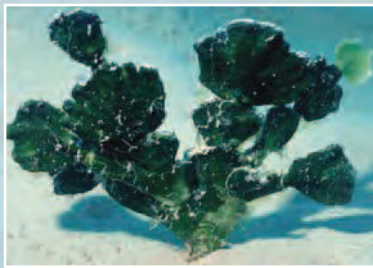


Analyse de la diversité du genre *Halimeda* en Nouvelle-Calédonie: Analyses morphologiques et ADN



Laury DIJOUX

M2- Sciences De l'Univers, Environnement, Ecologie
Mention Océanographie et Environnements Marins

Maîtres de stage : Claude Payri et Lydiane Mattio
Unité 227 "Biocomplexité des écosystèmes coralliens de l'Indo-Pacifique"

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Claude PAYRI, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe; pour le temps qu'elle m'a consacré tout au long de cette période, sachant répondre à toutes mes interrogations ; sans oublier sa participation au cheminement de ce rapport.

Je remercie également le docteur Lydiane MATTIO pour ses conseils et son aide précieuse tout au long de ce stage.

Merci aussi à Nathalie DUONG pour son inestimable aide technique et sa bonne humeur.

Je remercie également Clarisse Majorel, pour ses conseils et son aide à la Plateforme du Vivant.

Mais aussi Gregory LASNE, Elodie FONTAN, Dominique PONTON et Ondine CORNUBERT pour les différents prélèvements réalisés.

Merci également à l'équipe de plongée.

Je remercie aussi mes colocataires « Lofteuses », Swen, Cécile, Christelle et Caroline, pour leur soutien et leur présence, à Fanny pour ses encouragements et ses conseils, à Pauline, à Ollanta pour sa patience, à mes amis OEM également pour leur soutien malgré la distance et surtout à mes parents sans qui ce stage n'aurait pu se concrétiser.

Merci à toutes et à tous.

Sommaire

INTRODUCTION	6
I. MATERIEL ET METHODES	8
2. Lieu d'étude	8
3. Matériel biologique	10
4. Analyse morphologique	10
5. Analyse ADN	14
6. Analyses phylogénétiques	16
II. RESULTATS	18
1. Analyses morphologiques	18
2. Analyses phylogénétiques	22
2.1 Lignée 1 (<i>Rhipsalis</i>)	22
2.2 Lignée 2 (<i>Micronesicae</i>)	24
2.3 Lignée 3 (<i>Halimeda</i>)	26
2.4 Lignée 4 (<i>Pseudo-opuntia</i>)	28
2.5 Lignée 5 (<i>Opuntia</i>)	28
III. DISCUSSION	30
1. Pertinence des caractères morphologiques étudiés	30
2. Phylogénie générale	30
3. Analyse phylogénétique par lignée et implications taxonomiques	32
3.1 Lignée 1 (<i>Rhipsalis</i>)	32
3.2 Lignée 2 (<i>Micronesicae</i>)	34
3.3 Lignée 3 (<i>Halimeda</i>)	34
3.4 Lignée 4 (<i>Pseudo-opuntia</i>)	36
3.5 Lignée 5 (<i>Opuntia</i>)	36
4. L'apport de l'analyse ADN dans l'identification des morphotypes et des espèces	38
5. Diversité du genre <i>Halimeda</i> en Nouvelle-Calédonie	38
6. Distribution géographique	42
IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	46
V. BIBLIOGRAPHIE	50
VI. ANNEXES	56

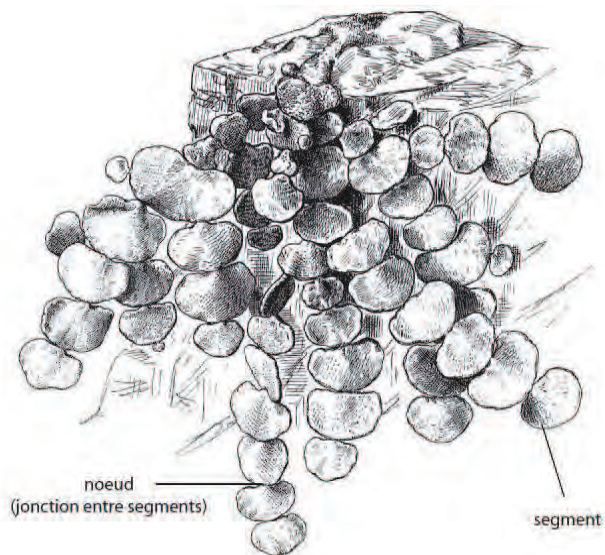


Figure 1. Morphologie générale de *Halimeda*, exemple d'un port "pendant" (source wikimedia d'après Oltmanns, 1904)

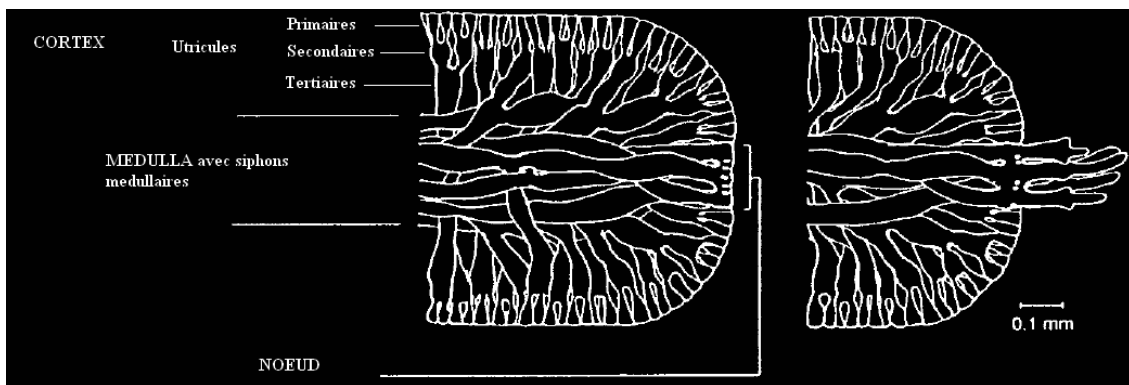


Figure 2. Coupe longitudinale d'un segment d'*Halimeda incrassata*, vue schématique de l'anatomie interne (d'après Hillis et al. 1998)

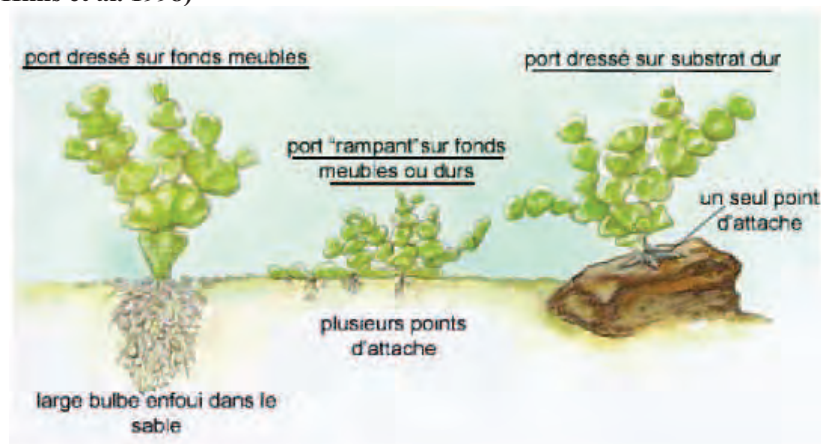


Figure 3. Les trois principaux ports et types de fixation (source: <http://www.aims.gov.au>)

Introduction

Le genre *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) est l'un des plus étudié parmi les algues vertes. Il est présent dans toute la région tropicale et subtropicale des trois océans mais également en mer Méditerranée et Mer Rouge (Verbruggen et al. 2005). Les *Halimeda* sont bien représentées dans les flores marines associées aux écosystèmes coralliens, aussi bien sur les fonds meubles des lagons que sur les récifs jusqu'à 150 m de profondeur. Ces algues ont la particularité d'être calcifiées et sont composées d'un enchaînement de segments calcifiés séparés par des 'articulations' ou 'nœuds' non calcifiés leur donnant une structure articulée (Figure 1). Comme tous les végétaux chlorophylliens se sont des producteurs primaires importants, fournissant nourriture mais également habitat à certaines espèces côtières (Hillis-Colinvaux, 1980). Leur cycle biologique passe par la production périodique de gamètes qui assurent la reproduction sexuée ; celle-ci est particulière car l'ensemble du contenu cytoplasmique se transforme en cellules reproductrices et l'algue meurt (Meinesz, 1980). Dans ce cas, les articles calcifiés se détacheront les uns des autres et se dégraderont au fil du temps participant alors à la formation du sable. Les populations peuvent également se multiplier par voie végétative grâce aux rhizoïdes ou par fragmentation du thalle. Au plan anatomique chaque individu correspond à une cellule unique géante plurinucléée formant par ramifications multiples et successives un ensemble de filaments qui s'organisent en une zone médullaire que l'on distingue d'une zone corticale correspondant à l'extrémité renflée des filaments qui forme les utricules (Figure 2) (Hillis-Colinvaux, 1980). La diversité de la taille et de la forme des segments et des plantes en font un genre très polymorphe (Figure 3). De plus, certaines espèces peuvent présenter des variants morphologiques en fonction de leur habitat, rendant leur identification d'autant plus délicate.

La première description du genre *Halimeda* a été réalisée en 1812 par Lamouroux. La division du genre en quatre lignées n'a été initiée que plus tard par J. G Agardh (1887) qui se basa sur les caractères morphologiques externes pour distinguer les lignées *Tunae*, *Pseudo-opuntia*, *Opuntiae* et *Rhipsalis*. Les études anatomiques (structures nodales et utricules) ont débuté en 1888 par Askenasy, jusqu'aux travaux de Hillis-Colinvaux (1959 et 1980) qui sont la référence pour la taxonomie du genre *Halimeda*. Hillis-Colinvaux y définit cinq lignées sur une base morphologique: *Rhipsalis* (8 espèces), *Opuntia* (7 espèces), *Halimeda* (11 espèces), *Micronesicae* (3 espèces) et *Crypticae* (1 espèce). Kooistra et collaborateurs (2002) rediscuteront ces cinq lignées en s'appuyant sur des analyses ADN : la lignée *Halimeda* est

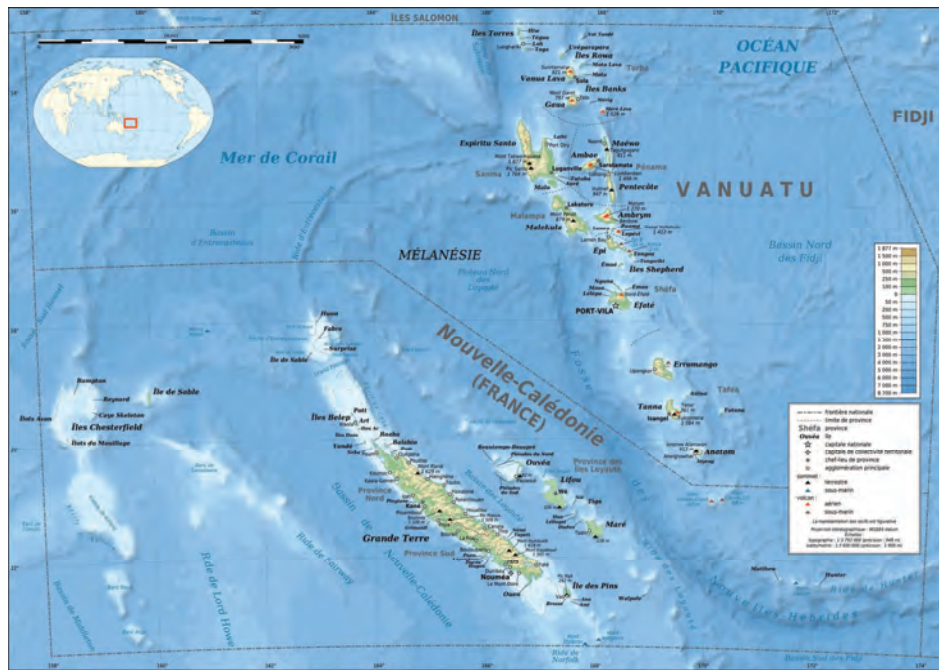


Figure 2. Carte topographique des îles et récifs de la Nouvelle -Calédonie et position géographique (source <http://www.populationdata.net>)

Tableau 1. Marqueurs moléculaires utilisés pour la phylogénie et la taxonomie du genre *Halimeda* (Verbruggen et al. 2009)

Type de marqueurs	Marqueurs
chloroplastique	<i>rbcL</i>
	<i>tufA</i>
	UCP3
	UCP7
nucléaire	SSU nrDNA
	<i>ITS</i>

séparée en deux lignées (*Halimeda* et *Pseudo-Opuntia*) et la lignée *Crypticae* est intégrée à la lignée *Micronesicae*. De plus, *H. melanesica*, classée par Hillis-Colinvaux avec *Micronesicae*, est finalement regroupée au sein de la lignée *Rhipsalis*. Trente-six espèces sont ainsi identifiées et confirmées par les analyses ADN. Même si certaines lignées sont clairement résolues, d'autres apparaissent comme des systèmes complexes au sein desquels demeurent des ambiguïtés taxonomiques au niveau spécifique. Aujourd'hui, 52 taxons sont reconnus à l'aide de 6 marqueurs moléculaires (Verbruggen 2009, tableau 1), bon nombre d'entre eux pourraient être de nouvelles espèces.

En Nouvelle-Calédonie, la première liste du genre fut établie en 1968 par Valet qui y dénombra 8 espèces. Le dernier recensement (Payri 2007) fait état de 19 espèces, pour la plupart identifiées sur la base des caractères morphologiques.

L'objectif de ce travail est de revisiter la diversité du genre *Halimeda* en Nouvelle-Calédonie à partir d'analyses de l'ADN confrontée à l'étude morphologique d'une collection de tissus et de spécimens déposés à l'IRD de Nouméa. L'analyse de la diversité sera comparée à celle de deux autres sites (Moorea, Polynésie française et atoll de Baa aux Maldives) pour lesquels nous avons une collection de tissus et de spécimens à disposition.

La présente étude a été réalisée au centre IRD de Nouméa, en Nouvelle-Calédonie, dans l'équipe CoRéUs, sous la direction du Pr. Claude Payri et de Lydiane Mattio, post-doctorante.

