

Génétique des populations de *Beryx splendens*  
de la zone économique de la Nouvelle-Calédonie :  
distribution des haplotypes  
du gène du cytochrome *b* de l'ADN mitochondrial  
et analyse phylogénétique de leurs séquences



Publication éditée par :  
Centre IRD (ex-ORSTOM) de Nouméa  
BP A5, 98848 Nouméa CEDEX  
Nouvelle-Calédonie  
Téléphone : (687) 26 10 00  
Fax : (687) 26 43 26

**Génétique des populations de *Beryx splendens*  
de la zone économique de la Nouvelle-Calédonie :  
distribution des haplotypes du gène du cytochrome *b*  
de l'ADN mitochondrial et analyse phylogénétique de leurs séquences.**

G. HOARAU, P. BORSA, F. BONHOMME, R. GRANDPERRIN



L'IRD propose des programmes regroupés en 5 départements pluridisciplinaires :

- I DME Département milieux et environnement
- II DRV Département ressources vivantes
- III DSS Département sociétés et santé
- IV DEV Département expertise et valorisation
- V DSF Département du soutien et de la formation des communautés scientifiques du Sud

**Modèle de référence bibliographique à cette revue :**

Dubus I., 1997. La rétention du phosphore dans les sols : principes d'étude, modélisation, mécanismes et compartiments du sol impliqués, *Doc. Sci. Tech.* III 3, 76 p.

ISSN 1297-9635

Numéro II1 - **Novembre 1999**

© IRD (ex-ORSTOM) 1999

Distribué pour le Pacifique par le Centre de Nouméa.

---

**Mots clés :**

BERYX SPLENDENS ; POISSON ; PECHERIE ; GENETIQUE DE POPULATION ; MONTS SOUS MARINS / NOUVELLE CALEDONIE



Génétique des populations de *Beryx splendens*  
de la zone économique de la Nouvelle-Calédonie :  
distribution des haplotypes du gène du cytochrome *b*  
de l'ADN mitochondrial et analyse phylogénétique de leurs séquences.

G. HOARAU, P. BORSA, F. BONHOMME, R. GRANDPERRIN

## Sommaire

<b>RÉSUMÉ</b>	7
<b>ABSTRACT</b>	9
<b>INTRODUCTION</b>	11
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	13
Échantillonnage	13
Analyses moléculaires : ADN mitochondrial	15
Polymorphisme de longueur d'amplification (DALP)	17
Traitement des données populationnelles	18
Traitement des données de séquence	19
<b>RÉSULTATS</b>	20
Variabilité du gène du cytochrome <i>b</i>	20
Structure géographique	24
Séquences du gène du cytochrome <i>b</i>	24
<b>DISCUSSION</b>	29
Hypothèse (1) : espèces jumelles	29
Hypothèse (2) : une seule espèce très structurée	33
Apport des marqueurs nucléaires	34
Conclusion	35
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	36



**Résumé** – La délimitation géographique des populations, établie sur des bases biologiques, est nécessaire à toute gestion rationnelle des pêcheries. Tel est le cas pour *Beryx splendens*, ressource pour laquelle la mise en évidence de différentes populations dans la zone économique (ZE) de Nouvelle-Calédonie serait essentielle pour en éviter la surexploitation. Nous avons choisi d'utiliser l'ADN mitochondrial comme marqueur génétique de la structure géographique de *B. splendens* sur les monts sous-marins de la ZE de Nouvelle-Calédonie. Un fragment d'environ 360 paires de bases du gène du cytochrome *b* a été amplifié par PCR à l'aide d'amorces universelles. Quatorze haplotypes ont été détectés par la technique du polymorphisme de conformation simple-brin ou SSCP, dans un échantillon total de 247 individus. La phylogénie inférée à partir des données de séquence des haplotypes SSCP montre deux clades distincts (A et W), séparés par environ 4 % à 6 % de divergence nucléotidique, au sein des échantillons de Nouvelle-Calédonie. La présence en sympatrie de deux lignées mitochondriales distantes conduit à envisager deux hypothèses : (1) le mélange de deux espèces jumelles dans les échantillons ; (2) la remise en contact récente de populations géographiquement séparées au cours des temps géologiques. Sur un échantillon d'individus de la ZE de Nouvelle-Calédonie, les fragments d'ADN anonymes amplifiés par PCR à l'aide d'amorces arbitraires montrent en général un polymorphisme de présence / absence, lequel est étroitement corrélé au polymorphisme mitochondrial A / W, ce qui correspond à l'existence d'un niveau élevé de déséquilibre nucléo-cytoplasmique. Ce résultat permet de rejeter l'hypothèse (2). Aucune hétérogénéité dans la distribution des fréquences haplotypiques n'a été détectée entre populations de chaque espèce (sp. A et sp. W) à l'échelle de la ZE de Nouvelle-Calédonie ( $\hat{\theta}$  de Weir & Cockerham = -0.005 et -0.002, respectivement). Les séquences partielles des haplotypes d'individus originaires de la ride de Chatham à l'est de la Nouvelle-Zélande et du banc de Galice dans l'Atlantique nord-est sont de type A. La divergence nucléotidique entre ces haplotypes de l'espèce *B. cf. splendens* sp. A échantillonnés aux antipodes apparaît comme très réduite, ce qui est synonyme de flux génique à l'échelle interocéanique, et concorde avec l'absence de différenciation à l'échelle régionale. Ces résultats, qui auront des conséquences sur la systématique du genre *Beryx*, devront être pris en compte pour la gestion de la pêcherie de *B. cf. splendens* dans la ZE de Nouvelle-Calédonie et peut-être ailleurs dans le monde.





**Abstract** – The geographic delineation of populations as inferred from biological data is desirable for rational fishery management. Evidence on population structure may be essential to avoid overfishing of alfonsino *Beryx splendens*, a valuable resource of the economic zone (EZ) of New Caledonia. Here we chose mitochondrial DNA as a genetic marker of the geographic structure of alfonsino on the seamounts of the New Caledonian EZ. A *ca.* 360-base pair fragment of the cytochrome *b* gene was PCR-amplified using universal primers. Fourteen haplotypes were detected through single strand conformation polymorphism (SSCP), on a total sample of 247 alfonsino. The phylogenetic tree inferred from SSCP haplotype sequences featured two distinct clades (A and W) within New Caledonian alfonsino samples. These two clades were distant by *ca.* 4% to 6% nucleotide divergence. The sympatric occurrence of distant mitochondrial lineages raises two hypotheses: (1) admixture of sibling species in the samples; (2) secondary contact of geographically separated populations. Anonymous DNA fragments that were amplified using arbitrary primers, in a sample from the New Caledonian EZ, generally exhibited presence or absence polymorphism. This polymorphism was tightly correlated with the A / W mitochondrial polymorphism pointing to a high level of nucleo-cytoplasmic disequilibrium. This result allows to reject hypothesis (2). No heterogeneity was detected in the distribution of haplotype frequencies between populations within either the A or W species at the scale of the New Caledonian EZ (Weir & Cockerham's  $\hat{\theta} = -0.005$  and  $-0.002$ , respectively). The partial haplotype sequences of individuals sampled on the Chatham Rise east of New Zealand and on the Galicia Bank off Spain in the northeastern Atlantic were of the A type. The nucleotide divergence between these two *B. cf. splendens* sp. A haplotypes sampled at opposite sides of the world was very low, a result that reveals gene flow at the inter-oceanic scale and agrees with the lack of differentiation evidenced at the regional scale. The present findings will have repercussions on the systematics of the genus *Beryx*, and should be taken into account for efficient management of the *B. cf. splendens* fishery in the EZ of New Caledonia and perhaps in other regions.



## INTRODUCTION

La génétique moléculaire des populations permet des inférences sur la biologie et l'écologie des organismes, et le cas échéant la phylogénie des gènes permet de reconstituer la séquence temporelle des événements de colonisation et de radiation qui ont affecté une espèce dans le passé. Cette approche est particulièrement utile chez les espèces dont la distribution, la biologie et l'écologie restent peu connues en raison de l'inaccessibilité des habitats et de la pauvreté des observations : tel est notamment le cas des espèces des grands fonds (CREASEY & ROGERS 1999).

La majorité des organismes marins ont une capacité de dispersion élevée, liée à la dérive passive des larves planctoniques ou à la migration des adultes. Ces caractéristiques, en général associées à des fécondités élevées, impliquent des niveaux de flux génique théoriquement élevés. De façon générale, l'aire de distribution de telles espèces est étendue et les tailles des populations sont énormes (PALUMBI 1992, 1994). On s'attend ainsi à ce que les espèces marines montrent de faibles différences génétiques sur de grandes distances. Même si un grand nombre d'espèces marines ayant des capacités de dispersion élevées présentent une faible différenciation, il existe des exemples où la structure génétique s'est révélée être marquée (BURTON 1983 ; HEDGECOCK 1986 ; KNOWLTON 1993 ; AVISE 1994 ; PALUMBI 1996). Pour cela, différents mécanismes ont pu être invoqués. Les convergences ou divergences de masses d'eaux, associées à des courants de directions opposées et à des différences de température et de salinité, constituent des barrières géographiques en ce qu'elles sont susceptibles de limiter les possibilités de dispersion. La sélection naturelle peut aussi jouer un rôle en favorisant les populations locales face aux immigrants (KOEHN & HILBISH 1987). Des mécanismes comportementaux comme le *homing* peuvent contribuer à l'isolement reproductif (AVISE 1994). Enfin, l'existence de mécanismes de reconnaissance des gamètes a été récemment suggérée (PALUMBI 1994). De plus, la fécondité élevée des espèces marines pourrait impliquer une forte variance du succès reproducteur, ce qui pourrait entraîner des effectifs efficaces bien plus faibles que les effectifs réels (HEDGECOCK 1994) et ainsi accentuer la différenciation génétique due à la dérive. De façon générale, potentiel de dispersion ne signifie pas nécessairement dispersion effective. Il convient d'accumuler de nouvelles données sur la structure géographique des populations d'un certain nombre d'espèces marines avant d'être en mesure de dégager des généralités quant aux modalités de la différenciation génétique des populations. De ce point de vue, les organismes de profondeur restent mal connus (CREASEY & ROGERS 1999).

Les travaux de génétique publiés à ce jour chez les poissons de profondeur ont permis de clarifier leur systématique, comme chez les grenadiers du genre *Coryphaenoides*, avec la mise en évidence d'un décalage des préférences bathymétriques entre espèces (WILSON & WAPLES 1983). Des différences génétiques ont pu être rapportées à l'échelle régionale, comme chez le hoki *Macruronus novaezelandiae* (BAKER *et al.* 1995). A l'inverse, une remarquable homogénéité a pu être observée à l'échelle mondiale, comme

chez le grenadier *C. armatus* (WILSON & WAPLES 1984) et l'empereur *Hoplostethus atlanticus* (SMITH 1986 ; BAKER *et al.* 1995).

Le béryx, *Beryx splendens* Lowe, 1834, est un poisson benthopélagique qui vit aux alentours des monts sous-marins et sur les pentes continentales à des profondeurs de 200 à 900 m (LEHODEY & GRANDPERRIN 1996) voire davantage (CREASEY & ROGERS 1999). *B. splendens* est largement répandu dans l'océan mondial (BUSAKHIN 1982). Sa fécondité est élevée : de 270 000 à 700 000 ovocytes par ponte (LEHODEY, GRANDPERRIN & MARCHAL 1997). Pélagiques, les larves et les juvéniles sont surtout présents entre 50 m et 200 m (IVANIN 1987). La phase pélagique durerait plusieurs mois (LEHODEY, GRANDPERRIN & MARCHAL 1997) autorisant une dispersion sur de grandes distances. Toutefois, les monts sous-marins constituent des habitats isolés, séparés les uns des autres par les immensités océaniques ; dans certains cas, l'interaction des courants et de la topographie provoque à leur voisinage la formation de colonnes de Taylor (RODEN 1991), tourbillons susceptibles de favoriser la rétention des larves et la concentration de leurs proies, offrant ainsi aux populations locales la possibilité d'auto-recrutement (ROGERS 1994).

Nous avons choisi d'utiliser un fragment du génome mitochondrial, le gène du cytochrome *b*, comme marqueur génétique de la structure géographique de *Beryx splendens* sur les monts sous-marins de la Nouvelle-Calédonie. Du fait de ses caractéristiques particulières, l'ADN mitochondrial (ADNmt) des animaux est un marqueur adapté à l'étude de la structuration géographique infra-spécifique (MAYNARD SMITH 1998). En effet, l'ADNmt est présent dans les cellules sous forme haploïde, sa reproduction est exclusivement clonale (voir, cependant, EYRE-WALKER, SMITH & MAYNARD SMITH 1999 et HAGELBERG *et al.* 1999, pour deux contre-exemples récemment mis en évidence chez *Homo sapiens*) et, chez la grande majorité des espèces, sa transmission est maternelle. L'effectif efficace de reproduction est donc théoriquement plus faible pour l'ADNmt que pour l'ADN nucléaire, d'où une sensibilité accrue aux phénomènes de dérive, de goulots d'étranglement ainsi qu'aux événements de fondation (MORITZ, DOWLING & BROWN 1987). De plus, le taux d'évolution du génome mitochondrial des vertébrés est globalement supérieur (de 2 à 10 fois) à celui du génome nucléaire (MORITZ, DOWLING & BROWN 1987), même si, chez les poissons, ce taux d'évolution est inférieur à celui d'autres groupes (MARTIN & PALUMBI 1993 ; MEYER 1993 ; RAND 1994). L'évolution rapide de l'ADN mitochondrial entraînant un important polymorphisme infra-spécifique, et son mode de transmission en faisant un excellent traceur pour la phylogénie, ce marqueur est idéal pour des études phylogéographiques au niveau populationnel (BOURSOT & BONHOMME 1986 ; AVISE *et al.* 1987 ; AVISE 1994 ; SOLIGNAC *et al.* 1995 ; MAYNARD SMITH 1998).

