez tous les organismes (Hui-Kun et al., 2012).

En effet, l'analyse met en évidence de fortes concentrations en caroténoïdes reliées aux fortes salinités. Une valeur élevée en caroténoïdes est, par conséquent, un indicateur de la présence de phytoplancton adapté aux fortes salinités et qui constitue une ressource alimentaire pour le zooplancton halophile se développant dans les milieux salins.

L'analyse Costatis révèle une corrélation positive entre la salinité et les matières en suspension. En effet, la concentration la plus importante de la matière en suspension est enregistrée dans M2. Des processus physico-chimiques comme la floculation peuvent en être à l'origine dans ce bassin à cause des fortes concentrations en sel. De plus, dans ce bassin, l'augmentation de la salinité est susceptible de provoquer la mortalité des organismes intolérants à la salinité et transportés par les courants d'eau. Ils participent ainsi à l'augmentation de la teneur en matière organique en suspension (Davis et Giordano, 1996).

Les ions azotés sont également corrélés avec la salinité.  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$  ont comme source la dégradation de la matière organique. Les organismes morts circulant d'un bassin à l'autre grâce aux courants d'eau sont dégradés et génèrent des ions azotés. Grâce à la mort de ces espèces sensibles au sel, la pompe des nutriments va s'alimenter entre A16/C41 et C41/M2. L'azote assimilable ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ ) constitue des nutriments pour le phytoplancton, il est très nécessaire à la croissance de ces autotrophes qui sont la base du réseau trophique dans la saline. Par contre,  $\text{NO}_2^-$  qui est toxique même à faible dose, génère un stress supplémentaire particulièrement élevé dans M2. L'accumulation de  $\text{NO}_2^-$  dans M2 est due au

processus de nitrification qui se produit dans ce bassin à cause de la forte teneur en sel (Dinçer et Kargi, 1999).

Enfin, la distribution du zooplancton peut être aussi reliée au gradient N:P. Dans la saline de Sfax, les concentrations en azote et en phosphore sont plus fortes que celles trouvées dans d'autres salines comme en Camargue (Thiéry et Puente, 2002) ou la saline de Megalon Embolon en Grèce (Dolapsakis et al., 2005). Cette différence peut être due aux rejets anthropogéniques et aux apports terrigènes effectués au niveau de la saline de Sfax comme signalé par Elloumi et al. (2008) et Kchaou et al. (2009).

De plus dans tous les bassins étudiés, N:P est inférieur à 16, ce qui indique un excès de phosphore. Cet excès peut provenir de diverses sources extérieures. La teneur en phosphore diminue de A5 à A16 et augmente de A16 à M2 (Tableau 3). Ces variations semblent résulter de la combinaison de deux gradients. Le premier gradient serait dû à l'entrée de l'eau de mer au niveau des premiers bassins et à la circulation de l'eau d'un bassin à l'autre. La concentration de P est susceptible de diminuer le long de la saline pour deux raisons. D'abord, ce nutriment est consommé par le phytoplancton (Abid et al., 2008). Ensuite, il a été démontré que le phosphore précipite entre les premiers bassins d'une saline et les suivants (Vieira et Amat, 1996) en raison de la diminution de la solubilité de cet élément chimique avec l'augmentation de la salinité. Le second gradient pourrait être causé par des rejets anthropogéniques puisque C41 et M2 sont situés à proximité des zones urbaines et industrielles. Cette entrée pourrait être accentuée par des phénomènes de percolation à travers le sol, ce qui peut contribuer à l'enrichissement en phosphore dans C41 et dans M2 avec de moindres quantités. L'excès de phosphore ne semble pas avoir d'impact négatif sur les espèces planctoniques étudiées puisque les indicateurs de phytoplancton et la densité de la plupart des espèces zooplanctoniques sont soit non corrélés, soit positivement corrélés avec la concentration en phosphore. Ce résultat est cohérent avec ceux de Dolapsakis et al. (2005) qui montrent que des concentrations élevées en P ont un effet positif sur la densité des microalgues dans le cas d'une forte salinité.

Les deux principaux gradients mis en évidence par Costatis (gradients de salinité et de N:P) permettent une bonne compréhension de la distribution du zooplancton dans les différents bassins de la saline de Sfax.

L'analyse par Costatis montre que A5, placé en haut et à droite du plan factoriel, est allié à une faible salinité et de fortes concentrations en chl *a*, chl *c* et en silicates, alors que A16, situé en bas à droite, est associé à une salinité légèrement plus élevée et des valeurs faibles de

chl *a*, chl *c* et silicates. La diminution de la chl *a* entre A5 et A16 montre que l'abondance du phytoplancton diminue. La chl *c* et les silicates sont positivement corrélés entre eux. La chlorophylle *c* est un pigment accessoire qui existe chez certains groupes de phytoplancton comme les diatomées (Strain et al., 1943). Par conséquent, la chlorophylle *c* permet d'évaluer la portion de diatomées dans le phytoplancton. La silice (Si) constitue aussi une composante essentielle pour certains organismes phytoplanctoniques, notamment les diatomées. Ces dernières sont protégées par un squelette externe nommé "frustule" principalement composé de (Si). Ainsi, la (Si) peut être un facteur limitant qui contrôle leur croissance (Leblanc et al., 2005). Ces paramètres biologiques (Si et Cl *a*) sont donc associés aux diatomées (Strain et al., 1943 ; Stefano et al., 2009).

Nos résultats suggèrent donc une diminution de l'abondance des diatomées entre A5 et A16. Cela est en accord avec les études précédentes montrant une diminution du phytoplancton, particulièrement des diatomées, entre les premiers bassins et A16 associée à une augmentation de la proportion de dinoflagellés (Abid et al., 2008 ; Elloumi et al. 2008, 2009 ; Khemakhem et al., 2010). Les diatomées peuvent avoir une influence sur la distribution du zooplancton puisqu'elles constituent une source alimentaire pour ceux-ci. Dans A5, *O. nana* et *P. grani* sont plus abondants que dans A16. Cela peut être expliqué par l'importance de la biomasse phytoplanctonique dans A5 particulièrement celle des diatomées qui sont une des principales sources alimentaires pour ces copépodes (Drira et al., 2009). Au contraire, dans A16, les teneurs plus faibles en phytoplancton peuvent être à l'origine d'une compétition alimentaire au sein du zooplancton.

C41 situé en bas et centré par rapport au premier axe est caractérisé par des valeurs relativement fortes de salinité et de N:P. Dans ce bassin, seuls deux taxa se développent, les Harpacticoida *Bryocamptus* sp. et *M. lilljeborgi*. Ces espèces sont caractérisées par un mode de vie benthique (Williams, 1980 ; Albeit et Scheibel, 1982 ; Heip et Herman, 1985) contrairement aux autres espèces étudiées qui sont pélagiques. *Bryocamptus* sp. et *M. lilljeborgi* vivent au fond où le ratio N:P peut être fort à cause de la dégradation de la matière organique (Tezuka, 1990). Un important ratio N:P peut, par conséquent, favoriser le développement de ces espèces benthiques. Ces taxa ne sont pas présents dans les autres bassins. Cela peut s'expliquer par la combinaison de plusieurs facteurs. D'une part, *M. lilljeborgi* et *Bryocamptus* sp. ne se développent pas dans M2. Les fortes valeurs de salinité constituent vraisemblablement un milieu très contraignant pour ces espèces. D'autre part *M. lilljeborgi* et *Bryocamptus* sp. ne sont pas observés dans les bassins de plus faibles salinité



(A5 et A16). Ce retrait de *M. lilljeborgi* et *Bryocamptus* sp. peut être lié à leur intolérance aux faibles salinités ou, plus probablement, à une exclusion spatiale compétitive. *M. lilljeborgi* et *Bryocamptus* sp. trouveraient alors refuge dans C41 qui constitue une barrière biologique pour beaucoup d'espèces qui n'y persistent pas, ce qui limite les phénomènes de compétition.

M2, situé à gauche du plan factoriel, est associé à une importante concentration de caroténoïdes, de fortes valeurs de salinité et à la dominance d' *A. salina*. Dans ces conditions de stress (créées par les fortes salinités et par les fortes concentrations en  $\text{NO}_2^-$  dans M2), la microalgue *Dunaliella salina* est caractérisée par une forte croissance qui se manifeste par des teneurs en caroténoïdes élevées (Chidambara Murthy et al., 2005). Associée à d'autres organismes, *D. salina* produit la couleur orangée caractéristique dans le bassin M2 (Abid et al., 2008 ; Baati et al., 2008 ; Elloumi et al., 2008). Cette espèce joue un rôle clé comme proie dans le contrôle de l'abondance et de la reproduction d'*A. salina* (Guermazi et al., 2009). La prolifération d'*A. salina* peut être aussi affectée par la présence ou l'absence d'autres espèces phytoplanctoniques tels que *Chlamydomonas* sp., les cyanobactéries, les diatomées et le cilié *Fabrea salina* (Guermazi et al., 2009). Ce protozoaire semble être une espèce compétitive d'*A. salina* vis-à-vis des ressources alimentaires (Guermazi et al., 2008 ; Khemakhem et al., 2010).

L'analyse des variations temporelles (trajectoires) montre une structure stable et solide au niveau environnemental et au niveau des communautés dans chaque bassin. Les variations les plus significatives se sont produites au printemps avec des valeurs plus élevées d'orthophosphates dans A5 et M2, et des valeurs plus élevées des ions azotés dans C41. Un excès de ces ions peut avoir des effets toxiques. Cependant, aucune influence sur les communautés zooplanctoniques n'a été détectée. Cela peut être expliqué par la capacité d'adaptation du zooplancton étudié (copépodes et artémies) à ces conditions environnementales particulières ; ce qui minimise l'impact de ces variations environnementales et favorise la stabilité des peuplements zooplanctoniques.

Cette étude montre une très forte structure spatiale et de grandes différences entre les facteurs environnementaux et la composition des communautés pour chaque bassin. Les variations saisonnières sont, au contraire, très faibles. La structure globale ne varie pas durant toute l'année malgré que certains facteurs environnementaux et l'abondance de quelques espèces peuvent varier entre les saisons (Toumi et al., 2005 ; Khemakhem et al., 2010). Il semble que chaque espèce préfère certaines conditions environnementales. Donc les variations environnementales saisonnières ne sont pas assez fortes pour influencer significativement la

distribution des espèces dans les différents bassins de la saline. Dans les biotopes caractérisés par un gradient de salinité élevé, les variations saisonnières des communautés planctoniques sont souvent reliées aux variations de la température et de la salinité (Hoffmeyer, 1994 ; Calbet et al., 2001 ; Vieira et Bio, 2011) et influencées par l'entrée de l'eau (Mozetiê et al., 1998 ; Khemakhem et al., 2013). Toutefois, les variations saisonnières sont moins marquées avec l'augmentation de la salinité (Lei et al., 2009). En outre, la saline de Sfax est située dans une région semi-aride dans laquelle les différences entre les saisons ne sont pas nettement identifiables. Finalement, il est impératif de contrôler l'entrée de l'eau pour préserver la production du sel, cela peut engendrer une certaine stabilité des conditions environnementales. La combinaison de tous ces facteurs peut expliquer la faible variation des conditions environnementales et par conséquent la stabilité de la distribution des espèces zooplanctoniques entre les bassins.

*Chapitre III :*  
*Étude de la composition biochimique*  
*en acides gras (AG) du zooplancton*  
*de la saline de Sfax couplée*  
*aux facteurs environnementaux*

### **Chapitre III : Étude de la composition biochimique en acides gras (AG) du zooplancton de la saline de Sfax couplée aux facteurs environnementaux**

#### **A. Introduction**

Les lipides sont utilisés comme des biomarqueurs pour identifier les relations existantes entre les différents maillons de la chaîne trophique (El-Sabaawi et al., 2009 ; Allan et al., 2010 ; Kelly et Scheibling, 2012). De plus, plusieurs études ont montré que la composition en acides gras d'un prédateur reflétait, en grande partie, la nature des proies ingérées (Bell et Dick, 1990 ; Stubbs et Smith, 1990 ; Parrish et al., 1995 ; Mayzaud et al., 1997).

Les acides gras saturés et monoinsaturés, au point de vue nutritionnel, sont plus pauvres que les acides gras polyinsaturés ; ces derniers sont de haute qualité nutritionnelle pour les consommateurs (Parrish, 2009 ; Pommier et al., 2012). Deux familles d'acides gras polyinsaturés sont considérées comme importantes de par leurs rôles biologiques : la famille des acides gras de la série (n-6) ou ( $\omega$ 6) et la famille des acides gras de la série (n-3) ou ( $\omega$ 3). D'autres acides gras sont dits essentiels de par leurs propriétés structurales et physiologiques déterminantes, il s'agit des acides eicosapentaénoïque (EPA, 20:5(n-3)), docosahexaénoïque (DHA, 22:6(n-3)) et arachidonique (ARA, 20:4(n-6)). Ces acides gras hautement insaturés agissent sur la croissance des espèces, le succès de la reproduction et le développement neural du zooplancton et des poissons (Ravet et al., 2003 ; Brett et al., 2006 ; Perhar et al., 2013). Certains acides gras (dont les polyinsaturés à longue chaîne carbonée) sont des métabolites essentiels pour les niveaux trophiques supérieurs, ils ne peuvent pas être synthétisés *de novo* par les organismes c'est-à-dire leur apport ne peut donc se faire que par le biais de l'alimentation puisqu'ils sont uniquement synthétisés par les niveaux trophiques inférieurs (phytoplancton et espèces algales ; Sargent, 1976 ; Ackman, 1980), d'où le caractère indispensable de ces composants (Kattner et Hagen, 2009 ; Mayzaud et al., 2013).

Le rôle des acides gras comme traceurs trophiques des organismes marins et des invertébrés (comme les copépodes) est largement présent dans la littérature, il est maintenant reconnu. En revanche le même aspect n'est pas beaucoup traité dans les milieux extrêmes et plus spécifiquement dans les biotopes hypersalins. Donc, la connaissance de la composition biochimique du zooplancton (copépode et *Artemia*) de la saline de Sfax est un nouvel aspect qui va permettre d'étudier la valeur nutritive et la contribution du zooplancton dans la chaîne alimentaire.

## **B. Matériels et Méthodes**

### **I. Prélèvement et conservation des échantillons**

Les échantillons destinés à l'étude biochimique (dosage des acides gras) sont prélevés sur un filtre de 80 µm de maille, triés, puis stockés à -20°C pour éviter tout risque d'oxydation des lipides.

### **II. Dosage des acides gras chez le zooplancton**

Afin de déterminer le régime alimentaire et d'évaluer la qualité nutritionnelle du zooplancton de la saline de Sfax, les acides gras ont été dosés chez les copépodes et les artémies. Ce dosage a été effectué selon la méthode de Folch et collaborateurs (1957) modifié par Bligh et Dyer (1959) et a été déterminé en suivant 3 étapes :

- Extraction des lipides
- Préparation des Esters Méthyliques d'Acides Gras (EMAG)
- Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

La teneur en acides gras est exprimée en % des acides gras totaux.

#### *II.1. Extraction des lipides*

La quantité de matériel biologique nécessaire à l'extraction des acides gras varie selon l'espèce et la quantité utilisée est adaptée à la disponibilité de cette dernière.

L'extraction des lipides nécessite un broyage uniquement pour les *Artemia* en raison de la petite taille des copépodes. Le broyage est réalisé dans 10 ml de méthanol afin de précipiter les protéines. On ajoute, par la suite, 20 ml de chloroforme pour solubiliser les lipides associés aux protéines. L'ensemble est alors homogénéisé, à l'aide d'un vortex, pendant 5 min puis passé à l'ultrason pendant 10 min. La solution est incubé dans un bain marie à 56°C durant 30 min ; cette étape favorise l'extraction des lipides qui sont solubles à chaud. L'adjonction d'une solution de NaCl à 0,9 % permet de saturer la phase organique et de relarguer ainsi les lipides. L'ensemble est centrifugé à 20,000 g pendant 15 min. La phase supérieure constituée de méthanol et d'eau contient les composés hydrophiles (glucides et protéines) tandis que les lipides sont dissous dans la phase organique inférieure, cette phase est récupérée. Après évaporation à chaud (45°C) du solvant sous flux d'azote, l'extrait lipidique peut être conservé à -20°C sous courant d'azote jusqu'à analyse.

#### *II.2. Méthylation et identification par Chromatographie en Phase Gazeuse*

Après extraction, les lipides sont saponifiés par ajout d'hexane. Les acides gras sont identifiés par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) à ionisation de flamme. La CPG est une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de

nature très diverse. Elle s'applique principalement aux composés gazeux volatils, ce qui n'est pas le cas des acides gras. Ceux-ci, de par leur nature peu volatile, sont, en effet, très difficiles à analyser directement par CPG, à moins d'augmenter la température, ce qui endommagerait la phase stationnaire des colonnes.

Pour résoudre ce problème, l'injection en CPG de l'extrait lipidique est précédée d'une méthylation directe des AG. Cela a pour but de transformer les AG en Esters Méthyliques d'Acides Gras (EMAG) plus volatils en utilisant une solution de boron trifluoride ( $\text{BF}_3$ ) dans le méthanol selon la méthode décrite par Santha et Ackman (1990). La méthylation se fait après incubation d'une heure à  $90^\circ\text{C}$ . Les EMAG sont resuspendus dans un mélange de 0,5 ml d'hexane et de 0,5 ml d'eau, on obtient alors une phase supérieure hexanique qui contient les acides gras méthylés qui sera injectée, par la suite, en CPG.

L'injection est faite dans la colonne capillaire du chromatographe du type « HP 5890 séries II » (Figure 16). L'azote est utilisé comme gaz porteur (1 ml/min). Les profils chromatographiques des acides gras sont traités à l'aide du logiciel de calcul DIAMIR (Varian, JMBS).

Les résultats obtenus sont sous forme de chromatogramme, les acides gras sont identifiés par comparaison des temps de rétention avec celui d'un acide gras standard connu l'acide heptadécanoïque ( $\text{C}_{17:0}$ ) utilisé comme étalon interne. Le temps de rétention caractérise qualitativement les acides gras alors que la concentration de ces derniers est déterminée par la surface des pics.



**Fig.16. Chromatographe de type « HP 5890 séries II »**

### *II.3. Indices trophiques*

Divers ratios alimentaires d'acides gras ont été calculés et utilisés en tant que biomarqueurs trophiques en se basant sur les travaux de El-Sabaawi et al. (2009). Cela permet d'avoir des informations sur le régime alimentaire des espèces étudiées.

Le zooplancton constitue une source en lipide polaire, riche en acides gras polyinsaturés (AGPI). De ce fait, le ratio AGPI/AGS (somme des acides gras polyinsaturés / somme des acides gras saturés) peut être utilisé comme indicateur de carnivorie (Cripps et Atkinson, 2000 ; Stevens et al., 2004). Un autre indice qui peut être employé pour identifier un régime alimentaire carnivore est le rapport DHA/EPA où DHA est l'acide docosahexaénoïque 22:6(n-3) et EPA est l'acide eicosapentaénoïque 20:5(n-3) (Dalsgaard et al., 2003). DHA est fortement conservé dans la chaîne trophique car il s'agit d'un composant stable et quantitativement important des lipides polaires (Scott et al., 2002 ; Veefkind, 2003). DHA/EPA permet de discerner la consommation de flagellés par rapport à celle des diatomées puisque les flagellés sont riches en DHA et les diatomées sont riches en EPA (Dalsgaard et al., 2003). Les diatomées sont caractérisées, également, par des fortes proportions en AGMI, 16:1(n-7) (Dalsgaard et al., 2003). Donc, des quantités élevées d'EPA et de 16:1(n-7) dans les copépodes indiquent que ces derniers sont herbivores (Dalsgaard et al., 2003).

Le rapport du marqueur de diatomées (D) sur le marqueur des flagellés (F), D/F est également utilisé pour distinguer l'alimentation. Ces marqueurs, spécifiques des diatomées et des flagellés, sont calculés selon les formules suivantes :  $D = 16AGPI + 16:1(n-7) + 20:5(n-3)$  et  $F = 18AGPI + 18:2(n-6) + 22:6(n-3)$  (El-Sabaawi et al., 2009). Ils permettent d'évaluer la présence et l'abondance relative des taxons considérés dans un régime alimentaire. Par ailleurs, des quantités importantes en acide linoléique 18:2(n-6) indiquent la présence de débris terrestres ou bien d'algues vertes dans le régime alimentaire du zooplancton (Dalsgaard et al., 2003).

### *II.4. Analyse en composantes principales (ACP)*

Une Analyse en composantes principales (ACP) normalisée a été effectuée pour voir les relations entre les paramètres physico-chimiques (température, densité, salinité, pH, matière en suspension et nutriments), biologiques (chlorophylle *a* et caroténoïdes) et biochimiques (acides gras).

Une simple transformation  $\text{Log}(x+1)$  est appliquée pour stabiliser les données afin de minimiser l'effet des valeurs les plus élevées (Frontier, 1973).

Dans cette étude, seulement deux axes sont représentés, ces axes expliquent la majeure partie de la variance et sont considérés comme statistiquement significatifs dans le plan factoriel.

### **C. Résultats**

#### **I. Analyse de la composition lipidique**

La composition en acides gras des copépodes et des *Artemia salina* dans les quatre bassins de salinité croissante A5, A16, C41 et M2 figure dans le tableau 5.

Les acides gras saturés (AGS) sont les acides 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0 et 24:0. Dans le bassin A5 (42 psu) les AGS totaux varient entre 81,41 % (chez *P. grani* femelle) et 95,06 % (chez *O. similis*) alors que dans le bassin A16 (61 psu) la quantité de ces acides gras est plus faible et oscille entre 67,61 % (chez *P. grani* femelle) et 82,06 % (chez *O. nana*). Dans le bassin C41 (96 psu) *M. lilljeborgi* renferme 86,01 % des AGS totaux. On n'a pas enregistré une différence remarquable entre les AGS totaux chez les *A. salina* mâle et femelle (59,11 % et 57,22 %, respectivement) dans le bassin M2 (193 psu). Les *O. similis* prélevés de A5 montrent la teneur la plus élevée en AGS totaux (95,06 %) principalement composée d'un mélange de 16:0 (72,09 %) et 18:0 (22 %).

L'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0) dominent les AGS totaux. Les teneurs en 16:0 varient entre 37,69 % chez *A. salina* femelle (M2) et 72,09 % chez *O. similis* (A5). Les teneurs en 18:0 sont plus faibles que 16:0 variant entre 14,43 % et 30,92 % des acides gras totaux dans *A. salina* mâle (M2) et *M. lilljeborgi* (C41), respectivement (Tableau 5).

Les teneurs en acides gras monoinsaturés (AGMI) totaux sont plus faibles que ceux des AGS chez les espèces étudiées et sont composées de : 14:1, 16:1, 17:1, 18:1, 20:1, 22:1 et 24:1. Dans le bassin A5, les AGMI totaux fluctuent entre 0,59 % (chez *O. similis*) et 20,63 % (chez *P. grani* mâle). Dans le bassin A16, ces acides gras modulent entre 6,44 % chez *P. grani* mâle et 18,45 % chez la même espèce femelle. Comme c'est le cas des AGS, il n'existe pas une très grande différence entre la quantité des AGMI chez *A. salina* mâle et femelle dans M2 (21,75 % et 24,18 % respectivement). La valeur la plus élevée en acides gras monoinsaturés totaux a été enregistrée au niveau des femelles (24,18 %) d'*A. salina* dans le bassin M2. Par contre, la plus faible valeur de ce type d'acides gras est observée chez *O. similis* prélevé de A5 (0,59 %). Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont : 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:3(n-6), 20:2(n-6), 20:3(n-6), 20:3(n-3), 22:4(n-6), 22:5(n-3). Ils varient entre 3,74 % et 8,74 % chez *P. grani* mâle et femelle, respectivement dans le bassin A5. Dans le bassin A16, les teneurs en ces AG sont comprises entre 3,26 % et 10,86 % chez *P. grani* mâle et femelle, respectivement. Les acides gras polyinsaturés totaux présentent la valeur la plus forte chez *A. salina* femelle (11,66 %)



dans le bassin M2 (Tableau 5). Au niveau de *P. grani* mâle (A16) nous avons enregistré la teneur la plus faible (3,26 %).

Les acides gras hautement insaturés (AGHI) sont : l'acide arachidonique (20:4(n-6), ARA), l'acide eicosapentaénoïque (20:5(n-3), EPA) et l'acide docosahexaénoïque (22:6(n-3), DHA) (Tableau 5). Au niveau du bassin A5 les AGHI totaux varient entre 0,09 % (chez *P. grani* mâle) et 1,91 % (chez *O. nana*). Dans A16, ces acides gras sont entre 0,31 % et 0,72 % chez *P. grani* mâle et femelle, respectivement. Des différences sont observées au niveau des AGHI totaux chez *A. salina* mâle et femelle (0,24 % et 0,78 %, respectivement) dans le bassin M2.

Les teneurs en ARA, EPA et DHA sont présentes au niveau de toutes les espèces mâles et femelles dans tous les bassins en faibles quantités et ne dépassent pas 0,72 %, 0,3 % et 0,47 %, respectivement, chez *O. nana* (A5). ARA est complètement absent chez *O. nana* prélevé de A16, par contre la teneur de cet acide gras est la plus élevée au niveau de la même espèce (*O. nana*) collectée de A5 (0,72 %).

**Tab.5. Composition des acides gras (% des acides gras totaux) des différentes espèces dans A5, A16, C41 et M2**

Bassins	<i>M. lilljeborgi</i>	<i>O. nana</i>		<i>O. similis</i>	<i>P. grani</i>				<i>A. salina</i>	
	C41	A5	A16	A5	mâle		femelle		mâle	femelle
					A5	A16	A5	A16	M2	
C12:0	2,31	0,05	9,74	0,05	2,56	2,92	3,24	3,05	1,93	2,08
C14:0	0,46	1,85	1,26	0,87	0,05	0,03	1,76	1,32	0,91	0,96
C16:0	51,99	64,4	44,4	72,1	52,6	46,1	47,3	38,71	41,4	37,69
C18:0	30,92	18,5	26,5	22	26,45	28,7	28,7	23,28	14,4	15,26
C20:0	0,21	0,32	0	0,01	0,2	0,43	0,11	0,54	0,08	0,44
C22:0	0,07	0,3	0,08	0,03	0,06	0,12	0,31	0,51	0,29	0,56
C24:0	0,05	0,42	0,13	0,01	0,01	0,11	0,01	0,2	0,06	0,23
<b>AGS totaux</b>	<b>86,01</b>	<b>85,8</b>	<b>82,1</b>	<b>95,1</b>	<b>81,93</b>	<b>78,4</b>	<b>81,4</b>	<b>67,61</b>	<b>59,1</b>	<b>57,22</b>
C14:1 (n-5)	0,49	0,08	0,11	0,05	0,06	0,05	0,05	0,67	0,12	0,69
C16:1 (n-7)	0,29	0,01	0	0,06	0,07	0,5	0,19	0,32	0,43	0,66
C16:1 (n-7)	0,43	0,07	0,21	0,04	0,09	0,55	0,25	3,06	0,24	0,24
C17:1	0,65	0,03	8,87	0,05	0,19	0,83	0,93	9,45	0,76	0,37
C18:1 (n-9)	0,5	0,13	0	0,1	12,23	0	0,48	0	0,31	0,01
C18:1 (n-9)	3,49	6,5	4,34	0,1	7,25	2,12	4,25	2,48	15,1	18,62
C18:1 (n-9)	0,09	0,04	0	0,06	0,17	0,09	0,07	0,15	4,07	0,11
C18:1 (n-9)	0,12	0,13	0	0,03	0,07	0,15	0,12	0,06	0,39	2,88
C20:1 (n-9)	0,1	0,44	0	0,03	0,1	0,11	0,12	0,16	0,09	0,18
C20:1 (n-9)	0,36	0,15	0	0,05	0,34	1,7	0,16	2,04	0,12	0,24
C22:1 (n-9)	0,05	0,17	0,23	0,01	0,05	0,21	0,15	0,06	0,11	0,08
C24:1 (n-9)	0,04	0,49	0	0,01	0,01	0,13	0,01	0	0,05	0,1
<b>AGMI totaux</b>	<b>6,61</b>	<b>8,24</b>	<b>13,8</b>	<b>0,59</b>	<b>20,63</b>	<b>6,44</b>	<b>6,78</b>	<b>18,45</b>	<b>21,8</b>	<b>24,18</b>
C18:2 (n-6)	0,11	0,16	0,89	0,09	0,09	0,06	0,5	1,65	0,34	0,52
C18:2 (n-6)	0,82	0,11	0	0,05	0,85	0,71	0,63	0	0,43	3,73
C18:2 (n-6)	0,12	0,04	0	0,04	0,03	0,09	0,38	0,81	0,3	0,28
C18:2 (n-6)	0,76	0,32	0	3,48	0,16	0,12	4,53	0,36	4,16	2,13
C18:2 (n-6)	0,28	0,15	0	0,02	0,3	0,09	0,08	0	0,17	0,3
C18:2 (n-6)	0,05	0,32	0	0,01	0,34	0,07	0,15	0,78	0,16	0,49
C18:3 (n-6)	0,28	0,3	0,23	0,06	0,85	0,05	0,94	1,11	0,86	1,12
C18:3 (n-3)	0,19	0,23	2,15	0,02	0,67	0,35	0,2	2,03	0,19	0,67
C18:3 (n-3)	0,19	0,2	0	0,03	0,13	0,64	0,45	0	0,55	0,21
C18:3 (n-3)	0,14	0,14	0	0,05	0,04	0,07	0,28	0,58	0,17	0,17
C20:2 (n-6)	0,15	0,15	0	0,02	0,14	0,08	0,16	1,73	0,16	0,69
C20:3 (n-6)	0,08	0,28	0,37	0,03	0,05	0,44	0,12	1,14	0,13	0,77
C20:3 (n-3)	0,04	0,22	0	0,02	0,04	0,1	0,06	0,47	0,42	0,3
C22:2 (n-3)	0,06	0,37	0	0,02	0,03	0,09	0,14	0,11	0,11	0,13
C22:4 (n-6)	0,03	0,65	0	0,01	0,02	0,09	0,07	0,06	0,14	0,11
C22:5 (n-3)	0,05	0,28	0,03	0,01	0,005	0,21	0,05	0,03	0,08	0,04
<b>AGPI totaux</b>	<b>3,35</b>	<b>3,92</b>	<b>3,67</b>	<b>3,96</b>	<b>3,745</b>	<b>3,26</b>	<b>8,74</b>	<b>10,86</b>	<b>8,37</b>	<b>11,66</b>
ARA-C20:4 (n-6)	0,05	0,72	0	0,04	0,04	0,11	0,06	0,38	0,06	0,25
EPA-C20:5 (n-3)	0,05	0,3	0,15	0,04	0,03	0,1	0,1	0,29	0,1	0,24
DHA-C22:6 (n-3)	0,03	0,42	0,33	0,03	0,01	0,07	0,01	0,05	0,04	0,22
DHA-C22:6 (n-3)	0,09	0,47	0	0,01	0,01	0,03	0,01	0	0,04	0,07
<b>AGHI totaux</b>	<b>0,22</b>	<b>1,91</b>	<b>0,48</b>	<b>0,12</b>	<b>0,09</b>	<b>0,31</b>	<b>0,18</b>	<b>0,72</b>	<b>0,24</b>	<b>0,78</b>

AGS : acide gras saturés, AGMI : acide gras monoinsaturés, AGPI : acide gras polyinsaturés,  
AGHI : acides gras hautement insaturés, EPA : acide eicosapentaénoïque, DHA: acide  
docosahexaénoïque, ARA : acide arachidonique

Le tableau 6 présente les valeurs des principaux indices trophiques : DHA/EPA, 18:2(n-6), AGPI/AGS et D/F .

Dans le bassin A5 le rapport DHA/EPA varie entre 0,2 et 2,97 chez *P. grani* femelle et *O. nana*, respectivement. Dans le bassin A16 ce ratio oscille entre 0,17 et 2,2 chez les mêmes espèces. La valeur la plus élevée du rapport DHA/EPA a été enregistrée au niveau de *O. nana* collecté de A5 (2,97) (Tableau 6).

Dans le bassin A5, la teneur la plus faible de l'acide linoléique 18:2(n-6) est enregistrée chez *O. nana* (1,1 %) alors que la valeur la plus élevée de cet acide gras dans le même bassin est trouvée chez *P. grani* femelle (6,27 %). Dans le bassin A16, *O. nana* a la plus faible valeur (0,89 %) en 18:2(n-6) alors que *P. grani* femelle a la plus grande valeur (3,6 %).

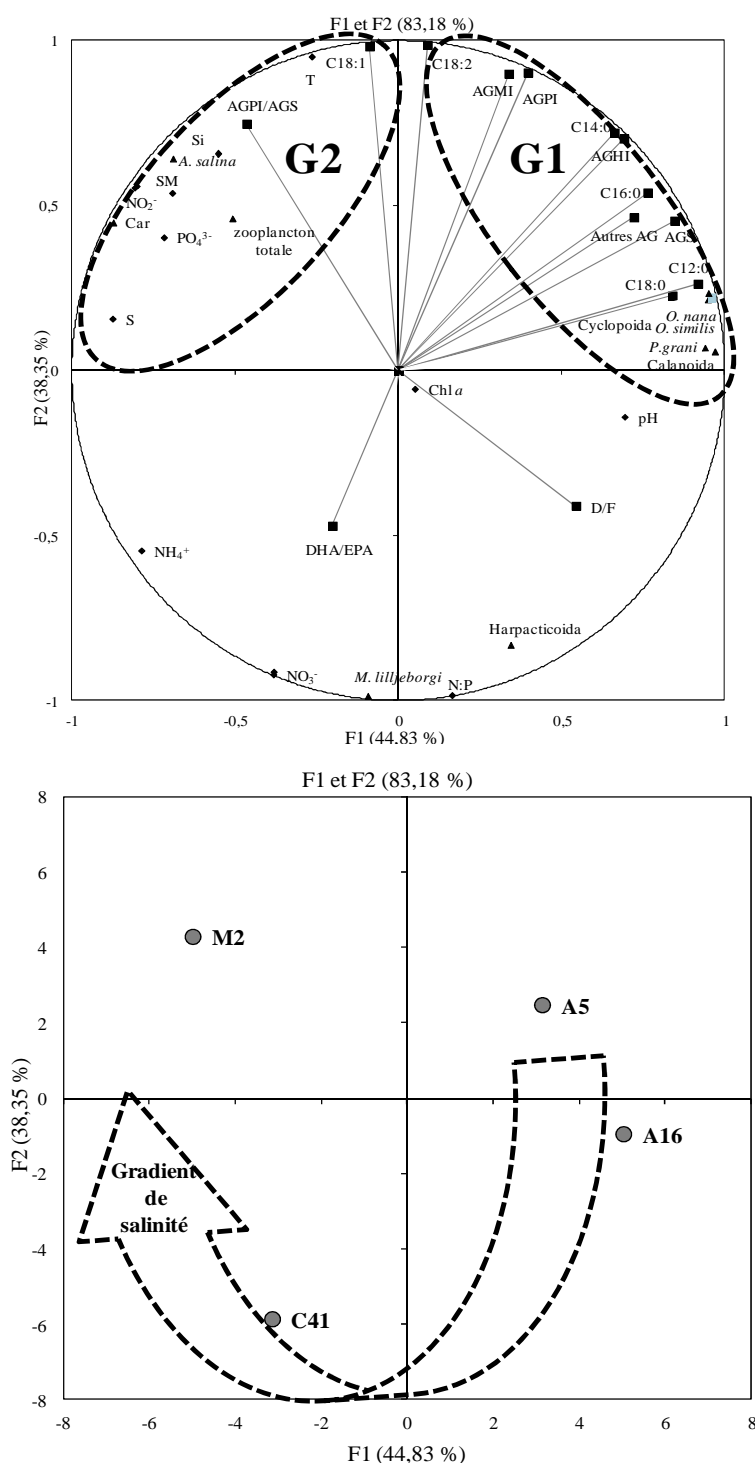
**Tab.6. Différences inter-spécifiques des acides gras trophiques chez les copépodes et les *A. salina* dans 4 bassins de la saline de Sfax**

Bassins	<i>M. lilljeborgi</i>		<i>O. nana</i>		<i>O. similis</i>		<i>P. grani</i> mâle		<i>P. grani</i> femelle		<i>A. salina</i> mâle		<i>A. salina</i> femelle	
	C41	A5	A16	A5	A5	A16	A5	A16	A5	A16	M2	M2	M2	M2
DHA/EPA	2,4	2,97	2,2	1	0,67	1	0,2	0,17	0,8	1,21				
18:2 (n-6)	2,14	1,1	0,89	3,69	1,8	1,14	6,27	3,6	5,56	7,45				
AGPI/AGS	0,04	0,05	0,04	0,04	0,1	0,04	0,11	0,16	0,14	0,2				
D/F	0,87	0,87	0,88	0,85	0,87	0,89	0,86	0,89	0,86	0,86				

## II. Analyse statistique

Une analyse en composante principale (ACP) est effectuée en rassemblant les paramètres environnementaux, les espèces et les acides gras.

La représentation des descripteurs sur le plan (F1 x F2) expliquent 83,18 % de la variance totale (Figure 17).



**Fig.17. Analyse en Composantes Principales (ACP) des paramètres environnementaux et des acides gras chez les copépodes et *Artemia salina* dans les bassins A5, A16, C41 et M2 de la saline de Sfax**

AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés, AGHI : acides gras hautement insaturés, AGS : acides gras saturés, Autres AG : autres acides gras, DHA : acide docosahexaénoïque, EPA : acide eicosapentaénoïque, D : somme des 16PUFA ; 16:1(n-7) ; 20:5(n-3), F : somme des 18PUFA ; 18:2(n-6) ; 22:6(n-3), T : température, S : salinité, SM : matières en suspensions,  $\text{NO}_2^-$  : nitrites,  $\text{NO}_3^-$  : nitrates,  $\text{NH}_4^+$  : ammonium,  $\text{PO}_4^{3-}$  : phosphates, Car : caroténoïdes, chl *a* : chlorophylle *a*, Si : silicates

Autour de l'axe F1, nous avons retrouvé l'association G1 qui sélectionne positivement le groupe des espèces de copépodes (*O. nana*, *O. similis* et *P. grani*) et la majorité des composés biochimiques : 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:2, AGPI, AGMI, AGHI et autres AG. Cette observation montre que les espèces *O. nana*, *O. similis* et *P. grani* se développent préférentiellement dans les bassins à faible salinité (A5 et A16) et produisent les plus grandes quantités des acides gras cités ci dessus.

Nous avons enregistré l'association G2 sélectionnée négativement et qui regroupe la température, la salinité, les matières en suspension, les nitrites, les orthophosphates, les silicates, les caroténoïdes, le zooplancton total, l'*A. salina*, l'acide 18:1 et le ratio AGPI/AGS (Figure 17). Les bassins les plus salés (C41 et M2), situés négativement par rapport à l'axe F1, sont influencés par ces facteurs.

Le premier axe décrit un régime alimentaire herbivore, en effet, D/F (Diatomées/Flagellés), qui est un indice d'herbivorie, se trouve dans la partie positive de cet axe. Ce ratio est significativement corrélé avec l'abondance du zooplancton total ( $r = -0,998$ ,  $p < 0,05$ ).

L'acide gras 18:2 qui est, également, un marqueur d'herbivorie et plus précisément d'algues vertes ou bien de détritres terrestres apparaît dans la partie positive de cet axe.

Les marqueurs trophiques de carnivorie DHA/EPA et AGPI/AGS sont situés dans la partie négative du deuxième axe.

L'analyse en composante principale montre qu'*A. salina* est significativement corrélé avec le ratio de carnivorie (AGPI/AGS) ( $r = -0,959$ ,  $p < 0,05$ ).

Le régime alimentaire semble être lié non seulement aux différentes espèces mais aussi à la disponibilité de la nourriture dans chaque bassin étudié de la saline.

#### **D. Discussion**

Nos résultats suggèrent que les conditions environnementales peuvent être nutritionnellement défavorables pour certaines espèces zooplanctoniques, par contre d'autres espèces sont capables de vivre et de se nourrir dans ces conditions. Pour cette raison, étudier la composition en acides gras du zooplancton de la saline de Sfax couplée aux paramètres environnementaux est d'une extrême importance.

Beaucoup de travaux traitant les acides gras chez le zooplancton sont effectués dans les eaux douces et dans les milieux marins (exemple Evjemo et al., 2008 ; Rossi et al., 2008 ; El-Sabaawi et al., 2009 ; Ravet et al., 2010). En revanche, peu d'études se sont concentrées sur la composition biochimique du zooplancton dans les milieux extrêmes comme les salines. Dans

la saline de Sfax, ces études se résument au travail effectué par Guerhazi et al. (2008) qui a analysé la composition du branchiopode *Artemia* en protéines et en acides gras.

Le présent travail est le premier réalisé dans la saline de Sfax qui étudie la composition du zooplancton (copépodes et *Artemia*) en acides gras. Ces résultats donnent des informations sur le comportement alimentaire des espèces zooplanctoniques étudiées au niveau des bassins A5, A16, C41 et M2 de la saline et l'interaction entre les acides gras et les paramètres environnementaux.

On remarque une grande différence dans la composition des acides gras entre les espèces, cela montre que les espèces étudiées sélectionnent fortement et différemment leurs proies. En effet, certaines espèces de copépodes sont aptes à se nourrir sélectivement de particules à haute qualité nutritionnelle comme les diatomées (Azovsky et al., 2005).

Les résultats montrent que le pourcentage des acides gras saturés (AGS) (principalement 16:0) est important chez toutes les espèces étudiées et dans tous les bassins ; cela peut être dû à une alimentation à base de chlorophycées (Farhadian et al., 2013). Cela est confirmé par la présence de l'acide myristique (14:0) et l'acide palmitique (16:0) qui sont les acides gras majeurs caractéristiques des algues vertes consommées et sont présents en forte teneur dans le zooplancton prédateur (Brett et al., 2006). Généralement, le 14:0 et 16:0 sont connus comme des précurseurs de 20:1(n-6) et de 22:1(n-6). En revanche, ces deux derniers acides gras ne sont pas détectés dans les échantillons de zooplancton prélevés de la saline. Cela peut être dû à la présence d'une lacune dans le système enzymatique d'élongation et de désaturation des acides gras saturés (Nanton et Castell, 1999).

Le zooplancton est incapable de synthétiser des taux considérables d'AGPI, cela peut être un facteur limitant pour sa croissance (Bell et Tocher, 2009 ; Vengadeshperumal et al., 2010). Dans cette étude on constate qu'*A. salina* est une source plus riche en AGMI et AGPI que les copépodes, cela peut être expliqué par la capacité de ce branchiopode d'ajuster les AGMI et les AGPI à des concentrations élevées en sel, par contre certaines espèces de copépodes sont incapables de modifier leurs AGMI et AGPI .

La présence de longues chaînes d'acides gras polyinsaturés dans la fraction lipidique polaire des copépodes est expliquée par le fait que l'acide stéarique (18:0) fourni par l'alimentation (principalement les cyanobactéries) peut subir des élongations et des désaturations par le système enzymatique de biosynthèse après avoir été consommé par les copépodes (Nanton et Castell, 1999). C'est le cas du copépode Harpacticoida *M. lilljeborgi* dans le bassin C41 qui représente le plus grand pourcentage de 18:0. L'élongation et la désaturation de certains acides

gras après leur incorporation dans un organisme peuvent affaiblir leur importance en tant que biomarqueurs trophiques ; par contre, cela peut mettre en valeur le rôle des copépodes dans le transfert de la matière organique des microorganismes vers les niveaux trophiques supérieurs (Caramujo et al., 2008).

D'autres acides gras comme l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 (n-3)) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 (n-3)) peuvent, chez certaines espèces, provenir directement en partie de la nourriture et chez d'autres espèces de mécanismes de bioconversion du 18:3 (n-3) (Bell et Tocher, 2009). Par conséquent, la composition en acides gras du zooplancton résulte peut être de la recombinaison des acides gras d'origine alimentaire et de ceux synthétisés *de novo* (Desvillettes et al., 1997).

