



HAL
open science

Structure génétique des populations de trois espèces de poissons de récifs cubains : *stegastes partitus*, *haemulon flavolineatum* et *acanthurus tractus*

Jessy Castellanos Gell Castellanos Gell

► To cite this version:

Jessy Castellanos Gell Castellanos Gell. Structure génétique des populations de trois espèces de poissons de récifs cubains : *stegastes partitus*, *haemulon flavolineatum* et *acanthurus tractus*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI; Universidad de La Habana (Cuba), 2012. Français. NNT : 2012PA112095 . tel-00713528

HAL Id: tel-00713528

<https://theses.hal.science/tel-00713528>

Submitted on 2 Jul 2012

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

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

**Université Paris-Sud 11
Universidad de la Habana
Centro de Investigaciones Marinas**

THESE

présentée par

Jessy CASTELLANOS GELL

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11

Spécialité : Biologie de l'évolution

Ecole doctorale : Gènes, Génomes, Cellules

Structure génétique des populations de trois espèces de poissons de récifs cubains : *Stegastes partitus*, *Haemulon flavolineatum* et *Acanthurus tractus*.

Soutenue le 1 juin 2012 devant le jury constitué de :

M. Pierre Capy	Professeur Paris-Sud 11	Examineur
M. Jorge Angulo Valdés	Professeur UH	Examineur
M. Marc Girondot	Professeur MNHN	Rapporteur
M. Serge Planes	DR CNRS EPHE	Rapporteur
M. Erik García Machado	Chercheur CIM	Directeur de thèse
M. Didier Casane	Professeur Paris Diderot	Directeur de thèse

Table des matières

Remerciements 7

Agradecimientos..... 9

I. Introduction.....15

II. Informations Complémentaires21

 II.1 Marqueurs moléculaires21

 II.1.1 ADN microsatellite.....21

 II.1.2 ADN mitochondrial23

 II.1.2.1 Région Non Codante de l’ADN mitochondrial25

 II.2 Structure génétique des populations de poissons de récifs25

 II.3 Modèles d’étude29

III. *Stegastes partitus*33

 III. 1 Caractéristiques générales de l’espèce33

 III. 2 Résultats35

 III.2.1 ADN microsatellite.....35

 III.2.1.1 Structure populationnelle36

 III.2.1.2 Diversité génétique.....39

 III.2.1.3 Analyse démographique40

 III.2.2 ADN mitochondrial42

 III.2.2.1 Diversité génétique et différenciation des populations42

 III.2.2.2 Démographie44

IV. *Haemulon flavolineatum*49

 IV. 1 Caractéristiques générales de l’espèce49

 IV. 2 Résultats51

 IV.2.1 ADN microsatellite51

 IV.2.1.1 Structure populationnelle52

 IV.2.1.2 Diversité génétique54

 IV.2.1.3 Analyse démographique.....55

IV.2.2 ADN mitochondrial.....	56
IV.2.2.1 Diversité génétique et différenciation des populations.....	56
IV.2.2.2 Démographie.....	59
V. <i>Acanthurus tractus</i>	63
V. 1 Caractéristiques générales de l'espèce	63
V. 2 Résultats.....	66
V.2.1 Région non codante	66
V.2.1.1 Diversité génétique et différenciation des populations.....	66
V.2.1.2 Démographie.....	68
V.2.2 Cytochrome b	70
V.2.2.1 Diversité génétique et différenciation des populations.....	70
V.2.2.2 Démographie.....	74
VI. Discussion générale	77
VI.1 Structure génétique	77
VI.2 Variabilité génétique.....	82
VI.3 Démographie.....	85
VI.4 La problématique <i>A. tractus/A. bahianus</i>	87
VI.4.1 Les arguments de l'ADNmt	87
VI.4.2 Dispersion des larves ou des adultes.....	88
VI.4.3 Un ou plusieurs événements de dispersion.....	88
VI.4.4 Quelques remarques.....	89
VI.5 Perspectives	89
VII. Matériels et méthodes.....	93
VII.1 Echantillonnage	93
VII.2 Traitement des échantillons	94
VII.3 Extraction de l'ADN	94
VII.4 Amplification de l'ADN microsatellite	95
VII.5 Génotypage	96
VII.6 Amplification de l'ADN mitochondrial	97

VII.7 Séquençage de l'ADN mitochondrial	97
VII.8 Traitements préliminaires des données	98
VII.9 Analyses statistiques	98
VII.9.1 ADN microsatellite	98
VII.9.1.1 Structure populationnelle	98
VII.9.1.2 Diversité génétique	99
VII.9.1.3 Analyse démographique	100
VII.9.2 ADN Mitochondrial	101
VII.9.2.1 Analyse des séquences	101
VII.9.2.2 Diversité génétique et différenciation des populations	101
VII.9.2.3 Analyse démographique	103
References Bibliographiques	105
Annexes	121
Abstract	137
Résumé	138

REMERCIEMENTS

Je suis reconnaissante à Pierre Capy, Marc Girondot, Serge Planes et Jorge Angulo d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse et d'avoir consacré du temps à l'évaluation critique de ce mémoire.

Je souhaite évidemment exprimer ma reconnaissance à mes co-directeurs de thèse, Erik Garcia Machado et Didier Casane. A Erik, parce que c'est déjà la troisième (et la dernière) thèse qu'on fait ensemble. A Didier pour le travail supplémentaire qu'implique le fait d'avoir une étudiante étrangère. Merci à eux deux pour leur patience, pour m'avoir permis de travailler sur un sujet si intéressant qui commence à se développer à Cuba, et pour m'avoir guidée et laissée une indépendance dans le travail. Merci pour l'opportunité de faire une partie de ma formation dans un pays et un laboratoire où j'ai pu pratiquer une activité scientifique à son meilleur niveau.

Un remerciement spécial à Silvan à qui j'étais collée tout le temps jusqu'au moment où il a décidé de partir et où j'ai gagnée un peu d'indépendance en France. Merci pour tout ton temps, ta compagnie, pour être allé à la fac toutes les années avec moi, pour m'emmener à l'aéroport avec toutes mes valises, pour parler espagnol, et pour pleins d'autres choses. A Amandine pour ne pas faire moins.

A Isa pour son amitié, pour être toujours prête à m'aider et pour l'avoir fait dans plusieurs occasions, pour son hospitalité. Merci à Véro pour son affection et pour son aide.

A Hélène, et les filles de l'IRD, Claire, et Maud qui m'ont tendue la main lorsque j'ai commencé mes manips sur les microsats avec le séquenceur automatique, et qui ont fait une place pour faire passer mes plaques parmi les leurs.

Enfin à tous et toutes dans le labo avec qui j'ai partagé un peu de temps et qui m'ont fait oublier la distance : Gaëlle, François, les deux Céline, Florence, Magalie, Brigitte, David, Emily, Isabelle, Patrick... Merci à tous, même si j'oublie d'en nommer.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy gracias a Dios por haberme permitido llegar hasta aquí y quiero agradecer además a todos los que de una forma u otra, ya sea en lo profesional o lo personal me han brindado su apoyo para la feliz culminación de esta etapa de mi vida.

A Yoa por su amor y su paciencia y porque ya no conozco la vida sin él.

A mi mamá y Ricardo por estar siempre ahí, por sacarme de todos los apuros, porque llamo y siempre responden, por su apoyo incondicional.

A mi papá porque su ejemplo me impulsa siempre en la vida.

A mi prima Lety por su apoyo, por cocinar, por internet, por soportarme en mi casa del vedado día y noche y por hacer todo para que yo pudiera trabajar tranquila.

A mi familia en general: mi abuela y mi tía Ida, mi hermanita, mis primos, mis tíos, mi suegra por su amor y su apoyo siempre... me siento feliz de pertenecer a este clan.

A Eloisa, Anmari y Ariagna por su amistad. Gracias por la ayuda con tantas cosas que necesité y gracias por los momentos de esparcimiento entre tantos días de escribir y escribir. A Ariagna además, porque aunque te hayas ido, tu trabajo en oceanología ha demostrado ser muy ventajoso.

A Volta por regalarme una portada tan linda y por permitirme opinar sobre otras que no lo fueron tanto.

En especial a Aymée y a mis compañeros de grupo Anna y Damir por su disposición y su ayuda en estos años.

A Adrian por el tiempo que me dedicó con los mapas y las distancias.

A Yuriem, Camila y Hanaina por el trabajo que hacen en la biblioteca, por su habilidad de buscar siempre la bibliografía que no tenemos.

A todos los muchachos del CIM, gracias por su ayuda cuando la necesité, ha sido un placer compartir con ustedes estos años: Orly, Leandro, Javier, Yuliet, Elaine, Jose Andrés, Alexei, Maickel, Patri, Maximo, Laura, Ivan, Lachi, el Coco, Pedrito.

También a Pedro por su guía y a los demás integrantes de esta familia por los momentos que hemos compartido: Teresa, Mirta, Betsy, Nelson y Yanisleidys, Harry, Henry y Lily, y Jessica.

A Yoa,

A mes parents

Introduction

I. INTRODUCTION

La dispersion des poissons de récifs dépend pour une large part, de l'existence de larves pélagiques qui peuvent être transportées au sein des courants marins loin de la population source (Cowen *et coll.*, 2000). Ceci est mis clairement en évidence chez les espèces territoriales, celles ayant un mode de vie benthiques ou celles ayant une phase adulte avec de faibles capacités de dispersion. De l'efficacité de ce transport dépendra donc l'existence de populations formant un continuum, plus ou moins connectées, tout le long des zones de récifs. Toutefois, ce phénomène de dispersion est beaucoup plus complexe et implique d'autres facteurs comme le comportement larvaire, la durée du stade larvaire pélagique, sa distribution vertical. D'autre part, la présence de barrières physiques, actuelles ou historiques peuvent limiter la dispersion de ces organismes. L'étude de cette question à Cuba nous aidera à déterminer les patrons de connectivité des récifs de l'archipel et aussi avec ceux de l'ensemble des Caraïbes. D'un point de vue pratique, cette information pourrait être utile à la mise en place de zones marines protégées.

L'étude de la dispersion par l'observation directe est très difficile pour deux raisons. Premièrement, au stade larvaire, les individus sont très petits, donc difficile à observer et par ailleurs ils sont très difficiles à identifier. Deuxièmement, de grandes distances isolent beaucoup de récifs parmi lesquels les individus adultes, ou les larves, se déplacent (Shulman et Bermingham, 1995; Rocha *et coll.*, 2005b). Ces deux facteurs limitent donc le suivi direct des individus comme moyen d'étude de la dispersion de la plupart des poissons de récifs (Hellberg, 2007; mais voir Planes *et coll.*, 2009). Il a donc été développé des méthodes qui, en utilisant des individus échantillonnés dans différentes zones, permettent à partir des informations obtenues par différents techniques d'inférer les patrons de migrations. Dans cette catégorie, on trouve les études de génétique des populations. Les populations peuvent être différentes du point de vue génétique à différents niveaux : 1) la présence de variants alléliques différents à un même locus, 2) des fréquences différentes pour un même variant à un *locus*, et 3) des déséquilibres de liaison différents entre variants à différents locus (Hellberg, 2007). Ces différences entre des populations s'accumulent ou se réduisent au cours du temps et avec des vitesses variables qui dépendent des effets simultanés de différentes forces évolutives dépendant elles-mêmes de facteurs environnementaux et de la biologie des espèces.

Il existe aujourd'hui une large gamme de marqueurs moléculaires qui peuvent être utilisés pour accomplir ce type de recherche. Cependant, pour qu'un marqueur

généétique soit potentiellement utile pour inférer si les populations sont ouvertes ou fermées à l'échange d'individus, il doit avoir un mode d'hérédité connu et être variable à l'intérieur de l'espèce (Hellberg *et coll.*, 2002). Les allozymes ont été très utilisées (Lacson et Morizot, 1991; Planes *et coll.*, 1996), mais elles ne révélaient qu'une partie limitée de la variabilité totale du génome (Nei, 1987) et c'est pourquoi elles ont cédé du terrain, en particulier à l'ADN mitochondrial et aux microsatellites. L'ADN mitochondrial a permis inférer des patrons de connectivité géographique. Il ne recombine généralement pas et sa taille de population effective est plus petite (1/4) que celle du génome nucléaire (Avisé, 1994), de sorte que les changements qui ont lieu au niveau populationnel sont détectés par ce marqueur plus facilement qu'avec des gènes nucléaires. Les microsatellites, d'autre part, sont très variables au niveau du nombre des répétitions et par conséquent un polymorphisme de taille est généralement observé. Ils peuvent être analysés de façon rapide et peu chère (Hellberg *et coll.*, 2002). Dans la pratique, la combinaison de divers marqueurs offre la plus grande quantité d'information pour l'étude d'une problématique particulière.

A Cuba, il a été encore fait trop peu d'études qui se servent des marqueurs moléculaires pour déterminer la structure génétique des populations de poissons des récifs et des patrons de connectivité entre les populations autour de l'île. Il existe certaines caractéristiques géographiques qui pourraient agir sur ce phénomène. Cuba comprend quatre groupes insulaires situés au nord et au sud et séparés entre eux par des zones beaucoup plus profondes où la plateforme est très étroite. D'autre part, Cuba est sous l'influence de divers systèmes de courants marins qui favorisent soit le mélange des différentes populations, soit l'autorecrutement. C'est pour ces raisons qu'on a souhaité étudier l'effet de la structure géographique de l'archipel cubain et la biologie reproductive des espèces sur la structure génétique et la connectivité des populations de poissons des récifs.

Dans cette perspective on a donc sélectionné trois espèces présentant des traits d'histoire de vies différents afin d'étudier leur influence sur la dispersion des poissons des récifs. Première espèce, *S. partitus* : c'est une espèce fortement territoriale qui fraie toute l'année mais préférentiellement pendant le printemps ; elle dépose ses œufs sur le substrat où ils sont protégés par le mâle. Les larves sont pélagiques pendant 28 jours dans la colonne d'eau. Deuxième espèce, *H. flavolineatum* : cette espèce fraie aussi toute l'année avec des pics pendant le printemps et l'automne ; les individus se regroupent pour la fraie, les œufs, puis les larves produits sont pélagiques, ces dernières ayant une durée d'existence très courte de 15 jours. Troisième espèce, *A. tractus* : cette espèce a un mode de vie nomade, les individus sont très mobiles même si des déplacements sur de grandes

distances n'ont pas été rapportés. Ils fraient aussi toute l'année avec des pics pendant les mois de janvier-février et août-septembre, les individus fraient par paires ou en formant des groupes, ils produisent des œufs pélagiques qui donnent des larves elles aussi pélagiques pendant 69 jours.

D'autre part, on connaît des facteurs environnementaux comme les fronts et courants marins, la topographie des fonds marins et de la côte qui affectent de la même façon la dispersion de toutes les espèces.

Si les facteurs environnementaux qui limitent ou favorisent la dispersion des organismes sont dominants sur les facteurs biologiques, on s'attend à trouver des patrons très semblables d'organisation de la diversité génétique des populations autour de Cuba, quelques soient les espèces considérées. Si les facteurs biologiques ont un effet dominant, on s'attend à des différences entre les patrons de structuration de la diversité génétique observés pour les différentes espèces. La combinaison des facteurs biologiques et environnementaux donnera des organisations de la diversité génétique plus ou moins semblables pour les différentes espèces en fonction du poids de ces différents facteurs.

Informations complémentaires

II. INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

II.1 Marqueurs moléculaires

II.1.1 ADN microsatellite

Les microsatellites sont des petites séquences d'environ quelques dizaines de nucléotides de longueur constituées par des éléments répétés dont la longueur peut varier entre 2 et 6 pb (Tautz, 1993). Tous les auteurs ne sont pas d'accord avec ce chiffre et la longueur des répétitions peut être fixée entre 2 et 8 pb (Armour *et coll.*, 1999), 1 et 6pb (Goldstein et Pollock, 1997) ou même entre 1 et 5 pb (Schlötterer, 1998).

On peut les classer selon la longueur de l'unité de base répété et en fonction de la structure de ces répétitions. Dans le premier cas ils seraient : mono-, di-, tri-, tétra-, penta- et hexa- nucléotides. Dans le deuxième cas, on les groupe en « parfait » s'ils contiennent un seul type d'unité répétée, « imparfait » s'ils contiennent une ou plusieurs interruptions à l'intérieur de la séquence, et « composé » lorsqu'ils sont constitués à partir de deux unités répétées différentes (Urquhart *et coll.*, 1994).

On les trouve de manière abondante chez les procaryotes autant que chez les eucaryotes. Chez l'homme, ils sont dispersés dans tout le génome et ils constituent environ 3% de celui-ci. La plupart du temps ils sont présents dans des régions non codantes, même s'il est connu qu'environ 8% sont localisés dans les régions codantes (Ellegren, 2000).

Les microsatellites ont été le marqueur par excellence pour beaucoup d'études de génétique des populations et d'écologie moléculaire (Schiffer *et coll.*, 2007; Duvernell *et coll.*, 2008; Edwards *et coll.*, 2008; Godinho *et coll.*, 2008; Schultz *et coll.*, 2008; Väli *et coll.*, 2008). L'élément clef de cette versatilité est la grande variabilité que l'on trouve de façon caractéristique à ces *locus*, et la rapidité et la fiabilité d'accès à ce type de données. Ce sont des marqueurs codominants qui abondent dans le génome ; ils sont relativement faciles à développer et peuvent être analysés à des couts modérés.

L'absence de fonction de ces séquences répétées, leur neutralité sélective, a été remise en question. Kashi y Soller (1999) ont montré que des microsatellites peuvent être des éléments codants et de régulation de l'expression de gènes. De plus, il a été montré que la variation du nombre de répétitions peut produire des

effets sur les fonctions des protéines et l'expression génique, mais aussi sur la physiologie et le développement des organismes (Nielsen *et coll.*, 1997; Brais *et coll.*, 1998). Toutefois, dans le cadre des études de génétique des populations, la plupart des microsatellites sont considérés comme des fragments d'ADN où les mutations sont neutres (Watkins, 2007).

Il y a des nombreux facteurs qui agissent sur la dynamique évolutive des microsatellites. Parmi eux, on trouve : le nombre de répétitions, la séquence du motif répété, la longueur de l'unité répétée, les séquences flanquantes, la présence d'imperfections, le taux de recombinaison et de transcription, l'efficacité du système de réparation et l'âge des individus. (Schlötterer, 2000; Ellegren, 2000a).

Les microsatellites ont un taux élevé de mutation spontanée, entre 10^{-2} chez l'homme (Weber et Wong, 1993) et 10^{-6} chez la drosophile (Schug *et coll.*, 1997), et par conséquent ils constituent une source de polymorphisme génétique importante (Kashi *et coll.*, 1997; King *et coll.*, 1997). Par ailleurs, on ne peut pas négliger leur patron de mutation. Comprendre le modèle de mutation qui est sous-jacent à l'évolution de ces locus est d'une grande importance pour le développement de statistiques qui montrent la structure génétique des données analysées (Balloux et Lugon-Moulin, 2002). Il y a dans la littérature deux modèles pour rendre compte des mutations dans les microsatellites: le modèle « IAM » pour infinite allele model (Kimura et Crow, 1964) et le modèle « SMM » pour stepwise mutation model (Ohta et Kimura, 1973).

Sous le modèle IAM chaque mutation produit un nouvel allèle et toutes les mutations ont la même probabilité d'apparition. Par contre, dans le cadre SMM, une mutation produit la perte ou l'addition d'une unité répétée et par conséquent on peut avoir comme résultat la création d'un allèle déjà présent dans la population (Estoup et Cornuet, 1999). Ainsi, les allèles avec des tailles très proches seraient plus proche phylogénétiquement que ceux avec des tailles plus différentes, et ce modèle possède donc une mémoire de la taille des allèles (Balloux et Lugon-Moulin, 2002). De plus, il est en accord avec un mécanisme moléculaire « mispairing slippage » à l'origine de l'addition ou de la délétion de répétitions et tient compte de l'homoplasie.

Il a été proposé deux variantes des modèles précédents : le Modèle à Deux Phases (TPM) c'est un cas particulier du SMM, développé par Di Rienzo *et al.* (1994) et le Modèle à K-Allèles (KAM) (Crow et Kimura, 1970) où il existe K allèles possibles avec une probabilité constante pour un allèle de muter vers n'importe quel des K-1 autres allèles.

En résumé, les microsatellites présentent un ensemble d'avantages qui ont déterminé son utilisation massive en génétique des populations : abondance, codominance, polymorphisme élevé et neutre en général. En plus, ils constituent de petits fragments d'ADN qui peuvent s'amplifier facilement pour PCR. Les travaux réalisés avec les microsatellites permettent de reconstruire l'histoire des migrations et de l'évolution des espèces, ainsi que évaluer la diversité biologique à différents niveaux d'organisation (Edwards *et coll.*, 1992).

II.1.2 ADN mitochondrial

Le génome mitochondrial des animaux est formé par une petite molécule unique d'ADN circulaire dont la taille varie dans une gamme assez étroite chez les vertébrés (16-20kb) (Awise *et coll.*, 1987; Boore, 1999). Sa séquence code pour 37 gènes dont 24 contiennent l'information pour une partie de la machinerie de traduction de la molécule elle-même (ARNt et ARNr), et les 13 autres pour les sous-unités de la chaîne de transport des électrons. En plus, il est reconnu une région régulatrice (ou de contrôle) des processus de réplication et de transcription de l'ADNmt d'environ 0.8 Kb nommée D-loop chez les vertébrés (Awise *et coll.*, 1987). Par ailleurs, il est décrit la présence, dans plusieurs ADNmt, de petits fragments non codants avec des fonction qui peuvent être aussi régulatrice (Boore, 1999).

L'utilité de l'ADNmt repose sur sa faible taille de population efficace, qui est généralement un quart de celle de l'ADN nucléaire et qui implique que la propagation d'un nouvel état d'un caractère dans une population va se produire, en moyenne, quatre fois plus vite que pour un marqueur autosomique. En plus, la taux de mutations synonymes est un ordre de grandeur plus grand que celui de l'ADN nucléaire (Birky *et coll.*, 1989; Li et Graur, 1991).

L'ADN mitochondrial a été largement utilisé comme un outil pour déchiffrer l'histoire évolutive et démographique des populations et des espèces (Ballard et Whitlock, 2004). Ce marqueur a démontré avoir une grande valeur en écologie moléculaire et en phylogéographie et 70% des études est basé sur l'analyse de la variation de la séquence de ce marqueur, de façon associée ou exclusive (Awise, 2000). Cette vaste application est due à une série d'avantages :

- Molécule à hérédité maternelle (les lignages maternels peuvent être suivis au cours du temps)
- Présent dans la cellule en copies multiples, ce qui est un avantage si l'on travaille avec du matériel dégradé.
- Évolution relativement rapide de la séquence, ce qui justifie son utilisation à l'échelle micro évolutive.

- Homoplasmie (un seul haplotype par individu, bien que l'hétéroplasmie puisse exister)
- Molécule haploïde avec absence de recombinaison

Cette dernière affirmation a été parfois mise en question à cause des travaux qui ont décrit des cas de recombinaison dans la mitochondrie chez les champignons et les plantes (Birky, 2001), et aussi une espèce de moule (Ladoukakis et Zouros, 2001) ainsi que chez l'homme où la machinerie de recombinaison semble être présente (Kajander *et coll.*, 2000).

