

RAPPORT DE STAGE LEONARDO DA VINCI 2013



ANICEE
LOMBAL

DIVERSITE DU GENRE *HALIMEDA* (BRYOPSIDALES, CHLOROPHYTA) EN PAPOUASIE NOUVELLE-GUINEE



STAGE EFFECTUE DU 15-01-2013 AU 15-07-2013

IRD INSTITUT DE RECHERCHE ET DE DEVELOPPEMENT

EQUIPE COREUS 227

MAITRE DE STAGE : CLAUDE PAYRI
STAGIAIRE : ANICEE LOMBAL



Remerciements

Je remercie la commission Européenne et, à travers elle, toute l'équipe de BIJob international de m'avoir permis l'accès à cette formation à l'étranger. Des échanges d'informations et de nouvelles régulières ont largement contribué au bon déroulement de mon stage autant du point de vue de ma propre assurance qu'au niveau de celle de ma Maitre de stage.

Je remercie également Madame Payri et Laurent Millet pour l'accueil qu'ils m'ont octroyé à l'IRD. Ils ont alloué un temps précieux à ma formation et ont su être présents lorsque les choses devenaient plus difficiles. Leur complémentarité m'a permis d'aborder mon sujet de deux manières très différentes m'apportant d'excellents outils pour mon avenir dans la recherche.

Je remercie ensuite toutes les personnes qui ont fait partie de mon quotidien pendant un temps, qu'il ait été court ou long, et qui m'ont chacun appris de petites choses qui ensemble auront grandi mes connaissances en matière de recherche. Merci donc à Daphné Grulois, Marc Oremus, Laure Barrabé, Christophe Vieira, Josina et Kelly.

Merci enfin à mes proches qui ont été très présents pour m'aider à mettre en place ce projet. Merci à mon fiancé, Julien, de m'entourer même dans les moments de pression, à ma mère, Marie-Françoise de Brabandère, de m'avoir soutenue sachant qu'elle ne me verrait plus pendant six mois et à Morgane, Melissa, Colin et Laura d'avoir égayé mes moments de pause à l'IRD.

TABLE DES MATIERES

I.	<u>Description des activités de l'entreprise d'accueil</u>	
I.1.	Institut de recherche pour le développement (IRD).....	2
I.2.	Biocomplexité des écosystèmes coralliens de l'Indo-Pacifique (CoRéUs).....	2
I.3.	Accueil au sein de l'équipe de Claude Payri.....	2
II.	<u>Introduction du genre <i>Halimeda</i></u>	
II.1.	Caractères morphologiques.....	3
II.2.	Caractères anatomiques.....	4
II.3.	Historique.....	5
-	II.3.1. De la morphologie à l'anatomie.....	5
-	II.3.2. Emergence des outils moléculaires.....	5
-	II.3.3. Aspects phylogéographiques.....	6
III.	<u>Objectifs du stage</u>	
IV.	<u>Matériel et méthode</u>	
IV.1.	Lieux d'échantillonnage.....	8
IV.2.	Classement des échantillons.....	8
IV.3.	Analyses génétiques de laboratoire.....	9
IV.4.	Analyses bioinformatiques.....	9
V.	<u>Résultats</u>	
V.1.	Arbre phylogénétique global.....	13
V.2.	Diversité génétique au sein de chaque lignée du genre <i>Halimeda</i>	14
-	V.2.1. Section <i>Rhipsalis</i>	14
-	V.2.2. Section <i>Halimeda</i>	16
-	V.2.3. Section <i>Pseudo-Opuntia</i>	19
-	V.2.4. Section <i>Opuntia</i>	20
-	V.2.5. Section <i>Micronesica</i>	24
VI.	<u>Discussion</u>	
VI.1.	Section <i>Rhipsalis</i>	26
VI.2.	Section <i>Halimeda</i>	27
VI.3.	Section <i>Pseudo-Opuntia</i>	28
VI.4.	Section <i>Opuntia</i>	28
VI.5.	Section <i>Micronesica</i>	29
VI.6.	Diversité du genre <i>Halimeda</i> en Papouasie Nouvelle-Guinée.....	30
VII.	<u>Conclusion et perspectives</u>	
VIII.	<u>Bibliographie</u>	

I. Description des activités de l'entreprise d'accueil

I.1 Institut de recherche pour le développement (IRD)

L'institut de recherche pour le développement (IRD) est un organisme français à caractère scientifique et technologique qui privilégie l'interdisciplinarité. Il a pour objectif de contribuer au développement social, économique et culturel des pays du Sud. Par son action de recherche, de formation et de partenariat, l'IRD est présent dans plus de 50 pays pour y traiter de sujets cruciaux tels que des changements climatiques ou des relations santé-environnement.

Créé en 1946, le centre de Nouméa, Nouvelle-Calédonie, est la principale implantation de l'IRD dans l'outre-mer tropicale française. Il héberge 15 unités de recherche qui en partenariat avec, entre-autres, l'IFREMER et le CNRS tentent de répondre à des enjeux locaux sur la thématiques des écosystèmes et des ressources naturelles marines et terrestres. Une série de projets y sont mis en place chaque année y compris celui de plus grande ampleur du muséum Calédonien qui permettrait de valoriser les échantillons scientifiques collectés depuis la création du centre.

I.2 Biocomplexité des Ecosystèmes Coralliens de l'Indo-Pacifique (CoRéUs)

Les récifs coralliens, ainsi que les écosystèmes qui y sont associés, sont un réservoir de biodiversité animale et végétale des fonds marins. Les coraux représentent un habitat et une source de nourriture pour de nombreuses espèces marines leur donnant un rôle majeur dans le maintien de la biodiversité du récif. Dans les îles du pacifique, en plus de contribuer à 90% des protéines animales consommées localement, les populations océaniques en dépendent pour le tourisme et pour l'ensemble des activités qui en découle. La sauvegarde et la gestion durable de cette ressource sont donc des enjeux fondamentaux d'un point de vue régional comme d'un point de vue mondial.

Depuis quelques décennies, plusieurs facteurs d'origine naturelle (cyclone, prolifération de l'étoile de mer *Acanthaster*) ou anthropiques (pollutions, surpêche) affectent la santé de ces écosystèmes. L'équipe CoRéUs vise à diagnostiquer cet état de santé et à évaluer l'efficacité des mesures de protection existantes à travers diverses thématiques. L'une d'entre -elle est l'assemblage de populations de poissons, invertébrés et macroalgues par « barcoding » (cf. Chapitre IV. Matériel et méthode) pour alimenter les bases nationales et internationales de données sur la biodiversité. L'accumulation de ces résultats permet de conduire des travaux d'analyse de plus grande ampleur dans un contexte Indo-Pacifique.

I.3 Accueil au sein de l'équipe de Claude Payri

Claude Payri est Directrice de l'unité de recherche 227 de CoRéUs, spécialiste en écologie de la flore marine des récifs coralliens, en taxonomie et biogéographie récifale et en reconstruction des paléoenvironnements. Ses thèmes de recherche s'articulent autour de trois axes centraux :

- la taxonomie et la phylogénie des algues marines dans le Pacific sud ;
- la relation entre l'habitat et la biodiversité dans l'écosystème corallien ;
- la paléoécologie en milieu corallien.

Mon stage s'inscrit dans le premier axe. Une série d'échantillons d'un genre d'algue verte (*Halimeda*) m'a été confiée afin que j'en établisse une phylogénie à partir d'outils moléculaire. Pour se faire, l'herbarium ainsi que les laboratoires de génétique m'ont été présentés. Une formation de base en taxonomie m'a été donnée par Claude Payri elle-même afin que je sois capable de reconnaître les différentes espèces du genre tandis qu'une formation en génétique m'a été donnée par Laurent Millet, responsable de la plateforme du vivant.

II. Introduction du genre *Halimeda*

Le genre *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) fait partie de la flore marine associée aux écosystèmes coralliens la mieux représentée. Très présent au niveau des récifs, on le retrouve également dans les fonds meubles des lagons jusqu'à 150m de profondeur. Son aire de répartition s'étend dans toute la zone marine tropicale et subtropicale, dans les trois océans (Pacifique, Indien et Atlantique) mais aussi en mer Méditerranée et en Mer Rouge (Verbruggen et al. 2005a).

Lorsque les organismes se reproduisent, ils meurent et sédimentent. Par ce biais, *Halimeda* est responsable de la formation de 90% des plages de sable et des récifs tropicaux (Drew 1983 ; Verbruggen 2005d). Son abondance et son ubiquité font dès lors de ce genre un producteur primaire d'intérêt mondial et expliquent qu'il fasse déjà l'objet de nombreuses études.

II.1 Caractères morphologiques

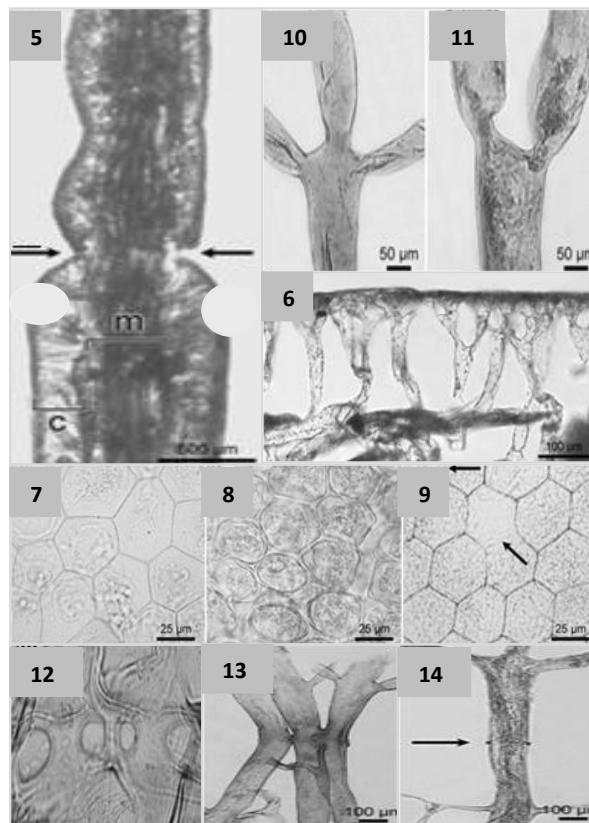
Halimeda est une algue verte, constituée de segments plus ou moins calcifiés séparés par des articulations ou « nœuds » non-calcifiés, lui donnant une structure articulée. L'aspect général du thalle peut être dressé, rampant ou buissonnant avec 1 à 4 ramifications dans la zone moyenne du thalle (Figs. 1-2 ; Verbruggen et al. 2004). Les segments sont de taille et de forme variables allant de 0.2mm à 5 cm de large avec une forme ronde, réniforme, lobé ou cylindrique. (Figs. 3-4 ; Verbruggen et al. 2004). Sa morphologie reflétant son habitat, (Gilmartin 1960, Colinvaux et al. 1965, Hillis-Colinvaux 1980, Kooistra et al. 2002) une des adaptations est son point d'attache au substrat formé d'un amas de rhizoïdes plus ou moins organisé. Dans des substrats meubles, de type sablonneux, il est formé d'un bulbe de rhizoïdes compacts augmentant l'adhésion aux grains de sables (Fig. 1 ; Verbruggen et al. 2004). Dans des substrats durs de type récifaux, les points d'attache peuvent être multipliés afin d'augmenter le contact au substrat (Fig. 2 ; Verbruggen et al. 2004).



Figures 1-4. Caractères morphologiques du genre *Halimeda*. **Fig. 1.** Structure articulée, thalle dressé, rhizoïdes en forme de bulbe. *H. macroloba*, Chesterfield. **Fig.2.** Structure articulée, thalle buissonnant ramassé à rampant, rhizoïdes avec plusieurs points d'attache au substrat. *H. opuntia*, Chesterfield. **Fig.3.** Segment de 2cm, forme réniforme. *H. macroloba*, Chesterfield. **Fig.4.** Segment de 0.8 cm, forme trilobée. *H. opuntia*, Chesterfield. Tous les spécimens proviennent de l'herbarium de l'IRD.

II.2 Caractères anatomiques

Appartenant aux Bryopsidales, l'organisme tout entier n'est constitué que d'une seule cellule tubulaire plurinucléée (Figs. 5-14 ; Verbruggen et al. 2004). La cellule s'anastomose en un nombre élevé de siphons qui s'organisent dans chaque segment en une zone compacte, la medulla, et une zone lâche, le cortex (Fig.5. ; Verbruggen et al. 2004). Les siphons médullaires se ramifient par dichotomie, trichotomie ou quadrichotomie ou peuvent juste présenter des constriction sans se diviser (Figs. 10-11. ; Verbruggen et al. 2004). Dans la zone du cortex, le calcaire s'accumule sous forme d'aragonite (Fig.6; Verbruggen 2004). Les siphons terminaux qui y sont visibles ont une structure renflée formant des utricules à formes polygonales diversifiées. Après décalcification, ceux-ci apparaissent attachés, fusionnés ou distants les uns des autres en fonction des espèces (Figs.7-9. ; Verbruggen 2004). Enfin, la fusion siphonale au niveau des nœuds qui séparent chacun des segments est un caractère de détermination important. La fusion peut impliquer de 2 à plusieurs siphons, elle peut être partielle, partielle avec des pores de connexion, totale ou absente (Fig.12-14. ; Verbruggen et al.2004).



Figures 5-14. Caractères anatomiques du genre *Halimeda*. **Fig. 5.** Section transversale de deux segments successifs montrant la medulla (m) et le cortex (c) ; *H. incrassata*. **Fig.6.** Zone corticale terminale d'accumulation d'aragonite ; *H. distorta*. **Figs.7-9.** Vue de surface des utricules périphériques. **Fig.7.** Utricules à forme polygonale irrégulière fermement attachés ; *H. melanesica*. **Fig.8.** Utricules à forme arrondie détachés les uns des autres ; *H. macroloba*. **Fig.9.** Utricules hexagonaux montrant des points de fusion ; *H. discoidea*. **Figs.10-11.** Ramification des siphons médullaires. **Fig.10.** Trichotomie ; *H. monile*. **Fig.11.** Dichotomie ; *H. tuna*. **Figs.12-14.** Fusion siphonale au niveau des nœuds. **Fig.12.** Fusion partielle avec pores de connexion ; *H. incrassata*. **Fig. 13.** Fusion incomplète de trois siphons ; *H. copiosa*. **Fig.14.** Siphons traversant le nœud sans fusion aucune ; *H. micronésica*. Tous les spécimens proviennent de l'herbarium de GENT.

II.3 Historique

II.3.1 De la morphologie à l'anatomie

Le genre *Halimeda* est écarté de celui des *Corallia*, et donc du règne animal, par Lamouroux en 1812. Pendant le 19^{ème} siècle, la description des espèces qui le composent est basée sur des caractères morphologiques. Il faut attendre le début du 20^{ème} pour que l'acquisition de la microscopie permette à Barton (1901) et plus tard à Hillis-Colinvaux (1980) d'établir une monographie à partir de critères anatomiques et biogéographique suffisamment discriminants pour déterminer 5 lignées distinctes : *Rhipsalis* (8 espèces), *Opuntia* (7 espèces), *Halimeda* (11 espèces), *Micronesica* (3 espèces) et *Cryptica* (1 espèce) (Fig.15. Description des lignées ; Hillis-Colinvaux 1980, Verbruggen et al. 2004).