La présence de quantités importantes d'acide oléique (18:1 (n-9)) et d'acide linoléique (18:2 (n-6)) chez *A. salina* (bassin M2) montre que l'alimentation de ce groupe zooplanctonique est liée aux cyanobactéries. En effet, les chlorophycées et les cyanobactéries sont les deux groupes les plus abondants dans le bassin M2 (Khemakhem et al., 2010). L'étude de Guermazi et al. (2008) effectuée dans le même milieu confirme que la composition en acides gras de la fraction lipidique des *Artemia* est entièrement dérivée de la chlorophycée *Dunaliella salina* et de cyanobactéries.

*P. grani* présente au niveau du bassin A5 montre de fortes teneurs en 18:2 (n-6). La forte proportion en cet acide gras indique la présence de débris terrestres ou d'algues vertes dans l'alimentation de cette espèce zooplanctonique (Dalsgaard et al., 2003).

Les plus hauts ratios d'AGPI (la somme de tous les AGPI)/AGS (la somme de tous les AGS) sont observés chez quelques espèces comme *P. grani* femelle (A5 et A16) et *A. salina* (M2), cela montre un régime alimentaire carnivore de ces espèces (Cripps et Atkinson, 2000). Toutefois, le régime alimentaire du zooplancton est différent selon l'espèce considérée (Tackx et al., 1990) et peut varier (carnivore et herbivore).

Le pourcentage total des acides gras hautement insaturés (AGHI) est plus élevé chez *P. grani* prélevé de A16 que ceux prélevés de A5. On remarque que la composition en acides gras d'une même espèce varie selon les bassins. Cela peut être lié soit à la disponibilité de la nourriture qui change d'un bassin à l'autre soit au comportement alimentaire d'une même espèce qui s'adapte aux conditions environnementales particulièrement la salinité. *Acartia* spp. sont connus pour être une source riche en AGHI, en particulier EPA et DHA (Watanabe et al., 1983 ; Vengadeshperumal et al., 2010).

*O. nana* (A5) présente un pourcentage élevé en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 (n-3)), cela peut indiquer une alimentation à base de diatomées puisque cet acide gras hautement insaturé est fortement présent chez ces microalgues (Dalsgaard et al., 2003). En effet, ce groupe de microalgues est très abondant au printemps dans le bassin A5 (Abid et al., 2008).

Cette étude indique que l'indice d'herbivorie, D/F, est négativement corrélé avec le zooplancton total ( $r = -0.998$ ,  $p < 0.05$ ). D/F est utilisé pour distinguer entre une alimentation à base de diatomées ou de flagellés (El-Sabaawi et al., 2009). *P. grani* (dans le bassin A5) et *A. salina* (dans le bassin M2) montrent les plus grandes valeurs de 18:2 (n-6). Des quantités importantes en cet AG prouvent la présence de détritus terrestres ou d'algues vertes dans l'alimentation du zooplancton (Dalsgaard et al., 2003).

On remarque également que *O. nana* (A5) est l'espèce qui accumule le plus d'acide arachidonique (ARA, 20:4 (n-6)) et d'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 (n-3)). Certains copépodes sont riches en phospholipides qui sont des antioxydants neutres et essentiels pour la synthèse des acides gras hautement insaturés (Sargent et al., 1999 ; Guangxing et Donghui, 2009). Une quantité importante en DHA a un effet bénéfique sur la productivité des copépodes (Norsker et Stottrup, 1994).

*O. nana* (A5) et *M. lilljeborgi* (C41) enregistrent les plus grandes valeurs de DHA/EPA, cela peut être relié, en partie, aux fortes quantités de détritus organiques filtrés par ces deux espèces au niveau des bassins A5 et C41.

La distribution des espèces zooplanctoniques dans la saline de Sfax semble être directement et indirectement influencée par les paramètres physiques, chimiques, biologiques et biochimiques. Ces paramètres sont potentiellement responsables de la production primaire et ont des conséquences primordiales sur les consommateurs comme les copépodes et les *Artemia*.

Les profils des acides gras observés sont spécifiques pour chaque groupe taxonomique. Les facteurs de stress et les changements environnementaux (Arts et al., 2009 ; Guschina et Harwood, 2009) déterminent la composition en acides gras des copépodes. Cela est susceptible d'entraîner différents comportements alimentaires.

Les conditions stressantes du milieu étudié reliées surtout à la salinité peuvent être un facteur limitant pour la production phytoplanctonique et par conséquent pour la disponibilité de la nourriture pour le zooplancton de la saline de Sfax, cela peut également avoir une influence sur la composition du zooplancton en acides gras.



Grâce à leurs teneurs en acides gras (acides gras hautement insaturés (AGHI) et acides gras polyinsaturés (AGPI)), les copépodes et les *Artemia* de la saline de Sfax peuvent être utilisés comme une source alimentaire pour les larves de poissons et de mollusques en élevage.

La détermination de la composition biochimique des microalgues vivant dans la saline de Sfax est très importante (Guermazi et al., 2014) afin d'isoler les espèces responsables des fortes teneurs de certains acides gras chez les espèces zooplanctoniques étudiées.

*Chapitre IV :*  
*Étude génétique des espèces*  
*zooplanctoniques de la saline de Sfax*

## **Chapitre IV : Étude génétique des espèces zooplanctoniques de la saline de Sfax**

### **A. Introduction**

La présence d'une espèce dans un milieu extrême comme les salines reflète sa capacité d'adaptation aux conditions environnementales stressantes générées par les fortes concentrations en sel. Pour surmonter ce stress, chaque organisme a ses propres particularités génétiques au sein de son génome. La vie en milieu extrême est donc susceptible de générer une diversité génétique particulière. Les outils moléculaires sont de plus en plus utilisés pour aborder différents niveaux de variabilité inter et intra-spécifiques et pour appréhender différentes problématiques génétiques liées aux environnements hypersalins. La biologie moléculaire permet aussi d'étudier l'expression des gènes qui s'expriment face au stress salin (Rajesh et al., 2012). Elle peut également permettre de déterminer la séquence complète du génome d'un organisme (Jung et al., 2006 ; Ki et al., 2009; Easton et al., 2014). Les outils moléculaires se basent sur les acides nucléiques. On peut citer les séquences des gènes et des régions intercalaires ribosomales et les séquences mitochondriales qui sont les plus utilisées pour effectuer des comparaisons entre les taxons. Les séquences d'ADN sont également utilisées, pour l'identification et la détection d'espèces cryptiques puisqu'il s'agit d'une méthode plus sensible et plus précise que les méthodes basées sur les critères morphologiques (Valentini et al., 2008 ; Palero et al., 2009). Dans plusieurs travaux, l'identification moléculaire a permis de revoir la taxonomie des espèces identifiées sur la base de critères morphologiques (exemple Wyngaard et al., 2010). Cela conduit à repérer de nouveaux critères de caractérisation afin de lever les problèmes de doute liés à l'identification des espèces.

De nombreux travaux ont traité de ces aspects moléculaires dans le milieu marin (Schwartz et al., 2006). En revanche, peu de travaux ont été réalisés dans les milieux salins et en particulier, sur la caractérisation génétique des copépodes et des artémies des milieux hypersalins.

Ce chapitre est entrepris afin d'estimer la variabilité génétique intra et inter-populationnelle d'espèces caractéristiques de certains bassins de la saline de Sfax et d'étudier la répartition phylogéographique des principales espèces emblématiques de cette faune. Pour cela, des marqueurs moléculaires tels que les séquences de 16S, 18S, COI et de Cytb ont été retenus. Le choix de ces marqueurs génétiques est basé sur des études antérieures réalisées sur différents taxons dans différents écosystèmes (exemple Bucklin et al., 2000 ; Wyngaard et al., 2010 ; Blanco-Bercial et al., 2011 ; Laakmann et al., 2012 ; Marrone et al., 2013). Ces marqueurs moléculaires ont permis de déterminer les niveaux de divergence génétique entre

les espèces, entre les populations au sein de chacune des espèces et à l'intérieur des populations.

## **B. Matériels et Méthodes**

### **I. Prélèvement et conservation des échantillons**

Les échantillons destinés à l'étude de la structure génétique ont été prélevés sur un filtre de 150 µm de maille (pour optimiser la récolte d'adultes) et sont conservés dans l'alcool 95%.

### **II. Extraction d'ADN génomique**

L'ADN est extrait par le CTAB (Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide). Cette technique d'extraction est appliquée sur les *Artemia salina*. Vu la taille relativement faible de ces dernières, aucun broyage n'est nécessaire.

Les échantillons sont digérés dans des tubes de 1,5 ml contenant le tampon de digestion (400 µl de tampon au CTAB extemporanément mélangé avec du β-mercapto-éthanol à 0,2 %) qui réduit les ponts disulfures présents dans les protéines et favorise le maintien des Dnase sous forme inactive. Un volume de 10 µL de protéinase K (20 mg/ml) est ajouté au mélange pour dégrader les protéines associées à l'ADN. Après mélange, l'ensemble est incubé une heure à 55°C dans un bain à sec.

L'extrait subit une purification au chloroforme : alcool isoamylique (24:1). Après une agitation manuelle, le mélange est centrifugé 15 min à 13,000 g et 2 phases sont séparées : la phase supérieure est la phase aqueuse contenant l'ADN ; la phase inférieure est la phase organique contenant les lipides dissous dans le chloroforme. On récupère la phase aqueuse contenant l'ADN génomique. Celui-ci est précipité par ajout de 40 µl d'acétate de sodium et de 880 µl d'éthanol absolu. L'ADN est ensuite rincé par de l'éthanol 70 %, séché et resuspendu dans 23 µl d'eau ultra pure. Ces ADN sont conservés à -20°C.

Afin d'extraire l'ADN des copépodes, chaque individu est isolé individuellement dans un micro tube de 0,2 ml contenant 23 µl d'eau ultra pure, puis chauffé à 94°C pendant 5 min.

Chaque ADN extrait est dosé par spectrométrie à une absorbance égale à 260 nm.

### **III. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

La PCR (pour polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne) est une technique de répllication *in vitro* qui a été mise au point en 1986 par Kary Mullis. Elle permet d'obtenir d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Le nombre de copies est de l'ordre de grandeur du million en quelques heures.

Il s'agit de réaliser une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques (sens et anti-sens)

complémentaire. Les amorces ou « primers » bornent alors la séquence à amplifier. Les couples d'amorces employés lors des amplifications par PCR sont décrits dans le tableau 7.

**Tab.7. Liste des couples d'oligonucléotides utilisés comme amorces lors des réactions de PCR**

Gène	Amorces	Séquence 5' → 3'	Tm	Taille du fragment amplifié	Référence Bibliographique
18S	RibF	GGG GGA GTA TGG TCG CAA GGC	60 °C	~ 400 pb	Hermann, 2011
	RibR	TCA GTG TAG CGC GCG TGC GGC			
18S	FAs18sa	CGT GGT GTG GTT GAA AGT TG	50 °C	~ 1400 pb	Cette étude
	RAs18sa	TCC CTC AAA CAA GGC CAA T			
16S	16Srep1	GTG CDA AGG TAG CAT AAT M	54 °C	~ 400 pb	Trang, 2006
	16Srep2	CAA CAT CGA GGT CRC AAD C			
COI	FuCOI	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	40 °C	~ 700 pb	Folmer et al., 1994
	RuCOI	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA			
Cytb	Ucytb151F	TGT GGR GCN ACY GTW ATY ACT AA	42 °C	~ 400 pb	Merritt et al., 1998
	Ucytb270R	AAN AGG AAR TAY CAY TCN GGY TG			
Cytb	L10319Cytb	CCT TGG GKC AGA TGT CTT TTT GGG	45 °C	~ 320 pb	Machida et al., 2004
	H10648Cytb	GAT AAA ATT TTC WGG GTC			

Un kit d'amplification par PCR (Promega) a été utilisé pour l'amplification des fragments d'intérêt. Le mélange réactionnel est préparé dans un micro tube de 0,2 ml où l'on dépose : 3 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) ; 1 µl de dXTP (10 mM) ; 1 µl de l'amorce sens (10 pMol) ; 1 µl de l'amorce anti-sens (10 pMol) ; 0,2 µl de Taq polymérase ; 10 µl de tampon de réaction de la Taq polymérase 10X ; 23 ou 1 µl d'ADN de copéode ou d'*Artemia* respectivement. Le volume final est ajusté à 50 µl avec de l'eau ultra pure.

L'amplification est réalisée à l'aide d'un « Thermocycler » (Biometra) selon le programme suivant : dénaturation à 93°C pendant 3 min, puis 35 cycles comprenant trois étapes : la dénaturation (30 s à 93°C) de l'ADN qui permet la séparation des doubles brins d'ADN ; l'hybridation des amorces (30 s à la température optimale (Tm)) qui permet leur fixation sur l'ADN dénaturé ; et l'élongation (72°C pendant 40 s jusqu'à 1,5 min (pour le 18S ayant une taille de 1400 pb)) du brin complémentaire de l'ADN matrice à partir des amorces hybridées et à l'aide des désoxynucléotides libres.

La température de fusion (Tm) dépend de la séquence des amorces utilisées et est indiquée pour chaque couple d'amorces dans le tableau 7 ; le nombre de cycles permet théoriquement d'augmenter le nombre de copies de façon exponentielle (2<sup>n</sup>). Au terme de ces cycles, le

programme s'achève par une étape d'élongation de 10 min à 72°C. A la fin de la PCR, les échantillons peuvent être conservés à -20°C.

#### **IV. L'électrophorèse**

L'électrophorèse permet de séparer les produits de la PCR selon leur taille. Elle se déroule sur un gel d'agarose de 1 % en présence d'un tampon de migration TAE et de bromure d'éthidium (BET) qui est un agent fluorescent permettant de visualiser les fragments d'ADN lorsqu'ils sont exposés à des rayonnements UV.

L'ADN migre dans le gel d'agarose de la cathode vers l'anode (les acides nucléiques étant chargés négativement à pH 8). Un marqueur de taille est déposé parallèlement aux échantillons. Le marqueur utilisé est choisi selon la taille des fragments attendus. Dans le cadre de cette étude le marqueur de taille utilisé est le 100 pb DNA Ladder Plus. Ce marqueur correspond à une échelle adaptée pour estimer les fragments de tailles comprises entre 100 et 3000 pb.

Un courant d'environ 10 V/cm de gel est appliqué aux bornes de la cuve. A l'issue de la migration, l'ADN est visualisé sous UV à 260 nm, longueur d'onde d'absorption maximale par l'ADN et photographié. Les bandes fluorescentes correspondant aux fragments de taille attendue, sont découpées à l'aide d'un scalpel et placées dans un micro tube. L'ADN est ensuite extrait de l'agarose.

#### **V. Éluion des fragments d'ADN à partir du gel d'agarose**

La récupération des fragments d'ADN se fait en utilisant le kit Wizard SV Gel (Promega) selon le protocole du fournisseur. L'ADN est repris dans 25 µl de Nuclease Free Water et stocké à -20°C afin d'être utilisé soit pour la réaction de séquençage soit pour le clonage.

#### **VI. Clonage des fragments d'ADN**

Le clonage a pour but d'isoler des fragments d'intérêt et de reproduire en grand nombre un fragment d'ADN en vue d'obtenir sa séquence complète.

##### *VI.1. Ligation des produits d'éluion dans le vecteur pGEM-T*

Les fragments d'ADN purifiés ont été insérés par ligation dans des vecteurs plasmidiques pGEM-T à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase (Promega).

Le plasmide utilisé contient un gène de résistance à l'ampicilline et un fragment du gène de la β-D-galactosidase dont l'activation peut être induite par la présence d'IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside), cela permet d'identifier les bactéries transformées par le plasmide recombinant. Le mélange réactionnel pour la ligation est le suivant : 3 µl d'ADN du produit de PCR élué ; 1 µl de pGEM-T ; 1 µl de T4 DNA ligase et 5 µl de tampon 2X de la T4 DNA ligase. Le mélange est incubé une heure à 24°C.

### *VI.2. Transformation et sélection bactérienne*

Les vecteurs recombinés sont intégrés dans des bactéries compétentes permettant le clonage du plasmide et donc du fragment d'intérêt par multiplication bactérienne. La souche de bactérie utilisée est *NEB5-alpha* appartenant à l'espèce *Escherichia coli*. Les bactéries compétentes sont préparées et ont acquis la chimiocompétence par un traitement chimique au  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  et  $\text{MgCl}_2$ , elles peuvent être stockées pendant 3 mois à  $-80^\circ\text{C}$  (durée de compétence maximale).

Dix microlitres du produit de ligation sont introduits dans 100  $\mu\text{l}$  de solution de bactéries compétentes. Après une incubation de 20 min dans la glace, les cellules subissent un choc thermique à  $42^\circ\text{C}$  pendant 42 s avant d'être immédiatement replacées dans la glace pendant 2 min.

Les bactéries sont placées en agitation dans 900  $\mu\text{l}$  du milieu de Luria Bertani liquide (LB) à  $37^\circ\text{C}$  pendant une heure. Les bactéries sont ensuite récupérées par une centrifugation de 3 min à 900 g. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans le volume de LB résiduel dans le tube. Avant d'être étalé sur un milieu LB solide (LB liquide et Agar) contenant de l'ampicilline (100 mg/ml), on ajoute à la suspension bactérienne, 40  $\mu\text{l}$  de X-Gal 2 % (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside) et 40  $\mu\text{l}$  d'IPTG (200 mg/mL).

Les boîtes de Petri sont placées dans l'étuve toute la nuit à  $37^\circ\text{C}$ . Après incubation, Les colonies bactériennes qui apparaissent de coloration blanche ont intégré le fragment d'intérêt. L'insertion de ce dernier dans le vecteur plasmidique induit l'inactivation du gène Lac Z qui code la  $\beta$  galactosidase, cela se traduit par l'incapacité de la cellule hôte à convertir le X- Gal en un colorant bleu après exposition à l'IPTG. En conséquence, en culture et en présence d'IPTG et de X-Gal, les bactéries résistantes à l'ampicilline et transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies blanchâtres. Par contre, les bactéries résistantes à l'ampicilline et transformées par les plasmides non recombinants se présentent sous forme de colonies bleues, d'où le nom de ce crible « bleu/blanc ».

### *VI.3. Repiquage et PCR sur colonie*

Le but est d'isoler les colonies de bactéries et d'obtenir des souches pures. Au moins 10 colonies pour chaque clonage sont étalées sur un milieu LB solide (LB et Agar) contenant de l'ampicilline. Les boîtes de Petri sont placées dans l'étuve toute la nuit à  $37^\circ\text{C}$ . On effectue par la suite la PCR sur des colonies bactériennes sélectionnées afin de vérifier l'absence de faux-positifs et donc d'identifier les colonies ayant intégré le fragment d'intérêt.

Les PCR sont réalisées avec les amorces T7 (10 pMol) et SP6 (10 pMol) qui sont situées de part et d'autre du site de clonage "*polylinker*" du vecteur PGEM-T. Le mélange réactionnel

contient : 0,5 µl de chacune des amorces ; 0,5 µl de dXTP (10 mM) ; 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) ; 0,1µl de Taq polymérase et 5 µl de tampon de réaction de la Taq polymérase 10X. Le volume final est ajusté à 25 µl avec de l'eau ultra pure. On pique la colonie avec un cône que l'on introduit dans le micro tube contenant le mélange réactionnel.

Une électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose pour vérifier la taille de l'insert. La taille attendue de l'amplification est la taille du fragment d'intérêt + 170 pb liées à la position des amorces de séquençage T7 et SP6 sur le plasmide.

#### *VI.4. Extraction plasmidique*

La purification de l'ADN plasmidique, est réalisée à l'aide du kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) après la mise en culture d'une colonie bactérienne sélectionnée dans 4 ml de LB liquide additionnés de 100 mg/ml d'ampicilline durant une nuit à 37°C dans un agitateur.

#### *VI.5. Séquençage des fragments d'intérêt*

Les plasmides contenant le fragment d'intérêt et les produits de PCR purifiés ont été séquencés par la Société Cogenics Beckman Coulter Genomics. Les amorces utilisées pour la lecture des inserts sont T7 et SP6.

### **VII. Outils d'analyses bioinformatiques**

Les banques de données génétiques consultées au cours de cette étude sont GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et Barcode Of Life Data System BOLD (<http://www.boldsystems.org/views/login.php>).

La recherche de similitudes entre les séquences nucléiques dans une banque de données est réalisée par le biais d'un Blast (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, Altschul et al., 1990). Cette méthode est communément utilisée pour connaître l'origine spécifique d'une séquence. Le programme compare les séquences nucléotidiques avec les séquences disponibles dans les banques de données. Le site NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) permet l'utilisation de cette application en accès libre.

Les électrophorégrammes sont édités dans le programme MEGA 5.05 (**M**olecular **E**volutionary **G**enetic **A**nalysis). Des alignements ont été réalisés. Dans un premier temps, cela facilite la détection d'artefacts (par exemple les insertions et les délétions) et de pics anormaux sur les chromatogrammes et permet de comparer les séquences entre elles. Ces dernières sont traitées avec les paramètres par défaut de Clustal W (Chenna et al., 2003) intégrés au programme MEGA suivi d'une vérification par lecture à l'œil.

Les relations entre individus et/ou espèces (Tableau 8) sont visualisées via la construction d'arbres avec les gènes 16S et 18S par la méthode du maximum de vraisemblance (ML).



Cette méthode recherche l'arbre phylogénétique dont la topologie est la plus vraisemblable étant donné les séquences nucléotidiques des unités taxonomiques et le modèle d'évolution des séquences nucléotidiques choisi. Ce modèle d'évolution a été déterminé à l'aide du logiciel ModelGenerator qui évalue et désigne le modèle de substitution nucléotidique optimal parmi 56 modèles testés, compte tenu des données observées. ModelGenerator utilise le critère d'information Akaike (AIC) et le critère d'information bayésien (BIC) pour sélectionner le modèle de substitution adéquat. La méthode du maximum de vraisemblance, utilisée pour la construction des arbres, est considérée comme une méthode de reconstruction phylogénétique des plus fiables particulièrement adaptée et robuste. Elle présente l'avantage de se placer dans un cadre statistique bien défini qui permet, par un ensemble de tests, l'évaluation d'hypothèses alternatives quant aux modalités d'évolution des séquences et aux phylogénies sous-jacentes (Delsuc et Douzery, 2004). C'est une méthode peu sensible aux artefacts mais elle demande beaucoup de temps pour le calcul. La construction des arbres est effectuée grâce au logiciel MEGA. La significativité statistique des branches a été évaluée avec un test de robustesse des reconstructions phylogénétiques à l'aide de la méthode de bootstrap avec 1000 répliquas.

**Tab.8. Les espèces utilisées dans cette étude pour construire des arbres phylogénétiques avec les gènes 16S et 18S**

<b>Ordre</b>	<b>Espèce</b>	<b>Nombre d'individu</b>	<b>Bassin de prélèvement</b>
Calanoida	<i>Paracartia grani</i>	4	A5
Cyclopoida	<i>Oithona nana</i>	5	A5
	<i>Oithona similis</i>	3	A5
Harpacticoida	<i>Clytemnestra scutellata</i>	3	A5
	<i>Bryocamptus</i> sp.	2	C41
	<i>Mesochra lilljeborgi</i>	2	C41
Anostraca	<i>Artemia salina</i>	5	M2

Afin d'enraciner ces arbres (placer les données dans un contexte historique et géographique), les séquences de 16S et 18S existant préalablement pour *Artemia salina* (Tableau 9) et pour les espèces de copépodes proches (Tableau 10) ont été récupérées sur GenBank.

**Tab.9. Liste des numéros d'accèsion à GenBank des séquences de 18S et 16S d'*A. salina* disponibles dans GenBank**

Espèce	Localisation	N° d'accèsion à GenBank	
		18S	16S
<i>Artemia salina</i>	Sfax, Méditerrané	gi 77963947 gi 77963950	gi 222092950
	Italie	gi 77963949	gi 222092953
	Chypre	gi 77963954	gi 222092952
		gi 77963953	gi 222092951
	Égypte	gi 77963951	
		gi 77963952	
Saline, Afrique du Sud	gi 222457874	gi 222092949	

Les espèces de copépodes voisines présentes dans GenBank utilisées dans cette étude pour établir l'arbre phylogénétique avec le 18S sont présentes dans le tableau ci-dessous :

**Tab.10. Liste des numéros d'accèsion à GenBank des séquences de 18S des copépodes disponibles dans GenBank**

Ordre	Espèce	Localisation	N° d'accèsion à GenBank
Calanoida	<i>Acartia longiremis</i>	Suède	gi 295443363
	<i>Acartia pacifica</i>	Non définie	gi 295443364
	<i>Acartia negligens</i>	Non définie	gi 295443405
	<i>Acartia danae</i>	Non définie	gi 295443404
	<i>Acartia hongii</i>	Non définie	gi 295443402
	<i>Acartia omorii</i>	Non définie	gi 295443403
	<i>Acartia tonsa</i>	USA	gi 213159410
	<i>Acartia tonsa</i>	USA	gi 310769934
	<i>Acartia tonsa</i>	USA	gi 310769935
Cyclopoida	<i>Oithona</i> sp.	USA	gi 291297517
	<i>Oithona</i> sp.	Nouvelle Calédonie	gi 356471528
	<i>Oithona</i> sp.	Nouvelle Calédonie	gi 356471529
	<i>Oithona nana</i>	Brésil	gi 319998059
	<i>Paracyclopina nana</i>	Corée	gi 208502869
	<i>Oithona simplex</i>	Brésil	gi 319998060
	<i>Oithona hebes</i>	Brésil	gi 319998058
	<i>Dioithona oculata</i>	Bélize	gi 319998057
<i>Oithona similis</i>	Non définie	gi 295443386	
Harpacticoida	<i>Bryocamptus pygmaeus</i>	Angleterre	gi 54401784
	<i>Attheyella crassa</i>	Angleterre	gi 170601576
	<i>Itunella muelleri</i>	Islande	gi 170601584
	<i>Mesochra rapiens</i>	Suède	gi 170601580
	<i>Tisbe</i> sp.	USA	gi 261824306

Les indices standards [diversité génétique, nombre de sites polymorphes (nombre et distribution des substitutions nucléotidiques)] et les indices moléculaires intra-populationnels (diversité nucléotidique, nombre moyen de différences nucléotidiques par site entre deux séquences) ont été calculés en utilisant le programme Arlequin Ver 3.11 (Excoffier, 2007) afin d'étudier la structure génétique des populations.

La diversité nucléotidique ( $\pi$ ) mesure la divergence nucléotidique moyenne entre toutes les paires de séquences (Tajima, 1983). Elle définit la probabilité que deux gènes tirés au hasard dans un échantillon soient différents au niveau d'un nucléotide donné.

La diversité génétique inter-populationnelle est appréhendée par l'indice de fixation  $F_{st}$ . Cet indice, appelé aussi indice de différenciation, permet d'évaluer la différenciation par paire de populations à partir du polymorphisme génétique. Il est testé par une procédure non-paramétrique de permutation de gènes entre populations comme décrit dans le logiciel Arlequin.HA

Le logiciel NETWORK 4.6.1.1 (disponible à [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) a été utilisé pour construire les réseaux de relations haplotypiques. "Un haplotype" correspond à une séquence nucléotidique, qui peut être commune à plusieurs individus, mais diffère des autres haplotypes par une ou plusieurs substitution de nucléotides. Cette méthode produit une estimation de la plausibilité des liens entre les haplotypes et permet de distinguer l'haplotype qui présente la plus forte probabilité d'être la forme initiale dans le réseau en se basant sur sa position relative et le nombre d'individus qui le présentent dans le réseau.

Dans les représentations obtenues avec ce logiciel, chaque cercle correspond à un haplotype ; la taille de ces cercles est proportionnelle à la fréquence relative de l'haplotype dans le jeu de données. La longueur des segments entre chaque haplotype est proportionnelle au nombre de mutations qui les sépare. Chaque nœud symbolise un haplotype hypothétique non détecté durant l'étude mais nécessaire à la construction du réseau (haplotypes manquants dans l'échantillonnage ou perdus par dérive au cours de l'évolution).

La distribution des différences par paire (*mismatch distribution*) a été calculée à l'aide du logiciel NETWORK. Cette distribution repose sur le principe suivant : plus deux séquences ont divergé depuis longtemps, plus la différence de nombre de sites polymorphes entre les deux sera grande. Cela permet d'estimer une soudaine expansion démographique ou spatiale. Avec le COI, la divergence inter-spécifique entre les copépodes Calanoida *Sinodiaptomus sarsi* et *Sinodiaptomus valkanovi* est de l'ordre de 23-26 %, en revanche la divergence intra-spécifique est beaucoup plus faible (2,4 - 4,1 % et s'élève à 5,7 % chez *Sinodiaptomus sarsi* et *Sinodiaptomus valkanovi*, respectivement) (Makino et al., 2010).

Les différences entre les haplotypes permettent aussi de détecter la présence d'espèces cryptiques. On appelle espèces cryptiques des espèces qui, sur le plan morphologique, ne présentent aucune différence permettant de les distinguer, mais qui, d'un point de vue génétique, révèlent des différences notables grâce aux études des séquences d'ADN.

## **C. Résultats**

### **I. Caractérisation phylogénétique des communautés zooplanctoniques**

#### *I.1. Étude phylogénétique de populations d'Artemia salina* prélevé de M2

##### I.1.a. Avec un fragment du gène 18S

Cinq séquences d'un fragment du gène codant l'ARN ribosomal 18S d'une longueur de 1430 pb ont été amplifiées pour *A. salina* prélevé de la saline de Sfax. L'alignement de ces séquences est présenté dans la figure 18. Ces séquences sont composées de 16,57 % de C, 29,27 % de T, 26,12 % de A et 28,05 % de G. Au niveau de ces séquences, 8 sites variables ont été observés. Les substitutions nucléotidiques comprennent 5 transitions et 3

transversions. Ces substitutions nucléotidiques suivent le modèle F81 (Felsenstein, 1981) qui suppose un taux variable pour les 4 types de nucléotides et un taux égal pour les transitions et les transversions.

Asm134 TCGTGGTGTGGTTGAAAGTTGTTCAAACCTTGATCCTTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACA  
Asm135 TCGTGGTGTGGTTGAAAGTTGTTCAAACCTTGATCCTTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACA  
Asm142 TCGTGGTGTGGTTGAAAGTTGTTCAAACCTTGATCCTTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACA  
Asm138 TCGTGGTGTGGTTGAAAGTTGTTCAAACCTTGATCCTTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACA  
Asm140 TCGTGGTGTGGTTGAAAGTTGTTCAAACCTTGATCCTTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACA  
\*\*\*\*\*  
Asm134 AGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGATAGACAAGAGGAAGGCT  
Asm135 AGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGATAGACAAGAGGAAGGCT  
Asm142 AGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGATAGACAAGAGGAAGGCT  
Asm138 AGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGATAGACAAGAGGAAGGCT  
Asm140 AGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGTTTGATAGACAAGAGGAAGGCT  
\*\*\*\*\*  
Asm134 CTTGGCCCTGTGGTCAGTAGTTTATTCCAATTGTTGCTATTGAATCACGTCCCAATGTT  
Asm135 CTTGGCCCTGTGGTCAGTAGTTTATTCCAATTGTTGCTATTGAATCACGTCCCAATGTT  
Asm142 CTTGGCCCTGTGGTCAGTAGTTTATTCCAATTGTTGCTATTGAATCACGTCCCAATGTT  
Asm138 CTTGGCCCTGTGGTCAGTAGTTTATTCCAATTGTTGCTATTGAATCACGTCCCAATGTT  
Asm140 CTTGGCCCTGTGGTCAGTAGTTTATTCCAATTGTTGCTATTGAATCACGTCCCAATGTT  
\*\*\*\*\*  
Asm134 TGATGTTTTGAGGTGCACAAGTAGGAATTTGATAAAGGTGTTGAGTACCCCTTGTGCA  
Asm135 TGATGTTTTGAGGTGCACAAGTAGGAATTTGATAAAGGTGTTGAGTACCCCTTGTGCA  
Asm142 TGATGTTTTGAGGTGCACAAGTAGGAATTTGATAAAGGTGTTGAGTACCCCTTGTGCA  
Asm138 TGATGTTTTGAGGTGCACAAGTAGGAATTTGATAAAGGTGTTGAGTACCCCTTGTGCA  
Asm140 TGATGTTTTGAGGTGCACAAGTAGGAATTTGATAAAGGTGTTGAGTACCCCTTGTGCA  
\*\*\*\*\*  
Asm134 ACATCATTGATTGGGGCAATTCGTTGAACAAAGGAGTGCTCAACAAGTGATACCCGAGGA  
Asm135 ACATCATTGATTGGGGCAATTCGTTGAACAAAGGAGTGCTCAACAAGTGATACCCGAGGA  
Asm142 ACATCATTGATTGGGGCAATTCGTTGAACAAAGGAGTGCTCAACAAGTGATACCCGAGGA  
Asm138 ACATCATTGATTGGGGCAATTCGTTGAACAAAGGAGTGCTCAACAAGTGATACCCGAGGA  
Asm140 ACATCATTGATTGGGGCAATTCGTTGAACAAAGGAGTGCTCAACAAGTGATACCCGAGGA  
\*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*  
Asm134 ATGGGGCTTTGAGGCAGTTTTTGTGGTGAATTGCCTTAAAGTTGTTTGGTTCATTACTC  
Asm135 ATGGGGCTTTGAGGCAGTTTTTGTGGTGAATTGCCTTAAAGTTGTTTGGTTCATTACTC  
Asm142 ATGGGGCTTTGAGGCAGTTTTTGTGGTGAATTGCCTTAAAGTTGTTTGGTTCATTACTC  
Asm138 ATGGGGCTTTGAGGCAGTTTTTGTGGTGAATTGCCTTAAAGTTGTTTGGTTCATTACTC  
Asm140 ATGGGGCTTTGAGGCAGTTTTTGTGGTGAATTGCCTTAAAGTTGTTTGGTTCATTACTC  
\*\*\*\*\*  
Asm134 ATTGAGAAATGGTAAAGACCATTGGATTGAGGAACCTGAAATTTGGCTCTGACTGAGGGC  
Asm135 ATTGAGAAATGGTAAAGACCATTGGATTGAGGAACCTGAAATTTGGCTCTGACTGAGGGC  
Asm142 ATTGAGAAATGGTAAAGACCATTGGATTGAGGAACCTGAAATTTGGCTCTGACTGAGGGC  
Asm138 ATTGAGAAATGGTAAAGACCATTGGATTGAGGAACCTGAAATTTGGCTCTGACTGAGGGC  
Asm140 ATTGAGAAATGGTAAAGACCATTGGATTGAGGAACCTGAAATTTGGCTCTGACTGAGGGC  
\*\*\*\*\*  
Asm134 TCTCAGAGGAGTAGAGCATGCAAAGCCTTTGAATCAAGTAAGCCAATGGAATTAAGGTA  
Asm135 TCTCAGAGGAGTAGAGCATGCAAAGCCTTTGAATCAAGTAAGCCAATGGAATTAAGGTA  
Asm142 TCTCAGAGGAGTAGAGCATGCAAAGCCTTTGAATCAAGTAAGCCAATGGAATTAAGGTA  
Asm138 TCTCAGAGGAGTAGAGCATGCAAAGCCTTTGAATCAAGTAAGCCAATGGAATTAAGGTA  
Asm140 TCTCAGAGGAGTAGAGCATGCAAAGCCTTTGAATCAAGTAAGCCAATGGAATTAAGGTA  
\*\*\*\*\*  
Asm134 CTTTATGTAGAGATGAGCCAACACTGAGGTGATTGTTGTTGCCCCAGCAGCATATCCCTTT  
Asm135 CTTTATGTAGAGATGAGCCAACACTGAGGTGATTGTTGTTGCCCCAGCAGCATATCCCTTT  
Asm142 CTTTATGTAGAGATGAGCCAACACTGAGGTGATTGTTGTTGCCCCAGCAGCATATCCCTTT  
Asm138 CTTTATGTAGAGATGAGCCAACACTGAGGTGATTGTTGTTGCCCCAGCAGCATATCCCTTT  
Asm140 CTTTATGTAGAGATGAGCCAACACTGAGGTGATTGTTGTTGCCCCAGCAGCATATCCCTTT  
\*\*\*\*\*  
Asm134 TGGGGGCCACGAGATGATAAAGTGGTTTTGTCTCTCAAGGTCTTAGTGTCTGTATTCC  
Asm135 TGGGGGCCACGAGATGATAAAGTGGTTTTGTCTCTCAAGGTCTTAGTGTCTGTATTCC  
Asm142 TGGGGGCCACGAGATGATAAAGTGGTTTTGTCTCTCAAGGTCTTAGTGTCTGTATTCC  
Asm138 TGGGGGCCACGAGATGATAAAGTGGTTTTGTCTCTCAAGGTCTTAGTGTCTGTATTCC  
Asm140 TGGGGGCCACGAGATGATAAAGTGGTTTTGTCTCTCAAGGTCTTAGTGTCTGTATTCC  
\*\*\*\*\*  
Asm134 ATTAGAGGATAATGGGAATGGGTGTTTGGCAGCAATAAGAGACTGGATCTTGCTCTGTA  
Asm135 ATTAGAGGATAATGGGAATGGGTGTTTGGCAGCAATAAGAGACTGGATCTTGCTCTGTA  
Asm142 ATTAGAGGATAATGGGAATGGGTGTTTGGCAGCAATAAGAGACTGGATCTTGCTCTGTA  
Asm138 ATTAGAGGATAATGGGAATGGGTGTTTGGCAGCAATAAGAGACTGGATCTTGCTCTGTA  
Asm140 ATTAGAGGATAATGGGAATGGGTGTTTGGCAGCAATAAGAGACTGGATCTTGCTCTGTA  
\*\*\*\*\*  
Asm134 GTGGAGGGCTCACTGAGGAATTGAGCACGCAAAAGCTTGTGGATAAGTCTTGAGTTGTTGT  
Asm135 GTGGAGGGCTCACTGAGGAATTGAGCACGCAAAAGCTTGTGGATAAGTCTTGAGTTGTTGT  
Asm142 GTGGAGGGCTCACTGAGGAATTGAGCACGCAAAAGCTTGTGGATAAGTCTTGAGTTGTTGT  
Asm138 GTGGAGGGCTCACTGAGGAATTGAGCACGCAAAAGCTTGTGGATAAGTCTTGAGTTGTTGT  
Asm140 GTGGAGGGCTCACTGAGGAATTGAGCACGCAAAAGCTTGTGGATAAGTCTTGAGTTGTTGT  
\*\*\*\*\*  
Asm134 GGGGCCAAAATCCATACACAATTTGAATAGTGGAAACATCAGAATGCTAGCACTGTGGTTA  
Asm135 GGGGCCAAAATCCATACACAATTTGAATAGTGGAAACATCAGAATGCTAGCACTGTGGTTA  
Asm142 GGGGCCAAAATCCATACACAATTTGAATAGTGGAAACATCAGAATGCTAGCACTGTGGTTA  
Asm138 GGGGCCAAAATCCATACACAATTTGAATAGTGGAAACATCAGAATGCTAGCACTGTGGTTA  
Asm140 GGGGCCAAAATCCATACACAATTTGAATAGTGGAAACATCAGAATGCTAGCACTGTGGTTA  
\*\*\*\*\*  
Asm134 GTTGCTGCCCCAGCAACATTTTGGGGATGGGGGCCACGAGACAATCACTGGGTATTGT  
Asm135 GTTGCTGCCCCAGCAACATTTTGGGGATGGGGGCCACGAGACAATCACTGGGTATTGT

```

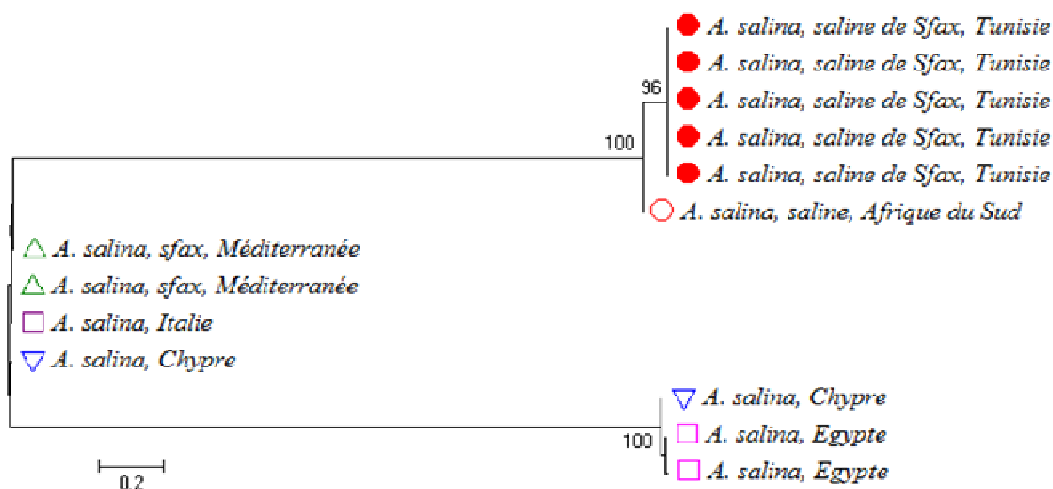
Asm142 GTTGCTGCCCCAGCAACATTTTGGGGATGGGGGCCACGAGACAATCACTGGGTATTGT
Asm138 GTTGCTGCCCCAGCAACATTTTGGGGATGGGGGCCACGAGACAATCACTGGGTATTGT
Asm140 GTTGCTGCCCCAGCAACATTTTGGGGATGGGGGCCACGAGACAATCACTGGGTATTGT
*****
Asm134 CTCGAGGCTCTGGTGTCTGTATTCCATTAGAGGATAGGAATGAATGTTTTGGAAGCAATA
Asm135 CTCGAGGCTCTGGTGTCTGTATTCCATTAGAGGATAGGAATGAATGTTTTGGAAGCAATA
Asm142 CTCGAGGCTCTGGTGTCTGTATTCCATTAGAGGATAGGAATGAATGTTTTGGAAGCAATA
Asm138 CTCGAGGCTCTGGTGTCTGTATTCCATTAGAGGATAGGAATGAATGTTTTGGAAGCAATA
Asm140 CTCGAGGCTCTGGTGTCTGTATTCCATTAGAGGATAGGAATGAATGTTTTGGAAGCAATA
*****
Asm134 AGAGATTGTATCCTGCTCTGTAGTGGGGCTCATTGAGGAATTGAGCATGCAAAGCTTGC
Asm135 AGAGATTGTATCCTGCTCTGTAGTGGGGCTCATTGAGGAATTGAGCATGCAAAGCTTGC
Asm142 AGAGATTGTATCCTGCTCTGTAGTGGGGCTCATTGAGGAATTGAGCATGCAAAGCTTGC
Asm138 AGAGATTGTATCCTGCTCTGTAGTGGGGCTCATTGAGGAATTGAGCATGCAAAGCTTGC
Asm140 AGAGATTGTATCCTGCTCTGTAGTGGGGCTCATTGAGGAATTGAGCATGCAAAGCTTGC
*****
Asm134 GATGCATCTTGAGTTGTTATAGGGCCAAAAGTTTATGCCAACTTTAATAATGGACATCAG
Asm135 GATGCATCTTGAGTTGTTATAGGGCCAAAAGTTTATGCCAACTTTAATAATGGACATCAG
Asm142 GATGCATCTTGAGTTGTTATAGGGCCAAAAGTTTATGCCAACTTTAATAATGGACATCAG
Asm138 GATGCATCTTGAGTTGTTATAGGGCCAAAAGTTTATGCCAACTTTAATAATGGACATCAG
Asm140 GATGCATCTTGAGTTGTTATAGGGCCAAAAGTTTATGCCAACTTTAATAATGGACATCAG
*****
Asm134 ATTAAGCATTGTGGTTAGTTGCTGCCCCAGCAACATTTGTTGGATAGGGGCCCGGGAA
Asm135 ATTAAGCATTGTGGTTAGTTGCTGCCCCAGCAACATTTGTTGGATAGGGGCCCGGGAA
Asm142 ATTAAGCATTGTGGTTAGTTGCTGCCCCAGCAACATTTGTTGGATAGGGGCCCGGGAA
Asm138 ATTAAGCATTGTGGTTAGTTGCTGCCCCAGCAACATTTGTTGGATAGGGGCCCGGGAA
Asm140 ATTAAGCATTGTGGTTAGTTGCTGCCCCAGCAACATTTGTTGGATAGGGGCCCGGGAA
*****
Asm134 GCACCTCTTACCCTTCCCTGAGGGCCCAAGTGGTGAAGACGAAGGGATTGGCTTGGTCAA
Asm135 GCACCTCTTACCCTTCCCTGAGGGCCCAAGTGGTGAAGACGAAGGGATTGGCTTGGTCAA
Asm142 GCACCTCTTACCCTTCCCTGAGGGCCCAAGTGGTGAAGACGAAGGGATTGGCTTGGTCAA
Asm138 GCACCTCTTACCCTTCCCTGAGGGCCCAAGTGGTGAAGACGAAGGGATTGGCTTGGTCAA
Asm140 GCACCTCTTACCCTTCCCTGAGGGCCCAAGTGGTGAAGACGAAGGGATTGGCTTGGTCAA
*****
Asm134 AAGAGAGGCGCGTGAAGTCCCTCAGGTGAGCCAAAAGTCTTGCATGCGATTGCACTAATGTA
Asm135 AAGAGAGGCGCGTGAAGTCCCTCAGGTGAGCCAAAAGTCTTGCATGCGATTGCACTAATGTA
Asm142 AAGAGAGGCGCGTGAAGTCCCTCAGGTGAGCCAAAAGTCTTGCATGCGATTGCACTAATGTA
Asm138 AAGAGAGGCGCGTGAAGTCCCTCAGGTGAGCCAAAAGTCTTGCATGCGATTGCACTAATGTA
Asm140 AAGAGAGGCGCGTGAAGTCCCTCAGGTGAGCCAAAAGTCTTGCATGCGATTGCACTAATGTA
*****
Asm134 GCATCGATTTTGCAAGCAATAAGCTAACATGCTCTTGAAATCTTGATGTATATTTCTAC
Asm135 GCATCGATTTTGCAAGCAATAAGCTAACATGCTCTTGAAATCTTGATGTATATTTCTAC
Asm142 GCATCGATTTTGCAAGCAATAAGCTAACATGCTCTTGAAATCTTGATGTATATTTCTAC
Asm138 GCATCGATTTTGCAAGCAATAAGCTAACATGCTCTTGAAATCTTGATGTATATTTCTAC
Asm140 GCATCGATTTTGCAAGCAATAAGCTAACATGCTCTTGAAATCTTGATGTATATTTCTAC
*****
Asm134 GTGTTAAATTCGTAGTGAATAATAGTCTTTTGGGGACTAGAATGGCTCTGTGATTCAAGG
Asm135 GTGTTAAATTCGTAGTGAATAATAGTCTTTTGGGGACTAGAATGGCTCTGTGATTCAAGG
Asm142 GTGTTAAATTCGTAGTGAATAATAGTCTTTTGGGGACTAGAATGGCTCTGTGATTCAAGG
Asm138 GTGTTAAATTCGTAGTGAATAATAGTCTTTTGGGGACTAGAATGGCTCTGTGATTCAAGG
Asm140 GTGTTAAATTCGTAGTGAATAATAGTCTTTTGGGGACTAGAATGGCTCTGTGATTCAAGG
*****
Asm134 ATCATGGATACCATTCGCAAGACTAAAGGGAGTGAAGGTGAGCTTGCCCCAATATAGCA
Asm135 ATCATGGATACCATTCGCAAGACTAAAGGGAGTGAAGGTGAGCTTGCCCCAATATAGCA
Asm142 ATCATGGATACCATTCGCAAGACTAAAGGGAGTGAAGGTGAGCTTGCCCCAATATAGCA
Asm138 ATCATGGATACCATTCGCAAGACTAAAGGGAGTGAAGGTGAGCTTGCCCCAATATAGCA
Asm140 ATCATGGATACCATTCGCAAGACTAAAGGGAGTGAAGGTGAGCTTGCCCCAATATAGCA
*****
Asm134 TGGCTTGAGGTGTGCAAGGGTGCAATTGCATTGGCCTTGTGTTGAGGGAA
Asm135 TGGCTTGAGGTGTGCAAGGGTGCAATTGCATTGGCCTTGTGTTGAGGGAA
Asm142 TGGCTTGAGGTGTGCAAGGGTGCAATTGCATTGGCCTTGTGTTGAGGGAA
Asm138 TGGCTTGAGGTGTGCAAGGGTGCAATTGCATTGGCCTTGTGTTGAGGGAA
Asm140 TGGCTTGAGGTGTGCAAGGGTGCAATTGCATTGGCCTTGTGTTGAGGGAA
*****

```

**Fig.18. Alignement des séquences de 18S d'*A. salina* prélevé du bassin M2 (En gris les sites variables)**

Ces séquences sont identiques à 99 % avec l'ensemble des *A. salina* disponible dans les banques de données nucléotidiques. Ces séquences et celles isolées chez d'autres *A. salina* (8 séquences disponibles dans les banques des gènes, Tableau 9) ont été utilisées dans une comparaison phylétique. Seul ce marqueur offre suffisamment de séquences d'origines géographiques différentes pour permettre cette approche. Un arbre a été établi en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Figure 19). Les séquences analysées (Tableau 9) ici sont issues d'échantillons provenant de zones géographiquement proches en Méditerranée

(Chypre, Égypte, Italie et Tunisie) mais de salinité non définie ou d'un milieu écologiquement proche (milieu hypersalin), celui de la saline de Swartkops en Afrique du Sud.