Les limitations associées à ce marqueur sont :

- L'absence de recombinaison signifie que toute la molécule a la même histoire. Par conséquent, la généalogie construite à partir de l'ADNmt (comme n'importe quelle autre obtenue d'une seule molécule) ne reflétera forcément pas la totalité de l'histoire de l'espèce en question (Ballard et Whitlock, 2004).
- L'hérédité maternelle implique que l'information soit limitée lorsque la dispersion est liée au sexe (Ballard et Whitlock, 2004).
- L'emploi de la coalescence a montré que les données obtenues à partir de cette molécule (très utilisée de façon unique dans les décennies passées) sont souvent insuffisantes pour obtenir des estimations précises des paramètres contrairement aux données multi-locus qui ont amélioré de manière remarquable la performance des méthodes analytiques dérivées de la coalescence (Avice, 2010).

En général les taux de mutation de l'ADN mitochondrial sont plus grands que ceux de l'ADN nucléaire, mais le rapport entre la variation de l'un et de l'autre n'est pas constant et dépend des gènes en question (Ballard et Whitlock, 2004). Plusieurs facteurs ont été proposés comme cause de ce taux d'évolution élevé (Avice, 2009) :

- Mécanismes relativement inefficace de réparation de l'ADN ;
- Environnement riche en oxygène auquel les molécules d'ADNmt sont exposées dans la mitochondrie.
- Relâchement de contraintes fonctionnelles.
- L'ADNmt est nue (*i.e.* il n'est pas associé à des protéines histones qui sont elles-mêmes bien conservées and peuvent limiter le taux d'évolution de l'ADN nucléaire).

Par ailleurs, quelques positions dans la séquence de l'ADNmt sont plus susceptibles d'évoluer que d'autres, probablement du fait de pressions sélectives plus faible (Aquadro *et coll.*, 1984). La plus grande vitesse avec laquelle le génome mitochondrial évolue par rapport à d'autres génomes (2% de divergence par million d'années chez les mammifères (Brown *et coll.*, 1979), mais elle peut varier entre groupes (voir la revue de Avise, 2000) est attribuée premièrement aux changements dans ces sites-là au-delà desquels les différences s'accumulent plus lentement (Avise *et coll.*, 1987).

II.1.2.1 Région Non Codante de l'ADN mitochondrial

L'ADNmt contient une région non codante de grande taille située entre les gènes ARNt-Pro et ARNt-Phe. Cette région, habituellement nommée région de contrôle, contient les promoteurs de la transcription pour toute les deux chaînes, plus l'origine de réplication de la chaîne lourde (Chang et Clayton, 1986).

Cette région non codante de l'ADNmt est particulièrement utile pour les analyses phylogéographiques à petite échelle évolutive, c'est-à-dire quelques milliers ou quelques dizaines de milliers d'années (Ward *et coll.*, 1993). Le rôle fonctionnel réduit, et donc les faibles pressions sélectives sur cette séquence, font que quelques fragments de cette séquence évoluent plus vite que la moyenne de la molécule. Ils présentent un rythme exceptionnellement rapide de substitutions nucléotidiques et un niveau élevé de polymorphisme intraspécifique (*e.g.* McMillan et Palumbi, 1997; Lunt *et coll.*, 1998). Certains auteurs (Aquadro et Greenberg, 1983; Vigilant *et coll.*, 1989) suggèrent que le rythme de l'horloge moléculaire de l'ensemble de la région de contrôle peut être de trois à cinq fois plus grand que celui du reste du génome mitochondrial. Néanmoins, même à l'intérieur de cette région quelque espèces de vertébrées ont montré une variabilité faible, voire nulle (Baker *et coll.*, 1994; Walker, 1998).

II.2 Structure génétique des populations de poissons de récifs

La connectivité des habitats marins et les conclusions faites à partir d'études de génétique des populations, sont des sujets largement présents dans la littérature scientifique (Shulman et Bermingham, 1995; Waters *et coll.*, 2000; Riginos et Victor, 2001; Planes et Fauvelot, 2002; Rocha *et coll.*, 2002; Chen *et coll.*, 2004). Il est décrit que l'usage de marqueurs génétiques permet d'estimer d'une façon empirique, sous certaines conditions, les niveaux d'échanges entre les populations d'organismes marins (Hellberg, 2009). Cette information est de première importance pour la compréhension de l'évolution et l'écologie de ces organismes.

Du point de vue pratique, de tels travaux peuvent avoir des implications sur la conservation de la biodiversité soit à travers des programmes de gestion des ressources de pêche et/ou la définition de zones marines protégées (Lubchenco *et coll.*, 2003).

Chez les espèces de poissons marins, Il est souvent montré l'existence d'une faible structuration génétique due à d'importants flux génétiques entre les populations (Ward *et coll.*, 1994; Waples, 1998; DeWoody et Avise, 2000). Les premiers travaux qui ont traité de ce sujet avec des populations de poissons de récifs reposent sur l'analyse de la variation des allozymes pour caractériser la structuration génétique. La plupart de ces travaux a trouvé une absence de différenciation génétique entre les localités étudiées, ce qui suggère l'existence de grandes populations panmictiques sur l'ensemble de grandes régions (Vawter *et coll.*, 1980; Shaklee et Samollow, 1984; Lacson et Morizot, 1991; Lacson et Bassler, 1992).

Toutefois, Waples (1987) et Doherty *et coll.* (1995) ont trouvé que des populations de poissons de récifs peuvent être génétiquement différenciées sur l'ensemble de leur aire de répartition et ils ont suggéré que la cause de cette différenciation est en relation étroite avec la durée de la phase de larve pélagique. La plupart des espèces marines inclue dans son cycle de vie au moins une phase de ce type pendant laquelle les individus peuvent être transportés loin de la population source au sein des courants océaniques (Cowen *et coll.*, 2000).

D'autres études qui ont comparé des espèces avec différents types de développement larvaire, loin de trouver une régularité, ont montré que cet aspect du cycle de vie ne prédit pas de façon simple les flux entre populations séparées (Shulman et Bermingham, 1995; Planes, 1998) et que des facteurs océanographiques comme les fronts, les courants et les gires pouvaient modeler de façon diverse la rétention larvaire et l'autorecrutement.

Actuellement, on connaît divers facteurs qui agissent sur la structure génétique des populations de poissons de récifs, ce qui reflète la complexité de ce phénomène et son caractère multifactoriel. Du point de vue biologique, ces facteurs agissent plutôt sur le stade larvaire pélagique et on a défini (parmi d'autres) les suivants (Cowen *et coll.*, 2000; Cowen, 2002; Sponaugle *et coll.*, 2003) :

- Comportement de fraient des adultes (lieu et moment par rapport les courants, gires et marées)
- Présence et durée des stades pélagiques des œufs et des larves
- Comportement (*e.g.* phylopatric) et capacités sensorielles des larves

- Distribution horizontale et verticale des larves
- Potentiel de dispersion des juvéniles et adultes
- Environnement biotique (e.g. prédation et nourriture sur la zone inter établissement)
- Variation dans le succès reproductif (Hedgecock, 1994) qui peut produire un «chaotic genetic patchiness» (Johnson et Black, 1982)

La dispersion larvaire agit sur les niveaux d'échange génétique parmi les populations, pourtant, d'autres facteurs comme l'écologie des adultes peuvent avoir des effets du même ordre de grandeur (Hellberg, 2009).

Des facteurs écologiques et la présence d'habitats disponibles soit pour l'établissement des larves soit pour la colonisation par des adultes, peuvent limiter l'aire de distribution des espèces. Il a été constaté que l'adaptation aux habitats différents peut produire des lignées génétiquement différenciées dans la même espèce indépendamment des facteurs océanographiques et de la durée de la phase larvaire pélagique (Riginos et Nachman, 2001; Rocha *et coll.*, 2005b). De la même façon, la capacité d'utiliser différents types d'habitats est en rapport direct avec l'importance de l'aire de distribution de nombreux poissons de récifs de la côte atlantique occidentale (Luiz *et coll.*, 2011).

La structure génétique des populations de poissons de récifs a aussi une origine dans l'effet de facteurs physiques sur la dispersion de ces organismes. Même si les caractéristiques écologiques de l'habitat ne sont pas propices à leur développement, des facteurs océanographiques peuvent agir comme barrières en empêchant la dispersion larvaire et en produisant l'isolement (Planes *et coll.*, 1996; Rocha *et coll.*, 2002; Taylor et Hellberg, 2006; Galarza *et coll.*, 2009) et ainsi agir comme des pièges et favoriser la rétention larvaire dans les récifs locaux (Swearer *et coll.*, 2002). D'autre part, la circulation océanique transporte aussi les larves, ce qui permet la dispersion et colonisation d'habitats lointains (Muss *et coll.*, 2001) ainsi que l'homogénéisation génétique à grandes distances (Horne *et coll.*, 2008).

Un point fondamental dans l'interprétation des données génétiques est de pouvoir discerner les événements historiques du reste des facteurs qui agissent sur la structure génétique des populations (Fauvelot et Planes, 2002). L'échange de migrants qui a lieu dans le présent ne correspond pas nécessairement aux inférences sur la connectivité entre les récifs formulées sur la base des données génétiques, car la structuration génétique dépend des phénomènes génétiques, biotiques et abiotiques qui ont eu lieu dans le passé et qui peuvent être différents de ceux aujourd'hui à l'œuvre. Identifier et discriminer différents scénarios est

essentiel, comme par exemple savoir si deux populations génétiquement similaires échangent quelques migrants dans le présent ou si elles se sont isolées dans un passé récent (Hellberg, 2007). La structure génétique des populations a été souvent mise en relation avec des événements historiques comme les changements de niveaux de la mer à cause des glaciations (Planes *et coll.*, 1993; Bowen *et coll.*, 2006a), des événements de colonisation (Rocha *et coll.*, 2005a), l'émergence de terres (Muss *et coll.*, 2001), etc.

Aujourd'hui, il existe une grande quantité d'information accumulée pour des espèces différentes, ce qui a permis de faire des études comparatives qui englobent dans une large mesure la diversité des poissons des récifs qui habitent les mers tropicales, et qui permet de faire des généralisations à grande échelle (Lester et Ruttenberg, 2005; Luiz *et coll.*, 2011). Il est à noter qu'il y a une prédominance des travaux dont l'échantillonnage prend en compte l'ensemble de l'aire de distribution des espèces étudiées. Bien que ces travaux nous donnent une vision général des patrons de dispersion (Rocha *et coll.*, 2005b; Bowen *et coll.*, 2006b), ces résultats pourraient cacher des phénomènes d'échange que se manifeste à plus petite échelle (*e.g.* Planes *et coll.*, 1996). Ainsi, d'après Doherty *et coll.* (1995), on doit faire plus attention à la stratégie d'échantillonnage car les erreurs de détection des variations à petite échelle pourraient surestimer la divergence apparente à grande échelle.

Dans le cas particulier de Cuba, on trouve très peu d'études antérieures à notre travail sur la structure génétique des populations d'organismes marins. Le seul travail de ce type portent sur les deux espèces les plus importantes de crevettes qui habitent la plateforme cubaine (*Litopenaeus schmitti* et *Farfantepenaeus notialis*). Les résultats montrent la présence de structuration génétique significative entre quelques populations proches géographiquement ainsi qu'une différenciation entre deux golfes séparés 350Km (Garcia Machado *et coll.*, 2001; Espinosa *et coll.*, 2003; Borrell *et coll.*, 2004; Robainas, 2004; Robainas *et coll.*, 2005). D'autre part, Paris *et coll.* (2005) ont simulé le transport larvaire de cinq espèces de vivaneaux autour de l'archipel cubain en utilisant un modèle de circulation océanique de haute résolution qui comprend des facteurs physiques et biologiques. Cette étude montre l'influence des courants marins sur la dispersion des larves, et indique un niveau d'autorecrutement entre 37 et 80%, ce qui implique une certaine identité des populations locales (figure 1.1).

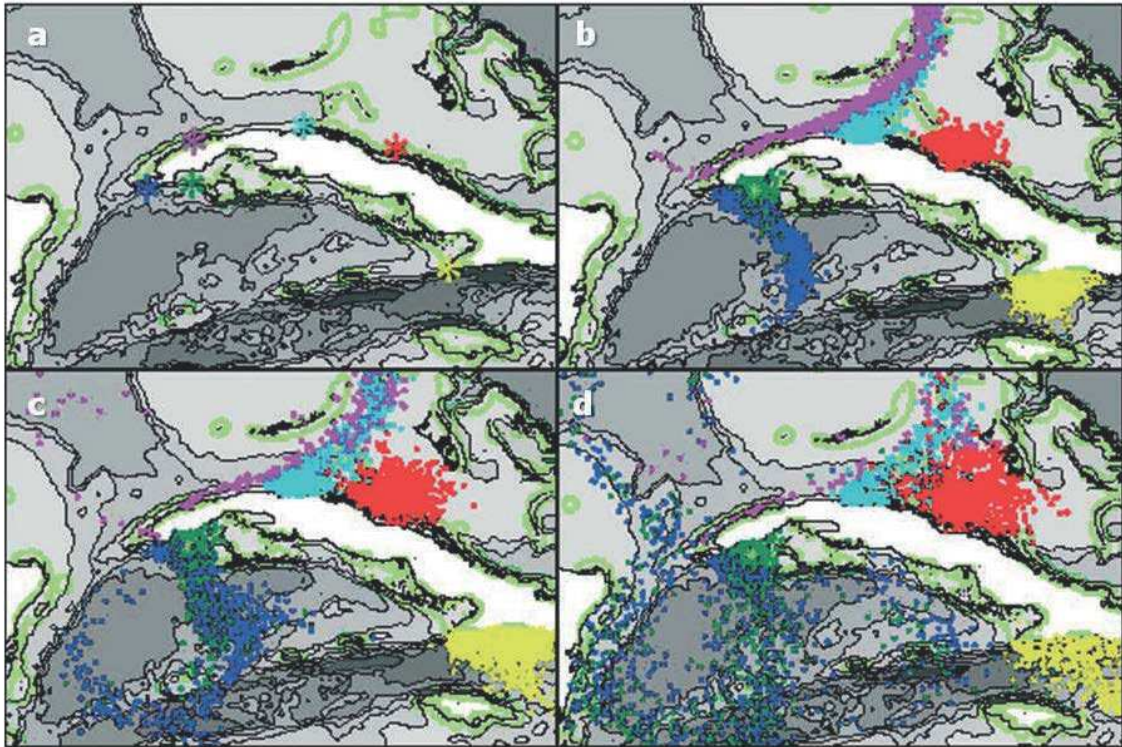
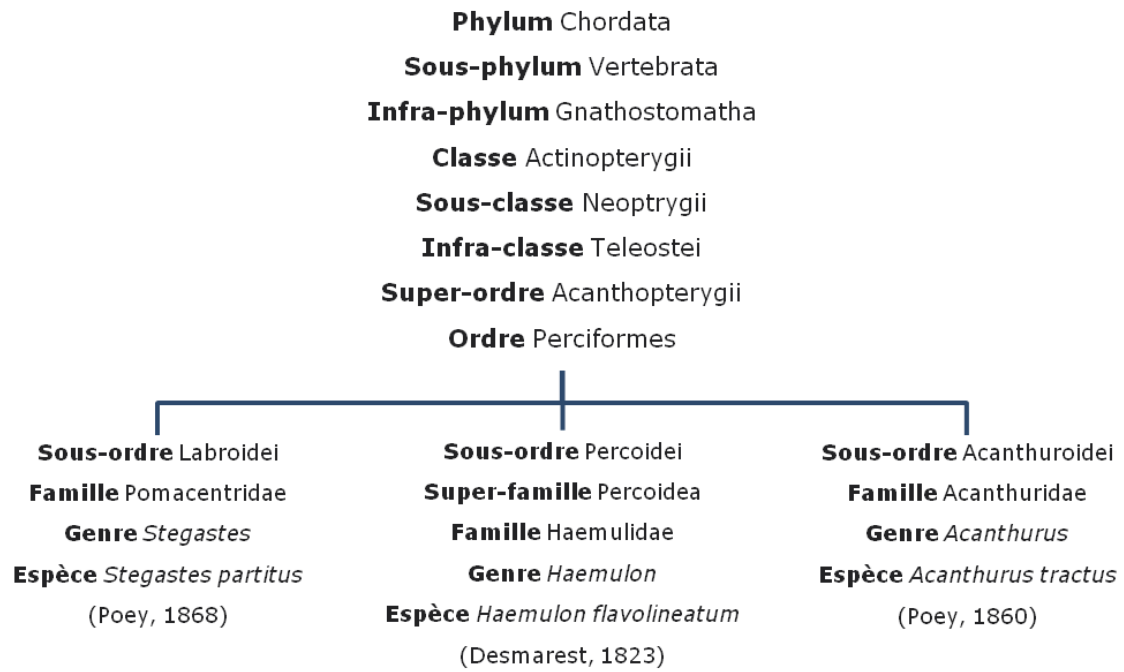


Figure 1.1 Transport simulé des larves dans les jours a) 1, b) 7, c) 14 et d) 30 après le premier jour de l'événement de frai de *Lutjanus analis* dans cinq sites autour de Cuba, correspondants aux couleurs. Le transport larvaire dans cette étude a été considéré passif. Extrait de Paris *et coll.* (2005).

II.3 Modèles d'étude

Afin de réaliser notre travail, nous avons sélectionné trois des espèces parmi les plus communes qui vivent dans les récifs cubains : *Stegastes partitus*, *Haemulon flavolineatum* et *Acanthurus tractus*. Elles partagent quelques caractéristiques qui les rendent particulièrement appropriées pour cette étude : leur distribution est à peu près la même et couvre l'ensemble des récifs des Caraïbes, des îlots de la Floride et les Bahamas (Claro, 1994) ; ces espèces sont relativement faciles à échantillonner soit avec des filets, soit avec des fusils sous-marins ; il existe des informations scientifiques sur leurs caractéristiques écologiques et reproductives (e.g. Burke, 1995; Robertson *et coll.*, 2005; Verweij *et coll.*, 2006; Figueira *et coll.*, 2008) ; des études de génétique des populations ont déjà été effectuées pour d'autres régions des Caraïbes et de l'Atlantique occidental (Lacson et Morizot, 1991; Lacson, 1992; Rocha *et coll.*, 2002; Hepburn *et coll.*, 2009). En revanche, ces espèces montrent des différences au niveau de quelques aspects de leurs traits d'histoire de vie que nous décrivons plus loin.

La position taxonomique, selon Nelson (2006) et Bernal et Rocha (2011), des espèces étudiées est présentée ci-dessous :



Stegastes partitus



III. STEGASTES PARTITUS

III. 1 Caractéristiques générales de l'espèce

L'espèce *Stegastes partitus*, (Poey, 1868) , (figure 3.1), appelée « demoiselle bicolor » est une des neuf espèces de la famille Pomacentridae qui vivent dans la mer des Caraïbes (Allen, 1991). Sa distribution correspond à l'Atlantique Occidental, soit le sud de la Floride, les Bahamas et les Caraïbes, mais s'étend probablement jusqu'au Brésil (Cervigón, 1993) (figure 3.2).

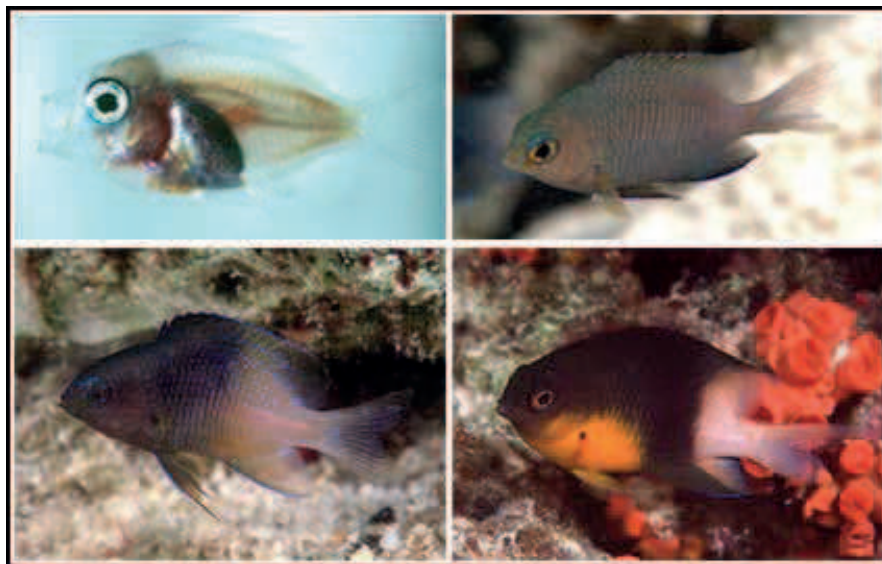


Figure 3.1. *Stegastes partitus*. A : larve ; B : juvénile ; C : juvénile à un stade avancé ; D : adulte. Extrait de Humann (2007).

Les adultes atteignent une longueur maximale de 10,0 cm (LT)(Claro, 1994) ce qui est en accord avec nos observations qui montrent une valeur moyenne de 5,14cm (minimum 3,36 cm et maximum 9,9 cm) (n = 286). Ils présentent un patron de coloration dans lequel la partie antérieure du corps est habituellement noire et la partie postérieure blanchâtre. Il est courant de trouver un deuxième type de coloration avec une tache jaune située dans la région ventro-latérale. La limite entre la zone sombre et claire est variable; la zone antérieure sombre peut couvrir seulement la partie supérieure de la tête ou s'étendre plus postérieurement jusqu'à la moitié du corps ou encore plus en arrière jusqu'à la base de la nageoire caudale. Rarement, on trouve des individus présentant un patron de coloration inversé, avec la partie antérieure du corps claire et la partie postérieure sombre (Smith, 1997).

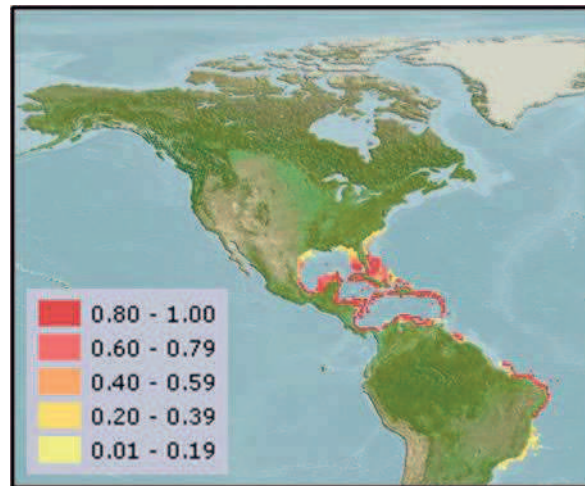


Figure 3.2 Distribution de *Stegastes partitus*. L'échelle de couleurs indique la probabilité d'occurrence. Extrait de Fishbase (Froese et Pauly, 2011).

Les demoiselles bicolores sont des poissons diurnes et benthiques. Leur nourriture consiste principalement en débris organiques et organismes appartenant au phytobenthos, au zoobenthos et au zooplancton.

La demoiselle bicolore a été utilisée comme modèle dans différentes études de la biologie des poissons des récifs coralliens car elle partage quelques aspects de son cycle de vie avec d'autres espèces de poissons des récifs, comme l'existence de larves planctoniques et une très grande fidélité à son lieu de vie depuis son recrutement jusqu'à sa maturité (Chittaro *et coll.*, 2006).