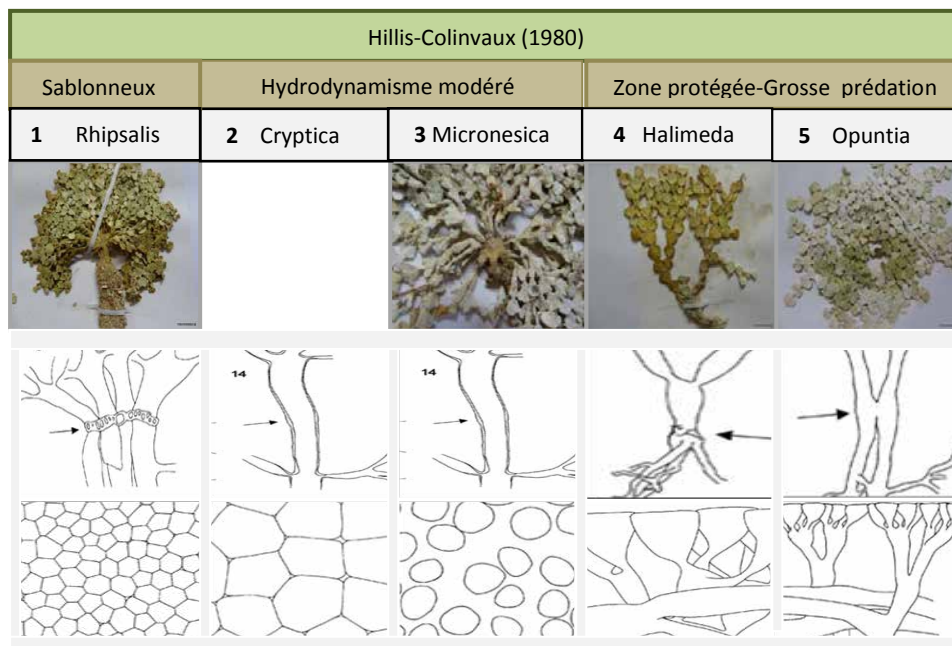


Figure 15. Monographie de Hillis-Colinvaux ; 1980. **Fig.15.1** Lignée *Rhipsalis*. Substrat sablonneux, thalle érigé, bulbe développé, fusion nodale partielle avec présence de pores, utricules ronds à polygonaux soudés mais non-fusionnés ; *H. borneensis*. **Fig.15.2.** Lignée *Cryptica*. Récifs à hydrodynamisme modéré, thalle buissonnant, rhizoïdes désorganisés avec un seul point d'attache, fusion nodale absente avec un seul siphon par nœud, utricules adhérents à forme polygonale irrégulière ; *H. cryptica*. **Fig.15.3.** Lignée *Micronesica*. Récifs à hydrodynamisme modéré, thalle buissonnant, rhizoïdes désorganisés avec un seul point d'attache, fusion nodale absente avec plusieurs siphons par nœud, utricules séparés à forme arrondie ; *H. micronesica*. **Fig.15.4.** Lignée *Halimeda*. Récifs protégés à haut degré de prédation, thalle érigé, rhizoïdes désorganisés avec un seul point d'attache (parfois présence d'un bulbe), fusion totale de 2-3 siphons et redivision après le nœud, faible calcification. **Fig.15.5.** Lignée *Opuntia*. Récifs protégés à haut degré de prédation, thalle rampant, un à plusieurs points d'attache au substrat, fusion nodale partielle de 2-4 siphons, forte calcification. Photos prises à l'IRD.

II.3.2 Emergence des outils moléculaires

L'émergence des outils moléculaires dans les années 90 amène Hillis et al. (1998) à construire la première phylogénie du genre. Ils utilisent un marqueur nucléaire 18S ribosomal sur 10 espèces et confirment 4 des lignées de Hillis-Colinvaux. L'adéquation entre la génétique et les caractères morpho-anatomiques est dès lors mise en évidence (Verbruggen 2005c). En 2002, Kooistra et al. utilisent 3 marqueurs nucléaires (ITS1, 5.8S and ITS2) sur 28 espèces et ouvrent la discussion autour des 5 lignées de Hillis-Colinvaux. La lignée *Halimeda* est séparée en deux lignées (*Halimeda* et *Pseudo-Opuntia*) et la lignée *Cryptica* est intégrée à la lignée *Micronesica*. De plus,

l'espèce *H. melanesica*, autrefois intégrée dans la lignée *Micronesica* par H.C., se retrouve dans la lignée *Rhipsalis* (Fig.16., Kooistra 2002). Cette étude mettra en évidence la valeur adaptative de certains traits morpho-anatomiques¹.

Figure 16. Comparaison des classements du genre *Halimeda* par Hillis-Colinvaux (1980) et Kooistra (2002).

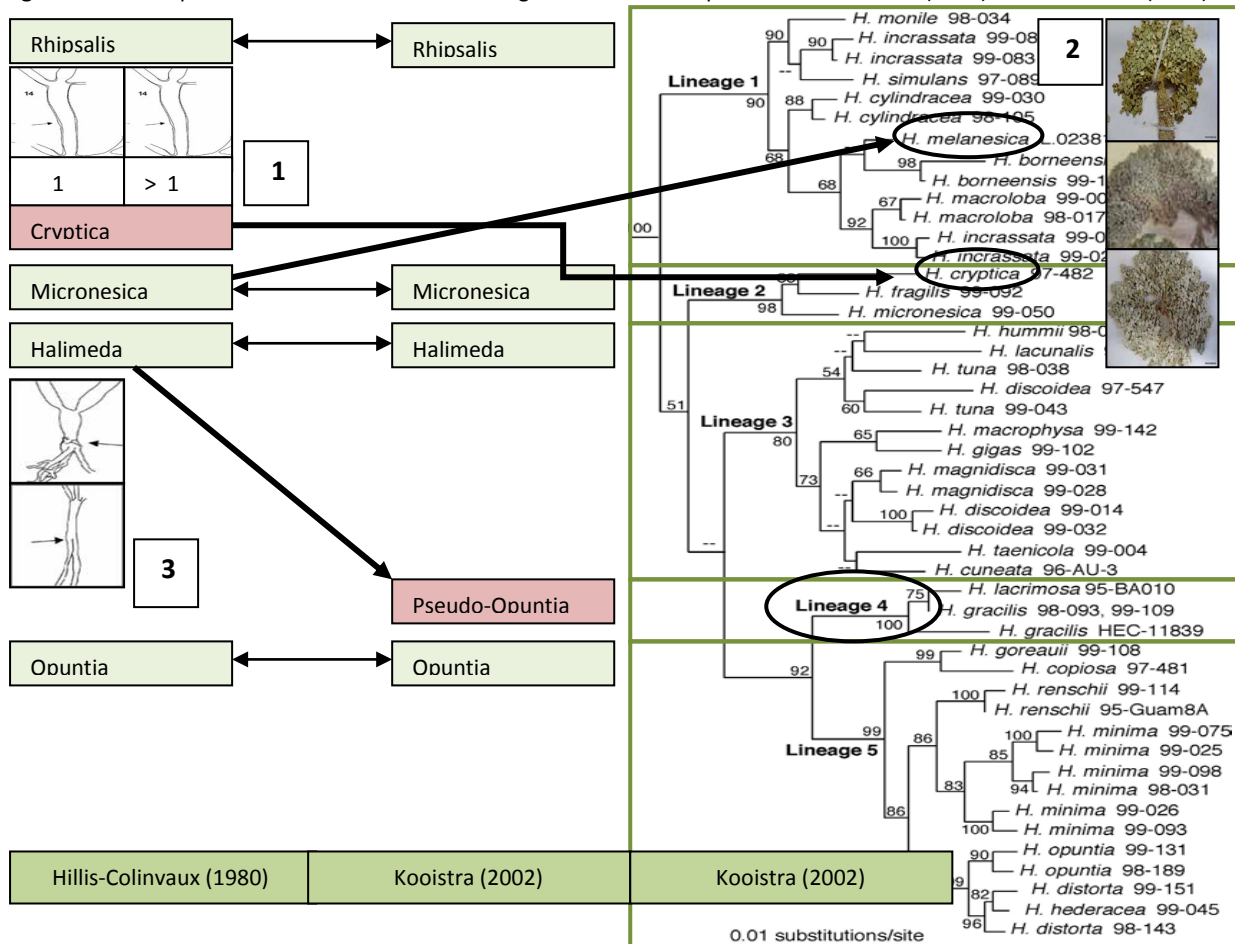


Fig.16.1 La lignée *Cryptica* de H.C. est incluse dans la lignée *Micronesica* de Kooistra. **Image 1 de gauche à droite** : un seul siphon nodal chez l'espèce *H. cryptica*, de 2 à plusieurs siphons nodaux chez les espèces de la lignée *Micronesica*. **Fig.16.2** L'espèce *H. melanesica* incluse dans la lignée *Micronesica* par H.C. est incluse dans la lignée *Rhipsalis* par Kooistra. **Image 2 de haut en bas** : *H. borneensis* avec son bulbe appartenant à la lignée *Rhipsalis*, *H. melanesica* sans bulbe a l'aspect général de *H. micronesica*, *H. micronesica*. **Fig.16.3** Les espèces *H. lacrimosa* et *H. gracilis* incluses dans la lignée *Halimeda* de H.C. forment une nouvelle lignée, *Pseudo-Opuntia*, chez Kooistra. **Image 3 de haut en bas** : fusion de plusieurs siphons pré-nodaux chez *Halimeda*, fusion de 2 siphons pré-nodaux dans la lignée *Pseudo-Opuntia*.

Les outils moléculaires élargissent ainsi nos compétences en matière de description et de classement des espèces. Même si dans le cas d'*Halimeda* la morpho-anatomie et la phylogénie

¹ *H. cryptica* diffère de toutes les autres espèces par la présence d'un siphon nodal unique. Sur base de cette observation, H.C. l'isole des autres lignées. La génétique montre qu'elle est pourtant monophylétique avec *H. fragilis* et *H. micronesica* de la lignée *Micronesica*. L'absence de fusion nodale étant leur caractère partagé. En réalité, le caractère « siphon unique » est une adaptation à un milieu plus profond et moins agité ne nécessitant plus la souplesse du thalle comme chez les autres espèces de la lignée *Micronesica*. De la même manière, *H. melanesica* est classé dans la lignée *Micronesica* par H.C. par homologies morphologiques : un point d'attache au substrat non-bulbaire, les segments sont petits, le thalle est buissonnant. Pourtant, la génétique montre qu'elle est monophylétique avec la lignée *Rhipsalis*. En réalité, il s'agit d'un cas de convergence évolutive avec les organismes de la lignée *Micronesica*, résultat d'une adaptation à un milieu récifal et non sablonneux à hydrodynamisme important nécessitant également une augmentation de la souplesse du thalle (Kooistra 2002).

montrent des résultats similaires, ils apportent un important complément d'informations en matière d'affinité biogéographique et d'histoire évolutive. Ils permettent également d'obtenir une classification globale rapidement rendant inutile l'observation de tous les individus échantillonnés et donc faisant gagner un temps précieux aux scientifiques. A ce jour, 52 espèces sont reconnues à l'aide de 4 marqueurs chloroplastiques (*rbcL*, *tufA*, UCP3, UCP7) et 2 marqueurs nucléaires (SSUnrDNA, *ITS*) (Verbruggen 2009).

II.3.4 Aspects phylogéographiques

En 2009, Verbruggen établit une phylogénie comprenant des espèces échantillonnées dans l'Atlantique et dans le complexe Indo-Pacifique. Une séparation quasiment parfaite en un clade « Atlantique » et un autre clade « Indo-Pacifique » divise chacune des lignées. Des modèles de niche écologiques basés sur la température et sur la disponibilité en nutriments montrent que des espèces telles *H.borneensis* (Indo-Pacifique) et son homologue *H.incrassata* (Atlantique) seraient aptes à survivre dans la région opposée. Ce sont donc des événements de spéciation allopatriques par vicariance qui serait la cause de cette ségrégation et non l'adaptation à l'environnement. L'orientation Nord-sud des continents Américains et Africains, la fermeture du bras de mer de Téthys (13 Ma) et l'expansion de l'Isthme du Panama (3.5 Ma) sont des événements incriminants de cette ségrégation (Kooistra 2002). Le cas unique de *H.opuntia* que l'on retrouve dans les deux océans pourrait être l'œuvre d'un mixage antérieur de ces eaux. Cela étant, il reste encore beaucoup d'éléments inconnus dont la dispersion que les algues peuvent faire preuve notamment au sein du complexe Indo-Pacifique.

III. Objectifs du stage

La Papouasie Nouvelle-Guinée occupe une position centrale au sein du complexe Indo-Pacifique. Située au Sud-Est de l'Indonésie et au Nord de l'Australie, elle est un carrefour biologique entre l'Asie tropicale et l'Est du Pacifique. Aussi, la diversité génétique du genre *Halimeda* a déjà été estimée à partir d'échantillons provenant notamment des Philippines (Nord-Est du Pacifique, Verbruggen 2005a), des Maldives (océan Indien, Dijoux 2012) et de la Nouvelle-Calédonie (Sud-Est du Pacifique, Dijoux 2012) mais jamais à partir de cette zone intermédiaire. C'est pourquoi mes recherches sont orientées vers cette région.

A partir d'outils moléculaires, mon stage s'articule autour de trois axes complémentaires. Le premier consiste à donner une estimation de la richesse spécifique du genre *Halimeda* échantillonné dans le lagon de Madang en Papouasie Nouvelle-Guinée. Le second consiste à observer à travers chaque lignée s'il existe un pattern géographique des différentes espèces du genre *Halimeda*. C'est-à-dire d'identifier s'il apparaît des sous-groupes communs à l'une ou l'autre région dans toutes les lignées. Et enfin le troisième consiste à étudier les éventuelles espèces polyphylétiques de façon plus précise afin de les documenter sur d'éventuelles espèces cryptiques issues de spéciations allopatriques ou sympatriques.

IV. Matériel et méthode

IV. 1 Lieux d'échantillonnage

La Papouasie Nouvelle-Guinée est située dans le Sud-ouest de l'Océan Pacifique, entre 3°S et 9°S, 140°N et 145°N au Nord de l'Australie et au Sud-est des Philippines. Elle fait partie du « Triangle de Corail » regroupant 6 pays qui représentent l'épicentre de la biodiversité corallienne (Niugini, 2012). La station principale échantillonnée est située dans le lagon de Madang (Fig. 17 ; Carte des zones échantillonnées). Le lagon est de petite taille et présente de nombreux habitats proches spatialement mais contrastés de par leur nature (platiers coralliens, tombants verticaux, herbiers etc ; Serge Andrefouet, 2012). Cette diversité du paysage sous-marin contribue fortement à l'importante biodiversité marine qui y est reconnue.

Une série d'échantillons inclus dans l'analyse proviennent de 2 zones de l'Océan Indien (Maldives, îles Glorieuses), de 2 zones d'Asie du Sud-est (Philippines, Okinawa) et de 3 zones de l'Est du Pacifique (Polynésie française, Îles marquises, Îles Gambier ; Fig.17. Carte des zones échantillonnées) afin de couvrir le mieux possible le complexe Indo-Pacifique.

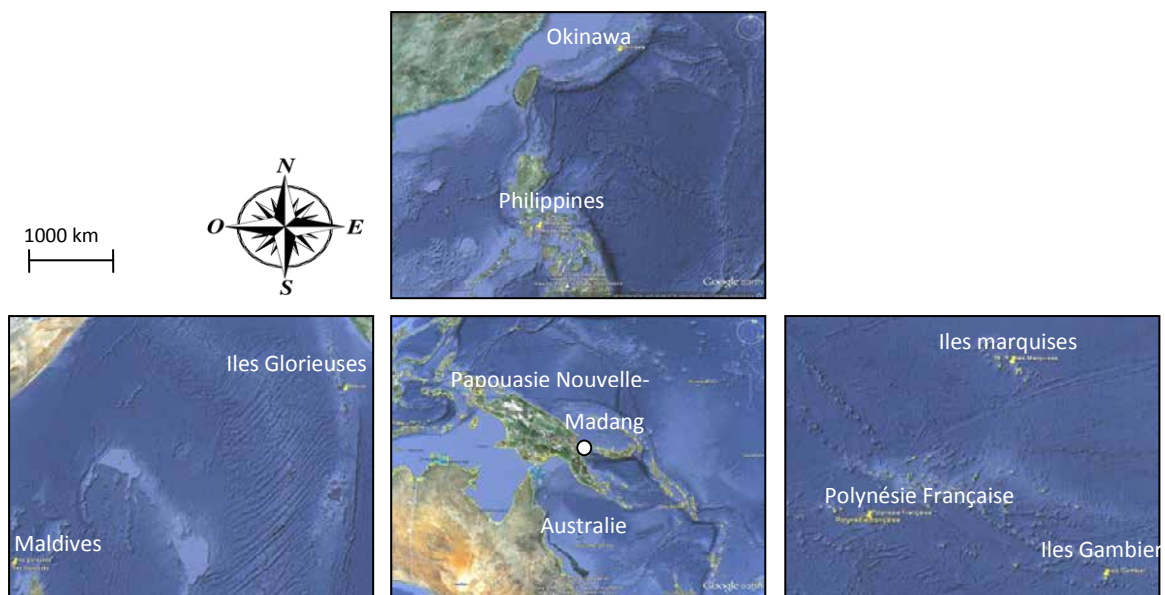


Figure 17. Carte de zones échantillonnées. La plupart des échantillons proviennent du Lagon de Madang en Papouasie Nouvelle-Guinée (image centrale). D'autres proviennent (de haut en bas et de gauche à droite) : d'Asie du Nord-est (Okinawa et Philippines), de l'Océan Indien (Maldives, îles Glorieuses) et du pacifique Est (Polynésie Française, Îles Marquises et îles Gambier). Images provenant de Google Earth.

