



UFR SCIENCES & TECHNIQUES COTE BASQUE  
Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Licence Biologie des Organismes



# Diversité génétique des Udoteaceae et Rhipiliaceae (Bryopsidales, CHLOROPHYTA) de l'Indo-Pacifique

**LAGOURGUE Laura**

Stage effectué du 4 mars au 30 juin 2013

Dans l'Unité de Recherche UR-227

*CoReUs «Biocomplexité des écosystèmes coralliens  
de l'Indo-Pacifique»*

IRD Noumea  
101, Promenade Roger Laroque, Anse Vata  
BP A5  
98881 NOUMEA, NOUVELLE-CALEDONIE

sous la direction scientifique de **Mme Claude PAYRI**

« Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil »







## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à remercier Mme Claude Payri pour m'avoir acceptée dans l'équipe CoReUs, et consacré du temps pour le suivi de mon stage ainsi que pour la rédaction de mon rapport. Je lui suis particulièrement reconnaissante de m'avoir ouvert les portes de l'univers de la phycologie, me permettant de découvrir et partager sa passion pour les algues et ainsi conforter mes propres aspirations professionnelles.*

*Un merci à Laury Dijoux pour son aide et les réponses à mes questions ainsi qu'à Laurent Millet, pour son encadrement à la Plate-Forme du Vivant, ses conseils en biologie moléculaire, sa patience et son attention !*

*Je remercie également Laure Barrabet pour son appui incontestable en phylogénie, sa pédagogie, le partage de ses connaissances et le temps qu'elle m'a consacré.*

*Enfin, un merci particulier à Anicée Lombal pour sa présence, ses conseils et son soutien tout au long de mon stage.*

*Laura. L*



## TABLE DES MATIERES

---

<b>I. Introduction .....</b>	<b>8</b>
<b>II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>14</b>
1) Lieu d'étude :.....	14
2) Matériel biologique :.....	14
3) Analyse moléculaire: .....	14
4) Analyse moléculaire: .....	18
<b>III. Résultats .....</b>	<b>20</b>
1) Phylogénie générale des Halimedaneae .....	20
2) Assignation des échantillons : .....	20
<b>IV. Discussion.....</b>	<b>24</b>
1) Phylogénie des Udoteaceae .....	24
2) Phylogénie des Rhipiliaceae .....	28
<b>Bibliographie .....</b>	<b>36</b>



## I. INTRODUCTION

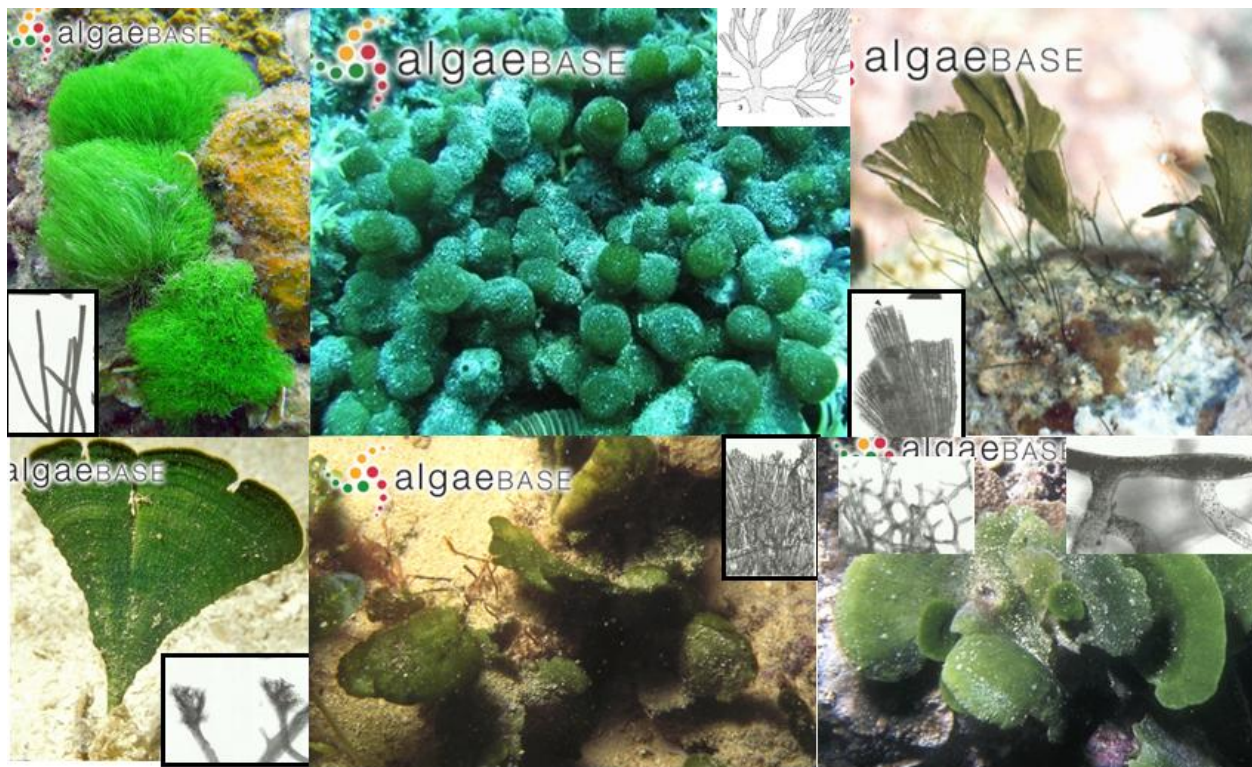
Les macroalgues représentent un groupe majeur des écosystèmes coralliens où elles jouent un rôle primordial tant dans la structure que dans le fonctionnement des communautés récifales et lagunaires. Par leur fonction photosynthétique, elles contribuent à la production primaire et constituent les premiers maillons des réseaux trophiques. Certaines d'entre-elles ont la particularité d'accumuler du carbonate de calcium dans leurs tissus et contribuent au bilan carbonaté des récifs. En particulier, les algues rouges calcaires Corallinales qui, pour les plus massives, participent activement à la construction des structures récifales à l'instar des coraux scléactiniaires (bâisseurs de récifs) ; d'autres, contribuent également de manière significative à la consolidation de l'édifice corallien, par leur rôle de cimentation. Les algues vertes calcifiées et articulées telles que les *Halimeda*, prennent part à la formation des sableux par dégénérescence du thalle à la fin de leur cycle biologique. Les plus grandes peuvent également former des algueraies et ainsi procurer habitat et protection à d'autres organismes.

En dépit de ce rôle essentiel et leur omniprésence dans les écosystèmes coralliens, l'étude des macrophytes demeure paradoxalement négligée en comparaison à l'effort porté aux groupes tels que coraux, poissons ou mammifères. L'ordre des Bryopsidales est particulièrement représentatif de cet état des faits : En dépit de son importance écologique en raison des nombreux taxons calcifiés qu'il regroupe et de l'intérêt qu'il présente au plan phylogénétique (au sein des Chlorophycées), peu d'études ont été consacrées à l'analyse de la diversité au sein de cet ordre. Pourtant, ces macroalgues présentent un double intérêt à être étudiées : tout d'abord international, en raison de leur répartition à l'échelle mondiale, mais également un intérêt régional et local, puisque près de 90% des taxons sont représentés dans les écosystèmes coralliens et certaines familles y sont d'ailleurs endémiques.

Les représentants des Bryopsidales sont caractérisés par une anatomie se résumant à une unique cellule tubulaire géante et plurinucléée. Cette simplicité masque pourtant des formes très diverses, allant d'une structure élémentaire à siphons (d'où leur appellation « Algues à siphons »), jusqu'à des morphologies bien plus complexes, où les siphons s'anastomosent entre eux pour devenir coalescents et former ainsi des thalles multiaxiaux. (cf Fig.1). Au plan anatomique, le thalle est composé au centre d'une medulla où les siphons ne présentent pas d'organisation particulière alors qu'ils se rangent vers la périphérie de manière relativement bien ordonnée pour former le cortex. Chez certains taxons les siphons se renflent à la périphérie et forment des utricules.

Plusieurs auteurs ont tenté de trouver une classification rationnelle de ces organismes. Tout d'abord, Smith (1955) sépare l'ordre des Bryopsidales en plusieurs familles (Halicytidaceae, Bryopsidaceae, Caulerpaceae, Codiaceae et Dichotomosiphonaceae), en se basant sur la morphologie des thalles, la reproduction, le type d'appareil plastidial ainsi que la distribution géographique. Hillis-Colinvaux (1984) a ensuite proposé de considérer deux sous-ordres :





**Figure 1 :** Morphologie et anatomie des genres étudiées ( de gauche à droite et de haut en bas) : *Chlorodesmis*, *Tydemania*, *Rhipidosiphon*, *Udotea*, *Rhipiliopsis*, *Rhipilia*.

(i) les Bryopsidineae défini par une reproduction non-holocarpique, et (ii) les Halimedaneae défini par une reproduction holocarpique (l'individu se transforme en gamètes) (sauf *Caulerpella*), et la présence de chloroplastes et amyloplastes (hétéroplastie). Par ailleurs, les Halimedaneae ont une distribution qui semble restreinte aux milieux tropicaux et subtropicaux (excepté *Caulerpa*, présente en eaux tempérées). Les phylogénies moléculaires ont confirmé cette séparation en deux groupes (Zechman and al 1990, Hnayuda et al. 2000) en prouvant leur monophylie respective. Cependant, la phylogénie à l'intérieur de ces sous-ordres reste obscure malgré les études entreprises (Hillis et al. 1998, Woolcott et al. 2000, Fama et al. 2002, Kooistra 2002, Kooistra et al. 2002).

Au sein du sous-ordre Halimedaneae, les relations de parentés, entre et à l'intérieur de deux familles, Udoteaceae et Rhipiliaceae, ne sont pas résolues, et elles renferment plusieurs entités polyphylétiques. La présente étude se focalise sur ces deux familles, qui d'une part, présentent un intérêt écologique particulier puisqu'elles possèdent des genres endémiques aux milieux coralliens et constituent d'autre part un défi à relever aux plans taxonomique et phylogénétique.

A ce jour, Udoteaceae regroupe onze genres présentant des morphologies variables et dont la majorité est calcifiée. Elles peuvent être trouvées en zone ouest-atlantique et tropicale où elles sont abondantes à l'intérieur des lagons et sur la partie sommitale des récifs. Quatre genres d'Udoteaceae ont été étudiés et sont décrits succinctement : *Chlorodemis* consiste en une unique touffe de siphons branchus et non calcifiés, s'élevant depuis des rhizoïdes basaux ; *Tydemania* a une morphologie plus complexe avec un ensemble de verticilles ou glomérules de fins siphons disposés le long d'un axe monosiphonné ou branchu. Les glomérules de siphons peuvent prendre la forme à lamelles de siphons coalescents. Chez *Udotea*, les siphons, qui ont la particularité de posséder des appendices latéraux microscopiques, forment un stipe multiaxial portant une ou plusieurs frondes lisses ou plissées en forme d'éventail. Les filaments sont imprégnés de carbonate de calcium pour former un ensemble rigide. *Rhipidosiphon*, quant à lui, présente un stipe uniaxial et une lame à rayonnement unique en forme d'éventail.

Pour ce qui est des Rhipiliaceae, cette famille regroupe des genres non calcifiés présentant de plus petits thalles, et principalement observés dans des parties plus profondes des pentes récifales. Elle se distingue de la précédente et des autres du même ordre par la différenciation de structures adhésives liant les siphons entre eux. Les individus du genre *Rhipilia* possèdent des lames en éventail composées d'un réseau de siphons entremêlés, orientés longitudinalement et interconnectés par des tenacules (provenant de la différenciation de siphons courts en petites branches de côtés reliant les siphons adjacents grâce à un système de deux à six dents). La fronde peut provenir de stolons multiples rampants ou bien d'une d'un rhizoïde unique. *Rhipiliopsis* présente également des lamelles mais dont les siphons sont reliés par des adhésions latérales nommées papillae.



Enfin, *Rhipiliella*, morphologiquement très proche de *Rhipiliopsis*, s'en distingue par la présence d'anneaux ou cicatrices le long du stipe, laissés par la chute successive des petites frondes, au fur et à mesure de la croissance des lames.

Actuellement, les quelques études réalisées sur les Udoteaceae et Rhipiliaceae se confrontent à plusieurs ambiguïtés au niveau de leur phylogénie, notamment depuis l'essor de l'outil moléculaire, qui a remis en cause certaines classifications se basant sur les aspects morphologiques et anatomiques. En effet, les analyses moléculaires révèlent une non-monophylie de certains genres au sein des Udoteaceae et des Rhipiliaceae (Kooistra 2002, Coppejans 2011, Verbruggen 2009 et 2012).