Les données mitochondriales nous permettront de tester des hypothèses sur la structure géographique de *Beryx splendens*. La première hypothèse est que les populations étudiées ne présentent aucune structure, formant un ensemble panmictique. En particulier, les monts sous-marins du sud de la Nouvelle-Calédonie pourraient

correspondre à un tel ensemble, plus au moins isolé des autres populations (LEHODEY, GRANDPERRIN & MARCHAL 1997), puisque cette zone est située à l'intérieur d'un système de courants formant un tourbillon (HENIN 1994). Selon cette hypothèse, on s'attend à ce que la distribution des haplotypes soit homogène à l'échelle de cet ensemble de monts sous-marins.

Une seconde hypothèse est celle de l'isolement par la distance, où la structure génétique globale de la population reflète l'état d'équilibre entre le flux génique et la dérive génétique locale (WRIGHT 1943). Selon cette hypothèse, la distance génétique entre populations croît avec la distance géographique qui les sépare.

Chez les espèces exploitées, l'étude de la structure géographique présente un intérêt pratique car elle peut aboutir à l'identification de différentes populations ou *stocks*. La délimitation géographique des populations, établie sur des bases biologiques, est nécessaire à toute gestion rationnelle des pêcheries (OVENDEN 1990 ; SMITH, JAMIESON & BIRLEY 1990 ; CARVALHO & HAUSER 1994 ; WARD & GREWE 1994). Tel est le cas pour *Beryx splendens*, ressource pour laquelle la mise en évidence de différentes populations dans la zone économique de Nouvelle-Calédonie serait essentielle pour en éviter la surexploitation (LEHODEY 1994 ; LEHODEY & GRANDPERRIN 1994).

Incidentement, nous montrons que le taxon actuel *Beryx splendens* consiste en deux espèces sympatriques en Nouvelle-Calédonie, ce qui soulève un problème de systématique et de taxonomie, et devrait aboutir à une révision du genre *Beryx*.

## MATERIEL ET METHODES

### *Echantillonnage*

Les poissons ont été capturés entre 450 m et 950 m de profondeur lors de deux campagnes réalisées dans le cadre du programme ZoNéCo d'évaluation des ressources marines de la zone économique de Nouvelle-Calédonie. La première, HALICAL1 (GRANDPERRIN, BARGIBANT & MENOUE 1995), a été effectuée à bord du navire océanographique (N.O.) *Alis* de l'ORSTOM ; une palangre de fond fut utilisée. La seconde, HALIPRO2 (GRANDPERRIN *et al.* 1997) se déroula à bord du N.O. *Tangaroa*, un grand chalutier néo-zélandais. Les échantillons proviennent de six zones (Fig. 1 ; Tableau 1) : le Grand Passage au nord de la Nouvelle-Calédonie, les pentes externes du récif de l'Astrolabe et de Lifou situés sur la ride des Loyauté, les monts sous-marins Stylaster et Aramis sur la ride de Norfolk, et le mont sous-marin K sur le prolongement sud de la ride des Loyauté. Sitôt les poissons remontés à bord, un morceau de muscle a été prélevé en avant de la nageoire dorsale de chaque individu et conservé dans l'alcool éthylique à 95 %. Deux échantillons supplémentaires de *Beryx splendens* ont été récoltés par chalutage sur la ride de Chatham à l'est de la Nouvelle-Zélande (42°53'S ; 177°42'E) et sur le banc de Galice au large de Vigo en Espagne (42°37'N - 42°41'N ; 11°35'W - 11°52'W). Enfin, trois individus pêchés dans le Golfe de Gascogne proviennent de la

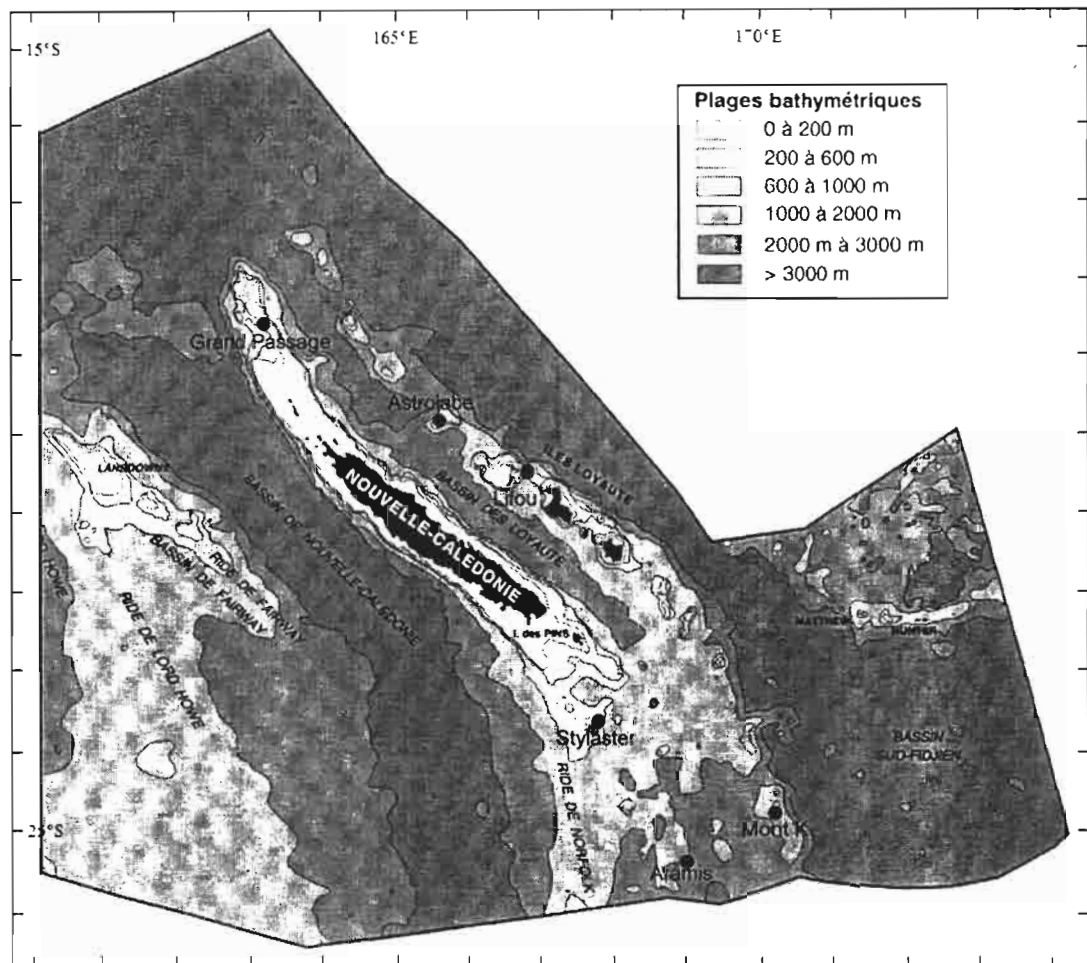


Figure 1 *Beryx cf. splendens*. Stations échantillonnées (●) dans la zone économique de Nouvelle-Calédonie (fond de carte d'après MISSEGUE, DUPONT & DANIEL 1992, dans LEHODEY 1994).

Tableau 1 *Beryx cf. splendens*. Localités, dates et profondeurs d'échantillonnage en Nouvelle-Calédonie. Campagne dénomination de la campagne d'échantillonnage, Code code d'enregistrement des échantillons, N taille de l'échantillon

Localité	Campagne	Code	N	Date	Profondeur (m)	
					Min	Max
Grand Passage	HALICAL1	HA1	33	Nov 94	575	750
Astrolabe	HALICAL1	HA1	30	Déc 94	535	750
Lifou	HALICAL1	HA1	41	Déc 94	450	793
Mont Stylaster	HALIPRO2	BT94	45	Nov 96	448	880
Mont K	HALIPRO2	BT17	49	Nov 96	935	936
Mont Aramis	HALIPRO2	BT35	49	Nov 96	640	740

crée de l'île d'Yeu en France.

*Analyses moléculaires : ADN mitochondrial*

L'ADN total a été extrait selon la méthode du "phénol-chloroforme" (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS 1989). Un fragment de muscle (0.1 à 0.5 g) est dilacéré dans un tube Eppendorf, puis laissé à sécher pendant 4 h à température ambiante. Après évaporation de l'alcool, 500 µl de tampon d'extraction (EDTA 25 mM, Tris 50 mM et 1 % SDS) et 10 U de protéinase K sont ajoutés dans chaque tube. Le contenu du tube est agité au vortex et placé au bain-marie toute une nuit à 55 °C. Après digestion des protéines, 500 µl (1 vol. / vol.) d'un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 : 24 : 1) sont ajoutés à chaque tube. Les tubes sont agités puis centrifugés pendant 10 min à 3 500 g. Le surnageant est prélevé et purifié une seconde fois au phénol-chloroforme. L'ADN du surnageant (environ 250 µl) est ensuite précipité pendant 1 h à -20 °C après ajout de deux volumes d'éthanol absolu (soit environ 500 µl) et 0.34 volume d'acétate de sodium 3 M pour une concentration finale de ~0.3 M. Après centrifugation, 10 min à 3 500 g, le culot d'ADN est rincé à l'éthanol 70 %, à nouveau séché, et resuspendu dans 100 µl d'eau ultrapure. Les solutions d'ADN ainsi préparées ont été conservées à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour la réaction de polymérisation cyclique (PCR ; Fig. 2).

La région de l'ADN amplifiée par la PCR est un fragment d'environ 350 paires de bases (pb) du gène du cytochrome *b*. Les amorces utilisées sont les amorces universelles *CBI-L* (5'-CATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') et *CB2-H* (5'-CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3') (KOCHER *et al.* 1989 ; PALUMBI *et al.* 1991). La PCR est réalisée dans 25 µl de mélange réactionnel contenant 1 X tampon *Taq*, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de chaque dNTP, 0.5 µM de chaque amorce, 0.25 U de *Taq*-polymérase (Promega, Madison WI, USA) et 3 µl de solution d'ADN. La réaction a lieu dans un thermocycleur Crocodile III (Appligène, Strasbourg, France), avec 35 cycles de 30 s à 95 °C (dénaturation) puis 30 s à 52 °C (hybridation) puis 1 min à 72 °C (élongation). Les produits de PCR obtenus sont visualisés au bromure d'éthidium sous lumière ultraviolette après migration sur un gel d'agarose à 2 %, et leur vitesse de migration est comparée au témoin de longueur "100-bp ladder" de Pharmacia Biotech (Uppsala, Suède).

Le polymorphisme de séquence du fragment amplifié a été mis en évidence par la technique de polymorphisme de conformation simple-brin ou SSCP (ORITA *et al.* 1989 ; HAYASHI 1992). Après dénaturation de l'ADN double-brin, chaque molécule simple-brin adopte, en se renaturant sur elle-même, une structure secondaire dépendant de sa séquence nucléotidique. Le polymorphisme de conformation, révélé par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide non-dénaturant, résulte de polymorphismes de structure secondaire des ADN simple-brin entre des fragments de séquences différentes (Fig. 3). La vitesse de migration de l'ADN simple-brin dépend non seulement de la taille, mais aussi de la formation secondaire adoptée. Les conditions de migration (température, temps de migration, puissance) doivent être ajustées et maintenues constantes afin de



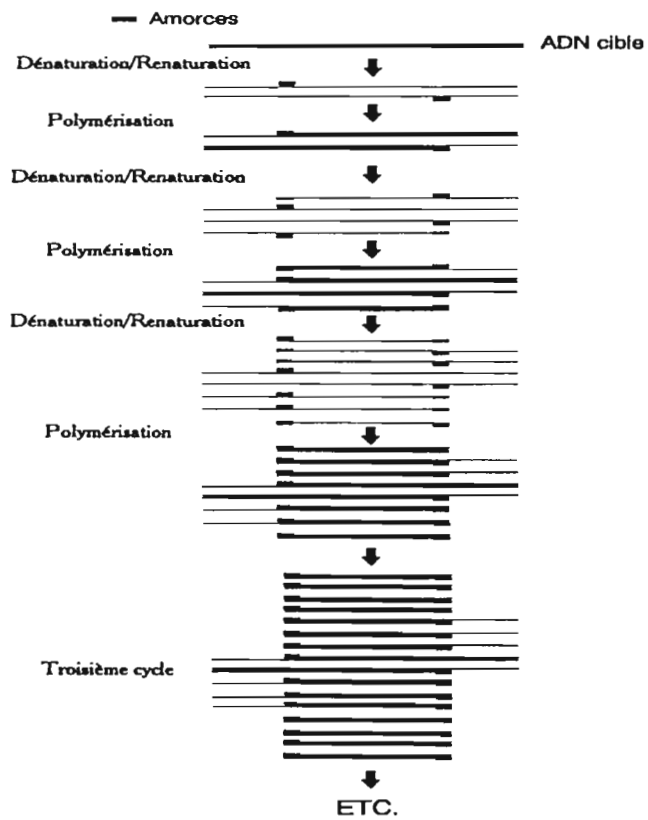


Figure 2 Principe de la PCR (d'après DESMARAIS *et al.* 1995)

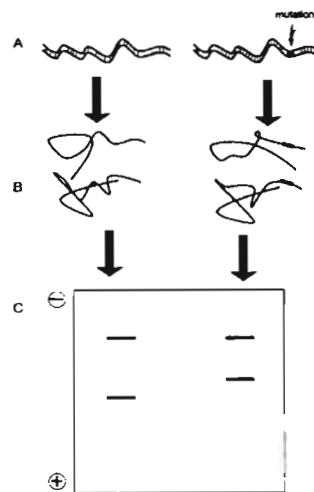


Figure 3 Principe de la SSCP (d'après DESMARAIS *et al.* 1995). A : amplification des 2 brins d'ADN, B : dénaturation, C : migration

conserver les molécules simple-brin dans une conformation spécifique stable (HAYASHI 1991, *in* LESSA & APPLEBAUM 1993 ; ORTI, HARE & AVISE 1997). Cette technique permettrait, pour un fragment de 300 à 450 pb, de détecter environ 90 % des variants (haplotypes) lorsque ceux-ci diffèrent d'une seule mutation ponctuelle (HAYASHI 1991, *in* LESSA & APPLEBAUM 1993). Pour un individu, on observe en théorie deux bandes, une pour chaque brin d'ADN. Dans certains cas toutefois, en raison de l'existence pour un même brin de plusieurs conformations semi-stables, plus de deux bandes peuvent être observées (DESMARAIS *et al.* 1995 ; BORSA & COUSTAU 1996 ; DE VIENNE 1997). Cinq  $\mu$ l du produit d'amplification par PCR de chaque individu sont dénaturés à 100 °C après ajout de 5  $\mu$ l de tampon de dénaturation (95 % de formamide, 10 mM NaOH, et 20 mM EDTA) et un  $\mu$ l de solution de colorant (42 %o xylène cyanol, 42 %o bleu de bromophénol, 5 % glycérol). La migration des ADN dénaturés est réalisée à une puissance de 2 W, pendant 15 h à 16 °C, dans un gel de polyacrylamide non-dénaturant à 1 X de solution d'acrylamide MDE (FMC Corporation, Rockland ME, USA) placé dans une cuve à migration verticale (Hoefer, San Francisco CA, USA). Les bandes d'ADN simple-brin ont été révélées par coloration au nitrate d'argent (WRAY *et al.* 1981).