IV. 2 Classement des échantillons

Les spécimens étudiés ont été récoltés en scaphandre autonome lors de campagnes océanographiques réalisées entre 2009 et 2012 par Claude Payri et Heroen Verbruggen pour la Papouasie Nouvelle-Guinée, les Îles Marquises, les îles Gambier et les îles Glorieuses et par Laurent Vigliola (CoRéUs) pour la Nouvelle-Calédonie (Chesterfield). Les échantillons arrivent dans nos locaux numérotés, répertoriés et conservés dans de l'éthanol à 90% en vue des analyses d'ADN. Seuls ceux provenant de Nouvelle-Calédonie sont arrivés en vrac et ont donc été classés et mis en tube à

l'herbarium de l'IRD. Les séquences des autres régions (Maldives, Afrique de l'Est, Nord-est Atlantique) proviennent de Genbank et sont donc déjà déterminées jusqu'au niveau de l'espèce.

IV. 3 Analyses génétiques de laboratoire

L'ADN des échantillons a été extrait à partir du protocole d'extraction de Kooistra (2002) avec néanmoins des variations, notamment de temps de pause, afin d'optimiser le rendement en termes de concentration d'ADN final. Deux segments du thalle de chaque individu sont séchés à l'air libre durant 24 heures puis broyés à l'azote liquide à l'aide d'un pilon et d'un mortier. 500 µl de tampon d'extraction (100mM tris-HCl, PH 8.0 ; 50mM EDTA, PH 8.0 ; 100mM NaCl ; 1% m/v SDS ; 1% m/v PVP-40 ; 0.5 % v/v 2-mercaptoethanol) préchauffés à 60°C sont ajoutés à la poudre obtenue. Les tubes sont incubés à 60°C pendant 3 heures avec agitation toutes les 20 minutes. 500 µl de chloroforme isoamylalcohol CIA (24/1 ; v/v) sont ajoutés au mélange. Les tubes sont agités 5 minutes mécaniquement puis centrifugés 8 minutes à 13200 tours/min. La couche aqueuse est collectée et une seconde extraction au CIA est appliquée suivie à nouveau de 8 minutes de centrifugation à 13200 tours/min. La couche aqueuse est collectée et l'ADN est précipité par l'ajout de 0.5 volume d'acétate d'ammonium (8M, PH 8.0) et 2 volumes d'éthanol 100% suivi d'un stockage à -20°C pendant 1 heure. Les tubes sont centrifugés 15 minutes à 13200 tours/min puis vidés de leur surnageant. Le culot d'ADN obtenu est lavé à l'éthanol 70%, séché 10 minutes à l'air libre puis suspendu dans 50 µl TE (10mM Tris-HCl, PH 8.0 ; 1mM eau distillée).

Le choix du marqueur utilisé pour amplifier l'ADN des échantillons s'appuie sur les études de Verbruggen (2005 ; 2009). Le marqueur chloroplastique *tufA* (F : 5'-TGAAACAGAAMAWCGTCATTATG-3' ; R : 5'-CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC-3' ; Fama et al. 2002) a été choisi pour sa qualité discriminante (suffisamment conservé mais assez polymorphe) essentielle pour l'identification des espèces mais également pour sa disponibilité en séquences sur Genbank. Les milieux réactionnels de PCR ont été préparés afin de contenir 0.4 µM d'amorces *Forward* et *Reverse*, 0.2 µM de DNTP, 2.5 µl de tampon de réaction 10X (contenant 1.5 mM de MgCl₂), 1.2 unité de Taq polymérase Hot start et de l'eau ultrapure pour un volume final de 25 µl. La réaction de polymérisation en chaîne a été effectuée dans un thermocycleur (VERITI, Applied Biosystems) selon deux programmes différents. Le premier pour *tufA* : une phase de dénaturation de 2 minutes à 94°C, 40 cycles de dénaturation de 1 minute à 94°C, une phase d'hybridation de 2 minutes à 52°C, une phase d'extension de 2 minutes à 72°C et une phase finale d'extension de 5 minutes à 72°C. Le second pour *HtufA*, amplifiant un sous-fragment de *tufA* : une phase de dénaturation de 5' à 94°C, 40 cycles de dénaturation de 45 secondes à 94°C, une phase d'hybridation de 2 minutes à 52°C, une phase d'extension de 4 minutes à 72°C et une phase finale d'extension de 7 minutes à 72°C.

Le séquençage des fragments d'ADN obtenus a été réalisé par la société Macrogen (Séoul, Corée) par la méthode 'Big Dye terminator' dans les deux sens *Forward* et *Reverse*.

IV. 4 Analyses phylogénétiques

Les séquences obtenues sont nettoyées et alignées à partir du logiciel CodonCode Aligner version 4.2.1 (Copyright CodonCode corporation). L'alignement est complété par 122 séquences disponibles sur Genbank obtenues avec *tufA* pour toutes les régions du monde confondues (Tableau 1. Spécimens utilisés dans l'analyse et leur localisation géographique).

Deux méthodes de reconstruction phylogénétiques sont appliquées à l'alignement de séquences final. La première, Maximum Likelihood (ML) est réalisée avec le logiciel MEGA version 5.2 (Tamura et al. 2011). Le logiciel FINDMODEL (disponible en ligne sur <http://www.hiv.lanl.gov>) est utilisé pour déterminer le modèle d'évolution le plus adéquat pour l'analyse ML. La robustesse des nœuds obtenus est calculée par bootstraps (BP ; Felsenstein 1985) avec 1000 répliques. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% (moyennement soutenu BP= [50%-70%]; bien soutenu BP= [70%-80%]; robuste BP>80%) sont rapportées sachant qu'en deçà de cette valeur la position des nœuds n'est pas considérée comme significative. La seconde, une approche Bayésienne, est réalisée avec le logiciel Mr Bayes 3.2 (Ronquist et al. 2003). Seules les probabilités postérieures (p.post.) supérieures à 0.8 sont reportées pour les mêmes raisons que dans le modèle ML sachant que le modèle n'offre de robustesse qu'au dessus de 0.9. Dans les deux cas, l'arbre est enraciné à partir des outgroups *Udotea orientalis* et *Avrainvillea rawsonii* (Bryopsidales, Chlorophyta) selon le modèle de Verbruggen (2006).

Une fois l'arbre général obtenu, chaque lignée est reconstruite phylogénétiquement par les deux méthodes décrites précédemment avec pour outgroup une espèce provenant de la lignée qui lui est le plus proche génétiquement. La manipulation permet de vérifier la position des espèces entre-elles au sein de la même lignée.

Lorsqu'une espèce apparaît polyphylétique de manière intra-régionale ou inter-régionale, un arbre phylogénétique non raciné est construit avec MEGA lorsque le nombre d'individus ne dépasse pas 10. Aussi, un réseau d'haplotypes est construit à partir du logiciel Network version 4.6.1.1 (Copyright 2004-2012 Fluxus Technology) pourvu que le nombre de mutations entre chaque haplotype ne dépasse pas 20. Lorsque le nombre d'individus au sein d'une même espèce est supérieur à 30, un indice de fixation (Fst) est calculé afin de déterminer s'il existe une structure (ou différenciation des populations) à l'intérieur de cette espèce. L'indice est obtenu à partir du logiciel Arlequin version 3.1 (Copyright 2006 L.Excoffier).

Tableau 1. Spécimens de Genbank utilisés dans l'étude avec leur localisation géographique. La colonne « numéro » se réfère aux numéros des échantillons dans l'herbarium de GENT et de l'IRD. Les localisations géographiques données entre parenthèses : CAR : Caraïbes ; C : central ; E : Est ; O : Ouest ; A : Atlantique ; I : Océan Indien ; P : Océan Pacifique.

Espèces	Numéro	Localité	Genbank
<i>H.minima</i>	HV63	(CP) Polynésie Française, Tahiti (PF)	FJ624671
<i>H.minima</i>	HV74	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	FJ624673
<i>H.minima</i>	IRD4858	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644702
<i>H.minima</i>	IRD4877	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644704
<i>H.minima</i>	HV765	(OP) Palawan, Philippines (Ph)	FJ624768
<i>H.minima</i>	IRD5298	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644706
<i>H.minima</i>	IRD5301	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644707
<i>H.minima</i>	HV791	(OP) Luzon, Philippines (Ph)	FJ624687
<i>H.minima</i>	HV720	(OP) Panglao, Philippines (Ph)	FJ624675
<i>H.minima</i>	PH526	(OP) Philippines (Ph)	FJ6244670
<i>H.minima</i>	IRD4930	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644705
<i>H.minima</i>	HV656	(OP) Bohol, Philippines (Ph)	FJ624710
<i>H.minima</i>	IRD4857	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644703
<i>H.minima</i>	HV148	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	FJ624708
<i>H.minima</i>	IRD5347	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644701
<i>H.minima</i>	IRD5297	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN744709
<i>H.minima</i>	HV695	(OP) Bohol, Philippines (Ph)	FJ624676
<i>H.minima</i>	IRD5301	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644707
<i>H.opuntia</i>	CP08909	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN744712
<i>H.opuntia</i>	HV591	(OP) Cebu, Philippines (Ph)	FJ624690
<i>H.opuntia</i>	G028	(OP) Cebu, Philippines (Ph)	FJ624689
<i>H.opuntia</i>	IRD5352	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644713
<i>H.opuntia</i>	CP08414	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644710

<i>H.opuntia</i>	HV61	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	AM049967
<i>H.distorta</i>	CP08910	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644663
<i>H.distorta</i>	CP08450	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644662
<i>H.distorta</i>	H0475	(WP) GBR, Australia (AUS)	FJ624648
<i>H.distorta</i>	HV734	(OP) Palawan, Philippines (Ph)	FJ624650
<i>H.distorta</i>	IRD4915	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644665
<i>H.distorta</i>	IRD4875	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644667
<i>H.distorta</i>	HV275	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	FJ624709
<i>H.distorta</i>	TZ0118	(WI) Zanzibar, Tanzanie (TZ)	FJ624658
<i>H.distorta</i>	HV188	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	FJ624657
<i>H.distorta</i>	HV199	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	FJ624656
<i>H.distorta</i>	HV600	(OP) Malapascua, Philippines (Ph)	FJ624654
<i>H.distorta</i>	H0507	(OP) Cebu, Philippines (Ph)	FJ624653
<i>H.distorta</i>	H0280	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	FJ624652
<i>H.distorta</i>	HV263	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	FJ624643
<i>H.distorta</i>	IRD4926	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644664
<i>H.velasquezii</i>	IRD4935	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644725
<i>H.velasquezii</i>	HV768	(OP) Luzon, Philippines (Ph)	FJ624699
<i>H.velasquezii</i>	IRD5296	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644724
<i>H.velasquezii</i>	HV779	(OP) Luzon, Philippines (Ph)	FJ624698
<i>H.copiosa</i>	HV460	(CAR) Saint Ann, Jamaïque (Jam)	FJ624647
<i>H.copiosa</i>	H0330	(CAR) Discovery Bay, Jamaïque (Jam)	EF667065
<i>H.goreauii</i>	H0258	(CAR) Galeta Island, Panama (PAN)	FJ624659
<i>H.goreauii</i>	HV457	(CAR) Saint Ann, Jamaïque (Jam)	FJ624662
<i>H.goreauii</i>	HV952	(CAR) Saint Ann, Jamaïque (Jam)	FJ624660
<i>H.gracilis</i>	HV824	(OP) Luzon, Philippines (Ph)	FJ624727
<i>H.gracilis</i>	H0861	(WP) GBR, Australia (AUS)	FJ624728
<i>H.gracilis</i>	HV461	(CAR) Saint Ann, Jamaïque (Jam)	EF667063
<i>H.gracilis</i>	HV317	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	AM049965
<i>H.gracilis</i>	IRD4938	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644680
<i>H.gracilis</i>	IRD4922	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644678
<i>H.gracilis</i>	TZ0004	(WI) Mbudya Island, Tanzanie (TZ)	FJ624725
<i>H.gracilis</i>	HEC15889	(CI) Surfer points, Sri Lanka (SL)	FJ624724
<i>H.gracilis</i>	HV959	(CAR) Saint Ann, Jamaïque (Jam)	FJ624721
<i>H.lacrimosa</i>	H0308	(CAR) Bahamas (BA)	EF667064
<i>H.tuna</i>	HV317	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	AY826968
<i>H.micronesica</i>	IRD4862	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644696
<i>H.micronesica</i>	H0014	(WP) GBR, Australia (AUS)	EF667060
<i>H.micronesica</i>	WLS184	(CP) Wallis et Futuna (WF)	EF667059
<i>H.fragilis</i>	IRD5318	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644668
<i>H.fragilis</i>	IRD4916	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644670
<i>H.fragilis</i>	IRD4874	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644671
<i>H.fragilis</i>	IRD5319	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644672
<i>H.fragilis</i>	IRD5300	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644673
<i>H.fragilis</i>	IRD4917	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644669
<i>H.cryptica</i>	H0237	(CAR) Discovery Bay, Jamaïque (Jam)	EF667056
<i>H.cryptica</i>	HV483	(CAR) Saint Ann, Jamaïque (Jam)	EF667067
<i>H.pygmaea</i>	DML40143	(CP) Polynésie Française, Fiji (PF)	EF667062
<i>H.borneensis</i>	CP08908	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644650
<i>H.borneensis</i>	CP08886	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644649
<i>H.borneensis</i>	IRD5309	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644651
<i>H.borneensis</i>	HV183	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	AM049955
<i>H.melanesica</i>	IRD5810	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JQ532551
<i>H.melanesica</i>	HV790	(OP) Luzon, Philippines (Ph)	AMO49961
<i>H.cylindracea</i>	IRD5325	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644652
<i>H.cylindracea</i>	IRD5326	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644653
<i>H.monile</i>	H0034	(CAR) Isla Galeta, Panama (PAN)	AMO49962
<i>H.incrassata</i>	H0179	(CAR) Bahamas (Ba)	AMO49958
<i>H.incrassata</i>	H0649	(NP) Maui, Hawaï, USA (HW)	AMO49959
<i>H.simulans</i>	HV449	(CAR) Discovery Bay, Jamaïque (Jam)	AMO49963
<i>H.macroloba</i>	IRD5322	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644692
<i>H.macroloba</i>	IRD5308	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644690
<i>H.macroloba</i>	IRD5321	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644691
<i>H.kanaloana</i>	IRD5324	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644685
<i>H.kanaloana</i>	IRD5323	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644684
<i>H.heteromorpha</i>	IRD5330	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644682
<i>H.heteromorpha</i>	IRD5346	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644683
<i>H.heteromorpha</i>	CP08518	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644681
<i>H.heteromorpha</i>	PH197	(OP) Cebu, Philippines (Ph)	FJ624535
<i>H.lacunalis</i>	H0121	(WP) Guam (GU)	AY826363
<i>H.lacunalis</i>	IRD5316	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644686

<i>H.lacunalis</i>	IRD5327	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644689
<i>H.cuneata</i>	WA182	(EI) Ouest Australie (O AUS)	AY826355
<i>H.cuneata</i>	H0500	(EA) Amérique du Sud, Brésil (BZ)	AY826358
<i>H.hummii</i>	H0253	(CAR) San Blas, Panama (PAN)	AM049988
<i>H.tuna</i>	H0231	(CAR) Puerto Morelos, Mexique (MX)	AF525581
<i>H.scabra</i>	DML68229	(CAR) Green turtle Bay, Bahamas (Ba)	FJ624540
<i>H.magnidisca</i>	IRD5329	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644695
<i>H.magnidisca</i>	H0822	(WP) GBR, Australia (AUS)	FJ624536
<i>H.discoidea</i>	IRD5306	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644660
<i>H.discoidea</i>	CP08413	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644656
<i>H.discoidea</i>	CP08454	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644657
<i>H.discoidea</i>	IRD5307	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644661
<i>H.discoidea</i>	SOC299	(WI) Socotra, Yémen (Soc)	AF407254
<i>H.gigas</i>	IRD4927	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644674
<i>H.taenicola</i>	IRD4861	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644723
<i>H.taenicola</i>	IRD4860	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644722
<i>H.taenicola</i>	CP08709	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644721
<i>H.taenicola</i>	CP08458	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644720
<i>H.taenicola</i>	CP08457	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644719
<i>H.taenicola</i>	IRD5313	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644717
<i>H.taenicola</i>	IRD5314	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644715
<i>H.taenicola</i>	IRD5315	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644716
<i>H.taenicola</i>	CP08411	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	JN644718
<i>H.taenicola</i>	HV285	(CP) Polynésie Française, Moorea (PF)	AY826365
<i>H.xishaensis</i>	IRD4933	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644728
<i>H.xishaensis</i>	IRD4932	(CI) Océan Indien, Maldives (Mal)	JN644726
<i>H.macrophysa</i>	IRD5328	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	JN644694
<i>H.macrophysa</i>	H0271	(OP) Nouvelle-Calédonie (NC)	AM049989
<i>H.renschii</i>	HV7	(WI) Zanzibar, Tanzanie (TZ)	FJ624691
<i>H.renschii</i>	TZ0454	(WI) Zanzibar, Tanzanie (TZ)	FJ624692

V. Résultats

Au total, l'ADN de 105 individus a pu être séquencé et aligné correctement pour le marqueur chloroplastique *tufA* (649pb après traitement) : 70 de Papouasie Nouvelle-Guinée, 18 de Nouvelle-Calédonie, 12 de Polynésie Française (6 des Iles Gambier, 5 des Iles Marquises et 1 d'Ahé), 3 d'Okinawa (Asie du Nord-est) et 2 des Iles Glorieuses (Océan Indien). A ces données obtenues au laboratoire, 122 séquences ont été ajoutées à partir de Genbank (voir fig. pour la distribution des séquences par région).