Dans ce contexte, le présent stage a deux objectifs : d'une part, identifier les échantillons récoltés sur différents sites de l'Indo-Pacifique à l'aide de l'outil moléculaire ; et d'autre part, apporter un supplément d'informations génétiques pour contribuer à la résolution de la phylogénie, et notamment, positionner les familles Udoteaceae et Rhipiliaceae au sein des Bryopsidales. Cela, afin de mieux appréhender les relations phylogénétiques entre les taxons et contextualiser leur histoire évolutive.

**Figure 2 : Différents sites d'échantillonnage dans l'Indo-Pacifique.**



**TABLEAU 1 : Nombre d'individus sélectionnés par site d'échantillonnage.**

Site d'achantillonnage	Nombre d'achantillons traités	Dénomination
Chesterfield	10	CH08*
Nouvelle-Calédonie	20	NC*
Madang, PNG	68	PHV* ou PAP*
Gambier	4	CP*
Salomon	10	S*
Vanuatu	6	V*
Fidji	12	FJ*
Glorieuses	8	GLO* ou ARV*

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1) Lieu d'étude :

Les spécimens étudiés proviennent de plusieurs sites de l'Indo-Pacifique, en particulier au niveau de l'arc mélanésien, soit une zone de 550 000 km s'étendant de la Papouasie-Nouvelle-Guinée (PNG) jusqu'à la Nouvelle-Calédonie (NC) au sud, composée de la Grande-Terre et des îles Loyauté, en passant par les archipels du Vanuatu et des îles Salomon. L'échantillonnage s'est étendu au-delà, jusqu'en Polynésie-française (PF), et plus précisément sur les îles Gambier. Pour l'Océan Indien, des échantillons proviennent des Glorieuses, île située au Nord-Ouest de Madagascar. (cf Fig.2)

### 2) Matériel biologique :

Les échantillons d'Udoteaceae et Rhipiliaceae proviennent de diverses missions menées par Claude Payri, Hereon Verbruggen ou par leurs collaborateurs, de 2004 à 2013. Un total de 138 spécimens a été manipulé. Leur provenance géographique est résumée dans le tableau 1. La majorité se trouvait conservée à l'éthanol 90° ou en silica gel, les autres étaient en herbier. Chaque échantillon avait été au préalable identifié au niveau générique directement sur le terrain, ou lors d'analyses morphologiques et anatomiques en laboratoire pour les spécimens de l'herbier.

### 3) Analyse moléculaire:

Pour chaque individu, 0,5 cm<sup>2</sup> de tissu ont été recueillis. Les échantillons conservés à l'éthanol, ont été, au préalable, séchés à l'air durant 12h. Les fragments ont ensuite été broyés manuellement (ou dans certains cas mécaniquement) à l'aide d'un piston dans l'azote liquide. L'ADN génomique total a été extrait selon le protocole décrit par Kooistra (2002) auquel quelques modifications ont été effectuées. (cf. ANNEXE 1).

La quantité d'ADN est estimée à l'aide du Nanodrop® qui indique la concentration en nucléotides du mélange, et la qualité de l'extraction, par mesure d'absorbance à 260λ, 280λ et 230λ. Les rapports 260/280 et 260/230 renseignent respectivement sur la présence d'acides aminés et de résidus de phénols dans l'échantillon. En fonction des concentrations nucléotidiques obtenues, des dilutions spécifiques sont réalisées en réplicats de chaque

**Tableau 2:** Séquences des amorces utilisées pour l'amplification PCR et le séquençage

Type d'amorce	Gène	Séquence de l'amorce (5'-3')	Sens	Température d'hybridation (°C)	Référence
tufGF4	<i>tufa</i>	GGNGCNGCNCAAATGGAYGG	<i>Forward</i>	45	Saunders et al.(2010)
tufAR	<i>tufa</i>	CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC	<i>Reverse</i>	45	Saunders et al.(2010)
HtufAF	<i>tufa</i>	ATGATWACNGGHGCGCWCAAATGG	<i>Forward</i>	55/ 52	Handeler (2010)/ Présente étude
HtufAR	<i>tufa</i>	TTGTTCKAACATAAAATTGWGGTC	<i>Reverse</i>	55/ 52	Handeler (2010)/ Présente étude
7F	<i>rbcl</i>	CCA MAA ACW GAA ACW AAA GC	<i>Forward</i>	41,5 / 45,5	Lam et Zechman(2006)/ Présente étude
712F	<i>rbcl</i>	CAT TAY TTA AAT GCW ACW GC	<i>Forward</i>	43,3	Présente étude
791R	<i>rbcl</i>	GGN AYA CCN AAW TCT TTI GC	<i>Reverse</i>	45,5	Présente étude
1391R	<i>rbcl</i>	TCT TTC CAA ACT TCA CAA GC	<i>Reverse</i>	41,5 / 43,5	Lam et Zechman(2006)/ Présente étude

**Tableau 3 :** Programme d'amplification par PCR.

Programme PCR	Primers			
	TufGF4-TufAR	HtufA-HtufAR	Rbcl5': 7F-791R	Rbcl 3': 712F-1391R
<b>Phase dénaturation initiale</b>	4min 94°C	5min 94°C	4min 94°C	4min 94°C
<b>Nombre cycles</b>	38	40	40	40
<b>Phase dénaturation</b>	1min 94°C	1min 94°C	1min 94°C	1min 94°C
<b>Phase d'hybridation</b>	1min15 45°C	1min45 à 55°C	1min50 45.3°C	1min50 43.3°C
<b>Phase d'élongation</b>	1min45 72°C	4min50 à 72°C	2min 72°C	2min 72°C
<b>Phase finale d'élongation</b>	7min 72°C	7min 72°C	10min 72°C	10min 72°C

échantillon à une concentration de 5ng/μL. Les deux lots des échantillons (originaux et dilués) sont conservés à -20°C.

Deux marqueurs chloroplastiques correspondant à des gènes codants du génome, *tufa* (codant pour le facteur d'élongation Tu) et *rbcl* (gène de la grande sous-unité du ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygénase ou RuBisCO) ont été amplifiés. Le premier a été choisi pour sa qualité discriminante car il présente une haute divergence interspécifique (Verbruggen 2009, Saunders et Kucera 2010). Ce marqueur se place donc comme le plus adéquat pour le *barcoding* chez les Bryopsidales. Le second marqueur a été choisi pour sa qualité d'amplification plus aisée et le grand nombre de séquences déjà disponibles que ce soit pour les Rhipiliaceae ou les Udoteaceae.

Pour le marqueur *tufa*, les couples d'amorces TufGF4-TufAR et HtufA-HtufAR ont été utilisés (communication interne). L'utilisation de deux jeux d'amorces a été nécessaire pour pallier quelques difficultés à amplifier avec TufGF4-TufAR (premières amorces sélectionnées) certains échantillons ainsi que les spécimens d'herbier. Les échantillons concernés, ainsi que ceux qui furent extraits par la suite, ont été amplifiés par le second couple d'amorce conseillé : HtufAF-HtufAR.

En ce qui concerne le marqueur *rbcl*, les couples d'amorces 7F-791R et 712F-1391R ont permis l'obtention de deux fragments de séquence se superposant. En effet, la séquence totale du marqueur étant d'environ 1 200 paires de bases, il était plus aisé de procéder ainsi plutôt que d'amplifier d'un seul tenant la totalité du marqueur.

Les séquences des différentes amorces, leur température d'hybridation ainsi que les références sont présentées en Tableau 2.

Le mélange réactionnel est préparé pour un volume total de 25 μL contenant 2,5 μL d'ADN dilué (5ng/μL), 5μL de tampon de réaction, 1,5 μL (*tufa*) ou 2μL (*rbcl*) de MgCl<sub>2</sub>, 1 μL de dNTPs, 1 μL de chaque amorce *forward* et *reverse*, 1 μL d'Albumine de serum bovin (ASB ou BSA) et 1,25 unités de Taq Polymerase. L'amplification par programme de réaction en chaîne (PCR) est réalisée dans un thermocycleur (VERITI, Applied Biosystems) selon le programme spécifique à chaque couple d'amorces (cf Tableau 3).

Les produits PCR sont ensuite contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% de TBE (Tris Borate EDTA), auquel est ajouté du bromure d'éthidium (BET), qui est un agent intercalant de l'ADN émettant une fluorescence sous lumière ultra-violette, et permettant ainsi de visualiser les bandes d'ADN. Seuls les produits PCR sous forme de bande unique et intense sont conservés.

La société Macrogen (Seoul, COREE) réalise la purification et le séquençage dans les sens *forward* et *reverse* par la méthode « Big Dye Terminator » basée sur électrophorèse capillaire. Seules les séquences des produits de PCR du marqueur *tufa* sont analysées dans ce rapport, les résultats pour le marqueur *rbcl* n'étant pas encore disponibles.

Les séquences obtenues sont « nettoyées » séparément puis assemblées en contigs à l'aide du logiciel Sequencher<sup>®</sup> 7.0. Elles sont ensuite alignées à l'œil à partir de *pairwise alignments* avec le logiciel BioEdit<sup>®</sup> 7.2.0 puis mises sous forme de matrice carrée.



**Tableau 4** : Liste des espèces utilisées pour les analyses phylogénétiques, avec le nom de souche et le numéro d'accèsion à *GenBank* de leur séquence *tufa*.

Taxon	Souche	Numéro d'accèsion à <i>GenBank</i>
<b>UDOTEACEAE</b>		
<i>Flabellia petiolata</i> (Turra) Nizamuddin		GU592538
<i>Pseudochlorodesmis</i> sp.	HV1204	FJ432656
<i>Tydemania expeditionis</i> Weber-van Bosse	HV873	FJ432661
<i>Tydemania expeditionis</i> Weber-van Bosse		AM049971
<b>RHIPILIACEAE</b>		
<i>Rhipilia copejansii</i> Schils et Verbruggen	PIT1044	JQ082492
<i>Rhipilia crassa</i> A.J.K. Millar & G.T. Kraft	HV738	FJ432657
<i>Rhipilia nigrescens</i> Coppejans & W.F. Prud'homme van Reine	H.0864	JQ082495
<i>Rhipilia orientalis</i> A.Gepp & E.S. Gepp	AD-A88388	JQ082497
<i>Rhipilia pusilla</i> (Womersley) Ducker	AD-A88532	JQ082493
<i>Rhipiliopsis profunda</i> (N.J. Eiseman & S.A. Earle) J.N. Norris & S.M. Blair		FJ432659
<b>HALIMEDACEAE</b>		
<i>Halimeda discoidea</i> Decaisne	SOC299	AY826360
<i>Halimeda gracilis</i> Harv. ex J. Agardh	HV317	AM049965
<i>Halimeda incrassata</i> (J.Ellis) J.V.Lamouroux		AM049959
<i>Halimeda opuntia</i> (Linnaeus) Lamouroux		FJ624690
<b>PSEUDOCODIACEAE</b>		
<i>Pseudocodium floridanum</i> Dawes & Mathieson	NSF.123	AM909697
<i>Pseudocodium natalense</i> De Clerck et al.	KZNb2281(GENT)	FJ607680
<b>CAULERPACEAE</b>		
<i>Caulerpella ambigua</i>		FJ432655
<i>Caulerpa flexilis</i> J. V. Lamour. ex C. Agardh	CA049	FR668296
<i>Caulerpa verticillata</i> J. Agardh		AJ417967
<i>Caulerpa sertularioides</i> (S. G. Gmel.) M. Howe	HV989	FJ432654
<b>DICHOTOMOSIPHONACEAE</b>		
<i>Avrainvillea lacerata</i> Harvey ex J. Agardh	HV599	FJ432651
<i>Avrainvillea nigricans</i> Decne.	HV891	FJ432652
<b>OUTGROUP</b>		
<i>Bryopsis plumosa</i> (Huds.) C. Agardh	HV880	JQ755423
<i>Codium lucasii</i> Setch.	H.0882	FJ432662
<i>Derbesia marina</i> (Lyngb.) Solier		U09431