I. Matériel et méthodes :

1. Lieu d'étude :

La Nouvelle-Calédonie est située dans l'Océan Pacifique sud-ouest, entre 18°S et 23°S et 164°E et 167°E, à environ 1 500 km à l'est de l'Australie. Elle est formée d'une île principale, la Grande Terre, de plusieurs ensembles d'îles plus petites, de plateformes récifales et de lagons. On retrouve les îles Belep au nord, l'île des Pins au sud, et à une centaine de kilomètres à l'est les îles Loyauté (Ouvéa, Lifou, Tiga et Maré). Les plateformes récifales sont au nombre de trois, les récifs d'Entrecasteaux qui constituent la limite nord des formations récifales, la Corne Sud qui délimite le lagon au sud ouest et l'immense plateau corallien des Chesterfield-Bellona à l'ouest à mi-chemin de l'Australie (Figure 4). Le lagon néo-calédonien a une surface totale de 24 000 km², ce qui en fait l'un des plus grands lagons du

monde (Andréfouët et al. 2006). Il est ceinturé par une barrière de corail continue d'une longueur de 1 600 km, située entre 10 et 70 km des côtes de la Grande Terre, et s'étendant, des récifs d'Entrecasteaux au nord-ouest à l'île des Pins au sud-est. Le lagon est divisé en 4 entités géographiques : le lagon Sud-Ouest, (région de Nouméa); le lagon sud qui s'étend du canal de la Havanah à l'île des Pins ; le lagon Est ; le lagon Nord, bordé par le Grand Passage au sud des récifs d'Entrecasteaux et enfin le lagon Nord-Ouest.

2. Matériel biologique :

Les spécimens étudiés proviennent de la collection phycologique conservée à l'IRD et établie par Claude Payri et ses collaborateurs. Ils ont été récoltés en scaphandre autonome lors de campagnes océanographiques réalisées entre 2007 et 2010, autour de la Grande Terre, aux îles Loyautés, à l'île des Pins, dans le grand lagon Nord ainsi qu'aux îles Chesterfield-Bellona. Une partie de la collection étudiée provient également de l'atoll de Baa (Maldives) et de l'île de Moorea (programme Biocode Moorea, Project –MBP-, Université de Berkeley, Polynésie française). Les échantillons conservés à l'éthanol provenant de Moorea n'ont été utilisés que pour l'analyse ADN, les vouchers étant conservés à l'Université de la Polynésie française (UPF) et à l'Université de Californie, Berkeley (UC). Ces échantillons avaient été identifiés par Claude Payri et Antoine de R. N'Yeurt dans le cadre du projet MBP.

Au cours de ce stage, 11 spécimens ont été récoltés par moi-même avec l'aide de Lydiane Mattio et de Nathalie Duong en palmes-masque-tuba sur le platier de Ricaudy à Nouméa. Plusieurs spécimens provenant de la baie du Prony (Sud de la Grande Terre) ont été aimablement collectés par G. Lasne de la société BIOCENOSE.

Pour les récoltes récentes, les spécimens ont été mis en herbier pour analyse morphologique ultérieure et des échantillons ont été conservés dans de l'éthanol à 90% pour les analyses ADN.

3. Analyse morphologique :

L'analyse morphologique est basée sur l'étude des caractères telle qu'admis par les taxonomistes spécialistes du groupe, à savoir les études d'Hillis- Colinvax (1980) et Verbruggen (2004).

Tableau 2. Liste des caractères pris en compte pour les analyses morphologiques

Caractères macroscopiques	Variables
Type d'attache au substrat	<ul style="list-style-type: none"> * un point d'attache unique => rhizoïdes compacts formant un bulbe dans les sédiments meubles => rhizoïdes plus ou moins développés, à la surface de substrats durs * plusieurs points d'attaches
Aspect général du thalle	<ul style="list-style-type: none"> - dressé - rampant - buissonnant - pendant
Forme des segments en position basale	<ul style="list-style-type: none"> - plats - en forme de tonneau - formant un pseudo-stipe
Ramification des segments en position basale	<ul style="list-style-type: none"> - segment basal portant une seule ramification - segment portant plusieurs ramifications se plaçant en couronne sur la partie apicale du segment
Forme générale des segments en position apicale	<ul style="list-style-type: none"> - plats - cylindriques (figure 5) - ronds, trilobés, réniformes, en trapèzes (figure 5) - présence ou non de carène saillante (nervures)
Ramification des segments de la partie moyenne du thalle	<ul style="list-style-type: none"> - ramification unique, donnant des files de segments non ramifiés - ramification di ou trichotome, dans un ou plusieurs plans - ramification > à 3
Calcification des segments	<ul style="list-style-type: none"> - faible, moyenne ou forte
Bords des segments	<ul style="list-style-type: none"> - lisses - ondulés
Caractères anatomiques	Variables
<u>Nœud</u> <ul style="list-style-type: none"> - Type de fusion - Nombre de siphons impliqués dans la fusion 	<ul style="list-style-type: none"> - Complète - Partielle avec ou sans pores, gros ou petit pores - Absente - De 2 à 4
<u>Utricules</u> <ul style="list-style-type: none"> - Nombre de couches d'utricules - Forme des utricules périphériques en coupe transversale (utricules 1) - Aspect après décalcification - Forme des utricules en vue de dessus 	<ul style="list-style-type: none"> - De 1 à 4 - Cupulés (Figure 26), en forme de grelots, arrondis - Soudés ou non (Figures 24 et 25) - Arrondis ou hexagonaux

Au total de 86 échantillons issus de la collection ont été étudiés. Pour le genre *Halimeda*, l'analyse morphologique se décompose en 3 étapes : (i) une observation macroscopique pour décrire l'aspect externe des spécimens (dimension, forme...), (ii) une observation sous la loupe binoculaire pour réaliser les dissections et préparations histologiques et (iii) une observation au microscope optique pour l'étude anatomique à partir des préparations histologiques. L'analyse macroscopique porte sur l'observation des caractères listés dans le tableau 2 et illustrés à la figure 5. Un certain nombre de mesures morphométriques sont également réalisées à cette étape. L'observation à la loupe binoculaire porte sur l'organisation de la partie nodale non calcifiée ; elle se fait après dissection de fragments prélevés sur les individus. La dissection consiste à isoler un nœud entre deux segments, pour aider la dissection, les fragments de segments sont décalcifiés à l'aide d'une goutte d'acide chlorhydrique (HCl) 10%, et la partie corticale est dégagée pour observer les siphons nodaux sous la loupe puis sous microscope. Les différentes variables observables au niveau du nœud sont listées dans le tableau 2. Enfin, l'observation au microscope optique se fait sur des coupes transversales de segment décalcifiées et montées entre lame et lamelles. L'observation anatomique porte sur les utricules et les filaments médullaires qui constituent les segments, selon les critères listés dans le tableau 2. La mesure de la taille des utricules (diamètre en vue de surface, longueur et largeur en coupe transversale) et des filaments est effectuée à l'aide d'un micromètre oculaire.

Suite aux analyses morphologiques, les individus partageant les mêmes caractères ont été regroupés en « morphotypes » (i.e. continuums morphologiques distincts). Les morphotypes seront ensuite comparés aux résultats obtenus avec l'analyse ADN avant identification taxonomique.

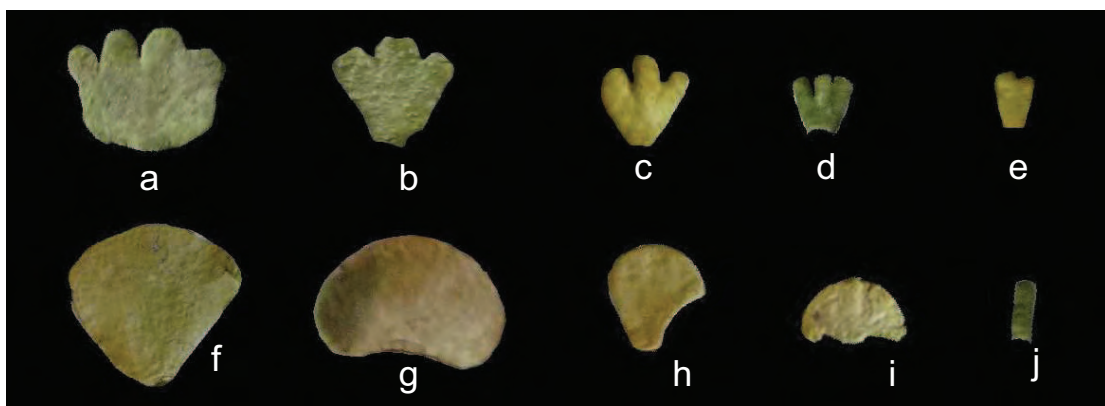


Figure 5. Formes des segments: a: quadrilobés, b à d : trilobés, e: bilobés, f: trapèze, g: réniforme, h: indéfini, i: en éventail, j: cylindrique

Tableau 3. Amorces nucléotidiques utilisées pour l'amplification et le séquençage

Nom de l'amorce	Direction de l'amorce	Séquence de l'amorce	Température d'hybridation (°C)	Source
UCP7	F	5'-ATWTCDCGCCATTWAGDCKVCC-3'	58	Provan et al. 2004
	R	5'-ATGGTWGGWCAWAAATTDGGTGAGTTT-3'		
<i>tufA</i>	F	5'-TGAAACAGAAMA WCGTCATTATG-3'	52	Famà et al. 2002
	R	5'-CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC-3'		
<i>rbcL1</i>	F	5'-CCAMAAACWGAAACWAAAGC-3'	52,2	Lam et Zechman 2006
<i>rbcL2</i>	F	5'-TCCAAAAACTGAAACTAAAGCAGG-3'	57,6	
<i>rbcL3</i>	R	5'-GCTTGWGMTTTRTARATWGCTTC-3'	56,2	
<i>rbcL4</i>	R	5'-TCAATAACCGCATGCATTGC-3'	55,3	
<i>rbcL5</i>	F	5'-GCTTATGCWAAAACATTYCAAGG-3'	56,2	
<i>rbcL6</i>	R	5'-AATTTCTTTCCAAACTTCACAAGC-3'	55,9	

F (Forward : 5' → 3') sens et R (Reverse : 3' → 5') antisens

4. Analyse ADN :

Pour compléter le lot des 139 échantillons conservés à l'éthanol et des 11 échantillons frais, 31 échantillons ont été prélevés sur les spécimens en herbier.

Les échantillons conservés à l'éthanol ont été séchés une nuit à l'air puis broyés dans de l'azote liquide. L'ADN des échantillons a été extrait grâce au kit « DNeasy Plant miniKit » (Qiagen). Le choix des marqueurs ADN utilisés au cours de cette étude s'appuie sur les études de Verbruggen (2005 et 2009). Les marqueurs chloroplastiques UCP7, *tufA* et *rbcL* ont ainsi été choisis pour leur qualité discriminante pour l'identification des espèces et également pour le grand nombre de séquences disponibles pour ces marqueurs. Les amorces nucléotidiques utilisées sont listées dans le tableau 3. Les milieux réactionnels PCR ont été préparés afin de contenir 0,4 µM d'amorces *Forward* et *Reverse*, 0,2µM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 2,5 µL de tampon de réaction 10X, 2 µL d'ADN extrait, 1,25 unités de Taq polymérase et de l'eau ultrapure pour un volume final de 25µL. La réaction de PCR a été effectuée dans un thermocycleur (VERITI, Applied Biosystems) selon le programme suivant : (i) une phase de dénaturation de 2 minutes à 94°C, (ii) 40 (*tufA*) ou 35 (*rbcL*) cycles comprenant une phase de dénaturation de 1 minute à 94°C, (iii) une phase d'hybridation de 1 minute à la température préconisée pour l'amorce (tableau 3), (iv) une phase d'extension de 1 minute à 72°C et (v) une phase finale d'extension de 5 minutes à 72°C.

Une partie du séquençage des produits PCR positifs a été effectuée par la société MacroGen (Séoul, Corée) par la méthode « Big Dye Terminator » dans les deux sens : *Forward* et *Reverse*. Une autre partie du séquençage a été réalisée à la « Plateforme du Vivant » de l'IRD de Nouméa par moi-même avec l'aide de N. Duong et C. Majorel. Les produits PCR ont d'abord été purifiés sur colonne MinElute (Qiagen) avant de subir une réaction de séquence grâce au kit « ABI Prism BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit » (Applied Biosystems). Le milieu réactionnel a été préparé pour contenir 0.8 µL de « ready reaction premix », 4µL de « BigDye Sequencing buffer », 4µM d'amorces *Forward* et *Reverse*, 10 ng d'ADN purifié et de l'eau ultrapure pour un volume final de 20µL. La réaction de séquençage a été effectuée dans le thermocycleur selon le programme suivant : (i) une phase de dénaturation d'une minute à 96°C, (ii) 60 cycles comprenant une phase de dénaturation de 15 secondes à 98°C, (iii) une phase d'hybridation de 10 secondes à 50°C et (iv) une phase d'extension de 4 minutes à 60°C. Les produits de séquence ont ensuite été

purifiés sur Cephalexin G50. Dix microlitres d'eau ont été rajoutés aux 20µl de produit de séquence purifié avant d'être traités par le séquenceur ABI (Applied biosystems).

5. Analyses phylogénétiques :

Dans un premier temps, les séquences obtenues ont été « nettoyées » et les séquences consensus (F+R) ont été alignées manuellement grâce au logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.0 (Hall 2005). Ces alignements ont été complétés par des séquences *tufA* et *rbcL* disponibles sur la GenBank pour le genre *Halimeda*. Trois méthodes de reconstruction phylogénétiques ont été appliquées aux alignements finaux : Neighbor-joining (NJ) et Maximum Parsimony (MP) grâce au logiciel MEGA4 (Tamura et al. 2007) et Maximum Likelihood (ML) grâce au logiciel PHYML (Guindon et Gascuel 2003). Le logiciel FINDMODEL (disponible en ligne sur <http://www.hiv.lanl.gov>) a été utilisé pour déterminer le modèle d'évolution le plus adéquat pour l'analyse ML. Pour estimer la robustesse des nœuds, les valeurs des bootstraps (BP) (Felsenstein 1985) ont été calculées avec 1 000 répliques pour les analyses NJ et MP et 100 répliques pour l'analyse ML. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50 % sont rapportées, les nœuds sont considérés comme faiblement soutenus en dessous de cette valeur seuil, moyennement soutenus (BP= [50-70%]), bien soutenus (BP= [70-80%]) ou robustes (BP > 80%). Les séquences de la région *tufA* pour *Avrainvillea rawsonii* (AM049968) et *Udotea orientalis* (AM049970) issus de la GenBank ont été utilisées comme racines pour la phylogénie générale, sur le modèle de Verbruggen (2006).