**Fig.19. Arbre de maximum de vraisemblance construit avec les séquences d'un fragment du gène 18S illustrant les relations existantes entre les haplotypes identifiés au sein des échantillons d'*A. salina* de la saline de Sfax prélevé du bassin M2 (pictogrammes pleins) et ceux disponibles dans GenBank (pictogrammes vides). Les valeurs de « bootstraps » supérieures à 60 % sont indiquées à côté de chaque embranchement concerné**

Cette figure souligne que les populations d'*A. salina* de la mer Méditerranée sont répartie en 2 groupes clairement identifiés, l'un d'entre eux limité à l'extrémité orientale de la mer Méditerranée, l'autre présent sur l'ensemble de la mer Méditerranée, bassin oriental comme bassin occidental. En ce qui concerne les résultats d'*A. salina* prélevés dans la saline, ils constituent une branche indépendante des résultats obtenus sur les échantillons de la même espèce potentiellement prélevés dans des milieux de salinité différente de celle du bassin M2. Par contre, ils sont génétiquement proches de ce qui a été obtenu à partir d'échantillons prélevés dans une saline géographiquement très éloignée.

#### I.1.b. Avec un fragment du gène 16S

Les séquences d'un fragment du gène 16S de 5 individus d'*A. salina* (Figure 20) ont été amplifiées par PCR et séquencées. Ces séquences possèdent une longueur de 369 pb et ont une composition nucléotidique de 24,67 % de C, 29,67 % de T, 25,11 % de A et 20,54 % de G. Les séquences « 16S » d'*A. salina* ont permis de décrire 3 sites variables. Les substitutions nucléotidiques comprennent 3 transitions et 2 transversions. Selon l'analyse réalisée à l'aide du logiciel ModelGenerator, les substitutions nucléotidiques observées suivent un modèle Jukes-Cantor (1969) qui suppose un taux équivalent pour les 4 types de nucléotides ainsi qu'un taux identique pour chaque type de mutation observé.

Asm12	CAACATCGAGGTCGCAAGCTCTTTTGTGCGATTGGGACTCTCAAAAAGAATTACGCTGTTA
Asm50	CAACATCGAGGTCGCAAGCTCTTTTGTGCGATTGGGACTCTCAAAAAGAATTACGCTGTTA
Asf11	CAACATCGAGGTCGCAAGCTCTTTTGTGCGATTGGGACTCTCAAAAAGAATTACGCTGTTA
Asf10	CAACATCGAGGTCGCAAGCTCTTTTGTGCGATTGGGACTCTCAAAAAGAATTACGCTGTTA
Asm52	CAACATCGAGGTCGCAAGCTCTTTTGTGCGATTGGGACTCTCAAAAAGAATTACGCTGTTA
*****	
Asm12	TCCCTAAGGTAACCTTGCTCTATGTTTCATCTAAGGATCAACGATCATTTATGAATGTTAAT
Asm50	TCCCTAAGGTAACCTTGCTCTATGTTTCATCTAAGGATCAACGATCATTTATGAATGTTAAT
Asf11	TCCCTAAGGTAACCTTGCTCTATGTTTCATCTAAGGATCAACGATCATTTATGAATGTTAAT
Asf10	TCCCTAAGGTAACCTTGCTCTATGTTTCATCTAAGGATCAACGATCATTTATGAATGTTAAT
Asm52	TCCCTAAGGTAACCTTGCTCTATGTTTCATCTAAGGATCAACGATCATTTATGAATGTTAAT
*****	
Asm12	GGGTCGCTGGTGTGTTGTTCTTCTCCCGGGTCGCCCAACCTAACATTGCCCCCTTCAGT
Asm50	GGGTCGCTGGTGTGTTGTTCTTCTCCCGGGTCGCCCAACCTAACATTGCCCCCTTCAGT
Asf11	GGGTCGCTGGTGTGTTGTTCTTCTCCCGGGTCGCCCAACCTAACATTGCCCCCTTCAGT
Asf10	GGGTCGCTGGTGTGTTGTTCTTCTCCCGGGTCGCCCAACCTAACATTGCCCCCTTCAGT
Asm52	GGGTCGCTGGTGTGTTGTTCTTCTCCCGGGTCGCCCAACCTAACATTGCCCCCTTCAGT
*****	
Asm12	TTAGTTACTTGCCGATAAACCGAAGGGTAGAATGTAAGATCTATAGGGTCTTATCGCCC
Asm50	TTAGTTACTTGCCGATAAACCGAAGGGTAGAATGTAAGATCTATAGGGTCTTATCGCCC
Asf11	TTAGTTACTTGCCGATAAACCGAAGGGTAGAATGTAAGATCTATAGGGTCTTATCGCCC
Asf10	TTAGTTACTTGCCGATAAACCGAAGGGTAGAATGTAAGATCTATAGGGTCTTATCGCCC
Asm52	TTAGTTACTTGCCGATAAACCGAAGGGTAGAATGTAAGATCTATAGGGTCTTATCGCCC
*****	
Asm12	TCCAAGAGCATTAAAGCTTTTTCACCTAAAAATTAACCTTCGGTTTAATGGGGGAGACAGG
Asm50	TCCAAGAGCATTAAAGCTTTTTCACCTAAAAATTAACCTTCGGTTTAATGGGGGAGACAGG
Asf11	TCCAAGAGCATTAAAGCTTTTTCACCTAAAAATTAACCTTCGGTTTAATGGGGGAGACAGG
Asf10	TCCAAGAGCATTAAAGCTTTTTCACCTAAAAATTAACCTTCGGTTTAATGGGGGAGACAGG
Asm52	TCCAAGAGCATTAAAGCTTTTTCACCTAAAAATTAACCTTCGGTTTAATGGGGGAGACAGG
*****	
Asm12	CCGCCTCTCGTCAGACCCTTCATTCCAGCCCCAATCGAGGGGCTAATGATTATGCTACC
Asm50	CCGCCTCTCGTCAGACCCTTCATTCCAGCCCCAATCGAGGGGCTAATGATTATGCTACC
Asf11	CCGCCTCTCGTCAGACCCTTCATTCCAGCCCCAATCGAGGGGCTAATGATTATGCTACC
Asf10	CCGCCTCTCGTCAGACCCTTCATTCCAGCCCCAATCGAGGGGCTAATGATTATGCTACC
Asm52	CCGCCTCTCGTCAGACCCTTCATTCCAGCCCCAATCGAGGGGCTAATGATTATGCTACC
*****	
Asm12	TTGCACA
Asm50	TTGCACA
Asf11	TTGCACA
Asf10	TTAGCACA
Asm52	TTAGCACA
	** *****

Fig.20. Alignement des séquences de 16S d'*A. salina* prélevé du bassin M2 (En gris les sites variables)

L'arbre phylogénétique construit avec le marqueur « 16S » (Figure 21) permet l'analyse des relations phylétiques entre les séquences d'*A. salina* de la saline de Sfax et ceux prélevés d'autres zones géographiques présentes dans la banque des gènes dont les N° d'accion sont présents dans le tableau 9.

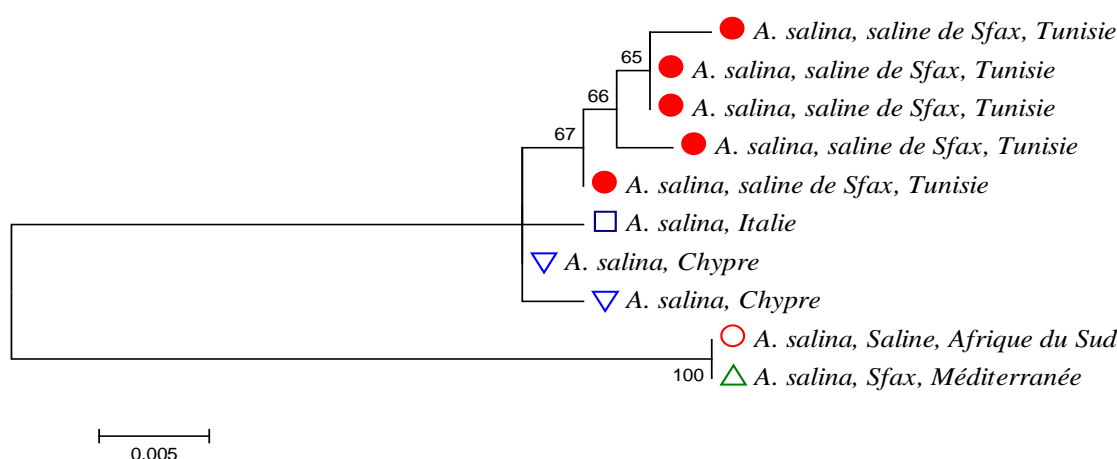


Fig.21. Arbre du maximum de vraisemblance construit avec le marqueur génétique 16S illustrant les relations existantes entre les haplotypes identifiés au sein des échantillons d'*A. salina* de la saline de Sfax prélevé du bassin M2 (pictogrammes pleins) et ceux disponibles dans GenBank (pictogrammes vides). Les valeurs de « bootstraps » supérieures à 60 % sont indiquées à côté de chaque embranchement concerné

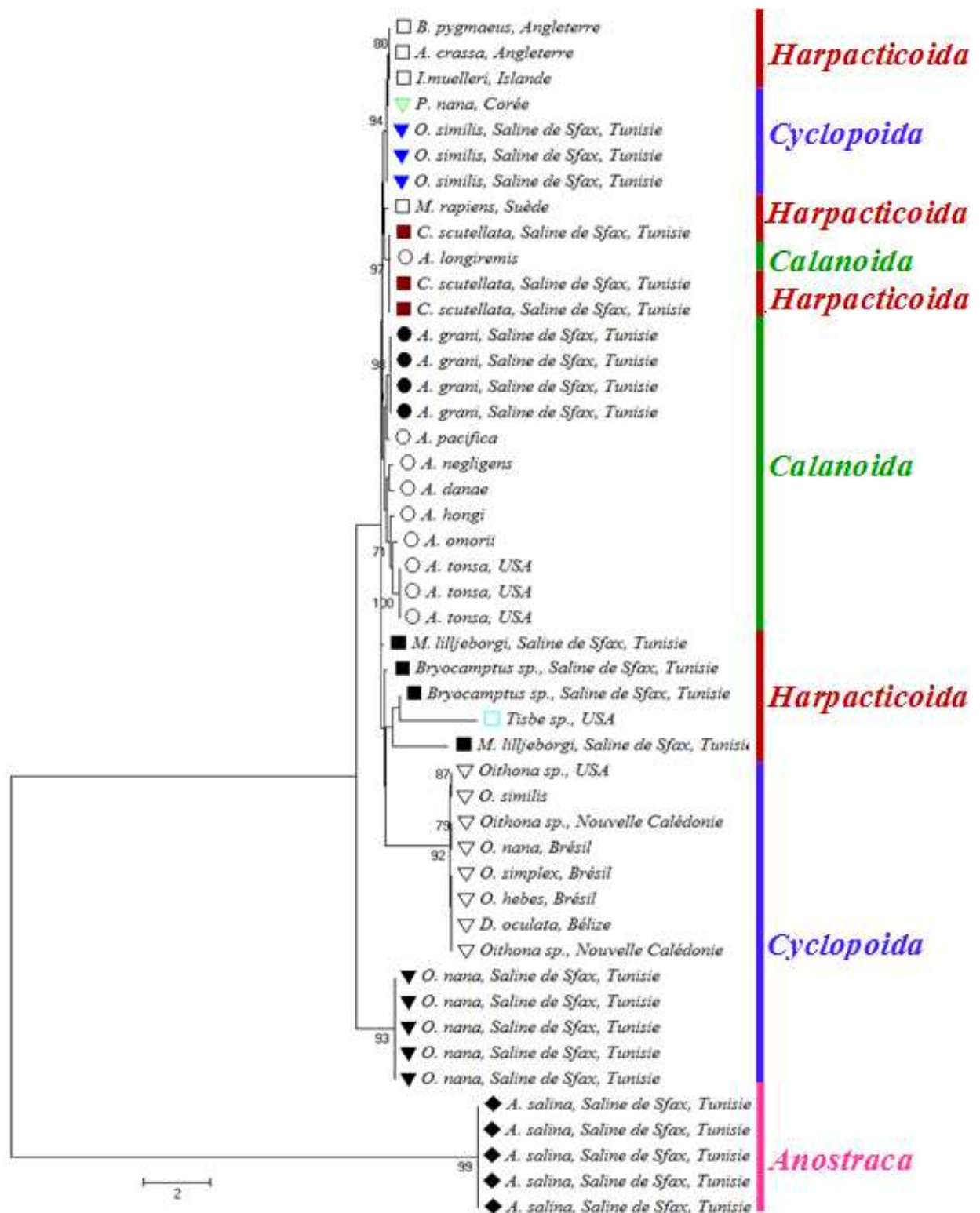


Avec ce marqueur, on remarque que les *A. salina* de la saline de Sfax sont regroupés ensemble. Ils constituent une branche indépendante des résultats obtenus sur les échantillons de la même espèce qu'ils soient prélevés en pleine mer Méditerranée (Chypre, Italie et Tunisie) ou bien d'une autre saline géographiquement éloignée en Afrique du Sud. Cependant, cette relation phylétique n'est pas significative au vu du test du bootstrap, puisque cet embranchement présente une valeur de bootstrap inférieure à 60 %.

### *1.2. Étude phylogénétique des copépodes*

Les séquences partielles du gène codant l'ARN ribosomal 18S de 24 individus du groupe de copépodes (Tableau 8) ont été amplifiées par PCR et séquencées.

Les relations phylétiques entre les différents haplotypes de copépodes étudiés et l'ensemble des espèces voisines disponibles dans les banques de données (Tableau 10) sont illustrées selon la méthode du maximum de vraisemblance sur la figure 22. Les artémies sont ici considérées comme groupe externe afin d'enraciner l'arbre puisqu'ils n'appartiennent pas à la sous classe des copépodes.



**Fig.22. Arbre du maximum de vraisemblance construit avec le 18S illustrant les relations existantes entre les haplotypes identifiés au sein des échantillons de copépodes et d'artémie et les espèces voisines**

Les pictogrammes pleins correspondent aux différentes séquences des individus échantillonnés de la saline de Sfax. Les pictogrammes vides correspondent aux différentes séquences récupérées sous GenBank. Les valeurs de « bootstraps » supérieures à 60 % sont indiquées à côté de chaque embranchement concerné

Les séquences acquises dans cette étude sont, d'une façon générale, regroupées, soulignant l'homogénéité des populations cibles. Cependant, la phylogénie obtenue avec les séquences issues des banques de données internationales souligne que la structuration génétique des copépodes n'est pas nettement identifiable. En effet, de nombreux taxons semblent polyphylétiques y compris au niveau du genre.

L'ordre des Calanoida est le seul qui semble formé un clade relativement monophylétique. *P. grani* de la saline de Sfax, appartenant à l'ordre des Calanoida, est entièrement regroupé avec les autres espèces Acartidae (Tableau 10) disponibles dans la banque des gènes. Les 2 autres ordres étudiés, Harpacticoida et Cyclopoida apparaissent dispersés dans l'arbre phylogénétique. Le genre *Oithona* de l'ordre des Cyclopoida apparaît à 3 niveaux correspondant à 2 espèces prélevées dans la saline de Sfax *O. similis*, *O. nana* (cette étude) et à un ensemble de 8 échantillons représentant 5 espèces déterminées prélevées dans différentes zones géographiques. Au sein de la famille des Oithonidae, on remarque que *O. similis* prélevé de la saline de Sfax se trouve très loin de *O. nana* provenant de la même zone géographique. *M. lilljeborgi* et *Bryocamptus* sp. (cette étude) appartenant à l'ordre des Harpacticoida apparaissent plus ou moins regroupés dans l'arbre phylogénétique. *C. scutellata*, appartenant également à l'ordre des Harpacticoida, est situé un peu loin de ces deux dernières espèces. Cependant, les valeurs de bootstrap ne valident pas toujours les relations phylétiques soulignées.

## **II. Génétique des populations chez *A. salina* et *P. grani***

La structure des populations est de plus en plus étudiée par les outils d'analyse génétique. Dans cette étude, cette approche a permis de déterminer le degré de variabilité des séquences entre les individus d'une même espèce voire d'espèces différentes. On s'est intéressé au polymorphisme sur deux fragments de gènes : le COI et le Cytb.

Le tableau ci-dessous montre les différences du niveau de variabilité génétique intra-spécifique (entre *P. grani* prélevés de deux bassins de salinité différente : A5 et A16) et inter-spécifique (entre *P. grani* et *A. salina*).

**Tab.11. Diversité génétique des *P. grani* et des *A. salina* avec le COI et le Cytb des différents sites échantillonnés**

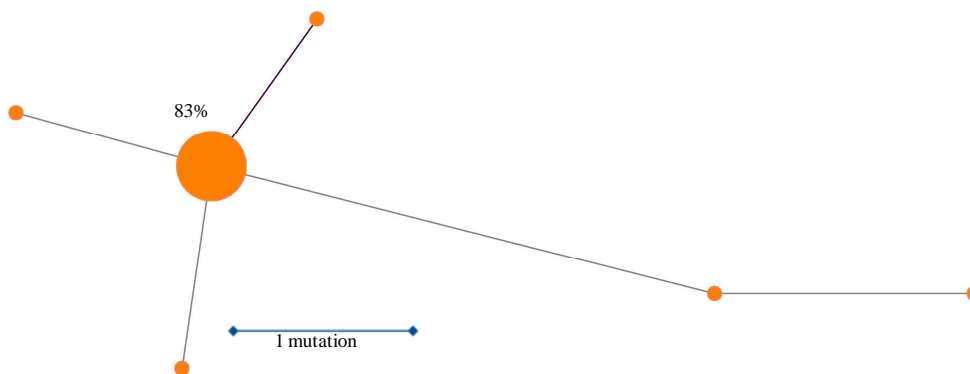
	<i>P. grani</i>						<i>A. salina</i>	
	COI			Cytb			COI	Cyt b
	A5	A16	A5 and A16	A5	A16	A5 and A16	M2	
N	20	26	46	9	14	23	29	13
N <sub>hap</sub>	12	11	21	9	14	23	6	13
N <sub>sipol</sub>	42	25	52	27	39	46	6	20
Hd	0.0500	0.0385	0.0217	0.111	0.0714	0.0435	0.0345	0.0769
$\pi$	0.0122	0.0076	0.0096	0.0277	0.0283	0.0293	0.0008	0.0155

N = nombre d'individus séquencés, N<sub>hap</sub> = nombre d'haplotypes, N<sub>sipol</sub> = nombre de sites polymorphes, Hd = taux de diversité haplotypique et  $\pi$  = taux de diversité nucléotidique

### II.1. Génétique des populations chez *A. salina*

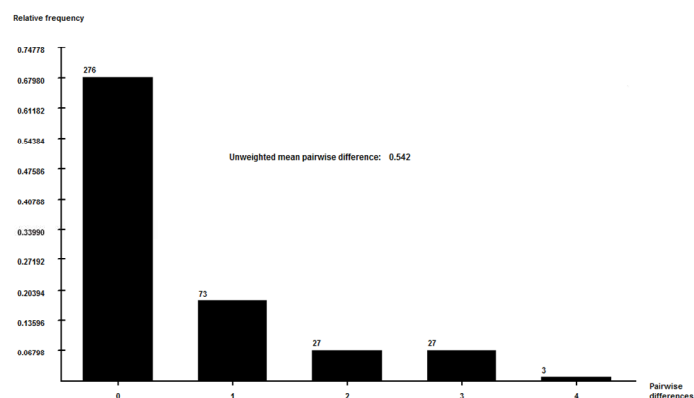
#### ❖ Avec le COI

Les séquences de COI de 29 individus d'*A. salina* ont été amplifiées. Ces séquences ont une longueur de 650 pb. Le réseau haplotypique d'*A. salina* est construit avec le marqueur COI (Figure 23). Avec ce marqueur, 6 haplotypes sont identifiés sur 6 sites variables. Ces haplotypes comprennent 5 transitions et une seule transversion. Les séquences contiennent 24,93 % de C, 33,84 % de T, 18,94 % de A et 22,3 % de G. Le modèle de substitution utilisé dans cette analyse est celui de Tamura-Nei (TrN) (1993) qui prend en compte un taux variable pour les 4 types de nucléotides ainsi qu'un taux inégal pour les transitions et les transversions, il différencie aussi les 2 types de transition (purine / purine et pyrimidine / pyrimidine).



**Fig.23. Réseau d'haplotypes construit avec le COI représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes d' *A. salina* prélevé du bassin M2**

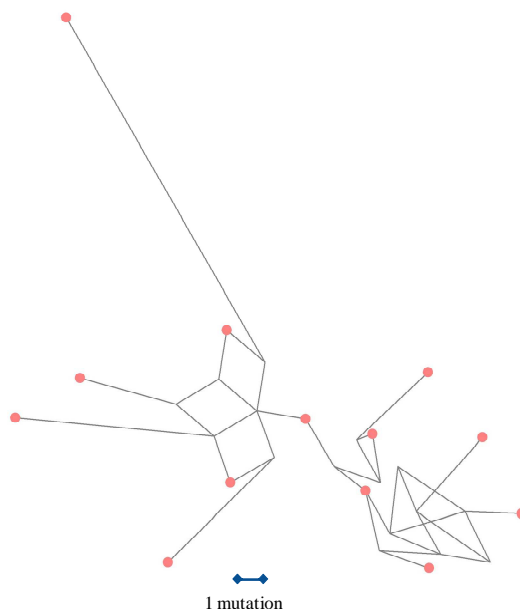
L'haplotype majoritaire représente 83 % (Figure 23), ce qui souligne un faible polymorphisme intra-spécifique. La distribution des mésappariements estimés avec ce marqueur génétique montre une courbe unimodale (Figure 24), ce qui confirme l'existence d'un seul groupe spécifique.



**Fig. 24. Distribution des mésappariements chez *A. salina* prélevé du bassin M2 avec le COI**

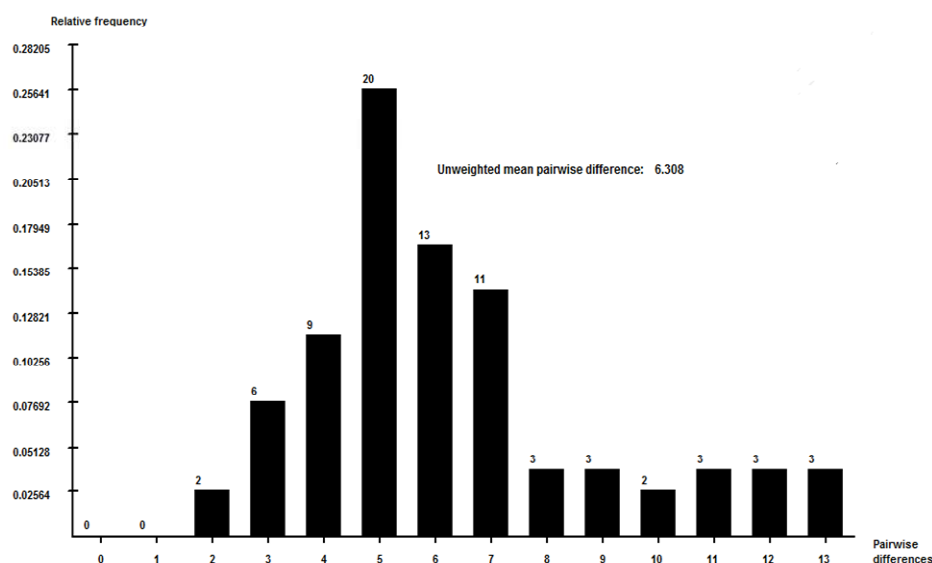
❖ Avec le Cytb

Possédant une longueur de 408 pb, le Cytb ne met pas en évidence d'haplotype majoritaire, 13 haplotypes sur 20 sites polymorphes sont observés à partir de 13 individus (Figure 25). La composition nucléotidique est : 35,56 % de A, 17,72 % de C, 28,18 % de G et 18,59 % de T. Les substitutions nucléotidiques sont composées de 20 transitions et 5 transversions. Selon l'analyse réalisée par ModelGenerator, les substitutions nucléotidiques observées suivent un modèle Tamura-Nei (1993) qui est décrit précédemment. Chez *A. salina*, le Cytb apparaît donc beaucoup plus variable que le COI.



**Fig.25. Réseau d'haplotypes construit avec le Cytb représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes d' *A. salina* prélevé du bassin M2**

Comme pour le marqueur génétique COI, la distribution des mésappariements du Cytb montre une courbe unimodale (Figure 26), ce qui confirme l'existence d'un seul groupe spécifique au sein des *A. salina*.



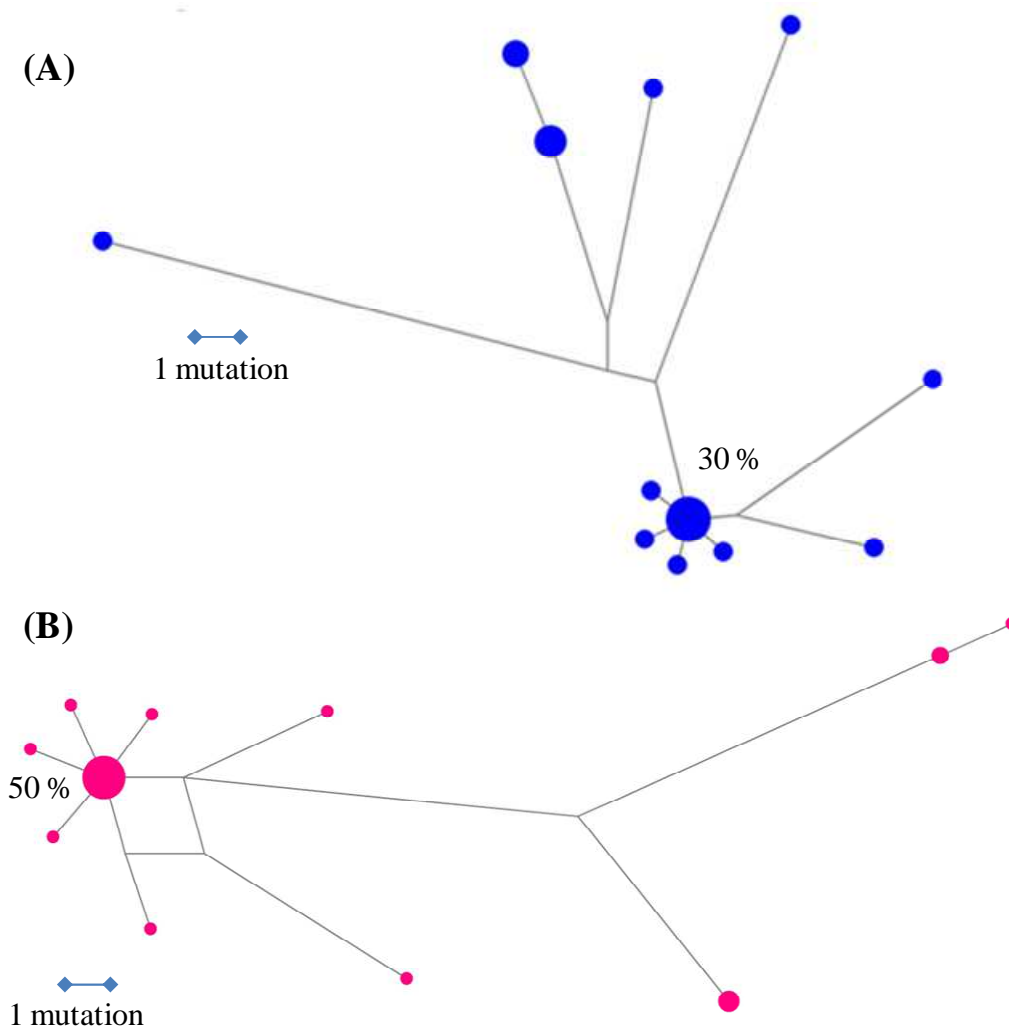
**Fig.26. Distribution des mésappariements chez *A. salina* prélevé du bassin M2 avec le Cytb**

## II.2. Génétique des populations chez *P. grani*

Afin d'étudier l'homogénéité ou la diversité génétique au niveau intra et inter-populationnel avec le COI et le Cytb, deux « populations » de *P. grani* ont été distinguées selon leur bassin d'origine (*P. grani* du bassin A5 de salinité 42 psu et *P. grani* du bassin A16 de salinité 62 psu).

### ❖ Avec le COI

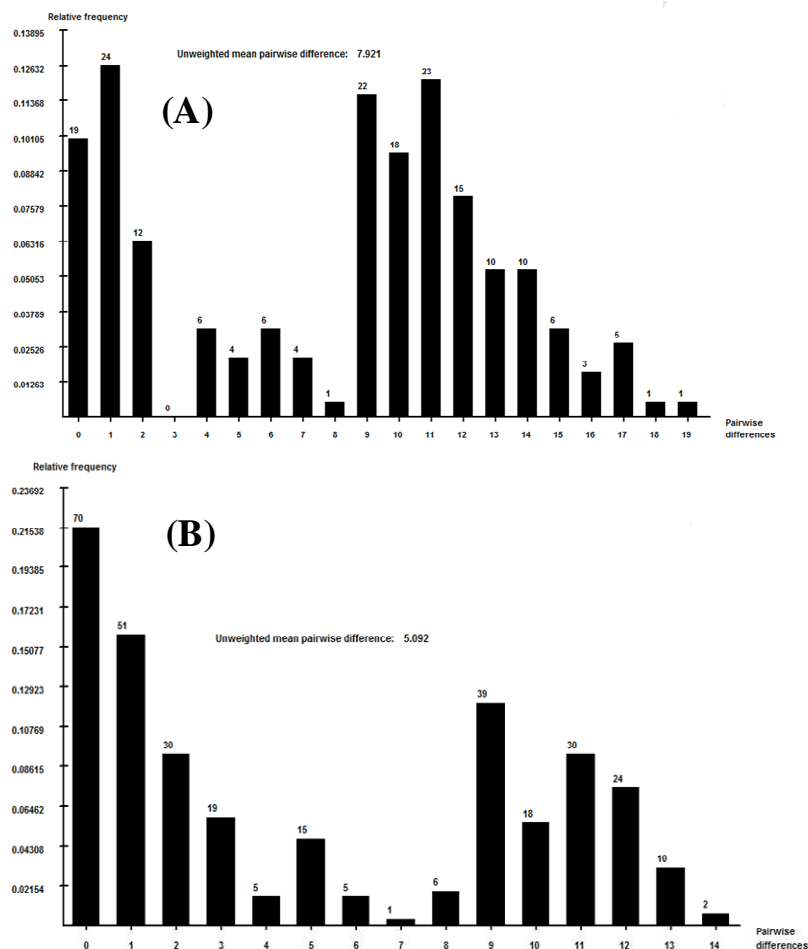
Un total de 20 *P. grani* prélevés de A5 et 26 prélevés de A16 sont séquencés avec un fragment du gène COI de longueur 650 pb. Les réseaux haplotypiques construits avec le COI pour *P. grani* que ce soit prélevés de A5 (Figure 27A) ou de A16 (Figure 27B) montrent un important polymorphisme représentant 30 % et 50 % respectivement d'haplotype majoritaire. La diversité haplotypique chez *P. grani* échantillonné dans A5 est plus importante que celle obtenue à partir de la même espèce prélevée dans A16 (respectivement  $Hd = 0,05$  et  $Hd = 0,0385$ ) (Tableau 9). Le modèle utilisé dans l'analyse des séquences de *P. grani* prélevé dans A5 est Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (1985) qui différencie les fréquences des bases et qui prend en compte la distinction entre transition et transversion. En revanche, l'analyse des séquences obtenues à partir de *P. grani* échantillonné dans A16 est proche du modèle Kimura (K80) (1980) qui suppose un taux équivalent pour les 4 types de nucléotides et qui prend en compte la plus grande probabilité pour observer les transitions et les transversions.



**Fig.27. Réseaux d'haplotypes construit avec le COI représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes de *P. grani* prélevé de A5 (Figure A) et de A16 (Figure B)**

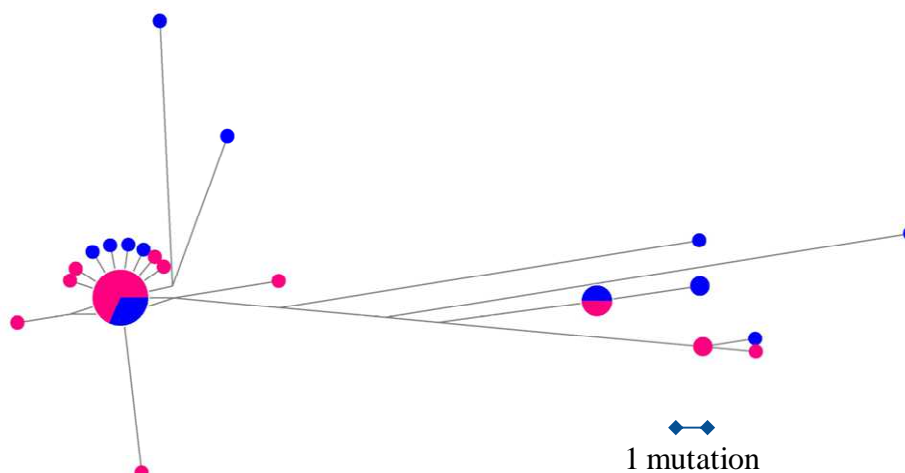
Douze haplotypes du fragment du gène mitochondrial COI ont été récupérés dans A5 à partir de 20 séquences et 11 dans A16 à partir de 26 séquences. Les séquences de COI comprennent 42 (dont 30 transition et 12 transversions) et 25 (dont 22 transition et 3 transversions) sites variables chez *P. grani* prélevés respectivement dans A5 et A16. Les séquences, qu'elles soient obtenues à partir d'individus prélevés dans A5 ou A16, ont une composition nucléotidique similaire : 15 % de C, 37 % de T, 26 % de A et 20 % de G.

La distribution des mésappariements (Figure 28) montre une courbe bimodale aussi bien chez *P. grani* prélevé dans A5 (Figure 28A) que dans A16 (Figure 28B).



**Fig.28. Distribution des mésappariements avec le COI chez *P. grani* prélevé de A5 (Figure A) et de A16 (Figure B)**

Le réseau haplotypique de l'ensemble des *P. grani* prélevés dans A5 et dans A16 est indiqué dans la figure 29.



**Fig.29. Réseau d'haplotypes construit avec le COI représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes de *P. grani***

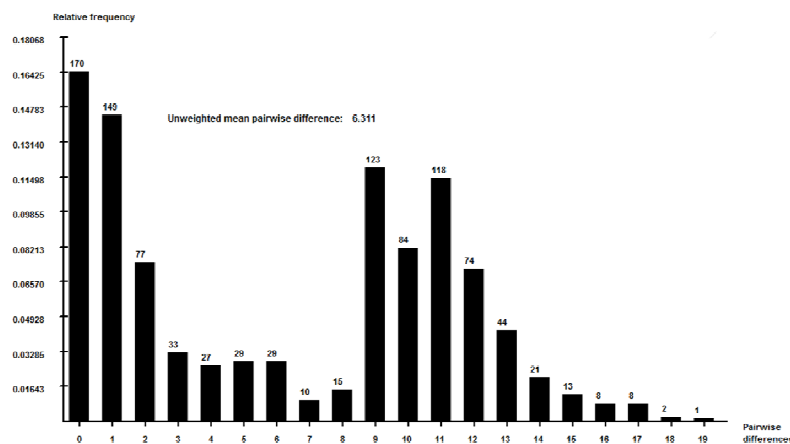
Le code couleur permet de visualiser la répartition géographique de ces haplotypes (A5 en bleu et A16 en rose)



Avec ce marqueur, seuls deux haplotypes sont communs et majoritaires aux 2 groupes et de nombreux autres sont uniques. Cependant, peu de mutations (3 au maximum) les différencient des haplotypes majoritaires. Le réseau haplotypique montre une distribution en rayon de la diversité génétique autour des 2 haplotypes majoritaires. La plupart des haplotypes divergent de l'haplotype dominant par seulement une mutation. Ce qui confirme la faible accumulation individuelle de mutations.

Sur les 46 séquences obtenues de l'ensemble de 2 bassins, 21 haplotypes ont pu être identifiés dont un haplotype majoritaire inégalement réparti entre les 2 sites (plus faiblement représenté par *P. grani* provenant de A5 (29 %)).

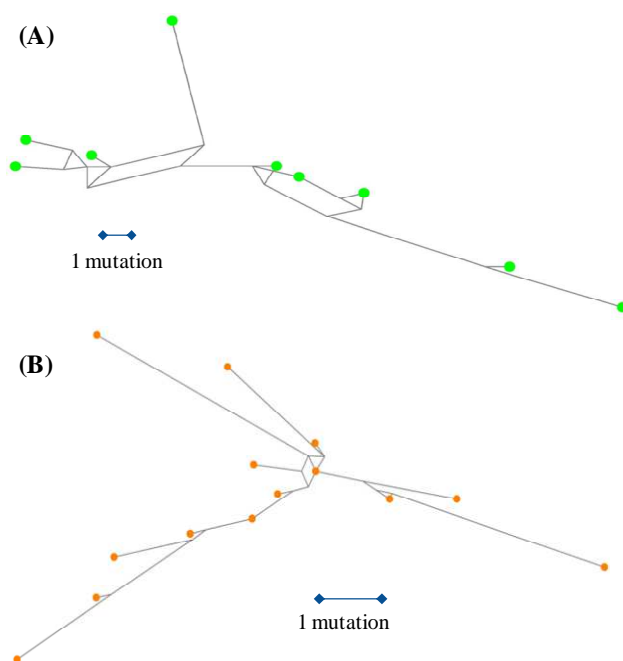
La distribution des mésappariements chez *P. grani* prélevés de A5 et A16 avec le COI montre une courbe bimodale (Figure 30). Cela souligne la présence de 2 groupes génétiquement distincts, présents dans les 2 bassins.