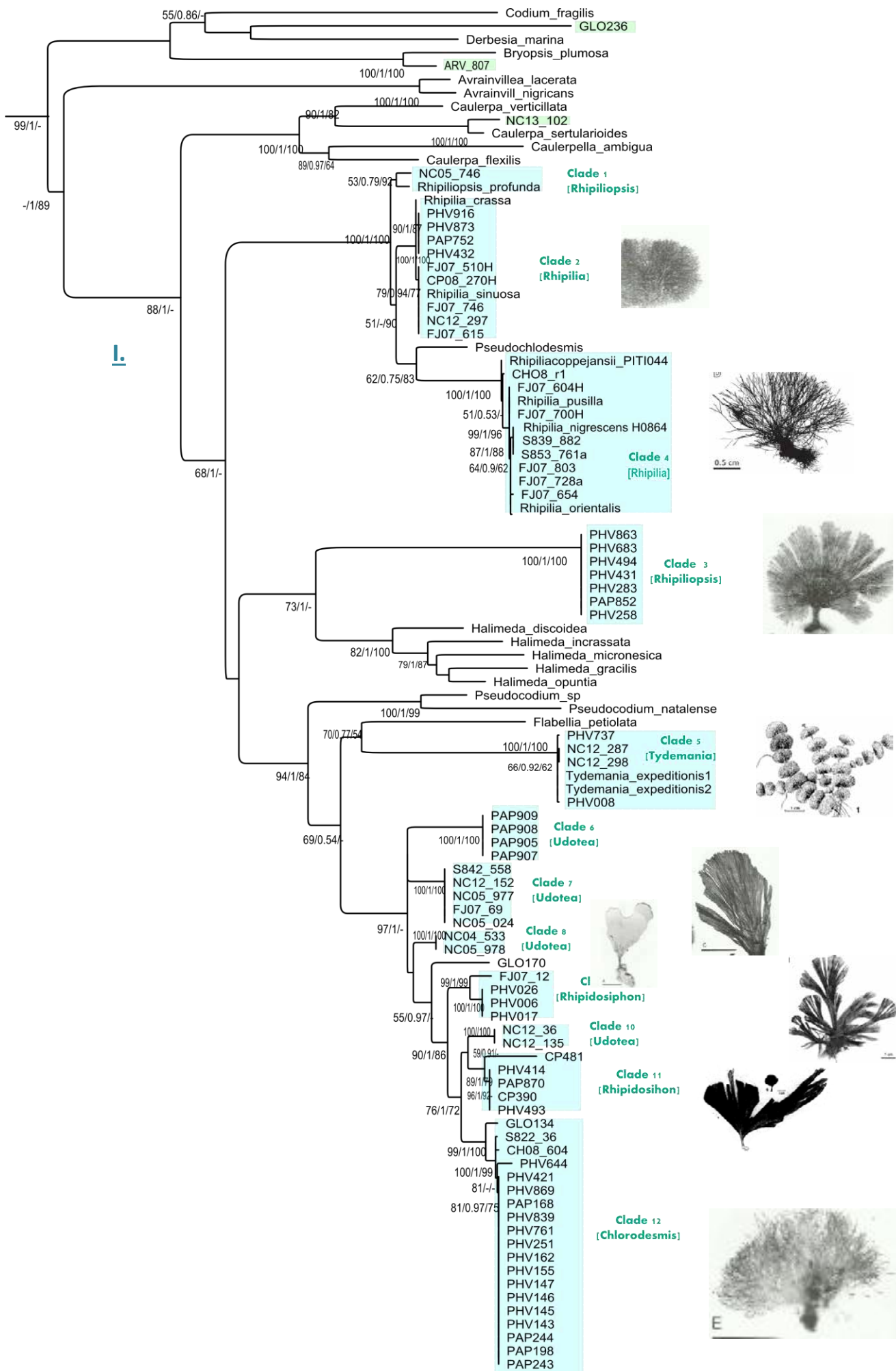
#### 4) Analyse moléculaire:

A partir des alignements obtenus, complétés par des séquences de *GenBank* (répertoriées au tableau 4), les constructions phylogénétiques ont été réalisées. Les individus *Derbesia marina*, *Codium fragilis* et *Bryospsi plumosa* ont été sélectionnés pour constituer l'*outgroup*.

**Analyses en Maximum de Parcimonie (MP) :** La méthode en maximum de parcimonie a été effectuée avec le logiciel PAUP\*4.0. Une analyse heuristique a été réalisée, c'est-à-dire que les taxons sont ajoutés pas à pas (*stepwise*), puis réarrangé par *tree bisection & reconnection* (TBR), ce qui permet une pondération des caractères, lorsque les données de départ sont nombreuses ou complexes (comme ici). Le paramétrage était le suivant : 10 000 réplicats, un ajout de séquences de manière aléatoire et un arbre de départ issu d'un tirage au hasard. L'arbre consensus strict a été lancé pour 500 réplicats de *bootstraps*(*bs*) avec les mêmes paramètres que la méthode heuristique. Un nœud est alors considéré comme soutenu si *bs* > 50%, moyennement soutenu pour *bs* =[50 ; 70]%, bien soutenu pour *bs*=[70 ;80]% et fortement soutenu pour *bs*> 80%.

**Analyse en Maximum de vraisemblance (ML) :** Pour la représentation en maximum de vraisemblance, la matrice a été soumise au logiciel FindModel, pour trouver le modèle d'évolution le plus en accord avec le jeu de données. Le modèle d'évolution retenu est « *general time-reversible* »(GTR), c'est-à-dire le plus général, le plus complexe et en contrepartie le plus long et le plus lourd en terme de calculs, mais la matrice de donnée initiale ne semble répondre à de modèles plus simples. De plus, GTR est lancé avec les paramètres de prise en compte d'une part, des variations de taux de substitution entre les sites (paramètre *Gamma*) et d'autre part, de la présence de sites invariables (facteur *Invariant*). Par la suite, le modèle sera cité « GTR+I+G ». L'analyse a été lancée sous SeaView 4.4.2 (Gouy, Guindon & Gascuel, 2010). Aucun algorithme de recherche n'a été paramétré afin que l'analyse sélectionne d'elle-même le réarrangement qui convient le mieux entre *Nearest-Neighbor Interchange* (réarrangement local au niveau des branches) et *Subtree Pruning and Regrafting* (réarrangement global de l'arbre) (*NNI & SPR*). L'arbre de départ est issu d'une courte analyse de séquences. 1000 réplicats de *bootstraps* ont été lancés et la robustesse d'un nœud est considérée comme pour l'analyse en MP.

**Analyses Bayésiennes (MB) :** Elles ont été effectuées par le logiciel MrBayes 3.1.2 (Ronquis et Huelsenbeck, 2001) et en utilisant le modèle d'évolution GTR + I + G. Deux *runs* indépendants de quatre chaînes de Markov, et une température inter-chaîne de 0,2, ont été lancés. L'arbre de départ est tiré au hasard. L'analyse a été programmée à 10 millions de générations, avec un échantillonnage d'arbre toutes les 1000 générations. La convergence des deux *runs* et l'estimation suffisante des paramètres ont été vérifiées à l'aide du logiciel Tracer (Rambaut et Drummond 2009) (Annexe III). Le premier million de générations est écarté en tant que *burn-in*. L'analyse Bayésienne est représentée sous forme d'arbre consensus semi-strict, c'est-à-dire que seuls les nœuds ayant une probabilité *a posteriori* (PP) supérieure à 0.50 sont conservés. Les autres sont figurés en râteau. Un nœud est considéré comme fortement soutenu pour PP > 0.95.



**Figure 3** : Représentation phylogénétique par analyse en maximum de vraisemblance (ML). Les valeurs de nœuds représentent respectivement les *bootstraps* ML, les probabilités a posteriori MB et les *bootstraps* MP.

### III. RESULTATS

Sur un total de 138 individus extraits (dont 46 en provenance de l'herbier), 118 produits PCR ont pu être obtenus pour le gène *tufa* (68 avec *tufGFA-tufAF* ; 103 avec *HtufAF-HtufAR*), 84 pour *rbcl* 5' et 71 pour *rbcl* 3'. Quelques individus n'ont pu être amplifiés, notamment des échantillons provenant de l'herbier. Il est possible que l'ADN se soit dégradé pour les spécimens conservés ainsi.

Parmi les séquences *tufa*, 74 ont été gardées (en fonction de la netteté des chromatogrammes mais surtout de la longueur en nombre de paires de bases) pour réaliser la matrice carrée qui comptabilise 102 séquences (avec les séquences de *GenBank*) et 613 caractères. Le jeu de données compte 351 caractères variables et 316 sites informatifs

L'arbre phylogénétique (Figure 3) représente l'analyse en Maximum de vraisemblance (ML). Les valeurs aux nœuds correspondent respectivement aux valeurs de *bootstrap* en ML, aux probabilités *a posteriori* en MB et aux *bs* en MP. Seuls les nœuds possédant des *bs* en ML >50 sont détaillés. Les autres représentations phylogénétiques sont données en Annexes III et IV.

#### 1) Phylogénie générale des Halimedaneae

L'ordre des Bryopsidales se divise en deux sous-ordres : Halimedaneae et Bryopsidaneae entre lesquels s'intercale la famille Dichotomosiphonaceae qui n'est actuellement pas incorporée dans ces sous-ordres. Halimedaneae est composé de quatre groupes principaux : Le premier se branche en clade-frère de l'ensemble des autres (support nodal différenciant selon les méthodes PP=1 en MB contre *bs*= 25 en ML) et représente la famille Caulerpaceae (PP=1). Les autres branches représentent respectivement Halimedaceae (PP=1), Rhipiliaceae (PP=1) et un groupe rassemblant les familles Pseudocodiaceae (PP=1) et Udoteaceae (PP=0.93). Outre ces deux dernières, formant des clades frères avec un fort support (PP=1), les relations entre les différentes familles ne sont pas résolues car les topologies ne présentent pas de nœuds suffisamment soutenus pour permettre une description précise.

#### 2) Attribution des échantillons :

L'arbre phylogénétique permet l'attribution d'un grand nombre d'échantillons au niveau du genre et, lorsque cela est possible, de l'espèce.

A l'échelle ordinaire, deux individus s'écartent des Halimedaneae: ARV\_807 est en réalité un *Bryopsis plumosa* (PP=1). L'identité de GLO236 ne peut être identifiée avec la seule séquence. Un examen anatomique devrait pouvoir positionner l'échantillon au moins au niveau du genre.

**Tableau 5** : Liste des échantillons et identification a posteriori

Echantillon	Localité	Identification génétique		
		Famille	Genre	espèce
PAP752	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sp</i>
PAP873	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sp</i>
PHV916	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sp</i>
PHV432	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sp</i>
CH08_r1	Polynésie Française	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sp</i>
S839_882	Salomon	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>nigrescens</i>
S853_761a	Salomon	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>nigrescens</i>
FJ07_728b	Fidji	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sp</i>
FJ07_654	Fidji	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sp</i>
FJ07_803	Fidji	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sp</i>
FJ07_615	Fidji	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sinuosa</i>
FJ07_746	Fidji	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sinuosa</i>
FJ07_700H	Fidji	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>penicilloides</i>
FJ07_604	Fidji	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>penicilloides</i>
CP08_270H	Polynésie Française	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sinuosa</i>
FJ07_510H	Fidji	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sinuosa</i>
NC12_297	Nouvelle-Calédonie	Rhipiliaceae	<i>Rhipilia</i>	<i>sinuosa</i>
PHV258	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipiliopsis</i>	<i>papuensis</i>
PAP852	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipiliopsis</i>	<i>papuensis</i>
PHV238	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipiliopsis</i>	<i>papuensis</i>
PHV494	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipiliopsis</i>	<i>papuensis</i>
PHV683	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipiliopsis</i>	<i>papuensis</i>
PHV431	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipiliopsis</i>	<i>papuensis</i>
PHV283	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Rhipiliaceae	<i>Rhipiliopsis</i>	<i>papuensis</i>
NC05_746	Nouvelle-Calédonie	Rhipiliaceae	<i>Rhipiliopsis</i>	<i>profunda</i>
PAP168	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PAP198	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PAP243	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PAP244	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PHV143	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PHV145	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PHV146	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PHV147	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PHV155	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PHV162	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PHV251	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PHV421	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PHV644	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
PHV761	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>

A l'échelle des Halimedaneae, NC13\_102 n'appartient pas aux familles étudiées mais à Caulerpaceae, et correspond notamment à *Caulerpa sertularioides* (PP= 1).

A l'intérieur des deux familles étudiées, la reconstruction de l'arbre phylogénétique montre 12 clades qui se regroupent en 3 grands groupes d'importance variable :

1- Le premier groupe, comportant les séquences références des genres *Rhipiliopsis* et *Rhipilia*, est formé de 3 clades :

- Le clade 1 correspond à la séquence de *Rhipiliopsis profunda* à laquelle se rattache un de nos échantillons avec un nœud moyennement soutenu (PP=0.79).
- Le clade 2, se compose d'un taxon regroupant *Rhipilia sinuosa* et plusieurs échantillons (PP= 0.94); d'un second taxon regroupant des individus en provenance de PNG et enfin la séquence *Rhipilia crassa* se distinguant des autres groupes.
- Le clade 3 se branche en groupe-frère de *Pseudochlorodesmis* sp. avec un soutien moyen (PP= 0.75) et se compose notamment de *Rhipilia coppejansii*, *R. pusilla*, *R. orientalis*, avec des échantillons s'intercalant entre ces séquences.

2- Le second groupe, constitué uniquement du clade 4, se rattache à la famille des Halimedaceae avec un nœud fortement soutenu (PP=1).