La reproduction se déroule de la façon suivante : les femelles déposent les œufs sur le substrat, puis les mâles fertilisent, protègent et entretiennent la ponte (Robertson *et coll.*, 1988). Les mâles sont polygynes séquentiels et c'est pourquoi le nid contient souvent des groupes œufs de différentes femelles à différents stades de développement (Schmale, 1981).

La fraie se réalise préférentiellement à certains moments, ce qui est rapporté aussi pour la plupart des poissons tropicaux (García-Cagide *et coll.*, 2001). Même si cette espèce se reproduit toute l'année, ils existent des maximums dans la taille relative des gonades et l'abondance des juvéniles qui sont consistants avec un patron saisonnier de reproduction au niveau des populations et qui ont été enregistrés pendant le printemps (février-juillet) (Betancourt, 2005).

Les œufs éclosent préférentiellement pendant la nuit, trois jours après la ponte, et ensuite les larves sont emportées dans l'océan (García-Cagides *et coll.*, 1994). A ce moment-là, elles commencent la phase planctonique qui dure entre 27 et 31 jours (moyenne 28,8 jours) jusqu'au recrutement sur un récif (Robertson *et coll.*, 1988; Wellington et Victor, 1989). Il est à noter que Villegas-Hernández *et coll.* (2008)

ont trouvé des valeurs différentes, minimum de 24 jours et maximum de 39 jours, pour les populations de *S. partitus* dans la localité de Banco Chinchorro, située à l'Est de la péninsule de Yucatán. D'après ces auteurs, la variabilité de la durée du stade larvaire chez *S. partitus* serait due aux différences de disponibilité d'habitat et de nourriture.

D'autre part, il est décrit que les larves sont transportés par les courants marins vers les eaux océaniques très proches du tombant (Valdes-Muñoz et Mocheke, 1994) (à quelques centaines de mètres de la côte, < 5km) et qu'elles sont distribués dans les premiers 100 m de profondeur. Le recrutement et la métamorphose se produisent rapidement (Sponaugle et Cowen, 1996a). Une fois un individu installé sur un site, il reste sédentaire et occupe une zone relativement petite (<2 m²) (Robertson *et coll.*, 1988; Chittaro *et coll.*, 2006). Valdes-Muñoz et Mocheke (1994) ont défini *S. partitus* comme une espèce territoriale, les individus sont isolés, ils occupent de façon permanente des espaces individuels, lesquels sont défendus, en particulier de l'entrée d'autres poissons. Le territoire défendu comprend le refuge, les zones d'alimentation et le site de fraie.

Stegastes partitus présente le plus haut pic de recrutement pendant l'été, et les nouvelles recrues arrivent avec une longueur maximale de 25 mm (Almada-Villela *et coll.*, 2003). Une étude réalisée à l'île de la Barbade par Sponaugle et Cowen (1996b) indique des augmentations temporaires de larves et de juvéniles. Les pics d'abondance correspondent avec le troisième quart de lune. Mais d'autres observations ont été faites dans d'autres localités. Par exemple, au Panamá, *S. partitus* présente des cycles de recrutement où les pics se produisant juste avant (Robertson *et coll.*, 1988) ou après (Robertson, 1992) la nouvelle lune.

Ces événements de synchronisation avec le cycle lunaire sont cohérents dans une localité donnée pour différentes espèces du même genre. Le recrutement de *S. leucostictus* à la Barbade possède aussi un pic d'abondance dans le troisième quart lunaire (Sponaugle et Cowen, 1996b) et de la même façon Robertson (1992) a rapporté que le recrutement de cinq autres espèces du genre *Stegastes* qui vivent sur les côtes de Panamá est synchronisé avec la nouvelle.

III. 2 Résultats

III.2.1 ADN microsatellite

Nous avons étudié un total de 248 individus de l'espèce *Stegastes partitus* de cinq localités autour de Cuba, en utilisant quatre locus microsatellites : SpGATA16,

SpAAT40, SpAAC41 et SpGATA40T. La taille de l'échantillon par site est reportée dans le tableau 3.1.

Aucun des locus analysés n'a présenté d'allèles nuls d'après le logiciel Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et coll.*, 2004). De la même façon, dans la comparaison par paires des locus analysés, aucune ne montre de déséquilibre de liaison après la correction de Bonferroni avec une valeur de probabilité corrigée de $\alpha=0.0083$ (annexe 1)

Tableau 3.1. Localités et nombre d'individus échantillonnés pour les données microsatellites. Entre parenthèse les années d'échantillonnage.

Localité	N
Ilot Breton	45 (2008)
Ilot Avalos	52 (2005)
La Bajada	48 (2005)
Plage Baracoa	55 (2006)
Ilot Coco	48 (2007)
Total	248

Le calcul de la statistique F_{IS} n'indique pour aucun des locus un écart significatif aux proportions de l'équilibre de Hardy-Weinberg une fois appliqué la correction de Bonferroni pour les tests multiples $\alpha=0,0025$ (400 randomisations) (tableau 3.2).

Tableau 3.2. F_{IS} par locus et localités d'échantillonnage de *Stegastes partitus*. Aucune valeur significative après correction de Bonferroni ($\alpha=0.0025$ et 400 randomisations).

	Plage Baracoa	Ilot Avalos	La Bajada	Ilot Coco	Ilot Breton
SpGATA16	0.119	0.202	0.194	0.187	0.156
SpAAT40	0.178	0.052	0.254	0.157	0.247
SpAAC41	0.266	0.155	0.131	0.280	0.129
SpGATA40T	0.163	0.136	0.266	0.277	0.127

III.2.1.1 Structure populationnelle

On a testé l'existence d'une structuration génétique des individus en analysant l'ensemble des données avec le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et coll.*, 2000). D'après la méthode d'Evanno, ils existent 2 clusters qui groupent tous les individus

échantillonnées, clusters qui n'ont pas un rapport clair avec les localités où les individus ont été capturés (figures 3.2 et 3.3). Néanmoins la figure montre que la plupart des individus (68,75%) de la localité d'Ilot Coco ont une probabilité d'appartenance au cluster vert supérieur ou égal à 0,6, au contraire du reste des localités où moins de la moitié des individus possède cette caractéristique : Plage Baracoa (45,45%), La Bajada (33,33%), Ilot Breton (22,22%) et Ilot Avalos (21,15%). Cela pourrait indiquer une certaine différenciation génétique de cette localité par rapport aux autres.

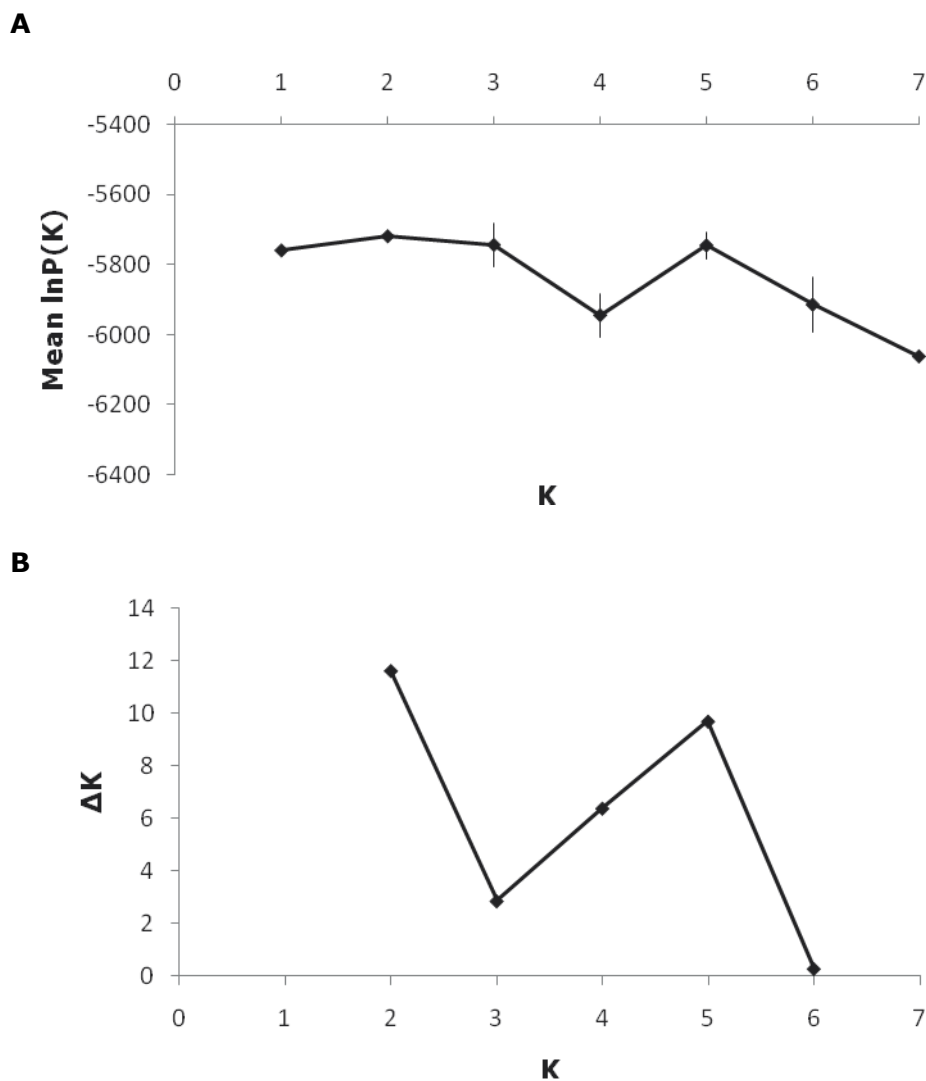


Figure 3.2. Détermination du nombre de populations (K) de *S. partitus* a partir des données microsatellites. **A** : Moyennes et écart-types pour 20 runs des probabilités postérieures pour les valeurs de K. **B** : Méthode d'Evanno.

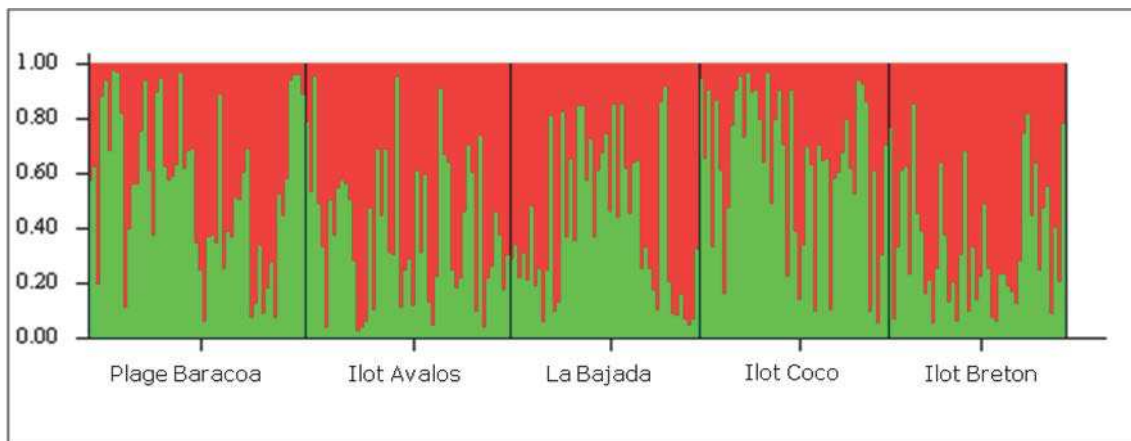


Figure 3.3. Probabilité d'appartenance de chaque individu aux 2 clusters, représentés par des couleurs différentes, et obtenue avec le logiciel STRUCTURE.

D'autre part, la matrice de valeurs de F_{ST} pour les localités prises deux à deux nous montre une différenciation exprimée par des valeurs de F_{ST} très faibles mais significatives d'un point de vue statistique. Cette différenciation, on la trouve pour toutes les localités sauf La Bajada (tableau 3.3).

Tableau 3.3. F_{ST} pour les localités d'échantillonnage de *Stegastes partitus* prises deux à deux. Les valeurs en gras sont significatives après la correction de Bonferroni ($\alpha=0.005$ et 200 randomisations).

	Plage Baracoa	Ilot Avalos	La Bajada	Ilot Coco
Ilot Avalos	0.0092*			
La Bajada	0.0059	-0.0001		
Ilot Coco	0.0129*	0.0130*	0.0076	
Ilot Breton	0.0084*	0.0064*	0.0019	0.0095*

Une représentation de cette différenciation basée sur la méthode du cadrage multidimensionnel non-métrique et les distances génétiques de Nei (1978) (figure 3.4) montre que les localités de Plage Baracoa et Ilot Coco sont les plus éloignées du reste du point de vue génétique, cette dernière étant la plus isolée.

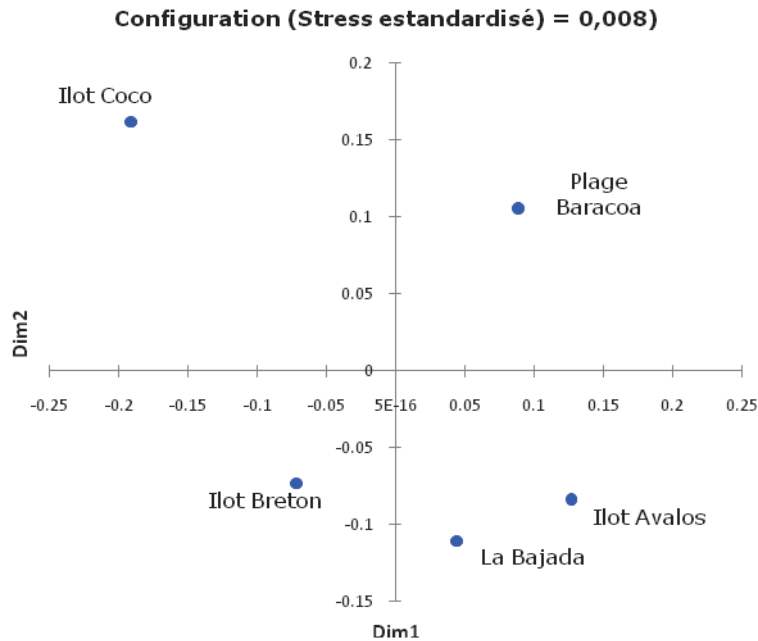


Figure 3.4. MDS basé sur la matrice des distances génétiques de Nei (1978).

Le test de Mantel ne nous a pas permis de rejeter l'hypothèse nulle d'absence de corrélation entre les matrices de F_{ST} et les distances géographiques construites à partir du patron général des courants marins ($r=0.513$, $p=0.124$) ou en prenant en compte la distance minimum entre l'îlot Breton et l'îlot Coco ($r=0.539$, $p=0.109$).

III.2.1.2 Diversité génétique

La variabilité génétique a été estimée à partir des 4 locus microsatellites pour l'ensemble des données et en prenant chaque localité de façon indépendante.

En général, tous les locus possèdent un nombre élevé d'allèles qui oscillent entre 21 et 37 (locus SpAAT40 et SpGATA40T respectivement) (tableau 3.4).

La localité avec la plus grande variabilité lorsqu'on regarde le nombre moyen d'allèles par locus est l'îlot Avalos, l'îlot Breton présente le nombre le plus bas (tableau 3.4). Cela peut être attribué aux différences de la taille de l'échantillon analysé par site. On a donc calculé la richesse allélique qui mesure cette quantité indépendamment de la taille de l'échantillon. La localité avec la valeur la plus grande de richesse allélique reste l'îlot Avalos mais celle avec la valeur la plus basse est l'îlot Coco.

Les estimations de hétérozygotie observées (H_o) et attendues (H_e) sont élevées, que ce soit par locus ou par localité d'échantillonnage, les fréquences attendues des hétérozygotes étant plus grandes que celles observées (tableau 3.4).

Le rang allélique le plus grand est observé avec le locus SpGATA40T qui présente une différence de 134 entre le nombre maximum et minimum de répétitions (tableau 3.5).

Tableau 3.4. Statistiques descriptives sur les microsatellites étudiés pour *S. partitus* par localité d'échantillonnage. Ba : Plage Baracoa, Av : Ilot Avalos, Bj : La Bajada, Co : Ilot Coco, Br : Ilot Breton

	Ba	Av	Bj	Co	Br	Na	Ho	He
SpGATA16	17	26	25	22	20	33	0.795	0.940
SpAAT40	16	17	16	16	16	21	0.697	0.922
SpAAC41	28	29	25	21	22	36	0.829	0.949
SpGATA40T	28	24	26	28	26	37	0.833	0.953
M	22.25	24	23	21.75	21			
Ra	19.61	21.21	21.43	19.88	20.22			
Ho	0.756	0.807	0.747	0.721	0.788			
He ±	0.92 ±	0.93 ±	0.94 ±	0.93 ±	0.94 ±			
e.t.	0.03	0.03	0.02	0.02	0.01			

Na : Nombre total d'allèles, Ho : Hétérozygotie observée, He : Hétérozygotie attendue, Ra : Richesse allélique, M : nombre moyen d'allèles par locus

Tableau 3.5. Rang allélique pour les quatre locus microsatellites de *S. partitus*

Locus	Rang allélique
SpGATA16	100
SpAAT40	57
SpAAC41	99
SpGATA40T	134
Moyenne	97.5
E.T.	31.52

III.2.1.3 Analyse démographique

L'écart de la valeur observée de diversité génique dans la population par rapport à sa distribution théorique a été testé en utilisant le test de Wilcoxon (Wilcoxon sign rank test) disponible dans le logiciel Bottleneck. D'une part on a analysé toutes les localités indépendamment et d'autre part on les a regroupées en prenant en compte des résultats des analyses de structure génétique. On a trouvé des

arguments en faveur d'un goulot d'étranglement, dans tous les cas pour le modèle IAM, et dans certaines localités pour les modèles TPM et SMM (tableau 3.6).

Tableau 3.6. Test de Wilcoxon pour la détection de goulots d'étranglement. p-excès d'hétérozygotes. En gras les valeurs significatives pour $\alpha=0,05$.

	IAM	TPM	SMM
Plage Baracoa	0,03125	0,15625	0,90625
Ilot Avalos	0,03125	0,09375	0,90625
La Bajada	0,03125	0,03125	0,03125
Ilot Breton	0,03125	0,03125	0,03125
Ilot Coco	0,03125	0,09375	0,90625
Toutes sans Ilot Coco	0,03125	0,06250	0,90625

L'analyse démographique avec le logiciel Lamarc (Kuhner, 2006) a été réalisé en prenant en compte de manière indépendante les groupes : Ilot Coco et le reste des localités regroupées. Ce logiciel recommande d'utiliser le programme Structure (Pritchard et coll. 2000) pour déterminer la structure des populations à analyser, étant donné que si le taux migration est élevée on n'obtiendra pas de résultats précis. L'analyse a montré que les deux populations se trouvent dans des conditions démographique différentes. La valeur de l'estimateur de croissance pour Ilot Coco est $g=-492,68$ (IC95% -499,55 à -447,30) ce qui indique une réduction de la taille de la population. Par contre, pour le reste des localités cette estimation indique une stabilité démographique $g=-0,002$ (IC95% -0,040 à 0,149). La valeur de θ pour ilot Coco est de $\theta=0,044$ (IC95% 0,035 à 0,054), et pour le reste $\theta=9,961$ (IC95% 9,788 à 9,996). En ce qui concerne les taux de migration (M), la valeur de M vers la population de l'ilot Coco est $M=0,010$ (IC95% 0,010 à 0,011) et celle dans le sens inverse $M=0,091$ (IC95% 0,050 à 0,140). Le taux de migration calculé en terme de $4Nm$ a été 0,004 individus vers l'ilot Coco est 0,89 vers le reste des localités.

III.2.2 ADN mitochondrial

III.2.2.1 Diversité génétique et différenciation des populations

On a séquencé un fragment de 379 pb de la région non codante de l'ADN mitochondrial chez 231 individus de *S. partitus* échantillonnés autour de Cuba (tableau 3.6). L'analyse de l'ensemble des individus a permis d'identifier 82 haplotypes différents et 74 sites polymorphes (tableau 3.7). Les valeurs relatives de composition nucléotidique montrent une prédominance des A et T (68,92%) par rapport à C et G (31,08%).

Le test d'homogénéité des fréquences n'a montré aucune différence entre les localités échantillonnées au cours du temps (annexe 2). C'est pourquoi on a mélangé les haplotypes des mêmes localités obtenues pour différentes années.

Tableau 3.6. Localités et nombre d'échantillons pour les séquences d'ADNmt de *Stegastes partitus*. Entre parenthèse les années d'échantillonnage.

Localité	n	n
Ilot Breton	35 (2008)	----
Ilot Avalos	25 (2005)	25 (2008)
La Bajada	18 (2005)	26 (2010)
Plage Baracoa	25 (2006)	25 (2009)
Ilot Coco	27 (2007)	25 (2008)
Total		231

On a construit un réseau d'haplotypes en utilisant la méthode de « median joining », et une optimisation basé sur le maximum de parcimonie (figure 3.5). On a obtenu une représentation en forme d'étoile dans laquelle il apparait un haplotype en fréquence majoritaire (111 individus) dont les autres dérivent, séparés par un ou deux pas mutationnels. Beaucoup moins représentés, on trouve deux haplotypes chez 13 et 14 individus qui représentent eux aussi de petits centres de diversification. Enfin on distingue quelques variants haplotypiques partagés par deux, trois ou quatre individus appartenant ou pas à la même localité. En règle générale, pour ce qui est de la relation entre haplotypes et localités

d'échantillonnage, on trouve à peu près la même proportion d'haplotypes partagés et uniques par localité.

La distance moyenne entre tous les individus séquencés est $d=0,0043 \pm 0,001$, obtenue avec le modèle TPM1uf+ Γ ($\alpha=0,437$). Cette distance est à peu près la même lorsqu'on estime la distance entre les individus de l'Ilot Coco et les autres ($d=0,004 \pm 0,001$).

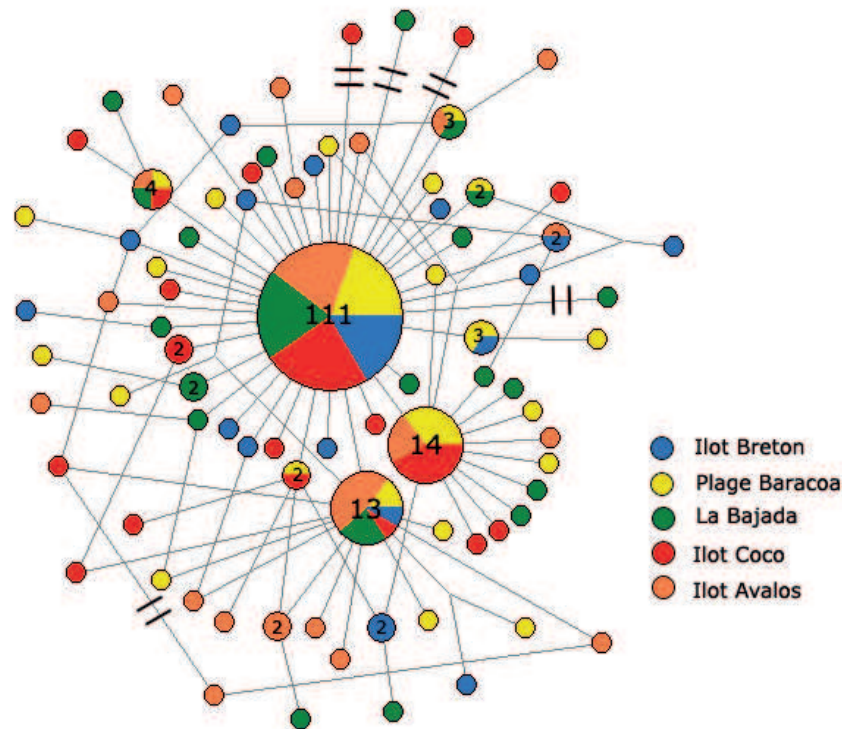


Figure 3.5. Réseau d'haplotypes obtenu à partir d'un fragment de la région non codante de l'ADNmt de *S. partitus*. Les connexions entre haplotypes indiquent un pas mutationnel à moins qu'on les signale avec des barres transversales. Dans ce cas, celles-ci correspondent au nombre de mutations. Les chiffres indiquent le nombre d'individus présentant l'haplotype, sauf pour les haplotypes présent chez un seul individu.