**Fig.30. Distribution des mésappariements avec le COI chez l'ensemble de *P. grani* prélevés de A5 et de A16**

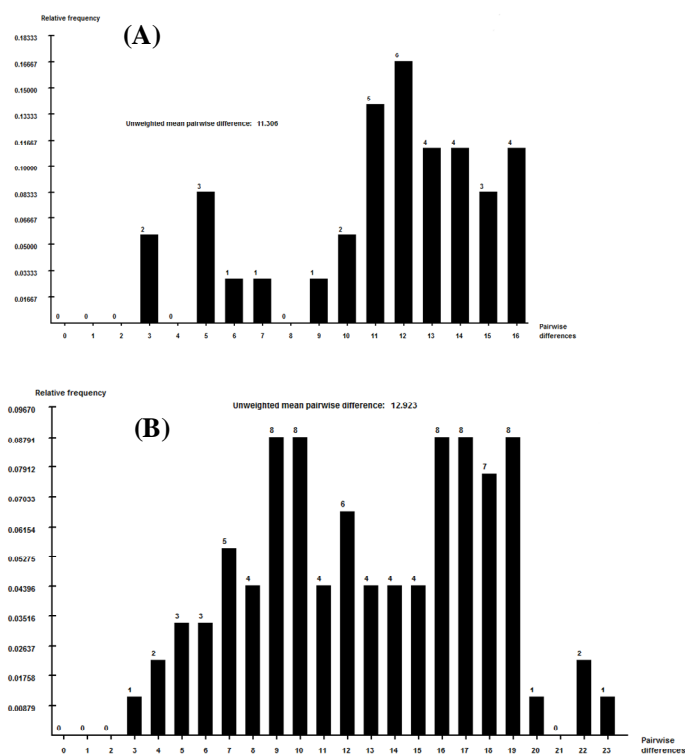
❖ Avec le Cytb

Les réseaux haplotypiques construits avec le Cytb pour *P. grani* que ce soit prélevés dans A5 (Figure 31A) ou dans A16 (Figure 31B), montrent un polymorphisme plus important que celui observé avec le COI puisque on n'observe aucun haplotype majoritaire avec ce marqueur génétique. Les individus *P. grani* issus de A5 montrent la diversité haplotypique la plus importante ( $H_d = 0,111$ ). Les séquences ont permis de décrire 9 haplotypes avec 27 sites variables. Celles de *P. grani* échantillonné dans A16 ont permis de décrire 14 haplotypes avec 39 sites variables. Selon ModelGenerator, les substitutions nucléotidiques observées au niveau des séquences de *P. grani* émanant de A5 ou de A16, suivent un modèle Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (1985).



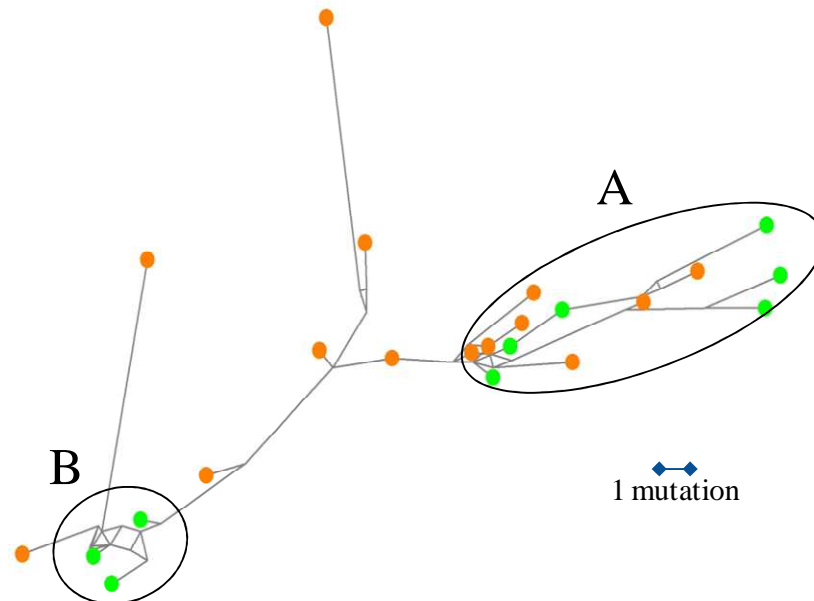
**Fig.31. Réseaux d'haplotypes construit avec le Cytb représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes de *P. grani* échantillonné de A5 (Figure A) et de A16 (Figure B)**

La distribution des mésappariements est analysée (Figure 32). Elle montre des courbes bimodales aussi bien pour les échantillons de A5 que ceux de A16. Cela confirme la présence de groupes génétiquement distincts dans les 2 bassin.



**Fig.32. Distribution des mésappariements avec le Cytb chez *P. grani* prélevé de A5 (Figure A) et de A16 (Figure B)**

Le réseau haplotypique de l'ensemble des séquences de Cytb de *P. grani* prélevé dans A5 et dans A16 est présenté dans la figure 33.

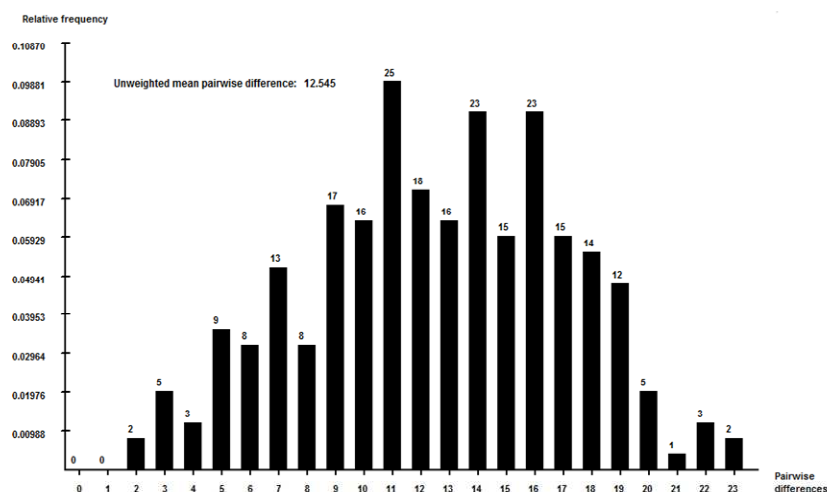


**Fig.33. Réseau d'haplotypes construit avec le Cytb représentant les relations évolutives entre les différents haplotypes de *P. grani***

Le code couleur permet de visualiser la répartition géographique de ces haplotypes (A5 en vert et A16 en orange). Les cercles correspondent aux groupes (A et B) formés par les *P. grani* prélevés du bassin A5.

Toutes les séquences obtenues correspondent à un haplotype individuel. Les séquences de *P. grani* prélevé dans le bassin A5 forment deux ensembles bien distincts (A et B). Celles obtenues à partir des individus prélevés dans A16 sont parfois proches des séquences de A5 et appartiennent au même ensemble (A) soit disjointes des ensembles définis précédemment. Contrairement à ce qui a été observé avec le COI, aucun haplotype commun à ces 2 bassins n'a été identifié avec ce marqueur.

La distribution des mésappariements chez *P. grani* prélevé dans A5 et A16 avec le Cytb montre une courbe bimodale (Figure 34). Même, si cette bimodalité est moins marquée que celle déduite avec le COI, cela semble confirmer l'existence de groupes structurellement différents vivant en sympatrie dans les deux bassins.



**Fig.34. Distribution des mésappariements avec le Cytb chez l'ensemble de *P. grani* prélevé de A5 et de A16**

❖ **Comparaison des résultats obtenus avec le COI et le Cytb**

D'après les valeurs de différentiation des « populations » ( $F_{st}$ ), les niveaux de différentiation des marqueurs COI et le Cytb ne sont pas semblables (Tableau 12). Ainsi, aucune différentiation n'est décelable avec le COI, par contre, le niveau de divergence génétique révélé avec le Cytb semble plus important.

**Tab.12. Différentiation génétique des populations ( $F_{st}$ ) de *P. grani***

Gène	$F_{st}$
COI	0
Cytb	0,04007

**D. Discussion**

L'objectif de ce travail est de réaliser une étude comparative de la phylogénie des espèces de 2 groupes zooplanctoniques et de la structuration génétique des populations des principales espèces de copépodes et d'une espèce de branchiopode de la saline de Sfax exposées à différentes contraintes environnementales, notamment en ce qui concerne la salinité.

L'analyse de la structure génétique des populations nous a montré la distribution de la diversité génétique parmi les bassins étudiés pour *Paracartia grani* et *Artemia salina*. Cette structure a été décrite sur la base des marqueurs d'ADN mitochondrial. Ces derniers présentent certaines contraintes. L'existence de pseudogènes nucléaires mitochondriaux peut biaiser l'identification (Bensasson et al., 2001). En plus, l'héritage d'un génome extranucléaire est mal connu ; généralement, la descendance est maternelle donc l'identification basée uniquement sur les gènes mitochondriaux peut présenter des lacunes car, dans ces conditions,

un gène mitochondrial détient seulement l'information maternelle (Machida et Tsuda, 2010). Enfin les gènes mitochondriaux peuvent, dans certains cas, perdre leur signal phylogénétique à cause de la saturation des mutations (Bucklin et al., 2011 ; Machida et al., 2006).

Les différentes espèces constituant le zooplancton de la saline de Sfax présentent un niveau de variabilité intra-spécifique relativement faible du COI que ce soit au niveau inter ou intra-populationnel. Le taux de diversité haplotypique ( $H_d$ ) obtenu dans cette étude est compris entre 0,0217 et 0,05 alors que la diversité nucléotidique ( $\pi$ ) est entre 0,0008 et 0,0122. Ces valeurs sont beaucoup plus faibles que celles observées dans l'étude de Dippenaar et al. (2010) où ils ont étudié les populations de copépode *Nesippus orientalis* collectés de différents sites des côtes de l'Afrique du Sud. La diversité globale des individus de cette espèce est élevée vu les fortes estimations de la diversité des haplotypes ( $H_d = 0,988$ ) et des nucléotides ( $\pi = 0,0647$ ). Une grande diversité haplotypique (0,75 - 0,96) et une faible diversité nucléotidique (0 - 0,008) ont été enregistrées chez trois espèces de gastéropodes *Cellana* spp. (Bird et al., 2007), cela est attribué aux mouvements récents d'expansion géographique subi par ces espèces, les événements historiques semblent influencer la structure génétique des populations. La diversité haplotypique et nucléotidique intra-populationnelle de *P. grani* ( $H_d = 0,0500$  et  $0,0385$  pour les échantillons provenant de A5 et A16, respectivement et  $\pi = 0,0122$  et  $0,0076$  pour les échantillons provenant de A5 et A16, respectivement) sont beaucoup plus faibles que celles obtenues pour le même genre *Acartia tonsa* ( $H_d = 0,926$  et  $\pi = 0,0904$ ) prélevés sur les côtes Atlantiques (Chen et Hare, 2011). De même, la diversité haplotypique et nucléotidique inter-populationnelle de *P. grani* ( $H_d = 0,0217$  et  $\pi = 0,0096$ , respectivement) est extrêmement faible en la comparant avec celle de la dernière étude citée, indiquant l'homogénéité des 2 groupes qui peuvent donc être considérés comme formant une seule population capable de se développer dans des conditions de salinité variables. En fait, la comparaison de la diversité génétique intra-spécifique d'individus prélevés dans la zone d'étude avec celle d'individus provenant d'autres zones montrent que l'origine géographique peut être un des facteurs déterminant les différenciations des populations. Cela a déjà été observé sur la base de la séquence d'ADN codant le gène ribosomal 28S chez *Oithona similis* ; des différenciations génétiques significatives ont été établies par Cepeda et al. (2012) entre des populations prélevées au Nord et au Sud de l'océan Atlantique. Les auteurs ont attribué cette différence principalement aux différentes origines géographiques de ces populations.

Des divergences ont été mises en évidence pour *A. salina* à l'échelle mondiale par le marqueur génétique 18S et dans une moindre mesure par le marqueur 16S (Baxevanis et al.,

2006 ; Kappas et al., 2009). Le 18S est considéré comme un marqueur suffisamment informatif pour étudier la diversité génétique du zooplancton au niveau inter-spécifique (Huys et al., 2006 ; Blanco-Bercial et al., 2011 ; Wyngaard et al., 2010; Huys et al., 2012 ; Laakmann et al., 2012). Cependant, dans le cas des travaux présentés ici, les marqueurs 18S et le 16S ne permettent pas d'obtenir des arbres congruents pour la population étudiée. Cela peut s'expliquer par le fait que l'un est un gène extranucléaire mitochondrial (16S) et l'autre est un gène nucléaire (18S) et que les vitesses d'évolution de ces 2 génomes sont différentes : le 16S présente une vitesse d'évolution plus élevée que le 18S, ce dernier est donc plus conservé (Mallatt et al., 2004 ; Schwentner et al., 2009 ; Williams et al., 2010 ; Blanco -Bercial et al., 2011). Cependant, le faible nombre de données disponibles pour les différents sites en dehors de la saline de Sfax et l'absence de données sur les caractéristiques des milieux échantillonnés nécessitent des études complémentaires afin d'augmenter le nombre de prélèvements et donc d'échantillonner à la fois d'autres points de salinité modérée en Méditerranée mais aussi d'autres salines.

Dans cette étude, le branchiopode *A. salina* a montré des caractéristiques génétiques particulières, différentes de celles observées pour les autres espèces dans le cadre de cette étude. Cela peut être éventuellement dû à des différences environnementales. L'adaptation des artémies à de fortes valeurs de salinité aboutit à des populations génétiquement distinctes (Baxevanis et al., 2006 ; Hou et al., 2006 ; Kappas et al., 2009). L'analyse comparée des séquences obtenues dans cette étude et celles disponibles dans les banques de données internationales montrent que les caractéristiques environnementales du milieu semblent être un facteur de différenciation et de ségrégation des populations. Au niveau du bassin M2 de la saline de Sfax, la population semble suivre un processus d'isolement qui peut diminuer sa variabilité génétique. Le clivage génétique marqué entre les populations représentées dans les arbres phylogénétiques, révélé par la comparaison des séquences d'origine populationnelle variée, souligne une séparation entre les populations vivant dans de fortes teneurs en sel et celles supposées prélevées en pleine mer. L'isolement écologique des *A. salina* par fréquentation d'habitats différents, marqués par les caractéristiques environnementales particulières du milieu hyper-salé, peut entraîner l'existence de groupes en voie de spéciation. Il apparaît que chez *A. salina*, la spéciation peut être un processus rapide déclenché par l'occupation de nouvelles niches écologiques et par les fortes pressions sélectives du milieu (Laakmann et al., 2012). Le processus de vicariance, à l'origine d'une spéciation, a montré que la divergence intra-spécifique d'*A. salina* remonte à environ 40 million d'années (Baxevanis et al., 2006). Malgré ces millions d'années d'évolution (Gomez et al., 2002 ;

Petrusek et al., 2008), la diversité morphologique qualitative est plutôt stationnaire c'est-à-dire les critères morphologiques sont restés les mêmes au cours de toute cette période alors que la divergence génétique s'est accrue et apparaît maintenant comme très élevée. La diversité écologique et l'adaptation locale de certaines populations à leur environnement avec peu ou sans modification morphologique, comme c'est le cas des *A. salina*, peut se refléter dans la diversité des séquences d'ADN étudiées et peut impliquer la mise en place de barrières d'isolement génétique (Kappas et al., 2009). L'histoire évolutive d'*A. salina* dans le bassin méditerranéen semble être étroitement liée à l'histoire géologique de cette aire géographique (Baxevanis et al., 2006). D'après la topologie de l'arbre obtenu avec le marqueur 18S, on remarque que les populations d'*A. salina* de la mer Méditerranée sont réparties en 2 groupes, l'un d'entre eux limité à l'extrémité orientale de la mer Méditerranée, l'autre présent sur l'ensemble de la mer Méditerranée, bassin oriental comme bassin occidental. Ces résultats confirment comme l'a observé Munoz et al. (2008), que les lignés d'*A. salina* de la Méditerranée et de l'Afrique du Nord sont hautement divergentes. Les différenciations substantielles des *A. salina* occupant les bassins oriental et occidental, sont aussi fortement soutenues par les analyses de polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) (Triantaphyllidis et al., 1996).

Les travaux réalisés ont aussi permis d'appréhender la diversité génétique aux niveaux intra et inter-spécifiques dans le groupe des copépodes. Dans notre étude, l'approche moléculaire basée sur l'ADNmt (COI et Cytb) semble mettre en évidence l'existence de deux populations de *P. grani* génétiquement distinctes sur l'ensemble des individus échantillonnés du bassin A5 (42 psu) et A16 (61 psu). Les réseaux haplotypiques obtenus avec ces deux marqueurs s'appuient sur des modèles évolutifs différents. Ces marqueurs sont très informatifs pour un niveau de divergence intra-spécifique. Le COI a été utilisé avec succès pour étudier la variabilité intra-spécifique du Calanoida *Sinodiaptomus valkanovi* (Makino et al., 2010). Il a fait également l'objet d'une étude réalisée par Chen et Hare (2011) sur *Acartia tonsa*. Avec le même marqueur génétique, ils ont pu définir trois lignées sympatriques au sein de cette espèce. Dans notre étude, les deux populations prédéfinies de *P. grani* sont réparties en deux bassins géographiquement proches mais présentant des facteurs physico-chimiques différents, leur présence sympatrique indique que les paramètres abiotiques comme la salinité ne semblent pas jouer un rôle dans la structuration génétique des populations. Le niveau de différenciation inter-groupes mis en évidence avec le marqueur Cytb ( $F_{st} = 0,04007$ ) est plus élevé que pour le COI ( $F_{st} = 0$ ). Par conséquent, le Cytb s'avère le plus polymorphe des 2 marqueurs chez les Acartidae et est donc plus adéquat pour différencier les groupes

d'individus génétiquement proches. La valeur de  $F_{st}$  obtenue avec le COI dans cette étude est plus faible que celle observée en comparant deux populations de copépodes Calanoida *Sinodiaptomus valkanovi*, une prélevée du Nord Est du Japon et l'autre de la mer intérieure de Seto ( $F_{st} = 0,85$ ) (Makino et al., 2011) ; cela est attribué aux invasions biologiques qui se sont produites et qui ont créé une diversité génétique intra-spécifique importante au sein de *S. valkanovi*, phénomène qui ne semble pas avoir existé au sein de notre site d'étude. La proximité géographique des 2 bassins échantillonnés dans la saline de Sfax peut expliquer cette proximité génétique et ne soutient pas l'hypothèse de la présence d'espèces cryptiques contrairement à ce que semble montrer la distribution des mésappariements des séquences prises 2 à 2.

Les échantillons de *P. grani*, qu'ils soient prélevés dans A5 ou dans A16, montrent un polymorphisme intra-spécifique plus élevé que celui observé chez *A. salina* : *P. grani* prélevés dans A5 et A16 représentent respectivement 30 % et 50 % d'haplotype majoritaire alors qu'on observe 83 % d'haplotype majoritaire chez *A. salina*. La différence d'amplitude de la variation génétique peut être attribuée à plusieurs facteurs. L'existence de groupes cryptiques au sein des Acartidae augmente la variabilité génétique du groupe. Cette hypothèse est corroborée par le caractère bimodal des courbes de distribution des mésappariement observés avec les marqueurs COI et le Cytb chez *P. grani* quel que soit le bassin de prélèvement. Avec le COI, la divergence intra-groupe dans A5 est plus élevée (7,921) que celle observée au niveau inter-groupe (A5 et A16, 6,311), en revanche, dans le bassin A16 cette divergence est plus faible (5,092). Avec le Cytb, la divergence intra-groupe dans A5 est plus faible (11,306) alors qu'elle est un peu plus élevée (12,923) dans A16 qu'au niveau inter-groupe (12,545). Néanmoins ces valeurs ne sont pas statistiquement différents. Dans une étude préalable effectuée par Marrone et al. (2013) sur le Calanoida *Hemidiaptomus ingens*, la moyenne de la divergence des séquences inter-clades obtenue à partir des marqueurs COI et Cytb (11-11,5) est plus importante que celle observée au niveau intra-clades (0,05-4,45). Ce critère est souvent utilisé pour identifier les espèces cryptiques (Hebert et al., 2003 ; Baird et al., 2011). En comparant ces résultats avec nos résultats, pour lesquels les différences entre les niveaux intra et inter-groupes sont insignifiants, l'hypothèse d'espèces cryptiques ne peut être retenue. Des flux d'individus de *P. grani* qui passent d'un bassin à l'autre (de A5 à A16 vu le sens de circulation des eaux dans la saline de Sfax) existent vraisemblablement, ce qui contribue à l'homogénéisation de la répartition de la diversité génétique. La variabilité génétique résulte souvent de l'action des facteurs environnementaux (physico-chimie de l'environnement, alimentation...) via les capacités de survie des individus. Les



caractéristiques environnementales propres à chaque bassin agissent différemment sur les différents génotypes présents. Les bassins A5 et A16 peuvent s'avérer moins sélectifs au niveau intra-spécifique que M2, ce qui peut entraîner une augmentation de la variabilité génétique des espèces qui se développent dans A5 et A16 et expliquer l'existence de groupes génétiquement différenciables mais insuffisamment pour confirmer un processus de spéciation en cours.

Malgré les travaux réalisés sur les copépodes (exemple Machida et al., 2006 ; Dippenaar et al., 2010 ; Wyngaard et al., 2010 ; Blanco-Bercial et al., 2011 ; Chen et al., 2011 ; Minxiao et al., 2011 ; Laakman et al., 2012), la phylogénie de ce groupe reste encore confuse et controversée. En se basant sur les critères morphologiques, les copépodes sont considérés comme un groupe monophylétique depuis 1859 (Dahms, 2004). Cependant, les résultats obtenus dans notre étude soulignent que la phylogénie des copépodes apparaît complexe et inidentifiable. Cela est en accord avec ce qui a été obtenu par Minxiao et al. (2011). Ils ont montré que la phylogénie de ce groupe zooplanctonique qui a été longtemps le sujet de discussion en raison de la complexité des caractères morphologiques, présente toujours des ambiguïtés.

Les résultats obtenus grâce à l'analyse du maximum de vraisemblance avec le marqueur « 18S » ont mis en évidence que seuls les Acartidae appartenant à l'ordre des Calanoida apparaissent génétiquement homogènes, alors que les Harpacticoida et les Cyclopoida sont dispersés. En effet, les séquences de *P. grani*, sont toutes regroupées avec les séquences d'autres espèces Acartidae disponibles dans les banques des gènes. Ces résultats confirment ceux obtenus sur la base des marqueurs 28S, 18S, COI et Cytb qui ont permis de caractériser 7 superfamilles de l'ordre des Calanoida comme monophylétique (Blanco-Bercial et al. (2011). Cela est en accord avec d'autres travaux comme ceux de Ho (1990) et Huys et Boxshall (1991) qui se sont basés sur les critères morphologiques. En 1984, Dussart a classé l'ordre des Calanoida et des Poecilostomatoida ensemble dans la lignée Cyclopinidae-Oithonidae-(Poecilostomatoida-Calanoida) (Martin et Davis, 2001), alors que les autres auteurs ont classé les Calanoida comme un groupe externe des Podoplea (Huys et Boxshall, 1991 ; Ho, 1994). Kabata (1979), Marcotte (1982) et Boxshall (1985) ont considéré l'ordre des Poecilostomatoida comme frère avec les Cyclopoida. En revanche d'autres études ont placé les Poecilostomatoida et les Siphonostomatoida ensemble. Récemment, Boxshall et Halsey (2004) ont attribué les Poecilostomatoida comme un sous-ordre des Cyclopoida. Toutes ces études effectuées précédemment confirment la complexité des liens phylétiques entre les différents ordres des copépodes, notamment des Harpacticoida, des Cyclopoida et

des Calanoida. Dans notre étude, les Cyclopoida sont composés de deux sous-groupes, l'un constitué de *O. similis* et de *Paracyclopsina nana* et l'autre présente d'autres espèces Oithonidae. La phylogénie de cet ordre est très confuse puisque on trouve parfois une même espèce, comme le cas de *O. similis*, dispatché dans les deux sous-groupes, le premier sous-groupe est constitué par les séquences de *O. similis* prélevés de la saline de Sfax alors que l'autre est formé par *O. similis* disponible dans la banque des gènes. Cela peut être lié à des problèmes d'interprétation des critères morphologiques établis lors de l'identification des espèces. L'identification des espèces de copépodes semble donc être un concept très délicat et compliqué qui peut entraîner des ambiguïtés dans la désignation des espèces. Cela est observé également pour l'ordre des Harpacticoida où on trouve le genre *Bryocamptus* réparti sur deux branches (*B. Pygmaeus* (Angleterre) et *Bryocamptus* sp. (saline de Sfax)). Le genre *Mesochra* présente le même type de disposition dans l'arbre puisque *M. lilljeborgi* (saline de Sfax) et *M. rapiens* (Suède) sont éloignés l'un de l'autre. En conséquence de ces résultats, il est difficile de définir des groupes comme l'ont fait plusieurs auteurs cités précédemment. Bien que la fiabilité des phylogénies basées sur les gènes nucléaires ribosomiaux soit en débat (Minxiao et al., 2011), ce marqueur a pourtant été utilisé avec succès pour résoudre les relations phylétiques entre plusieurs taxa dans de nombreux travaux antérieurs (Wägele et Mayer, 2007 ; von Reumont et al., 2009). De même, dans le taxon des copépodes, la plupart des études (exemple Thum, 2004 ; Wyngaard et al., 2010) ont montré que le marqueur « 18S » s'avère aussi efficace pour résoudre les relations de parenté qui unissent les espèces. Dans notre étude, seul le branchiopode *A. salina* est clairement discriminé par le 18S. Par contre, ce marqueur nucléaire ne semble pas adéquat pour distinguer les différents ordres de copépodes et pour analyser les liens phylétiques entre les taxons étudiés. Les valeurs de bootstrap issues de l'analyse du maximum de vraisemblance, sont, pour la plupart, faibles et souvent ne valident pas les embranchements obtenus. Cela peut être la conséquence d'un faible signal phylogénétique (Minxiao et al., 2011). L'ambiguïté des résultats peut être attribuée, également, à des erreurs d'identification en raison des difficultés d'analyse des caractères morphologiques, ou à la présence de groupes cryptiques en voie de différenciation liée à des processus évolutifs de convergence adaptative en milieu sélectif. En effet, sous l'appellation « *P. grani* » des espèces congénériques cryptiques sont suspectées mais restent à confirmer ; Des résultats similaires ont été observés par Makino et al., (2010) pour deux espèces de Calanoida *Sinosiaptomus valkanovi* et *S. sarsi* ; ces deux espèces montrent une divergence indiscernable sur des critères morphologiques classiques, la divergence des séquences du

fragment de gène COI est estimé entre 23 et 26 % entre ces deux espèces soit des valeurs supérieures à celles obtenues sur les groupes de la saline de Sfax.

L'abondante littérature scientifique qui traite les copépodes et les artémies indique, en général, une grande variabilité de leur diversité génétique. Les différences entre les groupes sympatriques sont observées à partir des marqueurs mitochondriaux ayant une vitesse d'évolution suffisamment informative aux niveaux spécifique et populationnel. Les résultats obtenus nous apportent de nouvelles interrogations qui pourront faire l'objet de travaux futurs. L'utilisation d'autres marqueurs portés par des génomes différents (nucléaire et mitochondrial) permettrait de confirmer et de renforcer les résultats. D'autre part, il serait aussi nécessaire d'accroître l'échantillonnage afin d'évaluer la structure génétique des populations *in situ* que ce soit pour les copépodes ou pour les artémies. De plus, l'extension spatiale de la zone d'échantillonnage à d'autres sites de prélèvement caractérisés par des salinités hétérogènes permettrait d'estimer l'influence de ce paramètre sur la ségrégation taxonomique et éventuellement de confirmer l'existence de groupes cryptiques. Enfin, l'approche phylétique doit être élargie à d'autres organismes constituant les peuplements des salines afin d'identifier les caractères représentatifs de la faune adaptée à cet environnement particulier que sont les milieux hypersalés.

*Conclusions générales*  
*et*  
*Perspectives*

## *Conclusions générales et perspectives*

### **La structure des communautés de copépodes et d'artémies de la saline de Sfax**

Au cours de cette étude, les paramètres biotiques ont été déterminés entre le mois de juin 2010 et le mois de mai 2011 au niveau de 4 bassins de salinité croissante (42 à 193 psu). Parallèlement, outre la salinité, plusieurs paramètres physico-chimiques de l'eau ont été analysés.

Les organismes qui vivent dans la saline sont capables de résister à de fortes salinités. Parmi les organismes qui forment une importante partie de la biomasse dans cet environnement, le zooplancton est constitué majoritairement, de copépodes et d'artémies. Au sein de cet écosystème, ces peuplements se structurent selon les bassins caractérisés par leur salinité.

L'analyse qualitative a montré que les peuplements de crustacés des bassins A5, A16 et C41 étaient constitués de copépodes appartenant à 3 ordres différents (Calanoida, Cyclopoida et Harpacticoida) répartis en 10 espèces. Le bassin du « partènements intérieurs » (M2) est monozoïque, on ne trouve que des artémies et plus précisément *A. salina*.

La composition des communautés de la saline de Sfax est analysée à l'aide d'une méthode multivariée : Costatis. Cette approche est particulièrement intéressante et adaptée quand les relations entre les espèces et les facteurs abiotiques sont fortes et plus importantes que la structure temporelle. Elle permet d'étudier les relations entre les espèces et l'environnement au niveau des différents sites étudiés et en tenant compte des dates d'échantillonnage.

Un gradient de salinité opposé à un gradient de qualité de l'eau et un gradient du rapport N:P ont été identifiés par Costatis comme déterminant majoritairement la distribution des espèces. Globalement, les Cyclopoida et les Calanoida sont associés aux plus faibles valeurs de salinité et aux plus faibles ratios N:P alors que les Harpacticoida sont liés aux valeurs de salinité et aux ratios N:P les plus élevés, et que les artémies sont associés à de très fortes valeurs de salinité et à de très faibles valeurs de N:P.

Cette étude confirme le rôle crucial de la salinité dans la distribution des espèces au sein de la saline de Sfax ; ce paramètre est considéré comme un facteur sélectif et de contrôle de la richesse spécifique zooplanctonique. Le présent travail souligne également l'influence, quoique plus faible, d'autres facteurs comme le ratio N:P qui pourrait être lié au mode de vie des animaux et directement aux autotrophes qui se développent au niveau des différents bassins.

Dans l'avenir, il faut effectuer un suivi plus rigoureux en court terme des paramètres biotiques et abiotiques de la saline afin de mieux caractériser ce milieu. Il serait aussi intéressant de suivre la variabilité de la production des œufs des espèces caractéristiques des différents bassins à l'échelle mensuelle et saisonnière et de tester l'influence de l'environnement physique, chimique et biologique lors de chaque saison.

#### **La composition des acides gras des copépodes et d'*A. salina* de la saline de Sfax**

Les acides gras saturés et insaturés ont été dosés chez certaines espèces de copépodes et chez *A. salina* afin de dégager la nature et l'importance nutritionnelle chez ces communautés zooplanctoniques.

L'analyse biochimique a montré la dominance des acides gras saturés, les copépodes et les artémies ont adopté une stratégie d'accumulation de quantités considérables d'acide palmitique (C16:0) et d'acide stéarique (C18:0) qui constituent des réserves énergétiques susceptibles d'assurer leur survie en période de carence nutritive du milieu.

On enregistre les plus grandes valeurs d'acides gras monoinsaturés et polyinsaturés totaux chez *A. salina*. Cela indique que cette espèce est apte à être utilisée pour des fins aquacoles.

L'apport calorique et la qualité nutritionnelle (en termes de composition biochimique) ne sont probablement pas équivalents entre les différentes espèces. La composition en acides gras est susceptible de varier en fonction du groupe taxonomique étudié, du sexe de l'espèce et des conditions environnementales et par conséquent elle est dépendante des ressources trophiques naturellement présentes dans chaque bassin de la saline.

Dès lors, une des perspectives liées à ce travail, serait de déterminer la composition en acides gras des autres compartiments trophiques surtout du phytoplancton présent dans les quatre bassins étudiés (A5, A16, C41 et M2) pour mieux identifier le transfert des acides gras du niveau supérieur de la chaîne trophique (zooplancton) vers les niveaux inférieures (phytoplancton).

#### **La diversité génétique des espèces zooplanctoniques de la saline de Sfax**

Cette étude a permis de tester différents marqueurs moléculaires selon les espèces ciblées de zooplancton et de définir l'approche méthodologique la plus adaptée. Cela a permis de souligner l'intérêt que peut présenter la phylogénie et la génétique des populations dans la connaissance des échanges génétiques actuels entre populations.

Avec les 4 gènes étudiés (COI, Cytb, 18S et 16S) une divergence de variabilité a été observée entre les niveaux intra-spécifique et inter-spécifique.

Échantillonner différents sites de la saline à des salinités différentes a permis d'appréhender les relations existantes entre les différentes espèces colonisant la saline ayant abouti à leur distribution actuelle spatiale.

La phylogénie des copépodes est controversée puisque la structuration génétique de ce groupe n'est pas nettement identifiable. L'existence d'espèces cryptiques au sein des *P. grani* est supposée mais reste à confirmer. Les facteurs abiotiques ne sont pas impliqués dans ces processus de divergence génétique.

Chez *A. salina*, la forte teneur en sel, est un facteur de ségrégation des populations, l'adaptation des artémies à cette condition aboutit à des populations génétiquement distinctes. Un clivage génétique est repéré, il met en évidence une séparation entre les populations vivant dans de fortes teneurs en sel et celles en pleine mer.

Cependant, le faible nombre de données disponibles dans les banques de données pour les différents sites en dehors de la saline nécessite de continuer l'échantillonnage en agrandissant la couverture spatiale, et donc, d'effectuer des prélèvements à la fois dans d'autres points en Méditerranée mais aussi dans d'autres salines. En effet, augmenter le nombre de sites d'échantillonnage permettrait d'accroître la robustesse des interprétations.

*Références*  
*bibliographiques*



## Références bibliographiques

### A

- ✓ Abid O., Sellami–Kammoun A., Ayadi H., Drira Z., Bouain A., Aleya L. 2008. Biochemical adaptation of phytoplankton to salinity and nutrient gradients in a coastal solar saltern, Tunisia. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 80 : 391-400.
- ✓ Ackman RG. 1980. Fish lipids. Part I. *In*: Connell JJ. (ed), *Advances in fish science and technology*. England, Fishing news books Ltd, pp 86-103.
- ✓ Adamowicz SJ., Menu-Marque S., Halse SA., Topan JC., Zemlak TS., Hebert PDN., Witt JDS. 2010. The evolutionary diversification of the Centropagidae (Crustacea, Calanoida) : A history of habitat shifts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55 : 418-430.
- ✓ Adrian R., Schneider-Olt B. 1999. Top-down effects of crustacean zooplankton on pelagic microorganisms in a mesotrophic lake. *Journal of Plankton Research* 21 : 2175-2190.
- ✓ Albeit J., Scheibel W. 1982. Benthic Harpacticoids as food source for fish. *Marine Biology* 70 : 141-147.
- ✓ Allan EL., Ambrose ST., Richoux NB., Froneman P.W. 2010. Determining spatial changes in the diet of nearshore suspension-feeders along the South African coastline: stable isotope and fatty acid signatures. *Estuarine Coastal and Marine Sciences* 87 : 463-471.
- ✓ Altschul SF., Gish W., Miller W., Myers EW., Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215 : 403-410.
- ✓ Amaral MJ., Costa MH. 1999. Macrobenthic communities of salt pans from Sado estuary (Portugal). *Acta Oecologica* 20 : 327-332.
- ✓ Arendt KE., Jonasdottir SH., Hansen PJ., Gärtner S. 2005. Effects of dietary fatty acids on the reproductive success of the calanoid copepod *Temora longicornis*. *Marine Biology* 146 : 513-530.
- ✓ Arnaud H., Georges P. 2000. Ressources génétiques et phylogéographie des huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* : variabilité, différenciation et adaptation des populations naturelles et introduites = Genetic resources and phylogeography of two cupped oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* :

variability, differentiation and adaptation of wild and introduced populations. INIST-CNRS, Cote INIST : T 136636.

- ✓ Antajan E., Gasparini S. 2004. Assessment of Cryptophyceae ingestion by copepods using alloxanthin pigment: a caution. *Marine Ecology Progress Series* 274 : 191-198.
- ✓ Arts MT., Brett MT., Kainz MJ. 2009. *Lipids in Aquatic Ecosystems*. New York. Springer. New York, p 377.
- ✓ Auel H., Hajes M., Stübing RDRD., Hagen W. 2002. Lipid biomarkers indicate different ecological niches and trophic relationships of the Arctic hyperiid amphipods *Themisto abyssorum* and *T. libellula*. *Polar biology* 25 : 374-383.
- ✓ Avise JC., Arnold J., Ball RM., Bermingham E., Lamb T., Neigel JE., Reeb CA., Saunders NC. 1987. Intraspecific phylogeography : The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18 : 489-522.
- ✓ Avise JC. 2000. *Phylogeography, the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts & London, UK.
- ✓ Ayadi H., Toumi N., Abid O., Medhioub K., Hammami M., Sime-Ngando T., Amblard C., Sargos D. 2002. Étude qualitative et quantitative des peuplements phyto et zooplanctoniques dans les bassins de la saline de Sfax, Tunisie. *Revue des Sciences de l'eau* 15 : 123-135.
- ✓ Ayadi H., Abid O., Elloumi J., Bouain A., Sime-Ngando T. 2004. Structure of the phytoplankton communities in two lagoons of different salinity in the Sfax Saltern (Tunisia). *Journal of Plankton Research* 26 : 669-679.
- ✓ Azovsky AI., Saburova MA., Chertoproud ES., Polikarpov IG. 2005. Selective feeding of littoral harpacticoids on diatom algae : hungry gourmands? *Marine Biology* 148 : 327- 337.

## B

- ✓ Baati H., Guermazi S., Amdouni R., Gharsallah N., Sghir A., Ammar E. 2008. Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles* 12 : 505-518.
- ✓ Baird HP., Miller KJ., Stark JS. 2011. Evidence of hidden biodiversity, ongoing speciation and diverse patterns of genetic structure in giant Antarctic amphipods. *Molecular Ecology* 20 : 3439-3454.

- ✓ Basedow SL., Tande KS. 2006. Cannibalism by female *Calanus finmarchicus* on naupliar stages. *Marine Ecology Progress Series* 327 : 247-255.
- ✓ Baxevanis AD., Kappas I., Abatzopoulos TJ. 2006. Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40 : 724-738.
- ✓ Beati L., Caceres AG., Lee JA., Munstermann LE. 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* and flies (Diptera : Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *International Journal of Parasitology* 34 : 225-234.
- ✓ Beaugrand G., Ibañez F., Lindley JA., , Reid PC. 2002. Diversity of calanoid copepods in the North Atlantic and adjacent seas : species associations and biogeography. *Marine Ecology Progress Series* 232 : 179-195.
- ✓ Bell MV., Dick JR. 1990. Molecular species composition of phosphatidylinositol from the brain, retina, liver and muscle of cod (*Gadus morhua*). *Lipids* 25 : 691-694.
- ✓ Bell MV., Tocher DR. 2009. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems : general pathways and new directions. In : Kainz M., Brett MT., Arts MT. (Eds), *Lipids in Aquatic Ecosystems*, Springer, New York, pp. 211–236.
- ✓ Bensasson D., Zhang DX., Hartl DL, Hewitt GM. 2001. Mitochondrial pseudogenes: Evolution 's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution* 16 : 314-321.
- ✓ Bibb M. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26 : 167-180.
- ✓ Bird CE., Holland BS., Bowen BW., Toonen RJ. 2007. Contrasting phylogeography in three endemic Hawaiian limpets (*Cellana* spp.) with similar life histories. *Molecular Ecology* 16 : 3173-3186.
- ✓ Blanco-Bercial L., Bradford-Grieve J., Bucklin A. 2011. Molecular phylogeny of the Calanoida (Crustacea : Copepoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59 : 103-113.
- ✓ Bligh EG., Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Revue canadienne de biochimie et physiologie* 37 : 911-917.
- ✓ Boëchat IG., Adrian R. 2006. Evidence for biochemical limitation of population growth and reproduction of the rotifer *Keratella quadrata* fed with freshwater protists. *Journal of Plankton Research* 28 : 1027-1038.
- ✓ Boorman LA. 1999. Salt marshes – present functioning and future change. *Mangroves and salt marshes* 3 : 227-241.

- ✓ Born C. 2007. Diversité génétique et dynamique des forêts d'Afrique centrale –Une étude multi-échelle de la structure de la diversité génétique d'un arbre pionnier, *Aucoumea klaineana*, PhD thesis, Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- ✓ Borowitzka MA., Borowitzka LJ., Kessly D. 1990. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology* 2 : 111-119.
- ✓ Bougis P. 1974. *Ecologie du plancton marin*. Masson & Cie (ed), Paris. Coll. *Ecologie* 2 : 196 p. 3 : 200 pp.
- ✓ Boxshall GA. 1985. The comparative anatomy of two copepods, a predatory calanoid and a particle-feeding momonilloida. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 311 : 303-377.
- ✓ Boxshall GA, Halsey SH. 2004. *An Introduction to Copepod Diversity*. Ray Society, London, Publication No. 166, 2 vols., pp. xv+966.
- ✓ Bradford-Grieve JM. 1994. Pelagic Calanoid Copepoda : Megacalanidae, Calanidae, Paracalanidae, Mecynoceridae, Eucalanidae, Spinocalanidae, Clausocalanidae. *New Zealand Oceanographic Institute Memoir* 102 : 1-160.
- ✓ Bradford-Grieve JM., Markhaseva EL., Rocha CEF., Abiahy B. 1999. South Atlantic Zooplankton (Volume 2. Edited by Boltovsky, Backhuys Publishers, Leiden, the Netherlands, pp. 869-1098.
- ✓ Bray L. 2009. L'espèce, discussion d'une notion intuitive. *Hommes et planètes* 43 : 32-35.
- ✓ Brett MT., Müller-Navarra DC., Ballantyne AP., Ravet JL., Goldman CR. 2006. *Daphnia* fatty acid composition reflects that of their diet. *Limnology and Oceanography* 51: 2428-2437.
- ✓ Britton RH., Johnson AR. 1987. An ecological account of a Mediterranean salina: the Salin de Giraud, Camargue (S. France). *Biological Conservation* 42 : 185-230.
- ✓ Browne RA., Mac Donald GH. 1982. Biogeography of the brine shrimp, *Artemia* : distribution of parthenogenetic and sexual populations. *Journal of Biogeography* 9 : 333-338.
- ✓ Bucklin A., Bentley AM., Franzen SP. 1998. Distribution and relative abundance of *Pseudocalanus moultoni* and *P. newmani* (Copepoda : Calanoida) on Georges Bank using molecular identification of sibling species. *Marine Biology* 132 : 97-106.

- ✓ Bucklin A., Kaartvedt S., Guarnieri M., Goswami U. 2000. Population genetics of drifting (*Calanus* spp.) and resident (*Acartia clausi*) plankton in Norwegian fjords. *Journal of Plankton Research* 22 : 1237-1251.
- ✓ Bucklin A., Frost BW., Bradford-Grieve J., Allen LD., Copley NJ. 2003. Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae. *Marine Biology* 142 : 333-343.
- ✓ Bucklin A., Frost BW. 2009. Morphological and molecular phylogenetic analysis of evolutionary lineages within *Clausocalanus* (Copepoda : Calanoidea). *Journal of Crustacean Biology* 29 : 111-120.
- ✓ Bucklin A., Ortman BD., Jennings RM., Nigro LM., Sweetman CJ., Copley NJ., Sutton T., Wiebe PH. 2010. A “Rosetta Stone” for metazoan zooplankton : DNA barcode analysis of species diversity of the Sargasso Sea (Northwest Atlantic Ocean). *Deep-Sea Research II* 57 : 2234-2247.
- ✓ Bucklin A., Steinke D., Blanco-Bercial L. 2011. DNA barcoding of marine metazoa. *Annual Review of Marine Science* 3 : 471-508.
- ✓ Budge SM., Iverson SJ., Koopman HN. 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using Fatty acids : a primer on analysis and interpretation. *Marine Mammal Science* 22 : 759-801.
- ✓ Burns JM., Janzen DH., Hajibabaei M., Hallwachs W., Hebert P.D.N. 2008. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 : 6350-6355.
- ✓ Burton RS., Lee BN. 1994. Nuclear and mitochondrial gene genealogies and allozyme polymorphism across a major phylogeographic break in the copepod *Tigriopus californicus*. *Proceeding of the National Academy of Science* 91 : 5197-5201.
- ✓ Burton RS., Metz EC., Flowers JM., Willett CS. 2005. Unusual structure of ribosomal DNA in the copepod *Tigriopus californicus* : intergenic spacer sequences lack internal subrepeats. *Gene* 344 : 105-113.
- ✓ Burton RS., Byrne RJ., Rawson PD. 2007. Three divergent mitochondrial genomes from California populations of the copepod *Tigriopus californicus*. *Gene* 403 : 53-59.