3- Enfin, le troisième groupe se compose des séquences de la famille Pseudocodiaceae se rattachant en clade frère à l'ensemble détaillé comme suit :

- Le clade 5 regroupe les séquences *Tydemania expéditionis* auxquelles se rattachent 4 individus de manière robuste (PP=1) avec une légère différenciation pour les individus de NC (NC12\_287 et NC12\_298)(PP= 0.92). A ce clade se branche en lignée sœur *Flabellia petiolata* avec un support moyen (PP=0,77). Le tout représente un groupe frère du restant des taxons avec un nœud fortement soutenu (PP= 0,93).
- Le clade 8 forme une lignée d'*Udotea* à part des clades 6 et 7 correspondant respectivement à *Udotea argentea* et *U. geppiorum*.
- Une troisième branche se compose d'un individu en provenance des Glorieuses, GLO170, se détachant du regroupement suivant :
  - Clade 9 représentant une lignée *Rhipidosiphon* (identifiés en tant que *R. lewmanomontiae*) fortement soutenue (PP=1) à laquelle se rattache FJ07\_12, un individu attribué à *Udotea glaucescens*.
  - Le clade 10 forme une lignée de deux individus, NC12-36 et -135 identifiés comme appartenant au genre *Udotea*.
  - Le clade 11 représente des individus identifiés *Rhipidosiphon javensis*.
  - Le clade 12, représentant le genre *Chlorodesmis*, se divise en trois sous-groupes : un regroupement de *Chlorodesmis fastigiata* en provenance de PNG fortement soutenu (0.97), auquel se rattachent deux individus CH08\_604 de Chesterfield et S822\_36 des Salomon (identifié comme un *C. hildebrandtii*), et enfin un individu des Glorieuses (GLO134) se branchant robustement au deux groupes précédents (PP=1).

Le bilan des identifications figure en Tableau 5.

**Tableau 5 : Suite et fin**

<b>PHV839</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
<b>PHV869</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>fastigiata</i>
<b>GLO_170</b>	Glorieuses	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>sp</i>
<b>GLO_134</b>	Glorieuses	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>sp</i>
<b>S822_36</b>	Salomon	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>hildebrandtii</i>
<b>CH08_604</b>	Polynésie Française	Udoteaceae	<i>Chlorodesmis</i>	<i>sp</i>
<b>PAP026</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Rhipidosiphon</i>	<i>lewmanomontiae</i>
<b>PHV493</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Rhipidosiphon</i>	<i>javensis</i>
<b>PHV017</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Rhipidosiphon</i>	<i>lewmanomontiae</i>
<b>PHV006</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Rhipidosiphon</i>	<i>lewmanomontiae</i>
<b>PHV414</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Rhipidosiphon</i>	<i>javensis</i>
<b>CP390</b>	Polynésie Française	Udoteaceae	<i>Rhipidosiphon</i>	<i>javensis</i>
<b>CP481</b>	Polynésie Française	Udoteaceae	<i>Rhipidosiphon</i>	<i>javensis</i>
<b>PAP870</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Rhipidosiphon</i>	<i>javensis</i>
<b>PHV008</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Tydemanina</i>	<i>expeditionis</i>
<b>PHV737</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Tydemanina</i>	<i>expeditionis</i>
<b>NC12_287</b>	Nouvelle-Calédonie	Udoteaceae	<i>Tydemanina</i>	<i>expeditionis</i>
<b>NC12_298</b>	Nouvelle-Calédonie	Udoteaceae	<i>Tydemanina</i>	<i>expeditionis</i>
<b>PAP905</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>argentea</i>
<b>PAP907</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>argentea</i>
<b>PAP908</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>argentea</i>
<b>PAP909</b>	Papouasie-Nouvelle-Guinée	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>argentea</i>
<b>NC12_135</b>	Nouvelle-Calédonie	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>sp</i>
<b>NC12_136</b>	Nouvelle-Calédonie	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>sp</i>
<b>NC05_977</b>	Nouvelle-Calédonie	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>geppiorum</i>
<b>NC05_978</b>	Nouvelle-Calédonie	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>sp</i>
<b>NC04_533</b>	Nouvelle-Calédonie	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>sp</i>
<b>NC05_024</b>	Nouvelle-Calédonie	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>geppiorum</i>
<b>S842_558</b>	Salomon	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>geppiorum</i>
<b>FJ07_69</b>	Fidji	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>geppiorum</i>
<b>FJ07_12</b>	Fidji	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>glaucescens</i>
<b>NC12_152</b>	Nouvelle-Calédonie	Udoteaceae	<i>Udotea</i>	<i>geppiorum</i>
<b>ARV_807</b>	Glorieuses	Bryopsidaceae	<i>Bryopsis</i>	<i>plumosa</i>
<b>NC13_102</b>	Nouvelle-Calédonie	Caulerpaceae	<i>Caulerpa</i>	<i>sertularioides</i>
<b>GLO_236</b>	Glorieuses	indéterminé	indéterminé	indéterminé

#### IV. DISCUSSION

L'analyse phylogénique des deux groupes Udoteaceae et Rhipiliaceae réalisée pour la première fois à l'aide du seul marqueur *tufa* montre des résultats globalement en accord avec les travaux précédents obtenus avec les marqueurs *rbcL* et *tufa* (Lam & Zechman 2006, Verbruggen et al. 2009, 2011, 2012) : Les familles du sous-groupe Halimedaneae présentent des relations phylogéniques non résolues (représentation Bayésienne), ou faiblement soutenues (ML et MP).

Les familles Dichotomosiphonaceae, Caulerpaceae, Halimedaceae et Pseudocodiaceae sont monophylétiques et robustement soutenues (PP=1). En ce qui concerne les familles étudiées, Udoteaceae apparaît également monophylétique (PP= 0,93) alors que Rhipiliaceae est polyphylétique.

Par ailleurs, les deux familles comportent toutes deux des genres qui ne sont pas monophylétiques. A l'échelle spécifique, l'interprétation des taxons appartenant aux Udoteaceae sera difficile, compte tenu de la lacune de séquences *tufa* pour cette famille (une seule espèce, *Tydemanina expeditionis* sert de référence).

##### 1) Phylogénie des Udoteaceae

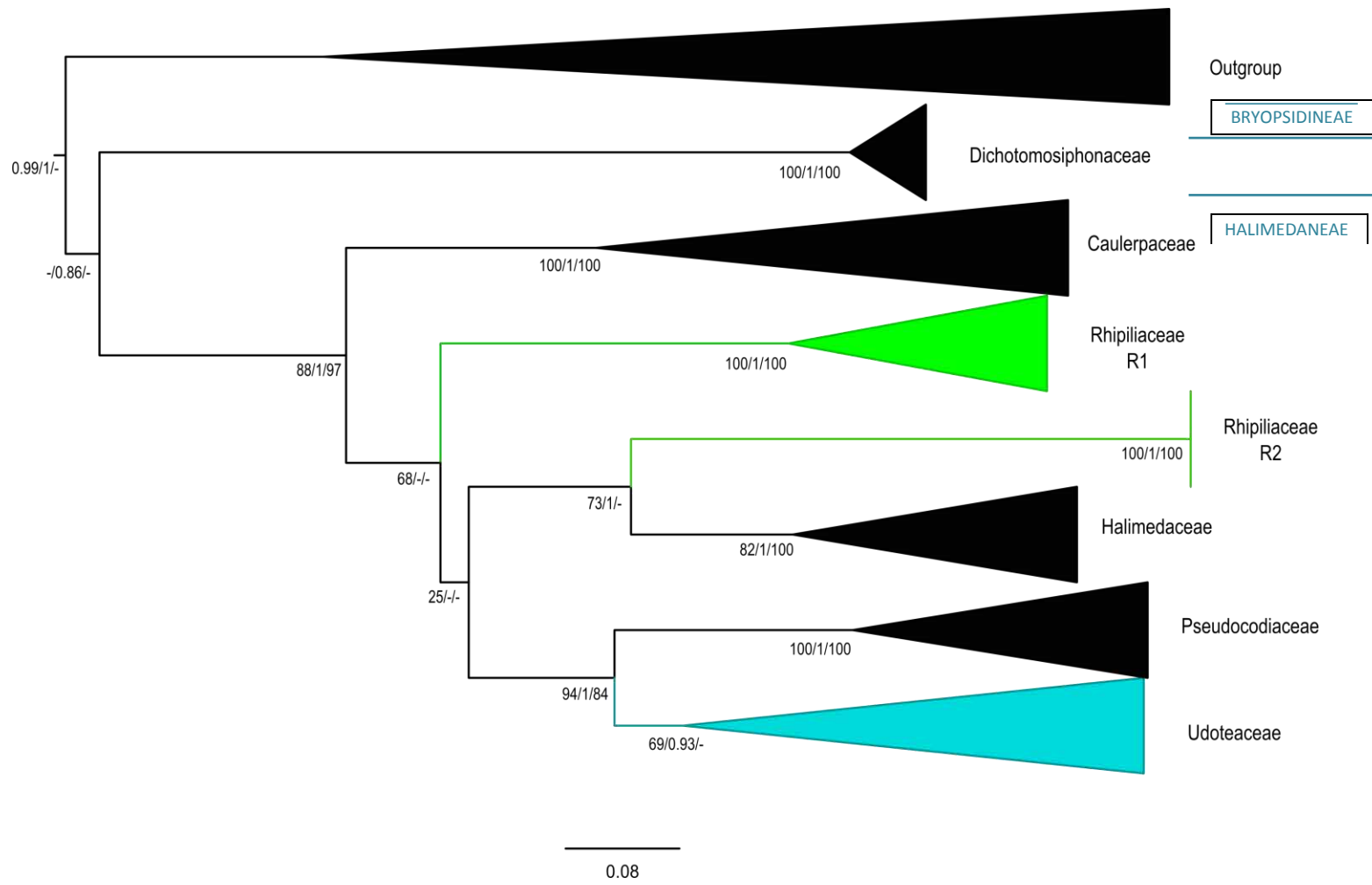
La famille Udoteaceae apparaît monophylétique (cf Fig6) et se branche en clade frère de Pseudocodiaceae avec une forte robustesse de nœud (PP= 0,93). Cependant, parmi les genres étudiés, la plupart ne sont pas monophylétiques comme pour les précédentes études (Kooistra 2002, Lam & Zechman 2006, Verbruggen et al. 2009, 2012) et leur résolution demeure complexe.

*Tydemanina* apparaît monophylétique avec un fort support (PP=1).

*Chlorodesmis* forme également un clade monophylétique. Tous les individus de PNG forment un clade bien soutenu, représentant *C.fastigiata* et se distinguant de *C. Hildebrandtii* et d'une troisième espèce représentée par l'individu des Glorieuses. Néanmoins, si en réalité, tous ces individus représentent une seule et même espèce, alors, les différences qui apparaissent au niveau des branches peuvent être reliées à des différences géographiques (influence de l'environnement), puisque les regroupements semblent suivre les localisations des prélèvements.

Pour les deux autres genres d'Udoteaceae étudiés, Udotea et Rhipidosiphon, une paraphylie est constatée, avec des relations phylogénétiques entre ces deux genres qui interpellent.





**Figure 5** : Arbre général collapsé à partir de l'analyse en Maximum de Vraisemblance (ML). Les valeurs aux nœuds correspondent aux valeurs de *bootstraps* ML/ probabilité *a posteriori* MB/ *bootstraps* MP.