Les analyses MP et Bayésienne ont produit des topologies identiques. Les arbres obtenus dans MEGA5 sont présentés dans le présent rapport avec les bootstraps obtenus par ML supérieurs à 50% et les probabilités postérieures Bayésienne supérieures à 0.8.

V.1 Arbre phylogénétique global

L'analyse de la totalité des séquences (227) met en évidence 5 clades robustes coïncidant avec les travaux de Kooistra (2002) et Verbruggen (2004). Les 5 lignées monophylétiques apparentes sont (1) *Opuntia*, (2) *Pseudo-opuntia*, (3) *Micronesica*, (4) *Rhipsalis* et (5) *Halimeda*. La PNG (Papouasie Nouvelle-Guinée) est représentée dans chacune des lignées sauf *Pseudo-Opuntia* (Fig. 18.a Arbre phylogénétique du genre *Halimeda*). Pour plus de clarté, les lignées seront traitées de manière succincte séparément.

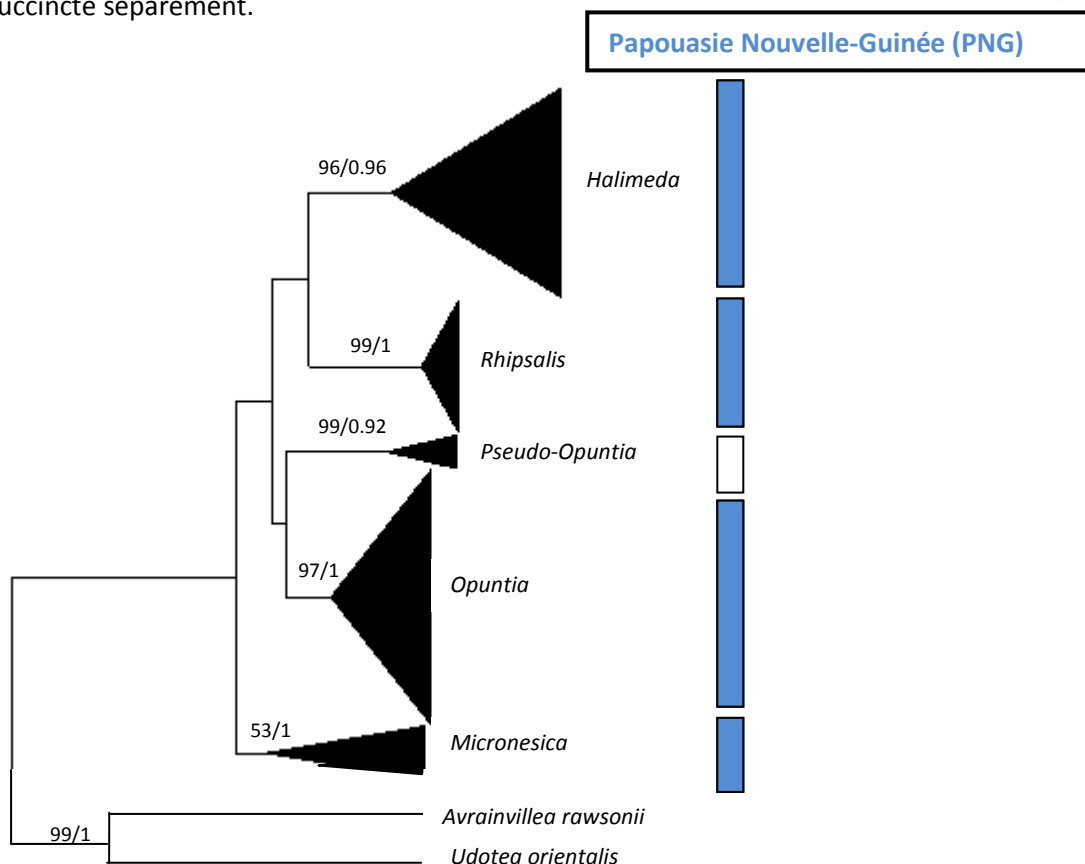


Figure.18. a. Arbre phylogénétique général du genre *Halimeda* basé sur le marqueur *tufA* pour 227 séquences obtenues. Les valeurs de bootstrap (%), ML et de probabilité postérieures ([0-1] Bayes) sont notés pour chaque clade obtenu. Les racines sont *Avrainvillea rawsonii* et *Udoetea orientalis* selon le modèle de Verbruggen (2006). Les rectangles bleus indiquent la présence de la Papouasie Nouvelle-Guinée dans chacune des lignées.

V.2 Diversité génétique au sein de chaque lignée

V.2.1 Arbre phylogénétique : section *Rhipsalis*

Figure.18.b. Arbre phylogénétique de la lignée *Rhipsalis* issu de la reconstruction par ML (BP>50% ; 1^{er} chiffre) et par une méthode Bayésienne (p post > 0.7 ; 2^{ème} chiffre). Racine : *H. lacunalis*. Chaque sous-clade est représentée par un rectangle bleu pour signaler la présence en PNG. Le rectangle signifie que *H. borneensis* pourrait être polyphylétique. Les localités sont notées comme suit, PF : Polynésie Française ; NC : Nouvelle-Calédonie ; PNG : Papouasie Nouvelle-Guinée ; Ph : Philippines ; Glo : Iles glorieuses ; OKI : Okinawa ; Pan : Panama ; Car : Caraïbes ; Jam : Jamaïque.

Le jeu de séquences correspondant à la lignée *Rhipsalis* donne lieu à 9 clades robustes correspondant aux espèces suivantes : *H.heteromorpha* N'Yeurt, *H.macroloba* Decaisne, *H.incrassata* J.V. Lamouroux, *H.melanesica* Valet, *H.borneensis* W.R Taylor, *H.cylindracea* Decaisne, *H.monile* J.Ellis et Solander, *H.simulans* M.A Howe et *H.kanaloana* Taylor (Fig.18.b). Au total, 10 individus de PNG sont présents dans ce clade répartis parmi *H.borneensis*, *H.macroloba* et *H.heteromorpha*.

- Le Sous-clade *H.borneensis* : (BP=89%) regroupe 1 individu provenant d'Okinawa, 1 des îles Glorieuses (Océan Indien), 4 de Polynésie Française et 4 de PNG. Le sous-clade de PNG (BP=73%) indique que *H.borneensis* pourrait être polyphylétique avec un sous-clade en provenance de cette région. L'arbre non-raciné du clade ainsi qu'un réseau d'haplotypes permettent de visualiser la distance qui sépare les sous-clades (Fig.19. Arbre non-raciné et réseau d'haplotypes du clade *H.borneensis*). Une seule mutation sépare le groupe PF du groupe PNG (Fig.19.a) tandis que 5 mutations séparent PNG du groupe Glorieuses et Okinawa (Fig.19.b,c). Le NJ met en évidence l'isolement de deux sous-clades : Oki et Glo.

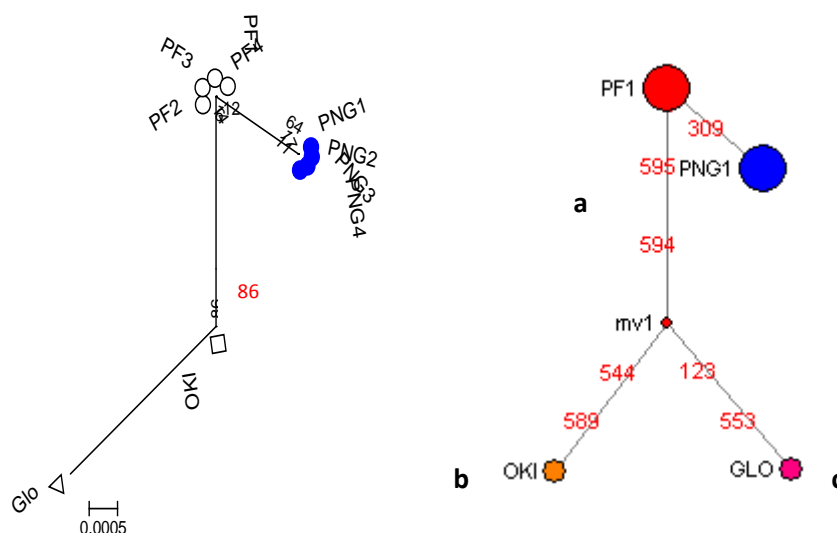


Figure.19. Arbre non-raciné et réseau d'haplotypes du clade *H.borneensis*. **A gauche** : arbre non-raciné obtenu par ML. Le chiffre par région suit l'ordre dans l'arbre général (ex : PNG1=PAPA898). Seul le BP qui sépare PNG-PF de Glo-OKI est robuste (86). PNG est indiqué en bleu. **A droite** : réseau d'haplotypes par Median-Joining. Les chiffres en rouge désignent des mutations, la taille des ronds est proportionnelle au nombre d'individus ayant le même haplotype. Polynésie Nouvelle-Guinée (PNG)=bleu foncé, Polynésie Française (PF)=rouge, Okinawa (OKI)=orange, île Glorieuses (Glo)=rose foncé. 5 mutations séparent PNG de Oki-Glo et une seule de PF. Deux groupes se distinguent (a,b et c).

- Le sous-clade *H.macroloba* : (BP=82%) regroupe 3 individus de Nouvelle-Calédonie et 2 de PNG. Il apparaît monophylétique.
- Le sous-clade *H.heteromorpha* : (BP=78%) regroupe 3 individus de PNG, 2 de Nouvelle-Calédonie, 1 de Polynésie Française et 1 des Philippines. Un sous-groupe apparaît réunissant les individus de PNG mais n'est pas suffisamment soutenu pour être isolé du clade principal.
- Les sous-clades *H.cylindracea* (BP=99%) et *H.melanesica* (BP=95%) ne comptent que des individus de Nouvelle-Calédonie sauf 1 des Philippines pour ce dernier. Un sous-groupe apparaît réunissant les individus de NC mais n'est pas suffisamment soutenu pour être isolé du clade principal.
- Enfin les clades *H.monile*, *H.incrassata*, *H.simulans* (BP=95%) ne sont représentés que dans l'Océan Atlantique (Caraïbes, Panama, Jamaïque). Ils apparaissent monophylétiques.

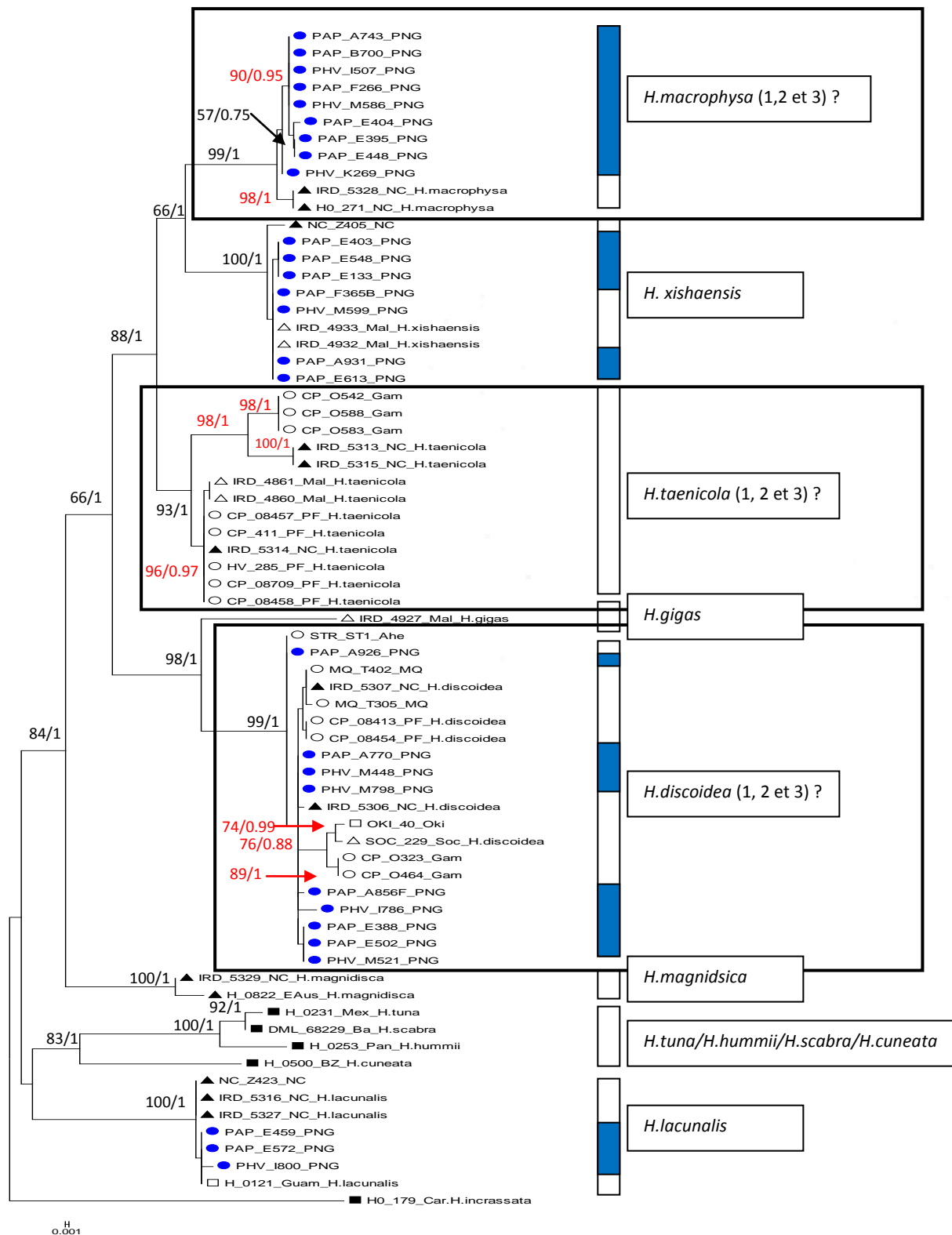
V.2.2 Arbre phylogénétique : section *Halimeda*

Figure 20. Arbre phylogénétique de la lignée *Halimeda* issu de la reconstruction par ML (BP>50% ; 1^{er} chiffre) et par une méthode Bayésienne (p post > 0.8 ; 2^{ème} chiffre). Racine : *H. incrassata*. Chaque sous-clade est représenté par un rectangle bleu pour signaler la présence en PNG. Le rectangle signifie que ces clades pourraient être polyphylétiques. Les localités sont notées comme suit, PF : Polynésie Française ; NC : Nouvelle-Calédonie ; PNG : Papouasie Nouvelle-Guinée ; Ph : Philippines ; Glo : Iles glorieuses ; OKI : Okinawa ; Pan : Panama ; Car : Caraïbes ; Jam : Jamaïque.

Le jeu de séquence correspondant à la lignée *Halimeda* donne lieu à 11 clades robustes correspondant aux espèces suivantes : *H.macrophysa* Askenasy, *H.xishaensis* Dong et Tseng, *H.taenicola* W.R. Taylor, *H.gigas* W.R. Taylor, *H.discoidea* Decaisne, *H.magnidisca* J.M. Noble, *H.tuna* J.Ellis et Solander, *H.hummii* D.L. Ballantine, *H.scabra* M.A. Howe, *H.cuneata* K.Hering, *H.lacunalis* W.R. Taylor (Fig.20). Au total, 28 individus de PNG sont présents dans ce clade répartis parmi : *H.macrophysa*, *H.xishaensis*, *H.discoidea*, *H.lacunalis*.

- Le sous-clade *H.macrophysa* (BP=99%) regroupe 9 individus de PNG et 9 de Nouvelle-Calédonie. Les BP significatives (BP=98% et BP=90%) indiquent que le clade pourrait être polyphylétique avec un premier sous-clade de PNG et un second de Nouvelle-Calédonie. Un arbre non-raciné et un réseau d'haplotypes sont construits (Fig.21. Arbre non-raciné et réseau d'haplotypes pour *H.macrophysa*). Une seule mutation sépare les 2 groupes de PNG (Fig.21.a) tandis que 5 mutations séparent le groupe Nouvelle-Calédonie et PNG (Fig.21.b).