## C

- ✓ Calbet A., Garrido S., Saiz E., Alcaraz M., Duarte CM. 2001. Annual zooplankton succession in coastal NW Mediterranean waters: the importance of the smaller fractions. *Journal of Plankton Research* 23 : 319-331.
- ✓ Calbet A., Carlotti F., Gaudy R. 2007. The feeding ecology of the copepod *Centropages typicus* (Kröyer). *Progress in Oceanography* 72 : 137-150.
- ✓ Camacho AI., Dorda BA., Rey I. 2011. Identifying cryptic speciation across groundwater population : first COI sequences of bathynellidae (crustacea, syncarida). *Graellsia* 67 : 7-12.
- ✓ Camus T., Zeng C. 2009. The effects of stocking density on egg production and hatching success, cannibalism rate, sex ratio and population growth of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture* 287 : 145-151.
- ✓ Caramujo MJ., Boschker HTS., Admiraal W. 2008. Fatty acid profiles of algae mark the development and composition of harpacticoid copepods. *Freshwater Biology* 53 : 77-90.
- ✓ Caudill CC., Bucklin A. 2004. Molecular phylogeography and evolutionary history of the estuarine copepod, *Acartia tonsa*, on the Northwest Atlantic coast. *Hydrobiologia* 511 : 91-102.
- ✓ Cepeda GD., Blanco-Bercial L., Bucklin A., Beron CM., Vinas MD. 2012. Molecular Systematic of Three Species of *Oithona* (Copepoda, Cyclopoida) from the Atlantic Ocean: Comparative Analysis Using 28S rDNA. *PLoS ONE* / e35861.
- ✓ Chang KH., Hanazato T. 2003. Seasonal and reciprocal succession and cyclomorphosis of two *Bosmina* species (Cladocera, Crustacea) co-existing in a lake: their relationship with invertebrate predators. *Journal of Plankton Research* 25: 141-150.
- ✓ Chen CA., Chen CP., Fan TY., Yu JK., Hsieh HL. 2002. Nucleotide Sequences of Ribosomal Internal Transcribed Spacers and Their Utility in Distinguishing Closely Related *Perinereis* Polychaets (Annelida; Polychaeta; Nereididae). *Marine Biotechnology* 4 : 17-29.
- ✓ Chen G., Hare MP. 2011. Cryptic diversity and comparative phylogeography of the estuarine copepod *Acartia tonsa* on the US Atlantic coast. *Molecular Ecology* 20 : 2425-2441.

- ✓ Chen J., Li Q., Kong L., Yu H. 2011. How DNA Barcodes Complement Taxonomy and Explore Species Diversity : The Case Study of a Poorly Understood Marine Fauna. PLoS One 6 DOI : 10.1371/journal.pone.0021326.
- ✓ Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson TJ., Higgins DG., Thompson JD. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Research 31 : 3497-3500.
- ✓ Chidambara Murthy KN., Vanitha A., Rajesha J., Mahadeva Swamy M., Sowmya PR., Ravishankar GA. 2005. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*—a green microalga. Life Sciences 76 : 1381-1390.
- ✓ Clegg JS., Willsie JK., Jackson SA. 1999. Adaptive Significance of a Small Heat Shock/a-Crystallin Protein (p26) in Encysted Embryos of the Brine Shrimp, *Artemia franciscana*. American Zoologist 39 : 836-847.
- ✓ Clough M., Summers K. 2000. Phylogenetic systematics and biogeography of the poison frogs : evidence from mitochondrial DNA sequences. Biological Journal of Linnean Society 70 : 515-540.
- ✓ Colburn EA. 1988. Factors influencing species diversity in saline waters of Death Valley, USA. Hydrobiologia 158: 215-226.
- ✓ Copin-Montaigut G. 2002. Chimie de l'eau de mer. Editeur : Institut Océanographique. Collection synthèse.
- ✓ Costa FO., DeWaard JR., Boutillier JB., Ratnasingham S., Dooh RT., Hajibabaei M., Hebert PDN. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 64 : 272-295.
- ✓ Cracraft J. 1989. Speciation and its ontology : the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. P. 28-59 in Otte D., Endler JA., editors. Speciation and its consequences. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- ✓ Cripps GC., Atkinson A. 2000. Fatty acid composition as an indicator of carnivory in Antarctic krill, *Euphausia superba*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 57 : 31-37.

## D

- ✓ Dahms HU. 2004. Postembryonic apomorphies proving the monophyletic status of the Copepoda. Zoological Studies 43 : 446-653.

- ✓ Dalsgaard J., St John M., Kattner G., Müller-Navarra D., Hagen W. 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology* 46 : 225-340.
- ✓ Darwin C. 1859. L'origine des espèces au moyen de la sélection naturelle ou la lutte pour l'existence dans la nature. P. 72 in Alfred Costes, Éditeur, Paris, France.
- ✓ Davis JS., Giordano M. 1996. Biological and physical events involved in the origin, effects and control of organic matter in solar saltworks. *International Journal of Salt Lake Research* 4 : 335-347.
- ✓ Davis JS. 2000. Structure, function, and management of the biological system for seasonal solar saltworks. *Global Nest Journal* 2 : 217-226.
- ✓ De Los Santos C., Sorgeloos P., Lavina E., Bernardino A. 1980. Successful inoculation of *Artemia* and production of cysts in manmade salterns in the philippines : 159-163. In : *The brine shrimp Artemia*. Vol.3. Ecology, culturing, Use in aquaculture. Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E.(Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 456 p.
- ✓ Delsuc F., Douzery EJP. 2004. Les méthodes probabilistes en phylogénie moléculaire, les modèles d'évolution des séquences et le maximum de vraisemblance. *Biosystema* 22, Avenir et pertinence des méthodes d'analyse en phylogénie moléculaire, 59-74p.
- ✓ Denis F., Ravallec R., Pavillon JF., van Wormhoudt A. 2009. Genetic differentiation of Atlantic populations of the intertidal copepod *Tigriopus brevicornis*. *Scientia Marina* 73 : 579-587.
- ✓ Desvilettes C., Bourdier G., Breton J.C. 1997. On the occurrence of a possible bioconversion of linolenic acid into docosahexaenoic acid by the copepod *Eucyclops serrulatus* fed on microalgae. *Journal of Plankton Research* 19 : 273-278.
- ✓ De Vienne D. 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA éditions. 200p.
- ✓ De-Young B., Heath M., Werner F., Megrey B., Monfray P. 2004. Challenges of modeling ocean basin ecosystems. *Science* 304 : 1463-1466.
- ✓ Dilling L., Wilson J., Steinberg DK., Alldredge AL. 1998. Feeding by the euphausiid *Euphosia pacifica* and the copepod *Calanus pacificus* on marine snow. *Marine Ecology Progress Series* 170 : 189-201.
- ✓ Dinçer AR., Kargı F. 1999. Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline wastewater. *Environmental Technology* 20 : 1147-1153.



- ✓ Dippenaar SM., Mathibela RB., Bloomer P. 2010. Cytochrome oxidase I sequences reveal possible cryptic diversity in the cosmopolitan symbiotic copepod *Nesippus orientalis* Heller, 1868 (Pandaridae : Siphonostomatoida) on elasmobranch hosts from the KwaZulu-Natal coast of South Africa. *Experimental Parasitology* 125 : 42-50.
- ✓ Dobbeleir J., Adam N., Bossuyt E., Bruggeman E., Sorgeloos P. 1980. New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp : 165-174. In : *The brine shrimp Artemia*. Vol.3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E.(Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 456p.
- ✓ Dolapsakis NP., Tafas T., Abatzopoulos TJ., Ziller S., Economou–Amilli A. 2005. Abundance and growth response of microalgae at Megalon Embolon solar saltworks in northern Greece : An aquaculture prospect. *Journal of Applied Phycology* 17 : 39-49.
- ✓ Dolbeth M., Martinho F., Viegas I., Cabral HN., Pardal M.A. 2008. Estuarine production of resident and nursery fish species : Conditioning by drought events? *Estuarine Coastal And Shelf Science* 78 : 51-60.
- ✓ Drillet G., Frouël S., Sichlau MH., Jepsen PM., Hojgaard JK., Joarder AK., Hansen BW. 2011. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture* 315 : 155-166.
- ✓ Drira Z., Bel Hassen M., Hamza A., Rebai A., Bouaïn A., Ayadi H., Aleya L. 2009. Coupling of phytoplankton community structure to nutrients, ciliates and copepods in the Gulf of Gabes (South Ionian Sea, Tunisia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90 : 1203-1215.
- ✓ Duminil J., Michele DM. 2009. Plant species delimitation : A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystem* doi : 10.1080/11263500902722964.
- ✓ Dussart BH. 1984. A propos du répertoire mondial des Calanoïdes des eaux continentales. *Crustaceana* : 25-31 pp.

## E

- ✓ Easton EE., Darrow EM., Spears T., Thistle D. 2014. The mitochondrial genomes of *Amphiascoides atopus* and *Schizopera knabeni* (Harpacticoida: Miraciidae) reveal similarities between the copepod orders Harpacticoida and Poecilostomatoida. *Gene* 538 : 123-137.

- ✓ Edmar, 2002. Endocrine Disruption in the Marine Environment Programme. Department for Environment Food and Rural Affairs. [http://www.defra.gov.uk/ENVIRONMENT/chemicals/hormone/pdf/edmar final.pdf](http://www.defra.gov.uk/ENVIRONMENT/chemicals/hormone/pdf/edmar%20final.pdf).
- ✓ Elevi Bardavid R., Oren A. 2008. Dihydroxyacetone metabolism in *Salinibacter ruber* and in *Haloquadratum walsbyi*. *Extremophiles* 12 : 125-131.
- ✓ Elgmork K., Halvorsen G. 1998. Intraspecific morphological variation in a freshwater copepod (Crustacea) in relation to geographic distribution and environment. *Canadian Journal of Zoology* 76 : 751-762.
- ✓ Elloumi J., Carrias JF., Ayadi H., Sime-Ngando T., Boukhris M., Bouain A. 2006. Composition and distribution of planktonic ciliates from ponds of different salinity in the solar saltwork of Sfax, Tunisia. *Estuarine Coastal Shelf Science* 67: 21-29.
- ✓ Elloumi J., Guermazi W., Ayadi H., Bouaïn A., Aleya L. 2008. Detection of water and sediments pollution of an arid Saltern (Sfax, Tunisia) by coupling the distribution of microorganisms with hydrocarbons. *Water, Air, and Soil Pollution* 187 : 157-171.
- ✓ Elloumi J., Guermazi W., Ayadi H., Bouaïn A., Aleya L. 2009. Abundance and biomass of prokaryotic and eukaryotic microorganisms coupled with environmental factors in an arid multi-pond solar saltern (Sfax, Tunisia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 89 : 243-253.
- ✓ El-Sabaawi R., Dower JF., Kainz M., Mazumder A. 2009. Characterizing dietary variability and trophic positions of coastal calanoid copepods : insight from stable isotopes and fatty acids. *Marine Biology* 156 : 225-237.
- ✓ Evagelopoulos A., Spyrakos E., Koutsoubas D. 2007. The biological system of the lower salinity ponds in Kalloni Saltworks (NE. Aegean Sea, Greece) : phytoplankton and macrobenthic invertebrates. *Transitional Waters Bulletin* 3 : 23-25.
- ✓ Evjemo JO., Tokle N., Vadstein O., Olsen Y. 2008. Effect of essential dietary fatty acids on egg production and hatching success of the marine copepod *Temora longicornis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 365 : 31-37.
- ✓ Excoffier L. 2007. Arlequin (v 3.11) : Software for Computational and Molecular Population Genetics. CMPG Laboratory, Zoological Institute, University of Berne, Switzerland.

## F

- ✓ Farhadian O., Kolivand S., Mahmoudi Khoshdarehgy M., Ebrahimi Dorch E., Mahboobii Soofiani N. 2013. Nutritional value of freshwater mesozooplankton

assemblages from Hanna Dam Lake, Iran, during a one-year study. Iranian Journal of Fisheries Sciences 12 : 301-319.

- ✓ Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. Journal Of Molecular Evolution 17 : 368-376.
- ✓ Figueroa D. 2011. Phylogenetic analysis of Ridgewayia (Copepoda : Calanoida) from the Galapagos and of a new species from the Florida keys with a reevaluation of the phylogeny of Calanoida. Journal of Crustacean Biology 31 : 153-165.
- ✓ Fisher RA. 1927. On Some Objections to Mimicry Theory : Statistical and Genetic. Transactions of the Entymological Society of London 75 : 269-278.
- ✓ Folch J., Lees M., Stanley GH. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry 226 : 497-509.
- ✓ Folmer O., Black M, Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3 : 294-299.
- ✓ Forget-Leray J., Landriau I., Minier C., Leboulenger F. 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). Marine Pollution Bulletin 60 : 288-294.
- ✓ Freire R., Insua A., Méndez J. 2005. *Cerastoderma glaucum* 5S ribosomal DNA : characterization of the repeat unit, divergence with respect to *Cerastoderma edule*, and PCR-RFLPs for the identification of both cockles. Genome 48 : 427-442.
- ✓ Froneman PW., Pakhomov EA., Perissinotto R., McQuaid CD. 1996. Role of microplankton in the diet and daily ration of Antarctic zooplankton species during austral summer. Marine Ecology Progress Series 143 : 15-3.
- ✓ Frontier S. 1973. Étude statistique de la dispersion du zooplancton. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 12 : 229 - 262.

## G

- ✓ Gasparini S. 2005. Observatoire Oceanologique de Villefranche, Université Pierre et Marie Curie.
- ✓ Goldstein DB., Schlotterer C. 1999. Microsatellites. Evolution and applications. Goldstein and Schlotterer eds, Oxford University Press.
- ✓ Gomez A., Serra M., Carvalho GR., Lunt DH. 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). Evolution 56 : 1431-1444.

- ✓ Gomez PI., Barriga A., Cifuentes AS., Gonzalez MA. 2003. Effects of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC30861) Chlorophyta. *Biological Research* 36 : 185-192.
- ✓ Graeve M., Kattner G., Hagen W. 1994. Diet-induced changes in the fatty acid composition of Arctic herbivorous copepods: Experimental evidence of trophic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 182 : 97-110.
- ✓ Greene CH., Pershing AJ. 2007. Changes in Arctic climate have contributed to shifts in abundances and seasonal cycles of a variety of species in the northwest Atlantic. *Science* 315 : 1084-1085.
- ✓ Gregor J., Marsalek B. 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll *a* : a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Research* 38 : 517-522.
- ✓ Guangxing L., Donghui X. 2009. Effects of Calanoid Copepod *Schmackeriapoplesiaas* a Live Food on the Growth, Survival and Fatty Acid Composition of Larvae and Juveniles of Japanese Flounder, *Paralichthysolivaceus*. *Journal of Ocean University of China* 8 : 359-365.
- ✓ Guerhazi W., Elloumi J., Ayadi H., Bouaïn A., Aleya L. 2008. Coupling changes in fatty acid and protein composition of *Artemia salina* with environmental factors in the Sfax solar saltern (Tunisia). *Aquatic Living Resources* 21 : 63-73.
- ✓ Guerhazi W., Ayadi H., Aleya L. 2009. Correspondence of the seasonal patterns of the brine shrimp, *Artemia salina* (Leach, 1819) (Anostraca) with several environmental factors in an arid solar saltern (Sfax, Southern Tunisia). *Crustaceana* 82 : 327-348.
- ✓ Guerhazi W., Masmoudi S., Boukhris S., Ayadi H., Morant-Manceau A. 2014. Under low irradiation, the light regime modifies growth and metabolite production in various species of microalgae. *Journal of Applied Phycology*. DOI 10.1007/s10811-014-0260-3.
- ✓ Guschina IA., Harwood JL. 2009. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In : Arts MT., Brett MT., Kainz MJ (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer, New York, pp 1-24.

H

- ✓ Haldane JBS. 1931. A Mathematical Theory of Natural Selection. Part VIII. Metastable Populations. Proceedings of the Cambridge Philosophical Society 27 : 137-142.
- ✓ Hammer UT. 1986. Saline lake ecosystems of the world. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 616 pp.
- ✓ Han-Liang C., De-Quan X., Ting-Ting W., Xue-Ping M., Hong-Ju J., Zhi-Guo D. 2006. Study on Sequences of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers of Clams Belonging to the Veneridae Family (Mollusca : Bivalvia). Acta Genetica Sinica 33 : 702-710.
- ✓ Harris DJ., Crandall KA. 2000. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda : Cambaridae) : implications for phylogenetic and microsatellite studies. Molecular Biology and Evolution 17 : 284-291.
- ✓ Harris R., Wiebe P., Lenz J., Skjoldal H.R. and Huntley M. (2000) Abundance and biomass of the ciliate community during a spring cruise in the Gulf of Gabes (East Mediterranean Sea, Tunisia). Acta Protozoologica 47:293–305.
- ✓ Harrison JS. 2004. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinia* (Decapoda : Pinnotheridae). Molecular Phylogenetics and Evolution 30 : 743-754.
- ✓ Hart CM., Gonzalez MR., Simpson EP., Hurlbert SH. 1998. Salinity and fish effects on Salton Sea microecosystems: zooplankton and nekton. Hydrobiologia 381 : 129-152.
- ✓ Hasegawa M., Kishino H., Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Molecular Biology and Evolution 22 : 160 - 174.
- ✓ Hays GC., Richardson AJ., Robinson C. 2005. Climate change and marine plankton. Trends in Ecology and Evolution 20 : 337-344.
- ✓ Hebert PDN., Ratnasingham S., Dewaard JR. 2003. Barcoding animal life : cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society, London B 270 (Suppl.), S96–S99.
- ✓ Hebert PDN., Penton EH., Burns JM., Janzen DH., Hallwachs W. 2004. Ten species in one : DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly

- Astraptes fulgerator*. Proceedings of the National Academy of Sciences 101 : 14812-14817.
- ✓ Heerkloss R., Brenning U., Ring M. 1990. Secondary production of calanoids (Copepoda, Crustacea) in Brackish waters. Limnology and Oceanography 20 : 65-69.
  - ✓ Heip C., Herman PMJ. 1985. The stability of a benthic copepod community. Marine Biology Section, Zoology Institute, State University of Ghent 2556-263.
  - ✓ Hendry AP., Vamosi SM., Latham SJ., Heilbuth J., Day T. 2000. Questioning species realities. Conservation Genetics 1 : 67-76.
  - ✓ Heptner MV., Ivanenko VN. 2002. Copepoda (Crustacea) of hydrothermal ecosystems of the World Ocean. Arthropoda Selecta 11 : 117-134.
  - ✓ Hermann D. 2011. Caractérisation d'éléments transposables de type marinier chez les microalgues marines. Thèse. Université du Maine. 268 p.
  - ✓ Hicks GRF., Coull BC. 1983. The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. Oceanography and Marine Biology 21 : 380-389.
  - ✓ Hillgruber N., Haldorson LJ., Paul AJ. 1995. Feeding selectivity of larval walleye pollock *Theragra chalcogramma* in the oceanic domain of the Bering Sea. Marine Ecology Progress Series 120 : 1-10.
  - ✓ Hillis DM., Dixon MT. 1991. Ribosomal DNA : molecular evolution and phylogenetic inference. Quarterly Review of Biology 66 : 411-453.
  - ✓ Ho JS. 1990. Phylogenetic analysis of copepod orders. Journal of Crustacean Biology 10 : 528-536.
  - ✓ Ho JS. 1994. Copepod Phylogeny - a Reconsideration of Huys-and-Boxhall Parsimony Versus Homology. Hydrobiologia 293 : 31-39.
  - ✓ Hodgkin J., Horvitz HR., Jasny BR., Kimble J. 1998. *C. elegans* : sequence to biology. Science DOI : 10.1126/science.282.5396.2011.
  - ✓ Hoffmeyer MS. 1994. Seasonal succession of Copepoda in the Bahia Blanca estuary. In Ferrari FD., Bradley BP (eds), Ecology and Morphology of Copepods. DH 102, Hydrobiologia 292/293 303 : 308.
  - ✓ Hopkins TL., Torres JJ. 1989. Midwater food web in the vicinity of a marginal ice zone in the western Weddell Sea. Deep-Sea Research 36 : 542-560.
  - ✓ Horváth Z., Vad CF., Tóth A., Zsuga K., Boros E., Vörös L., Ptacnik R. 2014. Opposing patterns of zooplankton diversity and functioning along a natural stress gradient: when the going gets tough, the tough get going. Oikos 123 : 461-471.

- ✓ Hou L., Bi X., Zou X., He C., Yang L., Qu R., Liu Z. 2006. Molecular systematics of bisexual *Artemia* populations. *Aquaculture Research* 37 : 671-680.
- ✓ Hui-kun D., Yan Z., Dong-dong Q., Wen-long L., Xue-jun H., Yong-xiu L., Xin D. 2012. Comparative Study on the Expression of Genes Involved in Carotenoid and ABA Biosynthetic Pathway in Response to Salt Stress in Tomato. *Journal of Integrative Agriculture* 11 : 1093-1102.
- ✓ Humes AG. 1994. How many copepods? *Hydrobiologia* 292/ 293 : 1-7.
- ✓ Huys R., Boxshall GA. 1991. *Copepod Evolution*. The Ray Society, London. 468p.
- ✓ Huys R., Llewellyn-Hughes J., Olson PD., Nagasawa K. 2006. Small subunit rDNA and Bayesian inference reveal *Pectenophilus ornatus* (Copepoda *incertae sedis*) as highly transformed Mytilicolidae, and support assignment of Chondracanthidae and Xarifiidae to Lichomolgoidea (Cyclopoida). *Biological Journal of the Linnean Society* 87 : 403-425.
- ✓ Huys R., Fatih F., Ohtsuka S., Llewellyn-Hughes J. 2012. Evolution of the bomolochiform superfamily complex (Copepoda: Cyclopoida): New insights from ssrDNA and morphology, and origin of umazuracolids from polychaete-infesting ancestors rejected. *International Journal for Parasitology* 42 : 71–92.

## I

- ✓ Imai H., Cheng JH., Hamasaki K., Numachi KI. 2004. Identification of four mud crab species (genus *Scylla*) using ITS-1 and 16S rDNA markers. *Aquatic Living Resources* 17 : 31-34.
- ✓ International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 460 : 860-921.

## J

- ✓ Jansen S., Riser CW., Wassmann P., Bathmann U. 2006. Copepod feeding behaviour and egg production during a dinoflagellate bloom in the North Sea. *Harmful Algae* 5 : 102-112.
- ✓ Jarne P., Lagoda, JL. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11 : 424-428.
- ✓ Jeffery NW., Elias-Gutierrez M., Adamowicz SJ. 2011. Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada. *PLoS One* 6, DOI : 10.1371/journal.pone.0018364.

- ✓ Jukes TH., Cantor CR. 1969. Evolution of Protein Molecules. New York: Academic Press. pp. 21-132.
- ✓ Jung SO., Lee YM., Park TJ., Park HG., Hagiwara A., Leung KMY., Dahms HU., Lee W., Lee JS. 2006. The complete mitochondrial genome of the intertidal copepod *Tigriopus* sp. (Copepoda, Harpactidae) from Korea and phylogenetic considerations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333 : 251-262.

## K

- ✓ Kabata Z. 1979. Parasitic copepoda of British fishes. Ray Society, 468 p.
- ✓ Kanazawa A., Teshima SI., Ono K. 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity of bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology* 63B : 295-298.
- ✓ Kappas I., Baxevanis AD., Maniatsi S., Abatzopoulos TJ. 2009. Porous genomes and species integrity in the branchiopod *Artemia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52 : 192-204.
- ✓ Kattner G., Graeve M., Hagen W. 1994. Ontogenetic and seasonal changes in lipid and fatty acid/alcohol compositions of the dominant Antarctic copepods *Calanus propinquus*, *Calanoides acutus* and *Rhincalanus gigas*. *Marine Biology* 118 : 637-644.
- ✓ Kattner G., Hagen W. 1995. Polar herbivorous copepods-different pathways in lipid biosynthesis. *ICES Journal of marine Science* 52 : 329-335.
- ✓ Kattner G., Hagen W. 2009. Lipids in marine copepods: latitudinal characteristics and perspective to global warming. In: Arts MT., Brett MT., Kainz MJ. (eds.), *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer, London, pp 257-280.
- ✓ Kchaou N., Elloumi J., Drira Z., Hamza A., Ayadi H., Bouaïn A., Aleya L. 2009. Distribution of ciliates in relation to environmental factors along the coastline of the Gulf of Gabes, Tunisia. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 83 : 414-424.
- ✓ Kelly JR., Scheibling RE. 2012. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Marine Ecology Progress Series* 446 : 1-22.
- ✓ Kerr KCR., Stoeckle MY., Dove DJ., Weigt LA., Francis CM. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes* 7 : 535-543.



- ✓ Khemakhem H., Elloumi J., Moussa M., Aleya L., Ayadi H. 2010. The concept of ecological succession applied to phytoplankton over four consecutive years in five ponds featuring a salinity gradient. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 88 : 33-44.
- ✓ Khemakhem H., Elloumi J., Ayadi H., Aleya L., Moussa M. 2013. Modelling the phytoplankton dynamics in a nutrient-rich solar saltern pond: predicting the impact of restoration and climate change. *Environmental Science and Pollution Research* 20 : 9057-9065.
- ✓ Ki JS., Lee KW., Park HG., Lee JS. 2009. The complete mitochondrial genome of the cyclopoid copepod *Paracyclops nana* : a highly divergent genome with novel gene order and atypical gene numbers. *Gene* 435 : 13-21.
- ✓ Kiener A. 1978. *Écologie, physiologie et économie des eaux saumâtres*. Coll. de biologie des milieux marins, 1, Masson, Paris, 220 p.
- ✓ Kiesling TL., Wilkinson E., Rabalais J., Ortner PB., McCabe MM., Fell JW. 2002. Rapid Identification of Adult and Naupliar Stages of Copepods Using DNA Hybridization Methodology. *Marine Biotechnology* 4 : 30-39.
- ✓ Kijewski T., Wijsman JWM., Hummel H., Wenne R. 2009. Genetic composition of cultured and wild mussels *Mytilus* from The Netherlands and transfers from Ireland and Great Britain. *Aquaculture* 287 : 292-296.
- ✓ Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 16 : 121 - 132.
- ✓ Knowlton N. 2000. Molecular genetics analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420 : 73-90.
- ✓ Kobbi-Rebai R., Annabi-Trabelsi N., Khemakhem H., Ayadi H., Aleya L. 2013. Impacts of restoration of an uncontrolled phosphogypsum dumpsite on the seasonal distribution of abiotic variables, phytoplankton, copepods, and ciliates in a man-made solar saltern. *Environmental Monitoring and Assessment* 185 : 2139-2155.
- ✓ Korovessis NA., Lekkas TD. 2000. Solar Saltworks Production Process Evolution – Wetland Function.” Post conference Symposium Proceedings in 6th Conference on Environmental Science and Technology. Pythagorion, Samos, 1st September 1999, GlobalNEST, Athens. pp 11-30.
- ✓ Kwok KWH., Leung KMY. 2005. Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda) : effects of temperature and salinity. *Marine Pollution Bulletin* 51 : 830-837.

L

- ✓ Laakmann S., Auel H., Kochzius M. 2012. Evolution in the deep sea: Biological traits, ecology and phylogenetics of pelagic copepods. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65 : 535-546.
- ✓ Lauritano C., Procaccini G., Ianora A. 2012. Gene expression patterns and stress response in marine copepods. *Marine Environmental Research* 76 : 22-31.
- ✓ Leblanc K., Hare CE., Boyd CW., Bruland KW., Sohst B., Pickmere S., Lohan MC., Buck K., Ellwood M., Hutchins DA. 2005. Fe and Zn effects on the Si cycle and diatom community structure in two contrasting high and low-silicate HNLC areas. *Deep-Sea Research I* 52 : 1842-1864.
- ✓ Lee RF., Nevenzel JC., Paffenhofer GA. 1971. Importance of wax esters and other lipids in the marine food : phytoplankton and copepods. *Marine Biology* 9 : 99-108.
- ✓ Lee MSY. 2003a. Species concepts and species reality : salvaging a Linnaean rank. *Journal of Evolutionary Biology* 16 : 179-188.
- ✓ Lee JS. 2003b. cDNA cloning of RhoA gene from the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda). *Korean Journal of Genetics* 25 : 403-408.
- ✓ Lee YM., Kim IC., Jung SO., Lee JS. 2005. Analysis of 686 expressed sequence tags (ESTs) from the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda). *Marine Pollution Bulletin* 51 : 757-768.
- ✓ Lei Y., Xu K., Ki Choi J., Pyo Hong H., Wickham SA. 2009. Community structure and seasonal dynamics of planktonic ciliates along salinity gradients. *European Journal of Protistology* 45 : 305-319.
- ✓ Letessier TB., Pond DW., McGill RAR., Reid WDK., Brierley AS. 2012. Trophic interaction of invertebrate zooplankton on either side of the Charlie Gibbs Fracture Zone/Subpolar Front of the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of Marine Systems* 94 : 174-184.
- ✓ Leu E., Falk-Petersen S., Kwasniewski S., Wulff A., Edvardsen K., Hessen DO. 2006. Fatty acid dynamics during the spring bloom in a high arctic fjord : Importance of abiotic factors versus community changes, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 63 : 2760-2779.
- ✓ Levinsen H., Nielsen TG. 2002. The trophic role of marine pelagic ciliates and heterotrophic dinoflagellates in arctic and temperate coastal ecosystems : A cross-latitude comparison. *Limnology and Oceanography* 47 : 427-439.

- ✓ Lonsdale DJ., Caron DA., Dennett MR., Schaffner R. 2000. Predation by *Oithona* spp. on protozooplankton in the Ross Sea, Antarctica. *Deep-Sea Research II* 47 : 3273-3283.
- ✓ Lorda JF., Fowler SW., Miquel JC., Baena AR., Jeffree RA. 2013.  $^{210}\text{Po}/^{210}\text{Pb}$  dynamics in relation to zooplankton biomass and trophic conditions during an annual cycle in northwestern Mediterranean coastal waters. *Journal of Environmental Radioactivity* 115 : 43-52.
- ✓ Lorenzen CJ. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments : Spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12 : 343-346.
- ✓ Lotufo GR. 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: Effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Marine Environmental Research* 44 : 149-166.

## M

- ✓ Machida RJ., Miya MU., Nishida M., Nishida S. 2002. Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea : Copepoda). *Marine Biotechnology* 4 : 406-417.
- ✓ Machida RJ., Miya MU., Nishida M., Nishida S. 2004. Large-scale gene rearrangements in the mitochondrial genomes of two calanoid copepods *Eucalanus bungii* and *Neocalanus cristatus* (Crustacea), with notes on new versatile primers for the srRNA and COI genes. *Gene* 332 : 71-78.
- ✓ Machida RJ., Miya MU., Nishida M., Nishida S. 2005. Molecular phylogeny and evolution of the pelagic copepod genus *Neocalanus* (Crustacea : Copepoda). *Marine Biology* 148 : 1071-1079.
- ✓ Machida RJ., Miya MU., Nishida M., Nishida S. 2006. Molecular phylogeny and evolution of the pelagic copepod genus *Neocalanus* (Crustacea : Copepoda). *Marine Biology* 148 : 1071-1079.
- ✓ Machida RJ., Hashiguchi Y., Nishida M., Nishida S. 2009. Zooplankton diversity analysis through single-gene sequencing of a community sample. *BMC Genomics*, 10 : 438 doi : 10.1186/1471-2164-10-438.
- ✓ Machida RJ., Tsuda A. 2010. Dissimilarity of Species and Forms of Planktonic *Neocalanus* Copepods Using Mitochondrial COI, 12S, Nuclear ITS, and 28S Gene Sequences. *PLoS One* 5, e10278.

- ✓ Magnusson K., Magnusson M., Östberg P., Granberg M., Tiselius P. 2007. Bioaccumulation of 14C-PCB 101 and 14C-PBDE 99 in the marine planktonic copepod *Calanus finmarchicus* under different food regimes. *Marine Environmental Research* 63 : 67-81.
- ✓ Makino W., Tanabe AS. 2009. Extreme population genetic differentiation and secondary contact in the freshwater copepod *Acanthodiptomus pacificus* in the Japanese Archipelago. *Molecular Ecology* 18 : 3699-3713.
- ✓ Makino W., Knox MA., Duggan IC. 2010. Invasion, genetic variation and species identity of the calanoid copepod *Sinodiptomus valkanovi*. *Freshwater Biology* 55 : 375-386.
- ✓ Mallatt JM., Garey JR., Shultz JW. 2004. Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference. First use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31 : 178-191.
- ✓ Mallatt J., Giribet G. 2006. Further use of nearly complete 28S and 18S rRNA genes to classify Ecdysozoa : 37 more arthropods and a kinorhynch. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40 : 772-794.
- ✓ Marcial HS., Hagiwara A., Snell TW. 2003. Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 : 3025-3030.
- ✓ Marcotte, B.M., 1982. Evolution within the Crustacea, Part 2, Copepoda. In: Abele, L.G. (Ed.), *The Biology of Crustacea, 1. Systematics, The Fossil Record, and Biogeography*. Academic Press, New York, pp. 185–197.
- ✓ Marques SC., Pardal MA., Mendes S., Azeiteiro UM. 2011. Using multitable techniques for assessing the temporal variability of species–environment relationship in a copepod community from a temperate estuarine ecosystem. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 405 : 59-67.
- ✓ Marrone F., Brutto SL., Hundsdoerfer AK., Arculeo M. 2013. Overlooked cryptic endemism in copepods: Systematics and natural history of the calanoid subgenus *Occidodiptomus* Borutzky 1991 (Copepoda, Calanoida, Diaptomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66 : 190-202.
- ✓ Martin JW., Davis GE. 2001. An updated classification of the recent Crustacea. *History Museum of Los Angeles County: Los Angeles, CA (USA) VII* : 123, Science Series 39.

- ✓ Marzio WDD., Castaldo D., Lorenzo TD., Cioccio AD., Sàenz ME., Galassi DMP. 2013. Developmental endpoints of chronic exposure to suspected endocrine-disrupting chemicals on benthic and hyporheic freshwater copepods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 96 : 86-92.
- ✓ Mauchline J. 1998. The Biology of Calanoid Copepods. *Advance Marine Biology* 33 : 1-710.
- ✓ Mayzaud P., Claustre H., Augier P. 1997. Spatial and life cycle changes in lipid and fatty-acid structure of the antarctic euphausiid *Eupausia superba*. In: Battaglia B., Valencia J., Walton DWH (eds), *Antarctic Communities*. Cambridge University Press, pp 284-294.
- ✓ Mayzaud P., Boutoute M., Noyon M., Narcy F., Gasparini S. 2013. Lipid and fatty acids in naturally occurring particulate matter during spring and summer in a high arctic fjord (Kongsfjorden, Svalbard). *Marine Biology* 160 : 383-398.
- ✓ McKinnon AD., Dugan S., Nichols PD., Rimmer MA., Semmens G., Robino R. 2003. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture* 223 : 89-106.
- ✓ Merritt TJC., Shi L., Chase MC., Rex MA., Etter RJ., Quattro JM. 1998. Universal cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7 : 7-11.
- ✓ Milligan PJ., Stahl EA., Schizas NV., Turner JT. 2010. Phylogeography of the copepod *Acartia hudsonica* in estuaries of the northeastern United States. *Hydrobiologia* DOI 10.1007/s10750-010-0097-y.
- ✓ Minxiao W., Song S., Chaolun L., Xin S. 2011. Distinctive mitochondrial genome of Calanoid copepod *Calanus sinicus* with multiple large non-coding regions and reshuffled gene order : Useful molecular markers for phylogenetic and population studies. *BMC Genomics* 12 :73 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/73>.
- ✓ Möllmann C., Kornilovs G., Fetter M., Köster FW. 2004. Feeding ecology of central Baltic Sea herring and sprat. *Journal of Fish Biology* 65 : 1563-1581.
- ✓ Montiel-Martinez A., Ciroso-Pérez J., Ortega-Mayagoitia E., Elias-Gutiérrez M. 2008. Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiaptomus garciai* (Osorio-Tafall 1942) as a valid endemic species. *Journal of Plankton Research* 30 : 1079-1093.

- ✓ Mozetič P., Umani SF., Cataletto B., Malej A. 1998. Seasonal and inter-annual plankton variability in the Gulf of Trieste (northern Adriatic). ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil 55 : 711- 722.
- ✓ Müller-Navarra D C., Brett M., Park S., Chandra S., Ballantyne AP., Zorita E., Goldman SR. 2004. Unsaturated fatty acid content in seston and tropho-dynamic coupling in lakes. Nature 427 : 69-72.
- ✓ Muñoz J., Gomez A., Green AJ., Figuerola J., Amat F., Rico C. 2008. Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca). Molecular Ecology 17 : 3160-3177.
- ✓ Muths D., Tessier E., Bourjea J. 2008. Contribution de la génétique des populations à l'étude de la connectivité régionale de certaines espèces de poissons commerciaux présents dans la Réserve Naturelle Marine de La Réunion : étude de faisabilité. Synthèse finale Ifremer-Parc Marin Réunion, 23p.
- ✓ Myers AA., Giller PS. 1988. Analytical biogeography : an integrated approach to the study of animal and plant distributions, Chapman & Hall, London.

## N

- ✓ Nanton DA., Castell JD. 1999. The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as a live food for marine fish larvae. Aquaculture 175 : 167-181.
- ✓ Norsker NH., Stottrup JG. 1994. The importance of dietary HUFA's for fecundity and HUFA content in the harpacticoid *Tisbe holothuriae* Humes. Aquaculture 125 : 155-166.
- ✓ Nybakken JW. 2001. Plankton and Plankton Community. In : Marine biology : an ecological approach, 5th ed. pp. 38-93.

## O

- ✓ O'Bryen PJ., Lee CS. 2005. Culture of copepods and applications to marine finfish larval rearing workshop discussion summary. In : Lee C.S., O'Bryen P.J., Marcus N.H. (Eds.), Copepods in Aquaculture, pp. 245-253.
- ✓ O'Connell JL., Johnson LA., Smith LM., McMurry ST., Haukos DA. 2012. Influence of land-use and conservation programs on wetland plant communities of the semiarid United States Great Plains. Biological Conservation 146 : 108-115.

- ✓ Ohman MD., Hirche HJ. 2001. Density-dependent mortality in an oceanic copepod population. *Nature* 412 : 638-641.
- ✓ Olli K., Wassmann P., Reigstad M., Ratkova TN., Arashkevich E., Pasternak A., Matrai PA., Knulst J., Klais R., Jacobsen A. 2007. The fate of production in the central Arctic Ocean-top down regulation by zooplankton expatriates? *Progress in Oceanography* 72 : 84-113.

P

- ✓ Palero F., Crandall KA., Abelló P., Macpherson E., Pascual M. 2009. Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50 : 152-162.
- ✓ Parrish CC., McKenzie CH., MacDonald BA., Hatfield EA. 1995. Seasonal studies of seston lipids in relation to microplankton species composition and scallop growth in South Broad Cove, Newfoundland. *Marine Ecology Progress Series* 129 : 151-164.
- ✓ Parrish CC. 2009. Essential fatty acids in aquatic food webs. In: Arts MT., Brett MT., Kainz MJ. (eds.), *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer, New York.
- ✓ Parsons TR., Strickland JDH. 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *Journal of Marine Research* 21: 155-163.
- ✓ Perhar G., Arhonditsis GB., Brett MT. 2013. Modelling the role of highly unsaturated fatty acids in planktonic food web processes: Sensitivity analysis and examination of contemporary hypotheses. *Ecological Informatics* 13 : 77-98.
- ✓ Peters J., Dutz J., Hagen W. 2007. Role of essential fatty acids on the reproductive success of the copepod *Temora longicornis* in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series* 341 : 153-163.
- ✓ Petrussek A., Hobaek A., Nilssen JP., Skage M., Cerny M., Brede N., Schwenk K. 2008. A taxonomic reappraisal of the European *Daphnia longispina* complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda). *Zoologica Scripta* 37 : 507-519.
- ✓ Pfeiler E., Hurtado LA., Knowles LL., Torre-Cosao J., Bourillan-Moreno L., Marquez-Farias JF., Montemayor-Lopez G. 2005. Population genetics of the swimming crab *Callinectes bellicosus* (Brachyura : Portunidae) from the eastern Pacific Ocean. *Marine Biology* 146 : 559-569.

- ✓ Piché J., Iverson SJ., Parrish FA., Dollar R. 2010. Characterization of forage fish and invertebrates in the Northwestern Hawaiian Islands using fatty acid signatures : species and ecological groups. *MEPS* 418 : 1-15.
- ✓ Plounevez S., Champalbert G. 1999. Feeding behaviour and trophic environment of *Engraulis encrasicolus* (L.) in the Bay of Biscay. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 49 : 177-191.
- ✓ Pommier J., Frenette JJ., Massicotte P., Lapierre JF., Glémet H. 2012. Seston fatty acid composition and copepod RNA:DNA ratio with respect to the underwater light climate in fluvial Lac Saint-Pierre. *Aquatic Sciences* 74 : 539-553.
- ✓ Pryor VK., Epifanio CE. 1993. Prey selection by larval weakfish (*Cynoscion regalis*): the effects of prey size, speed, and abundance. *Marine Biology* 116:31–37.

## Q

- ✓ Quiroz-Vazquez P., Elias-Gutiérrez M. 2009. A new species of the freshwater cladoceran genus *Scapholeberis* Schoedler, 1858 (Cladocera : Anomopoda) from the semidesert Northern Mexico, Highlighted by DNA Barcoding. *Zootaxa* 2236 : 50-64.

## R

- ✓ Rajesh S., Kiruthika J., Ponniah AG., Shekhar MS. 2012. Identification, cloning and expression analysis of Catechol-*O*-methyltransferase (COMT) gene from shrimp, *Penaeus monodon* and its relevance to salinity stress. *Fish & Shellfish Immunology* 32 : 693-699.
- ✓ Ravet JL., Brett MT., Müller-Navarra DC. 2003. A test of the role of polyunsaturated fatty acids in phytoplankton food quality for *Daphnia* using liposome supplementation. *Limnology and Oceanography* 48 : 1938-1947.
- ✓ Ravet JL., Brett MT., Arhonditsis GB. 2010. The effects of seston lipids on zooplankton fatty acid composition in Lake Washington, Washington, USA. *Ecology* 91 : 180-190.
- ✓ Reydon TAC. 2004. Why does the species problem still persist? *BioEssays* 26 : 300-305.
- ✓ Rose M. 1933. Copépodes pélagiques. *Faune de la France* 26, 375 pp.
- ✓ Rossi S., Youngbluth MJ., Jacoby CA., Pagès F., Garrofé X. 2008. Fatty acid trophic markers and trophic links among seston, crustacean zooplankton and the siphonophore



*Nanomia cara* in Georges Basin and Oceanographer Canyon (NW Atlantic). *Scientia Marina* 72 : 403-416.

- ✓ Ruppert EE., Fox RS., Barnes RD. 2003. *Invertebrate Zoology. A Functional Evolutionary Approach*, 7th ed. Brooks/Cole-Thomson Learning, Belmont, CA, USA.