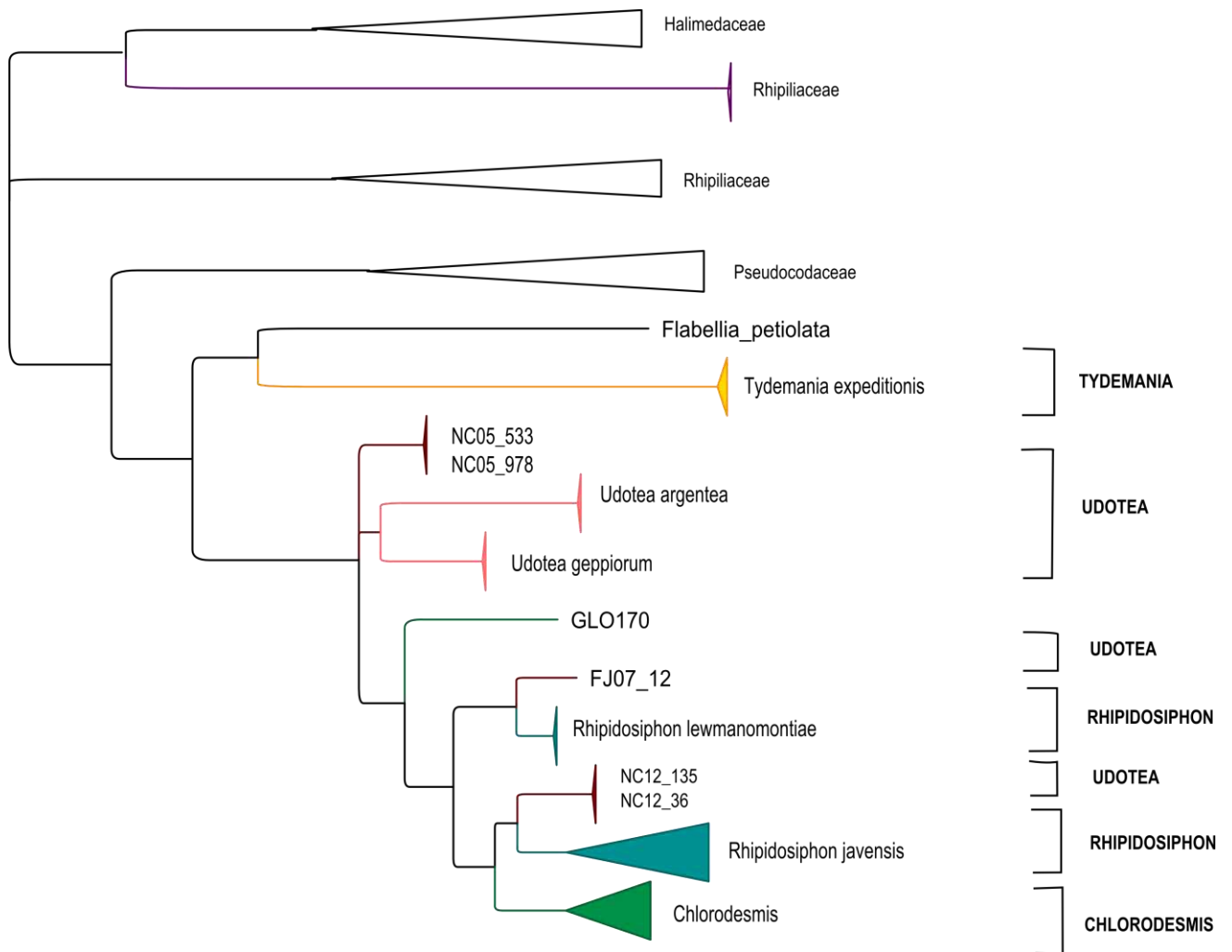
*Udotea* se répartit en cinq groupes : les deux premiers apparaissent en lignées-sœurs faiblement soutenues (PP=0,54) et représentent les espèces *U.argentea* et *U.geppiorum*.

La troisième lignée forme un râteau avec la précédente et le clade *Rhipidosiphon-Chlorodesmis*. Elle présente deux individus de NC (NC04\_533 et NC05\_978) non identifiés et dont l'étude morphologique réalisée indépendamment du travail (C.Payri) indique qu'il pourrait s'agir d'une nouvelle espèce d'*Udotea*. Cette hypothèse s'appuie notamment sur l'observation microscopique des siphons et des appendices latéraux de formes complexes et différentes de celles décrites chez les espèces publiées. (cf Fig.7)

Les deux autres groupes sont mêlés avec ceux du genre *Rhipidosiphon* : La quatrième lignée, représentée par une *U. glaucescens* de Fidji (FJ07\_12), se branche en frère avec un groupe de *Rhipidosiphon lewmanomontiae*. L'observation morphologique du spécimen de Fidji révèle des siphons d'organisation simple, sans présence d'appendices latéraux, comme habituellement présents chez *Udotea*. Quant à la cinquième lignée, formée par deux individus de NC (NC12\_36 et NC12\_135) non spécifiquement identifiés, elle se branche en clade-frère de *Rhipidosiphon javensis*. Malgré une morphologie extérieure très proche de celle d'*Udotea*, ces spécimens possèdent des siphons simples sans appendices latéraux, présentant des ramifications dichotomiques peu nombreuses et dissymétriques, comparables à ceux observés chez *Rhipidosiphon*. Des analyses plus approfondies permettront d'identifier plus précisément les spécimens de ce clade.

Comme vu ci-dessus, *Rhipidosiphon* est paraphylétique avec deux branches bien distinctes correspondant aux deux espèces *R. javensis* et *R. lewmanomontiae*. Cette dernière détient la singularité de posséder des constriction asymétriques au niveau des dichotomies (cf Fig.8). Ces deux espèces relativement proches dans l'arbre phylogénétique sont néanmoins séparées par les lignées d'*Udotea* qui s'intercalent. La paraphylie de ces genres, qui apparaît ici de manière évidente, remet en question l'assignation au genre « *Udotea* » des deux lignées s'intercalant dans le clade des *Rhipidosiphon*.

En effet, il est vraisemblable que le genre *Udotea* corresponde uniquement aux trois premières lignées évoquées ci-dessus, proches phylogénétiquement (et donc génétiquement) et possédant plus de caractères morphologiques en commun (notamment la présence d'appendices latéraux ou encore des constriction symétriques au niveau des dichotomies). Par ailleurs, aucune étude à ce jour n'a pu démontrer la monophylie du genre *Udotea*. Il apparaît donc nécessaire d'approfondir la question, par des observations morphologiques, anatomiques et par des analyses moléculaires à l'aide d'autres marqueurs, afin de déterminer si les deux lignées d'*Udotea* excentrées doivent être rattachées au genre *Rhipidosiphon* alors que la position de ce dernier est elle-même douteuse ; ou encore s'il y a autant de genres que de lignées, aussi bien pour les entités « *Udotea* » que « *Rhipidosiphon* ». Quoi qu'il en soit, les ambiguïtés constatées au niveau des genres grâce à l'analyse moléculaire, remettent fortement en cause la question de délimitation taxonomique sur les seuls critères morphologiques et anatomiques. Les genres *Udotea* et *Rhipidosiphon*, tels que décrits actuellement, regroupent vraisemblablement un plus grand nombre de genres qu'il conviendra de délimiter et décrire.



**Figure 6** : Topologie générale de la famille des Udoteaceae à partir de la représentation bayésienne.



**Figure 7** : Siphon de la fronde présentant des appendices latéraux en « inflorescence » présent chez les individus du clade 6 « Udotea » dont l'espèce est inconnue.

## 2) Phylogénie des Rhipiliaceae

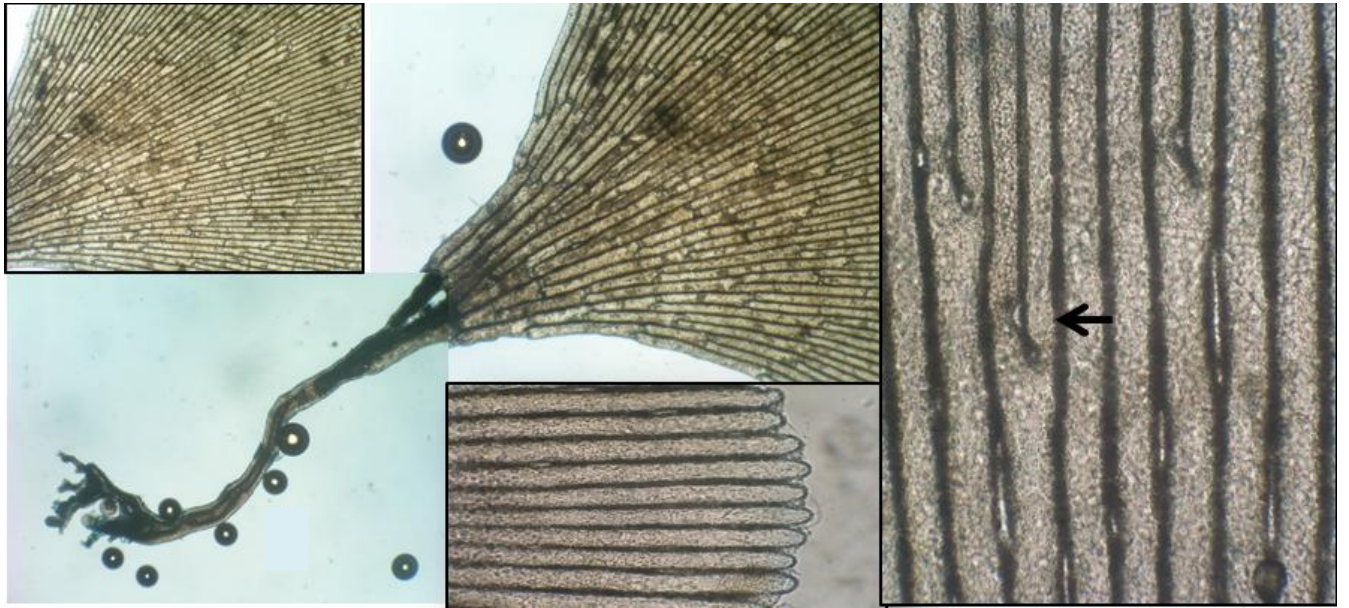
Contrairement aux études précédentes (Verbuggen 2009 et 2012), Rhipiliaceae apparaît non monophylétique (cf Fig.9). En effet, le cœur de cette famille (R1), constitué des genres *Rhipilia* et *Rhipiliopsis* se voit additionné d'une seconde lignée du genre *Rhipiliopsis* (R2) se rattachant en sœur à la famille Halimedaceae. Le genre type (*Rhipilia*) se trouvant dans le groupe R1, ce dernier peut être considéré comme le « vrai » clade familial. R1 est représenté par le genre *Rhipilia*, qui, comme dans les précédents travaux (Verbruggen 2009), n'est pas monophylétique avec la présence notamment de *Pseudochlorodesmis* sp. en son sein. Le genre *Rhipilia* se répartit en deux grandes lignées se subdivisant par la suite : Une composée des espèces *R.crassa* et *R.sinuosa*, auxquelles s'ajoute un groupe constitué d'individus exclusivement de PNG. Une seconde lignée dans laquelle, à la différence des études précédentes, *R. pusila* se branche, non pas avec les deux espèces précédentes, mais avec *R. nigrescens*, d'une part et *R. coppejansii*, récemment décrite, d'autre part. Parmi le clade *Rhipilia*, de nombreux échantillons n'ont pas d'équivalents sur *GenBank*, et des analyses supplémentaires devront déterminer s'il s'agit ou non de nouvelles espèces. En l'état actuel, les relations phylogénétiques à l'intérieur de ce genre ne sont pas clairement établies et le recours à d'autres marqueurs et à un plus grand nombre d'échantillons de diverses régions permettra de mieux établir la diversité réelle du genre.

Le genre *Rhipiliopsis*, se répartit en deux: Le premier se branche en clade frère de *Rhipilia* pour les représentations ML et MP ( $bs=51$  et  $90$ ) ou en rateau par analyse bayésienne. Il est formé de *R. profunda* (originaire des Caraïbes) et d'un individu de Nouvelle-Calédonie. Pour ce dernier, une observation morphologique a permis de mettre en évidence une coalescence des siphons au niveau de la fronde, des dichotomies dépourvues de constriction, l'absence de papillae formant des « anneaux ». Autant de caractéristiques partagées avec *R. profunda* et le distinguant des autres *Rhipiliopsis*.

Le second clade, nommé R2, correspondrait après vérification morphologique à *Rhipiliopsis papuensis*. En effet, les spécimens, tous originaire de PNG, possèdent un stipe monosiphonné dépourvu d'épines mais présentant une cortication à contre-sens (vers la base). Les filaments de la fronde sont renflés latéralement au même niveau d'un siphon à l'autre ce qui permet l'adhésion entre siphons adjacents par l'intermédiaire de papillae(cf Fig10).

La correspondance des observations morphologiques aux résultats moléculaires et phylogénétiques souligne la polyphylie du genre *Rhipiliopsis*.

Ce constat amène à reconsidérer la pertinence du transfert par Norris et Blair (Norris et Olsen, 1991) de l'espèce unique *Jonhson-sea-Linkia profunda* (Eiseman & Earle 1983) à *Rhipiliopsis profunda*. La position phylogénétique du spécimen assigné à *R. profunda*, isolée



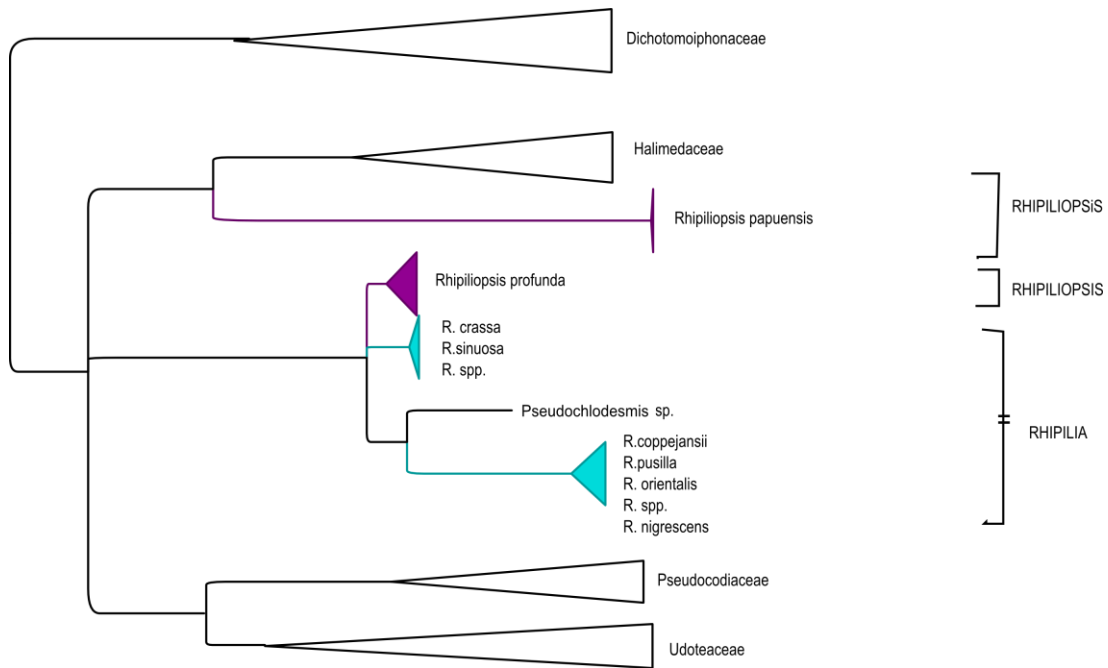
**Figure 8** : *Rhipidosiphon lewmanomontiae* : La fronde monostromatique s'élève sur un stipe présentant de jeunes rhizoïdes. Dichotomies à constrictions asymétriques (flèche).