Figure 6. Morphotype A (*Halimeda cylindracea*)



Figure 7. Morphotype B (*Halimeda borneensis*) (photo service plongée IRD)

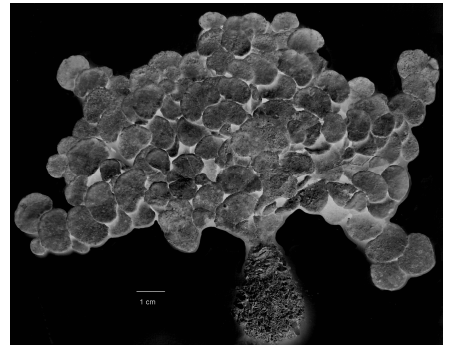


Figure 8. Morphotype C (*Halimeda macroloba*)



Figure 9. Morphotype D (*Halimeda fragilis*) (photo service plongée IRD)

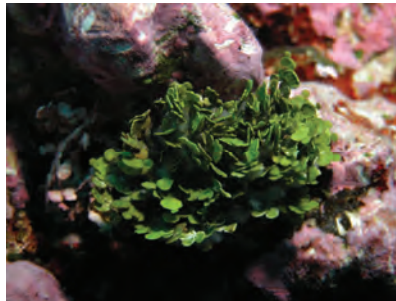


Figure 10. Morphotype E (*Halimeda micronesica*) (photo service plongée IRD)



Figure 11. Morphotype F (*Halimeda lacunalis*) (photo service plongée IRD)



Figure 12. Morphotype G (*Halimeda discoidea*) (photo service plongée IRD)



Figure 13. Morphotype H (*Halimeda macronhvsca*) (photo service plongée IRD)

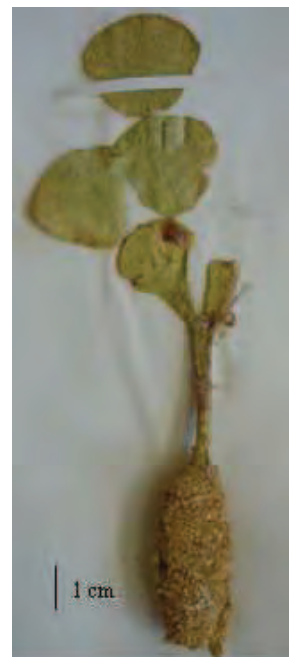


Figure 14. Morphotype I (*Halimeda magnidisca*) (photo service plongée IRD)

II. Résultats

1. Analyses morphologiques :

D'après les caractères morphologiques listés dans le tableau 2, 15 morphotypes (notés de A à O) ont été déterminés. Les morphotypes A, B et C se distinguent par la présence de pores au niveau des fusions nodales (alors qu'aucun autre morphotype ne présente ce caractère, Figure 21) et également par la présence d'un bulbe bien développé qui permet leur fixation dans les fonds meubles. Ils se différencient entre eux par la forme de leurs segments apicaux. Le morphotype A possède des segments apicaux cylindriques, simples ou trilobés (Figure 6) ; le morphotype B présente des segments apicaux plats trilobés (Figure 7) ; et le morphotype C possède des segments apicaux larges réniformes (Figure 8). Les morphotypes D et E se distinguent par l'absence de fusion des siphons au niveau des nœuds et par la séparation des utricules après décalcification (Figure 25). Le morphotype D présente un segment basal avec des ramifications à 360° (Figure 9) alors que le morphotype E présente un segment basal en forme de main avec des ramifications à 180° (Figure 10). Tous deux possèdent un seul point de fixation. Les morphotypes F à J présentent un thalle érigé avec un pseudo stipe, des fusions nodales totales de deux siphons, et un seul point d'attache. Le morphotype F se distingue par des segments apicaux ronds à ovales, parfois plus étroits à la base leur donnant une forme d'éventail ainsi que des utricules avec un diamètre inférieur à 50 µm en vue de surface (Figure 11). Le morphotype G, malgré un fort polymorphisme des thalles (Figure 12), a un caractère anatomique constant et distinctif avec la présence une couche d'utricules secondaires très larges et isodiamétriques par rapport aux utricules périphériques cupulés et deux à trois fois plus petits (utricules 1 cf. Figure 3). Le morphotype H présente un thalle plus petit que le morphotype G, et des utricules visibles en surface à l'œil nu, donnant aux segments apicaux un aspect en « nid d'abeille » caractéristique (Figure 13). Le morphotype I présente des segments basaux longs et fins, formant un stipe porté par un bulbe bien développé qui permet son encrage dans les substrats meubles (Figure 14). Le morphotype J se distingue par des segments apicaux épais en forme de trapèze, cylindriques ou ovales et un seul point de fixation (Figure 15); l'anatomie montre une troisième couche d'utricules (couche plus interne, Figure 3) d'une largeur supérieure à 110 µm. Le morphotype K se distingue par un thalle étendu, buissonnant ou rampant, plusieurs points d'attache au substrat,



Figure 15. Morphotype J (*Halimeda taenicola*) (photo service plongée IRD)

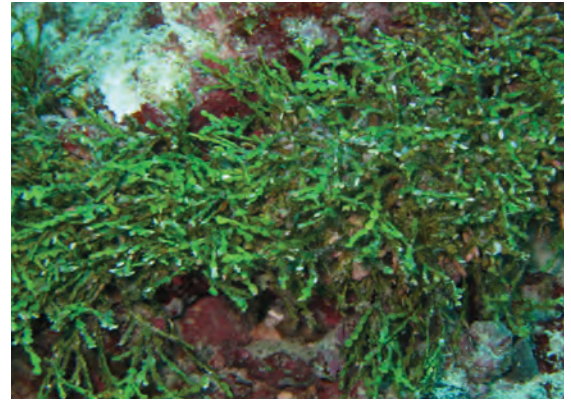


Figure 16. Morphotype K (*Halimeda gracilis*) (photo service plongée IRD)

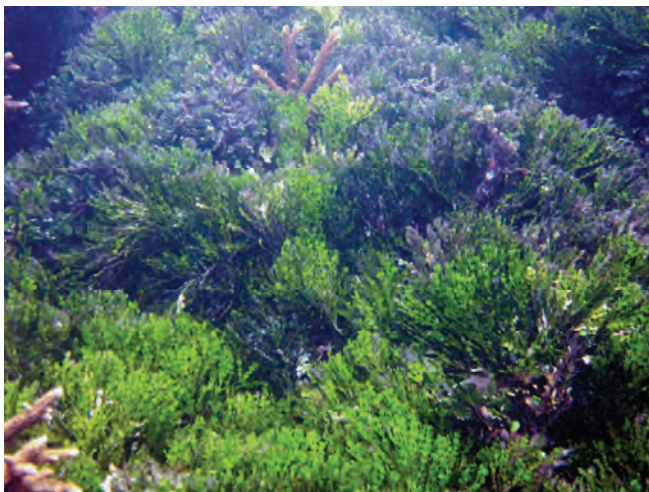


Figure 17. Herbier composé de *Halimeda minima* (morphotype L)



Figure 18. Morphotype M (*Halimeda opuntia*) (photo service plongée IRD)



Figure 19. Morphotype N (*Halimeda distorta*) (photo service plongée IRD)



Figure 20. Morphotype O (*Halimeda heteromorpha*) (photo service plongée IRD)

de nombreuses ramifications, et des branches longues et fines (3 mm de long et 4 mm de large en moyenne), avec des segments trilobés et cylindriques (Figure 16). Le nœud du morphotype K présente une fusion totale des siphons (Figure 23). Les morphotypes L, M et N possèdent deux structures nodales identiques, avec fusion de deux ou trois siphons (Figure 22), quelquefois plus, sur une courte portion du nœud. Le morphotype L possède un thalle pendant, ou « en rideau », fixé par un seul point au substrat, avec des branches orientées dans un seul plan, excepté parfois au niveau des premiers segments (Figure 17). Le morphotype M se caractérise par un thalle buissonnant et très dense, et des petits segments apicaux réniformes très cassants (calcification importante) présentant parfois des renflements assimilables à des nervures, on note plusieurs points d'attaches (Figure 18). Le morphotype N possède un thalle formant généralement un tapis plus ou moins dense, fixés au substrat par plusieurs points d'attache, avec des segments apicaux réniformes ou trilobés de différentes tailles (9 mm de long et 14 mm de large en moyenne), qui s'organisent dans différents plans (Figure 19). Il se distingue notamment du morphotype M par des segments apicaux de plus grande taille que ce dernier et de forme plus ou moins tordue. Le morphotype O présente un thalle assez polymorphe, pouvant parfois présenter un pseudo-stipe et un bulbe, mais dans la plupart des cas il possède une seule attache adaptée aux substrats durs. Les segments apicaux sont petits (2 à 8 mm de long et 2 à 9 mm de large en moyenne), pour la plupart trilobés, parfois réniformes (Figure 20). Le nœud du morphotype O est formé de siphons fusionnant de façon partiellement, avec très rarement présence de pores (très peu visibles).

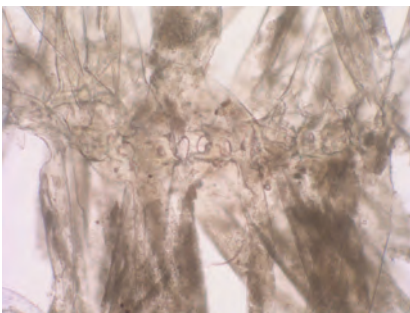


Figure 21. Fusion nodale avec pores (*Halimeda cylindracea*) x400

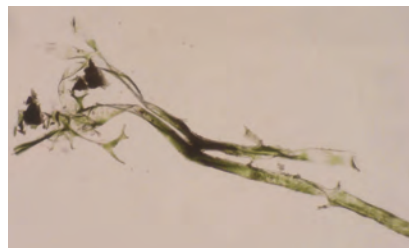


Figure 22. Fusion nodale partielle de deux siphons nodaux (*H. minima*) x 200



Figure 23. Fusion totale de deux siphons nodaux (*H. gracilis*) x200

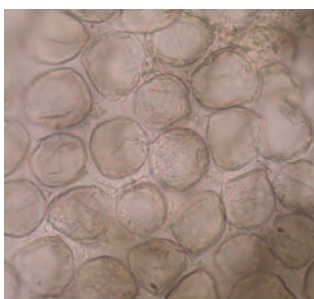


Figure 25. Utricules désoudés après décalcification (*H. cylindracea*) x 400

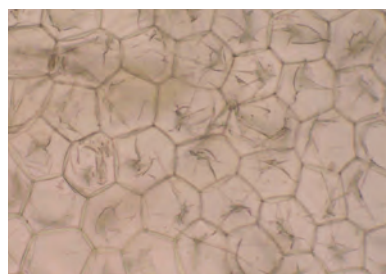


Figure 24. Utricules soudés après décalcification (*H. minima*) x 400

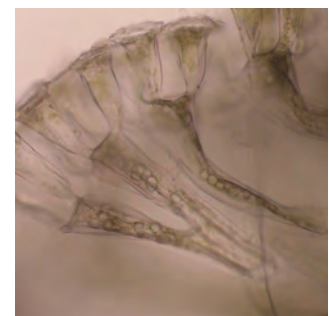


Figure 26. Utricules cupulés (*H. minima*) x400

Figure 27. Arbre phylogénétique général du genre *Halimeda* basé sur les alignements de la région *tufA* par analyse NJ. Les valeurs de Bootstrap (BP > 50%) sont indiquées pour les analyses NJ/MP/ML. Racines : *Avrainvillea rawsonii* et *Udotea orientalis*. Les triangles représentent le regroupement des séquences au sein des clades. L1 *Rhipsalis*, L2 *Micronesicae*, L3 *Halimeda*, L4 *Pseudo-Opuntia* L5 *Opuntia*

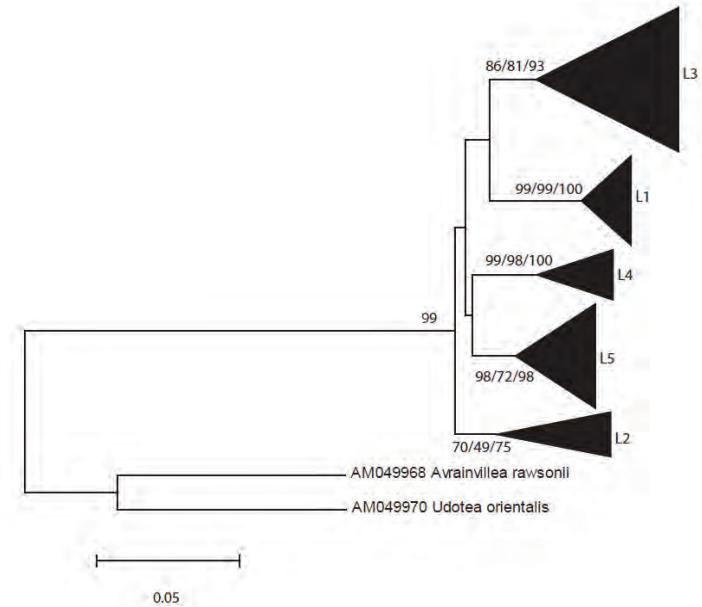
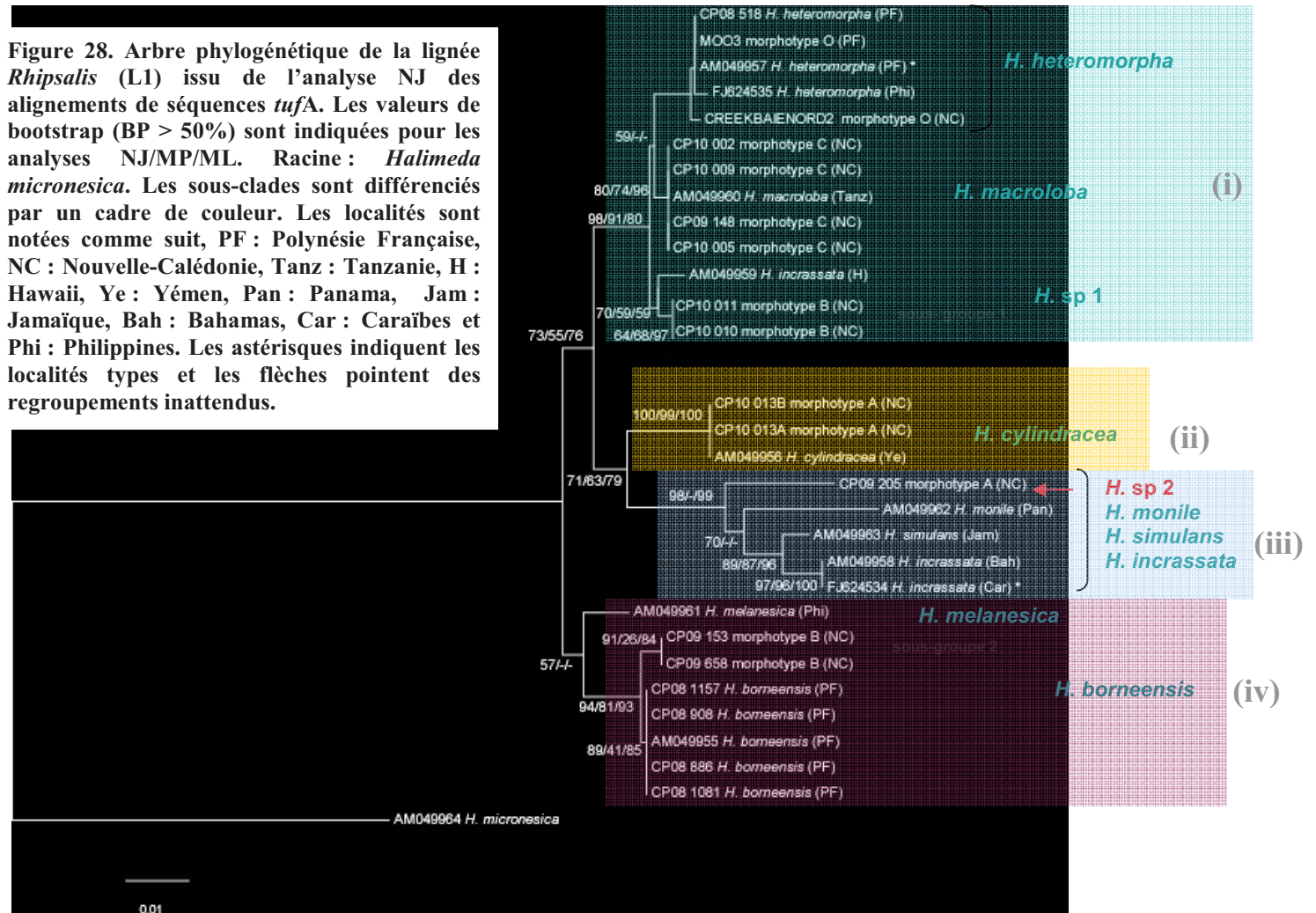