On a évalué la différenciation entre les localités prises deux à deux en utilisant la statistique Snn (Hudson, 2000). Cette analyse, comme pour les données microsatellites a trouvé des différences significatives entre l'Ilot Coco et les autres localités échantillonnées, sauf Plage Baracoa. Le résultat de la comparaison entre les ilots Breton et Avalos est aussi significatif (tableau 3.7).

L'analyse du polymorphisme a révélé une valeur élevée de diversité haplotypique et la plus petite valeur pour l'estimation de la diversité nucléotidique parmi les trois espèces analysées (tableau 5.8), ce qui correspondrait aussi à un événement d'expansion récente et une accumulation de mutations à partir d'une population

d'effectif efficace faible (Grant et Bowen, 1998; Avise, 2000). Ces résultats sont supportés par les valeurs négatives et significatives des statistiques D de Tajima et F_S de Fu (tableau 3.8).

Tableau 3.7. Valeurs de la statistique S_{nn} obtenues pour les localités d'échantillonnage prises deux à deux. * : Valeurs significatives, $p < 0.05$.

	Ilot Breton	Ilot Avalos	La Bajada	Plage Baracoa
Ilot Avalos	0.56*			
La Bajada	0.51	0.52		
Baracoa	0.53	0.51	0.51	
Ilot Coco	0.57*	0.55*	0.55*	0.50

III.2.2.2 Démographie

Le nombre observé de différences entre haplotypes pris deux à deux (mismatch distribution) a produit une distribution unimodale (Somme des carrés des écarts $SSD=0,00001$; $p=0,99$) (figure 3.6) ou la plupart des haplotypes sont séparés par une mutation, avec une valeur de $R_2=0,01$; $p=0,001$ (tableau 3.9). Cette statistique, comme F_S de Fu, est un bon outil pour détecter la croissance des populations (Ramos-Onsins et Rozas, 2002). Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'une population qui a connu une expansion démographique récente (Rogers et Harpending, 1992). Les résultats de l'estimation bayésienne des paramètres populationnels obtenus avec le logiciel Lamarc 2.1.6 pour la population d'ilot Coco et le reste des localités regroupées montre qu'actuellement elles sont en croissance : $g = 831,34$; $IC95\% = 504,34-999,99$ pour Ilot Coco et pour le reste $g = 945,27$; $IC95\% = 837,12 - 1000,00$ avec des valeurs de θ pour Ilot Coco $\theta = 0,15$ ($IC95\% = 0,03-0,31$) et pour le reste $\theta = 0,32$ ($IC95\% = 0,15-0,50$). Les taux de migration mesurés, vers et depuis les deux entités analysés, sont très élevés : $M_{\text{vers Ilot Coco}}=705,98$ ($IC95\%= 349,36-999,96$) et $M_{\text{vers le reste}}=273,14$ ($IC95\%= 70,99-488,66$).

Tableau 3.8. Indices de diversité moléculaire pour un fragment de la région non codante de l'ADNmt de l'espèce *S. partitus*.

	Ilot Coco	Total
Nombre de séquences	52	231
Nombre d'haplotypes	20	82
Transitions	16	53
Transversions	6	24
Indels	1	6
Sites polymorphiques	23	74
Diversité haplotypique (h) \pm e.t.	0.723 \pm 0.067	0.763 \pm 0.031
Diversité nucléotidique (π) \pm e.t.	0.004 \pm 0.003	0.004 \pm 0.003
K \pm e.t.	1.358 \pm 0.853	1.573 \pm 0.941
D de Tajima	-2.34 $p=0.0004$	-2.612 $p=0.00$
F_S de Fu	-19.57 $p=0.00$	-27.76 $p=0.00$

K : Moyenne des différences nucléotidiques entre les séquences prises deux à deux

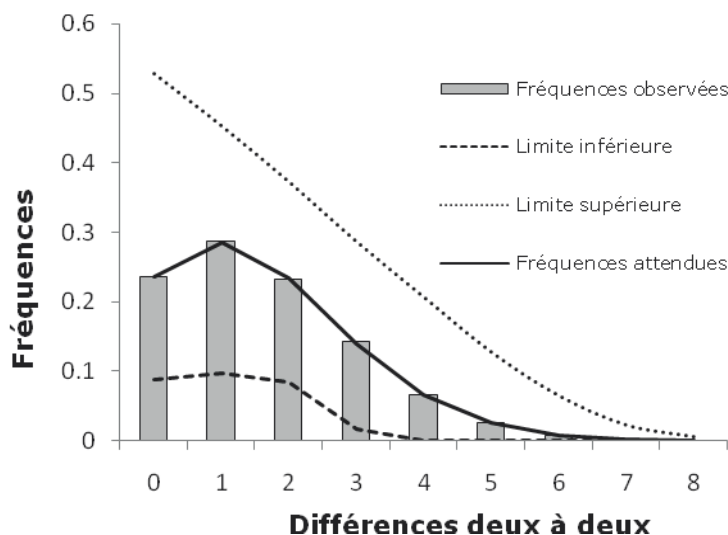


Figure 3.6. Distribution du nombre de différences entre haplotypes pris deux à deux (mismatch distribution) pour *S. partitus*.

Tableau 3.9. Paramètres démographiques obtenues pour *S. partitus* basés sur un fragment de la région non codante de l'ADNmt

τ	IC2.5%-IC97.5%	θ_0	IC2.5%-IC97.5%	SSD	R2
1,66	0,18-3,77	0,26	0,00-0,68	0,00001 P=0,99	0,010 P=0,001

τ : (tau) et intervalle de confiance de 95% ; θ_0 : thêta avant l'expansion ; SSD : somme des carrés des écarts ; R2 : statistique de Ramos-Onsins et Rozas (2002).

Haemulon flavolineatum



IV. HAEMULON FLAVOLINEATUM

IV. 1 Caractéristiques générales de l'espèce

L'espèce *Haemulon flavolineatum* (figure 4.1), appelée « gorette jaune », appartient à une des familles les plus abondantes de poissons marins dans l'ordre des Perciformes (Claro, 1994). Sa distribution comprend une grande partie de l'Atlantique occidental : la côte est des États-Unis, Les Bermudes, le nord du Golfe du Mexique, les Caraïbes, l'Amérique central jusqu'au Brésil (Courtenay et Sahlman, 1978) (figure 4.2).

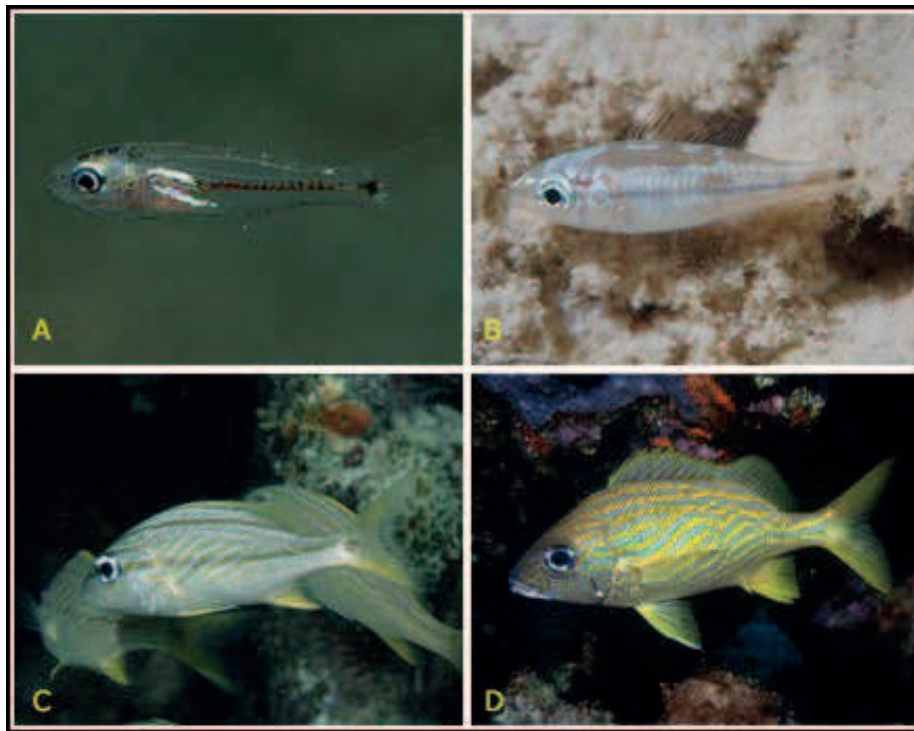


Figure 4.1. *Haemulon flavolineatum*. A : juvénile initial ; B : juvénile dans la nuit ; C : juvénile tardif ; D : adulte. Extrait de Humann (2007).

Durant la phase adulte, elles atteignent une taille maximale de 30cm (Guitart, 1977). Nos observations pour les individus échantillonnées montrent une valeur moyenne de 15,54 cm (minimum 10,80 cm et maximum 19,20 cm).

Le corps présente des bandes jaunes obliques, sur un fond gris argenté, qui passent par le centre des écailles. Au dessus de la ligne latérale, ces bandes se disposent de manière horizontale. Les nageoires sont jaunes. Pendant la phase

juvénile, on observe une tache noire de chaque côté de la nageoire caudale (Poey, 1868).

Ce sont des poissons suprabenthiques avec des habitudes nocturnes. On les trouve au niveau des récifs coralliens et des mangroves éloignées des estuaires (Burke, 1995). Lorsque la nuit tombe, les gorettes migrent vers les sites où elles se nourrissent d'une grande variété d'invertébrés benthiques qui vivent dans les herbiers marins et dans les plaines sablonneuses qui les entourent (Claro, 1994) .

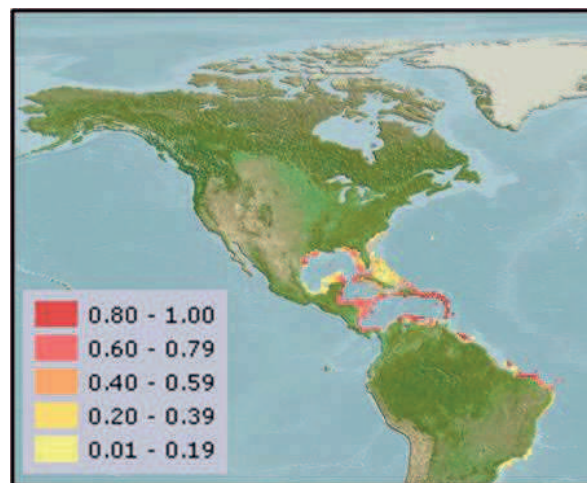


Figure 4.2. Distribution de *Haemulon flavolineatum*. L'échelle de couleurs indique la probabilité d'occurrence. Extrait de Fishbase (Froese et Pauly, 2011)

Pendant la journée, elles passent la plupart du temps sur le fond du récif et sont peu mobiles. Elles se déplacent en groupes qui peuvent être composés par peu d'individus ou en rassembler des milliers (Humann, 1994). A Cuba, nos observations directes nous suggèrent que, la plupart du temps, elles forment des groupes relativement petits et elles forment des rassemblements de milliers d'individus pendant la période de reproduction.

Les individus sont matures normalement quand ils atteignent la longueur totale d'environ 12 cm. La proportion d'individus matures atteint un maximum dans l'intervalle entre 17 et 19cm, et probablement la taille moyenne des individus matures est 15,5 cm (Gaut et Munro, 1983). Nos observations montrent que les individus avec des gonades bien développés possèdent des tailles supérieures à 13,1 cm.

Les gorettes fraient toute l'année avec des pics pendant le printemps et l'automne (Mc Farland *et coll.*, 1985; García-Cagides *et coll.*, 1994) et à une profondeur d'environ 20 à 30m (Lindeman *et coll.*, 2001). Le comportement social et l'usage du

territoire pendant cette période sont des aspects peu connus de la biologie de ces animaux car la ponte a lieu à la tombée de la nuit (Lindeman *et coll.*, 2001). Les œufs sont pélagiques (Mc Farland *et coll.*, 1985) et produisent des larves planctoniques. A la fin de cette période, les juvéniles sont recrutés sur les récifs (Williams *et coll.*, 2004). En ce basant sur l'analyse des anneaux de croissance des otolithes après le recrutement des larves, Lindeman *et coll.* (2001) ont estimé que la durée moyenne de la phase larvaire est de 15 jours, durée parmi les plus courtes mesurées pour des poissons des récifs coralliens. Ces auteurs montrent que les larves ne quittent pas la plate-forme et ne se trouvent pas dans les eaux superficielles, probablement formant des associations près du fond marin au moment de la phase de flexion. Toutes ces observations suggèrent que les larves peuvent être retenues dans le récif d'origine (Lindeman *et coll.*, 2001). Toutefois, Garcia-Cagides *et coll.* (1994) ont inclus la famille Haemulidae parmi celles qui réalisent pour frayer des migrations des eaux intérieures de la plate-forme vers les régions proches du tombant.

Le recrutement suit un cycle de 15 jours en accord avec les quarts lunaires, et c'est plus clairement évident pendant la période de mai à décembre. C'est une différence avec beaucoup d'autres espèces de poissons des récifs pour lesquelles le recrutement, bien que cyclique, se concentre essentiellement dans une période particulière de l'année (Williams et Sale, 1981).

IV. 2 Résultats

IV.2.1 ADN microsatellite

Le test d'homogénéité des fréquences entre les localités échantillonnées à différentes années n'a pas détecté des différences au cours du temps, sauf pour le *locus* HfAAC3 dans la localité « Ilot Avalos » (annexe 3). Ceci nous a permis de regrouper tous les données microsatellites pour chaque localité. Les chiffres qui correspondent aux individus échantillonnées sont décrits dans le tableau 4.1.

On a détecté la présence d'allèles nuls pour le *locus* HfAAC46 avec le logiciel Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et coll.*, 2004). Dans ce cas, on a estimé les fréquences corrigées des allèles et des génotypes en tenant compte de la présence des allèles nuls.

Parmi les comparaisons par paire des *locus* analysés, aucune ne montre de déséquilibre de liaison après la correction de Bonferroni avec une valeur de probabilité corrigée de $\alpha=0,0033$ (annexe 4).

L'écart aux fréquences de Hardy-Weinberg a été testé à partir du calcul de la statistique F_{IS} qui peut adopter des valeurs négatives ou positives, avec la valeur 0 indiquant un ajustement parfait. Ce test n'a identifié que le *locus* HfAAC41 comme présentant des fréquences statistiquement différentes de celles attendues (tableau 4.2).

Tableau 4.1. Localités et nombre d'échantillons pour les données microsatellites. Entre parenthèse l'année d'échantillonnage.

Localité	n	N
Ilot Breton	44 (2008)	-----
Ilot Avalos	27 (2007)	26 (2008)
La Bajada	21 (2007)	12 (2010)
Plage Baracoa	18 (2007)	32 (2009)
Ilot Coco	24 (2008)	-----
Total		204

Tableau 4.2. Valeur de F_{IS} et de la probabilité de l'écart aux fréquences de HW pour chaque *locus* étudié.

<i>Locus</i>	<i>Fis</i>	P
HfAAC3	-0,052	0,828
HfAAC10	0,076	0,317
HfAAC37	-0,010	0,601
HfAAC41	0,097	0,012
HfAAC43	0,088	0,450
HfAAC46	0,112	0,110

IV.2.1.1 Structure populationnelle

L'analyse de la structure génétique en utilisant le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et coll.*, 2000) nous suggère l'existence d'une population unique pour l'espèce *H. flavolineatum* autour de l'île de Cuba. On trouve des valeurs similaires de $\log Pr(X|K)$ pour les deux premières valeurs de K (figure 4.2A) parmi lesquels on a choisi la plus petite en accord avec Pritchard *et coll.* (2000). D'autre part, la méthode d'Evanno *et coll.* (2005) propose la valeur du mode de la distribution de ΔK sur $K=2$ (figure 4.2B). Toutefois lorsqu'on observe le coefficient d'appartenance de chaque individu à chacun des deux clusters, on remarque que la

valeur est autour de 0,5 (figure 4.3). Ceci nous donne à peu près la même probabilité d'avoir une origine dans l'un ou l'autre des clusters. On voit la difficulté de ce test d'identifier $K=1$ comme la valeur la plus vraisemblable de K , et cela nous permet de conclure que la valeur réelle de ce paramètre pour l'ensemble des données est 1 au lieu de 2. Ce résultat est confirmé par la matrice de valeurs de la statistique F_{ST} entre les localités d'échantillonnage pour lesquels on trouve des valeurs très faibles et non significatives (tableau 4.3).

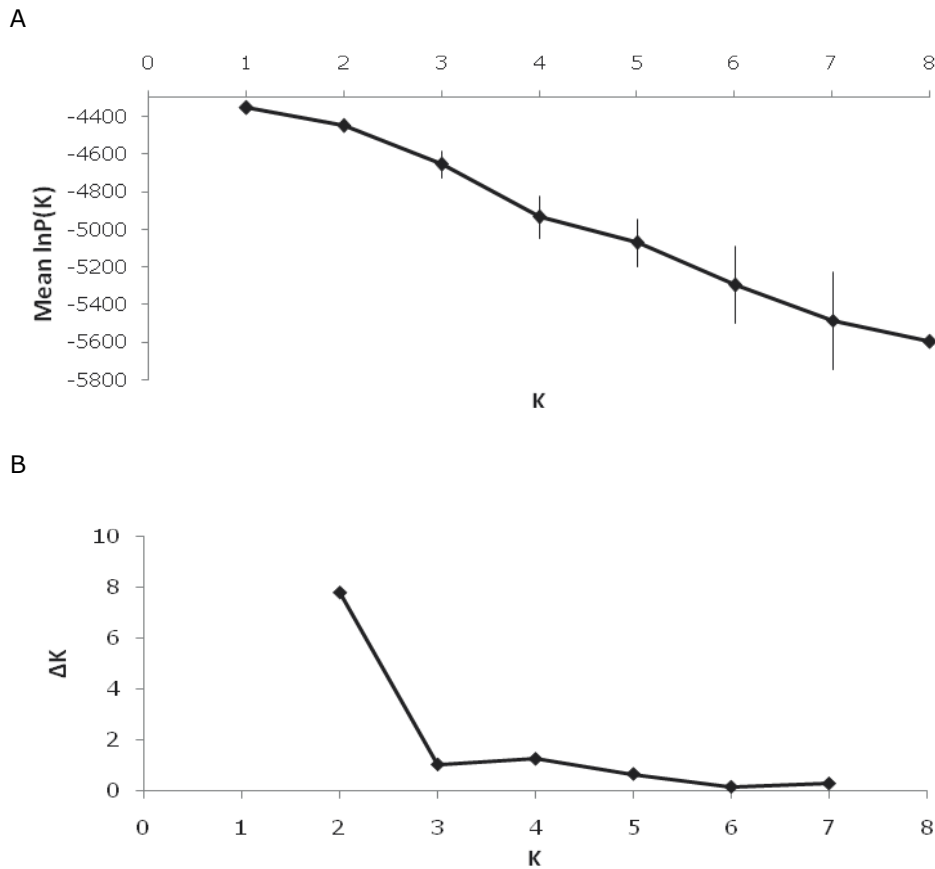


Figure 4.2. Détermination du nombre de populations (K) de *H. flavolineatum* à partir des données microsatellites. A : Moyennes et écart-types pour 20 runs des probabilités postérieures pour les valeurs de K ; B : Méthode d'Evanno *et coll.* (2005).

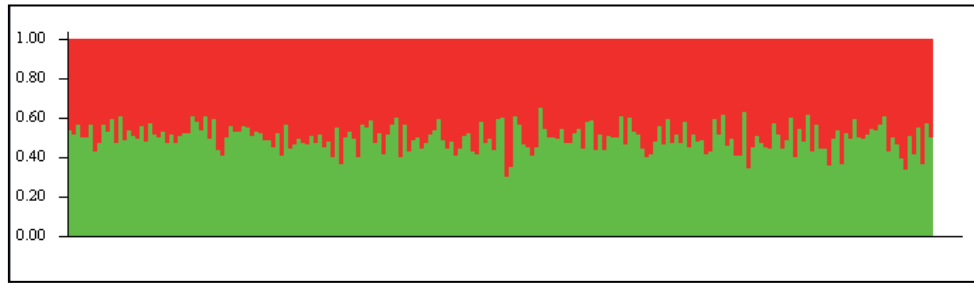


Figure 4.3. Probabilités d'appartenance de chaque individu à chacun des clusters définis pour le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et coll.*, 2000) pour K = 2.

Tableau 4.3. F_{ST} pour les localités d'échantillonnage prises deux à deux. Toutes les valeurs sont non significativement différentes de 0 après correction de Bonferroni ($p < 0,05$).

	Ilot Breton	Ilot Avalos	La Bajada	Plage Baracoa
Ilot Avalos	0,0105			
La Bajada	0,0012	0,0006		
Plage Baracoa	0,0101	-0,0002	0,0002	
Ilot Coco	0,0041	0,0014	-0,0029	-0,0008

En appliquant le test de Mantel nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les matrices de différenciation génétique, F_{ST} , et les distances géographiques, calculées sur la seule base du patron général de courants marins ($r=0,065$, $p=0,820$) ou en prenant en compte la distance minimum entre l'îlot Breton et l'îlot Coco ($r=0,057$, $p=0,797$).

IV.2.1.2 Diversité génétique

La variabilité génétique a été estimée à partir des 6 *locus* microsatellites : HfAAC3, HfAAC10, HfAAC37, HfAAC41, HfAAC43 et HfAAC46.

La population dans son ensemble présente un nombre modéré d'allèles par locus avec des valeurs qui oscillent entre 12 et 22 (locus AAC3 et AAC46 respectivement) (tableau 4.4). D'autre part, les valeurs d'hétérozygotie sont élevées, sauf pour le locus HfAAC3 qui est fortement en dessous de la moyenne car il y a un allèle très fréquent par rapport à tous les autres. Le rang allélique est similaire pour l'ensemble des *locus* sauf pour le locus AAC46 pour lequel la différence entre le nombre maximum et minimum de répétitions est beaucoup plus élevée.

Tableau 4.4. Statistiques descriptives des microsatellites étudiés chez *H.*

<i>flavolineatum</i>					
Locus	N	Na	Ho	He	Rang allélique
HfAAC3	188	12	0.457	0.435	48
HfAAC10	180	20	0.794	0.860	54
HfAAC37	193	15	0.819	0.810	48
HfAAC41	182	14	0.703	0.778	60
HfAAC43	165	16	0.800	0.877	45
HfAAC46	176	22	0.813	0.914	90
Moyenne	180,7	16,5	0,731	0,779	57,5
E.T.	3,98	3,78	0,140	0,072	16,80

N : taille de l'échantillon, Na : nombre d'allèles, Ho : Hétérozygotie observée, He: Hétérozygotie attendue.