## S

- ✓ Sacchi C F. 1967. Rythmes des facteurs physico-chimiques du milieu saumâtre et leur emploi comme indice de production in problèmes de productivité biologique. Masson, Paris, 131-158.
- ✓ Sánchez MI., Green AJ., Castellanos EM. 2006. Temporal and spatial variation of an aquatic invertebrate community subjected to avian predation at the Odiel salt pans (SW Spain). *Archiv für Hydrobiologie* 166 : 199-223.
- ✓ Santha NC., Ackman RG. 1990. Nervonic acid versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatographic analyses of fish oil longer-chain n-3 polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography Biomedical Sciences and Applications* 553 : 1-10.
- ✓ Sargent JR. 1976. The structure, metabolism and function of lipids in marine organisms. *In: Malins DC., Sargent JR. (eds), Biochemical and biophysical perspective in marine biology*, vol. 3. Academic Press, London, pp 149-212.
- ✓ Sargent JR., Whittle KJ. 1981. Lipids and hydrocarbons in the marine food web. *In : Longhurst, A.R. (eds) Analysis of marine ecosystems* 491-533p.
- ✓ Sargent J., Bell JG., McEvoy LA., Tocher D., Estevez A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177 : 191-199.
- ✓ Savolainen V., Cowan R.S., Vogler AP., Roderick GK. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life : an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360 : 1805-1811.
- ✓ Schmidt K., Atkinson A. 2006. Protozoans as a food source for Antarctic krill, *Euphausia superba*: Complementary insights from stomach content, fatty acids, and stable isotopes. *Limnology and Oceanography* 51: 2409-2427.
- ✓ Schwentner M., Timms BV., Bastrop R., Richter S. 2009. Phylogeny of *Spinicaudata* (Branchiopoda, Crustacea) based on three molecular markers—an Australian origin for *Limnadopsis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53 : 716-725.
- ✓ Scor-Unesco. 1966. Determination of phytoplanktonic pigments in sea water. UNESCO, Paris.

- ✓ Scott CL., Kwasniewski S., Falk-Petersen S., Sargent JR. 2002. Species differences, origins and functions of fatty alcohols and fatty acids in the wax esters and phospholipids of *Calanus hyperboreus*, *C. glacialis* and *C. finmarchicus* from Arctic waters. *Marine Ecology Progress Series* 235 : 127-134.
- ✓ Segal RD., Waite AM., Hamilton DP. 2009. Nutrient limitation of phytoplankton in solar salt ponds in Shark Bay, Western Australia. *Hydrobiologia* 626 : 97-109.
- ✓ Seo JS., Lee YM., Park HG., Lee JS. 2006. The intertidal copepod *Tigriopus japonicus* small heat shock protein 20 gene (Hsp 20) enhances thermotolerance of transformed *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340 : 901-908.
- ✓ Shannon CE. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27: 379-23.
- ✓ Shao R., Baker SC. 2007. Mitochondrial genomes of parasitic arthropods : implications for studies of population genetics and evolution. *Parasitology* 134 : 153-167.
- ✓ Schwartz MK., Luikart G., Waples R. 2006. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *TRENDS in Ecology and Evolution* 22 : 25-33. doi:10.1016/j.tree.2006.08.009.
- ✓ Smith L., Euliss N., Wilcox D., Brinson M. 2008. Application of a geomorphic and temporal perspective to wetland management in North America. *Wetlands* 28 : 563-577.
- ✓ Smith LM., Haukos DA., McMurry ST., Lagrange T., Willis D. 2011. Ecosystem services provided by playas in the High Plains : potential influences of USDA conservation programs. *Ecological Applications* 21 : S82-S92.
- ✓ Staton JL., Schizas NV., Klosterhaus SL., Griffitt RJ., Chandler GT., Coull BC. 2002. Effect of salinity variation and pesticide exposure on an estuarine harpacticoid copepod, *Microarthridion littorale* (Pope), in the southeastern US. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 278 : 101-110.
- ✓ Stefano MD., Stefano LD., Congestri R. 2009. Functional morphology of micro- and nanostructures in two distinct diatom frustules. *Superlattices and Microstructures* 46 : 64-68.
- ✓ Stevens CJ., Deibel D., Parrish CC. 2004. Incorporation of bacterial fatty acids and changes in a wax ester-based omnivory index during a long-term incubation

experiment with *Calanus glacialis* Jaschnov. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 303 : 135-156.

- ✓ St. John M., Lund ED. 1996. Lipid biomarkers : linking the utilization of frontal plankton biomass to enhanced conditions of juvenile North Sea cod. Marine Ecology Progress Series 131 : 75-85.
- ✓ Stoeckle MY, Hebert PDN. 2008. Barcode of life : DNA tags help classify life. Scientific American 299 : 82-88.
- ✓ Strain HH., Manning WM., Hardin G. 1943. Chlorophyll *c* (Chlorofucine) of diatoms and dinoflagellates. Carnegie Institution of Washington, Division of Plant Biology, Stanford University, California, 655-668.
- ✓ Stubbs CD., Smith AD. 1990. Essential fatty acids in marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. Aquaculture 97 : 61-72.
- ✓ Sunnucks P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. Trends in Ecology and Evolution 15 : 199-203.

## T

- ✓ Tackx MLM., Bakker C., Van Rijswijk P. 1990. Zooplankton grazing pressure in the oosterschelde (The Netherlands). Netherlands Journal of Sea Research 25 : 405-415.
- ✓ Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics 105 : 437-460.
- ✓ Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10 : 512-526.
- ✓ Tang B., Zhou K., Song D., Yang G., Dai A. 2003. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea : Brachyura). Molecular Phylogenetics and Evolution 29 : 309-316.
- ✓ Tanguay JA., Reyes RC., Clegg JS. 2004. Habitat diversity and adaptation to environmental stress in encysted embryos of the crustacean *Artemia*. Journal of Biosciences 29 : 489-501.
- ✓ Tezuka Y. 1990. Bacterial regeneration of Ammonium and Phosphate as affected by the Carbon: Nitrogen: Phosphorus ratio of organic substrates. Microbial Ecology 19 : 227-238.

- ✓ Thiéry A., Puente L. 2002. Crustacean assemblage and environmental characteristics of a man-made solar saltwork in southern France, with emphasis on anostracan (Branchiopoda) population dynamics. *Hydrobiologia* 486 : 191-200.
- ✓ Thioulouse J. 2011. Simultaneous analysis of a sequence of paired ecological tables : a comparison of several methods. *The Annals of Applied Statistics* 5 : 2300-2325.
- ✓ Thum R. 2004. Using 18S rDNA to resolve diaptomid copepod (Copepoda: Calanoida: Diaptomidae) phylogeny: an example with the North American genera. *Hydrobiologia*, 519 : 135-141.
- ✓ Tjensvoll K., Hodneland K., Nilsen F., Nylund A. 2005. Genetic characterization of the mitochondrial DNA from *Lepeophtheirus salmonis* (Crustacea : Copepoda). A new gene organization revealed. *Gene* 353 : 218-230.
- ✓ Toon A., Finley M., Staples J., Crandall KA. 2009. Decapod phylogenetics and molecular evolution. In : Martin J., Crandall KA., Felder, D. (Eds.), *Decapod Crustacean Phylogenetics*. CRC Press, Boca Raton, pp. 9-24.
- ✓ Torrentera L., Dodson SI. 2004. Ecology of the brine shrimp *Artemia* in the Yucatan, Mexico, Salterns. *Journal of plankton research* 26 : 617-624.
- ✓ Toth G., Gaspari Z., Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes : survey and analysis. *Genome Research* 10 : 967-981.
- ✓ Toumi N., Ayadi H., Abid O., Carrias JF., Sime-Negando T., Boukhriss M., Bouain A. 2005. Zooplankton distribution in four ponds of different salinity : a seasonal study in the Solar Saltern of Sfax (Tunisia). *Hydrobiologia* 534 : 1-9.
- ✓ Trang BQ. 2006. Analyse de l'évolution phylétique de crustacés décapodes et de l'évolution moléculaire des éléments mobiles de la famille mariner présents chez ces organismes. Thèse de doctorat de l'université du Maine, France. pp 198.
- ✓ Triantaphyllidis GV., Abatzopoulos TJ., Miasa E., Sorgeloos P. 1996. International study on *Artemia*. LVI. Characterization of two *Artemia* populations from Namibia and Madagascar : cytogenetics, biometry, hatching characteristics and fatty acid profiles. *Hydrobiologia* 335 : 97-106.
- ✓ Tripp KJ., Collazo JA. 2003. Density and distribution of water boatmen and brine shrimp at a major shorebird wintering area in Puerto Rico. *Wetland Ecological Management* 11 : 331-341.
- ✓ Troch MD., Chepurnov V., Gheerardyn H., Vanreusel A., Olafsson E. 2006. Is diatom size selection by harpacticoid copepods related to grazer body size?. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology* 332 : 1-11.

- ✓ Turner JT. 1984. The Feeding Ecology of Some Zooplankters That are Important Prey Items of Larval Fish. NOAA Technical Report 7 : 1-28.

V

- ✓ Ueda H., Ohtsuka S. 1998. Redescription and taxonomic status of *Sinodiaptomus valkanovi*, a common limnoplanktonic calanoid copepod in Japan, with special comparison to the closely related *S. sarsi*. Hydrobiologia 379 : 159-168.

V

- ✓ Valentini A., Pompanon F., Taberlet P. 2008. DNA barcoding for ecologists. Trends in Ecology and Evolution 24 : 110-117.
- ✓ Vanderploeg HA., Cavaletto JF., Liebig JR., Gardner WS. 1998. *Limnocalanus macrurus* (Copepoda : Calanoida) retains a marine arctic lipid and life-cycle strategy in Lake Michigan. Journal of Plankton Research 20 : 1581-1597.
- ✓ Veefkind R. 2003. Carbon isotope ratios and composition of fatty acids : tags and trophic markers in pelagic organisms. Dissertation, the University of Victoria, Victoria, British Columbia, Canada.
- ✓ Vengadeshperumal N., Damotharan P., Rajkumar M., Perumal P., Vijayalakshmi S., Balasubramanian T. 2010. Laboratory culture and biochemical characterization of the calanoid copepod, *Acartia southwelli* Sewel, 1914 and *Acartia centrura* Giesbrecht, 1889. Advances in Biological Research 4 : 97-107.
- ✓ Vieira N., Amat F. 1996. Fluctuation in the zooplankton community in two solar salt ponds, Aveiro, Portugal. International Journal of Salt Lake Research 4 : 327-333.
- ✓ Vieira N., Bio A. 2011. Spatial and temporal variability of water quality and zooplankton in an artisanal salina. Journal of Sea Research 65 : 293-303.
- ✓ Vincent D., Slawyk G., L'Helguen S., Sarthou G., Gallinari M., Seuront L., Sautour B., Ragueneau O. 2007. Net and gross incorporation of nitrogen by marine copepods fed on <sup>15</sup>N-labelled diatoms : Methodology and trophic studies. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 352 : 295-305.
- ✓ von Reumont BM., Meusemann K., Szucsich NU., Dell'Ampio E., Gowri-Shankar V., Bartel D., Simon S., Letsch HO., Stocsits RR., Luan YX., Wägele JW., Pass G., Hadrys H., Misof B. 2009. Can comprehensive background knowledge be incorporated into substitution models to improve phylogenetic analyses? A case study

on major arthropod relationships. BMC Evolutionary Biology 9 : 1-19. doi:10.1186/1471-2148-9-119.

W

- ✓ Wägele JW., Mayer C. 2007. Visualizing differences in phylogenetic information content of alignments and distinction of three classes of long-branch effects. BMC Evolutionary Biology 7 : 1-24. doi:10.1186/1471-2148-7-147.
- ✓ Wang KS., Chai TJ. 1994. Reduction in omega 3 fatty acids by UV-B irradiation in microalgae. Journal of Applied Phycology 6 : 415-421.
- ✓ Ward RD., Hanner R., Hebert PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. Fish Biology 74 : 329-356.
- ✓ Watanabe T., Kitajima C., Fujita S. 1983. Nutritional value of live organisms used in Japan for mass propagation of fish. Aquaculture 34 : 115-143.
- ✓ Watson JD., Crick FHC. 1953. Molecular structure of nucleic acids. Nature 171 : 737-738.
- ✓ Wells PG. 1984. Marine ecotoxicological tests with zooplankton. In : Persoone, G., Jaspers, E., Claus, C. (Eds.), Ecotoxicological Testing for the Marine Environment, vol. 1. Inst. Mar. Sci. Res., Bredene, pp. 215-256.
- ✓ Wexels Riser C., Wassmann P., Reigstad M., Seuthe L. 2008. Vertical flux regulation by zooplankton in the northern Barents Sea during arctic spring. Deep-Sea Research II 55 : 2320-2329.
- ✓ Willett CS., Burton RS. 2002. Proline biosynthesis genes and their regulation under salinity stress in the euryhaline copepod *Tigriopus californicus*. Comparative Biochemistry and Physiology, part B : Biochemistry and Molecular Biology 132 : 739-750.
- ✓ Williams DD. 1980. Some relationships between stream benthos and substrate heterogeneity. Limnology and Oceanography 25 : 166-172.
- ✓ Williams WD. 1998. Salinity as a determinant of the structure of biological communities in salt lakes. Hydrobiologia 381 : 191-201.
- ✓ Williams ST., Donald KM., Spencer HG., Nakano T. 2010. Molecular systematics of the marine gastropod families Trochidae and Calliostomatidae (Mollusca : Superfamily Trochoidea). Molecular Phylogenetics and Evolution 54 : 783-809.
- ✓ Wilson AC., Cann RL., Carr SM., George M., Gyllensten UB., Helm-Bychowski KM., Higuchi RG., Palumbi SR., Prager EM., Sage RD., Stoneling M. 1985. Mitochondrial

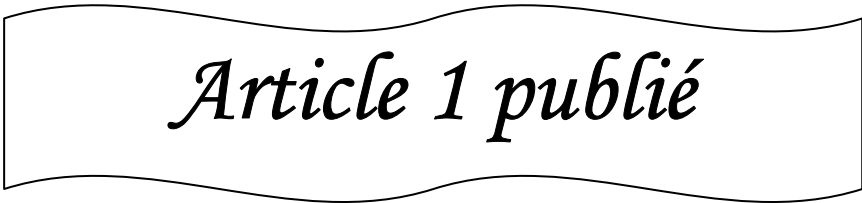
- DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26 : 375-400.
- ✓ Wilson SE., Steinberg DK., Buesseler KO. 2008. Changes in fecal pellet characteristics with depth as indicators of zooplankton repackaging of particles in the mesopelagic zone of the subtropical and subarctic North Pacific Ocean. *Deep-Sea Research II* 55 : 1636-1647.
  - ✓ Witt JDS., Threlloff DL., Hebert PDN. 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus : implications for desert spring conservation. *Molecular Ecology* 15 : 3073-3082.
  - ✓ Woese CR. 1987. Macroevolution in the microscopic world. In Patterson C (eds) *Molecules and morphology in evolution : Conflict or compromise?*. Cambridge, England, Cambridge Univ. Press. pp 176-202.
  - ✓ Wolff T. 1960. The hadal community, an introduction. *Deep Sea Research* 6 : 95-124.
  - ✓ Wollheim WM., Lovvorn JR. 1995. Salinity effects on macroinvertebrate assemblages and waterbird food webs in shallow lakes of the Wyoming High Plains. *Hydrobiologia* 310 : 207-233.
  - ✓ Wright S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16 : 97-159.
  - ✓ Wyngaard GA., Hołyn' ska M., Schulte II JA. 2010. Phylogeny of the freshwater copepod *Mesocyclops* (Crustacea: Cyclopidae) based on combined molecular and morphological data, with notes on biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55 : 753-764.

## Z

- ✓ Zhang LB., Simmons MP. 2006. Phylogeny and Delimitation of the Celastrales Inferred from Nuclear and Plastid Genes. *System Botany* 31 : 122-137.

*Annexes*





*Article 1 publié*

Ladhar C., Tastard E., Casse N., Denis F., Ayadi H. 2014.

Strong and stable environmental structuring of the  
zooplankton communities in interconnected salt ponds.

Hydrobiologia. DOI 10.1007/s10750-014-1998-y

*Strong and stable environmental structuring of the zooplankton communities in interconnected salt ponds*

**Chiraz Ladhar, Emmanuelle Tastard, Nathalie Casse, Françoise Denis & Habib Ayadi**

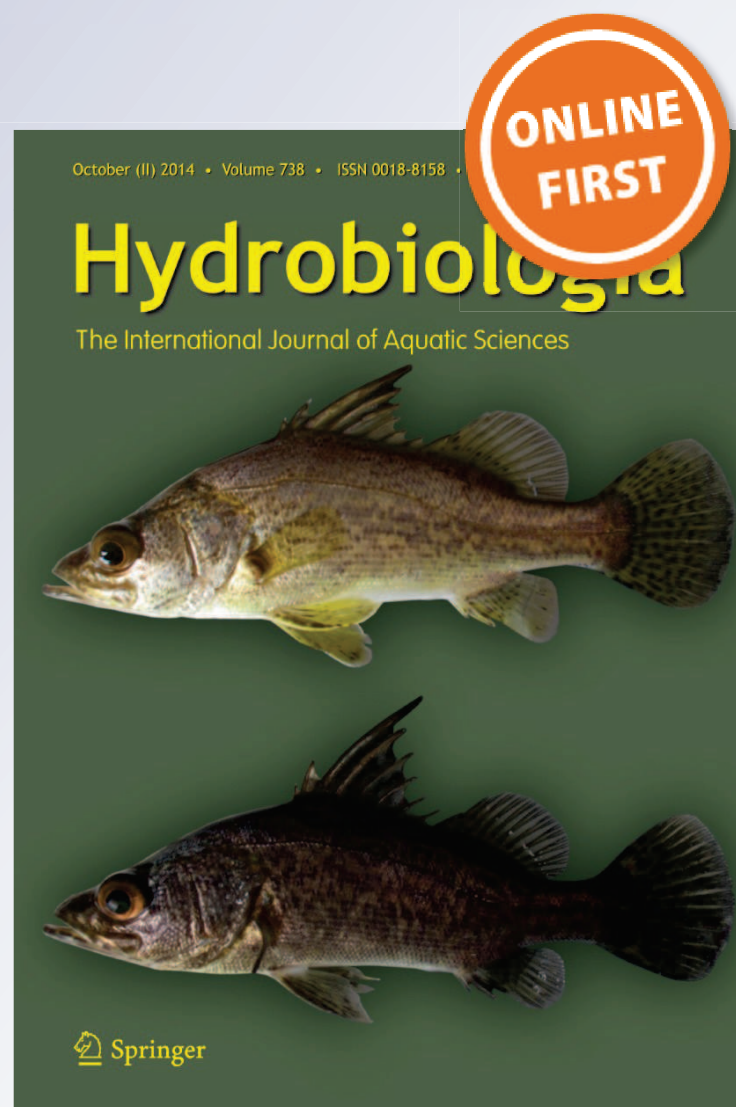
**Hydrobiologia**

The International Journal of Aquatic Sciences

ISSN 0018-8158

Hydrobiologia

DOI 10.1007/s10750-014-1998-y



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer International Publishing Switzerland. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

# Strong and stable environmental structuring of the zooplankton communities in interconnected salt ponds

Chiraz Ladhar · Emmanuelle Tastard ·  
Nathalie Casse · Françoise Denis · Habib Ayadi

Received: 6 January 2014 / Revised: 17 July 2014 / Accepted: 24 July 2014  
© Springer International Publishing Switzerland 2014

**Abstract** This study investigated assemblages of Copepoda and *Artemia* in saltern ponds and determined the main environmental factors affecting them. Copepoda and *Artemia* were collected from four ponds of varying salinity. Community composition was analyzed relative to environmental variables, with a focus on spatial and seasonal changes. We used a method called Costatis, which is particularly suited to analyze species and environmental data collected at the same sites and dates where the relationships between environmental conditions and composition of biological communities are strong and rather stable, which is the case in our system. The major structuring factors identified by Costatis were salinity and N:P ratio. Cyclopoida and Calanoida were associated with low salinity and low N:P ratios; Harpacticoida were associated with high salinity and high N:P ratios; and

*Artemia* were associated with very high salinity and low N:P ratios. The distribution of these groups over the salinity gradient is in accordance with previous results; the influence of N:P ratio had not been identified before and may reflect specific environmental requirements of the taxa.

**Keywords** Costatis · Zooplankton · Environmental variables · Salt marshes

## Introduction

Wetlands are discerned as essential ecosystems due to their ecological and economic importance. They act as biodiversity refugia and contribute to production of biochemicals, of food resources, and of energy (Smith et al., 2011; O'Connell et al., 2012). They are particularly vulnerable to activities in surrounding

---

Chiraz Ladhar and Emmanuelle Tastard are first co-authors.

---

Handling editor: Karl E. Havens

---

C. Ladhar · E. Tastard · N. Casse  
PRES LUNAM, Université du Maine, Laboratoire Mer,  
Molécules, Santé (EA2160), Avenue Olivier Messiaen,  
72085 Le Mans Cedex 9, France

C. Ladhar · H. Ayadi  
Département des Sciences de la Vie, Unité de recherche  
UR/05ES05, Biodiversité et Ecosystème Aquatiques,  
Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax, Route  
soukra Km 3.5, B.P. 1171, CP 3000 Sfax, Tunisia

F. Denis  
UMR BOREA «Biologie des Organismes et Ecosystèmes  
Aquatiques», Muséum National d'Histoire Naturelle  
(MNHN), CP 26, 43, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05,  
France

F. Denis (✉)  
Station de biologie Marine Muséum National d'Histoire  
Naturelle (MNHN), BP 225, 29182 Concarneau, France  
e-mail: fdenis@mnhn.fr; francoise.denis@univ-lemans.fr

area (Smith et al., 2008). Their degradation can have negative ecological, economic, and sociological effects (O'Connell et al., 2012). Inland saline biotopes include various aquatic environments such as lagoons, marshes, ponds, deltas, natural, and artificial lakes. Among them, some constitute transitional biotopes located between marine and continental ecosystems. They include salterns, which are divided into several interconnected shallow ponds where salinity increases from marine water to crystalliser ponds. In the last ones, salt precipitates (Abid et al., 2008; Guermazi et al., 2008; Khemakem et al., 2010). Species living in such habitats have to develop adaptative strategies to survive and reproduce. Despite the work done in the field (e.g., Oren, 2001; Thiéry & Puente, 2002; Torrentera & Dodson, 2004; Dolapsakis et al., 2005; Sánchez et al., 2006; Abid et al., 2008; Khemakem et al., 2010), much remains to be discovered regarding the relationships among biotic and abiotic factors in hypersaline environments.

In all aquatic environments, zooplankton has a fundamental ecological importance on account of its key position in the trophic web (Elloumi et al., 2009; Damotharan et al., 2010) and in the biochemical cycles (Leandro et al., 2014; Bickel & Tang, 2014). Zooplankton organisms are considered as secondary producers between primary producers (phytoplankton) and higher trophic levels such as planktivorous larval fish and birds (Hays et al., 2005; Sánchez et al., 2006; Letessier et al., 2012; Gascón et al., 2013; Rodríguez-Climent et al., 2013).

Some studies have been conducted on zooplankton in saltern biotopes (e.g., Davis, 2000; Thiéry & Puente, 2002) and most of them showed a strong effect of salinity on the distribution of zooplankton but few studies characterized the influence of other environmental factors (Vieira & Bio, 2011). Within zooplankton, copepods and Artemiidae are the most abundant groups in hypersaline ecosystems (Alonso, 1990; Torrentera & Dodson, 2004; Guermazi et al., 2008; Khemakem et al., 2010). Copepods can survive in various ecosystems. These crustaceans play a major role in the flow of energy and matter (De-Young et al., 2004) and in biogeochemical cycles (Lorda et al., 2013). Copepods are able to respond to environmental alterations (Greene & Pershing, 2007), therefore they can be considered as good biological indicator species (Hays et al., 2005; Drira et al., 2009; Marques et al., 2011). This ability allows them to develop in extreme environments including

salterns. Likewise, Artemiidae are also abundant in salterns; they are able to survive in stressful conditions like extreme salinity, high or low temperature, and anoxia (Torrentera & Dodson, 2004). Artemiidae are actively involved in the functioning of the saltern (Bruce & Imberger, 2009). Salt production is not only due to a physical process of evaporation depending on warm and dry weather (Vieira & Bio, 2011), but is also related to these brine organisms and biological processes (Davis, 2000; Davis & Giordano, 1996).

So, due to their key role in ecology and economy, understanding the structure of zooplankton communities living in extreme environment becomes critical for such biotope. Previous works aimed to study the population dynamics and environmental characteristics (Hart et al., 1998; Thiéry & Puente, 2002), the ecology (Torrentera & Dodson, 2004), the growth of microalgae (Dolapsakis et al., 2005), the spatial and temporal variability of water quality, and zooplankton (Vieira & Bio, 2011) in different types of salterns. In the target area, some studies have illustrated the distribution of zooplankton (Ayadi et al., 2002; Toumi et al., 2005), the biochemical adaptation (Abid et al., 2008), and ecological succession (Khemakem et al., 2010) of phytoplankton.

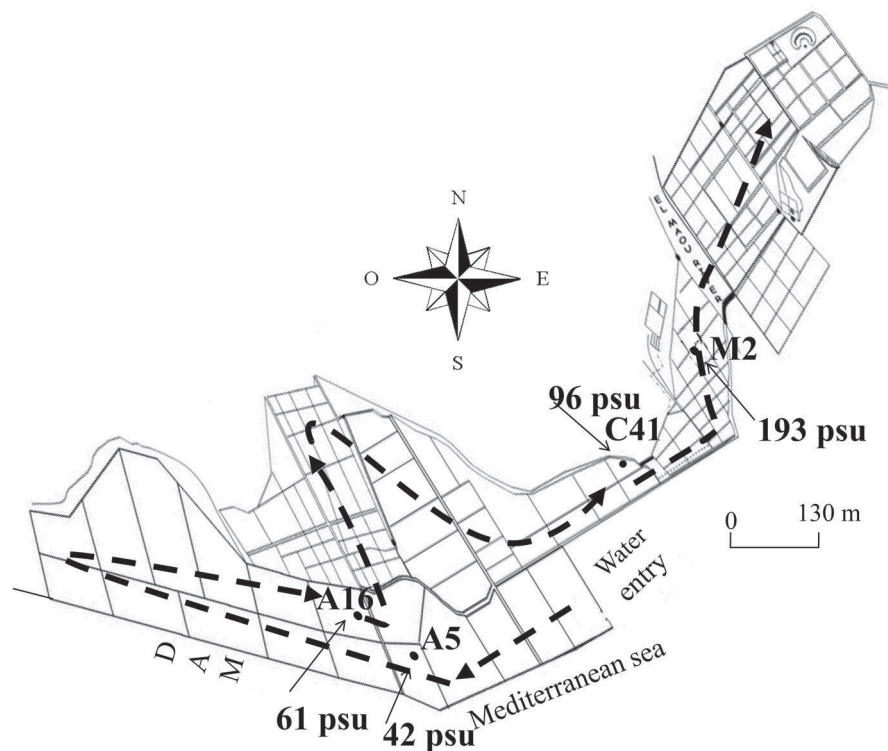
The major objective of this study is to deepen our knowledge on the community structure of the two main zooplankton groups (copepods and Artemiidae) in relation to environmental parameters, taking into account inter-pond and seasonal intra-pond variation. Some methods have been developed specifically to address such issues using species and environmental data collected at different sites and at different dates (Thioulouse et al., 2004; Thioulouse, 2011). These methods allow pointing out the relationships between species and environment on different sites, taking into account the temporal variation. Among them, the most convenient method depends on the global temporal variation pattern. Costatis is particularly suitable when the relationships between species and environment are strong and prominent relative to the temporal structure (Thioulouse, 2011).

## Materials and methods

### Study site and sampling

The solar saltern of Sfax is one of the most important salt producing hydro-systems in Tunisia (300 000 tons

**Fig. 1** Location of the sampled ponds (A5, A16, C41 and M2) in the solar saltern of Sfax. Arrows indicate the direction of the water flow in the saltern



per year). This artificial system is situated on the central eastern coastline of Tunisia (34°39'N and 10°42'E). The study site is composed of several interconnected ponds (20–70 cm depth) covering an area of 1500 ha. It occupies nearly 12 km along the southern coast of Sfax. An artificial seawall (4 m height) separates the solar saltern from the sea. The input of seawater and the circulation between the various ponds depend on the meteorological conditions. Water salinity varies from 40 psu in the first ponds to 400 psu in the last ones (Amdouni, 2009). Moreover, the saltern is located near an industrial zone. It happens that urban and industrial wastewater is discharged through a canal located near the salina before flowing in the sea. Sampling started on the 15th of June 2010 and ended on the 15th of May 2011. A sampling was performed once every 2 weeks. Samples were collected from four ponds (A5, A16, C41 and M2) of increasing salinity (42, 61, 96, and 193 psu, respectively) (Fig. 1).

#### Physical, chemical and biological parameters

Temperature was measured immediately in the field using a mercury glass thermometer graduated in

0.1°C. Salinity and pH were estimated using a salinometer and a Met Rohm type pH meter, respectively.

Magnesium carbonate ( $\text{MgCO}_3$ ) was added to water samples to fix photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, *c* and carotenoids). Then the samples were filtered by vacuum through Whatman GF/C glass fiber filters (0.45  $\mu\text{m}$ ). These filters were immediately stored at  $-20^\circ\text{C}$  until being extracted using acetone and read by spectrophotometer. The concentrations were then estimated using the equations proposed by Scor-Unesco (1966) for chlorophyll *a* and *c* and Parsons & Strickland (1963) for carotenoids. Samples for nutrient analysis were filtered and immediately frozen upon collection in the dark ( $-20^\circ\text{C}$ ). Nutrients ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and  $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) were analyzed with a Bran and Luebbe autoanalyzer type 3. Assimilable nitrogen ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) and phosphorus ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) are very important nutrients for growth of phytoplankton. The N:P ratio represents the DIN:DIP ratio where DIN is the dissolved inorganic nitrogen (the sum  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ ) and DIP is the dissolved inorganic phosphorus ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

The concentration of suspended matter was determined by measuring the dry weight of the residue.

**Table 1** List of species, physical, chemical, and biological parameters (and their abbreviations) used in multivariate analysis (Costatis). The salinity range is specified for each species

Taxa		Salinity range (psu)
Calanoida		
<i>Paracartia grani</i>	Pg	[40–70]
<i>Acartia discaudata</i>	Ad	[40–62]
<i>Acartia clausii</i>	Ac	[40–70]
Cyclopoida		
<i>Oithona nana</i>	On	[40–70]
<i>Oithona similis</i>	Os	[38–78]
Harpacticoida		
<i>Bryocamptus</i> sp.	Bsp	[76–106]
<i>Euterpina acutifrons</i>	Ea	[38–42]
<i>Clytemnestra scutellata</i>	Cs	[42–100]
<i>Mesochra lilljeborgi</i>	Ml	[80–106]
<i>Microsetella norvegica</i>	Mn	[42–60]
Anostraca		
<i>Artemia salina</i>	As	[182–210]
Physical parameters		
Salinity	S	
Temperature	T	
pH	pH	
Suspended matter	SM	
Chemical parameters		
Nitrite	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
Nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
Ammonium	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
Phosphate	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	
N:P ratio	N:P	
Silicate	Si	
Biological parameters		
Chlorophyll <i>a</i>	Chl <i>a</i>	
Chlorophyll <i>c</i>	Chl <i>c</i>	
Carotenoids	Car	

This residue was obtained by filtration of an adequate amount of water (50–400 ml) related to its quality through Whatman GF/C membrane.

#### Identification and counting of zooplankton

Zooplankton samples were collected by filtering 100 l of water through a 80 µm net, fixed with formaldehyde solution (4%) and counted under a binocular magnifying glass using Dolfus chamber. Species

identification was based on morphological criteria. Various keys were used (Rose, 1933; Bradford-Grieve, 1994; and Boxshall & Halsey, 2004). Copepods and Artemids were the majority. Amphipods, mysidaceae, nematods, or chironomid larvae were sometimes found in very small quantity. They were not included in our study. The H' diversity index (Shannon, 1948) was calculated for copepod communities.

$$H' = - \sum_{i=1}^s \left( \frac{n_i}{N} \right) \log_2 \frac{n_i}{N},$$

where  $n_i/N$  is the fraction of the entire community made up of species  $i$ ,  $s$  is the number of species encountered

#### Statistical analysis

Environmental variables and species are indicated in Table 1. Only the species with more than two occurrences were taken into account to limit the number of zero values. Mean and standard error of the mean (SE) were reported when appropriate. Differences between the sampled ponds for diversity index were analyzed by ANOVA test using Excel-Stat software.

In order to analyze the relationship between environmental variables and structure of the zooplankton community in the saltern, we performed a multivariate analysis. To be able to choose the most suitable statistical method for our data, we first assessed the influence of the season on the variable values and on the species abundances for each site using a Kruskal–Wallis test. Among 75 combinations (variables \* ponds and species \* ponds), we found an influence of the season for only 23 of them. These results suggest that environmental and species structures are quite stable throughout the year. Costatis was, therefore, the most suitable method to use for our data (Thioulouse, 2011). This analysis method is meant to analyze environmental data and species data collected at different dates and at different sites and organized in separate series of tables (or  $k$ -tables). One  $k$ -table reports the environmental data for each site and each date, and the other one reports the species data for each site and each date. The first step of the analysis is a Partial Triadic Analysis (PTA, Jaffrenou, 1978; Thioulouse & Chessel, 1987) which

identifies the stable structure in a  $k$ -table. The result is the mean table of maximum inertia which represents the “compromise” and captures the similarities among the  $k$  individual tables constituting the  $k$ -table (Mendes et al., 2010). PTA is performed on environmental data and on species data independently in order to summarize what is stable (over time or among sites) for each kind of data. The second step is a Co-Inertia analysis which is performed on the two compromises to describe the co-structure between the stable part of environmental data and the stable part of species data. The Co-Inertia analysis summarizes as well as possible the squared covariances between environment and species (Thioulouse, 2011).

In each table, the four sampled ponds were specified in rows. Both series of tables (or  $k$ -tables) contained 18 tables corresponding to the 18 sampling dates. A  $\log(x + 1)$  transformation was applied to species abundances to minimize the effect of exceptionally large values. Costatis analysis (ade4 library) was carried out using *R* to analyze the stable structure of the relationship between the copepod and Artemiidae communities and environmental variables through temporal variation. First, the two partial triadic analyses (PTAs) were performed independently: The compromises of those PTAs represent the stable structure, over time, of the environmental conditions in the saltern on the one hand and that of copepod and Artemiidae communities on the other hand. Second, the co-inertia analysis was performed on the compromises. The result is given under the form of one plot describing the co-structure between the stable structures extracted from each series of tables. The axes of this plot maximize the covariance between the coordinates of the environmental compromise and of the species compromise. The length of the arrows of the variables is indicative of their contribution to the zooplankton distribution. This method highlights the stable relationships between both structures. It also allows projecting the samples corresponding to each pond on the co-structure plots, giving a global overview of the characteristics of the ponds concerning environmental conditions and species distribution. Finally, projection per date, also called trajectories, may be performed to give an insight into temporal variation in environmental conditions and in the composition of the zooplankton community for each pond.

## Results

### Physical, chemical and biological parameters

The mean values and standard deviations of the physical and chemical parameters in the four ponds are indicated in Table 2. The salinity ranged between 38 psu in the first studied pond (A5, August, 2010) and 210 psu in the last studied pond (M2, June, 2010). This increase along the saltern is due to water evaporation. Water temperature differed slightly from pond to pond, with seasonal variations similar in all ponds. The lowest value of about 16°C was recorded in December 2010 (C41) whereas the highest value was 39°C (M2, August 2010). The pH values varied between 6.34 (M2, October 2010) and 8.92 (A5, December 2010), but the mean value showed very little variation among ponds. The annual average of N:P ranged from 9.85 in M2 to 14.34 in C41. These values were below the Redfield ratio (16), indicating an excess of P in all ponds. The highest mean values of Chlorophyll *a* and Chlorophyll *c* were found in A5 (0.053 and 0.056 mg m<sup>-3</sup>, respectively). Carotenoids increased with increasing salinity to attain a maximum value in M2.

### Zooplankton structure

Copepods were the dominant group of zooplankton community accounting for 82, 96, and 93% of total zooplankton abundance in A5, A16, and C41, respectively, but were completely absent from the pond M2. This one was characterized by the presence of only one taxon namely *Artemia salina*. In the three first ponds (A5, A16, and C41), a total of 11 copepod species (Table 1), representing 9 genera, 7 families, and 3 orders, were found. Obvious differences in copepod composition were found between the three ponds. Cyclopoida were dominant in the first pond A5, representing 50% of the total abundance of copepods. Calanoida were numerically important in the second pond A16, contributing to 55% of the total abundance of copepods. Harpacticoida were poorly represented in these ponds (13% in A5 and 11% in A16), while they represented 100% of the copepod community in the third pond C41 (Fig. 2).

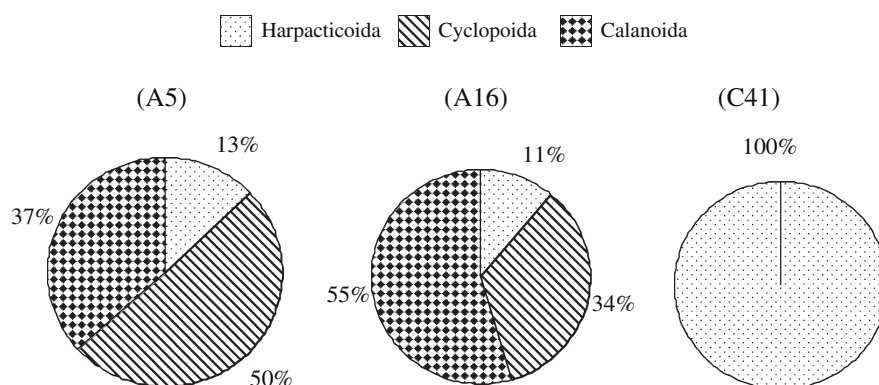
Significant differences were observed in Shannon diversity between the three ponds (A5, A16, and C41;  $F = 3.42$ ,  $P < 0.05$ , Table 3). The diversity of



**Table 2** Mean  $\pm$  SE of biological, physical, and chemical parameters in ponds A5, A16, C41, and M2

	Ponds			
	A5	A16	C41	M2
<b>Physical parameters</b>				
Salinity (psu)	42.1 $\pm$ 0.14	60.8 $\pm$ 0.5	96.5 $\pm$ 0.5	193.4 $\pm$ 0.53
Temperature ( $^{\circ}$ C)	26.6 $\pm$ 0.37	25.9 $\pm$ 0.36	27.3 $\pm$ 0.37	27.3 $\pm$ 0.37
pH	8.1 $\pm$ 0.03	8.2 $\pm$ 0.03	8.1 $\pm$ 0.02	8.1 $\pm$ 0.03
Suspended matter (mg l <sup>-1</sup> )	499 $\pm$ 35.39	586.63 $\pm$ 31.22	793.9 $\pm$ 62.7	2481 $\pm$ 129.59
<b>Chemical parameters</b>				
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu$ mol l <sup>-1</sup> )	0.57 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.02	0.54 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.03
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu$ mol l <sup>-1</sup> )	3.89 $\pm$ 0.15	4.52 $\pm$ 0.21	6.01 $\pm$ 0.42	4.9 $\pm$ 0.23
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ( $\mu$ mol l <sup>-1</sup> )	2.22 $\pm$ 0.07	2.1 $\pm$ 0.06	3.08 $\pm$ 0.11	2.57 $\pm$ 0.1
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ( $\mu$ mol l <sup>-1</sup> )	2.69 $\pm$ 0.2	1.09 $\pm$ 0.07	2.32 $\pm$ 0.14	3.14 $\pm$ 0.21
N:P ratio	9.63 $\pm$ 0.52	12.68 $\pm$ 0.5	14.34 $\pm$ 0.88	9.85 $\pm$ 0.81
Silicates ( $\mu$ mol l <sup>-1</sup> )	36.22 $\pm$ 2.29	22.28 $\pm$ 0.77	28.44 $\pm$ 2.69	39 $\pm$ 2.52
<b>Biological parameters</b>				
Chlorophyll a (mg m <sup>-3</sup> )	0.05 $\pm$ 0.003	0.034 $\pm$ 0.002	0.05 $\pm$ 0.002	0.03 $\pm$ 0.002
Chlorophyll c (mg m <sup>-3</sup> )	0.06 $\pm$ 0.004	0.04 $\pm$ 0.003	0.05 $\pm$ 0.003	0.05 $\pm$ 0.003
Carotenoids (mg m <sup>-3</sup> )	0.07 $\pm$ 0.003	0.06 $\pm$ 0.003	0.08 $\pm$ 0.003	0.12 $\pm$ 0.01

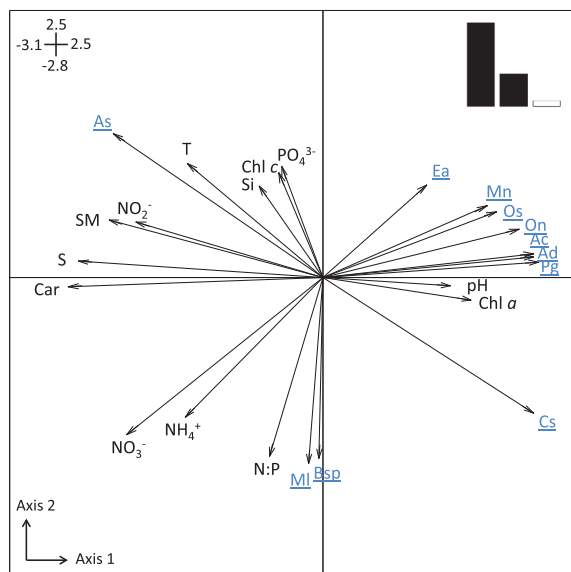
**Fig. 2** Distribution of the three copepod orders in ponds A5, A16, and C41



**Table 3** Mean of diversity index ( $H'$ )  $\pm$  SE of copepods in ponds A5, A16, and C41.  $F$  values were determined by a one-way ANOVA test

	Ponds			$F$ values (df)
	A5	A16	C41	
Diversity index $H'$	1.04 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.02	3.42 (57)*
Copepods species number	9	8	3	

\* Significant difference between sampled ponds ( $p < 0.05$ )



**Fig. 3** Eigenvalues diagram (top right) and factor map of the Costatis analysis showing the environmental parameters (in black) and the zooplankton species (in blue, underlined)

copepods decreased with increasing salinity, from the first pond (A5) to the third one (C41).