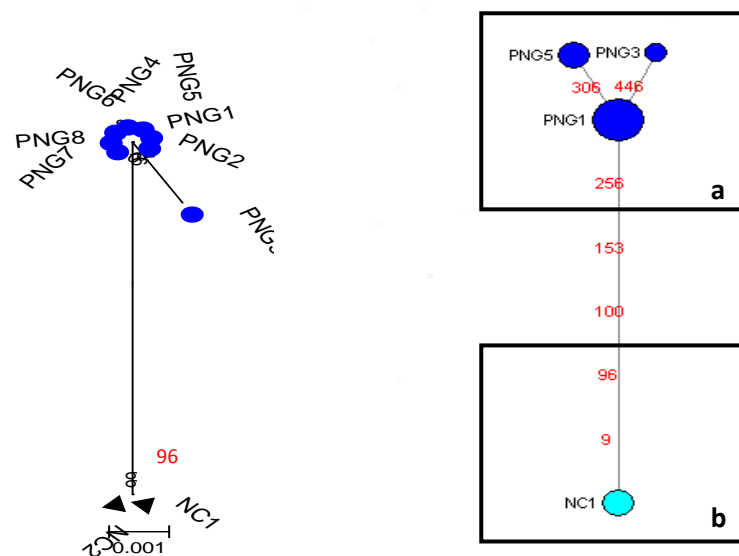


Figure21. Arbre non-raciné et réseau d'haplotypes du clade *H.macrophysa*. **A gauche** : arbre non-raciné obtenu par ML. Le chiffre par région respecte l'ordre dans l'arbre général (ex :PNG1=PAP743). Seul le BP qui sépare PNG de NC est robuste (96). PNG est indiqué en bleu. **A droite** : réseau d'haplotypes par Median-Joining. Les chiffres en rouge désignent des mutations, la taille des ronds est proportionnelle au nombre d'individus ayant le même haplotype. NC =bleu clair, PNG=bleu foncé.5 mutations séparent PNG de NC ce qui permet de distinguer 2 groupes (a et b).

- Le sous-clade *H.xishaensis* (BP=100%) regroupe 7 individus de PNG, 2 des Maldives et 1 de Nouvelle-Calédonie. Il apparaît monophylétique.
- Le sous-clade *H.discoidea* (BP=99%) regroupe 9 individus de PNG, 7 de Polynésie (incluant 2 Polynésie Française, 2 Marquises, 2 Gambier et 1 Ahé), 1 d'Okinawa et 1 de Socotra (Océan Indien). Les BP significatives (BP=74% et BP=89%) indiquent que le clade pourrait être polyphylétique séparant les individus de Socotra-Okinawa et des Iles Gambier des autres individus. Un arbre non-raciné et un réseau d'haplotypes sont construits (Fig.22. Arbre non-raciné et réseau d'haplotypes pour *H.discoidea*). On observe 5 mutations entre le groupe de la PNG-Polynésie Française-Nouvelle-Calédonie-Marquises (Fig.22.a) et celui des Socotra-Okinawa-Gambier (Fig.22.b). Le premier groupe est plus diversifié avec 8 haplotypes différents sur l'ensemble des régions contre 3 dans l'autre groupe.

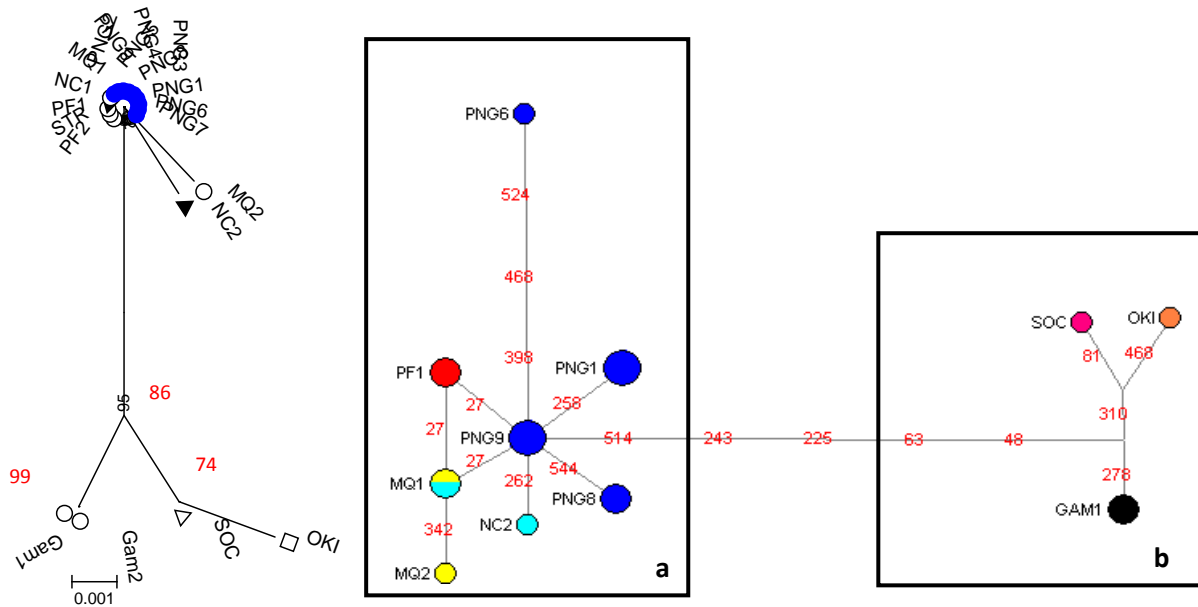


Figure.22. Arbre non-raciné et réseau d’haplotypes du clade *H. discoidea*. **A gauche** : arbre non-raciné obtenu par ML. Le chiffre par région respecte l’ordre dans l’arbre général (ex : MQ2=MQT402). Les BP qui sépare PNG de OKI, de SOC et de Gambier sont robustes (BP>70%). PNG est indiqué en bleu. **A droite** : réseau d’haplotypes par Median-Joining. Les chiffres en rouge désignent des mutations, la taille des ronds est proportionnelle au nombre d’individus ayant le même haplotype. Nouvelle-Calédonie(NC)=bleu clair, PNG=bleu foncé, Marquises(MQ)=jaune, Polynésie Française (PF)=rouge, Gambier (Gam)=noir, Okinawa (OKI)=orange, Socotra (SOC)=rose foncé. Deux groupes se distinguent (a et b).

- Le sous-clade *H. lacunalis* (BP=100%) regroupe 3 individus de PNG, 3 de Nouvelle-Calédonie et 1 des îles Gambier. Il apparaît monophylétique.
- Le sous-clade *H. taenicola* (BP=93%) regroupe 3 individus des îles Gambier, 2 des Maldives, 3 de Nouvelle-Calédonie et 5 de Polynésie Française. Les BP séparant du groupe les individus des Gambiers (BP=98%) et ceux de la Nouvelle-Calédonie (BP=100%) suggèrent que le clade pourrait être polyphylétique. Un arbre non-raciné et un réseau d’haplotypes sont construits (Fig.23. Arbre non-raciné et réseau d’haplotypes pour *H. taenicola*).

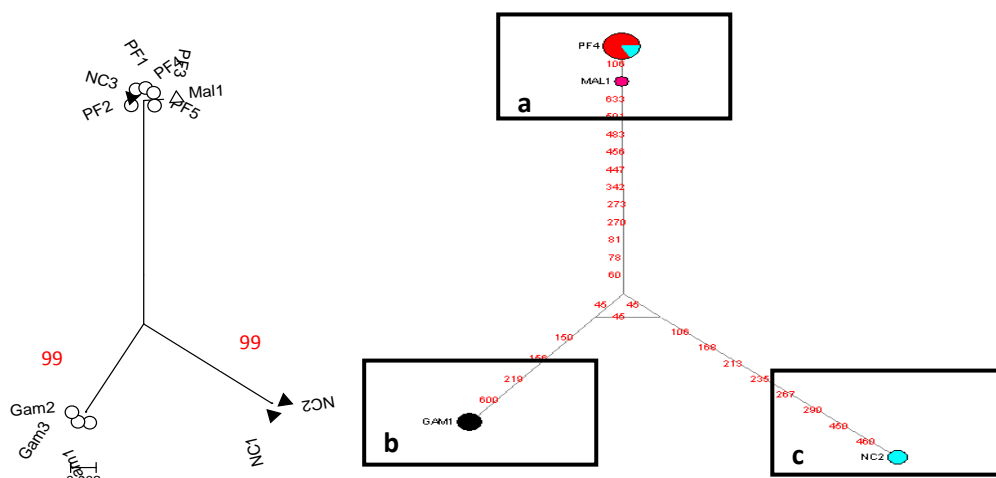


Figure 23. Arbre non-raciné et réseau d’haplotypes du clade *H. taenicola*. **A gauche** : arbre non-raciné obtenu par ML. Le chiffre par région respecte l’ordre dans l’arbre général (ex : Gam1=CP0542). Les BP qui sépare PF des Gambiers et de NC sont robustes. **A droite** : réseau d’haplotypes par Median-Joining. Les chiffres en rouge désignent des mutations, la taille des

ronds est proportionnelle au nombre d'individus ayant le même haplotype. Nouvelle-Calédonie(NC)=bleu clair, Polynésie Française (PF)=rouge, Gambier (Gam)=noir, Maldives (Mal)= rose foncé.

On observe 16 et 17 mutations respectivement entre les individus provenant de Polynésie Française et ceux provenant des Iles Gambiers, et ceux provenant de Nouvelle-Calédonie. Trois groupes sont reconnus. Le premier (Fig.23.a) réunissant la Polynésie Française et les Maldives, le second (Fig.23.b) les Iles Gambiers et le dernier (Fig.23.c) la Nouvelle-Calédonie.

- Le sous-clade *H.magnidisca* (BP=100%) regroupe 1 individu de Nouvelle-Calédonie et 1 de l'Est de l'Australie. Le nombre d'individus est trop faible pour le déclarer mono ou polyphylétique.
- Les sous-clades *H.tuna*, *H.scabra*, *H.hummii* et *H.cuneata* proviennent tous les quatre de l'Atlantique et forment un clade monophylétique robuste distinct chacun.

V.2.3 Arbre phylogénétique : section *Pseudo-Opuntia*

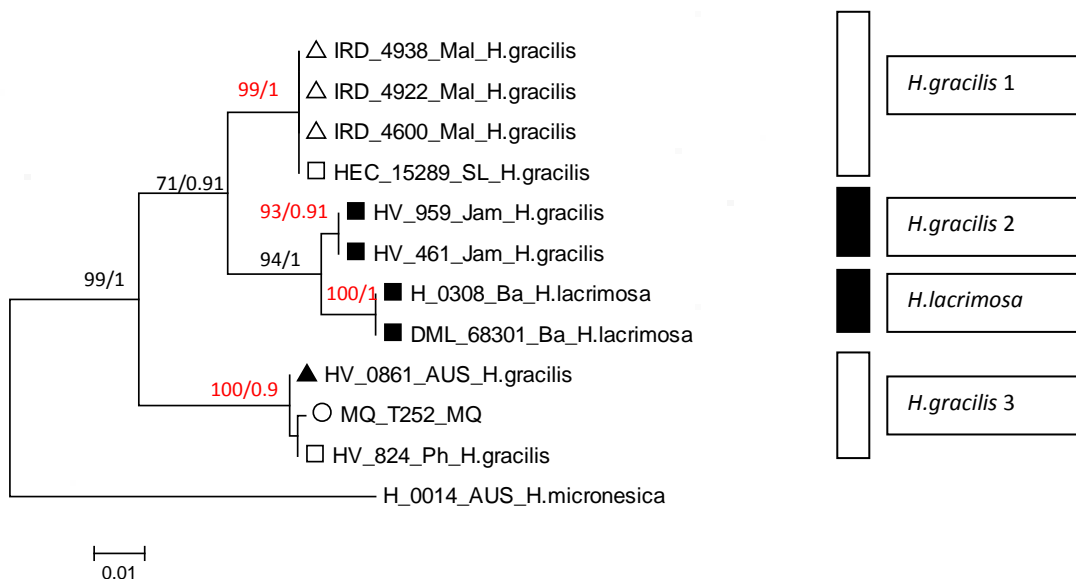


Figure 24. Arbre phylogénétique de la lignée *Pseudo-Opuntia* issu de la reconstruction par ML (BP>50% ; 1^{er} chiffre) et par une méthode Bayésienne (p post > 0.8 ; 2^{ème} chiffre). Racine : *H. micronesica*. Chaque sous-clade est représenté par un rectangle noir pour signaler la présence dans l'Atlantique. Les localités sont notées comme suit, Maldives : Mal, Sri Lanka : SL, Jamaïque : Jam, Bahamas : Ba, Australie : AUS, Philippines : Ph.

Le jeu de séquences correspondant à la lignée *Pseudo-Opuntia* donne lieu à 4 clades robustes correspondant aux groupes suivants : *H.gracilis* (1) Harvey J. Agardh (BP=99%) comprenant 3 individus des Maldives et 1 du Sri Lanka, *H.gracilis* (2) et *H.lacrimosa* M.A. Howe (BP=93% et BP=100%) tous issus de l'Atlantique et *H.gracilis* (3)(BP=100%) rassemblant 1 individu d'Australie, 1 individu des Marquises et 1 individu des Philippines (Fig.24). Il n'y a pas d'individus de PNG dans cette section. Un réseau d'haplotypes est réalisé mais n'est pas présenté tant le nombre de mutations qui séparent les clades est élevé.

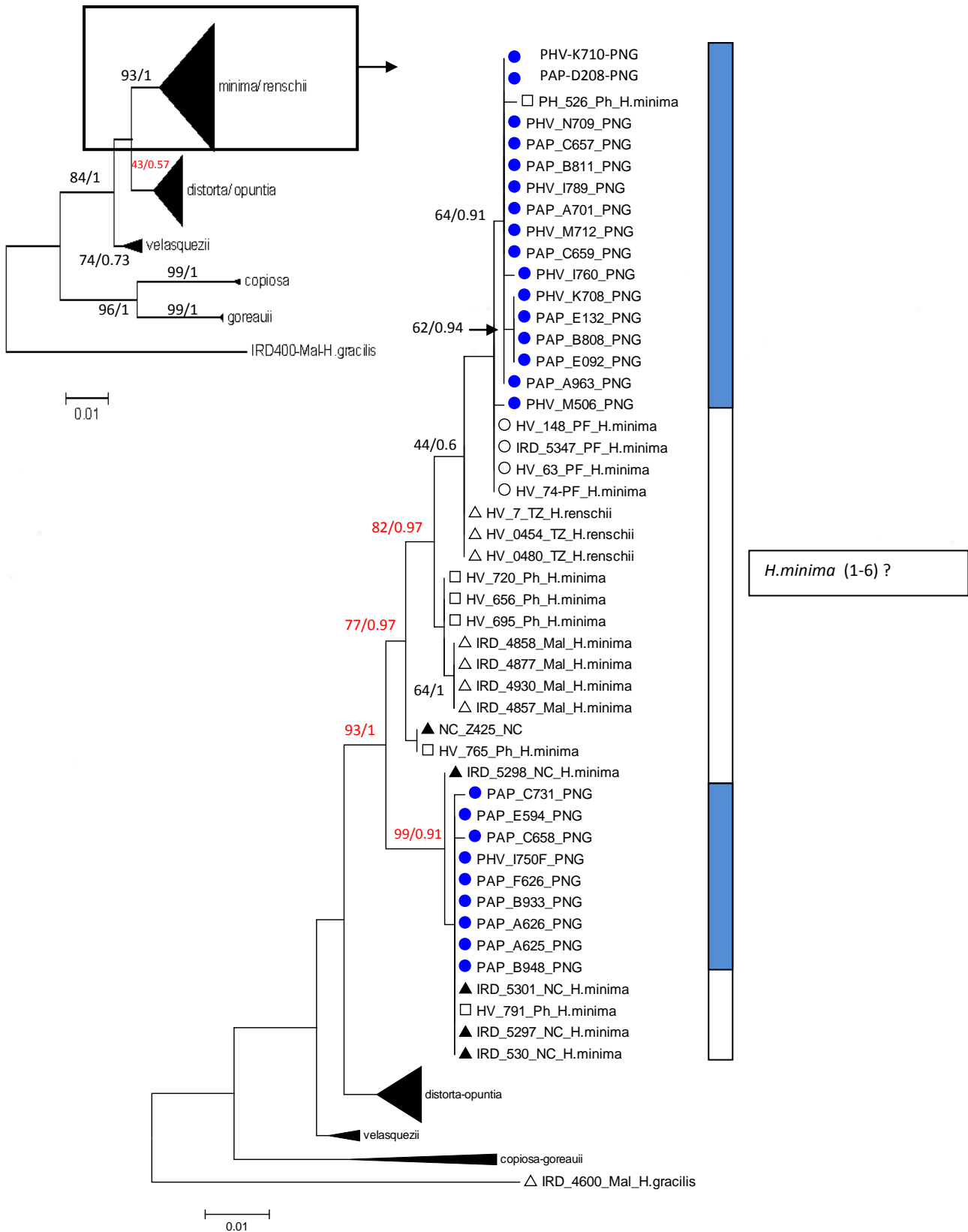
V.2.3 Arbre phylogénétique : section *Opuntia*

Figure 25. Gauche : Arbre phylogénétique de la lignée *Opuntia* issu de la reconstruction par ML (BP>50% ; 1^{er} chiffre) et par une méthode Bayésienne (p post > 0.8 ; 2^{ème} chiffre). Le clade *H. distorta-H.opuntia* est peu soutenu. **Droite :** Le clade *H. minima*. Racine : *H. gracilis*. Chaque sous-clade est représenté par un rectangle bleu pour signaler la présence de la PNG. Les localités sont notées comme suit, Mal : Maldives, Ph : Philippines, PNG : Papouasie Nouvelle-Guinée, PF : Polynésie Française, NC : Nouvelle-Calédonie, TZ : Tanzanie. Les meilleurs BP et P.post. divisent le groupe des *H. minima* en deux.