Les différents haplotypes détectés par la SSCP ont été séquencés. Nous avons utilisé la technique du séquençage cyclique à l'aide du kit "Thermo Sequenase" (Amersham Life Science, Cleveland OH, USA). Cette méthode consiste en l'incorporation aléatoire de didésoxyribonucléotides de terminaison de chaîne (SANGER, NICKLEN & COULSON 1977). Le séquençage a été effectué dans un séquenceur automatique A.L.F. (Pharmacia Biotech). La migration se fait en 5 heures sur un gel de polyacrylamide dénaturant à 6 % d'acrylamide Bio-Rad (Hercules CA, USA) et 42 % d'urée.

Les deux haplotypes les plus fréquents dans l'échantillon total (*a* et *w* ; voir ci-après) ont été amplifiés par PCR et séquencés une seconde fois à l'aide du kit "Thermo Sequenase Radiolabelled Terminator" (Amersham). Chacun des quatre didésoxyribonucléotides utilisés est marqué au <sup>33</sup>P. Les produits des quatre réactions de séquence sont chargés en parallèle dans un gel de polyacrylamide dénaturant à 6 % d'acrylamide Bio-Rad et 42 % d'urée. La migration se fait en 2 *runs* de 3 h et 6 h, à puissance constante (50 W). Après séchage, le gel est exposé contre un film d'autoradiographie X-Omat (Eastman-Kodak, Rochester NY, USA) pendant une durée dépendant de l'activité des produits, approximativement estimée au préalable à l'aide d'un compteur Geiger.

#### *Polymorphisme de longueur d'amplification (DALP)*

La technique des DALP (DESMARAIS, LANNELUC & LAGNEL 1998) permet, à l'instar des RAPDs (WILLIAMS *et al.* 1990), d'amplifier un certain nombre de fragments d'ADN anonymes à l'aide d'amorces arbitraires. Initialement, la technique a été développée dans le but d'acquérir rapidement des marqueurs nucléaires présentant un polymorphisme de longueur, en séquençant directement — ou après réamplification — des fragments d'ADN amplifiés par PCR après séparation et excision de ceux-ci sur un gel de

polyacrylamide. Le choix judicieux de la paire d'amorces (l'une des deux amorces contient le site d'initiation de la réplication pour l'ADN-polymérase du phage M13) permet de s'affranchir de l'étape du clonage. Incidemment, cette technique permet aussi d'établir des profils individuels ou *DNA fingerprints* à partir de la présence ou de l'absence d'un fragment amplifié pour une longueur donnée. Pour cela, un petit nombre d'amplifications par PCR peut suffire, puisqu'une paire d'amorces DALP permet en général de révéler une dizaine de bandes, dont une fraction est variable d'un individu à l'autre (DESMARAIS, LANNELUC & LAGNEL 1998). Nous avons réalisé cinq séries d'amplifications par PCR d'un échantillon d'individus à l'aide de chacune des amorces directes *DALP231* (5'-GTTTTCCCAGTCACGACAGC-3'), *DALP232* (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGAC-3'), *DALP233* (5'-GTTTTCCCAGTCACGACACG-3'), *DALP234* (5'-GTTTTCCCAGTCACGACCAG-3') et *DALP241* (5'-GTTTTCCCAGTCACGACTCAG-3'), utilisée en combinaison avec l'amorce inverse *DALP* (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') (DESMARAIS, LANNELUC & LAGNEL 1998). Juste avant la PCR, l'amorce *DALPR* a été marquée radioactivement au <sup>33</sup>P en utilisant 0.5 U de polynucléotide-kinase *T4* (Eurogentec, Liège, Belgique) dans un mélange réactionnel comprenant le tampon de la kinase à concentration 1 X, 2.5 μM de l'amorce, et 1.5 μM de [γ-<sup>33</sup>P]ATP (Isotopchim, Ganagobie, France), laissé 30 min à l'étuve à 37 °C. La réaction de PCR a été réalisée dans 20 μl de mélange réactionnel comprenant 1 X de tampon *Taq*, 1.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM de chaque dNTP, 0.25 μM d'amorce DALP directe, 1 μM d'amorce DALPR marquée, 0.5 U de *Taq*-polymérase (Promega) et 2 μl de solution d'ADN diluée à 1/50. Le programme de la PCR, réalisé sur un thermocycleur Crocodile III (Appligène) comprend 35 cycles de 30 s à 91 °C, 30 s à 50 °C et 40 s à 72 °C, à la suite d'un cycle de dénaturation de 3 min à 95 °C, et suivis par un cycle final d'élongation de 5 min à 72 °C. Les produits d'amplification par PCR ont été dénaturés à 95 °C en ajoutant 10 μl de tampon dénaturant (95 % de formamide, 20 mM EDTA, 0.05 % xylène cyanol et 0.05 % bleu de bromophénol). La migration s'effectue à 50 W pendant 5 h dans un gel de polyacrylamide dénaturant à 6 % d'acrylamide et 42 % d'urée. Après séchage, le gel est exposé contre un film d'autoradiographie Biomax (Eastman-Kodak) pendant 5 jours.

#### *Traitement des données populationnelles*

La diversité génétique des populations a été estimée à l'aide de l'estimateur  $\hat{H}$ , avec correction du biais dû à la taille d'échantillon (NEI 1987) :  $\hat{H} = N/(N-1) \cdot (1 - \sum_i x_i^2)$  où  $N$  est la taille de l'échantillon et  $x_i$  la fréquence du  $i$ ème haplotype. La variance d'échantillonnage de  $\hat{H}$  a été estimée à l'aide de la procédure SIMULONS du logiciel GENETIX (BELKHIR *et al.* 1996). Ce programme construit 100 nouveaux tableaux des individus par tirage aléatoire avec remise et calcule la valeur de  $\hat{H}$  pour chacun d'eux.

Les  $F_{st}$  par paire de populations (WRIGHT 1951) ont été estimés par la décomposition de la variance des fréquences alléliques :  $\theta (\equiv F_{st}) = a / (a+b+c)$  (WEIR & COCKERHAM 1984) où  $a$  est la composante inter-populations,  $b$  la composante entre individus à l'intérieur de chaque population, et  $c$  la composante entre gamètes à l'intérieur de chaque

individu (ici égale à 0 puisque nos données sont haploïdes), de la variance des fréquences alléliques. Les différentes valeurs de  $\hat{\theta}$  par paire ont été estimées selon WEIR & COCKERHAM (1984) à l'aide de GENETIX.

La significativité des différences entre populations a été testée de deux manières différentes. La première fait appel aux tests exacts de RAYMOND & ROUSSET (1995a), réalisés à l'aide du logiciel GENEPOP (RAYMOND & ROUSSET 1995b). La seconde est un test de significativité des  $\hat{\theta}$  par permutations (1000 permutations) (SOKAL & ROHLF 1995), à l'aide de GENETIX. Dans les deux cas, le seuil de significativité a été ajusté par une correction de Bonferroni séquentielle (RICE 1989).

Nous avons calculé sous EXCEL<sup>TM</sup> la régression de la distance de Reynolds [ $\mathcal{D} = -\ln(1-\theta)$ ; REYNOLDS, WEIR & COCKERHAM 1983] sur la distance géographique. La signification statistique de la corrélation entre la matrice des distances de Reynolds et la matrice des distances géographiques a été testée à l'aide de la procédure MANTEL du logiciel GENETIX. La valeur d'un paramètre d'association entre les deux matrices,  $Z$  (coefficient de MANTEL 1967), est calculée à partir des données réelles, puis comparée à la série de pseudo-valeurs obtenues par 5 000 permutations aléatoires de l'ordre d'entrée des populations dans l'une des deux matrices de distances (voir SOKAL & ROHLF 1995). S'il n'y a pas de relation entre les deux matrices de distances, la valeur de  $Z$  obtenue sur les données réelles ne s'écartera pas de la distribution des pseudo-valeurs de  $Z$  obtenues après permutations. Dans le cas contraire, on rejette l'hypothèse nulle d'absence de corrélation. Nous avons également calculé la régression de  $\hat{\theta} / (1-\hat{\theta})$  sur la distance géographique. Cette régression est positive dans un modèle unidimensionnel d'isolement par la distance (ROUSSET 1997).

#### *Traitement des données de séquence*

Les séquences obtenues ont été éditées et alignées manuellement à l'aide du logiciel ESEE (CABOT & BECKENBACH 1989). Trois méthodes d'inférence phylogénétique ont été utilisées sur cet alignement. La première, dite phénétique, passe par le calcul d'une matrice des distances par paire, utilisée ensuite pour la reconstruction d'un arbre selon l'algorithme du *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI 1987), à l'aide du logiciel MUST (PHILIPPE 1993). La seconde est basée sur le principe du partage des caractères dérivés (synapomorphie), la reconstruction de l'arbre suivant le critère du nombre minimum de changements d'état des caractères (parcimonie). Pour cela, nous avons utilisé l'algorithme heuristique du logiciel PAUP (SWOFFORD 1993). La troisième est une méthode probabiliste qui maximise la vraisemblance de l'arbre par rapport à un modèle d'évolution moléculaire. La reconstruction a été faite à l'aide de la procédure DNAML du logiciel PHYLIP (FELSENSTEIN 1993) en utilisant les options par défaut qui sont les suivantes : (i) taux de transition sur transversion = 2 ; (ii) fréquences nucléotidiques obtenues empiriquement ; (iii) taux de substitution égaux, quel que soit le type de substitution. La robustesse des nœuds a été estimée par *bootstrap* (FELSENSTEIN 1985). Le *bootstrap* est une méthode de ré-échantillonnage des sites nucléotidiques par tirage aléatoire avec

La robustesse des nœuds a été estimée par *bootstrap* (FELSENSTEIN 1985). Le *bootstrap* est une méthode de ré-échantillonnage des sites nucléotidiques par tirage aléatoire avec remise, ce qui correspond à une pondération aléatoire des sites. La valeur de *bootstrap* d'un nœud correspond à la fréquence de ce nœud dans l'ensemble des arbres inférés à partir des pseudo-matrices de séquences ainsi obtenues. Les programmes utilisés sont NJBOOT (logiciel MUST ; PHILIPPE 1993) et l'option BOOTSTRAP de PAUP (SWOFFORD 1993). Les valeurs de *bootstrap* de chaque nœud ont été calculées sur 2 000 pseudo-arbres reconstruits à l'aide de chacun des algorithmes de *Neighbor-Joining* et de parcimonie. En raison des temps de calcul énormes qui auraient été nécessaires, la robustesse de l'arbre de maximum de vraisemblance n'a pas été testée.

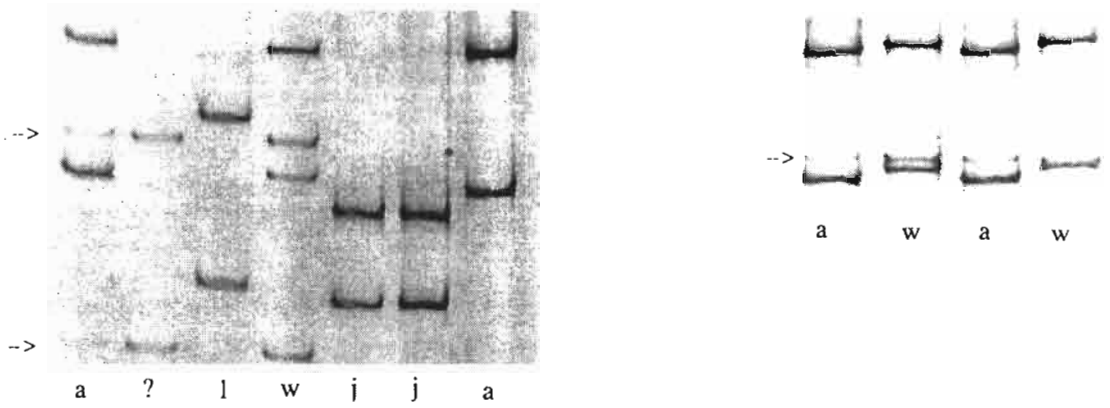
## RESULTATS

### *Variabilité du gène du cytochrome b*

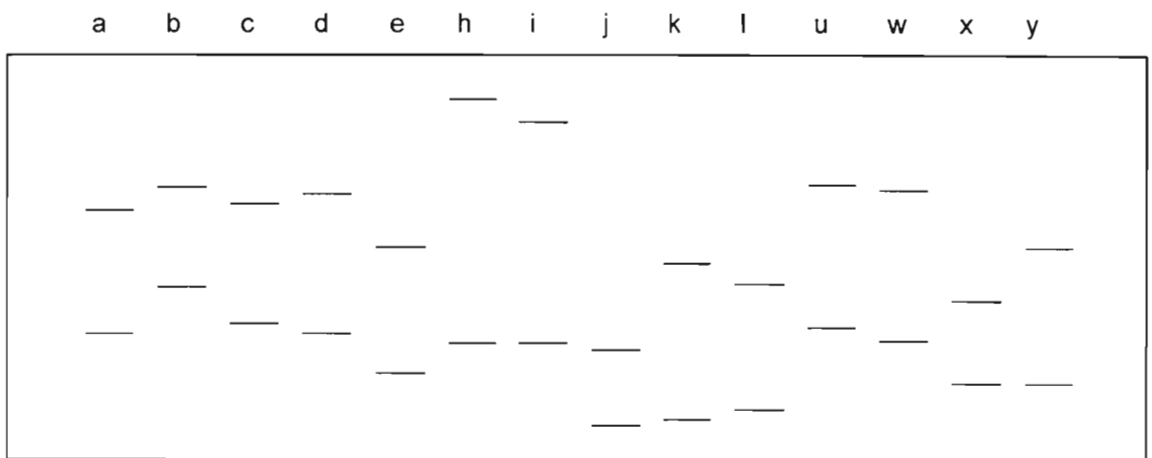
Un polymorphisme important a pu être révélé à l'aide de la technique de SSCP : au total 14 haplotypes ont pu être détectés sur un échantillon total de 238 individus de Nouvelle-Calédonie amplifiés par PCR au locus du cytochrome *b* (Figs. 4 et 5 ; Tableau 2).