Figure 28. Arbre phylogénétique de la lignée *Rhipsalis* (L1) issu de l'analyse NJ des alignements de séquences *tufA*. Les valeurs de bootstrap (BP > 50%) sont indiquées pour les analyses NJ/MP/ML. Racine : *Halimeda micronesica*. Les sous-clades sont différenciés par un cadre de couleur. Les localités sont notées comme suit, PF : Polynésie Française, NC : Nouvelle-Calédonie, Tanz : Tanzanie, H : Hawaï, Ye : Yémen, Pan : Panama, Jam : Jamaïque, Bah : Bahamas, Car : Caraïbes et Phi : Philippines. Les astérisques indiquent les localités types et les flèches pointent des regroupements inattendus.



2. Analyses phylogénétiques :

Au total, 86 séquences ont été obtenues pour le marqueur chloroplastique *tufA* : 38 séquences pour les individus de la Nouvelle-Calédonie, 24 pour les Maldives et 24 pour la Polynésie française. Aucune séquence n'a pu être obtenue à partir des spécimens d'herbier. L'amplification avec le marqueur UCP7 n'a pas fonctionné malgré de nombreuses tentatives et un réajustement du protocole. Les données sur le marqueur *rbcL* n'étaient pas disponibles au terme du stage.

Cent quatorze séquences disponibles pour le genre *Halimeda* sur GenBank ont été téléchargées et alignées aux séquences obtenues dans la présente étude (857 paires de base après traitement et alignement). Les analyses NJ, MP et ML ont produit des topologies similaires, et seuls les arbres issus de l'analyse NJ sont présentés dans ce mémoire, en indiquant toutefois les valeurs de bootstrap pour les trois méthodes. L'analyse de la totalité des séquences (200 séquences au total) met en évidence cinq clades principaux bien soutenus à faiblement soutenus ($49 \leq BP \leq 100\%$) (Figure 27), représentant les grandes lignées établies par Hillis-Collinvaux (1980) et revues par Verbruggen (2004) : (I) *Rhipsalis*, (II) *Micronesicae*, (III) *Halimeda*, (IV) *Pseudo-opuntia* et (V) *Opuntia*. Pour plus de clarté, les analyses ont été réalisées séparément pour chaque lignée (Figures 28 à 32).

2.1 Lignée 1 (*Rhipsalis*) :

Les séquences des morphotypes A, B, C et O se regroupent au sein du clade représentant la lignée *Rhipsalis* avec les séquences issues de GenBank pour *H. heteromorpha* N'Yeurt, *H. macroloba* Decaisne, *H. incrassata* (J. Ellis) J.V. Lamouroux, *H. melanesica* Valet, *H. borneensis* W.R. Taylor, *H. cylindracea* Decaisne, *H. monile* (J. Ellis & Solander) J.V. Lamouroux et *H. simulans* M.A. Howe, espèces classées par Hillis-Collinvaux (1980) et/ou Verbruggen (2004), (Figure 28). Quatre sous-clades se distinguent:

- Sous-clade (i) robuste (BP $\geq 80\%$) regroupant les séquences disponibles pour *H. heteromorpha*, *H. macroloba*, *H. incrassata*, ainsi que celles des morphotypes B, C et O,
- Sous-clade (ii) robuste (BP $\geq 99\%$) regroupant les séquences disponibles pour *H. cylindracea* et des séquences du morphotype A,
- Sous-clade (iii) robuste (BP $\geq 98\%$) groupant les séquences disponibles pour *H. monile*, *H. simulans*, *H. incrassata* et des séquences du morphotype A,

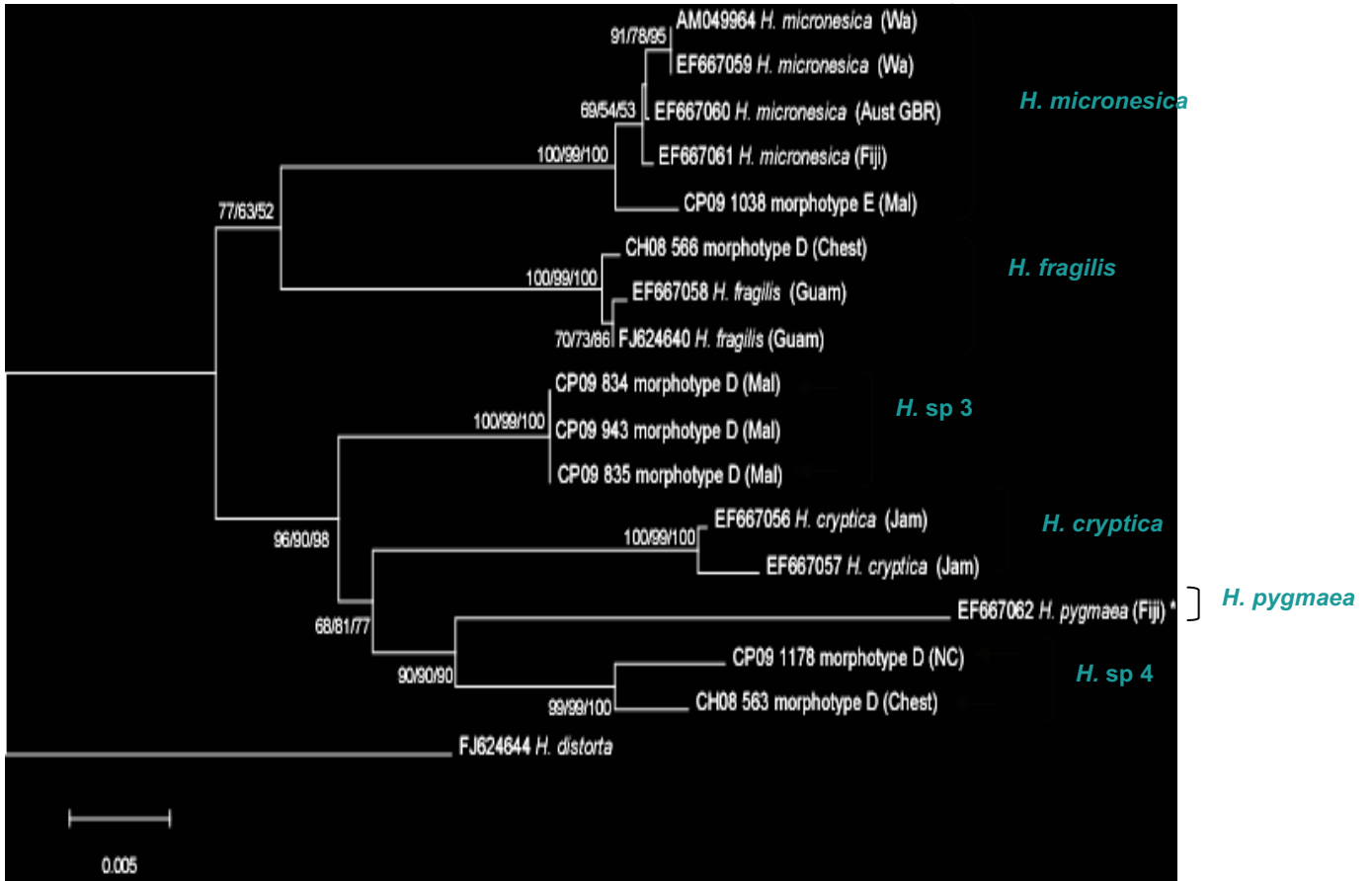


Figure 29. Arbre phylogénétique de la lignée *Micronesicae* (L2) issu de l'analyse NJ des alignements de séquences *tufA*. Les valeurs de bootstrap (BP > 50%) sont indiquées pour les analyses NJ/MP/ML. Racine : *Halimeda distorta*. Les localités sont notées comme suit, Wa : Wallis, Aust GBR : Australie Grande Barrière de Corail, Mal : Maldives, Chest : Chesterfield, NC : Nouvelle-Calédonie. Les astérisques indiquent les localités types et les flèches pointent des regroupements inattendus.

- Sous-clade (iv) robuste (BP \geq 81%) regroupant les séquences disponibles pour *H. borneensis* et des séquences du morphotype B.

Au sein du sous-clade (i), les séquences d'individus classés dans le morphotype C forment un groupe bien à fortement soutenu avec les séquences de *H. macroloba* ($74 \leq \text{BP} \leq 96\%$). Le morphotype B (dont tous les individus sont originaires de la Nouvelle-Calédonie) apparaît polyphylétique : deux séquences d'individus (sous-groupe 1) se regroupent avec les séquences disponibles pour *H. incrassata* d'Hawaï alors que deux autres séquences (sous-groupe 2) forment un groupe, différent du premier, avec des séquences de *H. borneensis* de la Polynésie française. De même pour le morphotype A, deux séquences se regroupent avec celles de *H. cylindracea* (ii) et une séquence avec le sous-clade (iii). On remarque également qu'au sein du sous-clade (iv), deux sous groupes bien soutenus qui incluent d'une part des séquences du morphotype B d'individus de Nouvelle-Calédonie et d'autre part des séquences d'individus de *H. borneensis* provenant de Polynésie française. Au total, 12 séquences provenant d'individus de la Nouvelle-Calédonie sont retrouvées dans ce clade.

2.2 Lignée 2 (*Micronesicae*) :

Les séquences des morphotypes E et D se regroupent au sein du clade représentant la lignée *Micronesicae* avec les séquences issues de GenBank pour *H. micronesica* Yamada, *H. fragilis* W.R. Taylor, *H. cryptica* Conlivaux & E.A. Graham et *H. pygmaea* Verbruggen, D.S. Littler & M.M. Littler (Figure 29).

Les séquences du morphotype E forment un clade robuste (BP \geq 99%) avec les séquences disponibles pour *H. micronesica*. Le morphotype D apparaît polyphylétique avec des séquences réparties dans trois clades différents, tous robustes (BP \geq 99%). Le premier regroupe des séquences de *H. fragilis*, alors que les deux autres regroupent uniquement des séquences du morphotype D. Au total 3 séquences provenant d'individus de la Nouvelle-Calédonie sont retrouvées dans ce clade.