IV.2.1.3 Analyse démographique

L'écart de la valeur observée de diversité génique dans la population par rapport à sa distribution théorique a été testé en utilisant le test de Wilcoxon (Wilcoxon sign rank test) disponible dans le logiciel Bottleneck (Cornuet et Luikart, 1996). On n'a trouvé aucun argument en faveur d'un goulot d'étranglement quel que soit le modèle de mutation utilisé (tableau 4.5). Toutefois, on observe un déficit d'hétérozygoties pour les modèles TPM et SMM.

Tableau 4.5. Test de Wilcoxon pour la détection de goulots d'étranglement.

	p-déficit d'hétérozygotes	p-excès d'hétérozygotes
IAM	0,92188	0,21875
TPM	0,03906	0,97656
SMM	0,00781	1,00000

L'analyse démographique en utilisant le logiciel Lamarc 2.1.6 (Kuhner, 2006) a montré que pour la taille on est en présence d'une population stable avec une valeur de $\theta = 9,052$ (IC95% 9,040-9,064) et presque nulle pour la croissance, $g = -0,103$ (IC95% -0,095 à -0,111).

IV.2.2 ADN mitochondrial

IV.2.2.1 Diversité génétique et différenciation des populations

On a séquencé 367 pb du premier fragment hypervariable de la région non codante de l'ADN mitochondrial et on a obtenu au total les séquences de 207 individus qui représentent toutes les localités échantillonnées pour l'analyse spatiale et au cours du temps (tableau 4.6). En analysant tous les individus confondus nous avons trouvé 80 sites polymorphes qui définissent 91 haplotypes différents (tableau 4.7). Les valeurs relatives de composition nucléotidique montrent une prédominance des A et T (61,64%) par rapport à C et G (38,36%).

Les résultats du test d'homogénéité des fréquences montrent que seule la localité de « Plage Baracoa » montre une différence significative au cours du temps, $\chi^2=47,40$, $p=0,04$ (annexe 5) est pourquoi, comme pour les données microsatellites, on a mélangé les haplotypes des mêmes localités obtenues pour différentes années.

Tableau 4.6. Localités et nombre d'échantillons pour les séquences d'ADNmt. Entre parenthèse l'année d'échantillonnage.

Localité	n	n
Ilot Breton	34 (2008)	----
Ilot Avalos	26 (2007)	25 (2008)
La Bajada	25 (2007)	24 (2010)
Plage Baracoa	27 (2007)	22 (2009)
Ilot Coco	24 (2008)	----
Total		207

Pour montrer de façon graphique les relations entre les haplotypes analysés, on a construit un réseau en utilisant la méthode de « median joining ». Cette représentation a dévoilé la présence de nombreux variants haplotypiques uniques, de même que des haplotypes communs et présents dans toutes, ou presque toutes, les localités échantillonnées (figure 4.4). La distribution trouvée ne montre pas un regroupement évident des individus par rapport à leur localité d'échantillonnage.

La distance moyenne entre les individus et calculée selon la méthode TPM2uf+I+Γ ($\alpha = 0.403$) est $d = 0,012 \pm 0,003$.

Le calcul de la statistique S_{nn} (Hudson, 2000) pour les localités prises deux à deux, n'a pas détecté de différenciation génétique entre les localités (tableau 4.7), la valeur globale de $S_{nn} = 0,18154$, $p = 0,9180$. Considérant l'absence de différenciation parmi les localités échantillonnées, on a décidé de les traiter comme une seule population.

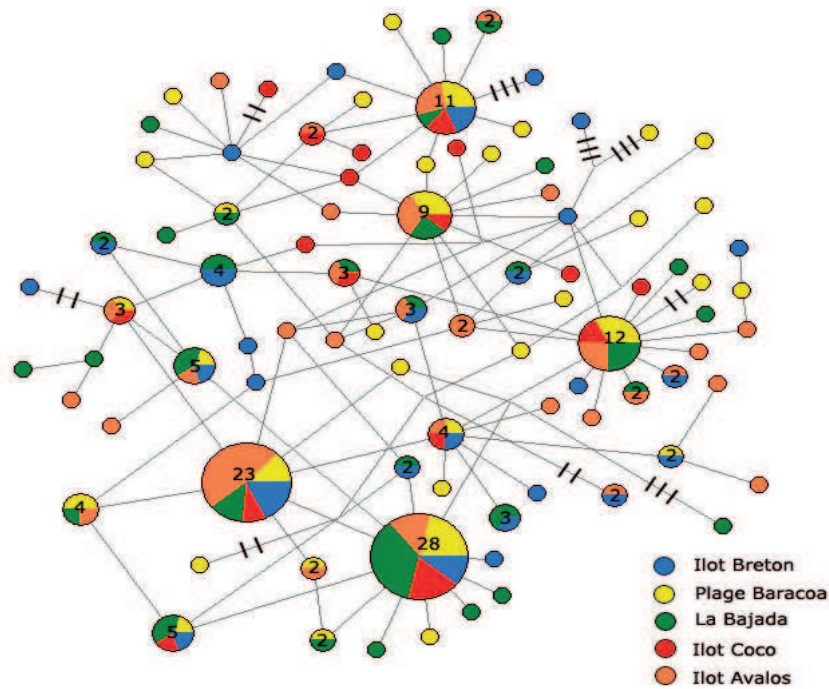


Figure 4.4. Réseau d'haplotypes obtenu à partir d'un fragment de la région non codante de l'ADNmt de *H. flavolineatum*. Les connexions entre haplotypes indiquent un pas mutationnel à moins qu'on les signale avec des barres transversales. Dans ce cas, celles-ci correspondent au nombre de mutations. Les chiffres indiquent le nombre d'individus portant l'haplotype, sauf pour les haplotypes uniques.

Tableau 4.7. Indices de diversité moléculaire pour un fragment de la RNC de l'ADNmt de l'espèce *H. flavolineatum*

Nombre de séquences	207
Nombre d'haplotypes	91
Transitions	52
Transversions	18
Indels	17
Sites polymorphes	80
Diversité haplotypique (h) \pm e.t.	0,960 \pm 0,00005
Diversité nucléotidique (π) \pm e.t.	0,01123 \pm 0,00041
K \pm e.t.	7,926 \pm 3,70
D de Tajima	-1,579 (p=0,024)
F_S de Fu	-24,464 (p=0,0003)

K : Moyenne des différences nucléotidiques entre les séquences prises deux à deux.

Tableau 4.8. Valeurs de la statistique S_{nn} obtenues pour les localités d'échantillonnage prises deux à deux. Toutes les valeurs sont non significatives, $p > 0,05$.

	Ilot Breton	Ilot Avalos	La Bajada	Plage Baracoa
Ilot Avalos	0,57			
La Bajada	0,52	0,54		
Baracoa	0,48	0,43	0,47	
Ilot Coco	0,50	0,55	0,51	0,46

L'analyse du polymorphisme a révélé une valeur élevée de diversité haplotypique et une très faible diversité nucléotidique (tableau 4.8), ce qui peut correspondre à une croissance rapide de la population et une accumulation de mutations à partir une population d'effectif efficace faible (Grant et Bowen, 1998; Avise, 2000).

IV.2.2.2 Démographie

Les valeurs des statistiques D de Tajima et F_S de Fu, sont négatives et significatives pour l'ensemble des données (tableau 4.8) ce qui suggère un événement d'expansion de la population.

La distribution du nombre observé de différences entre haplotypes pris deux à deux (mismatch distribution) a produit une distribution unimodale (somme des carrés des écarts SSD=0,0007, $p=0,9$) (figure 4.5) avec une valeur de $R^2=0,033$, $p=0.027$ (tableau 4.9). Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'une population qui a connu une expansion démographique récente (Rogers et Harpending, 1992). Dans cette même perspective, les paramètres populationnels estimés avec le logiciel Lamarc 2.1.6 (Kuhner, 2006) suggèrent aussi que la population est en croissance compte tenu de la valeur fortement positive du taux de croissance ($g=840,65$, IC95%=631,94-991,14) avec une valeur de $\theta=1.31$ (IC95%=0.74-1.90).

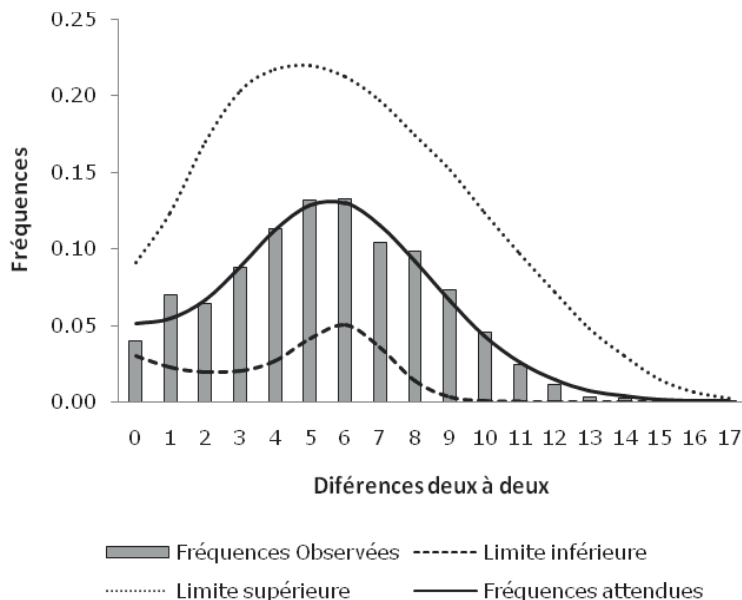


Figure 4.5. Distribution du nombre de différences entre haplotypes pris deux à deux (mismatch distribution) pour *H. flavolineatum*.

Tableau 4.9. Paramètres démographiques obtenues pour *H. flavolineatum* sur la base de l'analyse d'un fragment de la région non codante de l'ADNmt.

τ	IC2,5%-IC97,5%	θ_0	IC2.5%-IC97,5%	SSD	R2
6.0	2,268-6,809	0,490	0,0018-0,1354	0,0007 $p= 0,9000$	0,033 $p=0,027$

τ : (tau) et intervalle de confiance de 95% ; θ_0 : thêta avant l'expansion ; SSD : somme des carrés des écarts ; R2 : statistique de Ramos-Onsins et Rozas (2002).

Acanthurus tractus



V. ACANTHURUS TRACTUS

V. 1 Caractéristiques générales de l'espèce

L'espèce *Acanthurus tractus*, (figure 5.1), appelée « chirurgien marron », est une des espèces les plus communes de poissons herbivores des récifs coralliens dans toute son aire de répartition (Lewis et Wainwright, 1985; Edwards, 1990; Chapman et Kramer, 1999; Ferreira *et coll.*, 2004).

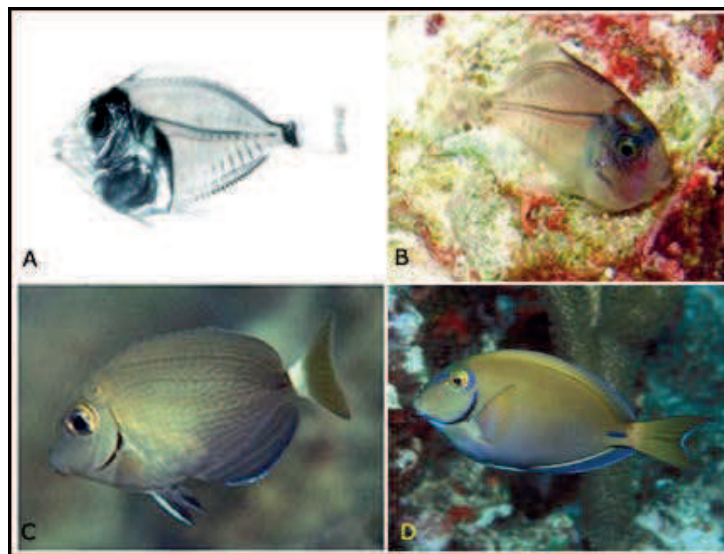


Figure 5.1 *Acanthurus tractus*. A : larve ; B : post-larve ; C : juvénile ; D : adulte. Extrait de Humann (2007).

Plus précisément, on trouve cette espèce dans l'Atlantique Nord tropical, du Massachusetts et Bermudes jusqu'à Trinidad et Tobago, dans le Gulf de Mexique et les îles des Caraïbes (Bernal et Rocha, 2011) (figure 5.2).

Récemment, sur la base de différences de coloration du bord des nageoires caudale et dorsale et sur celle de la distance génétique, Bernal et Rocha (2011) ont élevé au statut d'espèces différentes les lignées Caraïbienne et Atlantique d'*Acanthurus bahianus*, avec une distribution restreinte au nord et au sud de l'embouchure des rivières Orénoque-Amazone respectivement. Ces auteurs ont repris le nom *Acanthurus tractus* proposé par Poey (1860) pour la lignée des Caraïbes. Les résultats présentés ci-dessous nous montrent la présence de la lignée sud dans les Caraïbes et ils mettent donc en doute l'existence de deux entités spécifiques étant donné qu'on ne sait pas s'il existe un isolement reproducteur entre elles. Comme tous les aspects du cycle de vie chez *A. tractus* correspondent dans la littérature au

nom *A. bahianus* dans ce mémoire on parlera d'*Acanthurus bahianus/A. tractus* pour évoquer cette espèce.

A. bahianus/A. tractus est observé entre 2 et 40 mètres de profondeur (Desoutter, 1990), mais il est plus fréquent entre 2 et 25 mètres (Baensch et Debelius, 1997). Après la phase larvaire, on le trouve associé aux récifs peu profonds, maximum 25m, à la différence de *A. chirurgus* et *A. coeruleus*, les deux autres espèces de poissons chirurgiens les plus communs dans l'atlantique et qui ont été observés dans des zones beaucoup plus profondes (Nagelkerken *et coll.*, 2000).

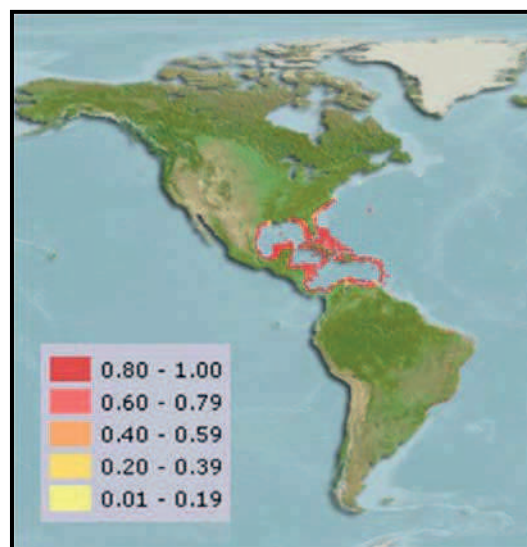


Figure 5.2. Distribution d'*Acanthurus tractus*. L'échelle de couleurs indique la probabilité d'occurrence. Modifié d'après Fishbase (Froese et Pauly, 2011)

Les deux espèces présentent une coloration gris bleuté ou marron homogène, à la différence de son congénère *A. chirurgus* qui montre de traits verticaux de chaque côté du corps. Les nageoires caudale, dorsale et anale sont bordées de blanc ou de bleue pâle chez *A. tractus* et une bande claire peut apparaître à la base du pédoncule caudal (Humann, 1994). La taille moyenne estimée pour cette espèce sur la base de notre échantillonnage (468 individus) est de 14,71 cm, minimum 8,54 cm et maximum 20,0 cm.

Les chirurgiens sont des poissons qui vivent dans de grands territoires dont ils utilisent les ressources alimentaires de façon extensive. Cette manière caractéristique d'occuper leur territoire implique un mode de vie nomade (Valdes-Muñoz et Mochek, 1994). Ils préfèrent les zones benthique et suprabenthique, ils sont très mobiles et forment fréquemment des groupes. Leur alimentation est essentiellement composée d'algues épiphytes qui croissent sur les coraux ou dans

les herbiers proches. D'après Robertson (1985) on peut les trouver seuls, car ils sont territoriaux dans une certaine mesure, ou en bandes qui se déplacent pour se nourrir. Ainsi, même si quelques adultes marqués ont été recapturés jusqu'à un kilomètre du site original de capture (Randall, 1962), Bardach (1958) a rapporté que des bancs surveillés pendant 30 minutes nagent d'habitude dans une zone de moins de 500m².

Reeson (1983) a suggéré que cette espèce se reproduit pendant toute l'année avec des pics de l'activité de fraie pendant janvier-février et aout-septembre.

Pour leur reproduction, ils fraient en couples ou en grands groupes et produisent des œufs pélagiques (Colin et Clavijo, 1988). Après 24 heures, l'œuf éclot et produit une larve connu sous le nom d'acronurus qui est visiblement adapté à l'existence pélagique (Randall, 1961a; Leis et Rennis, 1983). Cette larve a été capturée à grande distance de la côte (Sale, 1970). Sponaugle et Cowen (1996a) ont rapporté pour cette phase de larve pélagique une durée de 69 jours. On considère que les espèces qui composent la famille Acanthuridae appliquent une stratégie reproductive qui permet aux œufs, puis aux larves, d'être transporter sur de longue distance dans l'océan (Johannes, 1978; García-Cagides *et coll.*, 1994). Ainsi, Randall (1961b) a observé que trois espèces d'Acanthuridés choisissent pour frayer des localités avec une forte influence des courants marins dirigés vers l'océan.

Le recrutement a lieu pendant la nuit et en relation avec le cycle lunaire, le maximum étant autour de la nouvelle lune (Robertson, 1988; 1992; Sponaugle et Cowen, 1996a). Les juvéniles pélagiques de *A. bahianus*/*A. tractus* s'installent dans des habitats peu profonds et riches en refuges (Robertson, 1988; 1992). Les zones où se déroule la croissance se limitent presque entièrement aux récifs peu profonds, rarement au niveau des mangroves et des herbiers (Nagelkerken *et coll.*, 2000). Ils atteignent la maturité sexuelle dans les deux années qui suivent le recrutement et les individus peuvent vivre jusqu'aux dix ans (Robertson, 1988).

Reeson (1983) a montré que la taille des individus arrivant à maturité est autour de 11 cm, mais que la plupart des poissons sont matures pour une taille de 15-16cm de longueur totale.

V. 2 Résultats

V.2.1 Région non codante

V.2.1.1 Diversité génétique et différenciation des populations

On a analysé un fragment de 274 pb de la région non codante de l'ADN mitochondrial d'individus de l'espèce *A. tractus* échantillonnés autour de Cuba (tableau 5.1). On a séquencé ce fragment pour 73 individus qui correspondent à un même nombre d'haplotypes avec 159 sites polymorphes. Les valeurs relatives de composition nucléotidique montrent une prédominance des A et T (67,29%) par rapport à C et G (32,71%). Les transitions sont plus nombreuses que les transversions et le ratio transition/transversion a été estimé égal à 4,3:1.

Tableau 5.1. Localités et nombre d'échantillons séquencés pour la région non codante et le gène cytb de l'ADNmt des populations d'*Acanthurus tractus* autour de Cuba. Le nombre d'individus séquencés pour les deux gènes est indiqué entre crochets. Entre parenthèse est indiqué les échantillons faits au cours d'une deuxième année d'échantillonnage.

	Ilot Avalos	Plage Baracoa	Ilot Breton	Ilot Coco	La Bajada	Total
RNC	14[10]	15[12]	13[12]	14[13]	17[13]	73[60]
Cytb	22(20)	23	25	33	26	149

Le résultat de l'analyse d'assignation utilisant l'approche bayésienne implémentée dans le logiciel BAPS 5.3 est présenté figure 5.3. La méthode a regroupé tous les individus dans deux clusters avec une représentation différente des haplotypes dans chacun d'eux. Néanmoins, les échantillons appartenant aux différentes localités sont distribués dans les deux clusters ($\chi^2=9,49$ $p=0,388$) et par conséquent aucune partition géographique n'a été observé.

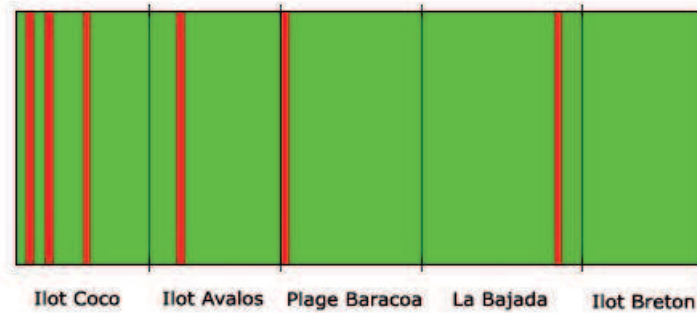


Figure 5.3. BAPS pour un fragment de la RNC d'*A. tractus*. Les individus ont été assignés à deux clusters représentés par des couleurs différentes.

La moyenne des différences entre les haplotypes est $k=24,41$ substitutions (tableau 5.2). Le réseau d'haplotypes, construit avec la méthode de « median joining » montre les relations entre les haplotypes de la région non codante. On a mis en évidence l'existence de deux lignées séparées par plus de 20 mutations (figure 5.4) qui correspondent aux deux clusters définis par la méthode bayésienne (BAPS).

La divergence moyenne des séquences entre les deux lignées est $d=0,199\pm 0,037$, estimée avec la modèle TrN + Γ ($\alpha=0,758$). La lignée (I) contient le plus grand nombre d'échantillons et montre une distance moyenne entre individus égale à $d=0,057 \pm 0,009$. La lignée (II), composé par six haplotypes, présente une distance moyenne entre individus relativement plus élevé, $d=0,073\pm 0,014$.

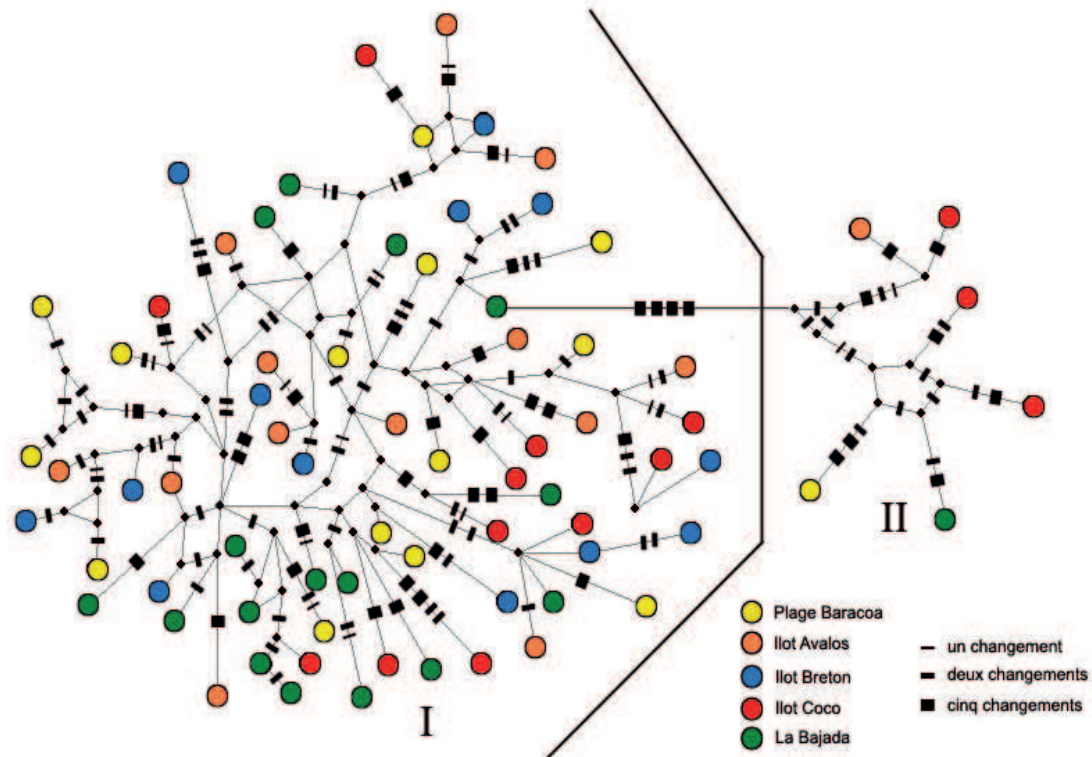


Figure 5.4. Réseau d'haplotypes obtenu à partir d'un fragment de la région non codante de l'ADNmt d'*A. tractus*. Les connexions entre haplotypes indiquent un pas mutationnel à moins qu'on les signale avec des barres transversales. Dans ce cas, celles-ci correspondent au nombre de mutations décrit dans la légende. Les nombres romains correspondent aux lignées I et II. Chaque haplotype est présent chez un seul individu.