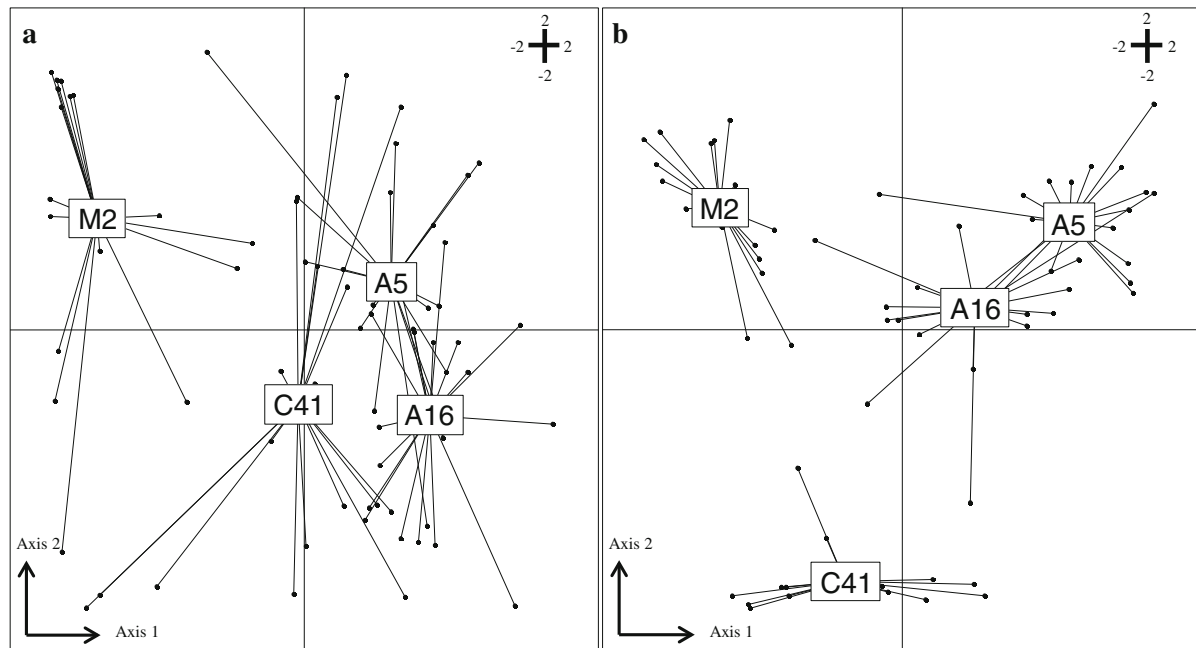
### Community analysis and relationship with environmental parameters

Costatis performed a co-inertia analysis between the species structure and the environmental structure. The first axis accounted for 68.7% of the explained inertia while the second axis accounted for 26.7% of the explained inertia (Fig. 3). The first axis describes a salinity gradient with high values of salinity, suspended matter, and carotenoids on the left side, and high values of chlorophyll *a* and pH on the right side of the factorial plan. Thus, the left side and the right side of the factorial plan correspond, respectively, to the “hypersaline side” and the “marine side.” The second axis shows essentially a N:P ratio gradient with assimilable phosphorus ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) on the top side of the factorial plan and the ratio of dissolved inorganic N:P on the bottom side of the factorial plan. Nitrogen ions have an intermediate position on both axes. Concerning the species structure, we mainly distinguish a pattern in the distribution of species along the first axis (Fig. 3), with thalassophilic species (Ea, Mn, Cs, Pg, Ad, Ac, On, Os) located on the low salinity side

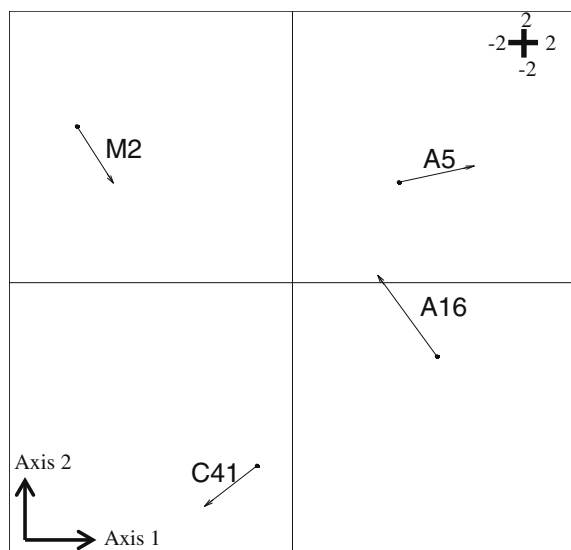
of the factorial plan (right side) and halophilic species (MI, Bsp, and, above all, As) on the high salinity side (left side). Copepod and *Artemia* species were, therefore, distributed according to their salinity affinities. The distribution of the species along the second axis suggests that MI and Bsp are associated with high N:P ratios, whereas all other species are associated with rather low or medium N:P ratios. As a result, the stable part of the species–environment relationships mainly consisted of a salinity gradient linked to a hypersaline-marine species gradient. N:P ratio influenced the distribution of the species in a lesser extent. Globally, Cyclopoida and Calanoida were associated with low salinity levels and quite low N:P ratios, Harpacticoida were associated with high salinity levels and high N:P ratios, and Artemiidea were associated with very high salinity levels and low N:P ratios.

The projection of each sampling event for each pond on the factor map allows visualizing the amplitude of temporal variation. For more efficiency, we presented two plots: one for the environmental structure (Fig. 4a) and another one for the species structure (Fig. 4b). The points corresponding to each pond were less dispersed on the factor map showing the species structure than on that showing the environmental structure. This indicates that the composition of the zooplankton communities was quite stable over time, despite environmental variation. The overall projection of the four ponds on the factorial map for the environmental variables and for the species (Fig. 5) illustrates the strength of the relationship between the zooplankton distribution and the environment and highlights differences between ponds. Each pond is represented by two points joined by an arrow. The end of the arrow corresponds to the zooplankton species and the origin of the arrow corresponds to the environment. Compared to the distances among ponds, the lengths of the arrows are short, underlying a strong relationship between the composition of zooplankton communities and environmental conditions and highlighting large differences among ponds concerning both the environmental conditions and the species composition.

The trajectories maps (Fig. 6) show the mean projection, per season, of the samples from each pond on the compromise axes for the environmental variables and for the species. The maps enabled us to identify seasonal variation in the environmental



**Fig. 4** Projection of the 18 sampling points corresponding to each pond on the factor map of the Costatis analysis showing **a** the environmental variables, **b** the zooplankton species



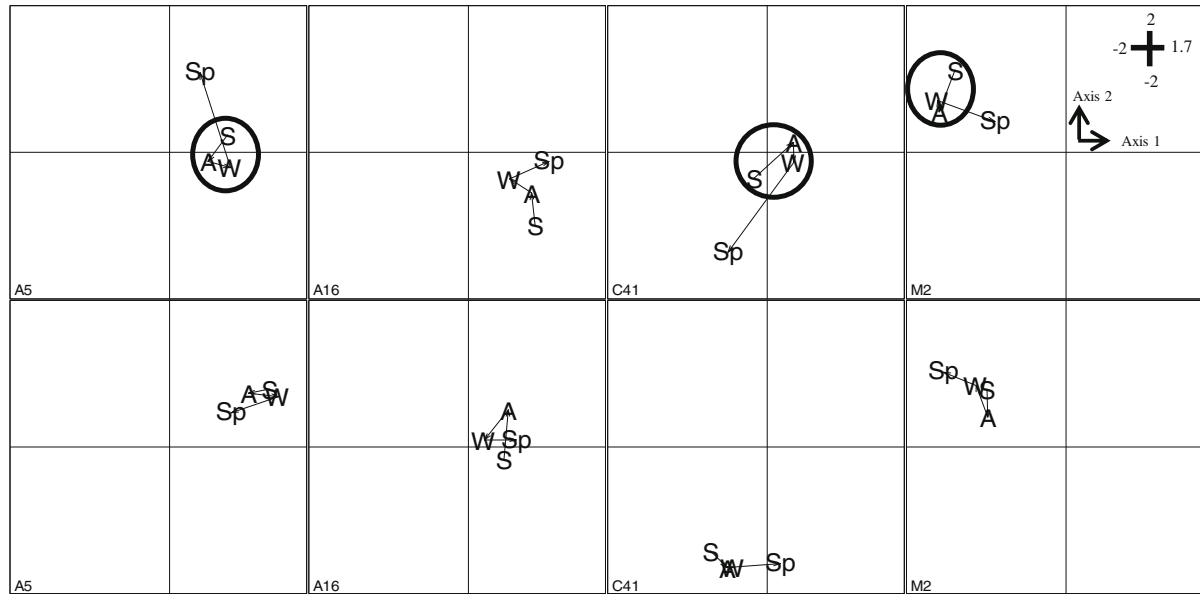
**Fig. 5** Projection of the sampling sites on the factor map of the Costatis analysis, in terms of both environmental and species structure. Each site is represented by two points: one corresponds to the environmental structure (origin of the *arrows*) and the other corresponds to the species structure (end of the *arrows*)

structure and in the species structure. Overall, both structures were quite homogeneous. In three ponds, the spring samples were associated with variation in

the environmental factors: excess of  $\text{PO}_4^{3-}$  in the first pond (A5) and in the last one (M2), and excess of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  in the third pond (C41). There was no strong seasonal variation in the species structure. Globally, the intra-pond seasonal differences were lower than the inter-pond differences.

### Discussion

The results of the present study provide fundamental information on the spatial distribution of copepod and *Artemia* species in a saltern. This distribution seemed to be related to several environmental factors varying among the salina ponds. The analysis highlights that the distribution of zooplankton is principally related to a salinity gradient. Other factors are associated with salinity. Suspended matter which is due to flocculation processes and carotenoids that are produced by some halophile phytoplankton species are more abundant in high salinity ponds (Guermazi et al., 2009). This study confirmed that among environmental factors, salinity had a pronounced selective effect on zooplankton composition and distribution (Hammer, 1986). Species diversity decreased as salinity increased, as



**Fig. 6** Mean projection of the samples on the factor map of the Costatis analysis, per season, for each pond, for environmental variables (*top*) and for zooplankton (*bottom*). When appropriate, an ellipse was drawn around the points showing a similar

structure, thereby highlighting the point outside the ellipse, indicative of remarkable variation. *S* summer, *A* autumn, *W* winter, *Sp* spring

observed in diverse saline environments, from estuaries to salterns (Colburn, 1988; Williams, 1998; Thiéry & Puente, 2002; Tripp & Collazo, 2003; Sánchez et al., 2006; Horváth et al., 2014). Moreover, salinity was the main factor influencing the composition of the invertebrate communities, as found in other systems (Hart et al., 1998; Wollheim & Lovvorn, 1995). The first salina sections (A5 and A16) maintained typical features of a marine system concerning both the environmental parameters and the composition of zooplankton communities, whereas later sections (C41 and M2) showed features particular to a hypersaline system where conditions are stressful (Sánchez et al., 2006).

Copepods dominated zooplankton in the three first ponds (A5, A16, and C41) and were absent in the pond with the highest salt concentration (M2, 193 psu) in which the number of taxa was low. The diversity index ( $H'$ ) showed a general decrease in copepod diversity with increasing salinity from A5 to C41. The increasing salinity is, therefore, a limiting factor for the diversity of aquatic fauna, similarly to what is encountered in other salterns (Britton & Johnson, 1987; Colburn, 1988; Williams, 1998; Amaral & Costa 1999; Thiéry & Puente, 2002; Evagelopoulos et al.,

2007). This influence of salinity suggests that there is a threshold above which only the most salt tolerant species survive (Williams, 1998; Toumi et al., 2005). Tolerance to salinity varies not only according to species but also to orders. Cyclopoida and Calanoida were present only in the two least salty ponds (between 40 and 65 psu). In hypersaline environments, these thalassophylic copepods, such as *O. nana*, *O. similis*, and *P. grani* are associated with the lowest salinity levels (Kobbi-Rebai et al., 2013). Oppositely, the third pond (C41: about 100 psu) was marked only by the presence of the Harpacticoida *Bryocamptus* sp. and *M. lilljeborgi*. Such distributional pattern was also observed in previous works about the studied saltern; it has been shown that between 77 and 120 psu, copepod communities would be marked by the presence of only these two taxa (Khemakhem et al., 2010; Kobbi-Rebai et al., 2013). These Canthocamptidae, adapted to osmotic stress and considered as halophilic taxa, were linked to the highest salinity level where we found copepods. In the last studied pond (M2: nearly 200 psu), euryhaline *Artemia salina* was the only zooplanktonic taxon. This corroborates previous work performed in salterns (Mitchell & Geddes, 1977; Toumi et al., 2005; Elloumi et al., 2009).

Tolerance or intolerance to salinity is probably related to the ability or difficulty of some species to react metabolically to high salinity; only halophilic organisms have specific ecophysiological and biological characteristics allowing them to tolerate such stress (Oren, 2001; Elevi Bardavid & Oren, 2008). Copepods are known to respond to osmotic stress by activating a series of defense mechanisms (Lauritano et al., 2012). These mechanisms include accumulation of intracellular organic osmolytes such as proline (Willett & Burton, 2002) and induction or repression of heat shock proteins (Willett & Burton, 2003; Lauritano et al., 2012). Like copepods, *Artemia salina* synthesizes a small heat shock protein (p26) to resist to extreme environmental stress (Clegg et al., 1999; Tanguay et al., 2004).

Zooplankton distribution was also related to N:P gradient. In the Sfax salina, both nitrogen and phosphorus concentrations were higher than reported for other saltworks like Camargue salina in France (Thiéry & Puente, 2002) and Megalon Embolon solar saltern in Greece (Dolapsakis et al., 2005). This difference could be due to the high anthropogenic inputs and terrigenous load in the water, as reported by Elloumi et al. (2008) and Kchaou et al. (2009). The N:P ratio was lower than 16 everywhere in the saltern, indicating an excess of phosphorus. This excess may come from external sources through water intake and bird droppings and/or from excretion of zooplankton. The global gradient of P could result from the combination of two gradients. The first one is due to a natural entry of sea water through the first studied pond (A5). The concentration of P is then expected to decrease along the salina for two reasons. First, it is consumed by the phytoplankton (Abid et al., 2008). Second, according to Vieira & Amat (1996), phosphorus should precipitate between the supply pond and the last ones because its solubility decreases as salinity increases, this nutritive element can be uptaken and incorporated into sediment. The second gradient might be caused by anthropogenic spill since the two last studied ponds (C41 and M2) are located near an urban and industrial area. An inflow could occur by percolation through the soil and have as a consequence the enrichment of P in M2 and, to a lesser extent, in C41. Only two species were associated with high N:P ratios: the Harpacticoida *Bryocamptus* sp. and *M. lilljeborgi*. These species are characterized by traits of benthic life

(Williams, 1980; Albeit & Scheibel, 1982; Heip & Herman, 1985) contrary to the other study species which are pelagic. *Bryocamptus* sp. and *M. lilljeborgi* live in the sea bed where N:P ratio may be high due to degradation of organic matter (Tezuka, 1990). High N:P ratio could, therefore, favor the development of these benthic taxa.

Our analysis showed a very strong spatial structure with large differences among ponds both in terms of environmental conditions and community composition. Seasonal variations are instead very low. The studied saltern is located in a semi-arid region without clear differences among seasons; temporal variations in temperature and hence in salinity are less marked than in most other comparable systems. Even if some environmental factors and the abundance of some species may fluctuate (Toumi et al., 2005; Khemakhem et al., 2010), the global structure does not vary throughout the year. It seems that each species is associated to a range of environmental conditions met in a given pond throughout the year. Hence, the seasonal environmental variations are not strong enough to significantly influence the distribution of the species in the different ponds through the selective processes. Usually, in biotopes characterized by a salinity gradient, seasonal variations in plankton communities are often mostly related to variations in temperature and salinity (Hoffmeyer, 1994; Calbet et al., 2001; Vieira & Bio, 2011) and influenced by water inflow (Mozetiç et al., 1998, Khemakhem et al., 2013). However, seasonal variations tend to be less distinct with increasing salinity (Lei et al., 2009). The seasonal variations in the saltern zooplanktonic communities are, nevertheless, often more pronounced in temperate climate areas (Hoffmeyer, 1994; Calbet et al., 2001; Vieira & Bio, 2011).

**Acknowledgments** The authors wish to thank Jean THIOULOUSE for constructive and critical reading of the manuscript. We are grateful to the staff of the saline of Sfax. This study was conducted in the framework of the PhD of Chiraz Ladhar (University of Maine: Laboratoire Mer, Molécules, Santé, UFR Sciences et Techniques, France – University of Sfax: Unité de recherche UR/05ES05, Biodiversité et Ecosystème Aquatiques, Tunisia). Chiraz Ladhar was supported by the Tunisian Ministry of Higher Education.

**Conflict of interest** All the authors of this article declare that no potential conflicts of interest are linked to the work described in this manuscript. They also declare not presenting financial, consulting, and personal relationships with other people or organizations that could influence the present work.

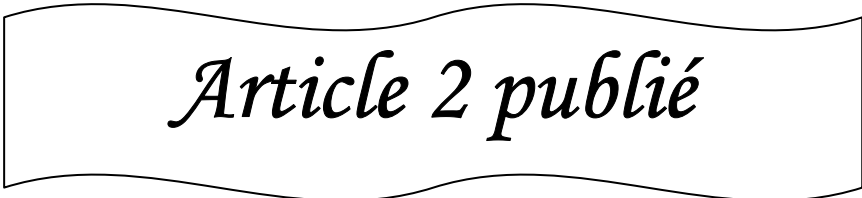
## References

- Abid, O., A. Sellami-Kammoun, H. Ayadi, Z. Drira, A. Bouaïn & L. Aleya, 2008. Biochemical adaptation of phytoplankton to salinity and nutrient gradients in a coastal solar saltern, Tunisia. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 80: 391–400.
- Albeit, J. & W. Scheibel, 1982. Benthic Harpacticoids as food source for fish. *Marine Biology* 70: 141–147.
- Alonso, M., 1990. Anostraca, Cladocera and Copepoda of Spanish saline lakes. *Hydrobiologia* 197: 221–231.
- Amaral, M. J. & M. H. Costa, 1999. Macrobenthic communities of salt pans from Sado estuary (Portugal). *Acta Oecologica* 20: 327–332.
- Amdouni, R., 2009. Behaviour of trace elements during the natural evaporation of sea water: case of solar salt works of Sfax saline (SE of Tunisia). *Global Nest Journal* 11: 96–105.
- Ayadi, H., N. Toumi, O. Abid, K. Medhioub, M. Hammami, T. Sime-Ngando, C. Amblard & D. Sargos, 2002. Qualitative and quantitative study of phyto- and zooplankton communities in the saline ponds of Sfax, Tunisia. *Journal of Water Science* 15: 123–135.
- Bickel, S. L. & K. W. Tang, 2014. Zooplankton-associated and free-living bacteria in the York River, Chesapeake Bay: comparison of seasonal variations and controlling factors. *Hydrobiologia* 722: 305–318.
- Boxshall, G. A. & S. H. Halsey, 2004. *An Introduction to Copepod Diversity*. The ray society, London.
- Bradford-Grieve, J. M., 1994. The marine fauna of New Zealand: Pelagic Calanoid Copepoda: Megacalanidae, Calanidae, Paracalanidae, Mecynoceridae, Eucalanidae, Spinocalanidae, Clausocalanidae. *New Zealand Oceanographic Institute Memoir*.
- Britton, R. H. & A. R. Johnson, 1987. An ecological account of a Mediterranean salina: the Salin de Giraud, Camargue (S. France). *Biological Conservation* 42: 185–230.
- Bruce, L. C. & E. J. Imberger, 2009. The role of zooplankton in the ecological succession of plankton and benthic algae across a salinity gradient in the Shark Bay solar salt ponds. *Hydrobiologia* 626: 111–128.
- Calbet, A., S. Garrido, E. Saiz, M. Alcaraz & C. M. Duarte, 2001. Annual zooplankton succession in coastal NW Mediterranean waters: the importance of the smaller fractions. *Journal of Plankton Research* 23: 319–331.
- Clegg, J. S., J. K. Willsie & S. A. Jackson, 1999. Adaptive significance of a small heat shock/a-crystallin protein (p26) in encysted embryos of the Brine Shrimp, *Artemia franciscana*. *American Zoologist* 39: 836–847.
- Colburn, E. A., 1988. Factors influencing species diversity in saline waters of Death Valley, USA. *Hydrobiologia* 158: 215–226.
- Damotharan, P., N. V. Perumal, M. Arumugam, P. Perumal, S. Vijayalakshmi & T. Balasubramanian, 2010. Studies on zooplankton ecology from Kodiakkarai (Point Calimere) coastal waters (South East coast of India). *Research Journal of Biological Sciences* 5: 187–198.
- Davis, J. S., 2000. Structure, function, and management of the biological system for seasonal solar saltworks. *Global Nest Journal* 2: 217–226.
- Davis, J. S. & M. Giordano, 1996. Biological and physical events involved in the origin, effects and control of organic matter in solar saltworks. *International Journal of Salt Lake Research* 4: 335–347.
- De-Young, B., M. Heath, F. Werner, B. Megrey & P. Monfray, 2004. Challenges of modeling ocean basin ecosystems. *Science* 304: 1463–1466.
- Dolapsakis, N. P., T. Tafas, T. J. Abatzopoulos, S. Ziller & A. Economou-Amilli, 2005. Abundance and growth response of microalgae at Megalon Embolon solar saltworks in northern Greece: An aquaculture prospect. *Journal of Applied Phycology* 17: 39–49.
- Drira, Z., M. Bel Hassen, A. Hamza, A. Rebai, A. Bouaïn, H. Ayadi & L. Aleya, 2009. Coupling of phytoplankton community structure to nutrients, ciliates and copepods in the Gulf of Gabes (South Ionian Sea, Tunisia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90: 1203–1215.
- Elevi Bardavid, R. & A. Oren, 2008. Dihydroxyacetone metabolism in *Salinibacter ruber* and in *Haloquadratum walsbyi*. *Extremophiles* 12: 125–131.
- Elloumi, J., W. Guermazi, H. Ayadi, A. Bouaïn & L. Aleya, 2008. Detection of water and sediments pollution of an arid Saltern (Sfax, Tunisia) by coupling the distribution of microorganisms with hydrocarbons. *Water, Air, and Soil Pollution* 187: 157–171.
- Elloumi, J., W. Guermazi, H. Ayadi, A. Bouaïn & L. Aleya, 2009. Abundance and biomass of prokaryotic and eukaryotic microorganisms coupled with environmental factors in an arid multi-pond solar saltern (Sfax, Tunisia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 89: 243–253.
- Evangelopoulos, A., E. Spyarakos & D. Koutsoubas, 2007. The biological system of the lower salinity ponds in Kalloni Saltworks (NE. Aegean Sea, Greece): phytoplankton and macrobenthic invertebrates. *Transitional Waters Bulletin* 3: 23–25.
- Gascón, S., X. Llopart, A. Ruiz-Navarro, J. Compte, D. Verdell-Cubedo, D. Boix, F. J. Oliva-Paterna, X. D. Quintana & M. Torralva, 2013. The effects of *Aphanius iberus* predation on an aquatic community: diel changes and the role of vegetation. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie* 182: 75–87.
- Greene, C. H. & A. J. Pershing, 2007. Changes in Arctic climate have contributed to shifts in abundances and seasonal cycles of a variety of species in the northwest Atlantic. *Science* 315: 1084–1085.
- Guermazi, W., J. Elloumi, H. Ayadi, A. Bouaïn & L. Aleya, 2008. Coupling changes in fatty acid and protein composition of *Artemia salina* with environmental factors in the Sfax solar saltern (Tunisia). *Aquatic Living Resources* 21: 63–73.
- Guermazi, W., H. Ayadi & L. Aleya, 2009. Correspondence of the seasonal patterns of the brine shrimp, *Artemia salina* (Leach, 1819) (Anostraca) with several environmental factors in an arid solar saltern (Sfax, Southern Tunisia). *Crustaceana* 82: 327–348.
- Hammer, U.T., 1986. *Saline lake ecosystems of the world*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht: 616 pp.
- Hart, C. M., M. R. Gonzalez, E. P. Simpson & S. H. Hurlbert, 1998. Salinity and fish effects on Salton Sea

- microecosystems: zooplankton and nekton. *Hydrobiologia* 381: 129–152.
- Hays, G. C., A. J. Richardson & C. Robinson, 2005. Climate change and marine plankton. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 337–344.
- Heip, C. & P. M. J. Herman, 1985. The stability of a benthic copepod community. Marine Biology Section, Zoology Institute, State University of Ghent: 255–263.
- Hoffmeyer, M. S., 1994. Seasonal succession of Copepoda in the Bahia Blanca estuary. In Ferrari, F. D. & B. P. Bradley (eds), *Ecology and Morphology of Copepods*. DH 102, *Hydrobiologia* 292/293: 303–308.
- Horváth, Z., C. F. Vad, A. Tóth, K. Zsuga, E. Boros, L. Vörös & R. Ptacnik, 2014. Opposing patterns of zooplankton diversity and functioning along a natural stress gradient: when the going gets tough, the tough get going. *Oikos* 123: 461–471.
- Jaffrenou, P. A., 1978. Sur l'analyse des familles finies de variables vectorielles. Bases algébriques et application à la description statistique. Thèse de 3e cycle, Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II, Montpellier.
- Kchaou, N., J. Elloumi, Z. Drira, A. Hamza, H. Ayadi, A. Bouain & L. Aleya, 2009. Distribution of ciliates in relation to environmental factors along the coastline of the Gulf of Gabes, Tunisia. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 83: 414–424.
- Khemakhem, H., J. Elloumi, M. Moussa, L. Aleya & H. Ayadi, 2010. The concept of ecological succession applied to phytoplankton over four consecutive years in five ponds featuring a salinity gradient. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 88: 33–44.
- Khemakhem, H., J. Elloumi, H. Ayadi, L. Aleya & M. Moussa, 2013. Modelling the phytoplankton dynamics in a nutrient-rich solar saltern pond: predicting the impact of restoration and climate change. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 9057–9065.
- Kobbi-Rebai, R., N. Annabi-Trabelsi, H. Khemakhem, H. Ayadi & L. Aleya, 2013. Impacts of restoration of an uncontrolled phosphogypsum dumpsite on the seasonal distribution of abiotic variables, phytoplankton, copepods, and ciliates in a man-made solar saltern. *Environmental Monitoring and Assessment* 185: 2139–2155.
- Lauritano, C., G. Procaccini & A. Ianora, 2012. Gene expression patterns and stress response in marine copepods. *Marine Environmental Research* 76: 22–31.
- Leandro, S. M., P. Tiselius, S. C. Marques, F. Avelas, C. Correia, P. Sa & H. Queiroga, 2014. Copepod production estimated by combining in situ data and specific temperature-dependent somatic growth models. *Hydrobiologia*. doi:10.1007/s10750-014-1833-5.
- Lei, Y., K. Xu, J. Ki Choi, H. Pyo Hong & S. A. Wickham, 2009. Community structure and seasonal dynamics of planktonic ciliates along salinity gradients. *European Journal of Protistology* 45: 305–319.
- Letessier, T. B., D. W. Pond, R. A. R. McGill, W. D. K. Reid & A. S. Brierley, 2012. Trophic interaction of invertebrate zooplankton on either side of the Charlie Gibbs fracture zone/subpolar front of the mid-atlantic ridge. *Journal of Marine Systems* 94: 174–184.
- Lorda, J. F., S. W. Fowler, J. C. Miquel, A. R. Baena & R. A. Jeffree, 2013.  $^{210}\text{Po}/^{210}\text{Pb}$  dynamics in relation to zooplankton biomass and trophic conditions during an annual cycle in northwestern Mediterranean coastal waters. *Journal of Environmental Radioactivity* 115: 43–52.
- Marques, S. C., M. A. Pardal, S. Mendes & U. M. Azeiteiro, 2011. Using multitaxa techniques for assessing the temporal variability of species–environment relationship in a copepod community from a temperate estuarine ecosystem. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 405: 59–67.
- Mendes, S., M. J. F. Gomez, M. J. Pereira, U. M. Azeiteiro & M. P. Galindo-Villardón, 2010. The efficiency of the partial triadic analysis method: an ecological application. *Biometrical Letters* 47: 83–106.
- Mitchell, B. D. & M. C. Geddes, 1977. Distribution of the brine shrimps *Parartemia zietziana* Sayce and *Artemia salina* (L.) along a salinity and oxygen gradient in a South Australian saltfield. *Freshwater Biology* 7: 461–467.
- Mozetič, P., S. F. Umani, B. Cataletto & A. Malej, 1998. Seasonal and inter-annual plankton variability in the Gulf of Trieste (northern Adriatic). *ICES Journal of Marine Science* 55: 711–722.
- O'Connell, J. L., L. A. Johnson, L. M. Smith, S. T. McMurry & D. A. Haukos, 2012. Influence of land-use and conservation programs on wetland plant communities of the semi-arid United States Great Plains. *Biological Conservation* 146: 108–115.
- Oren, A., 2001. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia* 466: 61–72.
- Parsons, T. R. & J. D. H. Strickland, 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *Journal of Marine Research* 21: 155–163.
- Rodríguez-Climent, S., N. Caiola & C. Ibáñez, 2013. Salinity as the main factor structuring small-bodied fish assemblages in hydrologically altered Mediterranean coastal lagoons. *Scientia Marina* 77: 37–45.
- Rose, M., 1933. Copépodes pélagiques. Faune de la France.
- Sánchez, M. I., A. J. Green & E. M. Castellanos, 2006. Temporal and spatial variation of an aquatic invertebrate community subjected to avian predation at the Odiel salt pans (SW Spain). *Archiv für Hydrobiologie* 166: 199–223.
- SCOR-UNESCO, 1966. Determination of Photosynthetic Pigments in Sea Water. SCOR-UNESCO, Paris.
- Shannon, C. E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27: 379–423.
- Smith, L., N. Euliss, D. Wilcox & M. Brinson, 2008. Application of a geomorphic and temporal perspective to wetland management in North America. *Wetlands* 28: 563–577.
- Smith, L. M., D. A. Haukos, S. T. McMurry, T. Lagrange & D. Willis, 2011. Ecosystem services provided by playas in the High Plains: potential influences of USDA conservation programs. *Ecological Applications* 21: S82–S92.
- Tanguay, J. A., R. C. Reyes & J. S. Clegg, 2004. Habitat diversity and adaptation to environmental stress in encysted embryos of the crustacean *Artemia*. *Journal of Biosciences* 29: 489–501.
- Tezuka, Y., 1990. Bacterial regeneration of ammonium and phosphate as affected by the carbon:nitrogen:phosphorus ratio of organic substrates. *Microbial Ecology* 19: 227–238.

- Thiéry, A. & L. Puente, 2002. Crustacean assemblage and environmental characteristics of a man-made solar saltwork in southern France, with emphasis on anostracan (Branchiopoda) population dynamics. *Hydrobiologia* 486: 191–200.
- Thioulouse, J., 2011. Simultaneous analysis of a sequence of paired ecological tables: a comparison of several methods. *The Annals of Applied Statistics* 5: 2300–2325.
- Thioulouse, J. & D. Chessel, 1987. Les analyses multitableaux en écologie factorielle. I. De la typologie d'état à la typologie de fonctionnement par l'analyse triadique. *Acta Oecologica, Oecologia Generalis* 8: 463–480.
- Thioulouse, J., M. Simier & D. Chessel, 2004. Simultaneous analysis of a sequence of paired ecological tables. *Ecology* 85: 272–283.
- Torreniera, L. & S. I. Dodson, 2004. Ecology of the brine shrimp *Artemia* in the Yucatan, Mexico, Salterns. *Journal of plankton research* 26: 617–624.
- Toumi, N., H. Ayadi, O. Abid, J. F. Carrias, T. Sime-Ngando, M. Boukhris & A. Bouaïn, 2005. Zooplankton distribution in four ponds of different salinity: a seasonal study in the solar salterns of Sfax (Tunisia). *Hydrobiologia* 534: 1–9.
- Tripp, K. J. & J. A. Collazo, 2003. Density and distribution of water boatmen and brine shrimp at a major shorebird wintering area in Puerto Rico. *Wetland Ecological Management* 11: 331–341.
- Vieira, N. & F. Amat, 1996. Fluctuation in the zooplankton community in two solar salt ponds, Aveiro, Portugal. *International Journal of Salt Lake Research* 4: 327–333.
- Vieira, N. & A. Bio, 2011. Spatial and temporal variability of water quality and zooplankton in an artisanal salina. *Journal of Sea Research* 65: 293–303.
- Willett, C. S. & R. S. Burton, 2002. Proline biosynthesis genes and their regulation under salinity stress in the euryhaline copepod *Tigriopus californicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 132: 739–750.
- Willett, C. S. & R. S. Burton, 2003. Characterization of the glutamate dehydrogenase gene and its regulation in a euryhaline copepod. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 135: 639–646.
- Williams, D. D., 1980. Some relationships between stream benthos and substrate heterogeneity. *Limnology and Oceanography* 25: 166–172.
- Williams, W. D., 1998. Salinity as a determinant of the structure of biological communities in salt lakes. *Hydrobiologia* 381: 191–201.
- Wollheim, W. M. & J. R. Lovvorn, 1995. Salinity effects on macroinvertebrate assemblages and waterbird food webs in shallow lakes of the Wyoming High Plains. *Hydrobiologia* 310: 207–233.





*Article 2 publié*

Ladhar C., Ayadi H., Denis F., Tastard E., Sellami I. 2014.

The effect of environmental factors on the fatty acid composition of copepods and *Artemia* in the Sfax solar saltern (Tunisia). *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 237-245.



Contents lists available at ScienceDirect

# Biochemical Systematics and Ecology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochemsyseco](http://www.elsevier.com/locate/biochemsyseco)

## The effect of environmental factors on the fatty acid composition of copepods and *Artemia* in the Sfax solar saltern (Tunisia)



Chiraz Ladhar<sup>a, b, c, \*</sup>, Habib Ayadi<sup>a</sup>, Françoise Denis<sup>b, c</sup>, Emmanuelle Tastard<sup>c</sup>, Ikbel Sellami<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Sfax, Faculté des Sciences de Sfax, Département des Sciences de la Vie, Unité de recherche UR 11 ES 72/Biodiversité et Écosystème Aquatiques, Route soukra Km 3,5, B.P. 1171, CP 3000 Sfax, Tunisia

<sup>b</sup> UMR BOREA «Biologie des Organismes et Écosystèmes Aquatiques», Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), CP 26, 43, rue Cuvier, 75231 Paris, Cedex 05, France

<sup>c</sup> Université du Maine, EA2160 Mer, Molécules, Santé, équipe biologie moléculaire et génétique évolutive, UFR Sciences et Techniques, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans cedex 9, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 February 2014

Accepted 7 June 2014

Available online

#### Keywords:

Sfax solar saltern

Fatty acids

Copepods

*Artemia salina*

### ABSTRACT

The biochemical composition and abundance variation of zooplankton (copepods and *Artemia salina*) were determined in four ponds of increasing salinity (A5, A16, C41 and M2) in the Sfax solar saltern (Tunisia). The zooplankton community was dominated by copepods in the ponds A5, A16 and C41. The pond M2 was marked by the presence of only *Artemia salina*. Our results showed the dominance of total saturated fatty acids (SFA), which made up 57%–95% of total fatty acids (TFA). SFA 16:0 and 18:0 dominate in all ponds. *A. salina* showed the highest amounts of the total monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA), this indicates that this species could be employed in hatcheries and used as food source for some aquarium species. Fatty acids of herbivory, proportion of all diatom markers to all flagellate markers (D/F), were negatively correlated with the total zooplankton ( $r = -0.998, p < 0.05$ ). *A. salina* was negatively correlated with a biomarker for carnivory polyunsaturated fatty acids/saturated fatty acids (PUFA/SFA) ( $r = -0.959, p < 0.05$ ). The dietary quality of zooplankton seems to be dependent on food availability in the four studied ponds.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Hypersaline environments result from the evaporation of sea water and are also called thalassohaline environments (Oren, 2002). An example of an extreme hypersaline environment is the crystallization ponds or solar salterns. The different ponds of the Sfax solar saltern (Tunisia) provide a diversity of environments where different conditions of salinity, pH, temperature,

**Abbreviations:** TFA, total fatty acids; SFA, saturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; HUFA, high unsaturated fatty acids; D/F, proportion of all diatom markers to all flagellate markers; EPA, eicosapentaenoic acid (20:5 (n-3)); DHA, docosahexaenoic acid (22:6 (n-3)); ARA, arachidonic acid (20:4 (n-6)); PUFA/SFA, polyunsaturated fatty acids/saturated fatty acids; DHA/EPA, docosahexaenoic acid/eicosapentaenoic acid (22:6(n-3)/20:5(n-3)); FATMS, fatty acid trophic markers.

\* Corresponding author. Université du Maine, EA2160 Mer, Molécules, Santé, équipe biologie moléculaire et génétique évolutive, UFR Sciences et Techniques, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans cedex 9, France. Fax: +33 216 74274437.

E-mail address: [ladhar.chiraz@yahoo.fr](mailto:ladhar.chiraz@yahoo.fr) (C. Ladhar).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2014.06.005>

0305-1978/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

light intensity, oxygen and nutrient concentrations are found, allowing the study of different communities (Khemakhem et al., 2010; Kobbi-Rebai et al., 2013). Copepods are the dominant group of mesozooplankton and play a key role in the food web as they form a link between primary producers and secondary consumers (Richmond et al., 2007; Guschina et al., 2009). There are important differences between both zooplankton guilds, especially regarding their impact on the lower trophic levels, either directly via feeding or indirectly by influencing nutrient cycling (DeMott, 1995). More recently, lipid biomarkers (fatty acid analysis) were used to identify specific food web relationships as they provide time-integrated information on an organism's assimilated diet (Allan et al., 2010; Kelly et al., 2012). Fatty acids are useful indicators of the nutritional quality of primary producers for planktonic grazers. SFA and MUFA are of a poorer nutritional quality than PUFA rich organic matter, which constitute a highly valuable food item for consumers (Parrish, 2009; Pommier et al., 2012). The physiologically active essential fatty acids in animals are eicosapentaenoic acid (EPA 20:5 (n–3)), docosahexaenoic acid (DHA 22:6 (n–3)) and arachidonic acid (ARA 20:4 (n–6)) (Sargent et al., 1999). These high unsaturated fatty acids (HUFA) have been linked to species growth, reproductive success, and neural development in both zooplankton and fish (Brett et al., 2006; Perhar et al., 2013). PUFA are essential metabolites that cannot be synthesized de novo by consumers but must be taken up via their food (Kattner et al., 2009; Mayzaud et al., 2013). The volume of literature on lipids in aquatic organisms has expanded greatly in recent decades showing an increasing interest in the fatty acid composition of marine and extreme ecosystems like solar salterns. Knowledge on the biochemical composition of copepod and *Artemia* groups has become important to understand their physiological functions, metabolism and nutritive value, as this is very relevant for the energy transfer in aquatic ecosystems and secondary production.

The present study was conducted in the Sfax solar saltern (Tunisia), a typical arid saltern that is well documented in terms of the distribution of planktonic ciliates (Guermazi et al., 2008; Elloumi et al., 2009a; Elloumi et al., 2009b), and on zooplankton distributional (Toumi et al., 2005; Kobbi-Rebai et al., 2013). Thus, field investigations of the fatty acid profiles of *Artemia* are very scarce (Guermazi et al., 2008). To our knowledge, this is the first attempt to determine the fatty acids composition of copepods and *Artemia salina* collected at four ponds of increasing salinity: A5, A16, C41 and M2. This study focused on the coupling changes in fatty acid composition of zooplankton with environmental factors in the Sfax solar saltern in order to 1) examine the impact of environmental factors particularly salinity and temperature on the biochemical composition of zooplankton species and to 2) analyse spatial patterns in these fatty acids profiles. The central hypothesis to test whether the extreme environmental conditions that prevail in the Sfax solar saltern could influence fatty acids profiles in the zooplankton species with respect to salinity gradients.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study site

The solar saltern of Sfax is located in the central east of Tunisia (Tunisia, 34° 39' 0.1" N and 10° 42' 35" E). It is composed of a series of interconnected ponds (20–70 cm depth) covering an area of 1500 ha. It stretches over about 12 km along the southern coast of Sfax. An artificial red silt seawall separates the study area from the sea. The input of seawater and the circulation between the various ponds are entirely depending on the meteorological conditions. Water salinity is subject to an increasing gradient from 40 psu to 400 psu (Amdouni, 2009).

### 2.2. Sampling

Four ponds A5, A16, C41 and M2 (Fig. 1) of increasing salinity were sampled bimonthly from 15 June 2010 until 15 May 2011. A5 and A16 (median salinity  $41.9 \pm 0.1$  psu and  $61.4 \pm 0.4$  psu respectively) are part of the series of preliminary concentration ponds in the saltern and are 50 and 30 cm deep respectively. C41 (median salinity  $95.5 \pm 0.5$  psu) is part of external pond and is 35 cm deep. Pond M2 (median salinity  $191.3 \pm 0.6$  psu) is the crystallizer and is 30 cm deep.

Samples (200 ml) were collected 20 cm below the surface with a 5 l Van Dorn bottle at the central part of each pond and filtered through a nylon net of 80  $\mu$ m mesh. Samples were stored in the dark and cold, for biological analysis and abiotic variables, except for temperature, which was measured in situ.

### 2.3. Physical and chemical factors

Temperature was measured immediately in the field using a mercury glass thermometer graduated in 0.1 °C. Salinity and pH were estimated using a salinometer and a Met Rohm type pH meter, respectively. Samples for nutrient analysis were filtered and immediately frozen upon collection in the dark (–20 °C). Nutrients ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) were analysed with a Bran and Luebbe autoanalyzer type 3. The annual average of N:P represents the DIN:DIP ratio where DIN is the dissolved inorganic nitrogen (the sum  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) and DIP is the dissolved inorganic phosphorus ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

The concentration of suspended matter was determined by measuring the dry weight of the residue after water filtration through Whatman GF/C membrane.

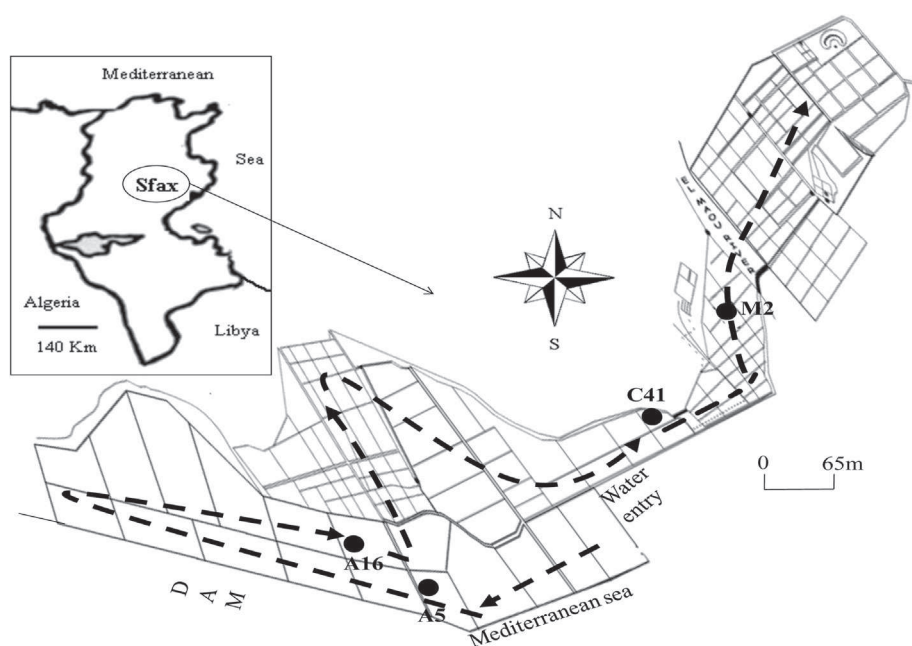


Fig. 1. Location of the ponds sampled in the solar saltern of Sfax: A5, A16, C41 and M2. Arrows indicate the direction of the water flow in the saltern.

#### 2.4. Chlorophyll and carotenoids

Magnesium carbonate ( $\text{MgCO}_3$ ) was added to water samples to fix photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and carotenoids). Then the samples were filtered by vacuum through Whatman GF/C glass fibre filters ( $0.45 \mu\text{m}$ ). These filters were immediately stored at  $-20^\circ\text{C}$  until being extracted using acetone and read on the spectrophotometer. The concentrations were then estimated using the equations proposed by Scor-Unesco (1966) for chlorophyll *a* and Parsons et al. (1963) for carotenoids.

#### 2.5. Zooplankton

Zooplankton samples were collected with a 5 l Van Dorn bottle through an  $80 \mu\text{m}$  nylon mesh, preserved with formalin 4% solution and coloured with Bengal Pink. The zooplankton was enumerated and counted under a binocular microscope type Leica in Dolffus chambers. Species identification was based on morphological criteria. The taxonomic identification was carried out according to Rose, 1933; Bradford-Grieve, 1994 and Boxshall et al., 2004.

Copepods and *Artemia* samples were brought to the laboratory, sorted alive at species level and stored frozen at  $-80^\circ\text{C}$  in eppendorfs. For each species, 3 replicates, containing 60 individuals each, were prepared in order to quantify fatty acids.