Un individu est en général caractérisé par un profil de migration à deux bandes. Toutefois, un certain nombre d'individus présentaient ici quatre bandes. On peut remarquer sur le premier gel de la figure 4 que l'individu 1, amplifié par PCR deux fois indépendamment, présente une fois deux bandes (premier puits sur la figure 4 gauche) et une fois quatre bandes (dernier puits). Ces deux bandes supplémentaires sont présentes chez d'autres individus du même gel, plus ou moins intenses par rapport aux bandes principales. La même observation peut être faite sur le deuxième gel, avec l'individu 2 (Fig. 4 droite). Ces bandes supplémentaires ont été interprétées comme le résultat de contaminations légères de la PCR, ce qui n'est guère étonnant du fait que nous utilisons des amorces universelles et que d'autres organismes sont actuellement étudiés au laboratoire à l'aide de la même technique. Ces bandes supplémentaires sont révélées sur les témoins négatifs de la PCR (individu noté "?" sur la figure 4 gauche), lesquels restent toutefois "blancs" au bromure d'éthidium sur gel d'agarose (cette technique étant cependant moins sensible que la coloration au nitrate d'argent). Les bandes supplémentaires, effectivement dues à la contamination, ne seront donc pas prises en compte dans l'analyse des profils de migration. Ces différents profils sont représentés en figure 5.

Les fréquences haplotypiques des échantillons sont reportées sur le tableau 3. Les échantillons de Lifou et des monts Stylaster, K et Aramis sont caractérisés par un même haplotype fréquent, *a*, et présentent plusieurs haplotypes rares. L'échantillon de Grand Passage diffère significativement de ces populations ; en effet, c'est l'haplotype *w* qui y est le plus fréquent. La population Astrolabe semble intermédiaire : l'haplotype *a* y est



**Figure 4** *Beryx cf. splendens*. Photographies de gels SSCP illustrant le polymorphisme du gène du cytochrome *b*. Les noms des allèles figurent au dessous. →, ? contamination



**Figure 5** *Beryx cf. splendens*. Profils de migration sur gel SSCP des 14 haplotypes détectés dans les échantillons de Nouvelle-Calédonie

**Tableau 2** *Beryx cf. splendens*. Haplo type et longueur à la fourche (LF) des individus dans six échantillons de Nouvelle-Calédonie (ND donnée non disponible).

Echantillon, Individu	Haplo-type	LF (cm)	Echantillon, Individu	Haplo-type	LF (cm)
Grand Passage			Lifou (suite)		
1	a	20	62	a	28
2	a	23	63	a?	32
3	a	20	66	a	31
13	w	28	68	a	31
14	w	36	69	a	33
15	w	31	70	a	30
16	w	39	71	a	30
17	w	31	72	w?	ND
18	w	34	74	a	35
19	w	33	75	a	32
21	w	36	77	a	37
22	j	34	78	a	30
23	w	ND	80	a	32
24	w	40	81	a	ND
25	a	39	82	a	32
26	w	34	158	a	43
27	a	25	160	a	27
28	a	29	161	a	31
29	w	31	162	a	26
31	w	24	163	a	28
32	w	22	164	a	29
33	a	25	165	a	23
34	w	23	166	a	27
35	w	28	167	a	30
36	a	28	168	a	27
37	w	26	169	w	23
39	w	32	170	a	29
40	w	27	171	w?	30
41	a	32	172	h	25
42	w	28	173	a	31
43	j	33	174	a	30
44	w	26	175	a	31
45	w	33	176	a	28
			177	w	29
			178	a	26
			179	a	30
			180	a	31
			181	a	27
			182	a	30
Astrolabe			Stylaster		
85	a	31	BT94 2	w	ND
86	a	35	BT94 3	a	ND
87	w	33	BT94 4	w	ND
88	a	29	BT94 5	w	ND
89	a	31	BT94 6	a	ND
92	j	30	BT94 7	a	ND
93	w	33	BT94 8	a	ND
94	w	29	BT94 9	a	ND
95	w	30	BT94 10	x	ND
96	u	31	BT94 11	a	ND
97	c?	28	BT94 30	a	ND
98	a	32	BT94 31	a	ND
100	a	34	BT94 32	a	ND
101	a	33	BT94 12	w	ND
102	a	25	BT94 13	a	ND
104	a	37	BT94 14	w	ND
105	a	33	BT94 15	a	ND
106	a	32	BT94 16	w	ND
107	a	28	BT94 17	a	ND
108	a	32	BT94 18	a	ND
109	a	30	BT94 19	a	ND
110	a	ND	BT94 20	a	ND
112	w	38	BT94 21	a	ND
113	w?	40	BT94 22	w	ND
114	w?	34	BT94 24	w	ND
116	w	33	BT94 25	h	ND
117	w	32	BT94 26	a	ND
118	w	28	BT94 27	a	ND
119	a	34			
120	w	32			
Lifou					
58	a	32			
59	w	26			

Tableau 2 (suite et fin)

Echantillon, Individu	Haplo- type	LF (cm)	Echantillon, Individu	Haplo- type	LF (cm)
<b>Stylaster (suite)</b>			<b>Mont K (suite)</b>		
BT94 28	<i>i</i>	ND	BT17 40	<i>a</i>	ND
BT94 29	<i>a</i>	ND	BT17 41	<i>a</i>	ND
BT94 30	<i>a</i>	ND	BT17 42	<i>a</i>	ND
BT94 31	<i>a</i>	ND	BT17 43	<i>a</i>	ND
BT94 32	<i>a</i>	ND	BT17 44	<i>a</i>	ND
BT94 33	<i>d</i>	ND	BT17 45	<i>a</i>	ND
BT94 34	<i>a</i>	ND	BT17 46	<i>a</i>	ND
BT94 35	<i>a</i>	ND	BT17 47	<i>a</i>	ND
BT94 36	<i>a</i>	ND	BT17 49	<i>a</i>	ND
BT94 37	<i>j</i>	ND	BT17 50	<i>a</i>	ND
BT94 38	<i>a</i>	ND			
BT94 39	<i>y</i>	ND	<b>Aramis</b>		
BT94 40	<i>a</i>	ND	BT35 1	<i>a</i>	ND
BT94 41	<i>k</i>	ND	BT35 2	<i>a</i>	ND
BT94 42	<i>w</i>	ND	BT35 3	<i>a</i>	ND
BT94 43	<i>a</i>	ND	BT35 4	<i>a</i>	ND
BT94 44	<i>a?</i>	ND	BT35 5	<i>a</i>	ND
BT94 45	<i>a</i>	ND	BT35 6	<i>e</i>	ND
BT94 46	<i>a</i>	ND	BT35 7	<i>a</i>	ND
BT94 47	<i>a?</i>	ND	BT35 8	<i>a</i>	ND
			BT35 9	<i>a?</i>	ND
<b>Mont K</b>			BT35 10	<i>a</i>	ND
BT17 1	<i>a</i>	ND	BT35 12	<i>a</i>	ND
BT17 2	<i>a</i>	ND	BT35 13	<i>a</i>	ND
BT17 3	<i>a</i>	ND	BT35 14	<i>a</i>	ND
BT17 4	<i>a</i>	ND	BT35 15	<i>a</i>	ND
BT17 5	<i>a</i>	ND	BT35 16	<i>a</i>	ND
BT17 6	<i>a</i>	ND	BT35 17	<i>a</i>	ND
BT17 7	<i>a</i>	ND	BT35 18	<i>a</i>	ND
BT17 8	<i>a</i>	ND	BT35 19	<i>a</i>	ND
BT17 9	<i>c</i>	ND	BT35 20	<i>a</i>	ND
BT17 10	<i>a</i>	ND	BT35 21	<i>a</i>	ND
BT17 11	<i>a</i>	ND	BT35 22	<i>a</i>	ND
BT17 12	<i>a</i>	ND	BT35 23	<i>a</i>	ND
BT17 13	<i>a</i>	ND	BT35 24	<i>a</i>	ND
BT17 14	<i>a</i>	ND	BT35 25	<i>a</i>	ND
BT17 15	<i>a</i>	ND	BT35 26	<i>a</i>	ND
BT17 16	<i>a</i>	ND	BT35 27	<i>a</i>	ND
BT17 17	<i>a</i>	ND	BT35 28	<i>b</i>	ND
BT17 18	<i>l</i>	ND	BT35 29	<i>a</i>	ND
BT17 19	<i>a</i>	ND	BT35 30	<i>a</i>	ND
BT17 20	<i>a</i>	ND	BT35 31	<i>a</i>	ND
BT17 21	<i>j</i>	ND	BT35 32	<i>a</i>	ND
BT17 22	<i>a</i>	ND	BT35 33	<i>a</i>	ND
BT17 23	<i>a</i>	ND	BT35 34	<i>a</i>	ND
BT17 24	<i>a</i>	ND	BT35 35	<i>a</i>	ND
BT17 25	<i>a</i>	ND	BT35 36	<i>a</i>	ND
BT17 26	<i>a</i>	ND	BT35 37	<i>a</i>	ND
BT17 27	<i>i</i>	ND	BT35 38	<i>a</i>	ND
BT17 28	<i>a</i>	ND	BT35 39	<i>d</i>	ND
BT17 29	<i>a</i>	ND	BT35 40	<i>a</i>	ND
BT17 30	<i>a</i>	ND	BT35 41	<i>a</i>	ND
BT17 31	<i>a</i>	ND	BT35 42	<i>c</i>	ND
BT17 32	<i>a</i>	ND	BT35 43	<i>a</i>	ND
BT17 33	<i>a</i>	ND	BT35 44	<i>a</i>	ND
BT17 34	<i>a</i>	ND	BT35 45	<i>a</i>	ND
BT17 35	<i>a</i>	ND	BT35 46	<i>a</i>	ND
BT17 36	<i>a</i>	ND	BT35 47	<i>a</i>	ND
BT17 37	<i>a</i>	ND	BT35 48	<i>a</i>	ND
BT17 38	<i>a</i>	ND	BT35 49	<i>a</i>	ND
BT17 39	<i>a</i>	ND	BT35 50	<i>a</i>	ND



majoritaire mais l'haplotype *w y* est tout de même assez fréquent. La valeur de diversité génétique,  $\hat{H}$ , ne diffère pas significativement entre les populations de Grand Passage, d'Astrolabe, et de Stylaster, ni entre celles de Lifou, d'Aramis et du Mont K. La différence est cependant significative entre ces deux ensembles.

#### *Structure géographique*

Les valeurs des  $\hat{\theta}$  par paire de populations sont présentées dans le tableau 4. La population de Grand Passage se détache nettement de celles de Lifou, Stylaster, Mont K et Aramis, avec des valeurs de  $\hat{\theta}$  très significatives ( $P < 0.001$ ). Entre Grand Passage et Astrolabe, la différence n'est pas aussi marquée, la valeur de  $\hat{\theta}$  n'étant pas significativement différente de 0 par le test des permutations, quoique significative à 5 % par le test exact de GENEPOP. Entre Astrolabe et les Monts K et Aramis, les valeurs de  $\hat{\theta}$  sont très significatives ( $P < 0.001$ ), mais pas entre Astrolabe et Lifou ni Stylaster. Entre Lifou, Stylaster, Mont K et Aramis, les  $\hat{\theta}$  ne sont pas significatifs. L'ensemble de ces résultats nous permet de rejeter l'hypothèse que ces 6 populations forment un grand ensemble panmictique. L'arbre des distances génétiques entre populations ( $\mathcal{D}$ ), non raciné, est linéaire, Mont K et Grand Passage étant aux deux extrémités. Les autres populations s'ordonnent dans l'ordre géographique (données non présentées).

La régression entre distance génétique ( $\mathcal{D}$ ) et distance géographique est positive et la corrélation entre ces deux distances (Tableau 5) est très forte (test de Mantel :  $P < 0.05$ ) (Fig. 6). Cette régression est meilleure que celle obtenue en utilisant la transformée logarithmique de la distance géographique. Les mêmes régressions ont été calculées en utilisant  $\hat{\theta} / (1 - \hat{\theta})$  (ROUSSET 1997) à la place de la distance de Reynolds et les résultats (non représentés) sont similaires à ceux obtenus précédemment. Nous observons donc un cline très marqué chez cette espèce, avec une augmentation de la distance génétique d'environ 0.65  $\mathcal{D}$  pour 1 000 km.

Les arbres phylogénétiques inférés à partir des données de séquence (voir ci-après) nous amènent à estimer à nouveau les valeurs de  $\hat{\theta}$  entre populations en considérant cette fois-ci que les échantillons consistent en un mélange d'individus de deux entités reproductivement isolées (A et W). La valeur du  $\hat{\theta}$  global est alors  $\hat{\theta} = -0.005$  pour les populations du clade A, et  $\hat{\theta} = -0.002$  pour les populations du clade W. Ces deux valeurs correspondent à une totale absence de différenciation géographique au sein de chaque clade, à l'échelle de la zone économique de la Nouvelle-Calédonie.