Compte tenu de la grande différenciation existant entre les deux lignées observées chez l'espèce *A. tractus*, et l'absence de différenciation entre les localités d'échantillonnage, les calculs des indices de diversité génétique (tableau 5.2) et les analyses démographiques ont été faites pour la lignée I d'une part et pour l'ensemble des données d'autre part.

Les estimations de diversité haplotypique et diversité nucléotidique sont très élevés pour la lignée I et pour l'espèce en son entier tableau 5.2.

V.2.1.2 Démographie

Les tests de neutralité, soit par la statistique D de Tajima ou F_S de Fu, donnent des valeurs négatives, mais elles ne sont pas toutes significatives au seuil 5% (tableau 5.2). Lorsqu'on enlève les haplotypes correspondant à la lignée II, les deux statistiques sont significatives. Les deux valeurs négatives et la valeur absolue de F_S particulièrement élevé suggèrent un événement d'expansion démographique de la population.

Tableau 5.2. Indices de diversité génétique pour un fragment de la RNC de l'ADNmt de l'espèce *A. tractus*.

	Lignée I	Total
Nombre de séquences	67	73
Nombre d'haplotypes	67	73
Transitions	127	146
Transversions	28	34
Indels	9	9
Nombre de sites polymorphiques	144	159
Diversité haplotypique (h) \pm e.t.	1,00 \pm 0,0026	1,00 \pm 0,0023
Diversité nucléotidique (n) \pm e.t.	0,067 \pm 0,034	0,089 \pm 0,044
K \pm e.t.	18,49 \pm 8,30	24,41 \pm 10,84
D de Tajima	-1,62 (p=0,024)	-1,37 (p=0,056)
F_S de Fu	-24,20 (p=0,0002)	-24,09 (p=0,0001)

K : Moyenne des différences nucléotidiques entre les séquences prises deux à deux.

L'analyse démographique par la méthode de « mismatch distribution », a montré que la distribution du nombre observé de différences entre haplotypes pris deux à deux pour l'espèce en son entier est bimodale. Les valeurs observées ne s'ajustent pas à celles attendues sous le modèle d'expansion soudaine : somme des carrés des écarts = 0.029, $p=0.0006$ (figure 5.5A). Le deuxième pic correspond aux différences entre les deux lignées. Lorsqu'on analyse les haplotypes appartenant à la première lignée, on trouve que les données sont en accord avec l'hypothèse d'un événement d'expansion de la population (figure 5.5B ; tableau 5.3). Les résultats de l'estimation bayésienne des paramètres démographiques de la population réalisée avec le logiciel Lamarc 2.1.6 (Kuhner, 2006) montrent une valeur positive du taux de croissance ($g=97,84$; IC95%=69,58-129,66) indiquant qu'actuellement la population est en croissance. La valeur estimée de $\theta = 4.05$ (IC95% = 2,30-7,88).

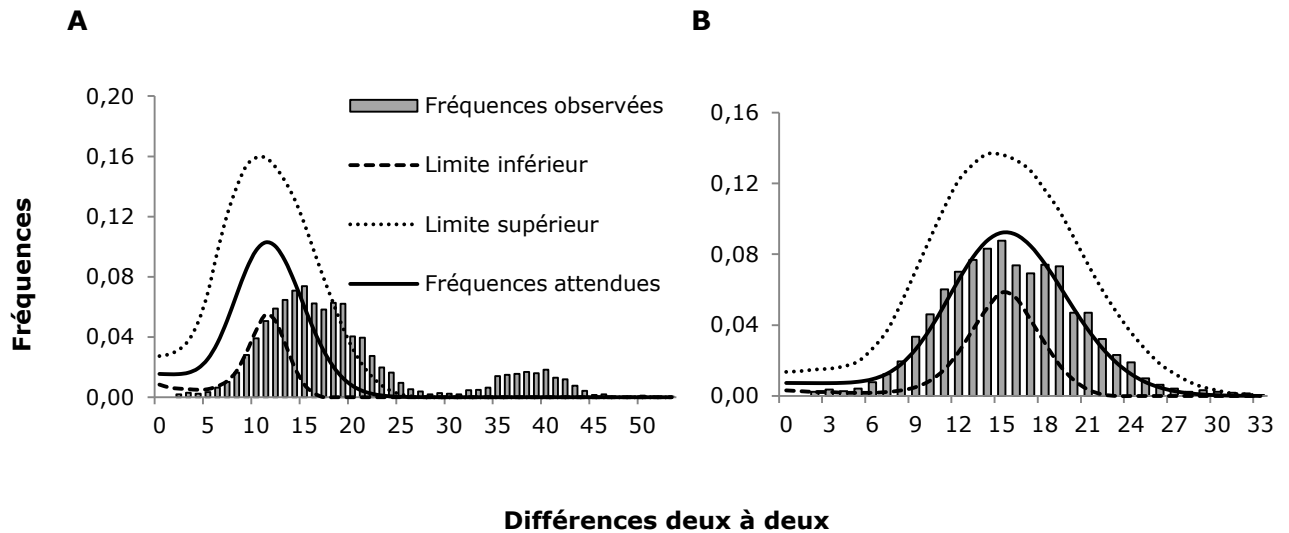


Figure 5.5. Distribution du nombre de différences entre haplotypes pris deux à deux (mismatch distribution) pour un fragment de la RNC d'*A.tractus*. **A** : Ensemble des données. **B** : Lignée I

Tableau 5.3. Paramètres démographiques obtenues pour *A. tractus* (lignée I) basés sur un fragment de la région non codante de l'ADNmt

τ	IC2,5%-IC97,5%	θ_0	IC2,5%-IC97,5%	SSD	R2
15,91	11,48-18,28	0,00	0,00-3,38	0,001	0,045
				p=0,55	p=0,006

τ : (tau) et intervalle de confiance de 95% ; θ_0 : thêta avant l'expansion ; SSD : somme des carrés des écarts ; R2 : statistique de Ramos-Onsins et Rozas (2002).

V.2.2 Cytochrome b

V.2.2.1 Diversité génétique et différenciation des populations

L'analyse d'un fragment du gène mitochondrial cytochrome b, a permis de définir 61 haplotypes pour les 149 individus séquencés (tableau 5.1). Ce fragment présente 74 sites polymorphes, tous situés en troisième position des codons. Les valeurs relatives de composition nucléotidique montrent une prédominance modérée des A et T (54,45%).

Le test d'homogénéité de fréquences n'a pas mis en évidence des différences significatives entre les échantillonnages (années 2006 et 2008) effectués pour la localité d'Ilot Avalos ($\chi^2_{0.05}=32,67$; p=0,46). Les individus de cette localité ont donc été regroupés pour les analyses.

L'approche bayésienne implémentée dans le logiciel BAPS 5.3 (Corander et Tang, 2007; Corander *et coll.*, 2008) a mis en évidence l'existence de trois clusters pour l'ensemble des données (figure 5.6). Les clusters 1 et 2 sont les plus proches : la différence du log de la vraisemblance marginale est la plus proche de zéro pour ces deux groupes (annexe 6). De la même façon que pour la région non codante aucune partition géographique n'a été trouvée en rapport avec ses clusters ($\chi^2=2,12$; $p=0,9$).

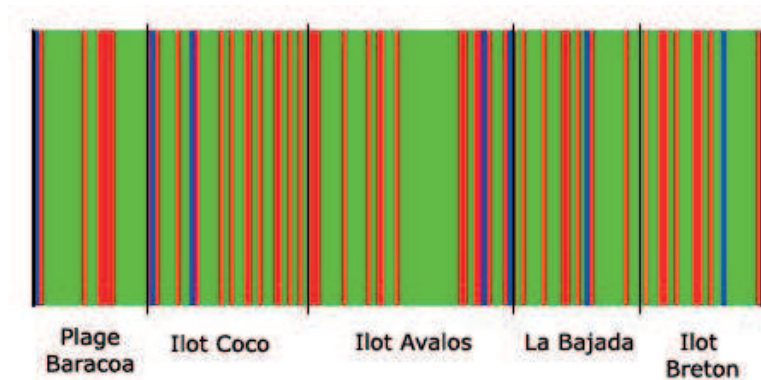


Figure 5.6 Résultats de l'analyse BAPS pour le fragment du gène *cytb* d'*A. tractus*. Les individus ont été assignés à trois clusters représentés par des couleurs différentes.

Le réseau d'haplotypes construit avec la méthode de « median joining » est présenté dans la figure 5.7. La valeur moyenne des différences entre tous les individus est égale à $k = 4,00 \pm 2,01$. Les relations généalogiques révèlent l'existence de deux lignées divergentes. La première (I) est composée par les deux haplotypes les plus fréquents (qui correspondent aux haplotypes ABA1 et ABA2 décrits par Rocha *et coll.* (2002) pour les Caraïbes et plus récemment assignés à *Acanthurus tractus* et d'un ensemble d'haplotypes rares qui dérivent de ces haplotypes majeurs. Ils correspondent aux clusters vert et rouge obtenus par le logiciel BAPS (figure 5.6). Le nombre moyen de différences nucléotidiques dans cette lignée est égale à $k = 2,93 \pm 0,034$ (tableau 5.4). La deuxième lignée (II) est connectée à la première par neuf mutations (huit transitions et une transversion). Elle n'est composée que par sept individus qui représentent toutes les localités d'échantillonnage et cinq d'entre eux partagent le même haplotype. Le nombre moyen de différences nucléotidiques dans cette lignée est égale à $k = 1,143 \pm 0,182$. Dans ce groupe d'individus on trouve aussi les haplotypes ABA3 et ABA4 décrits par Rocha *et coll.* (2002) qui représentent l'espèce *A. bahianus* (sensu Bernal et Rocha (2011)) laquelle d'après ces auteurs est restreinte à l'Atlantique

Sud. Ces haplotypes sont connectés aux haplotypes cubains par une à quatre transitions. La distance génétique moyenne estimée entre les individus des deux lignée est égale a $d = 0,020 \pm 0,006$. Nous l'avons obtenue en utilisant le modèle TrN + Γ ($\alpha=0,259$). D'autre part les valeurs de diversité haplotypique et nucléotidique sont relativement élevées (tableau 5.4).

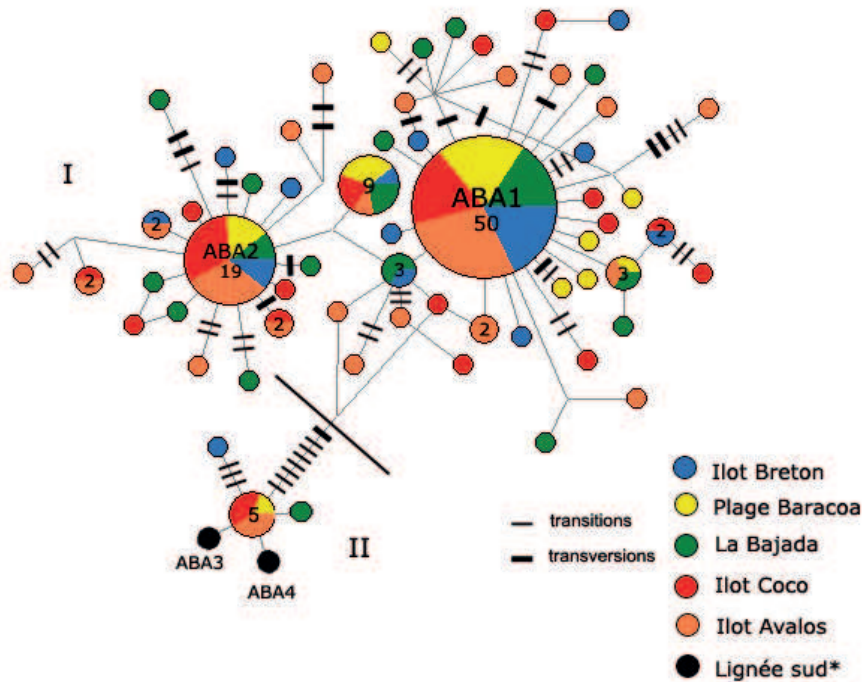


Figure 5.7. Réseau d'haplotypes obtenu à partir d'un fragment du gène *cytb* de l'ADNmt d'*A. tractus*. Les connexions entre haplotypes indiquent un pas mutationnel à moins qu'on les signale avec des barres transversales. Dans ce cas, celles-ci correspondent à chacun des types de mutations décrits dans la légende. Les chiffres indiquent le nombre d'individus, sauf pour les haplotypes uniques. Les nombres romains correspondent aux lignées I et II ; * : lignée sud décrite par Rocha *et coll.* (2002).

Tableau 5.4. Indices de diversité génétique pour un fragment du gène *cytb* de l'ADNmt de l'espèce *A. tractus*.

	Lignée I	Total
Nombre de séquences	142	149
Nombre d'haplotypes	58	61
Transitions	57	64
Transversions	12	13
Indel	0	0
Sites polymorphiques	66	74
Diversité haplotypique (h) ± e.t.	0,856±0,026	0,868±0,024
Diversité nucléotidique (π) ± e.t.	0,005±0,003	0,007±0,004
K ± e.t.	3,04±1,593	4,002±2,012
D de Tajima	-2,357 ($p=0,000$)	-2,237 ($p=0,0003$)
F_S de Fu	-26,431 ($p=0,000$)	-25,860 ($p=0,000$)

K : Moyenne des différences nucléotidiques entre les séquences prises deux à deux.

Dans cette même perspective, le calcul de la statistique S_{nn} entre les localités prises deux à deux (tableau 5.5) est cohérent car il indique une homogénéité génétique en prenant seulement les individus appartenant à la lignée I. Lorsqu'on a fait ce calcul en incluant toutes les individus les résultats ont été les mêmes (annexe 7).

Tableau 5.5. Valeurs de la statistique S_{nn} obtenues pour les localités d'échantillonnage prises deux à deux. Toutes les valeurs sont non significatives, $p>0,05$.

	Ilot Breton	Ilot Avalos	La Bajada	Plage Baracoa
Ilot Avalos	0,46			
La Bajada	0,46	0,51		
Baracoa	0,46	0,52	0,46	
Ilot Coco	0,43	0,46	0,49	0,50

V.2.2.2 Démographie

Comme attendu, l'information démographique obtenue par les tests de neutralité (D de Tajima et F_S de Fu) confirme celle obtenue pour la région non codante (tableau 5.4). La distribution du nombre observé de différences entre paires d'haplotypes « mismatch distribution » pour l'ensemble des données (SSD=0,0057, $p=0,574$) et pour la lignée I s'ajuste aux fréquences attendues sous le modèle d'expansion soudaine, comme observée pour la région non codante (figure 5.8, tableau 5.6). Les paramètres populationnels obtenus avec le logiciel Lamarc 2.1.6 (Kuhner, 2006) montrent la même tendance que les résultats pour la région non codante : $g=976,55$; IC95%=595,71-998,65 et $\theta=0,16$ (IC95%=0.10-0.23).

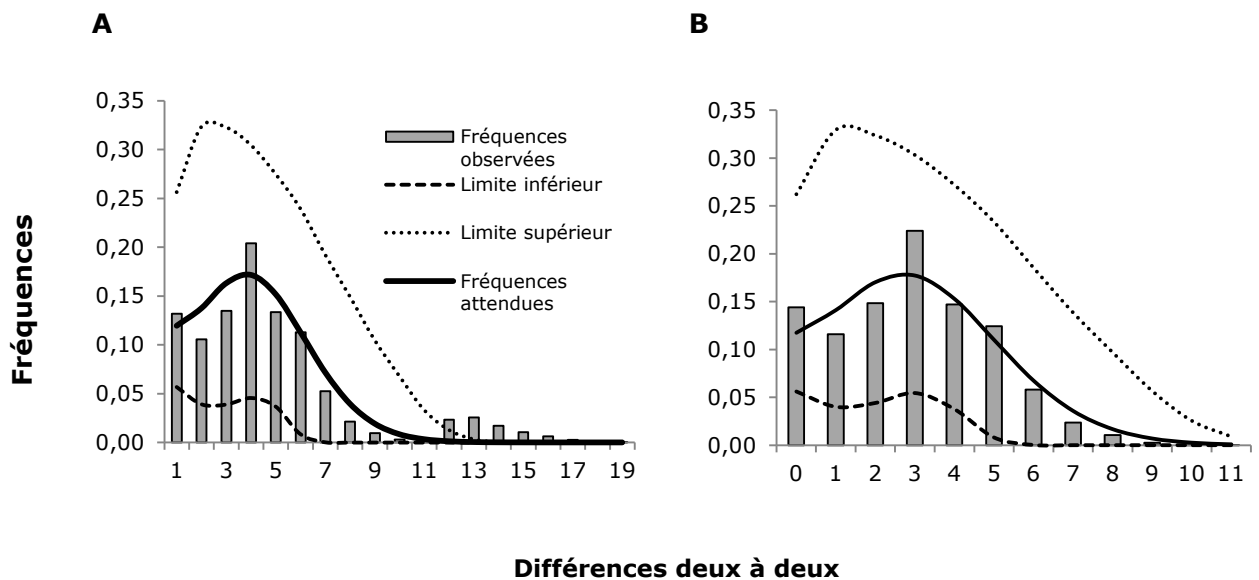


Figure 5.8. Distribution du nombre de différences entre haplotypes pris deux à deux (mismatch distribution) pour le gène cytb d'*A. tractus*. A : Ensemble des données ; B : Lignée I.

Tableau 5.6. Paramètres démographiques obtenues pour *A. tractus* (lignée I) basés sur un fragment du gène cytb de l'ADNmt.

T	IC2,5%-IC97,5%	θ_0	IC2,5%-IC97,5%	SSD	R2
3,79	1,13-6,48	0,002	0,00-1,51	0,005 $p=0,61$	0,02 $p=0,00$

τ (tau) et intervalle de confiance de 95% ; θ_0 : θ avant l'expansion ; SSD : somme des carrés des écarts ; R2 : statistique de Ramos-Onsins et Rozas (2002).

Discussion générale

VI. DISCUSSION GENERALE

VI.1 Structure génétique

Dans ce travail, nous avons fait une étude comparative de la structuration génétique des populations de trois espèces de poissons des récifs avec des histoires naturelles contrastées, mais exposées aux mêmes contraintes environnementales. Nous avons découvert que ce sont probablement les aspects biologiques (*i.e.* le comportement reproducteur) que déterminent l'existence de populations génétiquement différenciées chez les espèces de poissons étudiées.

L'analyse de la structure génétique des populations nous a montré la façon dont la diversité génétique est distribuée parmi les localités étudiées de *S. partitus*, *H. flavolineatum* et *A. tractus* autour de l'archipel cubain. Cette structure a été décrite sur la base des marqueurs d'ADN mitochondrial et microsatellite.

Au cours des dernières années les preuves se sont accumulées sur l'existence de discontinuités génétiques dans les systèmes marins. Néanmoins, il est admis que la plupart des populations de poissons marins présentent une structuration génétique faible due à des taux de flux génétique élevés entre elles (Ward *et coll.*, 1994; Waples, 1998; DeWoody et Avise, 2000; Palumbi, 2003).

Pour les trois espèces étudiées, et selon le marqueur analysé, nous avons observé des résultats différents mais qui sont en accord avec cette tendance.

Les deux espèces pour lesquelles on a pu faire l'analyse de locus microsatellites, *H. flavolineatum* et *S. partitus*, sont caractérisées par des valeurs faibles de F_{ST} , ce qui est attendu pour des espèces marines qui ont un grand potentiel de dispersion (Hoarau *et coll.*, 2002; Knutsen *et coll.*, 2003; Ovenden et Street, 2003; Knutsen *et coll.*, 2009; McCusker et Bentzen, 2010). Pour *H. flavolineatum* il a été mis en évidence l'absence de structure génétique significative entre toutes les localités analysées. Ceci a été aussi montré par Schlueter (1998) qui a étudié des populations d'îlots de la Floride et qui a détecté des quantités significatives de flux génétique qui homogénéise la diversité génétique de ces populations. En revanche, une étude à plus grande échelle géographique, le long des Caraïbes, des Bahamas et des îlots de la Floride (Purcell *et coll.*, 2006) a décrit une structuration génétique faible suivant un patron d'isolement par la distance, ce qui suggère des niveaux plus bas d'échanges à l'échelle régionale qui seraient dus aux limites de capacité de dispersion de cette espèce.

Le patron d'homogénéité génétique observé pour cette espèce autour de Cuba est aussi trouvé lorsqu'on a analysé la diversité au niveau de l'ADN mitochondrial. Shulman et Bermingham (1995) ont trouvé des résultats similaires au niveau de l'ensemble des Caraïbes. Chez cette espèce les haplotypes présentant les plus grandes fréquences sont trouvés dans toutes les localités à des fréquences statistiquement égales (annexe 8). Cette absence de différenciation a aussi été observée chez *A. tractus* (gène *cytb*).

Par ailleurs, chez *S. partitus* nous avons obtenu des indices de différenciation génétique (F_{ST}) faible mais statistiquement significatifs entre toutes les localités comparées deux à deux sauf pour les comparaisons avec La Bajada. L'analyse de la structuration de la diversité réalisées avec le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et coll.*, 2000) et la visualisation de la divergence des populations par une approche MDS basées sur les distances génétiques de Nei (1978) s'accordent pour indiquer que l'Ilot Coco est le plus différencié par rapport aux autres localités analysées. Le marqueur mitochondrial n'a pas permis de détecter des différences entre toutes les localités, mais a permis de distinguer l'ilot Coco des autres populations, ce qui pourrait être dû au taux de mutation plus élevé qui caractérise l'évolution moléculaire des microsatellites (Hedrick, 1999). En règle générale, chez *S. partitus*, la différenciation génétique se manifeste à une échelle relativement petite entre localités séparées de quelques centaines de kilomètres (entre 300 km et 700 km). D'autres études chez cette espèce ont montré que des populations séparées par des distances inférieures entretiennent des échanges génétiques suffisants pour permettre l'homogénéisation des fréquences alléliques (Christie *et coll.*, 2010), mais que la différenciation peut suivre un patron d'isolement par la distance lorsqu'on travaille à des échelles régionales (Purcell *et coll.*, 2009).