#### 2.6. Fatty acid analyses

Total lipids in copepods and *Artemia* were extracted with chloroforme/methanol (2:1) according to the methods of Folch et al. (1957) modified by Bligh et al. (1959). The fatty acid methyl esters were prepared from the lipid extract by transesterification using a direct transesterification with methanolic  $\text{BF}_3$  according to Santha et al. (1990). They were solubilized in hexane and water and injected into a polar column. We used a Hewlett Packard (HP) 5890 II gas chromatograph and flame detector (FID). The samples were analyzed using a fused silica polar capillary column ( $0.32 \text{ mm}$ ,  $0.52 \mu\text{m}$ ) with nitrogen as carrier gas. The oven was programmed to rise from an initial temperature of  $180^\circ\text{C}$ – $250^\circ\text{C}$  at a rate of  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  (from 180 to 220),  $2^\circ\text{C min}^{-1}$  (from 220 to 240) and  $5^\circ\text{C min}^{-1}$  (from 240 to 250) with the free fatty acids column. Results were obtained in the form of chromatogram. The chromatographic profiles of fatty acids were processed using the software calculation 'DIAMIR'. The heptadecanoic fatty acid (C17:0) was added as an internal standard for the quantification.

The retention time characterized qualitatively fatty acids while the concentration of the standard fatty acid was determined by the amplitude or area of the peaks.

#### 2.7. Fatty acid trophic markers (FATMS)

Fatty acid ratios were calculated and used as biomarkers based on El-Sabaawi et al. (2009) to inspect whether animal, bacteria or algae class ratios were maintained in the lipid extracts of zooplankton species thus reflecting their trophic position

and dietary quality. Carnivorous zooplankton often have higher proportions of polar lipids, which are rich in PUFA, than herbivorous crustaceans zooplankton do, the PUFA/SFA can also be used as an index of carnivory (Cripps et al., 2000; Stevens et al., 2004). Another index to determine the degree of carnivory was the ratio DHA/EPA (docosahexaenoic acid to eicosapentaenoic acid, 22:6n–3/20:5n–3) (Dalsgaard et al., 2003). DHA is highly conserved in food webs as it is an important component of polar lipids (Scott et al., 2002; Veefkind, 2003). The ratio DHA/EPA can be used to infer the proportion of flagellate to diatom consumption in Calanoida copepods because flagellates are rich in DHA, while diatoms are rich in EPA (Dalsgaard et al., 2003). In carnivorous copepods, the dietary signature of this index can be obscured by the trophic position because carnivorous copepods preferentially retain polar lipids which are rich in DHA (El-Sabaawi et al., 2009). The proportion of all diatom markers ( $D = 16\text{PUFA} + 16:1(n-7) + 20:5(n-3)$ ) to all flagellate markers ( $F = 18\text{PUFA} + 18:2(n-6) + 22:6(n-3)$ ), D/F, was also used to distinguish between diatom and dinoflagellate-based diet (El-Sabaawi et al., 2009). High proportions of 18:2(n–6) denote the presence of terrestrial detritus or green algae in zooplankton dietary (Dalsgaard et al., 2003).

## 2.8. Statistical analyses

The data recorded in this study were examined with a normalized principal component analysis (PCA) (Chessel et al., 1992). Physico-chemical (temperature, sigma-*t*, salinity, pH, suspended matter and nutrients), biological parameters (chlorophyll *a*, carotenoids and zooplankton) and fatty acids were considered. The discrimination between months was assessed by examining the projection of the plots of the extracted factors on a factorial plan consisting of the statistically significant axis of the PCA analysis. Simple log ( $x + 1$ ) transformation was applied to data in order to correctly stabilize the variance (Frontier and AuthorAnonymous, 1973). Mean and standard deviation (SD) were reported when appropriate. The potential relationships between variables were tested by Pearson's correlation coefficient. One-way ANOVA was applied to identify significant differences ( $p < 0.05$ ) between study ponds for physico-chemical and biological parameters variables. Analysis of variance (ANOVA) tests were made using XL stat software.

## 3. Results

### 3.1. Physical and chemical parameters

The mean values and standard deviations of the physico-chemical parameters in the four ponds are indicated in Table 1.

The water temperature in the four ponds varied from  $25.3 \pm 0.3$  °C (pond C41) to  $26.8 \pm 0.3$  °C (pond M2) (Table 1). This pattern of temperature is classically observed in the arid to semi-arid zone of the northern hemisphere (Elloumi et al., 2006). Due to the shallowness of the four studied ponds, no thermal stratification occurred. The pH ranged from  $8.1 \pm 0.02$  in pond A5 and C41,  $8.1 \pm 0.03$  in M2 to  $8.2 \pm 0.02$  in pond A16. The salinity showed an important variation between the different studied ponds ( $F = 179.98$ ,  $df = 76$ ,  $p < 0.001$ ), it increased progressively from  $41.9 \pm 0.1$  psu (pond A5) to  $191.3 \pm 0.6$  psu (pond M2). Concentrations of suspended matter ranged between  $548.7 \pm 27.21$  mg l<sup>-1</sup> (A16) and  $2378 \pm 111.5$  mg l<sup>-1</sup> (M2),

**Table 1**  
Biological and physico-chemical parameters (Mean  $\pm$  SD) of in the four ponds A5, A16, C41 and M2. Results of one-way ANOVA analysis.

Biological and physico-chemical parameters (mean $\pm$ SD)	Ponds				F values (df)
	A5	A16	C41	M2	
<b>Physical parameters</b>					
Temperature (°C)	26.1 $\pm$ 0.3	25.8 $\pm$ 0.3	25.3 $\pm$ 0.3	26.8 $\pm$ 0.3	0.22(76)
Salinity (psu)	41.9 $\pm$ 0.1	61.4 $\pm$ 0.4	95.5 $\pm$ 0.5	191.3 $\pm$ 0.6	179.98(76)***
pH	8.1 $\pm$ 0.02	8.2 $\pm$ 0.02	8.1 $\pm$ 0.02	8.1 $\pm$ 0.03	0.45(76)
Sigma-t (kg m <sup>-3</sup> )	0.98 $\pm$ 2.2	0.99 $\pm$ 2.8	1.02 $\pm$ 5.1	1.08 $\pm$ 3.6	9.72(76)***
Suspended matter (mg l <sup>-1</sup> )	652 $\pm$ 32.6	548.7 $\pm$ 27.21	739.8 $\pm$ 67.5	2378 $\pm$ 111.5	9.59(76)***
<b>Chemical parameters</b>					
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μmol l <sup>-1</sup> )	0.55 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.02	0.53 $\pm$ 0.02	0.71 $\pm$ 0.03	1.26(76)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μmol l <sup>-1</sup> )	4.08 $\pm$ 0.14	4.36 $\pm$ 0.18	5.87 $\pm$ 0.39	4.18 $\pm$ 0.21	0.53(76)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μmol l <sup>-1</sup> )	2.21 $\pm$ 0.06	2.00 $\pm$ 0.05	3.00 $\pm$ 0.10	2.46 $\pm$ 0.09	1.35(76)
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (μmol l <sup>-1</sup> )	2.56 $\pm$ 0.18	1.01 $\pm$ 0.06	2.22 $\pm$ 0.13	3.01 $\pm$ 0.19	1.52(76)
Si(OH) <sub>4</sub> (μmol l <sup>-1</sup> )	35.21 $\pm$ 2.09	22.1 $\pm$ 0.68	27.76 $\pm$ 2.48	37.85 $\pm$ 2.22	0.87(76)
T-N (μmol.l <sup>-1</sup> )	21.85 $\pm$ 0.18	22.06 $\pm$ 0.24	23.94 $\pm$ 0.41	21.87 $\pm$ 0.26	0.63(76)
T-P (μmol l <sup>-1</sup> )	9.61 $\pm$ 0.49	5.73 $\pm$ 0.21	8.25 $\pm$ 0.40	11.23 $\pm$ 0.55	1.36(76)
N/P ratio	4.78 $\pm$ 0.14	5.45 $\pm$ 0.15	5.02 $\pm$ 0.18	3.76 $\pm$ 0.13	1.29(76)
<b>Biological parameters</b>					
Chlorophyll <i>a</i> (mg m <sup>-3</sup> )	0.058 $\pm$ 0.003	0.035 $\pm$ 0.001	0.049 $\pm$ 0.002	0.039 $\pm$ 0.002	1.17(76)
Chlorophyll <i>b</i> (mg m <sup>-3</sup> )	0.018 $\pm$ 0.001	0.017 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.001	0.014 $\pm$ 0.001	0.11(76)
Chlorophyll <i>c</i> (mg m <sup>-3</sup> )	0.059 $\pm$ 0.004	0.034 $\pm$ 0.002	0.045 $\pm$ 0.002	0.048 $\pm$ 0.003	0.61(76)
Carotenoids (mg m <sup>-3</sup> )	0.071 $\pm$ 0.003	0.064 $\pm$ 0.002	0.084 $\pm$ 0.002	0.127 $\pm$ 0.008	1.74(76)
Zooplankton total (ind m <sup>-3</sup> )	13,374.3 $\pm$ 1073.06	3241.45 $\pm$ 410.5	7733.9 $\pm$ 420.3	11,657.7 $\pm$ 1729.77	0.90(76)

F values: between groups mean square/within-groups mean square.

Significant difference between sampled ponds: (\*\*\*) $p < 0.001$ .

and increased with increasing salinity ( $r = 0.857$ ,  $p < 0.001$ ). The suspended matter varied significantly between ponds ( $F = 9.59$ ,  $df = 76$ ,  $p < 0.001$ ). Nutrients showed small variation between all ponds. The nitrate concentration was higher than that of ammonium and nitrite. Orthophosphate and total phosphorus showed a quite similar behaviour. The DIN/DIP ratio ranged from  $10.03 \pm 0.71$  in M2 to  $14.44 \pm 0.81$  in C41. These values were below the Redfield ratio (16), indicating an excess of P in all ponds.

The highest mean value of Chlorophyll *a* was found in A5 ( $0.058 \pm 0.003 \text{ mg m}^{-1}$ ) whereas carotenoids attains a maximum value in M2 ( $0.127 \pm 0.008 \text{ mg m}^{-1}$ ).

### 3.2. Spatial abundance variation of zooplankton

The zooplankton community consisted of 15 copepod species belonging to three groups: Harpacticoida, Cyclopoida and Calanoida (Fig. 2). The species *Paracartia grani*, *Oithona nana*, *Oithona similis* and *Mesochra lilljeborgi* were the most abundant. The zooplankton community was dominated by copepods in A5, A16 and C41 which however were completely absent in the pond M2. This one was marked by the presence of only one anostraca taxa namely *Artemia salina*. Obvious differences in copepod composition were found between all the ponds. Calanoida were dominant in ponds A5 and A16 (48% and 55% of the total copepod abundance respectively), Harpacticoida were poorly represented in those ponds (10% and 11% of the total zooplankton abundance respectively). Cyclopoida were numerically important in ponds A5 and A16, contributing to 42% and 34% of the copepod total abundance respectively. Meanwhile, the C41 was mainly composed of Harpacticoida contributing to 100% of the copepod community (Fig. 2). The three groups Cyclopoida, Harpacticoida and Calanoida were negatively correlated with temperature ( $r = -0.06$ ,  $r = -0.95$ ,  $r = -0.239$ ,  $p < 0.05$  respectively) and salinity ( $r = -0.889$ ,  $r = -0.631$ ,  $r = -0.949$ ,  $p < 0.05$  respectively). Copepods were absent in pond M2 (Salinity = 191.3 psu), and substituted by *Artemia salina* which accounted on average for 100% of the total zooplankton abundance. *A. salina* was positively correlated with temperature ( $r = 0.846$ ,  $p < 0.05$ ) and salinity ( $r = 0.858$ ,  $p < 0.05$ ). The highest mean density of zooplankton being recorded in M2 ( $11657.7 \pm 1729.77 \text{ ind m}^{-1}$ ).

### 3.3. Zooplankton fatty acid composition – general patterns

Species for fatty acids analysis were chosen according to their indicator value (based on densities) within each sampling station. Fatty acids composition was the same in all ponds and for all species, except some species such as *Oithona nana* which does not contain some fatty acid like 24:1 (C 24:1 = 0%) in A16. SFA were composed of 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0 and 24:0; but mostly dominated by 16:0 and 18:0 (Table 2). The level of 16:0 ranged from 37.7% in female of *Artemia salina* to 72.1% in *Oithona similis*, the FA 16:0 was the highest concentration of fatty acids. The highest value of 16:0 was observed in A5 in *O. nana* and *O. similis* (64.4% and 72.1% respectively). Fatty acids 18:0 level was lower and ranged from 14.4% in male of *A. salina* to 30.9% of TFA in *Mesochra lilljeborgi* (Table 2). MUFA were composed of 14:1, 16:1, 17:1, 18:1, 20:1, 22:1 and 24:1. The MUFA was characterized by a high and clear dominance of 18:1 (n=9). The pattern of PUFA exhibited a predominance of 18:2 (7.4% in female of *A. salina* (Table 3)). The species *A. salina* showed the highest amounts of the total MUFA (21.7% for male and 24.2% for female) and the total PUFA (11.7% for female), a higher value of the total PUFA was also observed in female of *Paracartia grani* (10.9%); while the lowest values of the total MUFA and PUFA were observed in *O. similis* collected from A5 (0.6%) and *P. grani* males collected from A16 (3.3%), respectively. The species *O. similis* collected from A5 showed higher quantities of the total SFA (95.1%) mainly composed of mixtures of 16:0 (72.1%) and 18:0 (22%). The MUFA and SFA in Calanoida copepod *P. grani* (male or female) showed a large variation between ponds A5 and A16. The PUFA 20:2(n=6), 18:3(n=3), DHA and EPA were found in all species (male and female) collected from all ponds with very low amounts. DHA was absent in female of *P. grani* and *O. nana* collected from A16. We did not find ARA in *O. nana* in A16. The ARA, EPA and DHA abundance was low, not exceeding 0.7%, 0.3% and 0.5%, respectively in the *O. nana* (A5) (Table 3). The species *O. nana* (A5) accumulated more ARA than other species (Table 3).

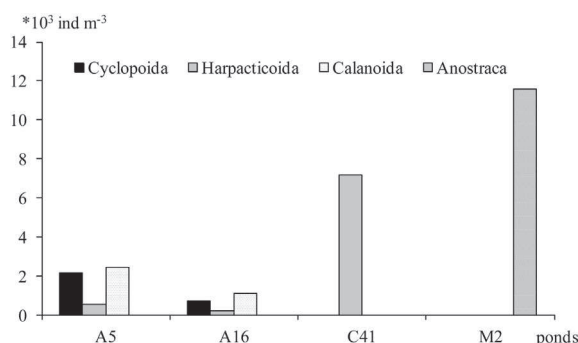


Fig. 2. Spatial variations of zooplankton abundance groups and Anostraca in ponds A5, A16, C41 and M2.

**Table 2**  
Relative fatty acid (FA) concentration (%) in all species at each station.

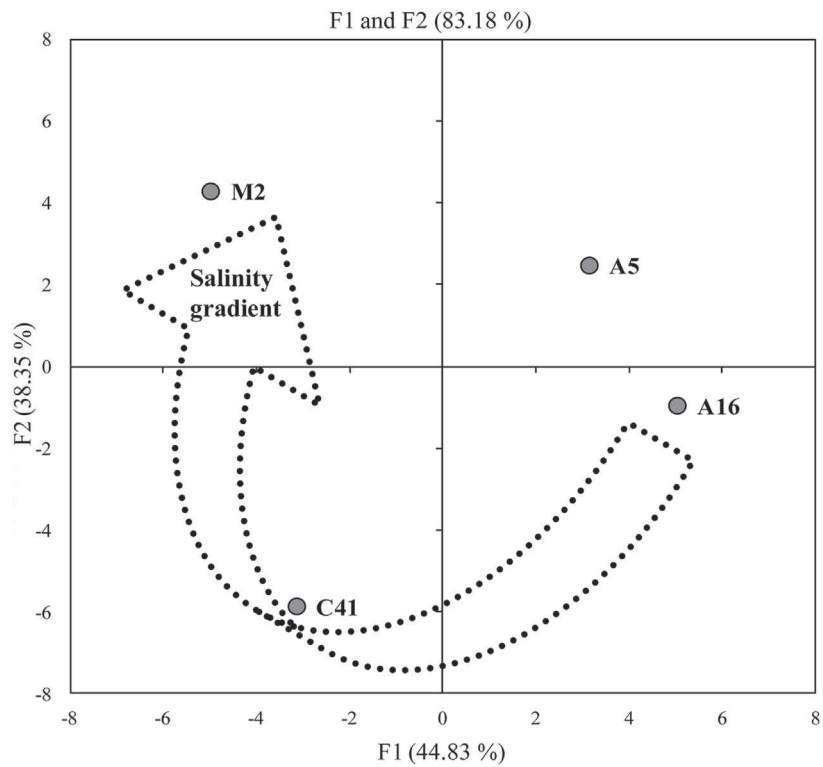
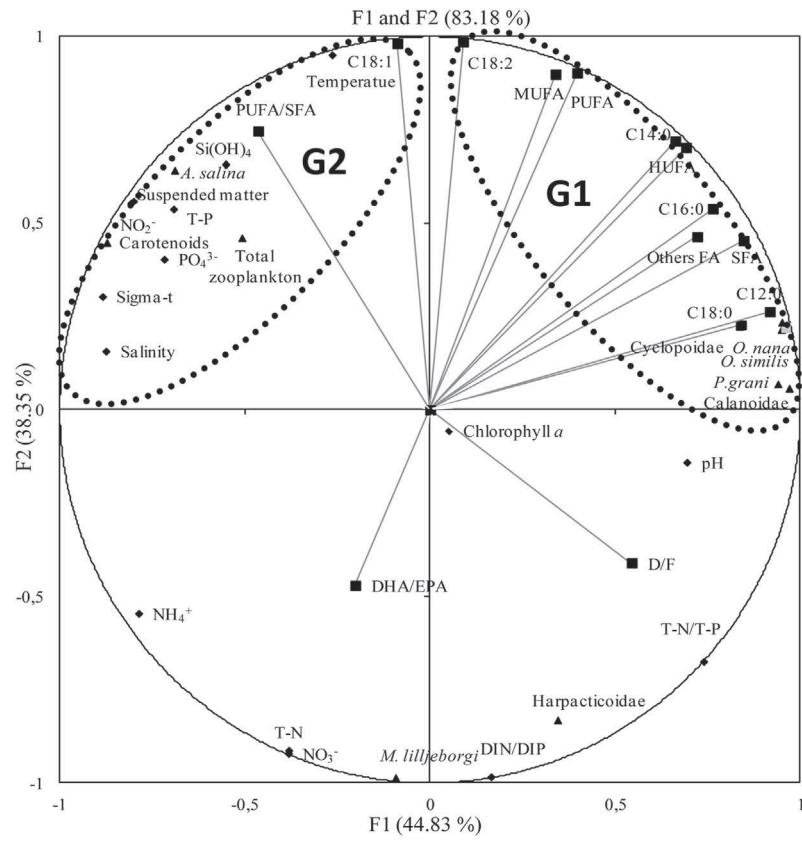
	<i>M. lilljeborgi</i>		<i>O. nana</i>		<i>O. similis</i>		<i>P. grani</i>		<i>A. salina</i>	
							Male	Female	Male	Female
Ponds	C41	A5	A16	A5	A5	A16	A5	A16	M2	
C12:0	2.3	0.05	9.7	0.05	2.6	2.9	3.2	3	1.9	2.1
C14:0	0.5	1.8	1.3	0.9	0.05	0.03	1.8	1.3	0.9	1
C16:0	52	64.4	44.4	72.1	52.6	46.1	47.3	38.7	41.4	37.7
C18:0	30.9	18.5	26.5	22	26.4	28.7	28.7	23.3	14.4	15.3
C20:0	0.2	0.3	0	0.01	0.2	0.4	0.1	0.5	0.1	0.4
C22:0	0.1	0.3	0.1	0.03	0.1	0.1	0.3	0.5	0.3	0.6
C24:0	0.05	0.4	0.1	0.01	0.01	0.1	0.01	0.2	0.1	0.2
Total SFA	86	85.8	82.1	95.1	81.9	78.4	81.4	67.6	59.1	57.2
C14:1 (n-5)	0.5	0.1	0.1	0.05	0.1	0.05	0.05	0.7	0.1	0.7
C16:1 (n-7)	0.3	0.01	0	0.1	0.1	0.5	0.2	0.3	0.4	0.7
C16:1 (n-7)	0.4	0.1	0.2	0.04	0.1	0.5	0.2	3.1	0.2	0.2
C17:1	0.6	0.03	8.9	0.05	0.2	0.8	0.9	9.4	0.8	0.4
C18:1 (n-9)	0.5	0.1	0	0.1	12.2	0	0.5	0	0.3	0.01
C18:1 (n-9)	3.5	6.5	4.3	0.1	7.2	2.1	4.2	2.5	15.1	18.6
C18:1 (n-9)	0.1	0.04	0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	4.1	0.1
C18:1 (n-9)	0.1	0.1	0	0.03	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	2.9
C20:1 (n-9)	0.1	0.4	0	0.03	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2
C20:1 (n-9)	0.4	0.1	0	0.05	0.3	1.7	0.2	2	0.1	0.2
C22:1 (n-9)	0.05	0.2	0.2	0.01	0.05	0.2	0.1	0.1	0.11	0.1
C24:1 (n-9)	0.04	0.5	0	0.01	0.01	0.1	0.01	0	0.05	0.1
Total MUFA	6.6	8.2	13.8	0.6	20.6	6.4	6.8	18.4	21.7	24.2
C18:2 (n-6)	0.1	0.2	0.9	0.1	0.1	0.1	0.5	1.6	0.3	0.5
C18:2 (n-6)	0.8	0.1	0	0.05	0.8	0.7	0.6	0	0.4	3.7
C18:2 (n-6)	0.1	0.04	0	0.04	0.03	0.1	0.4	0.8	0.3	0.3
C18:2 (n-6)	0.8	0.3	0	3.5	0.2	0.1	4.5	0.4	4.2	2.1
C18:2 (n-6)	0.3	0.1	0	0.02	0.3	0.1	0.1	0	0.2	0.3
C18:2 (n-6)	0.05	0.3	0	0.01	0.3	0.1	0.1	0.8	0.2	0.5
C18:3 (n-6)	0.3	0.3	0.2	0.1	0.8	0.05	0.9	1.1	0.9	1.1
C18:3 (n-3)	0.2	0.2	2.1	0.02	0.7	0.3	0.2	2.1	0.2	0.7
C18:3 (n-3)	0.2	0.2	0	0.03	0.1	0.6	0.4	0	0.5	0.2
C18:3 (n-3)	0.1	0.1	0	0.05	0.04	0.1	0.3	0.6	0.2	0.2
C20:2 (n-6)	0.1	0.1	0	0.02	0.1	0.1	0.2	1.7	0.2	0.7
C20:3 (n-6)	0.1	0.3	0.4	0.03	0.05	0.4	0.1	1.1	0.1	0.8
C20:3 (n-3)	0.04	0.2	0	0.02	0.04	0.1	0.1	0.5	0.4	0.3
C22:2 (n-3)	0.1	0.4	0	0.02	0.03	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C22:4 (n-6)	0.03	0.6	0	0.01	0.02	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C22:5 (n-3)	0.05	0.3	0.03	0.01	0.005	0.2	0.05	0.03	0.1	0.04
Total PUFA	3.3	3.9	3.7	4	3.7	3.3	8.7	10.9	8.4	11.7
ARA-C20:4 (n-6)	0.05	0.7	0	0.04	0.04	0.1	0.1	0.4	0.1	0.2
EPA-C20:5 (n-3)	0.05	0.3	0.1	0.04	0.03	0.1	0.1	0.3	0.1	0.2
DHA-C22:6 (n-3)	0.03	0.4	0.3	0.03	0.01	0.1	0.01	0.05	0.04	0.2
DHA-C22:6 (n-3)	0.1	0.5	0	0.01	0.01	0.03	0.01	0	0.04	0.1
Total HUFA	0.2	1.9	0.5	0.1	0.1	0.3	0.2	0.7	0.2	0.8

### 3.4. Principal component analysis

The plot of descriptors on axes 1 and 2 explained 83.2% of the total variance in fatty acid and environmental parameters (Fig. 3). The two axes F1 (44.8% of the total variance) and .3% of the total variance) selected two groups G1 (constituted by C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:2, PUFA, MUFA, HUFA, others fatty acids, the copepods species *Oithona nana*, *Oithona similis* and *Paracartia grani*) and G2 (formed by C18:1, temperature, PUFA/SFA, Si(OH)<sub>4</sub>, salinity, suspended matter, nitrite, total phosphorus, orthophosphorus, total zooplankton, carotenoids, sigma-t and *A. salina*) (Fig. 3). The plot of field observations showed a clear segregation between observations made in the hypersaline ponds M2 and C41 and the less salty ponds A5 and

**Table 3**  
Interspecific differences in fatty acid trophic markers (FATMS) for copepods and *Artemia salina* from the 4 ponds of the solar saltern of Sfax.

Ponds	<i>M. lilljeborgi</i>		<i>O. nana</i>		<i>O. similis</i>		<i>P. grani</i> male		<i>P. grani</i> female		<i>A. salina</i> male		<i>A. salina</i> female	
	C41		A5	A16	A5		A5	A16	A5	A16	M2		M2	
DHA/EPA	2.4		2.97	2.2	1		0.67	1	0.2	0.17	0.8		1.21	
18:2 (n-6)	2.14		1.1	0.89	3.69		1.77	1.14	6.27	3.6	5.56		7.45	
PUFA/SFA	0.04		0.05	0.04	0.04		0.05	0.04	0.11	0.16	0.14		0.2	
D/F	0.87		0.87	0.88	0.85		0.87	0.89	0.86	0.89	0.86		0.86	



**Fig. 3.** Principal component analysis (PCA) of the environmental parameters and fatty acid for copepods and *A. salina* at the four studied ponds A5, A16, C41 and M2. MUFA: Monounsaturated fatty acids, PUFA: Polyunsaturated fatty acids, HUFA: High unsaturated fatty acids, SFA: Saturated fatty acids, Others FA: Other fatty acids, DHA: Docosahexaenoic acid, EPA: Eicosapentaenoic acid, D: Sum of 16PUFA; 16:1n-7; 20:5(n-3), F: Sum of 18PUFA; 18:2(n-6); 22:6(n-3), T-N: Total nitrogen, T-P: Total phosphorus, DIN: Dissolved inorganic nitrogen, DIP: Dissolved inorganic phosphorus.



A16. The observations made in these two latter ponds were grouped in the positive part of the first axis together with the several fatty acid, in contrast to the observations made in ponds M2 and C41 which tended to group in the negative part of this axis, together with temperature, suspended matter, salinity, nutrients PUFA/SFA and total zooplankton (Fig. 3). The first PCA axis showed to be defined by FATMS of herbivory, D/F, whereas the second axis was more related to FATMS of carnivory and terrestrial detritus or green algae (PUFA/SFA; 18:2n–6). FATMS of herbivory (DHA/EPA) appear on the negative side of the second axis (Fig. 3). FATMS of herbivory (D/F) is significantly correlated with the total zooplankton ( $r = -0.998$ ,  $p < 0.05$ ). The PCA biplot showed that *A. salina* sampled from pond M2 significantly correlated ( $r = -0.959$ ,  $p < 0.05$ ) with a biomarker for carnivory (PUFA/SFA), whereas *Mesochra lilljeborgi* sampled from pond C41 is associated with the terrestrial detritus or green algae (18:2n–6) ( $r = -0.999$ ,  $p < 0.05$ ). These data are corroborated by ratios of FATMS (see Table 3). The dietary quality seems to be dependent not only on species but also on food availability in the four studied ponds.

#### 4. Discussion

In the solar saltern of Sfax, no significant correlation was found between the total zooplankton abundance and the two parameters of salinity and temperature. The same finding was reported by Toumi et al. (2005) in the same studied area. These results are in incongruity with works by Khemakhem et al. (2010) conducted in the Sfax salina, that showed a close correlation between salinity, associated with other environmental parameters, and zooplankton community. Our results indicate that the salinity had a negative effect on the abundance of copepods. These results are in agreement with other studies conducted in the solar saltern of Sfax (Elloumi et al., 2009b; Khemakhem et al., 2010).

The species *Oithona similis* was the most abundant copepod in pond A5. In ponds A16 and C41, the species *Oithona nana* and *Bryocamptus* sp. dominate, respectively. The same results were observed by Kobbi-Rebai et al. (2013).

Our results showed that the percentage of SFA (mainly 16:0) was high in all ponds, which might be related to the feeding of zooplankton from green algae (Chlorophyta) (Farhadian et al., 2013). This is supported by the fact that myristic acid (14:0) and palmitic acid (16:0) are the major fatty acids in green algae used by zooplankton (Brett et al., 2006). Generally, 14:0 and 16:0 are known as precursors of 20:1(n–6) and 22:1(n–6) fatty acids; however, the two later fatty acid were not detected in zooplankton samples of the saltern of Sfax. This might be due to a lack of the enzymatic system for chain elongation and desaturation of SFA in these zooplankton samples (Nanton et al., 1999). The highest value of 18:0 was observed in C41 in *Mesochra lilljeborgi*. The presence of long chain PUFA in the polar lipid fraction of copepods suggests that C18 from the diet (mainly cyanobacterium) may be elongated and desaturated by the copepod (Nanton et al., 1999). The ability to elongate and desaturate fatty acid may reduce the importance of some fatty acid as diet biomarkers while it may make the copepods as trophic intermediaries which transfer the organic matter from microorganisms to higher trophic webs (Caramujo et al., 2008). A high content of MUFA such as 18:1 (n–9) and 18:2 (n–6) found in *Artemia salina* (in pond M2) might be related to the feeding of zooplankton on cyanobacteria. Indeed, chlorophyceae and cyanobacteria are the main groups present in pond M2 (Khemakhem et al., 2010). A high proportion of 18:1(n–9) and 18:2 (n–6) was observed in copepods alimeted with cyanobacteria (Caramujo et al., 2008). The study by Guermazi et al. (2008) conducted in the Sfax salina showed that the fatty acid composition of the lipid fraction of *Artemia* was entirely composed of the Chlorophyceae *Dunaliella salina* and cyanobacteria.

The fatty acid composition varies among ponds. For instance, *Paracartia grani* showed a different fatty acid composition from pond A5 to pond A16. This could point at different food sources that are available in the ponds or it may be due to a different feeding behavior related to the environmental conditions in the ponds notably salinity. Our results indicate that the species *Paracartia grani* showed the highest amounts of the total HUFA in pond A16 than in pond A5. *Acartia* spp. are known to be a rich source of HUFA, in particular EPA and DHA (Vengadeshperumal et al., 2010). The hypersaline species (*Artemia salina*) was a rich source of MUFA, and PUFA. The higher amounts of MUFA and PUFA in Artemidae species than in the copepod species may be explained by their ability to adjust their MUFA and PUFA to salinity variations, whereas some species of copepods can't modify their MUFA and PUFA. Zooplankton are unable to synthesize PUFA at significant rates, therefore, this can be a limiting factor for their growth (Bell et al., 2009; Perumal et al., 2010).

This study indicates that fatty acids of herbivory, D/F, were negatively correlated with the total zooplankton ( $r = -0.998$ ,  $p < 0.05$ ). The species *Paracartia grani* (in pond A5) and *A. salina* (in pond M2) showed the highest amounts of the 18:2 (n–6). High proportions of 18:2 (n–6) denote the presence of terrestrial detritus or green algae in zooplankton dietary (Dalsgaard et al., 2003). Our results suggest also a high selectivity by all studied species, showing a large difference in fatty acids composition. Some species like *Paracartia grani* female (in ponds A5 and A16) and *A. salina* (in pond M2) showed the highest concentration of PUFA/SFA, pointing at the high availability of carnivorous food quality and the storage behavior of these species. The ratio PUFA/SFA denotes carnivory in copepods (Cripps et al., 2000).

The data in the present work showed that the species *Oithona nana* (pond A5) accumulated more ARA, EPA and DHA than other species. Copepods are rich in phospholipids, which are natural antioxidants and essential for synthesizing highly unsaturated fatty acids (Guangxing et al., 2009). A high level of DHA was a benefit effect on the productivity of copepods (Norsker et al., 1994).

Zooplankton of Sfax saltern can be used as a food source in the cultured finfish and shellfish larvae. The determination of the biochemical composition of microalgae of this area became important to isolate species which are responsible for high levels of some fatty acid in zooplankton.

## References

- Allan, E.L., Ambrose, S.T., Richoux, N.B., Froneman, P.W., 2010. Determining spatial changes in the diet of nearshore suspension-feeders along the South African coastline: stable isotope and fatty acid signatures. *Est. Coast. Mar. Sci.* 87, 463–471.
- Amdouni, R., 2009. Behaviour of trace elements during the natural evaporation of sea water: case of solar salt works of Sfax saline (S.E of Tunisia). *Global NEST J.* 11, 96–105.
- Bell, M.V., Tocher, D.R., 2009. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In: Kainz, M., Brett, M.T., Arts, M.T. (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer, New York, pp. 211–236.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Rev. can. biochim. physiol.* 37, 911–917.
- Boxshall, G.A., Halsey, S.H., 2004. *An Introduction to Copepod Diversity*. Ray Society, London, p. 966.
- Bradford-Grieve, J.M., 1994. Pelagic calanoid Copepoda: Megacalanidae, Calanidae, Paracalanidae, Mecynoceridae, Eucalanidae, Spinocalanidae, Clausocalanidae. *N. Z. Oceanogr. Inst. Mem.* 102, 1–160.
- Brett, M.T., Müller-Navarra, D.C., Ballantyne, A.P., Ravet, J.L., Goldman, C.R., 2006. Daphnia fatty acid composition reflects that of their diet. *Limnol. Oceanogr.* 51, 2428–2437.
- Caramujo, M.J., Boschker, H.T.S., Admiraal, W., 2008. Fatty acid profiles of algae mark the development and composition of harpacticoid copepods. *Freshw. Biol.* 53, 77–90.
- Chessel, D., Doledec, S., 1992. ADE Software (Version 3.6), Multivariate Analyses and Graphical Display for Environmental Data. User's Manual.
- Cripps, G.C., Atkinson, A., 2000. Fatty acid composition as an indicator of carnivory in Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 31–37.
- Dalsgaard, J., St John, M., Kattner, G., Müller-Navarra, D., Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv. Mar. Biol.* 46, 225–340.
- DeMott, W.R., 1995. Optimal foraging by a suspension-feeding copepod: responses to short-term and seasonal variation in food resources. *Oecologia* 103, 230–240.
- El-Sabaawi, R., Dower, J.F., Kainz, M., Mazumder, A., 2009. Characterizing dietary variability and trophic positions of coastal calanoid copepods: insight from stable isotopes and fatty acids. *Mar. Biol.* 156, 225–237.
- Elloumi, J., Carrias, J.F., Ayadi, H., Sime-Ngando, T., Boukhris, M., Bouain, A., 2006. Composition and distribution of planktonic ciliates from ponds of different salinity in the solar saltwork of Sfax, Tunisia. *Est. Coast. Mar. Sci.* 67, 21–29.
- Elloumi, J., Carrias, J.F., Ayadi, H., Sime-Ngando, T., Bouain, A., 2009a. Communities structure of the planktonic halophiles in the solar saltern of Sfax, Tunisia. *Est. Coast. Mar. Sci.* 81, 19–26.
- Elloumi, J., Guermazi, W., Ayadi, H., Bouain, A., Aleya, L., 2009b. Abundance and biomass of prokaryotic and eukaryotic microorganisms coupled with environmental factors in an arid multi-pond solar saltern (Sfax, Tunisia). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 89, 243–253.
- Farhadian, O., Kolivand, S., Mahmoudi Khoshdarehgy, M., Ebrahimi Dorch, E., Mahboobii Soofiani, N., 2013. Nutritional value of freshwater mesozooplankton assemblages from Hanna Dam Lake, Iran, during a one-year study. *Iran. J. Fish. Sci.* 12, 301–319.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Frontier, S., 1973. Statistic study of the zooplankton dispersion. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12, 229–262.
- Guangxing, L., Donghui, X., 2009. Effects of calanoid copepod *Schmackeria poplesia* as a live food on the growth, survival and fatty acid composition of larvae and juveniles of Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Ocean. Univ. China* 8, 359–365.
- Guermazi, W., Elloumi, J., Ayadi, H., Bouain, A., Aleya, L., 2008. Coupling changes in fatty acid and protein composition of *Artemia salina* with environmental factors in the Sfax solar saltern (Tunisia). *Aquat. Living Resour.* 21, 63–73.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L., 2009. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In: Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J. (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer, New York, pp. 1–24.
- Kobbi-Rebai, R., Annabi-Trabelsi, N., Khemakhem, H., Ayadi, H., Aleya, L., 2013. Impacts of restoration of an uncontrolled phosphogypsum dumpsite on the seasonal distribution of abiotic variables, phytoplankton, copepods, and ciliates in a man-made solar saltern. *Environ. Monit. Assess.* 185, 2139–2155.
- Kattner, G., Hagen, W., 2009. Lipids in marine copepods: latitudinal characteristics and perspective to global warming. In: Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J. (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer, London, pp. 257–280.
- Kelly, J.R., Scheibling, R.E., 2012. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 446, 1–22.
- Khemakhem, H., Elloumi, J., Moussa, M., Aleya, L., Ayadi, H., 2010. The concept of ecological succession applied to phytoplankton over four consecutive years in five ponds featuring a salinity gradient. *Est. Coast. Mar. Sci.* 88, 33–44.
- Mayzaud, P., Boutoute, M., Noyon, M., Narcy, F., Gasparini, S., 2013. Lipid and fatty acids in naturally occurring particulate matter during spring and summer in a high arctic fjord (Kongsfjorden, Svalbard). *Mar. Biol.* 160, 383–398.
- Nanton, D.A., Castell, J.D., 1999. The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture* 175, 167–181.
- Norsker, N.H., Stottrup, J.G., 1994. The importance of dietary HUFA's for fecundity and HUFA content in the harpacticoid Tisbe holothuriae Humes. *Aquaculture* 125, 155–166.
- Oren, A., 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 56–63.
- Parrish, C.C., 2009. Essential fatty acids in aquatic food webs. In: Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J. (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer, New York.
- Parsons, T.R., Strickland, J.D.H., 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.* 21, 155–163.
- Perhar, G., Arhonditsis, G.B., Brett, M.T., 2013. Modelling the role of highly unsaturated fatty acids in planktonic food web processes: sensitivity analysis and examination of contemporary hypotheses. *Ecol. Inf.* 13, 77–98.
- Perumal, P., Damotharan, N.P., Rajkumar, M., 2010. Laboratory culture and biochemical characterization of the calanoid copepod, *Acartia southwelli* Sewell, 1914 and *Acartia centrura* Giesbrecht, 1889. *Adv. Bio. Res.* 4, 97–107.
- Pommier, J., Frenette, J.J., Massicotte, P., Lapierre, J.F., Glémet, H., 2012. Seston fatty acid composition and copepod RNA: DNA ratio with respect to the underwater light climate in fluvial Lac Saint-Pierre. *Aquat. Sci.* 74, 539–553.
- Richmond, E.C., Wethey, D.S., Woodin, S.A., 2007. Climate change and increased environmental variability: demographic responses in an estuarine harpacticoid copepod. *Ecol. Model* 209, 189–202.
- Rose, M., 1933. Copépodes pélagiques. *Faune la Fr.* 26, 375.
- Santha, N.C., Ackman, R.G., 1990. Nervonic acid versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatographic analyses of fish oil longer-chain n-3 polyunsaturated fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B.* 553, 1–10.
- Sargent, J., Bell, J.G., McEvoy, L.A., Tocher, D., Estevez, A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191–199.
- Scor-Unesco, 1966. Determination of Photosynthetic Pigments in Sea Water. UNESCO, Paris.
- Scott, C.L., Kwasniewski, S., Falk-Petersen, S., Sargent, J.R., 2002. Species differences, origins and functions of fatty alcohols and fatty acids in the wax esters and phospholipids of *Calanus hyperboreus*, *C. glacialis* and *C. finmarchicus* from Arctic waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 235, 127–134.
- Stevens, C.J., Deibel, D., Parrish, C.C., 2004. Incorporation of bacterial fatty acids and changes in a wax ester-based omnivory index during a long-term incubation experiment with *Calanus glacialis* Jaschnov. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 303, 135–156.
- Toumi, N., Ayadi, H., Abid, O., Carrias, J.F., Sime-Ngando, T., Boukhris, M., Bouain, A., 2005. Zooplankton distribution in four ponds of different salinity: a seasonal study in the solar salterns of Sfax (Tunisia). *Hydrobiologia* 534, 1–9.
- Veefkind, R., 2003. Carbon isotope ratios and composition of fatty acids: tags and trophic markers in pelagic organisms. Dissertation. The University of Victoria, Victoria, British Columbia, Canada.
- Vengadeshperumal, N., Damotharan, P., Rajkumar, M., Perumal, P., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T., 2010. Laboratory culture and biochemical characterization of the calanoid copepod, *Acartia southwelli* Sewell, 1914 and *Acartia centrura* Giesbrecht, 1889. *Adv. Bio. Res.* 4, 97–107.

# Thèse de Doctorat

Chiraz LADHAR

*Étude de la dynamique, de la composition biochimique et de la variabilité génétique des copépodes et des Artemia d'un écosystème extrême : la saline de Sfax (Tunisie)*

*Dynamic, biochemical composition and genetic variability of copepods and Artemia of an extreme ecosystem : saltern of Sfax (Tunisia)*

## Résumé

Des approches traditionnelles en combinaison avec des méthodes moléculaires et biochimiques ont été utilisées pour étudier les communautés zooplanctoniques de la saline de Sfax.

Une dizaine d'espèces ont été identifiées dans 4 bassins de salinité croissante. Les copépodes étaient la composante la plus représentative du compartiment zooplanctonique dans les bassins A5, A16 et C41. Le bassin M2 est monozoiïque avec une présence exclusive d'*Artemia salina*.

Nous avons montré le rôle crucial de la salinité dans la distribution des espèces mais nous avons souligné également l'influence, quoique plus faible, d'autres facteurs comme le ratio N:P qui pourrait être liée au mode de vie des animaux et directement aux phytoplancton.

La composition en acides gras des copépodes et des *Artemia* est liée aux facteurs physico-chimiques et biologiques. Grâce à leur teneur en acides gras hautement insaturés, les copépodes et les *Artemia* peuvent être utilisés comme source alimentaire pour les poissons d'élevage.

La phylogénie des copépodes est controversée puisque la structuration génétique de ce groupe n'est pas nettement identifiable. L'existence d'espèces cryptiques au sein des *Paracartia grani* est supposée mais reste à confirmer. Les facteurs abiotiques ne sont pas impliqués dans ces processus de divergence génétique.

Chez *Artemia salina*, la forte teneur en sel, est un facteur de ségrégation des populations, l'adaptation des artémies à cette condition aboutit à des populations génétiquement distinctes. Un clivage génétique est repéré, il met en évidence une séparation entre les populations vivant dans de fortes teneurs en sel et celles en pleine mer.

**Mots-clés :** milieu extrême, copépodes, *Artemia*, acides gras, diversité génétique, phylogénie, génétique des populations.

## Abstract

Traditional and molecular methods were utilized to study zooplankton community of solar saltern of Sfax.

A dozen of species were identified in four ponds of increasing salinity. Copepods were the most abundant group in A5, A16 and C41. M2 is monozoiic with an exclusive presence of *Artemia salina*.

Salinity have a crucial role in species distribution, whereas, other factors such as N:P ratio have smaller influence.

Fatty acids composition of copepods and *Artemia* depends on physico-chemical and biological parameters. Owing to their Highly unsaturated fatty acids (HUFAs) composition, copepods and *Artemia* of the saltern of Sfax can be used as food source for cultured fishes.

Copepods phylogeny is controversial because their genetic structure is not clearly identifiable. The existence of cryptic species within *Paracartia grani* is assumed but should be confirmed. Abiotic factors are not involved in processes of genetic divergence.

For *Artemia salina*, the high salinity, is a factor of population segregation, the adaptation of *Artemia* in such condition leads to distinct, genetically, population.

A genetic divide was identified, it highlights a separation between population living in high salinity and those in the sea.

**Key Words :** extreme environment, copepods, *Artemia*, fatty acids, genetic diversity, phylogeny, population genetic