#### *Séquences du gène du cytochrome b*

Treize des 14 haplotypes de *B. splendens* détectés en Nouvelle-Calédonie ont été séquencés (seul, l'haplotype *e* n'a pas pu être séquencé), ainsi que 4 haplotypes détectés sur 12 individus de Nouvelle-Zélande et 4 haplotypes détectés sur 20 individus du banc de Galice, tous analysés par SSCP. Enfin, trois des individus de *Beryx* sp. échantillonnés à l'île d'Yeu ont été analysés par SSCP et ceux-ci ont montré un seul haplotype. Deux cent soixante treize paires de bases du gène du cytochrome *b* ont pu être séquencées en

**Tableau 3** *Beryx cf. splendens*. Fréquences des haplotypes SSCP dans cinq échantillons de la zone économique de la Nouvelle-Calédonie. *N* taille d'échantillon, *H* diversité génétique

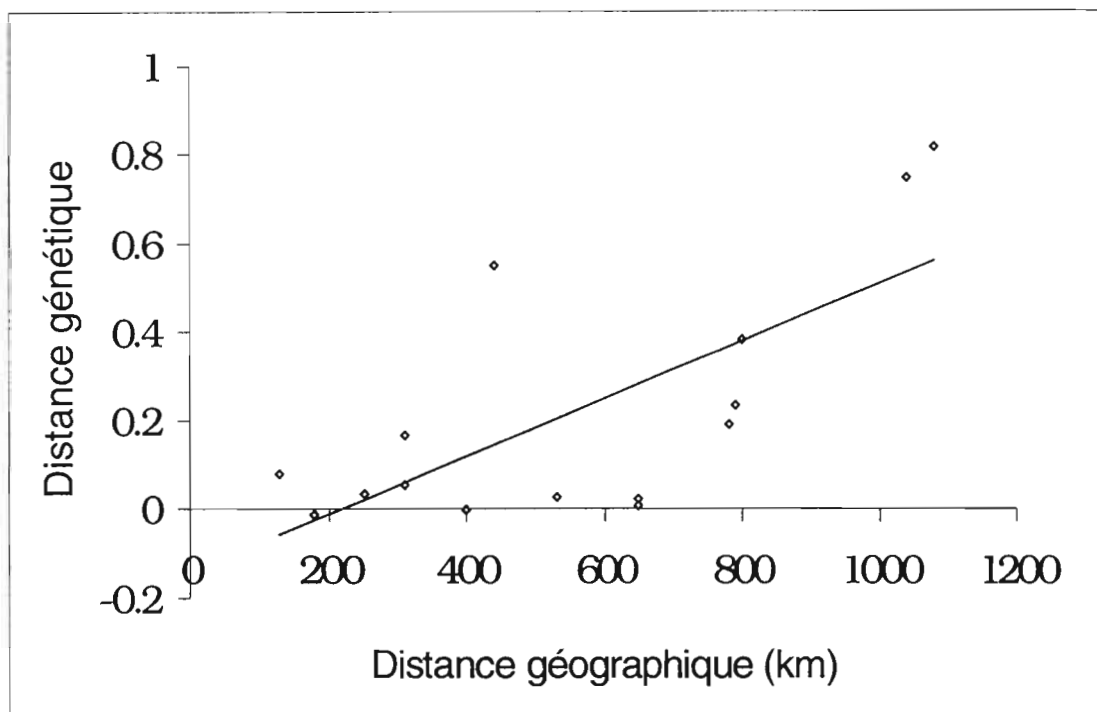
Haplotype	Echantillon					
	Grand Passage	Astrolabe	Lifou	Stylaster	Mont K	Aramis
<i>a</i>	0.27	0.57	0.83	0.67	0.90	0.92
<i>b</i>	-	-	-	-	-	0.02
<i>c</i>	-	-	-	-	0.02	0.02
<i>d</i>	-	-	-	0.02	-	0.02
<i>e</i>	-	-	-	-	-	0.02
<i>h</i>	-	-	0.02	0.02	-	-
<i>i</i>	-	-	-	0.02	0.02	-
<i>j</i>	0.06	0.03	-	0.02	0.02	-
<i>k</i>	-	-	-	0.02	-	-
<i>l</i>	-	-	-	-	0,02	-
<i>u</i>	-	0.03	-	-	-	-
<i>w</i>	0.67	0.37	0.15	0.18	-	-
<i>x</i>	-	-	-	0.02	-	-
<i>y</i>	-	-	-	0.02	-	-
<i>N</i>	33	25	40	43	49	48
<i>H</i> (écart-type)	0.49 (0.08)	0.54 (0.06)	0.29 (0.07)	0.48 (0.08)	0.20 (0.08)	0.23 (0.08)

**Tableau 4** *Beryx cf. splendens*. Valeurs estimées des  $\theta$  par paire de populations. <sup>ns</sup> non significatif, \* significatif au seuil  $\alpha=5\%$ , \*\*\* significatif au seuil  $\alpha=1\%$ , après ajustement de Bonferroni séquentiel (RICE 1989)

	Astrolabe	Lifou	Stylaster	Mont K	Aramis
Grand Passage	0.153*	0.423***	0.318***	0.559***	0.526***
Astrolabe		0.070 <sup>ns</sup>	0.027 <sup>ns</sup>	0.208***	0.175***
Lifou			-0.001 <sup>ns</sup>	0.024 <sup>ns</sup>	0.007 <sup>ns</sup>
Stylaster				0.052 <sup>ns</sup>	0.035 <sup>ns</sup>
Mont K					-0.013 <sup>ns</sup>

**Tableau 5** *Beryx cf. splendens*. *En haut* : matrice des distances génétiques  $\mathcal{D} = -\ln(1-\theta)$  (REYNOLDS, WEIR & COCKERHAM 1983) ; *en bas* : distances géographiques (en km) par paire de populations

	Grand Passage	Astrolabe	Lifou	Stylaster	Mont K	Aramis
Grand Passage		0.166	0.550	0.383	0.818	0.747
Astrolabe	310		0.080	0.027	0.233	0.192
Lifou	440	130		-0.001	0.024	0.007
Stylaster	800	530	400		0.054	0.036
Mont K	1080	790	650	310		-0.013
Aramis	1040	780	650	250	180	



**Figure 6** *Beryx cf. splendens*. Régression linéaire de la distance génétique  $\mathcal{D} = -\ln(1-\theta)$  (REYNOLDS, WEIR & COCKERHAM 1983) sur la distance géographique (test de Mantel, 5000 permutations,  $P < 0.05$ )

**Tableau 6** *Beryx cf. splendens*. Matrice des distances nucléotidiques (%) par paires d'haplotypes ( $\pi_{ij}$ ; NEI 1987) échantillonnés dans la zone économique de la Nouvelle-Calédonie (a, d, h, i, j, k, l, u, w, x, y) et comparaison avec l'haplotype de *Beryx sp.* du Golfe de Gascogne (Atl.)

	Atl.	a	d	h	i	j	k	l	u	w	x	y
a	7.353											
d	7.380	0.735										
h	7.011	1.103	0.738									
i	6.667	0.738	0.370	0.000								
j	7.807	4.461	5.224	5.597	5.243							
k	7.865	2.239	2.247	2.622	2.256	5.682						
l	6.716	0.372	0.373	0.746	0.373	4.906	1.887					
u	6.667	0.741	0.743	1.111	0.746	5.243	2.264	0.376				
w	8.487	4.797	5.556	5.926	5.576	1.119	6.015	5.243	5.576			
x	7.353	1.471	1.476	1.845	1.481	5.204	2.996	1.119	1.481	6.273		
y	7.353	0.733	0.735	1.103	0.738	5.204	2.239	0.372	0.741	5.535	1.471	

	111	111	111	111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	444	444	444	455	555	555
<i>Atl</i>	NNS	CAA	ATT	CTT	ACA	GGA	CTT	TTC	CTA	GCC	ATA	CAC	TAT	ACC	TCT	GAC	ATC	GCC	ACC
<i>a</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>d</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>h</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>i</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>j</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	T..	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>k</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>l</i>	..C	...	..M	..C	...	...	...	...	...	...	...	N..	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>u</i>	..C	...	..C	..C	...	B..	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>w</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	T..	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>x</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>y</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>bg4</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
<i>nz1</i>	..C	...	..C	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...	...	..T	...
	556	666	666	666	777	777	777	788	888	888	889	999	999	999	111	111	111	111	111
<i>Atl</i>	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	000	012	345	678	901
<i>a</i>	GCC	TTC	TCA	TCA	GTA	GCC	CAC	ATC	TGC	CGG	GAC	GWA	AAC	TAC	GGA	TGA	CTG	ATC	CGA
<i>d</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	..T	..T	...	...	...	...	..A	...	...
<i>h</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	D..T	..T	...	...	...	...	..A	...	...
<i>i</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	..T	..T	...	...	...	...	..A	...	...
<i>j</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	..V	..BN	V..	...	...	...	..A	...	...
<i>k</i>	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	..A	..T	..T	...	...	...	...	..A	...	...
<i>l</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	..T	..T	...	...	...	...	..A	...	...
<i>u</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	V..T	...	...	...	...	...	..A	...	...
<i>w</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..H	..T	...	..C	...	...	...	..A	...	...
<i>x</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	..G	...	..A	...	...
<i>y</i>	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	..A	..T	..T	...	...	...	...	..A	...	...
<i>bg4</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	..T	..T	...	...	...	...	..A	...	...
<i>nz1</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	..T	..T	..N	...	...	...	..A	...	...
	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
<i>Atl</i>	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	444	567	890	123	456	789	012	345	678
<i>a</i>	AAC	CTG	CAC	GCC	AAC	GGA	GCA	TCC	GTC	TTC	TTC	ATC	TGC	ATT	TAC	ATG	CAC	ATC	GCC
<i>d</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..C	...	..A	...	...	...	...
<i>h</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..C	...	..A	...	...	...	...
<i>i</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..C	...	..A	...	...	...	...
<i>j</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	..C	...	..A	...	..T	..T	...
<i>k</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..C	...	..A	...	...	...	...
<i>l</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..C	...	..A	...	...	...	...
<i>u</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..C	...	..A	...	...	...	...
<i>w</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	..C	...	..A	..T	..T	...	...
<i>x</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..T	...	...	C..	...	..C	...	..A	...	...	...	...
<i>y</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..C	...	..A	...	...	...	...
<i>bg4</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..C	...	..G	...	...	...	...
<i>nz1</i>	...	..A	..T	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	..C	...	..A	...	...	...	...
	111	111	111	111	111	111	111	111	111	122	222	222	222	222	222	222	222	222	222
<i>Atl</i>	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678
<i>a</i>	CGA	GGA	CTA	TAC	TAC	GGC	TCC	TAC	CTC	TAT	AAA	GAA	ACC	TGA	AAC	ACC	GGA	GTA	GTT
<i>d</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	N..	...	...	..G	...	..C	...
<i>h</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	..C	...	..C	...
<i>i</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	W..	...	...	...	...	..K	...	..C	...
<i>j</i>	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	..C	...	...	...	...	...	...	...	..A	..C
<i>k</i>	...	..C	...	...	...	...	...	..M	...	...	...	...	..M	...	...	...	R..	B..C	...
<i>l</i>	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	W..	...	...	...	...	...	...	R..	..C	...
<i>u</i>	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...
<i>w</i>	...	...	...	...	...	...	...	..A	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	..C
<i>x</i>	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...
<i>y</i>	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...
<i>bg4</i>	...	...	...	W..	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	..W	...	..C	...
<i>nz1</i>	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	..N	...	...	N..	...	...	...	...	..C	...
	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222
<i>Atl</i>	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345
<i>a</i>	CTA	CTC	CTG	CTA	GTA	ATA	ATA	ACC	GCT	TTC	GTA	GGC	TAT	GTT	CTT	...	...	...	...
<i>d</i>	...	...	..A	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	...	...	...
<i>h</i>	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	...	...	...
<i>i</i>	...	...	..A	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	...	...	...
<i>j</i>	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	..C	..A	...	...	...	...	...
<i>k</i>	M..	...	..A	...	A..T	...	...	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	...	...	...
<i>l</i>	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	...	...	...
<i>u</i>	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	...	...	...
<i>w</i>	...	...	..A	...	..G	...	...	...	...	...	...	..T	..C	..A	..C	...	...	...	...
<i>x</i>	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	...	...	...
<i>y</i>	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	...	...	...
<i>bg4</i>	...	...	...	...	...	..M	...	..YY	..NN	..NNN	..NNN	..NNN	..NNN	..NNN	..NNN	...	...	...	...
<i>nz1</i>	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	...	...	...

**Figure 7** *Beryx cf. splendens*. Séquences partielles de 11 haplotypes de Nouvelle-Calédonie (*a*, *d*, *h*, *i*, *j*, *k*, *l*, *u*, *w*, *x*, *y*), d'un haplotype du banc de Galice (*bg4*) et d'un haplotype de la ride de Chatham (*nz1*), comparées à celle de l'haplotype de *Beryx* sp. échantillonné dans le Golfe de Gascogne (*Atl*). Ambiguïtés : M = A ou C, R = A ou G, W = A ou T, K = G ou T, V = A ou C ou G, H = A ou C ou T, D = A ou G ou T, B = C ou G ou T, N = A ou C ou G ou T, S = C ou G, Y = C ou T

totalité ou en quasi-totalité pour 11 haplotypes de Nouvelle-Calédonie, un haplotype de la ride de Chatham, un haplotype du banc de Galice, et l'haplotype unique de *Beryx* sp. du Golfe de Gascogne (Fig. 7). Les haplotypes *b* et *c* de Nouvelle-Calédonie ne sont pas représentés en figure 7 pour la raison que leurs séquences partielles sont identiques à celle de l'haplotype *y*. Nous observons que les 16 séquences s'alignent parfaitement et qu'il n'y a aucune insertion ni délétion.

Les distances nucléotidiques (NEI 1987) ont été estimées pour toutes les paires d'haplotypes de Nouvelle-Calédonie (Tableau 6). Les topologies des arbres inférés à l'aide des algorithmes de *Neighbor-Joining*, de parcimonie et de maximum de vraisemblance, sont similaires. La figure 8 présente l'arbre de *Neighbor-Joining*, non raciné, des haplotypes de *Beryx splendens* échantillonnés en Nouvelle-Calédonie et de l'haplotype de *Beryx* sp. du Golfe de Gascogne. Tout comme les deux autres, cet arbre présente deux clades bien soutenus chez *B. splendens*, l'un (W) comprenant les haplotypes *w* et *j* et l'autre (A), les haplotypes *a*, *d*, *h*, *i*, *k*, *l*, *u*, *x* et *y*. Dans ce dernier clade, les branches sont courtes et les relations entre haplotypes sont mal résolues. Les deux clades sont séparés par une distance correspondant à 4.0 - 6.2 % de divergence nucléotidique.