---

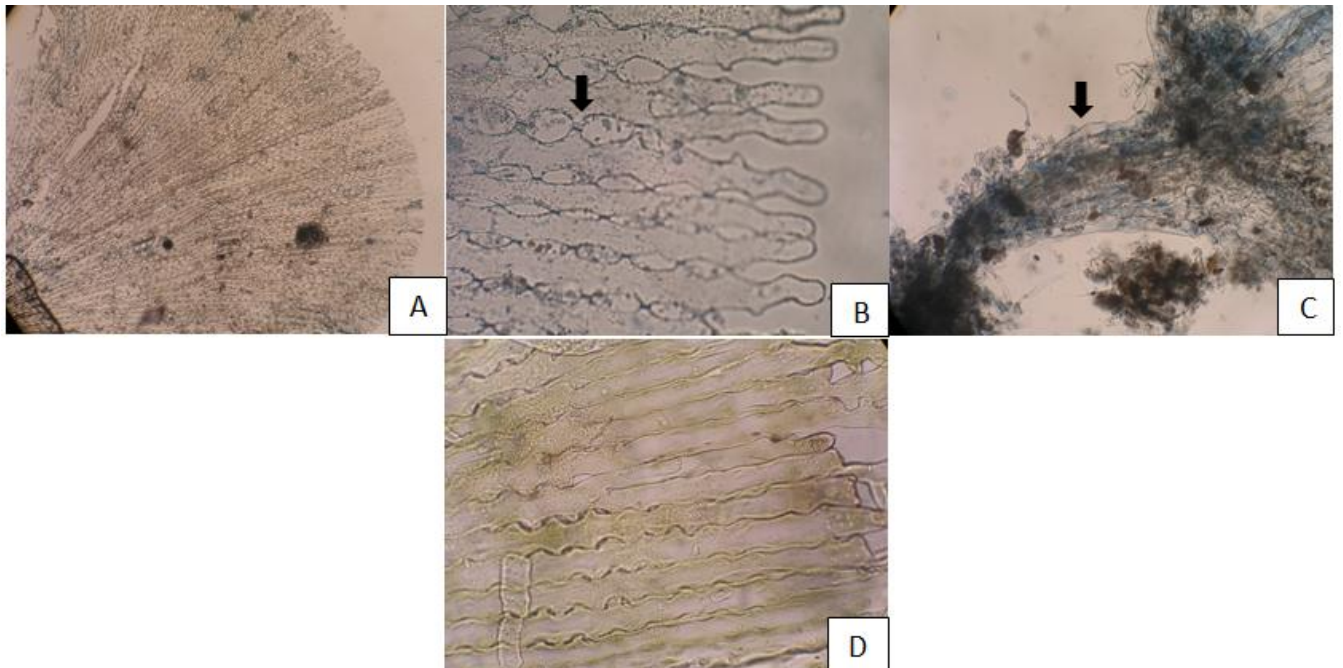
des autres *Rhipiliopsis*, et d'autre part, attaché à un clade uniquement composé de *Rhipilia* spp. (excepté *Pseudochlorodesmis* sp.) remet en question son appartenance au genre *Rhipiliopsis*.

D'autres investigations sont nécessaires avant de pouvoir conclure s'il s'agit d'un genre à part entière et s'il convient de reconsidérer le genre *Jonhson-sea-Linkia* pour ces deux spécimens, ou s'il doit être rattaché au genre *Rhipilia* même si ce dernier n'est pas non plus correctement résolu.

Quoi qu'il en soit, la présence de *Rhipiliopsis papuensis* en clade-frère de Halimedaceae, remet en question le statut du taxon *Rhipiliopsis* en tant que genre et/ou porte atteinte à la monophylie de Rhipiliaceae. Il faudrait connaître la position phylogénétique d'autres espèces de ce genre (autre que *R. profunda*) avant de pouvoir conclure sur la question.



**Figure 9** : Topologie générale de la famille des Rhipiliaceae à partir de l'analyse Bayésienne;



**Figure 10** : A-C : *Rhipiliopsis papuensis* (A) Fronde circulaire monostromatique ; (B) siphons sinueux coalescents grâce aux papillae se trouvant de part et d'autre des siphons adjacents (flèche); (C) Stipe multisiphonée avec filaments corticaux en direction de la base (flèche).  
 D : *Rhipiliopsis* sp. : Siphons coalescents formant un thalle compact. Les dictionomies sont dépourvues de constrictions.



## V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats des analyses moléculaires et l'interprétation phylogénique qui a suivi, ont permis d'assigner plusieurs spécimens d'Udoteaceae et de Rhipiliaceae à différents genres voire espèces en fonction de la disponibilité des séquences. Par ailleurs, la phylogénie révèle des entités dont le statut reste à éclaircir : Les genres *Udotea* et *Rhipidosiphon* qui s'entremêlent et pourraient répondre un nombre de genres plus importants qu'actuellement admis ; la famille Rhipiliaceae qui apparaît polyphylétique et comprend des genres non monophylétiques : *Rhipilia* pour qui il serait intéressant d'analyser la distinction en deux clades et la proximité phylogénétique, dans chacun d'entre eux, d'espèces pourtant différentes; et enfin *Rhipiliopsis*, avec notamment une possible remise en question du transfert *Jonhson-sea-Linkia* à *R. profunda*.

Malgré le peu de séquences *tufa* disponibles pour les familles étudiées, l'apport des analyses moléculaires est considérable et multiple. Dans certains cas, il permet de compléter les analyses morphologiques et anatomiques. Dans d'autres cas, il remet en question ces critères à la base de la taxonomie, en révélant de la diversité cryptique, ou des incohérences de classification à l'échelle des espèces, des genres, et parfois même des familles. Cependant, comme constaté lors de cette étude, cet outil présente certaines limites et demande un recours à des séquences extérieures pour enrichir les bases de données à l'appui des représentations phylogénétiques. En ce cas, il est nécessaire d'approfondir l'étude en élargissant le champ de données par l'amplification d'autres marqueurs. Les séquences *rbcL* à venir, vont notamment permettre de confirmer ou réfuter les constats révélés tout au long de cette étude, voire approfondir et apporter de nouveaux renseignements. Mais pour de plus larges perspectives, il pourrait être judicieux d'utiliser des marqueurs de différents compartiments cellulaires (mitochondrie, noyau) qui apporteraient une gamme d'information génétique plus large et variée. Il pourra s'agir de marqueurs tels que l'ARN 18s ou 16S pour l'information nucléaire. Des séquences présentes sur *GenBank* témoignent de la faisabilité de l'amplification des marqueurs cités ci-dessus.

Par ailleurs, ce travail ne peut se dissocier d'une étude morpho-anatomique des spécimens. Dans l'idéal, une culture in-vitro permettrait d'évaluer les plasticités morphologiques et physiologiques. L'utilisation combinée de ces différentes méthodes pourrait dans un avenir proche, viser à l'établissement d'une clé de détermination prenant en considération une large gamme de données autres que les critères de morphologie externe (ultrastructure, physiologie, biochimie, séquençage génomique). Ceci, non pas dans un but de supplanter la taxonomie mais plutôt de la compléter.

Ainsi, les points de questionnement entrevus posent différentes pistes de recherche qu'il serait intéressant d'emprunter. Ce travail d'ensemble sur les Udoteaceae et Rhipiliaceae était nécessaire pour faire le point sur leur position phylogénétique respective au sein des Bryopsidales et plus précisément du sous-ordre Halimedaneae. Il apparaît alors





évident qu'une étude propre à chacune des familles serait digne d'intérêt, notamment pour éclaircir les relations phylogénétiques à l'intérieur de chacune d'elle, à l'échelle générique puis spécifique et tenter de résoudre l'ambiguïté sur la détermination des genres et espèces. En l'état actuel, il est tout autant possible de révéler l'existence de nouveaux genres, comme de proposer la synonymie entre plusieurs espèces.

Indéniablement, beaucoup reste à faire dans le domaine de la phycologie, que ce soit en termes de diversité génétique, de phylogénie, ou d'évolution.



## BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, Isabella, and John Huisman. *Marine Green and Brown Algae of the Hawaiian Islands*. Hawaii: Bishop museum, 2004.
- Cocquyt, Ellen, Heroen Verbruggen, Frederik Leliaert, Frederick W. Zechman, Koen Sabbe, and Olivier De Clerck. "Gain and Loss of Elongation Factor Genes in Green Algae." *BMC Evolutionary Biology* 9, no. 1 (2009): 39.
- "Coppejans & Prud'homme van Reine 1989 Rhipilia Blumea.pdf," n.d.
- Coppejans, E., O. De Clerck, and F. Leliaert. "New Records of the Green-algal Genus Rhipiliopsis (Udoteaceae, Caulerpales) from Papua New Guinea and the Seychelles Islands." *Botanica Marina* 42 (1999): 377–382.
- Coppejans, Eric, Frederik Leliaert, Heroen Verbruggen, Anchana Prathep, and Olivier De Clerck. "Rhipidosiphon Lewmanomontiae Sp. Nov. (Bryopsidales, Chlorophyta), a Calcified Udoteacean Alga from the Central Indo-Pacific Based on Morphological and Molecular Investigations." *Phycologia* 50, no. 4 (July 13, 2011): 403–412. doi:10.2216/10-90.1.
- COPPEJANSI, E. "A NOTE ON RHIPIILIA NIGRESCENS COPPEJANS & PRUDROIVIME VAN REINE (CHLOROPHYTA)." Accessed June 26, 2013. <http://www.phycology.ugent.be/reprints/p63.pdf>.
- Dijoux, Laury, Heroen Verbruggen, Lydiane Mattio, Nathalie Duong, and Claude Payri. "Diversity of *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in New Caledonia: a Combined Morphological and Molecular Study." *Journal of Phycology* 48, no. 6 (December 2012): 1465–1481. doi:10.1111/jpy.12002.
- Eiseman, Nathaniel J., and Sylvia A. Earle. "Johnson-sea-linkia Profunda, a New Genus and Species of Deep-water Chlorophyta from the Bahama Islands." *Phycologia* 22, no. 1 (1983): 1–6.
- Famà, Patrizia, Brian Wysor, Wiebe HCF Kooistra, and Giuseppe C. Zuccarello. "MOLECULAR PHYLOGENY OF THE GENUS CAULERPA (CAULERPALES, CHLOROPHYTA) INFERRED FROM CHLOROPLAST tufA GENE1." *Journal of Phycology* 38, no. 5 (2002): 1040–1050.
- Hernandez, Pedro. "APPROVED FOR FINAL DRAFT SUBMISSION." University of California, n.d.
- Huisman, John. *Marine Plants of Australia*. Australia, 2000.
- Kooistra, Wiebe HCF. "Molecular Phylogenies of Udoteaceae (Bryopsidales, Chlorophyta) Reveal Nonmonophyly for Udotea, Penicillus and Chlorodesmis." *Phycologia* 41, no. 5 (2002): 453–462.
- "Kraft 2007 Udotea.pdf," n.d.
- Kraft, Gerald. *Algae of Australia. Marine Benthic Algae of Lord Howe Island and the Southern Great Barrier Reef*. Vol. 1. Green Algae. CSIRO Publishing. Commonwealth of Australia: Mc Carthy, 2007.
- Kraft, Gerald T. "The Green Algal Genera Rhipiliopsis A. & ES Gepp and Rhipiliella Gen. nov.(Udoteaceae, Bryopsidales) in Australia and the Philippines." *Phycologia* 25, no. 1 (1986): 47–72.
- Lam, Daryl W., and Frederick W. Zechman. "PHYLOGENETIC ANALYSES OF THE BRYOPSIDALES (ULVOPHYCEAE, CHLOROPHYTA) BASED ON RUBISCO LARGE SUBUNIT GENE SEQUENCES1." *Journal of Phycology* 42, no. 3 (June 2006): 669–678. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00230.x.