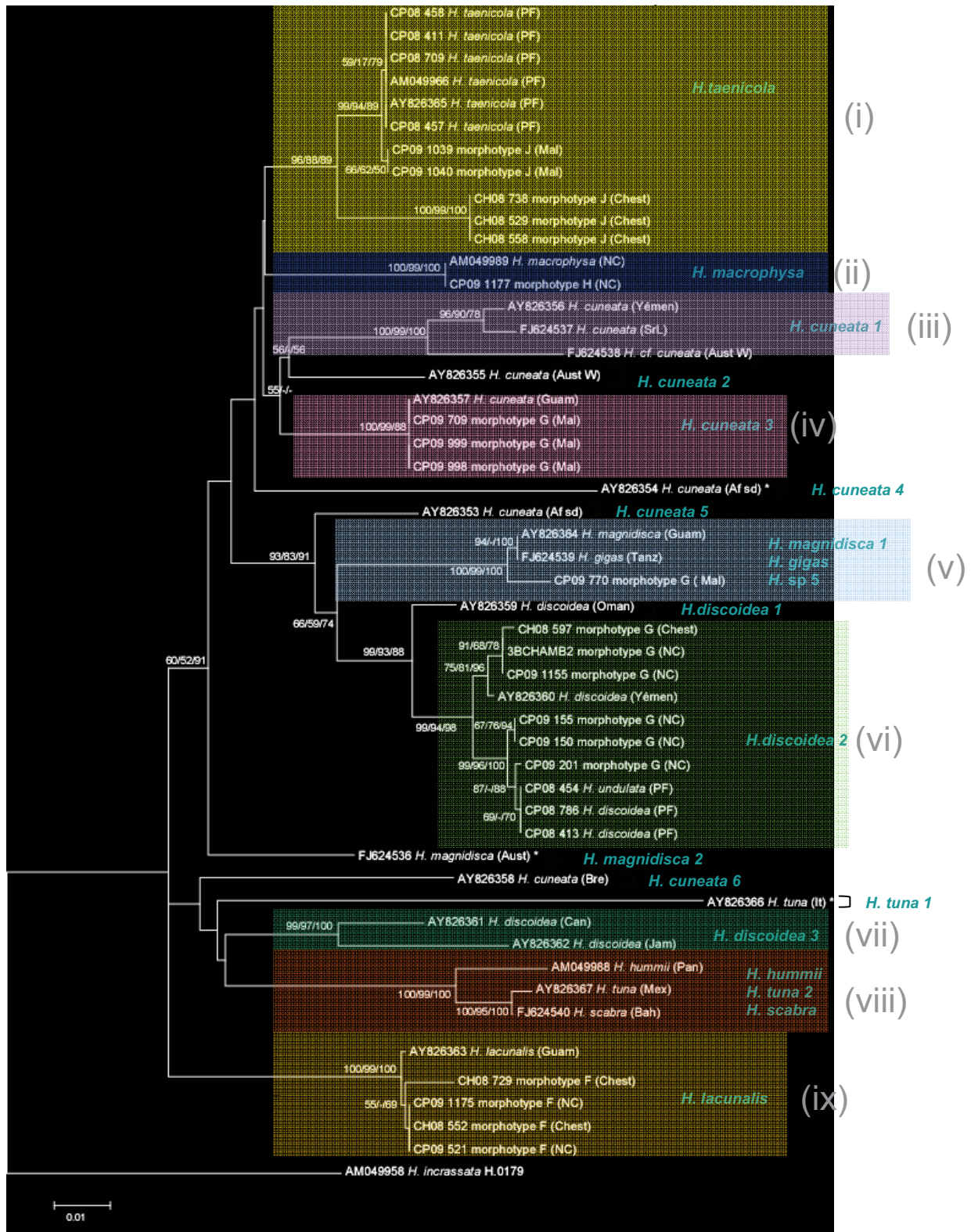


Figure 30. Arbre phylogénétique de la lignée *Halimeda* (L3) issu de l'analyse NJ des alignements de séquences *tufA*. Les valeurs de bootstrap (BP > 50%) sont indiquées pour les analyses NJ/MP/ML. Racine : *Halimeda incrassata*. Les sous-clades sont différenciés par un cadre de couleur. Les localités sont notées comme suit, PF : Polynésie française, Mal : Maldives, Chest : Chesterfield, NC : Nouvelle-Calédonie, Ye : Yemen, SrL : Sri Lanka, Aust W : Ouest de l'Australie, Af sd : Afrique du Sud, Tanz : Tanzanie, Bre : Brésil, It : Italie, Can : Canaries, Jam : Jamaïque, Pan : Panama, Mex : Mexique, Bah : Bahamas. Les astérisques indiquent les localités types et les flèches pointent des regroupements inattendus

2.3 Lignée 3 (*Halimeda*) :

Les séquences des morphotypes J, H, G et F se regroupent dans ce clade représentant la lignée *Halimeda* avec les séquences issues de GenBank pour *H. discoidea* Decaisne, *H. taenicola* W.R. Taylor, *H. cuneata* K. Hering , *H. macrophysa* Askenasy, *H. magnidisca* J.M. Noble, *H. gigas* W.R. Taylor, *H. lacunalis* W.R. Taylor , *H. tuna* (J. Ellis & Solander) J.V. Lamouroux , *H. hummii* D.L. Ballantine et *H. scabra* M.A. Howe (Figure 30). Neuf sous-clades bien soutenus se distinguent dans cette lignée :

- Sous-clade (i) robuste (BP \geq 89%) regroupant les séquences disponibles pour *H. taenicola* avec celles du morphotype J,
- Sous-clade (ii) robuste (BP \geq 99%) composé des séquences de *H. macrophysa* et du morphotype H,
- Sous-clade (iii) robuste (BP \geq 99%) composé de séquences de *H. cuneata*,
- Sous-clade (iv) moyennement soutenu à robuste ($68 \leq$ BP \leq 100%) composé de séquences de *H. cuneata* et de séquences du morphotype G,
- Sous-clade (v) robuste (BP \geq 99%) composé des séquences de *H. magnidisca*, *H. gigas* et de séquences du morphotype G,
- Sous-clade (vi) robuste (BP \geq 86%) composé des séquences de *H. discoidea* et de séquences du morphotypes G,
- Sous-clade (vii) robuste (BP \geq 97%) composé de séquences de *H. discoidea*,
- Sous-clade (viii) robuste (BP \geq 99%) composé de séquences de *H. hummii*, *H. tuna* et *H. scabra*,
- Sous-clade (ix) robuste (BP \geq 99%) composé des séquences de *H. lacunalis* et du morphotype F.

H. cuneata apparaît polyphylétique, ainsi que *H. magnidisca*, *H. discoidea* et *H. tuna*. Les séquences du morphotype G apparaissent dans des sous-clades distincts, montrant également son caractère polyphylétique. Quatorze séquences issues d'individus de Nouvelle-Calédonie sont retrouvées dans ce clade.

Figure 31. Arbre phylogénétique de la lignée *Pseudo-Opuntiae* (L4) issu de l'analyse NJ des alignements de séquences *tufA*. Les valeurs de bootstrap (BP > 50%) sont indiquées pour les analyses NJ/MP/ML. Racine : *Halimeda macrophysa*. Les localités sont notées comme suit, Mal : Maldives, SrL : Sri Lanka, Ha : Hawaii, Chest : Chesterfield, PF : Polynésie Française, Aust W : Ouest Australie, Tanz : Tanzanie, Flo : Floride, Jam : Jamaïque, Bah : Bahamas. Les astérisques indiquent les localités types.

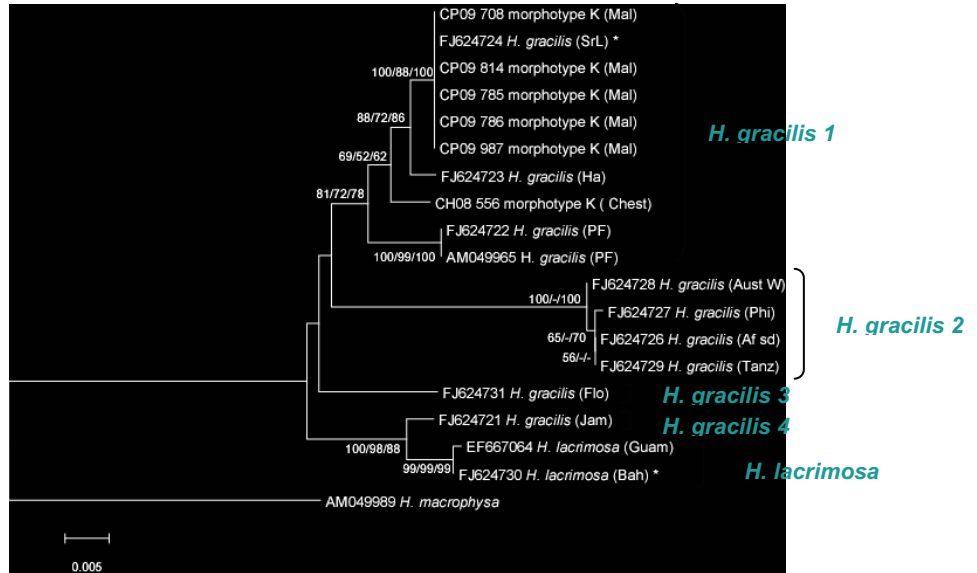
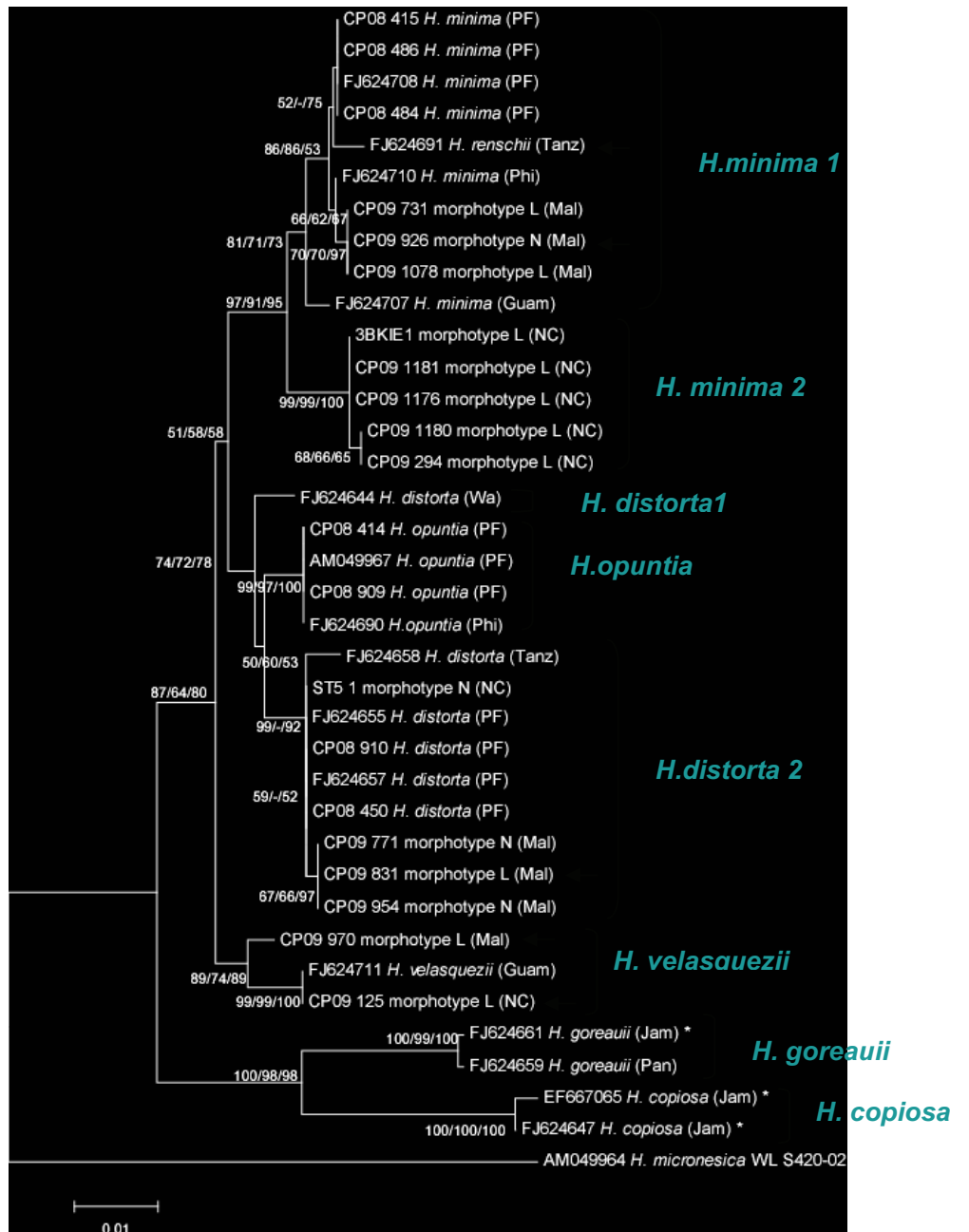


Figure 32. Arbre phylogénétique de la lignée *Opuntiae* (L5) issu de l'analyse NJ des alignements de séquences *tufA*. Les valeurs de bootstrap (BP > 50%) sont indiquées pour les analyses NJ/MP/ML. Racine : *Halimeda micronesica*. Les localités sont notées comme suit, PF : Polynésie française, Tanz : Tanzanie, Mal : Maldives, NC : Nouvelle Calédonie, Wa : Wallis, Jam : Jamaïque, Pan : Panama. Les astérisques indiquent les localités types et les flèches pointent des regroupements inattendus.



2.4 Lignée 4 (*Pseudo-opuntia*):

Les séquences du morphotype K se regroupent au sein du clade représentant la lignée *Pseudo-opuntia* avec les séquences issues de GenBank de *H. gracilis* Harvey ex J. Agardh et *H. lacrimosa* M.A. Howe (Figure 31). Les séquences du morphotype K forment un sous-clade bien soutenu ($72 \leq \text{BP} \leq 81\%$) avec les séquences de *H. gracilis*. Une séquence d'un individu de Nouvelle-Calédonie est retrouvée dans ce clade.

2.5 Lignée 5 (*Opuntia*):

Les séquences des morphotypes L, M et N se regroupent au sein du clade représentant la lignée *Opuntia* avec les séquences issues de GenBank pour *H. renschii* Hauck, *H. minima* (W.R. Taylor) Hillis-Colinvaux, *H. distorta* (Yamada) Hillis-Colinvaux, *H. opuntia* (Linnaeus) J.V. Lamouroux, *H. velasquezii* W.R. Taylor, *H. copiosa* Goreau & E.A. Graham et *H. goreauii* W.R. Taylor (Figure 32).

Les séquences de *H. minima* et *H. renschii* forment un sous-clade robuste ($\text{BP} \geq 91\%$) incluant les morphotypes L et N. Au sein de ce sous-clade, les séquences se regroupent de façon moyennement soutenue à robuste ($52 \leq \text{BP} \leq 100\%$) par région géographique (Polynésie française, Océan Indien, Philippines, Tanzanie et Nouvelle-Calédonie). *Halimeda distorta* apparaît polyphylétique, une séquence est présente seule, et 5 autres séquences forment un sous-clade distinct avec une séquence du morphotype L et 3 séquences du morphotype N. Les séquences d'*H. opuntia* forment un sous-clade monophylétique robuste ($\text{BP} \geq 97\%$). Les séquences de *H. velasquezii* se regroupent avec deux séquences du morphotype L. Enfin, les séquences de *H. copiosa* et de *H. goreauii* forment chacune deux sous-clades robustes ($\text{BP} \geq 99\%$). Au total, 7 séquences provenant d'individus de Nouvelle-Calédonie sont retrouvées dans ce clade.

III. Discussion

1. Pertinence des caractères morphologiques étudiés.

Parmi les neuf caractères morphologiques étudiés ici, certains se sont révélés être très polymorphes au sein d'une même espèce (par exemple la forme des segments ou l'aspect général du thalle) et ne sont pas pertinents pour discriminer les espèces. De plus, certains caractères tels que la présence d'un bulbe ont été retrouvés dans plusieurs lignées (L1 et L3), l'acquisition de ce caractère semble donc secondaire, en réponse à une adaptation spécifique au milieu (fonds meubles et/ou vaseux). Cette observation avait déjà été faite dans les études précédentes du genre, notamment par Verbruggen et Kooistra (2004). Ainsi, la morphologie externe, même si elle permet un premier travail de classement des individus en groupes morphologiques, elle ne permet l'identification au niveau spécifique que dans de très rares cas.