Cette topologie d'arbre et ces valeurs de divergence nucléotidique sont très inhabituelles, sinon inconnues à l'échelle infra-spécifique chez les poissons marins (voir p. ex. GRANT & BOWEN 1998). Avant d'engager une discussion des interprétations possibles de telles données, il convient de s'assurer que les fragments d'ADN amplifiés sont bien de l'ADNmt et non des pseudo-gènes insérés dans le génome nucléaire (A.J. BAKER, A. MEYER, communications personnelles), comme cela a pu être observé chez certains vertébrés (LOPEZ *et al.* 1994 ; COLLURA & STEWART 1995 ; SORENSON & FLEISCHER 1996 ; GREENWOOD & PÄÄBÖ 1999). Sous l'hypothèse qu'un des deux clades observés serait en fait un pseudo-gène, on s'attend à ce que l'accumulation des mutations s'y soit faite au hasard, c'est-à-dire en échappant aux contraintes liées à l'expression d'un gène mitochondrial et au maintien de sa fonctionnalité. Parmi ces contraintes, il y a la nécessité de respecter le code génétique de l'ADNmt (lequel est partiellement différent du code génétique nucléaire), l'absence d'insertions ou de délétions, l'absence de codons de fin de transcription (codons-stops) et une fréquence plus élevée des mutations synonymes que des mutations conduisant à un changement d'acide aminé. Au passage, on peut se demander pourquoi ce pseudo-gène serait amplifié, et lui seulement, chez certains individus et pas d'autres, et pourquoi il y aurait un gradient géographique marqué dans la présence de ce pseudo-gène. Toutes les séquences ont été traduites à l'aide du logiciel MEGA (KUMAR, TAMURA & NEI 1993) en utilisant le code génétique mitochondrial de la drosophile. Aucun codon-stop n'est présent et la majorité des mutations sont en position 3 du codon, c'est-à-dire qu'elles ne modifient pas (mutations synonymes), ou rarement, la séquence d'acides aminés de la protéine. Nous pouvons donc rejeter l'hypothèse du pseudo-gène.

### *Polymorphismes anonymes (DALP)*

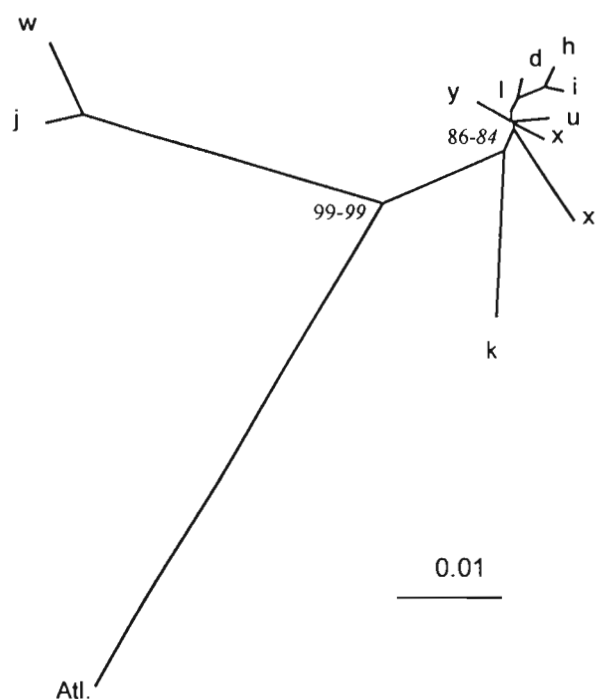
Les données obtenues à l'aide de 5 paires d'amorces DALP consistent en des *patterns* de présence / absence de produit d'amplification d'une longueur donnée, ou bien en des polymorphismes de longueur présumés, pour 25 individus d'haplotype mitochondrial de type *a* (dont deux ont été analysés avec les 5 paires d'amorces, 5 avec les amorces *DALP231*, *DALP232* et *DALP233*, et 18 avec les amorces *DALP234* et *DALP241*) et 10 individus d'haplotype mitochondrial de type *w* (dont 3 analysés avec les 5 paires d'amorces, et 7 avec les amorces *DALP234* et *DALP241*) (voir Fig. 9). Les résultats de polymorphisme DALP sont résumés au tableau 7. Sur 20 locus DALP présumés, quatre seulement présentent des polymorphismes partagés entre les individus de type *a* et ceux de type *w*, dont deux seulement se traduisent par l'occurrence de phénotypes identiques dans les échantillons d'individus de chacun des deux types.

## DISCUSSION

La phylogénie des haplotypes du gène du cytochrome *b* chez *Beryx splendens* des monts sous-marins de Nouvelle-Calédonie montre l'existence de deux lignées mitochondriales distinctes, séparées l'une de l'autre par une divergence nucléotidique de 4 % à 6 %. En faisant l'hypothèse d'une horloge moléculaire avec un taux de divergence nucléotidique de 0.5 % à 2 % par million d'années (MA) (AVISE, WALKER & JOHNS 1998), ces deux lignées mitochondriales pourraient avoir divergé il y a 2 MA à 12 MA. En fait, *B. splendens*, étant une espèce poïkilotherme d'habitat froid, à temps de génération long (LEHODEY & GRANDPERRIN 1996 ; LEHODEY, GRANDPERRIN & MARCHAL 1997), à croissance lente (GAULDIE 1995 ; LEHODEY & GRANDPERRIN 1996 ; ANIBAL *et al.* 1998) et présumément à métabolisme lent, présente toutes les caractéristiques des vertébrés dont l'ADN mitochondrial évolue particulièrement lentement (MARTIN & PALUMBI 1993 ; RAND 1994). Ainsi, la borne inférieure du taux de divergence moléculaire proposé par AVISE, WALKER & JOHNS (1998), soit 0.5 % / MA, pourrait être encore supérieure à la réalité. La présence en sympatrie de deux lignées mitochondriales phylogénétiquement distantes conduit à envisager deux hypothèses : (1) le mélange dans les échantillons de deux espèces jumelles, ou (2) la remise en contact récente de populations géographiquement séparées au cours des temps géologiques (SOLIGNAC *et al.* 1995).

### *Hypothèse (1) : espèces jumelles*

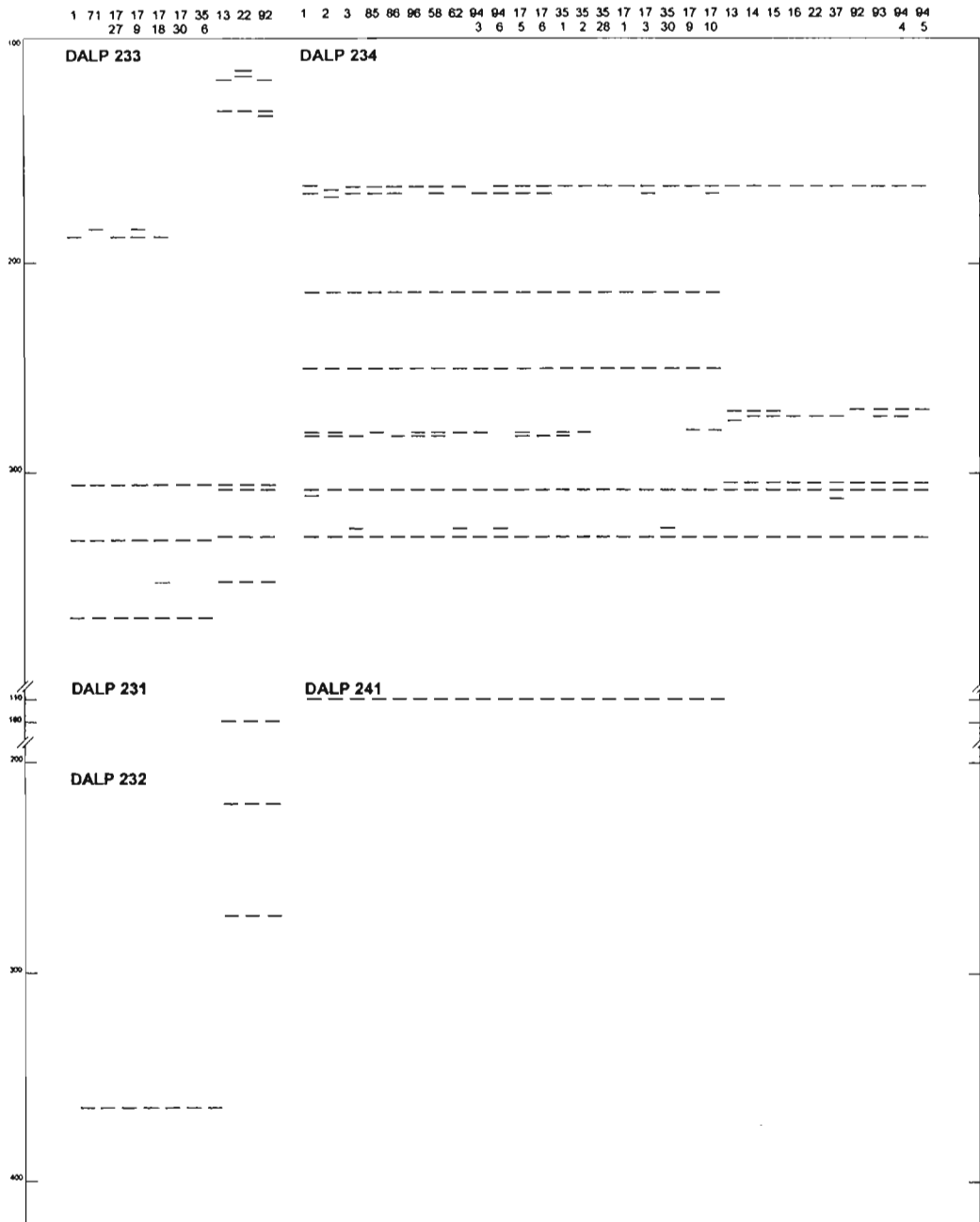
Par espèces jumelles, on entend : espèces biologiques, morphologiquement identiques ou suffisamment semblables pour avoir été réunies par la taxonomie au sein d'une seule espèce morphologique (MAYR 1942). L'existence d'espèces jumelles est un fait d'observation courante chez les organismes marins, en particulier les organismes de



**Figure 8** *Beryx cf. splendens*. Arbre de Neighbor-Joining (NJ), non raciné, des séquences de 11 haplotypes de Nouvelle-Calédonie, et de l'haplotype de *Beryx* sp. du Golfe de Gascogne (*Atl.*). Les chiffres pour un nœud donné indiquent les proportions (en %) d'arbres montrant ce nœud sur 2000 arbres inférés (*caractères droits* : NJ ; *italiques* : parcimonie) après rééchantillonnage aléatoire (*bootstrap*) des sites nucléotidiques. Seuls les scores de *bootstrap* > 60% sont présentés. Le trait d'échelle représente 1% de divergence nucléotidique

**Tableau 7** *Beryx cf. splendens*. Polymorphismes de longueur anonymes (nombre de bandes d'une longueur donnée après migration, dans un gel de polyacrylamide dénaturant, des produits de réaction PCR) observés chez les individus dont l'extrait d'ADN total a été amplifié à l'aide de 5 paires d'amorces DALP, et présentés en fonction de leur haplotype au locus du cytochrome *b* (*a* ou *w*). Au total, 20 bandes ou niveaux de bande suffisamment intenses ont été retenus, dont 16 sont diagnostiques de l'un ou l'autre haplotype, et 4 sont partagés. Les données brutes correspondantes sont rassemblées en figure 9

Phénotypes observés	Paire d'amorces PCR				
	<i>DALP231</i>	<i>DALP232</i>	<i>DALP233</i>	<i>DALP234</i>	<i>DALP241</i>
<b>Monomorphismes de longueur :</b>					
présents chez <i>a</i> uniquement	-	1	2	2	1
présents chez <i>w</i> uniquement	1	2	2	-	-
partagés	-	-	-	-	-
<b>Polymorphismes de longueur :</b>					
présents chez <i>a</i> uniquement	-	-	1	1	-
présents chez <i>w</i> uniquement	-	-	2	1	-
partagés	-	-	1	3	-



**Figure 9** *Beryx cf. splendens*. Représentation schématique et synthétique des profils de migration sur gel de polyacrylamide des produits d'amplification de l'ADN génomique total obtenus avec 5 paires d'amorces *DALP* (*DALP* 231, 232, 233, 234 et 241). Les numéros en tête du schéma sont ceux des individus (voir Tableau 2) ; les cotes sur la gauche indiquent les distances de migration (en mm) à partir de la ligne de chargement du gel.



profondeur (KNOWLTON 1993 ; CREASEY & ROGERS 1999). L'isolement reproducteur entre deux espèces biologiques peut résulter de mécanismes pré-zygotiques (décalage des dates de ponte, ségrégation des habitats au moment de la reproduction, barrières comportementales, non-reconnaissance des gamètes) ou post-zygotiques (sélection contre les descendants hybrides). Dans ce dernier cas, l'isolement est incomplet mais le maintien à long terme de deux entités biologiques distinctes suppose que la valeur sélective des hybrides est inférieure à celle des types parentaux.