- Leliaert, Frederik, Heroen Verbruggen, and Frederick W. Zechman. "Into the Deep: New Discoveries at the Base of the Green Plant Phylogeny." *BioEssays* 33, no. 9 (September 2011): 683–692. doi:10.1002/bies.201100035.
- Littler, D.S., and M.M Littler. "Systematics of Udotea Species (Bryopsidales, Chlorophyta) in the Tropical Western Atlantic." *Phycologia* 29 (1990): 206–252.
- Littler, D.S., and M.M. Littler. "Reestablishment of the Green Algal Genus *Rhipidosiphon* Montagne (Udoteaceae, Bryopsidales) with a Description of *Rhipidosiphon Floridensis* Sp. Nov." *British Phycological Journal* 25, no. 1 (March 1990): 33–38. doi:10.1080/00071619000650031.
- "Norris & Olsen 1991 Cladophora Deepwater.pdf," n.d.
- "SAUNDERS\_TufGF4\_2010.pdf," n.d.
- Stam, Wytze T., Jeanine L. Olsen, Susan Frisch Zaleski, Steven N. Murray, Katherine R. Brown, and Linda J. Walters. "A FORENSIC AND PHYLOGENETIC SURVEY OF CAULERPA SPECIES (CAULERPALES, CHLOROPHYTA) FROM THE FLORIDA COAST, LOCAL AQUARIUM SHOPS, AND E-COMMERCE: ESTABLISHING A PROACTIVE BASELINE FOR EARLY DETECTION1." *Journal of Phycology* 42, no. 5 (2006): 1113–1124.
- Verbruggen, Heroen, Matt Ashworth, Steven T. LoDuca, Caroline Vlaeminck, Ellen Cocquyt, Thomas Sauvage, Frederick W. Zechman, Diane S. Littler, Mark M. Littler, and Frederik Leliaert. "A Multi-locus Time-calibrated Phylogeny of the Siphonous Green Algae." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50, no. 3 (March 2009): 642–653. doi:10.1016/j.ympev.2008.12.018.
- Verbruggen, Heroen, and Tom Schils. "*RHIPILIA COPPEJANSII*, A NEW CORAL REEF-ASSOCIATED SPECIES FROM GUAM (BRYOPSIDALES, CHLOROPHYTA)<sup>1</sup>." *Journal of Phycology* 48, no. 5 (October 2012): 1090–1098. doi:10.1111/j.1529-8817.2012.01199.x.
- Verbruggen, Heroen, Caroline Vlaeminck, Thomas Sauvage, Alison R. Sherwood, Frederik Leliaert, and Olivier De Clerck. "PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *PSEUDOCHLORODESMIS* STRAINS REVEALS CRYPTIC DIVERSITY ABOVE THE FAMILY LEVEL IN THE SIPHONOUS GREEN ALGAE (BRYOPSIDALES, CHLOROPHYTA)." *Journal of Phycology* 45, no. 3 (June 2009): 726–731. doi:10.1111/j.1529-8817.2009.00690.x.
- (n.d.).

### **Webographie :**

- Algaebase : <http://www.algaebase.org/>
- Phycoweb : <http://www.phycoweb.net/>
- NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>

Les images utilisées pour ce rapport proviennent du site Algaebase (Michael D. Guiry) ou des différentes publications.



# ANNEXES





## **ANNEXE I : Protocole d'extraction (Kooistra, 2002)**

(Les modifications apparaissent en gras)

- 1) Prélèvement de 0,5 à 1 cm<sup>2</sup> d'échantillon sec (12h min d'évaporation pour spécimens à l'éthanol).
- 2) Broyage au piston (voire perceuse) avec l'azote liquide, jusqu'à la réduction en poudre.
- 3) Ajout de 500 µL de tampon d'extraction (100mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 50 nM EDTA, pH 8.0 ; 100 nM NaCl ; 1% m/v sodium diodecyl sulfate ; 1% m/v polyvinylpyrrolidone-40 et **1% v/v 2-mercaptoethanol**)\* préalablement chauffé à 60°C.
- 4) Incubation en lyse **3h** à 60°C avec agitations fréquentes.
- 5) Ajout d'un volume équivalent de Chloroforme-alcool isoamyll (CIA)\*.
- 6) Centrifugation 8 min à 16.000g.
- 7) Collecte de la couche aqueuse contenant l'ADN, ré-extraction au CIA, puis à nouveau une centrifugation 8min à 16.000g.
- 8) Précipitation de l'ADN présent dans la phase aqueuse par ajout de 0,5 volume d'acétate d'ammonium et 2 volumes d'éthanol 100%.
- 9) Stockage à -20°C de **1h à 2h** puis centrifugation à 16.000g 15min.
- 10) Déversement du contenu des tubes pour ne garder que le culot d'ADN ayant précipité au fond.
- 11) Lavage du culot d'ADN par ajout d'éthanol 70% et agitation.
- 12) Centrifugation de 5min à 16.000g.
- 13) Déversement du contenu puis séchage dans une cuve vacuum à 30°C pour 13min.
- 14) Suspension dans 50 µL de tampon de suspension (TRIS EDTA pH 8.0)\*

\* : Préparation des solutions :

- Tampon d'extraction(50ml)

- ◆ Solution de Tris-HCl (1M) : M= 157,6 g/mol ; V= 50ml >> m= 7,88g → pH=8
- ◆ Solution EDTA (1M) : M= 372,24g/mol ; V=50ml >> m= 18,61g → pH=8
- ◆ Solution NaCl (5M) : M= 58,44g/mol ; V=50ml>> m=14,61g
  - a) Cf(Tris-HCl)= 100mM ; Ci= 1M >> Vp= 5mL
  - b) Cf (EDTA) = 50 mM ; Ci= 1M >> Vp=2,5mL
  - c) Cf (NaCl)= 100 mM ; Ci= 5M >> Vp= 1mL
  - d) 1% (m/v) SDS >> m= 0,5g
  - e) 1% (m/v) PVP40 >> m= 0,5
  - f) 1% (v/v) 2-mercaptoethanol >> Vp= 0,5mL

- CIA (100mL) à 24/1 (V/V)

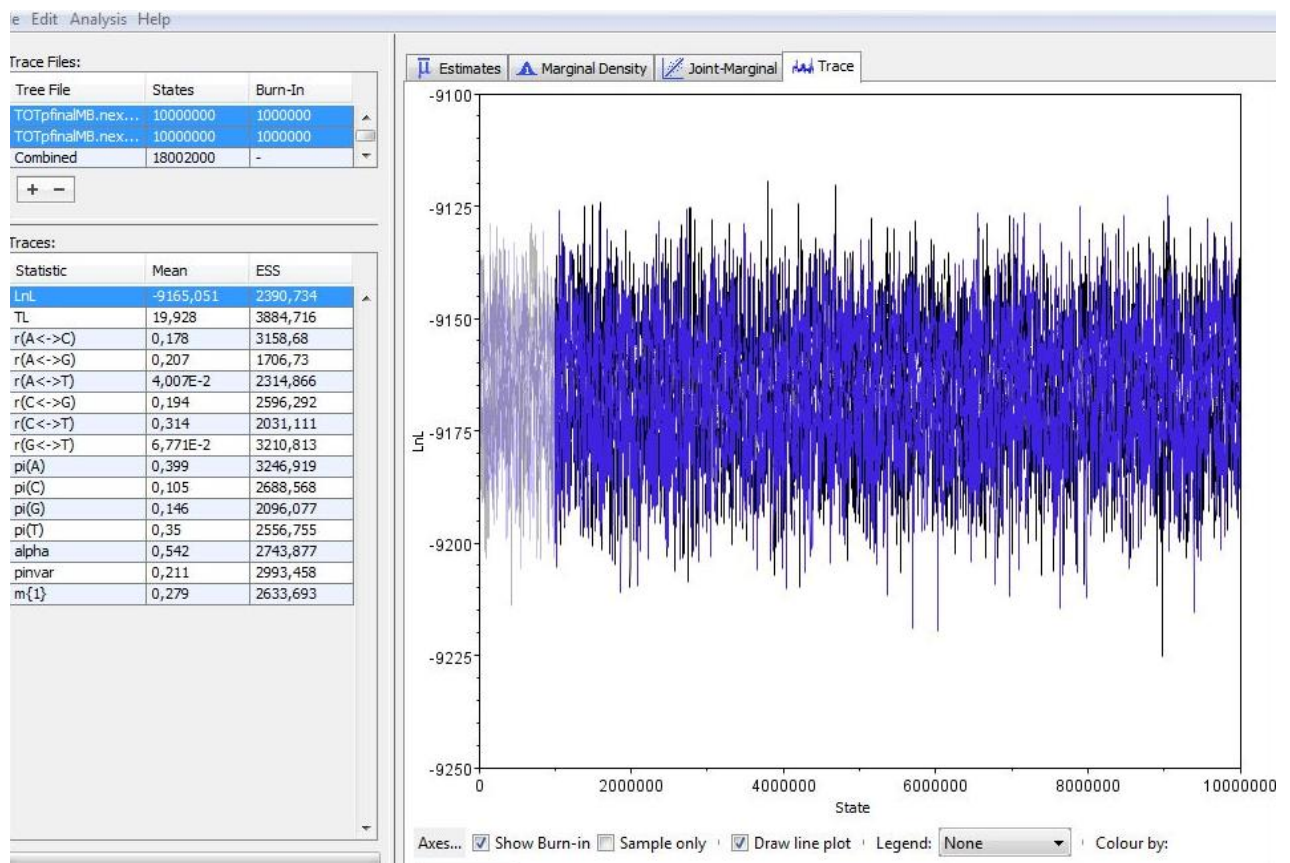
- ◆ Vp (Chloroforme)= 96mL M= 77,08g/mol >> m= 15,41g → pH=8
- ◆ Vp (isoamylalcohol) = 4mL

- Acétate d'ammonium (25mL ; 8M)

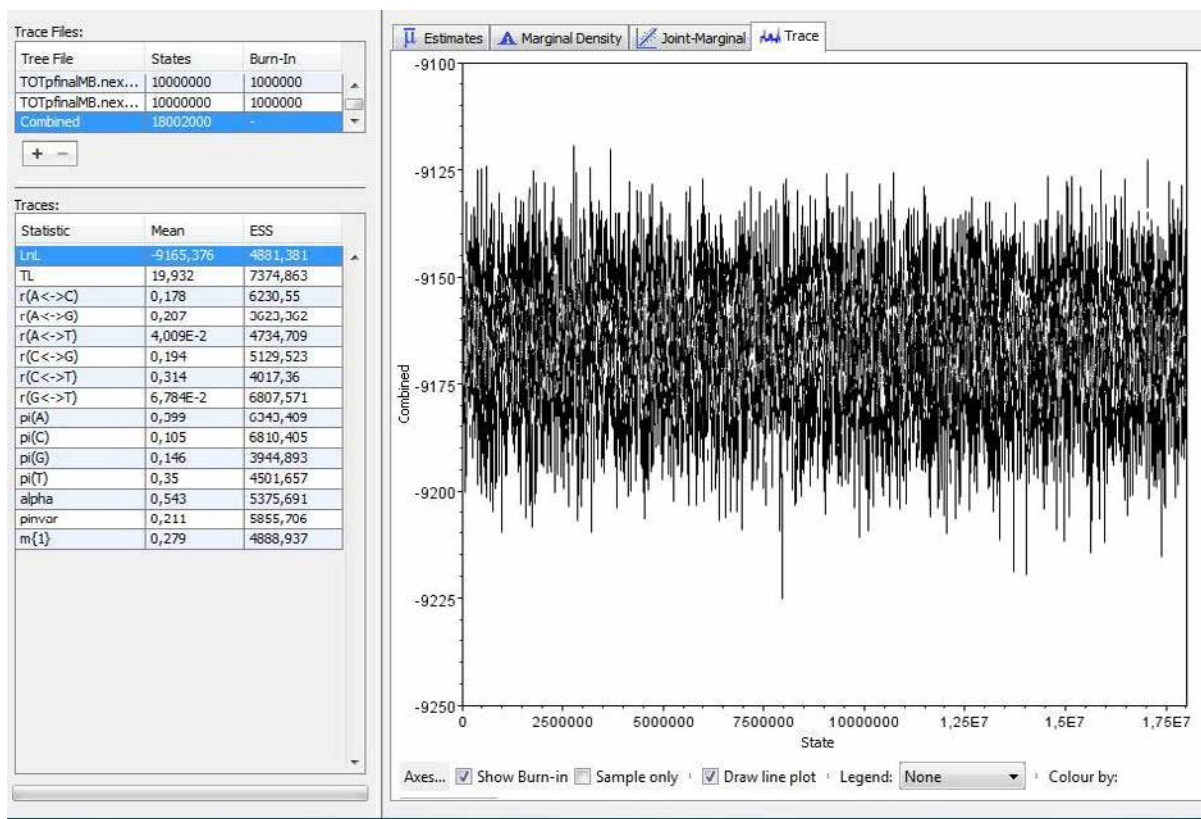
**ANNEXE III** : Détails de l'analyse bayésienne et représentation graphique des paramètres sous le logiciel Tracer (Rambaut et Drummond 2009).