La structuration observée chez *S. partitus* indique des flux génétiques limités, comme décrit chez d'autres espèces de poissons et en raison de différents facteurs (Ruzzante *et coll.*, 2000; Planes *et coll.*, 2001; Riginos et Nachman, 2001; Planes et Fauvelot, 2002; Rocha *et coll.*, 2005b; Wilson, 2006). Lorsqu'on regarde les comparaisons des localités prises deux à deux, on trouve que la différenciation est largement indépendante de la distance entre sites d'échantillonnage. Ceci est en accord avec l'absence de structuration trouvée pour les deux autres espèces échantillonnées aux mêmes endroits, et nous permet d'écartier l'influence de ce facteur « distance » sur la structure génétique existant. White *et coll.* (2010) ont montré, au moyen de simulation de la dispersion larvaire basée sur les observations des courantes océaniques, que les distances géographiques ne prédisent pas la structuration du polymorphisme génétique. Ceci paraît vrai aux échelles suffisamment faibles où la dispersion est également probable entre toutes

les populations et il n'y a donc pas de relation entre la distance et le flux génétique (Hellberg, 2009).

L'impact des distances géographiques sur la structuration génétique des populations dépend étroitement de différents aspects de la biologie de l'espèce comme le type d'œufs produits, benthiques ou pélagiques, la présence de stades larvaires pélagiques et la durée de ces phases de développement. De ces facteurs dépendent le recrutement local ou la dispersion sur de longues distances (Bowen *et coll.*, 2006a). Shulman et Bermingham (1995) ont trouvé que les espèces avec des œufs non-pélagiques ont, en moyenne, des capacités de dispersion plus restreintes et une différenciation génétique supérieure à celles qui ont des œufs pélagiques. Par ailleurs, le lien entre la durée du stade larvaire et la structuration génétique des populations a été objet de nombreuses études, sans aboutir dans la plupart des cas à une relation clairement établie (Shulman et Bermingham, 1995; Taylor et Hellberg, 2005; Bay *et coll.*, 2006; Bowen *et coll.*, 2006a).

Les données suggèrent que les courants marins peuvent aussi moduler la structuration génétique des populations par le transport des larves d'une population à une autre population ou en agissant comme des barrières avec différents degrés de perméabilité (Gaylord et Gaines, 2000; Muss *et coll.*, 2001; Taylor et Hellberg, 2006). Au niveau de la Caraïbe, Shulman et Bermingham (1995) en analysant un groupe d'espèces avec des traits de vie divers n'ont pas pu mettre en évidence des différences significatives entre des localités séparées par les principaux courants, mais ils suggèrent l'importance possible des courants à petite et moyenne échelle qui pourraient avoir une influence locale sur l'isolement de populations d'une même espèce. Dans cette perspective sont développés des modèles qui permettent de prédire les patrons de dispersion larvaire et de structuration génétique basés sur des données océanographiques plus précises (Paris *et coll.*, 2005; Galindo *et coll.*, 2006; White *et coll.*, 2010).

Autour de l'archipel cubain, la circulation des courants marins a été décrite par Victoria del Rio et Penié (1998) (figure 9.1). Un patron complexe est observé dans la zone sud occidentale (Claro *et coll.*, 2001), formant des gyres et pouvant favoriser le mélange des populations des localités de La Bajada, Ilot Avalos et Ilot Breton au sud, ainsi que celles des localités de La Bajada et Plage Baracoa au nord et Ilot Coco dans une certaine mesure. Par ailleurs, le « Loop Current » du Golfe du Mexique (Hofmann et Worley, 1986) peut transporter les individus vers l'est et les pousser vers la côte, ce que limite la probabilité qu'ils se mélangent avec ceux du sud. (voir figure 1.1, extrait de Paris *et coll.* 2005).

La circulation des courants peut être impliquée dans la dispersion des larves des poissons qui fraient au niveau de la plateforme insulaire et favoriser de cette façon le flux de gènes entre populations. Toutefois la différenciation génétique trouvée n'est pas homogène pour les trois espèces étudiées, ce qui pourrait indiquer l'importance des aspects spécifiques du cycle de vie sur les limites de dispersion.

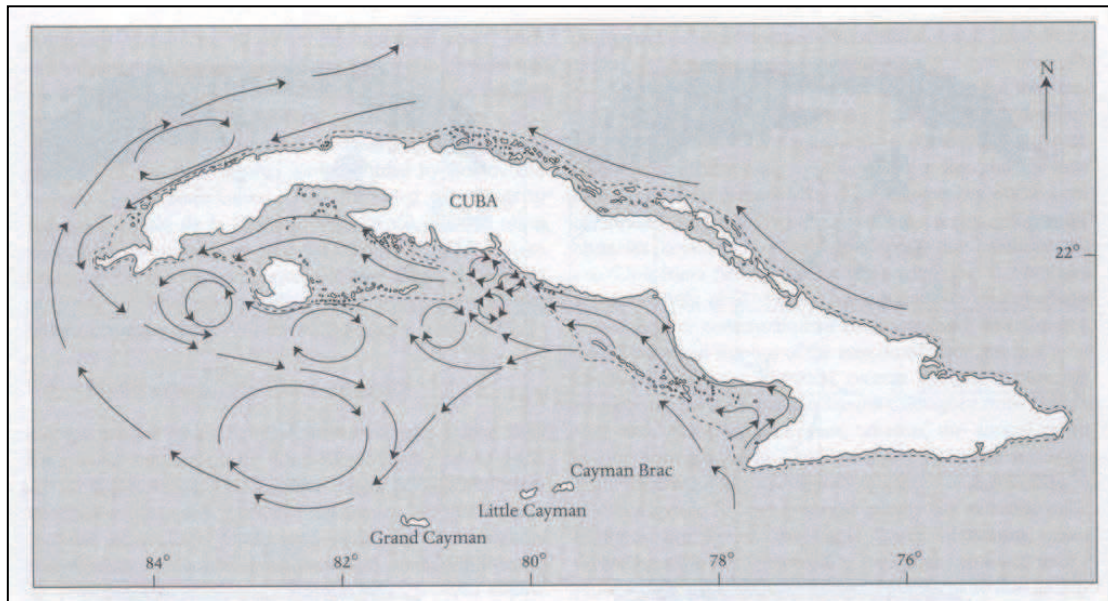


Figure 6.1. Patron des courants marin autour de Cuba. Extrait de Claro *et coll.* (2001).

Haemulon flavolineatum produit œufs pélagiques (Mc Farland *et coll.*, 1985) qui produisent des larves planctoniques d'une durée moyenne de 15 jours, durée parmi les plus courtes mesurées pour des poissons des récifs coralliens. De plus, Garcia-Cagides *et coll.* (1994) ont suggéré que les individus réalisent pour fraier des migrations des eaux intérieures de la plate-forme vers les régions proches du tombant. Même si cette espèce ne réalise pas les grandes migrations pour fraier décrites pour d'autres espèces comme les lutjanidés (Claro et Lindeman, 2003), la taille des populations augmentent pendant la reproduction en raison du regroupement d'individus venant de différents endroits (Claro, communication personnelle).

Acanthurus tractus fraient en couples ou en grands groupes et produit des œufs pélagiques (Colin et Clavijo, 1988; Weber et Brown, 2009). L'œuf éclot et produit une larve connu sous le nom d'acronurus qui est visiblement adapté à une vie pélagique (Randall, 1961a; Leis et Rennis, 1983) d'une durée de 69 jours. De plus quelques auteurs considère que les espèces qui composent la famille des Acanthuridés appliquent une stratégie reproductive qui permet aux œufs, puis aux larves, d'être transportés sur de longue distance dans l'océan en choisissant pour

frayer des localités avec une forte influence des courants marins dirigés vers l'océan (Johannes, 1978; García-Cagides *et coll.*, 1994).

Stegastes partitus, à l'opposé des autres espèces étudiées, pond des œufs dans un nid sur le fond marin et qui sont protégés par le mâle jusqu'à l'éclosion. La période larvaire pélagique a une durée moyenne de 28,8 jours (maximum de 39 jours) (Villegas-Hernández *et coll.*, 2008). Cette espèce est sédentaire et les individus pondent leurs œufs à quelques dizaines de mètres des zones où ils se nourrissent (Robertson, 1990). Les larves des pomacentridés comme *S. partitus* sont généralement collectés près de la côte (Leis, 1991; Cowen et Castro, 1994) et probablement elles restent dans l'environnement du récif pendant toute la durée de leur stade pélagique (Leis, 1991; Sponaugle et Cowen, 1996a), affectés par un régime de courants associés à la côte (Cowen et Castro, 1994). C'est pourquoi les larves de cette espèce ne sont pas exposées dans la même mesure aux courants prédominants qui peuvent modeler la distribution des larves et la structure génétique de *H. flavolineatum* et *A. tractus*.

Par ailleurs, il a été proposé que les caractéristiques suivantes du comportement peuvent induire que les larves se développent près de la côte plutôt qu'elles se dispersent (Riginos et Victor, 2001). En effet, les larves provenant des œufs benthiques sont habituellement plus avancées dans leur développement que celle qui proviennent d'œufs pélagiques (Cowen et Sponaugle, 1997), et ainsi elles pourraient avoir une meilleure capacité pour nager de façon active et de maintenir leur position dans la colonne d'eau (Stobutski et Bellwood, 1994; Fisher *et coll.*, 2000) et éviter la dispersion (Doherty *et coll.*, 1996). Leis *et coll.* (2007) ont observé, dans une expérience *in situ*, que 80% des larves nagent de façon orientée vers le récif. Quelques auteurs suggèrent que, probablement, elles utilisent leurs capacités sensorielles pour accomplir ces déplacements en direction des récifs (voir la revue de Sale, 2004). Le comportement larvaire pourrait être un paramètre important pour comprendre la connectivité entre les populations des poissons des récifs (Bowen *et coll.*, 2006a).

En résumé, selon le modèle proposé par Paris *et coll.* (2005) on peut prévoir que les espèces tels que *A. tractus* et *H. flavolineatum*, avec des capacités de dispersion semblables à celles des lutjanidés, montrent un certain isolement génétique dans la région de l'îlot Coco par rapport le reste des localités étudiées. Les résultats ne soutiennent pas cette idée pour ces espèces et indiquent que l'effet sur l'isolement de la direction des courants marins dans certaines régions est plus marqué pour des espèces telles que *S. partitus* qui présente un comportement reproducteur qui peut favoriser une rétention local des larves de manière plus marquée. D'ailleurs,

cette espèce présente un niveau de fragmentation génétique plus important, même dans des localités affectées par des patrons de courants marins qui favorisent le mélange des larves provenant de récifs différents, comme les localités du sud et sud-ouest de l'archipel (figure 6.1, 7.1, tableau 3.3).

Malgré l'homogénéité génétique observée pour les sites échantillonnés chez la gorette jaune et le chirurgien marron, il a été décrit que des populations peuvent être démographiquement indépendantes du point de vue écologique, même si la migration est suffisamment forte pour empêcher la différenciation génétique. L'absence de cette dernière n'indique donc pas nécessairement des échanges fréquents entre les populations (Waples, 1998; Waples et Gaggiotti, 2006). La littérature scientifique récente sur ce sujet indique qu'un pourcentage important des larves retournent au récif natal (Swearer *et coll.*, 1999; Jones *et coll.*, 2005; Almany *et coll.*, 2007; Planes *et coll.*, 2009; Christie *et coll.*, 2010). Ainsi, Swearer *et coll.* (2002) ont conclu que l'autorecrutement a lieu pour différentes espèces présentant différents traits d'histoire de vie et vivant dans différents habitats. La capacité des larves à rejoindre leur population d'origine peut être un phénomène commun à différentes espèces marines. A Cuba, ce comportement a été observé dans des populations de quelques espèces de gorettes et de vivaneaux vivants au sud ouest de l'île (Lindeman *et coll.*, 2001). D'autre part, Paris *et coll.* (2005) ont estimé des taux « virtuels » d'autorecrutement entre 37 et 80% pour les larves de mérour et de vivaneaux ; espèces qui font des migrations pour frayer et dont les larves sont fréquemment observées hors de la plateforme (Claro et Lindeman, 2003), ce qui favorise par ailleurs l'homogénéisation.

VI.2 Variabilité génétique

L'abondante littérature scientifique qui traite de la diversité génétique des poissons marins indique, en général, une grande variabilité de celle-ci (Buonaccorsi *et coll.*, 2001; Waldick *et coll.*, 2002; Adams *et coll.*, 2006). Pour les indicateurs de la diversité au niveau des locus microsatellites, ils oscillent généralement entre des valeurs modérées et grandes (Buonaccorsi *et coll.*, 2001; Adams *et coll.*, 2006; Purcell *et coll.*, 2006; Wilson, 2006), en raison du taux de mutation élevé qui caractérise ce type de marqueur (entre 10^{-2} chez l'homme (Weber et Wong, 1993) et 10^{-6} chez la drosophile (Schug *et coll.*, 1997)). Toutefois, dans le cas des espèces menacées (DeSalle et Amato, 2004) avec des tailles des populations faibles, cette diversité peut être réduite.

Les estimations de diversité génétique obtenues au cours de ce travail sont un peu plus élevées que celles obtenues pour des locus microsatellites dans d'autres travaux

sur les même espèces : *Haemulon flavolineatum* (Purcell *et coll.*, 2006) et *Stegastes partitus* (Hepburn *et coll.*, 2009; Christie *et coll.*, 2010) mais proche de celles obtenues chez d'autres poissons marins comme la blennie (*Axoclinus nigricandus*) (Riginos et Nachman, 2001), la girelle à tête bleue (*Thalassoma bifasciatum*) (Purcell *et coll.*, 2006), le flet (*Platichthys flesus*) (Hemmer-Hansen *et coll.*, 2007) et huit espèces de pomacentridés Bay *et coll.*, (2006). En général, les marqueurs microsatellites présentent chez les poissons marins un fort polymorphisme et une faible structuration géographique indicatrice de taux élevés de flux génétique entre populations (O'Reilly *et coll.*, 2004). Ceci se traduit en un nombre élevé d'allèles par *locus* et un fort pourcentage d'individus hétérozygotes par *locus* et par localité d'échantillonnage. Les valeurs d' hétérozygotie observées chez les trois espèces étudiées sont en accord avec les valeurs généralement rapportées chez les poissons marins (DeWoody et Avise, 2000).

La variabilité génétique de la région non codante de l'ADNmt présente des caractéristiques différentes chez les trois espèces analysées. Nous avons classé ces espèces dans des catégories différentes en fonction des estimations de la diversité haplotypique (h) et de la nucléotidique (π), comme proposé par Grant et Bowen (Grant et Bowen, 1998) et Avise (2000).

Chez *Stegastes partitus* la diversité génétique est caractérisée par une valeur élevée de h et une valeur faible de π (tableau 6.1). Ces valeurs sont à l'intérieur de l'intervalle de variation observé par Bay *et coll.* (2006) pour huit espèces de pomacentridés, et par Shulman et Bermingham (1995) pour deux espèces de cette même famille. En règle générale, une diversité génétique caractérisée par une diversité nucléotidique faible et une diversité haplotypique élevée est observée de façon récurrente chez les poissons marins (Grant et Bowen, 1998). Cette organisation de la diversité génétique suggère une croissance rapide à partir d'une population ancestrale d'effectif efficace (N_e) faible, et un temps écoulé suffisamment long pour générer une variabilité haplotypique par mutations, mais insuffisamment long pour permettre l'accumulation d'un grand nombre de différences entre les séquences analysées. Ce scénario est en accord avec l'existence d'un événement fondateur ou avec des fluctuations de la taille de la population avec des goulots d'étranglement.

Tableau 6.1 Comparaison de la diversité génétique chez les trois espèces étudiées

	<i>S. partitus</i>	<i>H. flavolineatum</i>	<i>A. tractus</i>
h	0,763	0,96	1,0
π	0,004	0,01	0,089

Chez *Acanthurus tractus*, la diversité génétique est caractérisée par des valeurs élevées de diversité haplotypique et nucléotidique (tableau 6.1). Cette dernière valeur, qui dépasse 8%, est remarquable compte tenu que π varie en règle générale entre 0 et 10% (Grant et Bowen, 1998). Les acanthuridés pourraient avoir un taux de mutation particulièrement élevé dans la région non codante de l'ADNmt. Ainsi, chez trois espèces du genre *Naso*, on observe $7,3\% < \pi < 13,6\%$, cette dernière valeur étant la plus grande trouvée pour ce marqueur chez les poissons (Klanten *et coll.*, 2007; Horne *et coll.*, 2008). D'autres espèces de poissons marins ont aussi montré une évolution particulièrement rapide de cette région de l'ADN mitochondrial (McMillan et Palumbi, 1997; Bowen *et coll.*, 2006b). Une diversité forte, tant au niveau haplotypique que nucléotidique, peut correspondre à l'existence de lignées bien différenciées qui coexistent après un contact secondaire entre populations séparées pendant un temps long, ou à des populations de taille efficace grande et stable pendant une longue période de leur histoire évolutive et jusqu'à aujourd'hui (Grant et Bowen, 1998). Néanmoins, s'il existe vraiment chez cette espèce un taux de mutation de l'ADNmt particulièrement élevé, les scénarios démographiques précédemment décrits pourraient être remis en question.

Enfin, chez *Haemulon flavolineatum*, la diversité génétique présente un état intermédiaire à ceux observés chez les deux autres espèces, une diversité haplotypique grande mais entre les valeurs observées pour les deux autres espèces et une diversité nucléotidique modérée qui est aussi incluse entre les valeurs observées pour les deux autres espèces (tableau 6.1).

Les relations entre les haplotypes des individus échantillonnés, présentées sous la forme d'un réseau d'haplotypes, nous permettent de faire des hypothèses sur l'histoire évolutive des populations analysées. Chez *S. partitus*, nous avons obtenu une représentation sous forme d'étoile, avec un haplotype très abondant et plusieurs haplotypes dérivés qui s'en distinguent par un ou deux pas mutationnels. Cet haplotype est présent dans toutes les localités, ce qui peut indiquer l'existence

de flux génétiques récents entre elles (Horne *et coll.*, 2008). Il est probablement le plus ancien, étant donné qu'il existe une corrélation positive entre la fréquence et l'âge des haplotypes, et il a probablement été présent dans les populations pendant un temps long (Castelloe et Templeton, 1994; voir la revue de Posada et Crandall, 2001). En conséquence, la plupart des nouveaux haplotypes dérivent des haplotypes les plus communs, ce qui implique que les variants les plus rares correspondent aux mutations les plus récentes (voir aussi la revue de Posada et Crandall, 2001; Templeton, 2006). Ces hypothèses sont généralement vérifiées pour les séquences sélectivement neutres et en l'absence de subdivision des populations.

Le réseau d'haplotypes obtenu chez *H. flavolineatum* diffère du précédent. Au lieu d'un haplotype prédominant, on observe quelques variants plus fréquents, et d'autres peu fréquentes et qui dérivent des premiers, avec de nombreux haplotypes uniques interconnectés de façon complexe. Cette absence de résolution peut s'expliquer par l'homoplasie (des mutations reverses ou parallèles) (Posada et Crandall, 2001). Même si la plupart des haplotypes diffèrent de leur voisin le plus proche par un seul pas mutationnel, comme chez *S. partitus*, la moyenne des différences nucléotidiques entre les séquences prises deux à deux (k) est près de 8 et la diversité nucléotidique est plus grande que 1%, supérieure à ce qu'on trouve chez *S. partitus*. *A. tractus* présente la particularité de fortes divergences entre les haplotypes des individus qui constituent les populations autour de Cuba.

VI.3 Démographie

Nous avons utilisé différentes méthodes pour tester l'hypothèse de neutralité des séquences d'ADNmt. Ceux-ci donnent aussi des arguments en faveur de l'existence de changements démographiques dans les populations étudiées. Les tests de neutralité D de Tajima et F_s de Fu ont produit des estimations avec des valeurs négatives et significatives pour les trois espèces étudiées, ce qui suggère soit l'effet d'un balayage sélectif, d'une expansion de la taille des populations ou un goulot d'étranglement ancien. Parmi ces trois hypothèses, des cas d'expansion des populations ont été corroborés pour les trois espèces par l'analyse de « mismatch distribution » où la distribution du nombre des différences entre les haplotypes pris deux à deux est unimodale, ce qui est en accord avec le modèle d'expansion soudaine. Toutefois, lorsqu'on regarde les paramètres de croissance obtenus pour les trois espèces on se rend compte que les temps correspondant au processus d'expansion sont différents, ce qui indique soit, que ces événements ne se sont pas produits au même moment, et par conséquent ne sont pas le produit d'un même

facteur causal (e.g. changement écologique) ou qu'un même agent n'a pas affecté les espèces avec la même ampleur. D'autre part les résultats des analyses bayésiennes réalisées avec la région de contrôle de l'ADNmt en utilisant le logiciel Lamarc montrent que les populations continuent à croître. Malgré les différences génétiques trouvées chez *S. partitus* entre l'îlot Coco et le reste des individus regroupés, il existe des taux élevés et différents de flux génétique entre ces deux populations identifiées, plus précisément le flux est plus faible vers l'îlot Coco. Ces résultats confirment que la population de l'îlot Coco, bien que de façon faible, est plus isolée du reste.

L'espèce *S. partitus* est, parmi les trois espèces, la plus proche de l'événement d'expansion soudaine, avec une valeur de $\tau = 1,66$ ce qui correspond au temps mesuré sur la base du taux de mutation de la région non codante. Dans cette perspective les événements d'expansion de *H. flavolineatum* et *A. tractus* sont plus éloignés dans le temps avec des valeurs de $\tau = 6,0$ et $\tau = 15,91$ respectivement. Les estimations de θ montrent aussi des différences pour les trois espèces analysées, la plus petite valeur étant obtenue pour *S. partitus*. Ces trois espèces sont parmi des plus communes dans les récifs cubains (Claro, 1994), mais *S. partitus* est la deuxième parmi les poissons les plus abondants dans les récifs des petites Antilles et Cuba (Claro et coll., 1998), avec des populations composées de milliers d'individus dans des localités situées au nord de La Havane (González-Sansón et Aguilar, 2003). Toutefois, une grande variance du succès reproducteur peut provoquer la diminution de la taille efficace des populations et la coalescence tôt des lignées existantes (Hedgecock, 1994).

Lorsqu'on regarde le signal produit par les marqueurs microsatellites chez *S. partitus* et *H. flavolineatum*, on ne détecte aucun changement dans la taille des populations analysées. Elles semblent plutôt stables avec des taux de croissance exponentielle (g) très proches du zéro. Cette contradiction apparente peut refléter les caractéristiques intrinsèques des marqueurs, c'est-à-dire que dans certains cas il n'y a pas de coïncidence entre les données nucléaires et les données mitochondriales (Zink et Barrowclough, 2008). Comme le temps de coalescence est une fonction positive de la taille efficace de la population (N_e), qui est quatre fois plus grand pour l'ADN nucléaire que pour l'ADNmt, ces marqueurs donnent une information sur la démographie et la dispersion ayant eu lieu dans des temps différents, le passé plus récent pour l'ADNmt et qui correspond aux générations entre $4N_e$ et N_e et le passé lointain pour l'ADN nucléaire, aux générations avant $4N_e$ (Templeton, 2006). C'est pourquoi si les événements d'expansion ont eu lieu

entre 4Ne et Ne générations on n'est pas capable de les détecter avec les marqueurs microsatellites.