Les caractères anatomiques sont les plus solides et les plus fiables pour identifier les espèces. Le type de fusion nodale, la taille et la forme des utricules n'étant pas influencés par le milieu, sont les critères principaux à considérer pour une identification morphologique. Cette dernière peut être consolidée par une analyse morphométrique des segments (Verbruggen et al., 2005).

2. Phylogénie générale

Cinq clades bien soutenus et correspondant aux lignées *Rhipsalis*, *Micronesicae*, *Halimeda*, *Pseudo-Opuntia* et *Opuntia* ont été obtenus, confirmant ainsi la classification proposée par Hillis-Colinvaux (1980) et reprise par Verbruggen et collaborateurs (2004). Le marqueur *tufA* permet une bonne distinction entre les différents clades.

La position des lignées dans la présente étude ne peut être discutée car la position de certains clades dans l'arbre phylogénétique est mal soutenue. Pour mémoire, Kooistra et ses collaborateurs (2002) montraient que la lignée *Rhipsalis* (L1) est la plus ancienne, suivies des lignées *Micronesicae* (L2), *Halimeda* (L3), *Pseudo-Opuntia* (L4) ; la lignée *Opuntia* (L5) étant la plus récente dans l'histoire évolutive du genre.

3. Analyse phylogénétique par lignée et implications taxonomiques.

3.1 Lignée 1 *Rhipsalis*

La lignée 1 regroupe 8 espèces dont *H. cylindracea*, *H. borneensis* et *H. macroloba*, qui correspondent respectivement aux morphotypes A, B (sous-groupe 2) et C. On note que les autres individus du morphotype B (sous-groupe 1) constitués d'individus de Nouvelle-Calédonie (CP10 010 et CP10 011), se regroupent (BP = 70% NJ) avec une séquence de GenBank identifiée comme *H. incrassata* de Hawaii (Verbruggen, 2005). Cependant, le statut polyphylétique du taxon *H. incrassata* a été résolu dans la révision de Verbruggen et ses collaborateurs (2006), et la séquence doit être considérée comme celle de la nouvelle espèce *H. kanaloana* décrite de Hawaii, *H. incrassata* étant confirmée comme une espèce exclusivement Caraïbes. Un réexamen des individus CP10 010 et CP10 011, montre une anatomie très comparable à celle de *H. kanaloana*, notamment par la forme et la taille de leurs utricules. La présence de *H. kanaloana* en Nouvelle-Calédonie n'est pas à exclure puisque Verbruggen et ses collaborateurs (2006) indiquent avoir étudié un spécimen du Japon (identifié comme *H. incrassata*) et qui pourrait être *H. kanaloana*. La présence de cette espèce en Nouvelle-Calédonie devra être confirmée par d'autres observations et analyses et à ce stade ces spécimens sont regroupés dans le sous-clade nommé *H.sp1*.

Le sous-clade (iii) formé de *H. incrassata*, *H. simulans* et *H. monile* comprend une séquence d'un individu assigné au morphotype A (CP09 205). Ici les données ADN nous permettent de séparer cet individu des autres du morphotype A, et après réexamen les caractères anatomiques le rapprochent de *H. monile*. La présence de cette espèce en Nouvelle-Calédonie devra être confirmée par l'observation d'autres spécimens, ainsi il sera nommé *H. sp 2*. Il est à noter que *H. monile* a été signalé dans le Pacifique en Micronésie (Lobban & Tsuda 2003), aux îles Marshall (Taylor 1950), en Mer rouge et Arabie Saoudite par Papenfuss (1968) mais cependant d'après Verbruggen et collaborateurs (2005 a), il s'agirait de mauvaises identifications, *H. monile* étant une espèce strictement atlantique dans son étude. On pourrait ainsi supposer l'existence d'une espèce-sœur de *H. monile* dans le Pacifique.

3.2 Lignée 2 *Micronesicae*

La lignée 2 regroupe 4 espèces comme décrit par Hillis-Colinvaux (1980) puis confirmé par Verbruggen et collaborateurs (2004) : *H. micronesica*, *H. fragilis*, *H. cryptica* et *H. pygmae*, dont les deux premières correspondent respectivement aux morphotypes E et D (*H. cryptica* et *H. pygmae* n'ayant pas été observées au cours de cette étude). Le morphotype D regroupe plusieurs spécimens et apparaît polyphylétique ; seul un individu des Chesterfield peut être identifié à *H. fragilis* (CH08 566). Les autres individus assignés à ce morphotype se répartissent entre deux autres sous-clades bien distincts nommés *H.sp 3* et *H.sp 4* et qui contiennent respectivement des individus des Maldives et des individus de la Grande Terre (Nouvelle-Calédonie) et des Chesterfield.

Les données sont insuffisantes pour décider de la position taxonomique de ces deux sous-clades. Un rapprochement à des taxons déjà décrits n'est pas possible ici. Des observations supplémentaires et d'autres marqueurs sont nécessaires avant de décider s'il s'agit d'espèces nouvelles pour la science.

3.3 Lignée 3 *Halimeda*

La lignée 3 comprend 11 espèces dont 3 monophylétiques (*H. taenicola*, *H. macrophysa* et *H. lacunalis*) qui correspondent respectivement aux morphotypes J, H, et F et 8 taxons polyphylétiques comme par exemple *H. cuneata* et *H. discoidea* déjà discuté par Kooistra et collaborateurs (2002) et Verbruggen et collaborateurs (2005), et *H. magnidisca*. Le morphotype G, polyphylétique, peut être identifié à deux espèces, *H. discoidea* (2) et *H. cuneata*. En réalité, la description faite ici du morphotype G se rapproche de la description de *H. discoidea* faite par Hillis-Colinvaux, les individus se regroupant avec *H. cuneata* ayant été mal identifiés (après réexamen, les utricules secondaires de ces trois individus se sont révélés être différents de la description de *H. discoidea*). Un individu de ce même morphotype reste cependant indéterminé (CP09 770), il se regroupe en effet avec deux séquences de GenBank assignées à *H. gigas* de Tanzanie et *H. magnidisca 1* de Guam. les identifications de ces deux espèces sont douteuses, tout au moins pour *H. magnidisca 1*. En effet, *H. magnidisca* apparaît polyphylétique la séquence notée *H. magnidisca 2* est celle de l'échantillon provenant de l'Australie qui est la localité type cette espèce. Dans le cadre de notre étude il n'est pas possible d'identifier l'individu CP09 770. d'autres observations sont nécessaires pour décider de son identité, il est reporté ici *H. sp5*.

3.4 Lignée 4 *Pseudo Opuntia*

La lignée 4 comprend uniquement 2 espèces : *H. gracilis*, qui correspond au morphotype K et *H. lacrimosa* qui ne correspond à aucun de nos morphotypes. Plusieurs sous-clades apparaissent dans cette lignée, ainsi on observe 4 groupes de *H. gracilis* qui pourraient correspondre à des entités taxonomiques distinctes. *Halimeda gracilis* ayant été décrite au Sri Lanka le sous-clade qui renferme le spécimen de cette localité peut être assigné à *H. gracilis*. On y retrouve nos échantillons des Maldives et celui des Chesterfield, les autres sous-clades pourraient correspondre à des taxons différents.

3.5 Lignée 5 *Opuntia*

La lignée 5 regroupe 6 espèces dont 2 polyphylétiques, à savoir *H. minima* et *H. distorta*. Huit sous-clades bien soutenus se distinguent. Les morphotypes L et N s'insèrent dans ces sous-clades, et peuvent être identifiés à *H. minima* et *H. distorta* respectivement.

H. minima se divise en deux sous-clades bien soutenus. Le premier sous-clade regroupe uniquement des individus du morphotype L de Nouvelle-Calédonie (*H. minima* 2), alors que le second regroupe des séquences de *H. minima* et des morphotypes L et N mais aussi une séquence de *H. renschii*. La séquence de *H. renschii* dont nous disposons n'étant pas celle de la localité-type (qui est les Comores), celle-ci pourrait être l'objet d'une mauvaise identification. D'après Kooistra et Verbruggen (2005), le clade correspondant à *H. minima* serait en réalité composé d'au moins deux espèces, mais celles-ci n'ont pas été identifiées à ce jour. Des études complémentaires sont nécessaires pour élucider la position de *H. renschii* et sa relation avec *H. minima*.

Enfin, deux individus de Nouvelle-Calédonie classés dans le morphotype L se regroupent avec *H. velasquezii* ; après réexamen morphologique, ces deux individus possèdent une taille d'utricules qui correspond à la description de *H. velasquezii*, ce qui nous permet de les identifier *a posteriori* à cette espèce.

4. L'apport de l'analyse ADN dans l'identification des morphotypes et des espèces

De façon générale, les clades des arbres phylogénétiques concordent avec les morphotypes. Pour quelques spécimens mal classés, ou pour lesquels l'assignation à un morphotype était douteuse, les données ADN ont permis de lever les ambiguïtés et dans la plupart des cas, un nouvel examen morphologique a permis de confirmer les résultats de l'analyse moléculaire et établir *a posteriori* l'identification des individus au rang spécifique.

Ainsi, en confrontant les regroupements en morphotypes des spécimens avec le résultat de l'analyse des regroupements obtenus grâce à la taxonomie moléculaire, les morphotypes ont été confirmés et correspondent aux taxons suivants : *H. cylindracea* Decaisne (morphotype A), *H. borneensis* W.R. Taylor (morphotype B), *H. macroloba* Decaisne (morphotype C), *H. heteromorpha* N'Yeurt (morphotype O), *H. fragilis* Taylor (morphotype D), *H. micronesica* Yamada (morphotype E), *H. lacunalis* W.R. Taylor (morphotype F), *H. discoidea* Decaisne (morphotypes G), *H. macrophysa* Askenasy (morphotype H), *H. taenicola* W.R. Taylor (morphotype J), *H. gracilis* Harvey (morphotype K), *H. minima* (W.R. Taylor) Colinvaux (morphotype L), *H. velasquezii* W.R. Taylor (morphotype L bis), *H. opuntia* (Linnaeus) Lamouroux (morphotype M) et *H. distorta* (Yamada) Hillis (morphotype N).

5. Diversité du genre *Halimeda* en Nouvelle-Calédonie

La présente étude a permis d'identifier seize espèces représentant les cinq lignées d'*Halimeda* en Nouvelle-Calédonie. Treize d'entre-elles ont pu être séquencées à partir de la collection de tissus, il s'agit de : *H. borneensis*, *H. cylindracea*, *H. discoidea*, *H. distorta*, *H. fragilis*, *H. gracilis*, *H. heteromorpha*, *H. lacunalis*, *H. macroloba*, *H. macrophysa*, *H. minima*, *H. taenicola* et *H. velasquezii*. En revanche, les trois espèces *H. magnidisca*, *H. micronesica* et *H. opuntia* reconnues sur la base des critères morphologiques n'ont pas pu être séquencées en dépit de plusieurs essais d'extraction et d'amplification. Ces espèces feront l'objet d'analyses complémentaires afin de confronter leurs séquences à celles de la GenBank et de confirmer leur identité grâce à l'outil moléculaire.

De plus, trois nouveaux taxons, dont sans doute l'espèce Hawaïenne *H. kanaloana* (*cf H. sp1*), *H. sp 2* et *H. sp 4* ont été reconnus grâce à l'analyse ADN, révélant une diversité génétique plus grande que la diversité spécifique décrite jusque là pour la Nouvelle-Calédonie. Toutefois, la confirmation de ces taxons devra passer par des observations

supplémentaires mais également par l'utilisation d'autres marqueurs génétiques. Une analyse génétique avec le marqueur *rbcL* a d'ailleurs été initiée au cours de ce stage et les séquences à venir permettront de mieux documenter les présents résultats.

Enfin, plusieurs espèces signalées en Nouvelle-Calédonie comme *H. melanesica*, dont la localité type est la Nouvelle-Calédonie (Lifou, Iles Loyautés), n'a pas pu être incluse à cette étude. Les seuls échantillons en herbiers n'ont pu être séquencés. De même *H. gigas* représenté par plusieurs spécimens en collection n'a pas pu être séquencée ; plusieurs spécimens collectés sous cet épithète se sont révélés être des *H. discoidea*. La présence de ce taxon en Nouvelle-Calédonie est sujette à discussion. De manière générale, l'importante collection déposée à l'IRD n'ayant pas pu être traitée en totalité au cours de ce stage, il conviendrait de réaliser une étude minutieuse et exhaustive du reste de la collection afin de confirmer ou infirmer la présence des espèces non décrites dans cette étude.

Tableau 4. . Affinités biogéographiques des espèces de Nouvelle-Calédonie avec les régions voisines. L'indice de Sorensen a été calculé en divisant le nombre d'espèces communes avec la Nouvelle-Calédonie présentes dans la localité par la somme des espèces présentes au total en Nouvelle-Calédonie et dans la localité. Les références sont données en bibliographie

	Nouvelle-Calédonie (1 et 2)	Maldives (1,3,4)	Wallis (5)	Polynésie française (6)	Hawaii (7)	Norfolk (8)	Samoa (12)	Fidji (9 et 10)	Papouasie Nouvelle Guinée (11)	Guam et Micronésie (13)	Australie (Lord Howe Island & Southern Great Barrier Reef) (14)	Répartition géographique (15)
<i>H.borneensis</i>	x		x	x				x	x			IP
<i>H.cylindracea</i>	x							x	x	x	x	IP
<i>H.discoidea</i>	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	A et IP
<i>H.distorta</i>	x	x	x	x					x	x	x	IP
<i>H.fragilis</i>	x	x						x	x	x	x	IP
<i>H.gigas</i>	x						x	x	x	x		IP
<i>H.gracilis</i>	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	A et IP
<i>H.heteromorpha</i>	x			x							x	IP
<i>H.lacunalis</i>	x			x				x	x	x	x	IP
<i>H.macroloba</i>	x		x	x	x		x	x	x	x	x	IP
<i>H.macrophysa</i>	x						x	x	x	x	x	IP
<i>H.magnidisca</i>	x										x	IP
<i>H.melanesica</i>	x			x				x	x			IP
<i>H.micronesica</i>	x	x	x	x				x	x	x	x	IP
<i>H.minima</i>	x	x	x	x			x	x	x	x	x	IP
<i>H.opuntia</i>	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	A et IP
<i>H.taenicola</i>	x	x	x	x		x		x		x		IP
<i>H.velasquezii</i>	x	x			x					x		IP
<i>H.sp1</i> (cf <i>H. kanaloana</i>)	x				x							P
<i>H.sp2</i>	x											NC
<i>H.sp4</i>	x											NC
<i>H.sp5</i>	x											NC
<i>H.sp6</i>		x										NC
nombre d'espèces par région	22	15	10	13	8	3	9	23	18	22	16	
nombre d'espèces communes avec la Nouvelle-Calédonie		10	8	12	6	2	7	14	14	14	13	
Indice de similarité de Sorensen (β)		0,541	0,500	0,686	0,400	0,160	0,452	0,622	0,700	0,636	0,684	

De même pour les Maldives et la Polynésie française, seules les séquences de 7 espèces pour chaque localité représentant respectivement les lignées 2 à 5 pour les Maldives et 1, 3, 4 et 5 pour la Polynésie française ont pu être analysées ici. Néanmoins, pour les Maldives *H. opuntia*, n'a pu être décrite que sur la base de la morphologie, il faudra confirmer l'identification ultérieurement par analyse génétique. On peut supposer un sous échantillonnage de ces deux localités, les études sur le genre *Halimeda* aux Maldives sont peu nombreuses et ont signalé uniquement 10 espèces (Wynne, 1993), mais en Polynésie française, 12 espèces ont été décrites précédemment par N'Yeurt et Payri en 2006 pour l'ensemble de la Polynésie française, contre sept au cours de ce stage qui n'a concerné que la collection de l'île de Moorea.