Le jeu de séquences correspondant à la lignée *Opuntia* donne lieu à 4 clades robustes correspondant aux groupes suivants : *H.minima* W.R.Taylor + *H.renschii* (BP=93%) Hauck, *H.velasquezii* (BP=74%) W.R.Taylor, *H.copiosa* (BP=99%) Goreau & E.A. Graham et *H.goreauii* (BP=99%) W.R.Taylor. Un cinquième clade, moins robuste (BP=43%), est formé par les espèces *H.distorta* Yamada + *H.opuntia* Goreau & E.A. Graham (Fig.25. Gauche). La Papouasie Nouvelle-Guinée est représentée dans *H.minima*+*H.renschii* et *H.distorta* + *H.opuntia*.

- Le sous-clade *H.minima*+*H.renschii* (Fig.25. Droite ; BP=99%) comprend 25 individus de PNG, 6 des philippines, 4 de Polynésie Française, 3 de Tanzanie, 4 des Maldives et 5 de Nouvelle-Calédonie. Les valeurs de BP robustes (BP=82% ; BP=77% ; BP=99%) ainsi que les moyennement robustes (BP=64% ; BP=46% ; BP=46%) (Fig.25. Droite) suggèrent que le clade pourrait être polyphylétique et séparé jusqu'à 6 groupes distincts. Un réseau d'haplotype est construit (Fig. 26. Réseau d'haplotypes pour le clade *H.minima*+*H.renschii*). Deux groupes apparaissent bien distincts séparés par 6 mutations au minimum. Le premier groupe (Fig.26.a) : *H.minima* 1+*H.renschii*, est plus diversifié avec 8 haplotypes différents répartis sur l'ensemble des régions. Le second (Fig.26.b) : *H.minima* 2 ne compte que 2 haplotypes répartis en PNG, Nouvelle-Calédonie et Philippines. Comme le nombre d'individus dépasse 30, une mesure de Fst est réalisée considérant chacun des groupes comme une population distincte. La Fst=0.366 avec une p-value=0.000 (H0 : Htz among=Htz within) sur 1023 permutations. Il ya donc une structure apparente au sein du clade *H.minima*+ *H.renschii* avec deux populations distinctes.

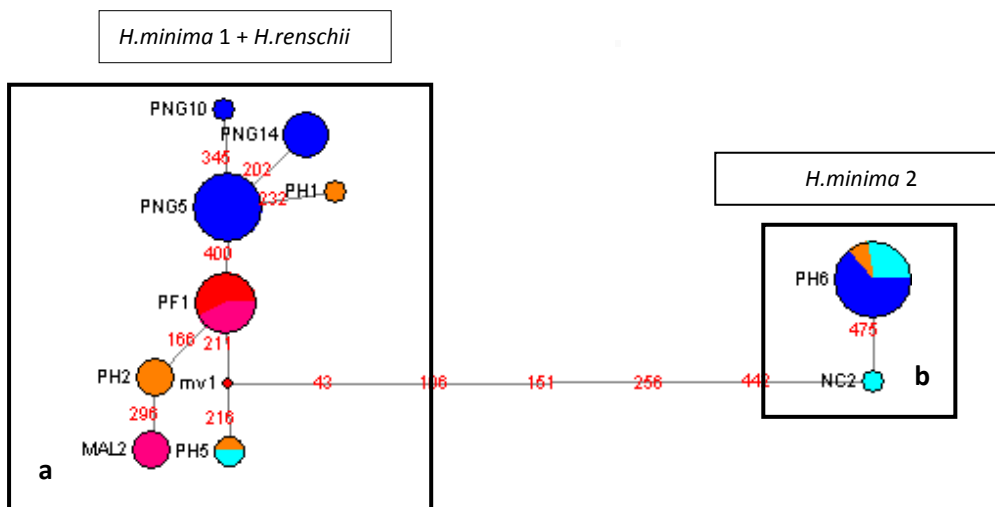


Figure 26. Réseau d'haplotypes du clade *H.minima*+*H.renschii*. Les chiffres en rouge désignent des mutations, la taille des ronds est proportionnelle au nombre d'individus ayant le même haplotype. Nouvelle-Calédonie(NC)=bleu clair, Polynésie Française (PF)=rouge, Maldives (Mal)= rose foncé, Papouasie Nouvelle-Guinée (PNG)=bleu, Philippines (Ph)=orange. Deux groupes apparaissent bien distincts avec 6 mutations minimum, le premier (a) : *H.minima*1+*H.renschii* et le second (b): *H.minima*2. Les cadres signifient les deux groupes comparés par la Fst.

- Le sous-clade *H.distorta* + *H.opuntia* (Fig.27. gauche ; BP=43%) comprend 2 individus de PNG, 7 de Polynésie Française, 4 de Nouvelle-Calédonie, 2 des Marquises, 5 des philippines, 2 de Tanzanie et 3 des Maldives. Plusieurs valeurs de BP significatifs (Fig.27. ; chiffres en rouge) signifient que le clade serait polyphylétique. Un clade (BP=97%) rassemble des spécimens de *H.opuntia* et de *H.distorta* de Polynésie Française, des îles Marquises et de Nouvelle-Calédonie. Un second (BP=92%), rassemble des spécimens *H.opuntia* de Polynésie Française et des Philippines. Un troisième (BP=92%), regroupe 2 spécimens *H.distorta* provenant des

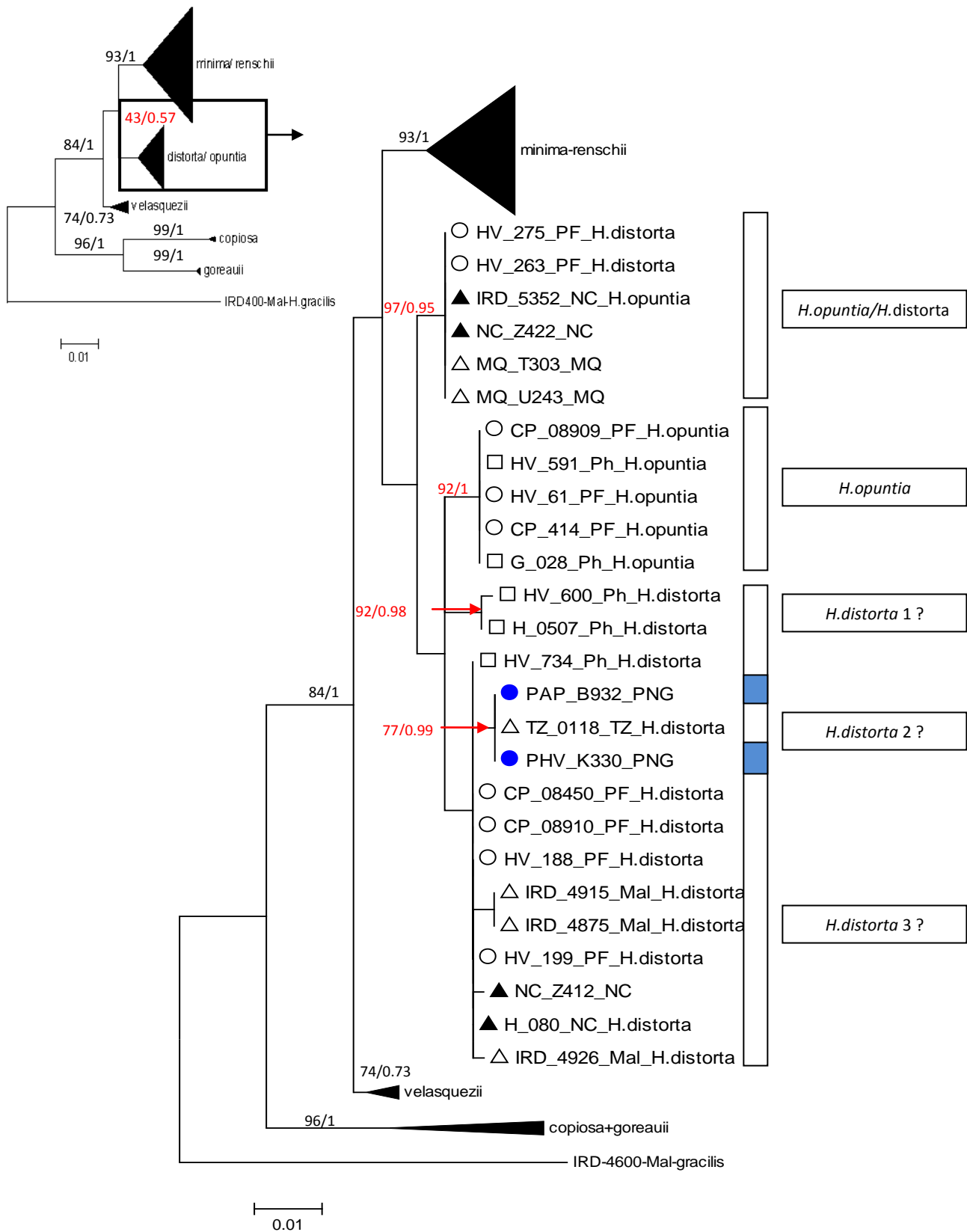


Fig.27. Gauche : Arbre phylogénétique de la lignée *Opuntia* issu de la reconstruction par ML (BP>50% ; 1^{er} chiffre) et par une méthode Bayésienne (p post > 0.8 ; 2^{ème} chiffre). Le clade *H. distorta*-*H. opuntia* est peu soutenu. **Droite :** Le clade *H. distorta*+*H. opuntia*. Racine : *H. gracilis*. Chaque sous-clade est représenté par un rectangle bleu pour signaler la présence de la PNG. Les localités sont notées comme suit, Mal : Maldives, Ph : Philippines, PNG : Papouasie Nouvelle-Guinée, PF : Polynésie Française, NC : Nouvelle-Calédonie, TZ : Tanzanie. Les meilleurs BP et P.post. divisent le groupe des *H. distorta*-*H. opuntia* en trois clades.

des Philippines tandis qu'un dernier regroupe toutes les autres *H.distorta*. Un réseau d'haplotypes est construit (Fig.28. Réseau d'haplotypes du clade *H.distorta*+ *H.opuntia*). Trois groupes apparaissent bien distincts, le premier réunissant le groupe des *H. distorta* (1-3) (Fig.28.a), le second réunissant le groupe des *H.opuntia* (Fig.28.b), et le dernier (Fig.28.c) réunissant le groupe *H.distorta*+*H.opuntia* provenant des Marquises, de la Nouvelle-Calédonie et de la Polynésie Française.

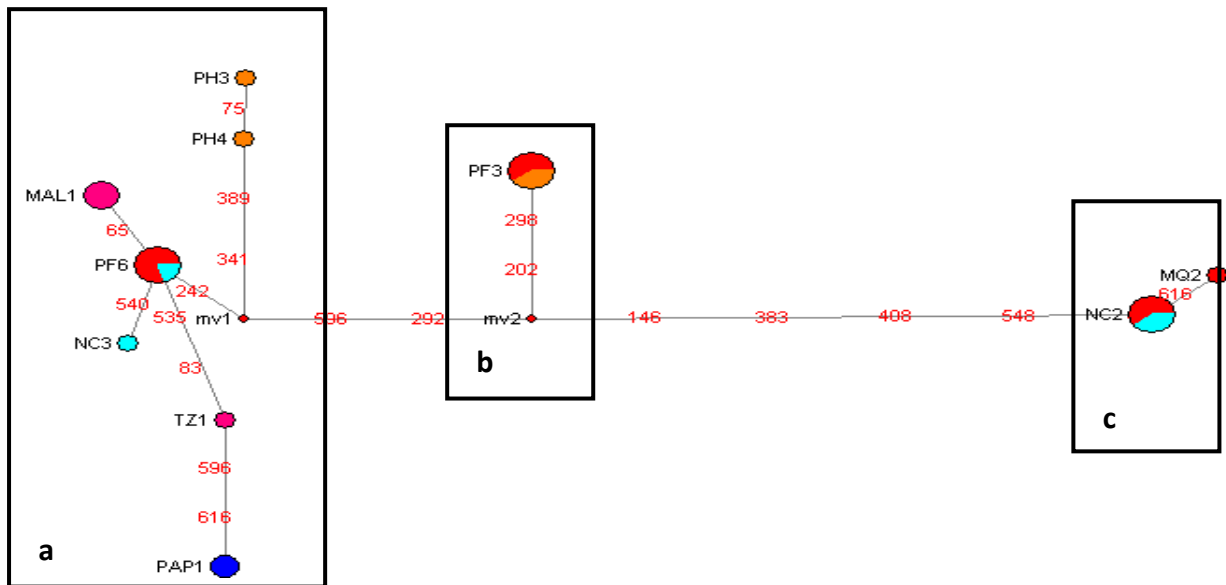


Figure.28. Réseau d'haplotypes du clade *H.opuntia* + *H.distorta*. Les chiffres en rouge désignent des mutations, la taille des ronds est proportionnelle au nombre d'individus ayant le même haplotype. Nouvelle-Calédonie(NC)=bleu clair, Polynésie Française (PF)=rouge, Maldives (Mal)= rose foncé, Papouasie Nouvelle-Guinée (PNG)=bleu, Philippines (Ph)=orange. Trois groupes apparaissent bien distincts avec (a, b et c).

- Le sous-clade *H.velasquezii* (Fig.29. gauche ; BP=74%) regroupe 2 individus des Philippines, 1 d'Okinawa, 1 des Maldives et 1 de Nouvelle-Calédonie. Une valeur de Bootstrap significative (BP=78%) indique que le clade pourrait être polyphylétique séparant l'Asie du Sud et la Nouvelle-Calédonie des Maldives. Un réseau d'haplotypes est construit (Fig.30. Réseau d'haplotypes *H.velasquezii*.) Il ya 4 mutations qui séparent le groupe des Maldives (Fig.30.a)de celui de l'Asie du Sud-Nouvelle-Calédonie contre deux maximum au sein de ce dernier groupe (Fig.30.b).
- Les sous-clades *H.copiosa* et *H.goreauii* ne comprennent que des individus en provenance de l'Atlantique. Ils apparaissent tous les deux monophylétiques.