Selon cette première hypothèse, l'observation d'un cline des fréquences haplotypiques (Fig. 6) traduirait un cline de présence / absence des deux espèces (appelons-les provisoirement *Beryx* cf. *splendens* sp. A et *B.* cf. *splendens* sp. W). Ce cline pourrait correspondre à une zone de contact, peut-être une zone d'hybridation le long d'un habitat (ride océanique) *grosso modo* orienté Nord-Sud. Le gradient Nord-Sud observé pourrait cependant masquer un gradient de la profondeur moyenne d'échantillonnage, difficile à mettre en évidence du fait que les seules données dont nous disposons sont les profondeurs minimale et maximale de la pose de la palangre et du trait de chalut de fond (Tableau 1). Le gradient géographique des fréquences des haplotypes caractéristiques des deux espèces serait alors artéfactuel, et les deux espèces pourraient être considérées comme sympatriques, mais non syntopiques, chacune ayant son *preferendum* bathymétrique, au moins durant la période de reproduction. L'une des deux espèces (*B.* cf. *splendens* sp. W) a été échantillonnée en Nouvelle-Calédonie exclusivement, en particulier dans le Nord de la zone prospectée. Cette espèce est caractérisée au locus du cytochrome *b* par l'haplotype *w* ou par l'haplotype *j*, qui diffère du premier par deux substitutions nucléotidiques (sur 273 pb). L'autre espèce, *B.* cf. *splendens* sp. A, a été échantillonnée en Nouvelle-Calédonie, sur la ride de Chatham au large de la Nouvelle-Zélande, et sur le banc de Galice dans l'Atlantique Nord-Est. Cette espèce est caractérisée par l'haplotype *a* ou par l'un des nombreux variants qui lui sont apparentés (*c, d, h, i, k, l, u, x, y, bg4, nz1* ; Fig. 7). Aucune hétérogénéité dans la distribution des fréquences alléliques n'a été observée, au sein de chaque espèce, à l'échelle de la zone économique de la Nouvelle-Calédonie. La divergence nucléotidique de *B.* cf. *splendens* sp. A observée à l'échelle inter-océanique est du même ordre que la divergence observée à l'échelle locale. La similarité de séquence entre l'haplotype *bg4* échantillonné en Atlantique et les autres haplotypes du clade A, échantillonnés en Nouvelle-Zélande et en Nouvelle-Calédonie (Fig. 7), suggère que les populations de *B.* cf. *splendens* sp. A ont une histoire commune récente à l'échelle inter-océanique et implique un niveau de flux génique élevé à cette échelle géographique. Le maintien d'une telle homogénéité génétique à l'échelle mondiale est un résultat significatif, si l'on excepte les exemples d'introductions volontaires (espèces élevées ou cultivées) ou involontaires, en liaison avec le développement des transports aérien et maritime (moustique *Culex pipiens* : RAYMOND *et al.* 1991 ; moule *Mytilus galloprovincialis* : MCDONALD & KOEHN 1988 ; GELLER, CARLTON & POWERS 1994). Notons cependant que quelques-uns des poissons de profondeur ayant fait l'objet d'études génétiques de leurs populations présentent des

caractéristiques similaires à l'espèce *B. cf. splendens* sp. A, à savoir une remarquable homogénéité génétique à l'échelle inter-océanique (grenadier *Coryphaenoides armatus* : WILSON & WAPLES 1984 ; empereur *Hoplostethus atlanticus* : ELLIOTT, SMOLENSKI & WARD 1994).

Selon la taxonomie actuelle, le genre *Beryx* Cuvier, 1829 comprend deux espèces, *B. decadactylus* Cuvier, 1829 et *B. splendens* Lowe, 1834, toutes deux à répartition mondiale (BUSAKHIN 1982 ; HEEMSTRA 1986 ; FROESE & PAULY 1995). La taxonomie existante reflète notre perception des distances morphologiques entre échantillons (souvent réduits à quelques types conservés empaillés ou dans le formol !) or il est fort possible que la distance morphologique entre espèces au sein des Berycidae soit bien plus faible que chez d'autres groupes. En effet, cette famille est connue pour son extrême conservatisme morphologique (le genre *Beryx* est ainsi connu depuis le Crétacé), qui pourrait refléter un ajustement très précis à des conditions écologiques restées stables au cours des temps géologiques (WILLIAMS 1992). Nos résultats amèneraient ainsi à la révision de la taxonomie de *B. splendens* en reconnaissant que ce taxon renferme au moins deux espèces biologiques.

Les données de divergence nucléotidique (Tableau 6) montrent que la distance moléculaire entre l'haplotype de *Beryx* sp. échantillonné dans le Golfe de Gascogne et l'une ou l'autre des lignées mitochondriales échantillonnées en Nouvelle-Calédonie (environ 7 % à 9 %) est du même ordre que la distance qui sépare ces deux dernières. Sous l'hypothèse, toujours, de l'existence sympatrique de deux espèces jumelles de *Beryx* cf. *splendens* en Nouvelle-Calédonie, cette observation nous conduit à admettre que l'espèce échantillonnée dans le Golfe de Gascogne serait elle-même différente. Le *Beryx* sp. échantillonné dans le Golfe de Gascogne pourrait être *B. decadactylus*, ou bien une espèce de *Beryx* inconnue à ce jour, mais il ne peut s'agir d'aucune des deux espèces de *B. cf. splendens* échantillonnées en Nouvelle-Calédonie.

#### *Hypothèse (2) : une seule espèce très structurée*

La seconde hypothèse est qu'une seule espèce serait présente en Nouvelle-Calédonie et que la phylogénie dichotomique traduirait la remise en contact récente (eu égard au pas de temps nécessaire à l'équilibre mutation / dérive) de deux lignées mitochondriales qui auraient divergé par isolement géographique. (2.1) Sous l'hypothèse supplémentaire que la distribution géographique des fréquences haplotypiques reflète l'état d'équilibre entre flux génique et dérive génétique, le cline abrupt observé signifierait soit un taux de migration efficace extrêmement réduit, soit des tailles efficaces de population extrêmement faibles, soit les deux. (2.2) Dans le cas inverse, la remise en contact des deux lignées mitochondriales serait trop récente par rapport au temps nécessaire pour atteindre l'équilibre migration / dérive, et il faudrait alors admettre que la zone échantillonnée coïncide précisément avec la zone de contact entre les deux lignées.

Bien qu'il soit impossible, sur la seule base des données mitochondriales, de rejeter l'hypothèse (2) et l'une ou l'autre de ses implications selon que l'équilibre migration / dérive est établi ou non, celles-ci sont peu étayées comme il est montré dans ce qui suit.

Il est important de noter que chez *Beryx splendens*, l'échelle des différences génétiques est de l'ordre de quelques centaines de km. Chez les espèces marines à longue phase larvaire et présentant ce type de différence croissant avec la distance, le taux de divergence est bien moindre. Ainsi, chez la sole *Solea vulgaris*, la valeur estimée de  $\mathcal{D}$  augmente linéairement avec la distance géographique, à raison de 0.01 pour 1 000 km de la Manche à la Mer Egée (KOTOULAS, BONHOMME & BORSA 1995 ; BORSA *et al.* 1997). Chez les populations insulaires du poisson-chirurgien *Acanthurus triostegus* des Iles de la Société et des Tuamotu-Gambier (Polynésie française),  $\mathcal{D}$  tend à augmenter avec la distance inter-îles à raison de 0.03 pour 1 000 km (PLANES *et al.* 1994). Chez le flet atlantique, *Platichthys flesus flesus*, la valeur estimée de  $\mathcal{D}$  augmente de 0.008 tous les 1 000 km (BORSA, BLANQUER & BERREBI 1997 ; P. BORSA, données non publiées). La même approche, utilisée chez les bivalves *Ostrea edulis* et *Ruditapes decussatus* aboutit à des résultats semblables (SAAVEDRA *et al.* 1993 ; BORSA *et al.* 1994 ; LAUNEY 1998 ; P. BORSA, données non publiées). Ces études ont toutefois porté sur les données de fréquences alléliques à des locus nucléaires (allozymes et microsattellites). A notre connaissance, les seules données équivalentes à partir de marqueurs mitochondriaux ont été publiées chez l'étoile de mer *Linckia laevigata*, espèce dont la phase larvaire, pélagique, est de durée comparable à celle de *Beryx splendens* (de l'ordre du mois). Chez cette espèce, la différenciation génétique croît avec la distance géographique à raison de 0.03  $\mathcal{D}$  pour 1 000 km (WILLIAMS & BENZIE 1998).

Chez *Beryx splendens*, l'augmentation de  $\mathcal{D}$  est de ~0.4 pour 600 km : la pente du cline géographique des fréquences alléliques est d'un ordre de grandeur dix à cent fois supérieur à celui des espèces citées ci-dessus. L'hypothèse (2.1) de l'isolement par la distance est donc difficile à admettre pour cette raison, mais aussi parce qu'elle est incompatible avec le très faible taux de divergence nucléotidique observé dans l'un des deux clades (le clade A) entre haplotypes du cytochrome *b* échantillonnés aux antipodes (p. ex. les haplotypes *i* et *bg4* de la Fig. 7).

L'hypothèse (2.2) selon laquelle le cline des fréquences haplotypiques constituerait un état transitoire suppose que l'étude a été entreprise à l'endroit même de la remise en contact, et que cette dernière est très récente. Dans quelques cas bien documentés d'expansion des aires de distribution d'espèces marines, on peut estimer que la vitesse de colonisation est de l'ordre de 10-100 km/génération (PALMER & STRATHMANN 1981), ce qui est très rapide et rend l'hypothèse (2.2) d'autant moins vraisemblable.

#### *Apport des marqueurs nucléaires*

L'analyse génotypique à un ou plusieurs locus nucléaires permettrait de départager les scénarios en concurrence. Selon l'hypothèse (1) (deux espèces biologiques), on s'attend à ce que les génotypes nucléaires ne soient pas répartis au hasard dans l'une ou l'autre des

deux classes (A ou W) définies en fonction de l'haplotype mitochondrial, et que les individus présumés hétérozygotes entre allèles fixés dans l'un ou l'autre type soient absents ou rares. Selon l'hypothèse (2.1), on s'attend à ce qu'il n'y ait à l'échelle locale aucune corrélation entre génotype nucléaire et haplotype mitochondrial et que les fréquences génotypiques nucléaires soient conformes aux attendus du modèle de Hardy-Weinberg. Selon l'hypothèse (2.2), l'équilibre migration / dérive n'est pas encore atteint, et on s'attend à observer un gradient de déséquilibres [de Hardy-Weinberg, génotypique (WEIR 1990), nucléo-cytoplasmique (ASMUSSEN & ARNOLD 1991)] parallèle au cline des fréquences haplotypiques.

Les données de polymorphisme DALP tendent à confirmer que les deux lignées mitochondriales de *B. cf. splendens* correspondent bien à deux espèces reproductivement isolées. Sous la réserve que les fragments d'ADN amplifiés par les DALP sont bien d'origine nucléaire, le déséquilibre de liaison total entre haplotypes et marqueurs DALP (ceci à un certain nombre de locus DALP présumés) signifie qu'il n'y a aucune recombinaison entre ces marqueurs conformément aux attendus de l'hypothèse (1) ci-dessus, et contrairement à l'hypothèse (2).

### Conclusion

L'identification de deux espèces au sein de *Beryx cf. splendens* aura des implications évidentes sur la systématique et la taxonomie du genre *Beryx*. La gestion de sa pêche dans la zone économique de Nouvelle-Calédonie et peut-être ailleurs dans le monde devra prendre en compte ces nouvelles données.

Aucune hétérogénéité n'a pu être détectée à l'échelle régionale entre populations au sein de chacune des deux espèces, mais les tailles d'échantillon sont probablement insuffisantes pour détecter de faibles niveaux de différenciation géographique. L'espèce *Beryx cf. splendens* sp. A présente peu de différences entre séquences échantillonnées aux antipodes, ce qui est synonyme de flux génique à l'échelle inter-océanique et concorde avec l'absence de différenciation à l'échelle régionale.

Nous envisageons maintenant (i) de décrire à nouveau les deux espèces de *Beryx cf. splendens* à partir de leurs caractéristiques génétiques (p. ex. leur haplotype au locus du cytochrome *b*), (ii) de rechercher des critères morphométriques diagnostiques pour l'identification de chaque espèce, (iii) d'approfondir l'étude génétique des populations dans la zone de sympatrie entre les deux espèces en utilisant des marqueurs nucléaires.

**Remerciements** - Les prélèvements qui ont servi de base à ce travail ont été effectués lors de campagnes halieutiques réalisées dans le cadre du programme ZoNéCo d'évaluation des ressources marines de la zone économique de Nouvelle-Calédonie. Nous exprimons notre gratitude aux responsables de ce programme qui ont autorisé la valorisation scientifique des opérations de pêche exploratoire. Les analyses moléculaires ont été réalisées entre février 1998 et mars 1999 au laboratoire Génome, Populations, Interactions (UPR 9060 du CNRS / URM 16 de l'IFREMER) de la Station marine de l'Environnement littoral (Université Montpellier 2) à Sète ; celles-ci ont été financées sur l'action budgétée n° 632740 de l'IRD (ex-ORSTOM) et sur les fonds propres du laboratoire Génome, Populations, Interactions. Nous remercions Ramón GARCIA

CANCELA et Carmen G. PIÑEIRO ALVAREZ de l'*Instituto Español de Oceanografía* de Vigo (Espagne) et Pascal LORANCE de l'IFREMER pour l'échantillonnage des béryx du banc de Galice, ainsi que Claire DAGUIN pour l'obtention de béryx atlantiques supplémentaires, Malcom CLARK et Dianne TRACEY du *National Institute of Water and Atmospheric Research* de Kilbirnie, Nouvelle-Zélande, qui ont organisé l'échantillonnage des béryx sur la ride de Chatham lors d'une campagne du N.O. *Tangaroa*, Cécile PERRIN pour son aide précieuse lors du séquençage et du traitement des données de séquence, Sophie ARNAUD pour sa participation à la mise au point de marqueurs mitochondriaux chez le béryx, Emmanuel DOUZERY pour ses conseils avisés, Michel RAYMOND et Costas TSIGENOPOULOS pour de fréquentes discussions, Patrick LEHODEY et Jacques PANFILI pour leur aide bibliographique, et Anne-Sophie GILBERT, Bertrand RICHER DE FORGES et Gérard RINAUDO pour la relecture du manuscrit.