6. Distribution géographique

Cette étude a concerné 3 régions de l'Indo-Pacifique, les Maldives pour l'Océan Indien, la Polynésie française et la Nouvelle-Calédonie pour l'Océan Pacifique. Cette dernière région a fait l'objet d'un échantillonnage plus important.

A partir de la littérature disponible on recense un total de trente-sept espèces dans cette zone, avec un maximum d'espèces signalées pour les îles Fidji (23 espèces). Le genre *Halimeda* semble être bien présent dans toutes les localités, aussi bien à l'est (Hawaii) qu'à l'ouest du Pacifique mais également aux Maldives (10 espèces). La plupart des espèces se retrouvent dans les onze localités retenues dans le cadre de cette étude (tableau 4), mais on note toutefois que certaines espèces sont restreintes à une seule localité, qui se trouve être leur localité-type : *H. cereidesmis* et *H. howensis* (Lord Howe Island) et *H. pygmaea* (Fidji). *H. monile*, qui n'a été recensée que sur l'île de Guam, pourrait cependant voir sa répartition étendue à la Nouvelle-Calédonie grâce aux données qu'apportent cette étude, mais cela reste à confirmer. De même *H. pygmaea* est vraisemblablement plus largement répandue mais la petitesse du thalle (quelques millimètres de hauteur), rend les prélèvements difficiles. La localité la plus « pauvre » pour le genre serait Norfolk avec seulement 3 espèces recensées. Ceci peut s'expliquer par une diversité en habitats plus faible, notamment l'absence de formations coralliennes et lagunaires. Malgré tout, l'effort d'échantillonnage n'a sans doute pas été le même dans chacune des localités retenues dans cette étude ; les comparaisons doivent se faire avec prudence en évitant des conclusions hâtives.

Néanmoins, il nous a semblé intéressant de mener ce travail comparatif et le tableau 4 présente la flore des *Halimeda* recensée en Nouvelle-Calédonie, à la fois par la littérature et par la présente étude, ainsi que les affinités de celle-ci avec certaines localités de l'Indo-Pacifique pour lesquelles plusieurs études phycologiques ont été menées. La richesse en nombre d'espèces en Nouvelle-Calédonie est comparable à celle des Fidji et de Micronésie avec 22, et 23 espèces (Tableau 4).

La Nouvelle-Calédonie possède une majorité d'espèces appartenant à la grande province biogéographie Indo-Pacifique Ouest (Kooistra et al. 2002) avec un maximum de similarité avec la Papouasie-Nouvelle-Guinée (0,7), l'Australie (0.684) et la Polynésie française (0.686) Toutes les espèces de Polynésie française sont présentes en Nouvelle-Calédonie et on retrouve avec l'exemple des *Halimeda* le gradient d'appauvrissement en espèces d'ouest en est dans le Pacifique. La forte similarité avec la Papouasie-Nouvelle-Guinée confirme les fortes affinités avec cette région et l'origine probable des espèces de cette zone considérée comme le triangle d'or de la biodiversité et comme le foyer de dispersion des faunes et des flores de l'Indo-Pacifique (Keppel et al. 2009). Le plus faible nombre d'espèces trouvé en Papouasie-Nouvelle-Guinée tient sans doute au fait que cette région est sous étudiée en raison des difficultés d'accès.

Seules *H. discoidea*, *H. gracilis* et *H. opuntia*, sont considérées comme des espèces à la fois Atlantique et Indo-Pacifique. Cependant, *H. opuntia* est la seule espèce à former une lignée unique pantropicale, contrairement aux autres espèces qui présentent différents clades suivant les localités où elles ont été observées, formant ainsi une distinction nette entre Atlantique et Indo-Pacifique (Verbruggen 2009). Cette divergence entre Atlantique et Indo-Pacifique serait le résultat d'une faible dispersion entre les deux bassins océaniques, dû à la frontière naturelle formée par le continent Américain d'une part et Africain d'autre part. Une seule espèce, potentiellement présente en Nouvelle-Calédonie, pourrait être exclusivement pacifique, à savoir *H. kanaloana*, celle-ci n'ayant été décrite aux îles Hawaii et serait présente au Japon. Des études morphologiques et ADN complémentaires pourraient permettre de statuer sur sa répartition.

Avant de conclure sur la présence d'espèces endémiques à la Nouvelle-Calédonie, il conviendrait d'étudier plus en détail les spécimens qui n'ont pas pu être assignés à des espèces décrites.

La distribution géographique présentée ici s'appuie sur des études bibliographiques, dont la plupart sont basées sur des études morphologiques uniquement, il conviendrait d'étudier plus en détail les compositions spécifiques du genre *Halimeda* de ces différentes localités et d'élargir les comparaisons à d'autres régions comme le Japon avec lesquels la Nouvelle-Calédonie partage un grand nombre d'espèces dans d'autres groupes biologiques. Les méthodes d'analyse ADN sur les collections d'herbier doivent être revues afin de réaliser des analyses complémentaires sur les différentes collections, voire sur de nouvelles collections pour certaines localités.

IV. Conclusions et perspectives

L'étude d'une importante collection de spécimens (86), réalisée à l'échelle de la Nouvelle-Calédonie, avec une approche combinant étude morpho-anatomique et analyses ADN a permis de mettre en évidence une diversité spécifique du genre *Halimeda* élevée, avec 22 taxons dont 4 qui n'avaient pas été signalés jusqu'ici et qui s'avéreront peut être de nouvelles espèces pour la science.

Les bons résultats obtenus pour le marqueur *tufA* ont permis d'utiliser les nombreuses séquences disponibles sur la GenBank et de conforter ou revoir certaines identifications taxonomiques avec celles obtenues précédemment par Payri (2007). L'absence de résultat pour le marqueur UCP7 s'explique par les nombreuses difficultés rencontrées lors de l'amplification de cette région. D'autres travaux sont nécessaires pour surmonter ces échecs techniques et adapter le protocole. De plus, les résultats du séquençage avec le marqueur *rbcL* sont encore à venir, et leur analyse permettra de compléter cette étude et notamment de mieux documenter les espèces non identifiées.

Compte tenu de la richesse de la collection déposée à l'IRD, il serait judicieux de travailler à améliorer le protocole d'extraction et d'amplification d'ADN à partir de tissus secs. Cette démarche permettrait de réviser et de valider les identifications établies par la seule approche morphologique pour des spécimens d'herbiers, d'affiner l'analyse de la diversité du genre en Nouvelle-Calédonie et de mieux établir les distributions à l'échelle de la Nouvelle-Calédonie et les affinités biogéographiques. De plus, l'analyse de l'ensemble de la collection, qui comprend des échantillons de toute la Nouvelle-Calédonie, permettrait une

étude intra-territoriale. En effet, étant donné l'étendue du territoire, on peut supposer retrouver une diversité différente dans les localités. Par exemple, les plateaux des Chesterfield et des Surprises, composés d'atoll pourraient abriter des espèces différentes par rapport à l'île des Pins, qui est soumise à un climat plus doux.

V. Bibliographie

- Abbott, I.A., Huisman, J.M., 2004. Marine green and brown algae of the Hawaiian islands. Bishop Museum Press, Hawai'i, pp. 130-136. (7)
- Andréfouët, S., Muller-Karger, F.E., Robinson, J.A., Kranenburg, C.J., Torres-Pulliza, D., Spraggins, S.A., Murch, B., 2007. Global assessment of modern coral reef extent and diversity for regional science and management applications: a view from space. 10th International Coral Reef Symposium.
- Coppejans, E., Leliaert, F., Dargent, O., De Clerck, O., 2001. Marine green algae (Chlorophyta) from the north coast of Papua New Guinea. *Cryptogamie, Algologie*. 22: 375-443. (11)
- Famà, 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. *Journal of Phycology*. 38, 1040–1050.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence-limits on phylogenies – An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783-791.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696-704.
- Hillis-Colinvaux, L.W., 1980. Ecology and taxonomy of *Halimeda*: primary producer of coral reefs. *Advances in Marine Biology*. 17, 1–327.
- Hillis, L.W., Engman, J.A., Kooistra, W.H.C.F., 1998. Morphological and molecular phylogenies of *Halimeda* (Chlorophyta, Bryopsidales) identify three evolutionary lineages. *Journal of Phycology*. 34, 669–681
- Keppel, G., Lowe, A.J., Possingham, H.P., 2009. Changing perspectives on the biogeography of the tropical South Pacific: influences of dispersal, vicariance and extinction. *Journal of Biogeography*, 36, 1035-1054.
- Kooistra, W., Coppejans, E.G.G., Payri, C., 2002. Molecular systematics, historical ecology, and phylogeography of *Halimeda* (Bryopsidales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 24, 121–138.
- Kooistra, W.H.C.F., Verbruggen, H., 2005. Genetic patterns in the calcified tropical seaweeds *Halimeda opuntia*, *H. distorta*, *H. hederacea* and *H. minima* (Bryopsidales, Chlorophyta) provide insights in species boundaries and interoceanic dispersal. *Journal of Phycology*, 41: 177–187.
- Kraft, G.T., 2007. *Algae of Australia: Marine Benthic Algae of Lord Howe Island and the Southern Great Barrier Reef, 1: Green Algae*. ABRS, Canberra; CSIRO Publishing, Melbourne, pp. 189-221.
- Lam, D.W., Zechman, F.W., 2006. Phylogenetic analyses of the Bryopsidales (Ulvophyceae, Chlorophyta) based on Rubisco large subunit gene sequences. *Journal of Phycology*. 42, 669–678.
- Lobban, C. S., Tsuda, R. T., 2003. Revised checklist of benthic marine macroalgae and seagrasses of Guam and Micronesia. *Micronesica*. 35-36: 54-99. (13)
- Meinesz, A., 1980. Connaissances actuelles et contribution à l'étude de la reproduction et du cycle des Udoteacees (Caulerpales, Chlorophytes). *Phycologia*. 19, 110–138.

- Millar, A. J. K., 1999. Marine benthic algae of Norfolk Island, South Pacific. *Australian Systematic Botany*, 12: 479-547 (8)
- N'Yeurt, A. D. R., G. R. South, 1996. A revised checklist of the benthic marine algae of the Fiji Islands, South Pacific (including the island of Rotuma). *Micronesica* 29: 49-98 (9)
- N'Yeurt, A. D. R., South, G. R., Keats, D.W., 1996. A revised checklist of the benthic marine algae of the Fiji Islands, South Pacific (including the island of Rotuma). *Micronesica*, 29: 49-98.
- N'Yeurt, A. D. R., 2001. Marine algae from the Suva Lagoon and reef, Fiji, *Australian Systematic Botany* 14, 689-869. (10)
- N'Yeurt, A.D.R., Payri, C., 2004. A preliminary annotated checklist of the marine algae and seagrasses of the Wallis Islands (French Overseas Territory of Wallis and Futuna), South Pacific. *Australian Systematic Botany*, 17, 367-397. (5)
- Papenfuss, G. F., 1968. A history, catalogue, and bibliography of Red Sea benthic algae. *Israel Journal of Botany*, 17: 1-118.
- Payri, C., 2007. Revised Checklist of marine algae (Chlorophyta, Rhodophyta and Ocrophyta) and seagrasses (Marine Angiosperma) of New Caledonia. In: Payri, C., Richer De Forges, B. (Eds.), 2007. *Compendium of marine species from New Caledonia*. pp: 95-112.
- Provan, J., Murphy, S., Maggs, C.A., 2004. Universal plastid primers for Chlorophyta and Rhodophyta. *European Journal of Phycology*. 39, 43–50.
- Roberts, C. M., McClean, C. J., Veron, J.E.N., Hawkins J.P., Allen, G.R., McAllister D.E., Mittermeier, C.G., Schueler, F.W., Spalding, M., Wells, F., Vynne, C., Werner, T.B., 2002. Marine Biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science*, 295: 1281-1284
- Skelton, P. A. and G. R. South, 2002. Annotated catalogue of the benthic marine algae of the Palolo Deep National Marine Reserve of Samoa. *Australian Systematic Botany* 15: 135-179
- Skelton, P. A. and G. R. South (2004). "New records and notes on marine benthic algae of American Samoa - Chlorophyta & Phaeophyta." *Cryptogamie, Algologie* 25(3): 291-312 (12)
- Tamura, K.D.J, Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analyses (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Taylor, W.R., 1950. *Plants of Bikini and other northern Marshall Islands*. Algae: Chlorophyceae. University of Michigan Press, Ann Arbor, MI. 218 pp.
- Verbruggen, H., Kooistra, W., 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., 2005. Morphometric taxonomy of siphonous green algae: a methodological study within the genus *Halimeda* (Bryopsidales). *Journal of Phycology*, 41: 126–139.
- Verbruggen, H., De Clerck, O., Kooistra, W. & Coppejans, E., 2005. Molecular and morphometric data pinpoint species boundaries in *Halimeda* section *Rhipsalis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Journal of Phycology*. 41, 606–621.

Verbruggen, H., De Clerck, O., Schils, T., Kooistra, W. & Coppejans, E., 2005. Evolution and phylogeography of *Halimeda* section *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37, 789–803.

Verbruggen, H., De Clerck, O., N'Yeurt, A., Spalding, H., Vroom, P.S., 2006. Phylogeny and taxonomy of *Halimeda* *incrassata*, including descriptions of *H.kanaloana* and *H. heteromorpha* spp. Nov. (Bryopsidales, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*. 41, 337-362.