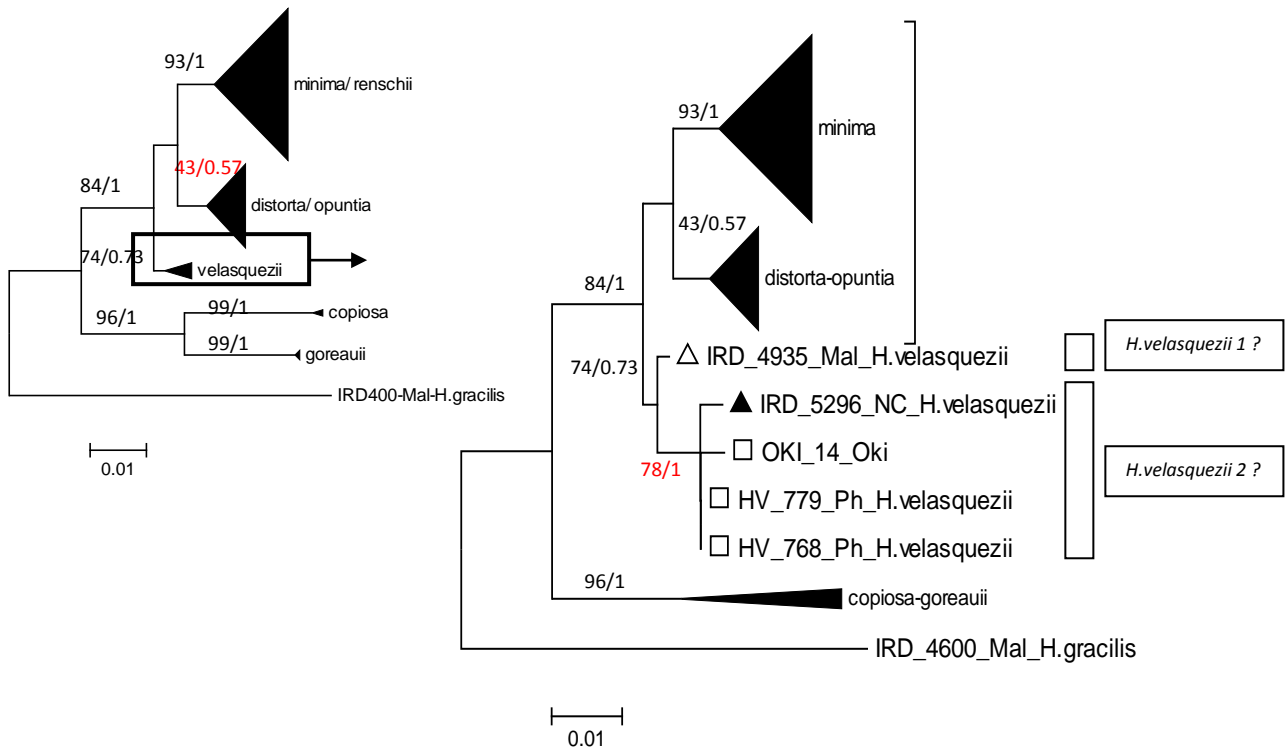


Figure 29. Gauche : Arbre phylogénétique de la lignée *Opuntia* issu de la reconstruction par ML (BP>50% ; 1^{er} chiffre) et par une méthode Bayésienne (p post > 0.8 ; 2^{ème} chiffre). Le clade *H. distorta-H.opuntia* est peu soutenu. Droite : Le clade *H.velasquezii*. Les localités sont notées comme suit, Mal : Maldives, Ph : Philippines, NC : Nouvelle-Calédonie. Les meilleurs BP et P.post. divisent le groupe des *H.velasquezii* en deux clades.

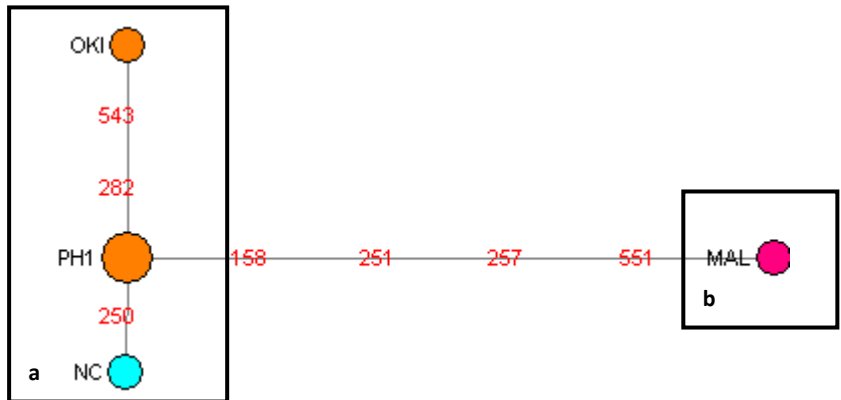


Figure 30. Réseau d'haplotypes du clade *H.velasquezii*. Les chiffres en rouge désignent des mutations, la taille des ronds est proportionnelle au nombre d'individus ayant le même haplotype. Nouvelle-Calédonie(NC)=bleu clair, Polynésie Française (PF)=rouge, Maldives (Mal)= rose foncé, Papouasie Nouvelle-Guinée (PNG)=bleu, Philippines (Ph)=orange. Deux groupes apparaissent distincts avec (a et b).

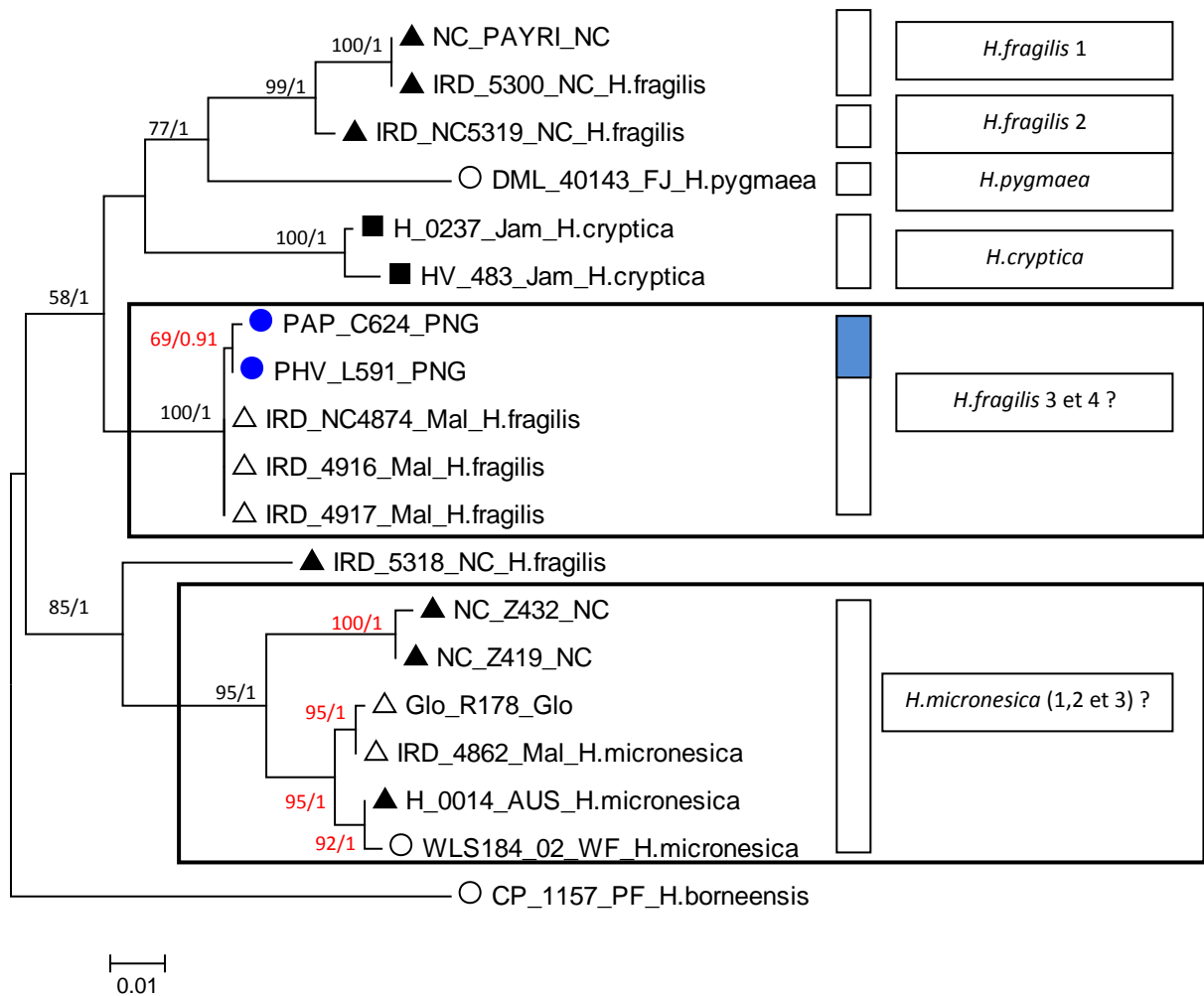
V.2.4 Arbre phylogénétique : section *Micronesica*

Figure 31. Arbre phylogénétique de la lignée *Micronesica* issu de la reconstruction par ML (BP>50% ; 1^{er} chiffre) et par une méthode Bayésienne (p post > 0.8 ; 2^{ème} chiffre). Les localités sont notées comme suit, Mal : Maldives, Ph : Philippines, NC : Nouvelle-Calédonie, Glo : Glorieuses, FJ : Fiji, Jam : Jamaïque, PNG : Papouasie Nouvelle-Guinée, AUS : Australie, WF : Wallis et Futuna. Les meilleurs BP et P.post. divisent le groupe des *H.micronesica* en trois clades.

Le jeu de séquences correspondant à la lignée *Micronesica* donne lieu à 6 clades robustes correspondant aux groupes suivants : *H.fragilis* 1 (BP=100%) Taylor, *H.fragilis* 2 (BP=99%), *H.pygmaea* (BP=77%) Verbruggen, *H.cryptica* (BP=100%), *H.fragilis* 3 (BP=100%) et *H.micronesica* (BP=95%) Yamada ainsi qu'à un individu isolé appartenant à *H.fragilis*. Deux individus de PNG apparaissent dans le clade *H.fragilis* 3 (Fig.31. Arbre phylogénétique de la lignée *Micronesica*).

- Les sous-clades *H.fragilis* 1 et 2 (BP=100% et 99%) ne comprennent que des individus de NC.
- Le sous-clade *H.pygmaea* (BP=77%) comprend un seul individu provenant des Iles Fiji.
- Le sous-clade *H.cryptica* (BP=100%) regroupe deux individus venant de Jamaïque (Caraïbes)
- Le sous-clade *H.fragilis* 3 (BP=100%) comprend 2 individus de PNG regroupés avec une valeur de bootstrap moyennement robuste (BP=69%) et 3 individus des Maldives. Etant donné le nombre d'haplotype trop faible, il n'est pas possible de construire de réseau.
- Le sous-clade *H.micronesica* (BP=95%) comprend 2 individus de Nouvelle-Calédonie, 1 des Maldives, 1 des Iles Glorieuses, 1 d'Australie et 1 des iles Wallis et Futuna. Trois clades se détachent : la NC (BP=100%), l'Océan Indien (BP=95%) et l'Australie et Wallis et Futuna

(BP=92%). Un arbre non-raciné ainsi qu'un réseau d'haplotypes sont construits (Fig.32. Arbre non-raciné et réseau d'haplotypes du clade *H.micronesica*). Trois clades apparaissent bien distincts avec néanmoins plus de mutations séparant les individus de l'Océan Indien (Fig.32.droite a) et du Pacifique Est (Fig.32.droite b) de ceux de Nouvelle-Calédonie (Fig.32. droite c).

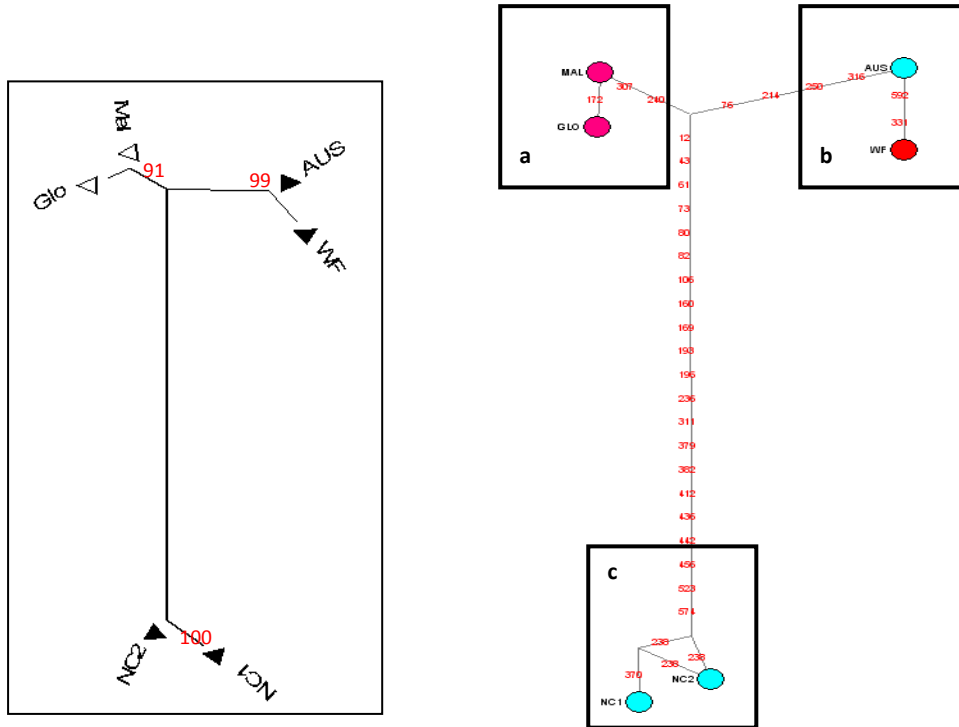


Figure 32. Arbre non-raciné et réseau d'haplotypes du clade *H.micronesica*. **A gauche** : arbre non-raciné obtenu par ML. Les BP qui séparent les clades sont robustes (BP>90%). **A droite** : réseau d'haplotypes par Median-Joining. Les chiffres en rouge désignent des mutations, la taille des ronds est proportionnelle au nombre d'individus ayant le même haplotype. Nouvelle-Calédonie(NC)=bleu clair, Wallis et Futuna (WF)=rouge, Maldives (Mal) et Glorieuses (Glo)=rose foncé. Trois groupes se distinguent (a,b et c).

VI. Discussion

Le premier objectif de cette étude est la caractérisation de la diversité génétique du genre *Halimeda* en Papouasie Nouvelle-Guinée. Avec sa position particulière dans le triangle d'or, cette région est une source d'informations clé dans l'étude de l'histoire des espèces, de leur mode de migration et de leur évolution formant un foyer de dispersion des faunes et flore de l'Indo-Pacifique. Les individus qui ont pu être séquencés dans cette région apparaissent dans quatre lignées (*Rhipsalis*, *Halimeda*, *Opuntia* et *Micronesica*) sur les cinq qui ont été mise en évidence à partir des individus provenant des Iles Glorieuses et des Maldives (Océan Indien), des Philippines et d'Okinawa (Nord-est Pacifique), de Nouvelle-Calédonie et d'Australie (Sud-est Pacifique) et de Polynésie Française, des Iles Marquises et des Iles Gambier (Sud-est Pacifique). Au total, les individus de Papouasie Nouvelle-Guinée sont répartis sur dix espèces ou dix clades distincts.

Lorsqu'un sous-clade régional se distingue d'un clade déjà admis, une nouvelle espèce est susceptible d'être mise en évidence. Les individus de Papouasie Nouvelle-Guinée offrent de nouvelles perspectives à la taxonomie classique d'*Halimeda* tant ils apparaissent comme faisant le lien entre les régions environnantes. Leur position n'est jamais anodine et de nombreux débats s'ouvrent grâce à leur connaissance. D'autre part, le marqueur *tufA* utilisé dans cette étude avait déjà été utilisé par Verbruggen (2005a-d, 2006, 2009) notamment dans la délimitation des espèces provenant des sections *Opuntia* et *Pseudo-Opuntia*. Les présents résultats montrent que ce gène a un potentiel de « barcoding » montrant une résolution suffisante à l'intérieur des clades qui définissent des espèces mettant en évidence la présence d'espèces cryptiques.

Pour plus de clarté, chacune des analyses phylogénétiques par lignée ainsi que leurs implications taxonomiques seront discutées séparément de manière succincte.

VI.1. Lignée *Rhipsalis*

La lignée *Rhipsalis* regroupe 9 espèces dont trois sont représentées en Papouasie Nouvelle-Guinée (*H.borneensis*, *H.macroloba* et *H.heteromorpha*). Le clade *H.borneensis* apparaît polyphylétique avec un sous-clade de Papouasie Nouvelle-Guinée proche de celui observé en Polynésie Française et deux autres groupes respectivement d'Okinawa et des Iles Glorieuses séparés par cinq mutations. Une barrière géographique pourrait jouer un rôle dans la séparation plus importante entre l'Océan Indien, le Pacifique Nord-ouest et la Papouasie Nouvelle-Guinée plutôt qu'entre cette dernière et la Polynésie Française. On note également la position centrale de la Polynésie Française au sein du complexe d'espèces que semble former *H.borneensis*. Il faut néanmoins pointer la nécessité d'étoffer l'échantillonnage pour les régions d'Okinawa et des Iles Glorieuses puisqu'elles ne présentent, à ce jour, qu'un seul individu chacune. Les clades *H.macroloba* et *H.heteromorpha* apparaissent monophylétiques. Une résolution fait défaut entre les trois espèces *H.macroloba*, *H.heteromorpha* et *H.kanaloana*. En 2005, Verbruggen fait état de ce cas difficile et discute de leur position respective. Ici, une technique supplémentaire devrait être utilisée pour pouvoir les positionner entre-elles telle (de type UPGMA) avec l'intégration d'une plus grande quantité d'individus de Papouasie Nouvelle-Guinée et notamment des exemples de *H.kanaloana*.

Le clade *H.cylindracea* a été enrichi depuis les travaux de Dijoux (2012) avec plusieurs individus de Nouvelle-Calédonie. L'espèce semble être représentée en Papouasie Nouvelle-Guinée

selon les descriptions de terrain mais n'apparaît pas dans le jeu de séquences. Un effort de séquençage doit être réalisé afin de s'assurer que l'espèce est bien absente de cette région. Le clade *H.melanesica*, lui, n'apparaît pas dans les données de terrain. L'espèce est néanmoins particulière tant elle ne présente pas le bulbe de rhizoïdes caractéristique de la lignée *Rhipsalis*. Présente en Nouvelle-Calédonie, son absence n'est probablement pas issue d'un effet de migration mais sans doute de l'habitat qui ne s'y prête pas.