La méthode bayésienne se base sur la fonction de vraisemblance mais se distingue de la méthode du Maximum de vraisemblance par le concept de probabilité qu'elle emploie. En effet, elle exprime la probabilité qu'un modèle fonctionne, étant donné le jeu de donnée posé, contrairement au ML qui représente la probabilité d'observer les données sous un modèle particulier. L'analyse bayésienne ne sélectionne donc pas l'arbre maximisant la vraisemblance mais attribue une distribution de probabilités *a priori* aux différents arbres puis réalise une inférence à partir de la distribution des probabilités *a posteriori*. Telle une « marche exploratoire » elle recherche des optimums dans l'espace de tous les arbres possibles par la méthode MCMC (Chaines de Markov Monte Carlo). Quatre chaînes à rôle différents (de la plus stricte à la plus laxiste) parcourent aléatoirement l'« espace » à la recherche des point chauds (arbre optimaux) et communiquent entre elles (température inter-chaîne) pour un meilleur échantillonnage des distributions.

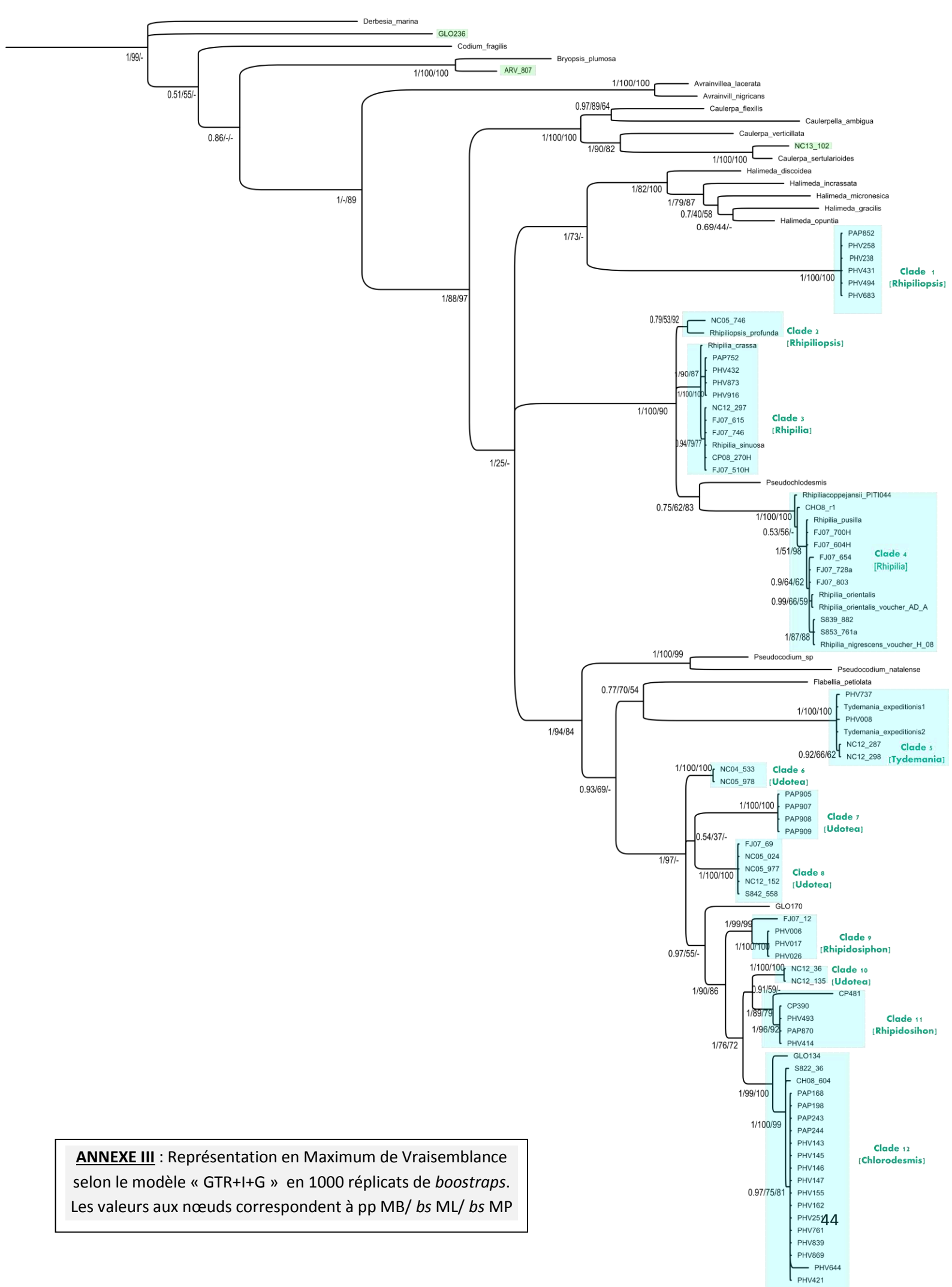
En général, pour une analyse bayésienne, deux opérations (*runs*) indépendantes sont lancées. Il faut ensuite vérifier qu'il y a eu congruence et s'assurer d'une inférence juste (Fig.A). Le *burn-in* correspond au nombre de générations nécessaire pour obtenir la superposition des deux *runs*.. La courbe renseigne également, à vue d'œil, sur le nombre de générations total qu'il est adéquat de lancer. Une concaténation (Fig.B) des deux *runs* indépendants permet ensuite, de vérifier que l'estimation est suffisante ou s'il faut modifier les paramètres.



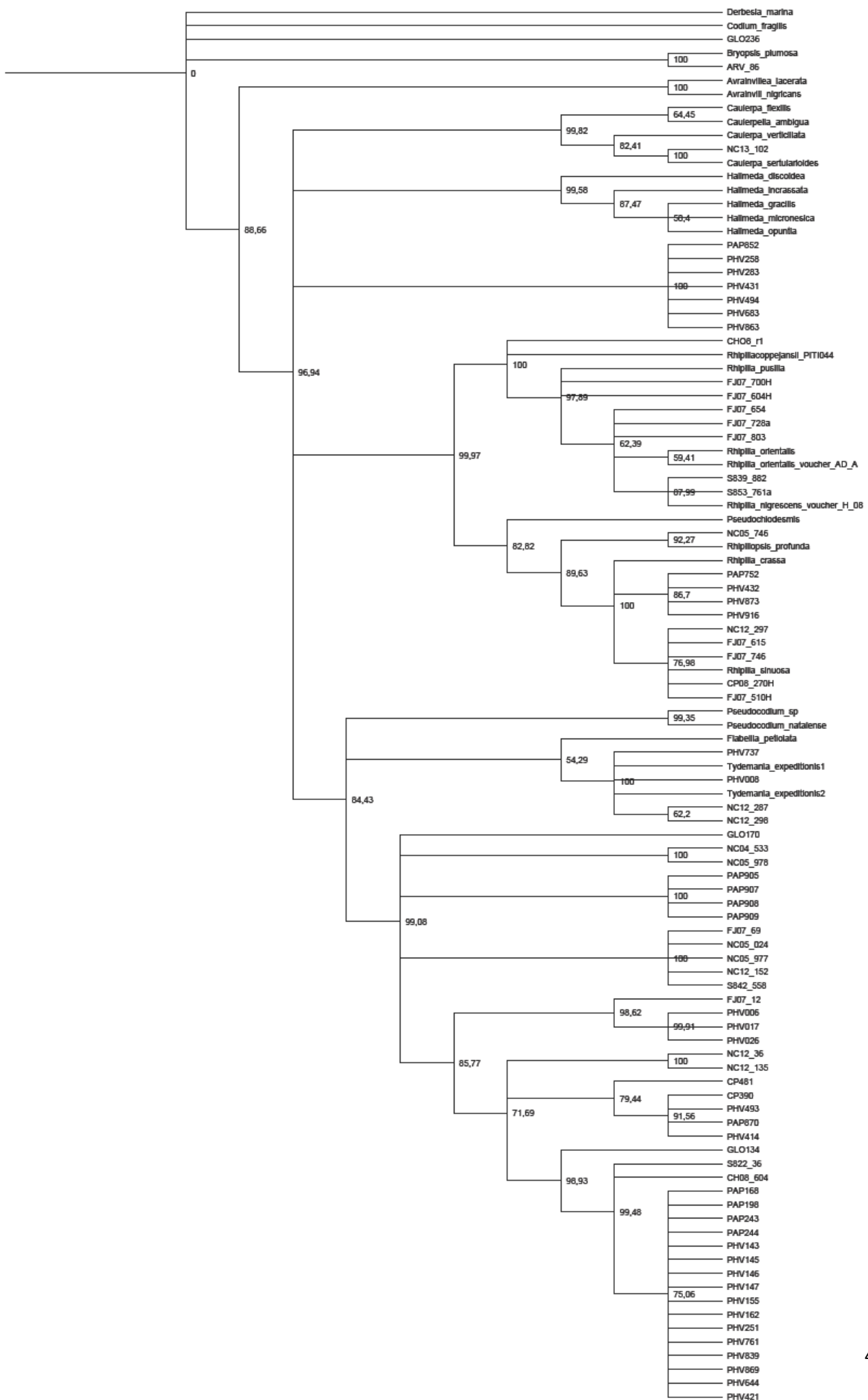
**Figure A** : Graphique des deux *runs* de 10 millions de générations se superposant. La convergence est démontrée et le *burn-in* est représenté par le premier million de générations.



**Figure B** : Graphique représentant la concaténation des deux *runs* indépendants.



**ANNEXE III** : Représentation en Maximum de Vraisemblance selon le modèle « GTR+I+G » en 1000 répliqués de *bootstraps*. Les valeurs aux nœuds correspondent à pp MB/ bs ML/ bs MP



## Calendrier de stage

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
Bibliographie															
Mise en place protocole															
Experimentation															
Traitement résultats															
Redaction															

## Intervenants

Intervenant	Idée originale	Bibliographie	Mise en place du protocole	Collecte de données	Analyse des données	Rédaction
Principal	CP	LL	LL	LL	LL	LL
Secondaire			AL		LB	CP

CP : Claude Payri (maître de stage)

LL : Laura Lagourgue (stagiaire)

LM : LaurentMillet (Technicien de laboratoire)

AL : Anicée Lombal (stagiaire)

LB : Laure Barrabet (Post-doctorante)

## Diversité génétique des Udoteaceae et Rhipiliaceae (Bryopsidales, Chlorophyta) de l'Indo-Pacifique

---

### Résumé :

Les Udoteaceae et Rhipiliaceae sont deux familles d'algues vertes marines appartenant à l'ordre des Bryopsidales. Leurs représentants consistent en une seule cellule plurinucléée géante et tubulaire, pouvant se dissocier en branches ou siphons. La morphologie qui en découle est pourtant variée, allant de la simple touffe de filaments à des structures bien plus complexes, en thalles uni- ou multiaxiaux avec ou sans imprégnation de calcaire. Ces morphologies bien distinctes amènent à onze genres pour les Udoteaceae et trois pour les Rhipiliaceae. Les caractères morphologiques et anatomiques semblaient, jusqu'à une dizaine d'années, bien délimiter les différents genres et espèces. Néanmoins, l'outil moléculaire, notamment les marqueurs chloroplastiques *tufa* et *rbcl* pour ces deux familles, conduit à des représentations phylogénétiques révélant d'une part, des incohérences dans cette classification préalablement admise, et d'autre part, des lacunes au niveau des relations entre les taxons, puisque beaucoup apparaissent non résolues. Cette étude a pour objectif d'apporter un supplément d'informations génétiques, afin d'approfondir l'analyse phylogénétique à l'intérieur de ces deux familles. La phylogénie basée sur le seul marqueur chloroplastique *tufa* contredit la monophylie des Rhipiliaceae et maintient les polyphylies des genres *Rhipilia*, *Rhipiliopsis*, *Rhipidosiphons* et *Udotea* au sein des deux familles. Cela confirme l'essoufflement des caractères morphologiques externes pour délimiter correctement les groupes naturels, que ce soit à l'échelle générique comme spécifique. Néanmoins, l'anatomie des siphons pourrait conduire à une classification qui se voudrait plus juste, puisqu'elle concorde, à l'échelle générique, avec la représentation phylogénétique. Cependant, ceci devra être vérifié et confirmé par l'apport d'informations génétiques en provenance d'autres marqueurs chloroplastiques, nucléaires, mitochondriaux.

**Mots-clés :** Udoteacea, Rhipiliaceae, génétique, phylogénie, diversité.