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANIBAL J, ESTEVES E, KRUG H, MARQUES DA SILVA H (1998) Age and growth in the alfoncino, *Beryx splendens* (Berycidae) from the Azores (central eastern Atlantic). *Italian Journal of Zoology*, **65** (suppl.), 215-218.
- ASMUSSEN MA, ARNOLD J (1991) The effects of admixture and population subdivision on cytonuclear disequilibria. *Theoretical Population Biology*, **39**, 273-300.
- AVISE JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, London, 511 p.
- AVISE JC, ARNOLD J, BALL RM, BIRMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA, SAUNDERS NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489-522.
- AVISE JC, WALKER D, JOHNS GC (1998) Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **265**, 1707-1712.
- BAKER CS, PERRY A, CHAMBERS GK, SMITH PJ (1995) Population variation in the mitochondrial cytochrome *b* gene of the orange roughy *Hoplostethus atlanticus* and the hoki *Macruronus novaezelandiae*. *Marine Biology*, **122**, 503-509.
- BELKHIR K, BORSA P, GOUDET J, CHIKHI L, BONHOMME F (1996) *GENETIX v. 3.0, Logiciel sous WINDOWS™ pour la Génétique des Populations*. Laboratoire Génome et Population, Université Montpellier 2, Montpellier.
- BORSA P, BLANQUER A, BERREBI P (1997) Genetic structure of the flounders *Platichthys flesus* and *P. stellatus* at different geographic scales. *Marine Biology*, **129**, 233-246.
- BORSA P, COUSTAU C (1996) Single-stranded DNA conformation polymorphism at the *Rdl* locus in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Heredity*, **76**, 124-129.
- BORSA P, JARNE P, BELKHIR K, BONHOMME F (1994) Genetic structure of the palourde *Ruditapes decussatus* L. in the Mediterranean. In: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (ed. BEAUMONT AR), pp. 103-113. Chapman & Hall, London.
- BORSA P, NACIRI M, BAHRI L, CHIKHI L, GARCÍA DE LEÓN FJ, KOTOULAS G, BONHOMME F (1997) Zoogéographie infra-spécifique de la mer Méditerranée: analyse des données génétiques populationnelles sur seize espèces atlanto-méditerranéennes (poissons et invertébrés). *Vie et Milieu*, **47**, 295-305.
- BOURSOT P, BONHOMME F (1986) Génétique et évolution du génome mitochondrial des mézoaires. *Génétique, Sélection, Evolution*, **18**, 73-98.
- BURTON RS (1983) Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. *Marine Biology Letters*, **4**, 193-206.
- BUSAKHIN SV (1982) Systematics and distribution of the family Berycidae (Osteichthyes) in the world ocean. *Journal of Ichthyology (USSR)*, **22**, 1-21.
- CABOT EL, BECKENBACH AT (1989) Simultaneous editing of multiple nucleic acid and protein sequences with ESEE. *Computer Applications in the Biosciences*, **5**, 233-234.
- CARVALHO GR, HAUSER L (1994) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **4**, 326-350.
- COLLURA R, STEWART C (1995) Insertions and duplications of mitochondrial DNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids. *Nature*, **378**, 485-489.
- CREASEY SS, ROGERS AD (1999) Population genetics of bathyal and abyssal organisms. *Advances in Marine Biology*, **35**, 1-151.

- DESMARAIS E, VIGNERON S, BURESI C, ROIZES G (1995) *Détection du Polymorphisme dans l'ADN. Applications en Biologie et Médecine Diagnostique, Epidémiologique, et Pronostique*. INSERM, Paris, 185 p.
- DESMARAIS E, LANNELUC I, LAGNEL J (1998) Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Research*, **26**, 1458-1465.
- DE VIENNE D (1997) *Les Marqueurs Moléculaires et leurs Applications*. CNED, Rennes, 119 p.
- ELLIOTT NG, SMOLENSKI AJ, WARD RD (1994) Allozyme and mitochondrial DNA variation in orange roughy, *Hoplostethus atlanticus* (Teleostei: Trachichthyidae): little differentiation between Australian and North Atlantic populations. *Marine Biology*, **119**, 621-627.
- EYRE-WALKER A, SMITH NH, MAYNARD SMITH J (1999) How clonal are human mitochondria? *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **266**, 477-483.
- FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
- FELSENSTEIN J (1993) *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) v. 3.5*. University of Washington, Seattle WA.
- FROESE R, PAULY D (eds.) (1995) *FishBase. A Biological Database on Fish Concepts, Design and Data Sources*. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila.
- GAULDIE RW (1995) Biological history and estimation from the zones, checks and microincrements of the otolith of the alfonsin, *Beryx splendens* (Berycidae). *Cybium*, **19**, 107-129.
- GELLER JB, CARLTON JT, POWERS DA (1994) PCR-based detection of mtDNA haplotypes of native and invading mussels on the northeastern Pacific coast: latitudinal pattern of invasion. *Marine Biology*, **119**, 243-249.
- GRANDPERRIN R, BARGIBANT G, MENO J-L (1995) Campagne HALICAL 1 de pêche à la palangre de fond dans le Nord et sur la ride des Loyauté, en Nouvelle-Calédonie. *Conventions Sciences de la Mer, Biologie Marine (ORSTOM, Nouméa)*, **12**, 1-67.
- GRANDPERRIN R, FARMAN R, LORANCE P, JOMESSY T, HAMEL P, LABOUTE P, LABROSSE P, RICHER DE FORGES B, SERET B, VIRLY S (1997) *Campagne HALIPRO 2 de Chalutages Exploratoires Profonds dans le Sud de la Zone Economique de Nouvelle-Calédonie (R.V. Tangaroa, 4-28 Novembre 1996)*. Programme ZoNéCo d'évaluation des ressources marines de la zone économique de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, 150 p.
- GRANT WS, BOWEN BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, **89**, 415-426.
- GREENWOOD AD, PÄÄBÖ S (1999) Nuclear insertion sequences of mitochondrial DNA predominate in hair but not in blood of elephants. *Molecular Ecology*, **8**, 133-137.
- HAGELBERG E, GOLDMAN N, LIO P, WHELAN S, SCHIEFENHÖVEL W, CLEGG JB, BOWDEN DK (1999) Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, **266**, 485-492.
- HAYASHI K (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications*, **1**, 34-38.
- HAYASHI K (1992) PCR-SSCP – rapid and easy detection of DNA-sequence changes. *Human Cell*, **5**, 180-184.
- HEDGECOCK D (1986) Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bulletin of Marine Science*, **39**, 550-564.
- HEDGECOCK D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? *In: Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (ed. BEAUMONT AR), pp. 122-134. Chapman & Hall, London.
- HEEMSTRA PC (1986) Berycidae. *In: Smith's Sea Fishes* (eds. SMITH MM, HEEMSTRA PC), pp. 409-410. Springer Verlag, Berlin.
- HENIN C (1994) Rapport des données physiques de la campagne ZoNéCo-1 à bord du N.O. L'ATALANTE du 26 juin au 15 juillet 1993. *Rapports et Missions Scientifiques à la Mer, Océanographie Physique (ORSTOM, Nouméa)*, **11**, 1-62.
- IVANIN NA (1987) On the discovery of a juvenile beryx-alfosino, *Beryx splendens*, in the region of the North Australian trough of the Indian Ocean. *Journal of Ichthyology (USSR)*, **27**, 171-172.
- KNOWLTON N (1993) Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 189-216.

- KOCHER TD, THOMAS WK, MEYER A, EDWARDS SV, PÄÄBO S, VILLABLANCA FX, WILSON AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **86**, 6196-6200.
- KOEHN RK, HILBISH TJ (1987) The adaptative importance of genetic variation. *American Scientist*, **75**, 134-141.
- KOTOULAS G, BONHOMME F, BORSA P (1995) Genetic structure of the common sole *Solea vulgaris* at different geographic scales. *Marine Biology*, **122**, 361-375.
- KUMAR S, TAMURA K, NEI M (1993) *Molecular Evolutionary Genetics Analysis: MEGA*, v. 1.01. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Penn State University, University Park PA.
- LAUNEY S (1998) *Marqueurs microsatellites chez l'huître plate Ostrea edulis L.: caractérisation et application à un programme de sélection pour une résistance au parasite Bonamia ostreae et à l'étude de populations naturelles*. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, 214 p.
- LEHODEY P (1994) *Les monts sous-marins de Nouvelle-Calédonie et leurs ressources halieutiques*. Thèse de doctorat, Université Française du Pacifique, Papeete, 401 p.
- LEHODEY P, GRANDPERRIN R (1994) A study of the fishery and biology of *Beryx splendens* (alfonsin) in New Caledonia. *Fisheries Newsletter*, **71**, 30-36.
- LEHODEY P, GRANDPERRIN R (1996) Age and growth of the alfonsino *Beryx splendens* over the seamounts off New Caledonia. *Marine Biology*, **125**, 249-258.
- LEHODEY P, GRANDPERRIN R, MARCHAL P (1997) Reproductive biology and ecology of a deep-demersal fish, alfonsino *Beryx splendens*, over the seamounts off New Caledonia. *Marine Biology*, **128**, 17-27.
- LESSA EP, APPLEBAUM G (1993) Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Molecular Ecology*, **2**, 119-129.
- LOPEZ JV, YUHKI N, MASUDA R, MODI W, O'BRIEN SJ (1994) *Numt*, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution*, **39**, 174-190.
- MANTEL N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220.
- MARTIN AP, PALUMBI SR (1993) Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **90**, 4087-4091.
- MAYNARD SMITH J (1998) *Evolutionary Genetics (2nd edn.)*. Oxford University Press, Oxford, 325 p.
- MAYR E (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York, 797 p.
- MCDONALD JH, KOEHN RK (1988) The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Marine Biology*, **99**, 111-118.
- MEYER A (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, (eds. HOCHACHKA PW, MOMMSEN P), vol. 2, pp. 1-37. Elsevier, Amsterdam.
- MISSEGUE F, DUPONT J, DANIEL J (1992) Carte bathymétrique de synthèse de la zone économique de la Nouvelle-Calédonie. Projet ZOE 500. *Conventions Sciences de la Terre, Géologie, Géophysique (ORSTOM, Nouméa)*, **5**, 43 p.
- MORITZ C, DOWLING TE, BROWN WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 269-292.
- NEI M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512 p.
- ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, HAYASHI K, SEKIYA T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **86**, 2766-2770.
- ORTI G, HARE MP, AVISE JC (1997) Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Molecular Ecology*, **6**, 575-580.
- OVENDEN JR (1990) Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, **41**, 835-53.
- PALMER AR, STRATHMANN RR (1981) Scale of dispersal in varying environments and its implications for life histories of marine invertebrates. *Oecologia*, **48**, 308-318.

- PALUMBI SR (1992) Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology and Evolution*, **7**, 114-117.
- PALUMBI SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **25**, 547-72.
- PALUMBI SR (1996) Macrospatial genetic structure and speciation in marine taxa with high dispersal abilities. In: *Molecular Zoology. Advances, Strategies and Protocols* (eds. FERRARIS JD, PALUMBI SR), pp.101-117. Wiley-Liss, New York.
- PALUMBI S, MARTIN A, ROMANO S, MCMILLAN WO, STICE L, GRABOWSKI G (1991) *The Simple Fool's Guide to PCR*, v. 2.0. University of Hawaii, Honolulu HI, 47 p.
- PHILIPPE H (1993) MUST: a computer package of management utilities for sequences and trees. *Nucleic Acids Research*, **21**, 5264-5272.
- PLANES S, BORSA P, GALZIN R, BONHOMME F (1994) Geographic structure and gene flow in the manini (convict surgeonfish, *Acanthurus triostegus*) in the south-central Pacific. In: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (ed. BEAUMONT AR), pp. 113-122. Chapman & Hall, London.
- RAND DM (1994) Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 125-131.
- RAYMOND M, CALLAGHAN A, FORT P, PASTEUR N (1991) Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, **350**, 151-153.
- RAYMOND M, ROUSSET F (1995a) An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**, 1280-1283.
- RAYMOND M, ROUSSET F (1995b) GENEPOP: a population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- REYNOLDS J, WEIR BS, COCKERHAM CC (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for short term genetic distance. *Genetics*, **105**, 767-779.
- RICE WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- RODEN GI (1991) Mesoscale flow and thermohaline structure around Fieberling Seamount. *Journal of Geophysical Research*, **96**, 16653-16672.
- ROGERS AD (1994) The biology of seamounts. *Advances in Marine Biology*, **30**, 305-350.
- ROUSSET F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219-1228.
- SAAVEDRA C, ZAPATA C, GUERRA A, ALVAREZ G (1993) Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **115**, 85-95.
- SAITOU N, NEI M (1987) The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2nd edn.)*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **74**, 5463-5467.
- SMITH PJ (1986) Genetic similarity between samples of the orange roughy *Hoplostethus atlanticus* from the Tasman Sea, south-west Pacific Ocean and north-east Atlantic Ocean. *Marine Biology*, **91**, 173-180.
- SMITH PJ, JAMIESON A, BIRLEY AJ (1990) Electrophoretic studies and the stock concept in marine teleosts. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, **47**, 231-245.
- SOKAL RR, ROHLF FJ (1995) *Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research (3rd edn.)*. Freeman & Co, New York, 859 p.
- SOLIGNAC M, PERIQUET G, ANXOLABEHÈRE D, PETIT C (1995) *Génétique et Evolution, t. II. L'Espèce, l'Evolution Moléculaire*. Hermann, Paris, 367 p.
- SORENSEN MD, FLEISCHER R (1996) Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**, 15239-15243.
- SWOFFORD DL (1993) *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, v. 3.1.1. Illinois Natural History Survey, Champaign IL.
- WARD RD, GREWE PM (1994) Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **4**, 300-325.
- WEIR BS (1990) *Genetic Data Analysis*. Sinauer, Sunderland MA, 377 p.
- WEIR BS, COCKERHAM CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.



- WILLIAMS GC (1992) *Natural Selection: Domains, Levels, and Challenges*. Oxford University Press, New York, 208 p.
- WILLIAMS JGK, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFALSKI JA, TINGEY SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 6531-6535.
- WILLIAMS ST, BENZIE JAH (1998) Evidence of a biogeographic break between populations of a high dispersal starfish: congruent regions within the Indo West Pacific defined by color morphs, mtDNA and allozyme data. *Evolution*, **52**, 87-99.
- WILSON RRJr, WAPLES RS (1983) Distribution, morphology, and biochemical genetics of *Coryphaenoides armatus* and *C. yaquinae* (Pisces: Macrouridae) in the central and eastern North Pacific. *Deep-Sea Research*, **30**, 1127-1145.
- WILSON RRJr, WAPLES RS (1984) Electrophoretic and biometric variability in the abyssal grenadier *Coryphaenoides armatus* of the western North Atlantic, eastern South Pacific and eastern North Pacific Oceans. *Marine Biology*, **80**, 227-237.
- WRAY W, BOULIKAS T, WRAY WP, HANCOCK R (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **118**, 197-203.
- WRIGHT S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 139-156.
- WRIGHT S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323-354.