Finalement, les clades monophylétiques de *H.monile*, *H.incrassata* et *H.simulans* ne proviennent que de l'Atlantique (Verbruggen 2009). Il était donc attendu de ne pas en observer en Papouasie Nouvelle-Guinée.

VI.2. Lignée *Halimeda*

La lignée *Halimeda* regroupe 11 clades robustes dont quatre sont représentées en Papouasie Nouvelle-Guinée (*H.macrophysa*, *H.xishaensis*, *H.discoidea*, *H.lacunalis*). Le clade *H.macrophysa* apparaît divisé en deux sous-clades séparant les individus de Nouvelle-Calédonie de ceux de Papouasie Nouvelle-Guinée par cinq mutations. Les observations morphologiques de terrain confirment ce constat. Habituellement, les utricules de grande taille de cette espèce sont visibles macroscopiquement ce qui n'était pas le cas lors de l'observation des échantillons de cette espèce pendant la mission dans le lagon de Madang. Les clades *H.xishaensis* et *H.lacunalis* rassemblent chacun des individus des Maldives, de Nouvelle-Calédonie et de Papouasie Nouvelle-Guinée en un seul clade monophylétique. Ceci met en évidence les flux géniques qui existent entre ces régions pour ces espèces. Le clade *H.discoidea* apparaît divisé en deux groupes séparés par six mutations. Le premier est plus de deux fois plus diversifié que le second et regroupe la Papouasie Nouvelle-Guinée, la Polynésie Française et la Nouvelle-Calédonie contre le groupe d'Okinawa, de Socotra et des îles Gambiers. On note la position centrale de la Papouasie Nouvelle-Guinée au sein du premier groupe. Par cette observation, on peut penser que le berceau de l'espèce s'est diversifié au cours du temps dans la première région et que des flux migratoires ont eu lieu plus tard vers les autres régions. Il faudrait néanmoins plus de marqueurs et d'échantillons pour en avoir la certitude. Néanmoins, ce clade a déjà été étudié par Verbruggen (2005a). Il observe également un pool génique plus important et diversifié qui regroupe les Philippines et la Polynésie Française écartant les sous-clades de Socotra et d'Oman (Nord-ouest de l'Océan Indien). Une explication possible de cet isolement génétique est le phénomène d'upwelling qui remonte les eaux froides le long de la péninsule Arabique. De la même façon, les îles Gambiers occupent une position particulière isolée des autres archipels de l'Est du Pacifique. L'apport d'informations provenant de Papouasie Nouvelle-Guinée informe le débat sur la complexité de l'espèce.

Le clade *H.taenicola* apparaît divisé en trois clades fortement soutenus séparant la Polynésie Française et un individu des Maldives des îles Gambiers et de la Nouvelle-Calédonie par seize mutations minimum. Il s'agirait d'un complexe d'espèces cryptiques. Une fois de plus, l'isolement des îles Gambiers souligne leurs positions particulières. On note que l'étude de Dijoux (2012) montre des résultats semblables avec une nette séparation entre les Maldives et la Polynésie en opposition à la Nouvelle-Calédonie. Comme l'espèce n'apparaît pas en Papouasie Nouvelle-Guinée ni dans le jeu de séquences ni dans les données de terrain on ne peut pas apporter d'éclairage à ce sujet.

Les clades *H.magnidisca* et *H.gigas* apparaissent en un nombre trop peu élevé pour pouvoir en tirer des traits de caractères. Elles apparaissent dans les données de terrain du lagon de Madang et doivent être complétées par un effort de séquençage.

Finalement, les espèces *H.tuna*, *H.hummii*, *H.scabra* et *H.cuneata* apparaissent toutes monophylétiques et ne sont originaires que de l'atlantique. Il était donc attendu de ne pas en retrouver en Papouasie Nouvelle-Guinée.

VI.3. Lignée *Pseudo-Opuntia*

La lignée *Pseudo-Opuntia* regroupe 4 clades robustes non représentés parmi les séquences obtenues pour la Papouasie Nouvelle-Guinée. L'espèce *H.gracilis* semble néanmoins être présente dans les données de terrain de Madang. Un effort de séquençage est donc à nouveau nécessaire afin de s'assurer de son absence. Plusieurs études ont été réalisées sur ce clade montrant qu'il s'agit d'un complexe séparant les individus en provenance de l'océan Indien de ceux de l'Atlantique et de ceux de l'ouest du Pacifique (Dijoux 2012). La présente étude confirme ces observations.

VI.4. Lignée *Opuntia*

La lignée *Opuntia* regroupe cinq clades robustes dont deux sont représentés en Papouasie Nouvelle-Guinée (*H.minima* + *H.renschii*, *H.opuntia* + *H.distorta*). Le clade réunissant *H.minima* et *H.renschii* apparaît comme un complexe d'espèces montrant jusqu'à 6 sous-clade distincts. Le réseau d'haplotypes montre néanmoins deux groupes principaux séparés par cinq mutations. Il est à noter qu'au sein du groupe le plus diversifié, le maximum de mutations entre deux des haplotypes les plus éloignés ne dépasse pas quatre. Il y a donc plus de flux génique et de diversification entre les individus du premier groupe qu'entre le premier et le deuxième groupe. Aussi, étant donné que les deux groupes partagent les mêmes régions, on peut dire que la barrière génétique entre les deux n'est pas d'origine géographique mais probablement liée à l'habitat où à une différenciation physiologique trop importante. D'autre part, les individus identifiés comme *H.renschii*, tous en provenance de Tanzanie, forment un clade à part entière. Il n'est pas exclu que l'entièreté du premier sous-clade fasse en réalité partie de *H.renschii*. Pour en être sûr, il faudrait ajouter au jeu de données plusieurs séquences de cette espèce ayant d'autres origines géographiques. On trouve donc au sein de la Papouasie Nouvelle-Guinée au moins deux espèces très éloignées génétiquement qui, jusqu'à aujourd'hui, se nommeraient toutes deux *H.minima*. Ceci confirme l'hypothèse de Verbruggen et Kooistra (2004) selon laquelle *H.minima* est partagée en, au moins, deux groupes très distincts. Le clade réunissant *H.opuntia* et *H.distorta* apparaît également comme un complexe d'espèces. Dans cette étude, un clade partageant deux individus *H.distorta*, un individu *H.opuntia* et trois individus nouvellement séquencés apparaît très robuste. Or, *H.opuntia* apparaît toujours monophylétique dans la littérature. Des analyses morphologiques supplémentaires ont permis de palier à cette étrangeté en revenant sur l'identification de l'individu dit *H.opuntia*. Il s'agit en réalité d'un individu *H.distorta*. Aussi, le réseau a permis de mettre en évidence un premier groupe assez large de *H.distorta* comprenant trois sous-clades dont un des Philippines (*H.distorta* 1), un de Papouasie Nouvelle-Guinée (*H.distorta* 2) et un dernier sous-clade comprenant la Polynésie Française, les Maldives et la Nouvelle-Calédonie (*H.distorta* 3). Un second groupe est reconnu regroupant tous les *H.opuntia* tandis qu'un dernier groupe, beaucoup plus éloigné génétiquement, constituerait le *H.distorta* 4 regroupant des individus de Polynésie et de Nouvelle-Calédonie. Le

caractère polyphylétique de *H. distorta* avait déjà été mis en évidence par Verbruggen et Kooistra (2005a). Ici, c'est l'éloignement du *H. distorta* 4 qui ouvre la réflexion.

Le clade *H. velasquezii* n'est pas représenté en Papouasie Nouvelle-Guinée. L'ajout d'une séquence de ce clade en provenance d'Okinawa permet néanmoins de confirmer les travaux de Dijoux (2012) qui séparent le clade en deux, éloignant les individus en provenance de l'Océan Indien de la région de l'Asie du Sud et de la Nouvelle-Calédonie.

VI.5. Lignée *Micronesica*

La lignée *Micronesica* regroupe 6 clades robustes dont un est représenté en Papouasie Nouvelle-Guinée (*H. fragilis* 3). Ce clade regroupe deux individus de Papouasie Nouvelle-Guinée et trois des Maldives. Un sous-clade robuste semble séparer les deux régions. La distance génétique qui les sépare reste cependant faible et il est donc difficile d'en tirer une conclusion trop hâtive.

Le clade *H. micronesica* ne reprend pas d'individus provenant de notre région principale d'analyse. Cependant, des séquences supplémentaires permettent d'observer trois clades distincts, un premier de Nouvelle-Calédonie, un second de l'Océan Indien et un dernier de l'Australie et des îles Wallis et Futuna. *H. micronesica* serait donc un complexe d'espèce qui mérite d'être étoffé en séquences de diverses régions afin d'être mieux résolu.

Finalement, les clades *H. pygmaea* et *H. cryptica* restent inféodés à leur localité type c'est-à-dire, respectivement, aux îles Fiji et aux Caraïbes. Il était attendu que ces espèces n'apparaissent pas en Papouasie Nouvelle-Guinée.

VI.6 Diversité génétique du genre *Halimeda* en Papouasie Nouvelle-Guinée

La présente étude a permis d'identifier dix espèces représentant quatre des cinq lignées obtenues pour le genre *Halimeda* en Papouasie Nouvelle-Guinée : *H. borneensis*, *H. macroloba*, *H. heteromorpha*, *H. macrophysa*, *H. xishaensis*, *H. discoidea*, *H. lacunalis*, *H. minima*, *H. distorta* et *H. fragilis*. Or, treize espèces supplémentaires apparaissent dans les données de terrain : *H. gracilis*, *H. hederacea*, *H. gigas*, *H. opuntia*, *H. stiposa*, *H. pumilla*, *H. micronesica*, *H. renschii*, *H. kanaloana*, *H. magnidisca*, *H. magnicuneata* et *H. cylindracea* mais en moindre quantité. Étant donné le nombre élevé d'échantillons rapportés de la mission de terrain (440) et le principe de « travail en aveugle » des travaux menés, il n'est pas étonnant que seules les espèces les mieux représentées soient sorties du lot. De plus, il n'est pas impossible que certaines des espèces supplémentaires minoritaires aient été mal identifiées. Pour palier à ces incertitudes, ces dernières feront l'objet d'une étude supplémentaire ciblée et seront ajoutés à l'arbre principal afin de confirmer leur identité.

Une série de taxons ont été reconnus révélant une diversité génétique plus importante au sein de différentes espèces. On note notamment les cas retrouvés chez *H. borneensis*, *H. macrophysa*, *H. discoidea*, *H. minima* et *H. distorta*. Contrairement à la nette fracture qui existe entre les espèces récoltées en Atlantique et celles récoltées dans le complexe Indo-Pacifique, ce dernier n'apparaît pas divisé de manière restrictive. Par contre, on notera que la position de la Papouasie semble plus proche de celle de la Polynésie Française, incluant les îles Marquises, que des régions de l'Océan Indien comme les Maldives et les îles Glorieuses. Aussi, les îles Gambiers, quand elles sont représentées, apparaissent complètement isolées des autres régions. Les raisons de cet isolement

sont probablement liées à des courants froids qui empêchent l'établissement de *Halimeda* dans les régions intermédiaires du Pacifique et qui poussent les individus des Gambiers à évoluer seules. De la même façon, les quelques individus provenant d'Asie du sud, Okinawa, apparaissent éloignés du groupe principal. Dans les deux cas, l'ajout de séquences en provenance de régions intermédiaires permettrait un éclairage sur la situation.

VII. Conclusions et perspectives

L'étude d'une collection de 105 séquences de nouveaux individus rassemblés avec 122 séquences de Genbank obtenues avec le marqueur *tufA* a permis de mettre en évidence la position caractéristique de la Papouasie Nouvelle-Guinée dans le complexe Indo-Pacifique. De plus, elle permet l'observation de nouveaux taxons dont il n'avait jamais été question avant et met le doigt sur la grande complexité d'au moins cinq espèces.

Ceci étant, une série d'analyses supplémentaires permettrait de compléter ce premier constat. D'abord, la méthode d'extraction utilisée pour les 105 individus mérite d'être améliorée. Il s'agit, en effet, d'une technique au chloroforme qui date de 2002. Malgré qu'elle ait été optimisée, il apparaît que l'ADN ne puisse pas être conservé longtemps et l'amplification du gène a montré de nombreuses difficultés non encore résolues en cette fin de stage. L'ADN des espèces manquantes sera donc extrait à l'aide de mini-kit Quiagen (cf : Dijoux ; 2012) pendant les quelques jours restant de mon stage. Ensuite, pour avoir une résolution phylogéographique robuste, il faudrait ajouter des individus provenant de chacune des régions pour toutes les espèces. Ceci permettrait de faire des comparaisons à égalité et de mettre en parallèle tous les paramètres requis. Enfin, même si le marqueur utilisé a déjà fait ses preuves plus d'une fois, il serait le bienvenu de repasser tous les ADN obtenus avec un second marqueur de type *rbcl* pour vérifier que les résultats sont identiques.

De manière globale, ce stage est une réussite personnelle et un réel apport à l'expérience dont je faisais preuve avant d'arriver en Nouvelle-Calédonie. Il m'a appris à gérer un projet de manière autonome du début à la fin en passant par l'apprentissage de nombreuses techniques qui m'étaient encore totalement étrangères. Cette autonomie m'a également permis d'échanger avec des collègues de travail planchant sur des recherches très différentes mais dont les aspects scientifiques comparables nous a permis d'ouvrir des débats souvent très instructifs. Ces six mois font largement partie de mes plus riches expériences depuis que je me destine à la recherche scientifique.

VIII. Bibliographie

- Colinvaux L.H., Wilbur K.M. & Watabe N. 1965. Tropical marine algae: growth in laboratory Culture. *Journal of Phycology*1: 69–78.
- Dijoux L. 2012. Diversity of *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in New Caledonia: a combined morphological and molecular study. *Journal of phycology* 48, 1465-1481.
- Fama`, P., Wysor, B., Kooistra, W. H. C. F. & Zuccarello, G. C. 2002. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene.J. *Journal of phycology* 38:1040–50.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the Bootstrap. *Evolution* 39:783–91.
- Gilmartin M. 1960. The ecological distribution of the deep water algae of Eniwetok. *Ecology* 41: 210–221.
- Hillis L.W. 1999. Phylogeny of *Halimeda* (Bryopsidales): linking paleontological, morphological and molecular data. *Acta Palaeontologica Romaniae* 2: 183–189.
- Kooistra W.H.C.F., Coppejans E.G.G. & Payri C. 2002. Molecular systematics, historical ecology and phylogeography of *Halimeda* (Bryopsidales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*24: 121–138.
- Lamouroux J.V.F. 1812. Extrait d'une mémoire sur la classification des polypiers coralligères non entièrement pierreux. *Nouveau Bulletin des Sciences par la Societe Philomatique de Paris*3: 181–188.
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Verbruggen H., Wiebe H.C.F. Kooistra 2004. Morphological characterization of lineages within the calcified tropical seaweed genus *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta). *European journal of phycology* 39,213-228.
- Verbruggen H., De Clerck O., Cocquyt E., Kooistra W.H.C.F. & Coppejans E. 2005a. Morphometric taxonomy of siphonous green algae: a methodological study within the genus *Halimeda* (Bryopsidales). *Journal of Phycology* 41: 126–139.
- Verbruggen H., Wiebe H.C.F. Kooistra, Eric Coppejans 2005b. Molecular and morphometric data pinpoint species boundaries in *Halimeda* section *Rhipsalis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Journal of phycology* 41, 606-621.
- Verbruggen H. 2005c. The molecular revolution in *Halimeda* systematics. *Resegmenting Halimeda*, 33.
- Wiebe H.C.F. Kooistra, Eric G.G. Coppejans and Claude Payri 2005d. Molecular systematics, historical ecology, and phylogeography of *Halimeda* (Bryopsidales). *Molecular phylogenetics and evolution* 24, 121-138.
- Verbruggen H., de Clerck O., N'Yeurt a., Spalding H., Vroom P.S. 2006. Phylogeny and taxonomy of *Halimeda incrassate* including description of *H.kanaloana* and *H.heteromorpha* spp. (Bryopsidales, Chlorophyta). *European journal of phycology* 41, 337-362.
- Verbruggen H., Ashworth, M. LoDuca, S.T. Vlaeminck, C. Cocquyt, E. Sauvage, T. Zechman, F.W. Littler, M.M. Leliaert, F. & De Clerck, 2009. A multi-locus time calibrated phylogeny phylogeny of the siphonous green algae. *Molecular phylogenetics and Evolution* 50,642-653