Verbruggen, H., Tyberghein, L., Pauly, K., Vlaeminck, C., Van Nieuwenhuyze, K., Kooistra, W.H.C.F, Leliaert F., De Clerck, O., 2009. Macroecology meets macroevolution: evolutionary niche dynamics in the seaweed *Halimeda*. *Global Ecology and Biogeography*. 18, 393-405.

Verbruggen, H., Ashworth, M., LoDuca, S.T., Vlaeminck, C., Cocquyt, E., Sauvage, T., Zechman, F.W., Littler, D.S., Littler, M.M., Leliaert, F. & De Clerck, O., 2009. A multi-locus time calibrated phylogeny of the siphonous green algae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 50, 642–653.

Wynne, M. J., 1993. Benthic marine algae from the Maldives, Indian Ocean, collected during the R/V Te Vega Expedition. *Contributions from the University of Michigan Herbarium*, 19: 5-30. (4)

VI. Annexes

Annexe.1 Méthodes d'analyses phylogénétiques

- **la méthode des distances** avec la construction d'un arbre selon la méthode **Neighbor Joining (NJ)** ou méthode du plus proche voisin (Saitou et Nei, 1987). Cette méthode consiste à établir une matrice de distance entre chaque paire de séquences et de construire un arbre phylogénétique à partir de cette matrice en respectant le principe de parcimonie. Les paires de séquences d'unité taxonomique sont regroupées successivement selon leur similarité pour obtenir l'arbre phylogénétique le plus parcimonieux.
- **La méthode de parcimonie** (MP, Maximum Parsimony method) permet la construction de l'arbre évolutif le plus court. La méthode prend en compte les évènements mutationnels (substitution, insertion/délétion) survenus sur les sites dits informatifs. Un site est dit informatif si pour la position considérée il existe au moins deux nucléotides différents et que chacun d'eux est présent au moins une fois. Les cladogrammes sont alors construits avec des longueurs de branches correspondant à la somme d'évènements mutationnels pour un site donné. L'arbre choisi est le plus court, soit celui qui nécessite le moins de changements.
- **La méthode du maximum de vraisemblance** (ML, Maximum Likelihood) qui consiste à construire un arbre phylogénétique dont l'ordre des branchements et les longueurs des branches optimales sont estimés et dont la vraisemblance est calculée, étant donné les séquences nucléotidiques et le modèle d'évolution choisi. Le modèle d'évolution est déterminé grâce au logiciel FindModel

Annexe 2 : Tableau des caractères morphologiques des différents morphotypes

	Morphotypes			
	A	B	C	D
Type d'attache au substrat	bulbe	bulbe	bulbe	une seule attache (amas de rhizoïdes c)
Aspect général du thalle	dressé	dressé	dressé	compact, buissonnant
Forme des segments en position basale	pseudo-stipe avec un branchement	très développé, épais, donnant lieu à plusieurs ramifications (forme de main)	épais, pseudo-stipe avec un branchement	un segment central plus ou moins plat d'où partent des ramifications à 360°
Forme générale des segments en position apicale (L : longueur, l : largeur)	cylindriques, plus ou moins longs et assez polymorphes (trilobés ou non)	segments plats trilobés	segments larges L = 0.8 à 1 cm l = 2 à 3 cm réniformes	segments petits L = 0.6 à 0.8 cm l = 0.8 à 1.2 cm plats, réniformes
Noeud	fusion partielle avec pores	fusion partielle avec pores	fusion partielle avec pores	pas de fusion, nombreuses ramifications après le noeud peu de siphons nodaux
Nombre d'étages ou de couches d'utricules	3 à 5	3 ou plus	3 à 4	2 à 3
Forme des utricules périphériques en coupe transversale (L : longueur, l : largeur)	utricules 1 : obconiques L1 : 25 à 60 l1 : 20 à 45 µm L2 : 20 à 40 µm l2 : 17 à 60 µm	utricules 1 : L1 : 40 à 68 µm l1 : 32 à 55 µm	utricules 1 : forme de clochettes ou de trompette L1 : 60 à 200 µm l1 : 20 à 60µm L2 : 40 à 80 µm l2 : 20 à 58 µm	utricules 1 :forme de poire L1 :60 à 70µm, l1 :20 à 44 µm
Aspect après décalcification	non soudés	soudés	soudés	utricules non soudés après décalcification
Forme des utricules en vue de dessus	rond à polygonaux	polygones	ronds à polygonaux	arrondie, diamètre moyen 40 µm
Identification	<i>H. cylindracea</i>	<i>H. borneensis</i>	<i>H. macroloba</i>	<i>H. fragilis</i>

Annexe 2 suite

	Morphotypes			
	E	F	G	H
Type d'attache au substrat	un seul point d'attache (amas de rhizoïdes non organisés)	Un seul point d'attache (amas de rhizoïdes non organisés)	un seul point d'attache, parfois présence d'un bulbe	Un seul point d'attache
Aspect général du thalle	buissonnant	érigé	Érigé, très polymorphe	plutôt petit, érigé
Forme des segments en position basale	un segment en forme de main avec des ramifications à 180°	premier segment épais, en forme de baril	Premier segment épais et court, formant un stipe	Ramifications partant d'un seul segment court
Forme générale des segments en position apicale	Premiers segments très ramifiés, puis très peu de ramification : aspect de « longue chaînette » Segments supérieurs réniformes à ronds, segments inférieurs trilobés	ronds à ovales, certains plus étroits à la base (forme d'éventail)	Gros segments très polymorphes : ronds, ovales, réniformes, très rarement cylindriques ou étroits à la base	Segments gros, réniformes Plusieurs segments peuvent se « brancher » sur les segments plus anciens.
<u>Nœud</u>	Pas de fusion	fusion de 2 ou 3 siphons sur une portion importante	fusion totale de 2 ou 3 siphons au niveau du nœud, puis division des siphons	fusion complète de 2 fragments au niveau du nœud, puis division des siphons
Nombre d'étages ou de couches d'utricules	2 à 3	3	2, rarement 3	2
Forme des utricules périphériques en coupe transversale (L : longueur, l : largeur)	Utricules 1 en forme de poire : L1 : 40 à 60µm, l1 : 24 à 40µm L2 : 13 à 40 µm, l2 : 8 à 15µm L3 : 56 µm, l3 : 16µm	Utricules périphériques en forme de poire : L1 : 80 à 88 µm, l1 : 40 à 44 µm L2 : 60 µm, l2 : 28 à 40µm L3 : 180 µm, l3 : 72 µm	Utricules périphériques cupulés : L1 : 20 à 160 L2 = 80 à 240 µm l2 = 72 à 176 µm Utricules 2 très larges par rapport aux utricules périphériques, forme très ronde	Utricules périphériques cupulés , L1 : 80 à 120 µm, l1 : 40 µm L2 : 96 à 160 µm, l2 = 56 à 80 µm
Aspect après décalcification	Utricules désoudés, comme des petits bouquets	utricules soudés	Utricules soudés	Utricules soudés
Forme des utricules en vue de dessus	Forme arrondie diamètre moyen 30-32µm	Pentagone et hexagone diamètre inférieur à 50µm	Hexagone : diamètre de 40 à 120 µm (moy 70.18)	Utricules périphériques visibles à l'œil nu, donnant un aspect en nid d'abeille aux segments. Forme arrondie ou hexagonale, diamètre moyen 80 µm
Identification	<i>H. micronesica</i>	<i>H. lacunalis</i>	<i>H. discoidea</i>	<i>H. macrophysa</i>

Annexe 2 suite

	Morphotypes			
	I	J	K	L
Type d'attache au substrat	Une attache, souvent présence d'un bulbe développé	Un point d'attache	Un seul point d'attache	Un seul point d'attache
Aspect général du thalle	érigé	érigé	Thalle étendu, buissonnant ou rampant. Ramifications importantes « Branches » très longues et fines, caractéristiques de l'espèce	Thalle érigé ou pendant « en rideau » Branches dans un seul plan sauf parfois au niveau des premiers segments
Forme des segments en position basale	Premiers segments souvent longs et fins, formant une « tige »	Premiers segments souvent épais et carrés, formant un stipe	Segment plus ou moins aplatis, supportant plusieurs ramifications (4 ou plus)	premier segment trilobé supportant de nombreuses ramifications
Forme générale des segments en position apicale	Segments supérieurs larges et grands, étroits à leur base, en éventail	Segments supérieurs assez épais, en forme de trapèze, de petit cylindres pour certains (plus épais) ou ovales	Segments très petits, trilobés, cylindriques	Segments petits réniformes à ovales
<u>Nœud</u>	Fusion complète de 2 ou 3 siphons puis redivision après le nœud en 2 ou 3 siphons	fusion complète de 2 siphons, puis redivision après le nœud en 2 ou 3 siphons	fusion complète de 2 ou plus rarement 3 siphons	fusion de 2 ou plus rarement 3 siphons sur un petit point d'attache (fusion partielle)
Nombre d'étages ou de couches d'utricules	2	3	2	1 à 2
Forme des utricules (L : longueur, l : largeur)	Utricules 1 cupulés à tubulaire L1 = 100 à 150 µm l1 = 30 à 65 µm	Utricules 1 cupulés, L1 = 72 à 80 µm, l1 = 36 à 44 µm L 2= 68 à 140 µm, l2 = 40 à 100 µm l3 > 110 µm	Utricules périphériques : forme de cône ou de trompette L1 : 50 à 65 µm l1 : 25 à 30 µm	Utricules périphériques en forme de petits grelots (arrondis) : L1 = 28 à 40µm, l1 = 16 à 26 µm
Aspect après décalcification	soudés	Soudés	soudés	soudés
Forme des utricules en vue de dessus	polygones réguliers	Hexagone, diamètre moyen de 40 à 60 µm	pentagone ou hexagone, parfois arrondis	Pentagone ou hexagone, diamètre 14 à 40 µm (moy 28µm)
Identification	<i>H. magnidisca</i>	<i>H. taenicola</i>	<i>H. gracilis</i>	<i>H. minima</i>

Annexe 2 suite et fin

	Morphotypes		
	M	N	O
Type d'attache au substrat	plusieurs points d'attaches, parfois non visible après la récolte	plusieurs points d'attaches, parfois non visible après la récolte	une attache
Aspect général du thalle	Thalle buissonnant et ramassé	Thalle généralement dense formant des tapis avec des segments dans plusieurs plans	Thalle érigé mais touffu (nombreuses ramifications)
Forme des segments en position basale	Non visible	Non visible	petit et épais, pseudo-stipe
Forme générale des segments en position apicale	Segments petits, réniformes, présentant parfois des renflements assimilables à des nervures.	Segments de différentes tailles, réniformes ou trilobés L = 7 à 11 mm l = 10 à 18 mm	Segments petits, pour la plupart trilobés, parfois réniformes L = 2 à 8 mm l = 2 à 9 mm
<u>Nœud</u>	fusion de 2 ou plus rarement 3 siphons sur un petit point d'attache	fusion partielle de 2, 3, 4 ou 5 siphons	fusion partielle
Nombre d'étages ou de couches d'utricules	1 à 3	3	2 à 3
Forme des utricules périphériques en coupe transversale (L : longueur, l : largeur)	Utricules périphériques plus ou moins arrondis, L = 48 µm, l = 40µm	Utricules 1 en forme de cône L1 = 50 à 60 µm l1 = 30 à 40 µm	cupulés L1 = 50 à 120 µm l1 = 50 à 120 µm
Aspect après décalcification	Soudés	soudés	soudés
Forme des utricules en vue de dessus	Pentagones ou hexagones arrondis, diamètre 20 à 30µm	polygones	polygones
Identification	<i>H. opuntia</i>	<i>H. distorta</i>	<i>H. heteromorpha</i>

Etude de la diversité du genre *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophytes) en Nouvelle-Calédonie : analyses morphologiques et ADN.

Laury Dijoux, rapport de stage de Master 2 Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie mention Océanographie et environnements marins, Université Pierre et Marie Curie - 2010

Résumé :

Halimeda Lamouroux est un genre d'algues vertes calcifiées et segmentées de l'ordre des Bryopsidales. Il est retrouvé dans toute la zone tropicale et sub-tropicale et fait partie des genres les plus étudiés au sein des algues vertes. Son fort polymorphisme rend parfois l'identification des individus au niveau spécifique complexe, et les analyses morphologiques ne témoignent pas toujours de la diversité spécifique existant au sein du genre. Les analyses ADN permettent de pallier ce manque en fournissant des preuves solides aidant à différencier les espèces entre elles. Les études précédentes ont fait état de 19 espèces en Nouvelle-Calédonie, mais leur identification a été principalement réalisée sur la base de la morphologie. L'objectif de ce travail a été de revisiter la diversité du genre *Halimeda* en Nouvelle-Calédonie en utilisant une approche combinant des analyses morpho-anatomiques et moléculaires à partir de séquences d'ADN chloroplastique (*tufA*). Les analyses ont permis l'identification de 16 espèces dont 13 ont pu être séquencées. Trois taxons encore indéterminés ont également été mis en évidence grâce aux apports moléculaires portant à 22 le nombre possible d'espèces. Des études complémentaires avec d'autres marqueurs moléculaires, notamment *rbcL*, devront être réalisées pour confirmer les identifications taxonomiques.

Mots-clés : diversité, *Halimeda*, morphologie, Nouvelle-Calédonie, phylogénie

Study of the diversity of *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in New Caledonia: morphological and DNA analyses.

Abstract:

Halimeda Lamouroux constitutes a genus of calcified and segmented green seaweeds within the order of the Bryopsidales. It is found in all the tropical and sub-tropical area and it is one of the most studied genera within the green seaweeds. Its high polymorphism makes the species identification complicated and the morphological analyses do not always recognise the specific diversity within this genus. Molecular analyses help to differentiate species from one another by giving solids proofs. Previous studies revealed 19 species, but their identification was largely based on morphological data. The aim of this work was to assess the genus's diversity in New Caledonia using morpho-anatomical examinations and molecular analyses based on chloroplastic DNA sequences (*tufA*). The analyses identified 16 species which 13 that were sequenced. Three undetermined taxa were also brought to light with the molecular data. This study permits to increase the view of the *Halimeda* genetic diversity in New Caledonia with potentially 22 species. Further analyses should be done with more molecular markers, such as *rbcL*, to confirm taxonomical identifications.

Keywords: diversity, *Halimeda*, morphology, New-Caledonia, phylogeny.