D'autre part, et avec ce même marqueur on a obtenu des arguments en faveur de l'occurrence d'un goulot d'étranglement chez les populations de *S. partitus*, pour le modèle de mutation IAM. Strictement parlant, l'excès de diversité génique par rapport à la diversité génique attendue à l'équilibre mutation dérive (principe du test utilisé par le logiciel Bottleneck) a été seulement démontré par ce modèle par Maruyama et Fuerst (1985). Même si on ne connaît pas le modèle selon lequel les microsatellites étudiés mutent, il a été décrit que lorsqu'ils dévient légèrement du modèle SMM, fait qui est très commun (Balloux et Lugon-Moulin, 2002), ils montreront un excès de diversité génique en conséquence d'un goulot d'étranglement (Cornuet et Luikart, 1996).

VI.4 La problématique *A. tractus*/*A. bahianus*

VI.4.1 Les arguments de l'ADNmt

Lorsqu'on compare *A. tractus* et *A. bahianus* avec les deux autres espèces du genre qui habitent dans la même région (*A. chirurgus* et *A. coeruleus*) on se rend compte qu'elles sont très sensibles aux barrières écologiques imposées par le flux d'eau douce produit par l'embouchure des rivières Orénoque et Amazone (Rocha *et coll.*, 2002). C'est pourquoi ce cas a été considéré comme un exemple classique de forte structuration de populations produit par une barrière géographique qui s'est maintenue pendant une période évolutive longue (Fig 17.1 chez Helfman *et coll.*, 2009). Notre analyse des relations entre les haplotypes d'*A. tractus* trouvés autour de Cuba a regroupé sept individus avec les haplotypes ABA3 et ABA4 de la lignée sud décrite par Rocha *et coll.* (2002) comme *A. bahianus*. Ces haplotypes sont séparés par neuf mutations du clade qui définit l'espèce *A. tractus* des Caraïbes (Bernal et Rocha, 2011).

Nos données ne réfutent pas les résultats préalables qui montrent une divergence génétique importante entre des populations des deux provinces biogéographiques. Toutefois, la présence d'haplotypes du sud dans les Caraïbes (*i.e.* Cuba) suggère que des individus du sud ont été capables de traverser la barrière d'eau douce mentionnée ci-dessus. Étant donné que la taille de notre échantillon est quatre fois plus grande que celle de Rocha *et coll.* (2002) (149 vs 38), et que les haplotypes des individus du sud représentent seulement 5% de notre échantillon, il est compréhensible que ces haplotypes n'aient pas été détectés dans la première étude sur un petit échantillon.

VI.4.2 Dispersion des larves ou des adultes

Les stades juvénile et adulte de *A. bahianus* et *A. tractus* sont vagiles (Robertson *et coll.*, 2005). Néanmoins, leur absence des eaux profondes et fonds boueux et leur occurrence presque exclusive dans les récifs peu profonds ont été considérées comme des facteurs fondamentaux impliqués dans l'isolement entre les lignées des Caraïbes et de l'Atlantique sud qui définissent ces espèces (Rocha *et coll.* 2002). D'autre part, elles produisent des œufs pélagiques et les larves ont une période planctonique de 69 jours (Sponaugle et Cowen, 1996a). Il est connu que ces deux caractéristiques favorisent la dispersion au moyen des courants marins (Muss *et coll.*, 2001). L'existence d'*A. bahianus* du Brésil jusqu'aux îles de la dorsale médio-Atlantique sans différenciation génétique suggère que les niveaux faibles de salinité autour de la barrière Orénoque-Amazone sont donc plus efficaces pour empêcher la dispersion des larves que les courants marins (Rocha *et coll.* 2002).

Lessios et Robertson (2006) et Floeter *et coll.* (2008) ont apporté un éclairage sur cet aspect du problème lorsqu'ils ont comparé la structure et le flux génétique entre des populations de quelques espèces de poissons de l'Atlantique et Pacifique. Ces travaux ont montré qu'il n'existe pas un patron unique qui explique la divergence génétique et les temps de séparation entre les populations pour les différentes espèces. Ceci suggère que les larves peuvent de façon sporadique traverser une barrière à l'occasion de fluctuations des conditions de l'environnement qui induisent des changements dans l'efficacité de la barrière. Apparemment, c'est aussi applicable à la barrière Orénoque-Amazone pour l'espèce *A. bahianus*. La dispersion d'*A. tractus* vers l'Atlantique du sud ne peut pas être rejetée, mais elle est moins probable car les courants principaux viennent du sud en direction des Caraïbes. Cette hypothèse reste à vérifier car il est connu que d'autres espèces migrent dans les deux sens à travers cette barrière (Floeter *et coll.*, 2008; Rocha *et coll.*, 2008).

VI.4.3 Un ou plusieurs événements de dispersion

Les données disponibles sont insuffisantes pour estimer précisément la date de l'événement de dispersion vers les Caraïbes. Les haplotypes identifiés dans notre étude ont des positions terminales et internes dans le réseau (figure 5.7), mais ils représentent seulement une petite fraction de la diversité révélée par le travail précédent. Comme par ailleurs le nombre de substitutions nucléotidiques entre les haplotypes du sud trouvés à Cuba et les séquences pour cette région qui sont disponibles, les haplotypes ABA3 et ABA4, est faible (un à quatre mutations), il est probable que la migration d'*A. bahianus* vers la région des Caraïbes ait eu lieu relativement récemment. La distribution actuelle des haplotypes suggère aussi

qu'au moins un événement ancien de colonisation a eu lieu beaucoup plus tôt dans l'histoire évolutive d'*A. bahianus*/*A. tractus*. Si on fait l'hypothèse de 2% de divergence par million d'année, taux qui a été largement utilisé pour estimer des temps de divergence à partir du gène *cytb* (Brown *et coll.*, 1979), la divergence de 2.0% entre les séquences de ces deux espèces indique qu'elles ont divergé il y a environ un million d'années, soit bien après la mise en place de l'organisation actuelle du bassin des rivières Orénoque-Amazone (c. 10 million d'années Lovejoy *et coll.*, 1998). Ceci fait penser qu'un événement de colonisation a eu lieu à l'occasion d'une dispersion restreinte à travers la barrière déjà établie. Cette colonisation par une population de petite taille pourrait expliquer la monophylie réciproque des populations (ou espèces) présentes des deux cotés de la barrière.

VI.4.4 Quelques remarques

L'existence des haplotypes d'*A. bahianus* dans la province biogéographique des Caraïbes soutient l'hypothèse d'enrichissement de la faune dans cette province (Robertson *et coll.*, 2006; Rocha *et coll.*, 2008). Le patron de couleurs qui caractérise *A. bahianus* n'a pas été observé dans l'échantillon analysé. Il est toutefois possible qu'on n'est pas fait assez attention à ce point lors de la collecte des individus car il y a une assez forte variabilité de la coloration chez cette espèce. A l'occasion de futurs échantillonnages, il sera nécessaire de rechercher les différences morphologiques qui séparent *A. tractus* et *A. bahianus* pour voir s'il y a une correspondance avec la divergence génétique. Plus de données, en particulier sur l'ADN nucléaire, sont maintenant nécessaires pour élucider la question de l'isolement génétique entre ces deux espèces d'acanthuridés. On peut se poser la question suivante : est-ce que *A. bahianus* est réellement présent dans les Caraïbes ou ces haplotypes sont-ils le produit d'événements anciens d'hybridation qui ont amené à de l'introgession mitochondriale ? Déterminer si ces deux espèces se croisent ou si seulement elles cohabitent là où se superposent leurs aires de répartition est un aspect crucial de futurs travaux sur ces poissons.

VI.5 Perspectives

Ce travail de thèse représente la première étude de la structure génétique des populations de poissons marins autour de Cuba. Il nous a permis de révéler des caractéristiques des populations de trois espèces et montrer qu'au moins à l'échelle étudiée et dans les conditions écologiques de l'archipel cubain les caractéristiques biologiques des espèces peuvent déterminer le niveau d'isolement géographique des populations. Les estimations de paramètres démographiques ont aussi montré

des disparités entre les espèces, ce qui peut être un indice d'histoires évolutives différentes, ainsi que des sensibilités différentes aux événements écologiques qui se sont produits dans la région pendant les derniers milliers d'années. Les résultats nous apportent de nouvelles interrogations pour des travaux futurs.

Il serait utile d'obtenir plus de données sur les locus microsatellites chez *S. partitus* afin d'augmenter la puissance pour mesurer la structure génétique des populations.

L'analyse de l'ADN nucléaire chez *A. tractus* et *A. bahianus* permettra de répondre à la question de l'isolement génétique entre ces deux espèces d'acanthuridés.

Il faudrait échantillonner et ajouter dans les analyses des individus provenant de la zone sud orientale de l'île, sachant que des travaux préalables ont montré des pourcentages élevés d'autorecrutement dans cette zone.

Il serait particulièrement utile l'utilisation des approches de génétique du paysage, c'est-à-dire des tests spécifiques pour mesurer l'influence des variables du paysage sur la variation génétique. Plus précisément, l'incorporation des données sur la circulation marine autour de Cuba, comme la vitesse des courants et du vent, l'échelle d'action des courants et leur changement saisonniers.

Enfin, nous étendrons ce type d'étude à d'autres organismes marins avec des capacités de dispersion et des besoins écologiques différents pour pouvoir faire des généralisations et identifier les spécificités des patrons phylogéographiques qui caractérisent les populations autour de Cuba.

Matériels et Méthodes

VII. MATERIELS ET METHODES

VII.1 Echantillonnage

Nous avons échantillonné des individus adultes (mâles et femelles) des trois espèces étudiées (*Stegastes partitus*, *Haemulon flavolineatum* et *Acanthurus tractus*) dans les cinq localités suivantes situées autour de l'archipel cubain : Ilot Avalos (Archipel des Canarreos), La Bajada (Péninsule de Guanahacabibes), Plage Baracoa (au nord de La Havane), Ilot Coco (Archipel des Jardins du Roi) et Ilot Breton (Archipel des Jardins de la Reine) pendant la période de 2005-2010 (figure 7.1, tableau 7.1). L'échantillonnage a été répété dans le temps dans quelques localités et pour les espèces *A. tractus* et *H. flavolineatum*. L'échantillonnage a été réalisé avec des filets pour l'espèce la plus petite et moins rapide (*S. partitus*) et avec des fusils sous-marins pour les autres deux.

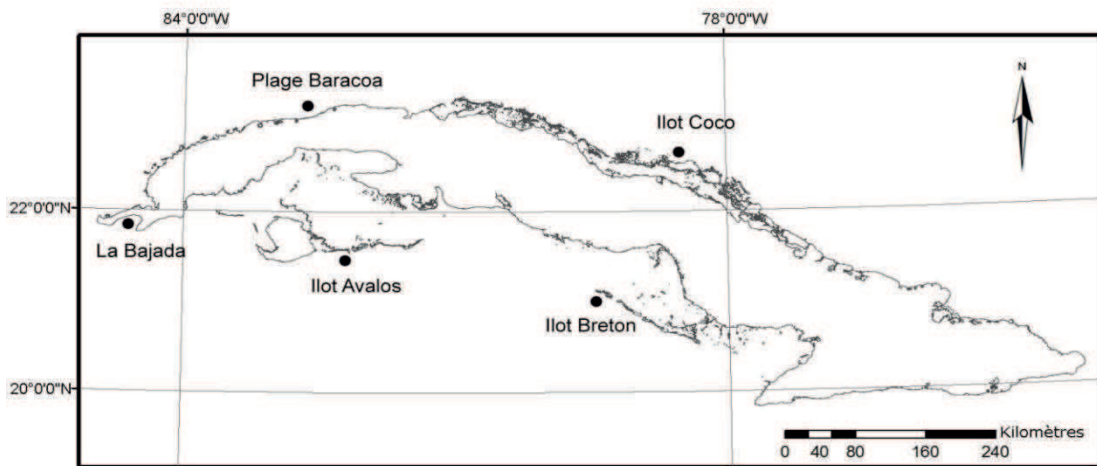


Figure 7.1 Localités d'échantillonnage autour de l'île de Cuba pour les espèces *S. partitus*, *H. flavolineatum* et *A. tractus*.

Tableau 7.1. Dates et localités d'échantillonnage

Localité	Espèces		
	<i>S. partitus</i>	<i>H. flavolineatum</i>	<i>A. tractus</i>
Ilot Avalos	Déc. 2005	Déc. 2007	Oct. 2006
	Oct. 2008	Oct. 2008	Oct. 2008
La Bajada	Jui. 2005	Mai, 2007	Mai, 2007
	Fév. 2010	Fév. 2010	-----
Plage Baracoa	Jui, 2006	Mai, 2007	Fév. 2006
	Mar, 2009	Nov. 2009	-----
Ilot Coco	Mar. 2007	Fév. 2008	Mar. 2007
	Fév. 2008	-----	-----
Ilot Breton	Déc. 2008	Déc. 2008	Déc. 2008

VII.2 Traitement des échantillons

La plupart des échantillons a été traitée aussitôt après capture. Néanmoins, pour quelques cas, cela n'a pas été possible et les animaux ont été congelés à -20°C jusqu'à leur traitement ultérieur. Par la suite des fragments de tissus correspondants aux nageoires caudales, pectorales et dorsales ont été coupés et stockés dans l'éthanol 95% pour conserver le matériel génétique.

VII.3 Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait soit en utilisant du phénol-chloroforme et la méthode de Sambrook *et coll.* (1989), en prélevant un fragment de tissu d'environ 8,0 mm², soit en utilisant la méthode d'extraction avec résine ChelexTM (Walsh *et coll.*, 1991) selon Estoup *et coll.* (1996), à partir de 2,0 mm² de tissu.

La qualité des extractions obtenues par une ou l'autre de ces deux méthodes a été vérifiée au moyen de l'électrophorèse en gel d'agarose 1% en utilisant le tampon TBE 0.5% (Tris-Acide Borique 40 mM, EDTA 1 mM). Pour la révélation, on a immergé le gel dans une solution de Bromure d'éthidium 0.5 µg/ml et ensuite regardé le résultat avec un transilluminateur de lumière UV.

VII.4 Amplification de l'ADN microsatellite

Les marqueurs microsatellites pour *S. partitus* et *H. flavolineatum* ont été choisis parmi ceux décrits par Williams *et coll.* (2003; 2004) (tableaux 7.2 et 7.3). Aucun marqueur microsatellite n'a été pas utilisé pour *A. tractus*.

La plupart des génotypes des individus ont été obtenus de façon automatique (avec un séquenceur capillaire), sauf quelques uns qui ont été obtenus en utilisant l'électrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide. Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes (volume final de 10 µL pour l'automatique et de 20 µL pour le manuel) : 5-20 ng d'ADN dilué dans le tampon TE 1X, du tampon d'amplification 1X, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM (0,2 µM pour le procédé manuel) de chacune des amorces et 0,5 u (1u pour le procédé manuel) de Taq DNA Polymérase (GoTaq Promega). Pour le locus AAC43 de *H. flavolineatum* 1u de polymérase a été utilisé dans tous les cas. Le volume final a été complété avec de l'eau désionisée stérile.

Pour la méthode automatique, les amorces ont été marquées avec les fluorochromes VIC, 6-FAM, NED et PET (tableaux 7.2 et 7.3). Le cycle d'amplification par PCR a été le suivant : 3 min à 95°C de dénaturation initiale et 34 cycles de 45s à 92°C pour la dénaturation de l'ADN, 45s à 53°C pour l'hybridation des amorces à l'ADN cible, et 1min à 72°C pour l'extension des chaînes nucléotidiques. Au bout du programme on a ajouté 10min à 72°C pour compléter l'extension des produits d'amplification.

Tableau 7.2. Amorces pour l'amplification des locus microsatellites utilisés dans l'étude des populations de *S. partitus* de l'archipel cubain. Chaque fluorochrome est marqué en couleur.

LOCUS	AMORCES
<i>SpGATA16</i>	Direct 5'-CCTTTTTCAACTTAAATTAGATAGA-3' Reverse 5'-VIC-CTTGGTGTCTTGTGAGTGTGT-3'
<i>SpAAT40</i>	Direct 5'-NED-CTGGGCTTCTTTTTTGT-3' Reverse 5'-AGTGGTCCCAGAGTTTTCTC-3'
<i>SpAAC41</i>	Direct 5'-6-FAM-CGAAGGCTGTGTTTCAGTTATACA-3' Reverse 5'-GCCCCGTCAGTACAGTCTGTG-3'
<i>SpGATA40T</i>	Direct 5'-ATGCCTCACAATGATGTATATTT -3' Reverse 5'-PET-TTGCCTGCTGATAATTAACG -3'

Tableau 7.3. Amorces pour l'amplification des locus microsatellites utilisés dans l'étude des populations de *H. flavolineatum* de l'archipel cubain. Chaque fluorochrome est marqué en couleur.

LOCUS	AMORCES
<i>HfAAC3</i>	Direct 5' - VIC -GCTCCATGCTGAATGTGAT-3' Reverse 5' -ATGGTCTGTGTCTTGAGTCTGT-3'
<i>HfAAC10</i>	Direct 5' -CACGGAGAAAGGAATAGCAT-3' Reverse 5' - PET -TGGCAGAGAGAGAGGTTTCA-3'
<i>HfAAC37</i>	Direct 5' -CCAGCAGAGGAGGTGAGAC-3' Reverse 5' - NED -CCGCTGTTTCCAATTTATCT-3'
<i>HfAAC41</i>	Direct 5' - 6-FAM -TCTGCTGTTTACTTTTTCTCTGTC-3' Reverse 5' -CAGCCCTCGATACAAGTTCA-3'
<i>HfAAC43</i>	Directo 5' - NED -CTGCCTTGTGTGGACAAAA-3' Reverse 5' -CGTGAGTCAAAACATACACTGA-3'
<i>HfAAC46</i>	Direct 5' -CCAGGGAGGAGAGAGGAGT-3' Reverse 5' - VIC -AGGGGTCAAAGGAAAGTCAT-3'

* L'unité de base répétée de tous les microsatellites est AC sauf pour le locus *HfAAC43* où elle est GT.

VII.5 Génotypage

Les individus ont été analysés dans un séquenceur automatique ABI3130 XL Genetic Analyser en utilisant GS500 (-250) LIZ comme marqueur de taille et avec le logiciel Genemapper 3.0 (AppliedBiosystems).

Pour les échantillons analysés sur gel d'acrylamide, la taille des allèles a été déterminée en utilisant comme marqueurs des génotypes préalablement connus. Dans le cas des allèles présentant des difficultés pour la lecture de la taille on a refait migrer l'échantillon sur gel pour vérifier les résultats.

VII.6 Amplification de l'ADN mitochondrial

Deux régions de l'ADN mitochondrial ont été analysées pour déterminer la structure génétique des populations des poissons étudiés. D'une part, 460 pb du domaine hypervariable I (HVR-I, selon les sigles en anglais) de la région de contrôle (ou région non codante ou RNC) pour lequel on a utilisé les amorces universelles CR-A 5'-AATTCTCACCCCTAGCTCCCAAAG-3' et CR-E 5'-CCTGAAGTAGGAACCCAGATG-3' décrites par Lee *et al.* (1995). Pour chaque espèce on a aussi développé trois variantes internes différentes (annexe 9). Pour l'espèce *A. tractus* qui est apparue trop variable pour cette région, un fragment du gène cytochrome b (*cytb*), de 608 pb a été amplifié.

Les PCR ont été effectuées avec les mêmes concentrations de réactifs que pour l'analyse manuelle des microsatellites, mais dans un volume final de 50 µL. Nous utilisons le programme décrit précédemment pour les microsatellites, mais en faisant 40 cycles et des températures d'hybridation entre 52°C et 54°C en fonction des paires d'amorces utilisées. Pour le *cytb*, on a modifié le programme avec les cinq premiers cycles à 47°C et le reste à 50°C comme température d'hybridation.

Avant le séquençage, les produits d'amplification ont été purifiés pour éliminer l'enzyme et les amorces résiduelles. A cette fin, on a utilisé le kit Nucleospin Gel and PCR clean-up Gel extraction Nucleospin[®]Extract II (Macherey-Nagel) (www.mn-net.com).

VII.7 Séquençage de l'ADN mitochondrial

Les produits d'amplification ont été séquencés en utilisant le système automatique Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems, HITACHI).

Le mélange de réaction a été préparé à partir de 20 à 40 ng de produit de PCR, 3 µL de tampon 5X, 1 µL d'amorces (3,3 µM) et 2 µL de Mix BigDye (Promega) pour être utilisé avec le programme suivant: 1 min à 96°C, 24 cycles de: 10s à 96°C, 5 s à 50°C et 4 min à 60°C. Ensuite, l'ADN a été précipité en rajoutant 2 µL de EDTA 125 mM, AcNa 3M et 50 µL d'éthanol absolu et en laissant 15 min à l'abri de la lumière. Puis on a centrifugé pendant 20 min à 13 500 rpm et le surnageant a été soigneusement éliminé. L'étape suivante est un lavage avec de l'éthanol 70%, suivi par une centrifugation de 7 min à la même vitesse. Finalement, l'alcool a été enlevé et le culot séché à 37°C une heure minimum, voire une nuit. Le culot est resuspendu dans de la diformamide 5%.

VII.8 Traitements préliminaires des données

Chaque allèle microsatellite a été inclus dans une classe d'allèle nommée en accord avec son rang de taille (procédé connu sous le nom de "binning") étant donné que la longueur théorique du motif répété n'est pas toujours en accord avec celle déterminé par le séquenceur automatique (Amos *et coll.*, 2007). Ce procédé a été implémenté dans le logiciel FLEXIBIN, qui offre le plus de précision et de vitesse (Amos *et coll.*, 2007).

Le programme Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et coll.*, 2004) a été utilisé pour faire des corrections de lecture et détecter la présence d'allèles nuls.

VII.9 Analyses statistiques

VII.9.1 ADN microsatellite

Pour tester l'homogénéité de fréquences au cours du temps pour chacune des localités d'échantillonnage on a utilisé la statistique χ^2 avec le logiciel CHIRXC (Zaykin et Pudovkin, 1993).

Préalablement à l'analyse des données microsatellites, on a testé le déséquilibre de liaison entre chaque paire de *locus* en utilisant le test basé sur le rapport de valeurs de vraisemblance (G-test) disponible dans le logiciel FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). Ce test permet de tester l'association entre génotypes pour toutes les paires de *locus*.

VII.9.1.1 Structure populationnelle

Afin de déterminer l'existence d'une structure génétique pour l'ensemble de données indépendamment des localités d'échantillonnage, on a utilisé le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et coll.*, 2000). Le modèle de groupement implémenté dans le logiciel permet, en utilisant plusieurs *locus*, d'assigner les individus aux (K) populations avec une certaine valeur de probabilité. Il est requis que les *locus* soient en équilibre de liaison et il est fait l'hypothèse d'équilibre de Hardy-Weinberg dans les populations. Cette méthode a l'avantage de donner des résultats fiables d'assignation avec un nombre modeste de *locus*. Les paramètres ont été fixés pour utiliser l'« admixture model », ce que permet aux individus d'avoir plusieurs origines et le « correlated alleles frequencies », qui tient compte, d'après Falush *et coll.* (2003), que les fréquences alléliques de populations différentes sont probablement similaires à cause de la migration ou du polymorphisme ancestral partagé. Vingt itérations ont été réalisées pour des valeurs de K comprises entre 1

et 8 avec une période de burn-in de 10^4 et un nombre de répétitions de la MCMC de 10^6 . La meilleure partition est déterminée à partir des logarithmes des valeurs de probabilité postérieure pour chaque valeur de K . On a aussi utilisé la méthode décrit par Evanno *et coll.* (2005), qui permet estimer le paramètre ΔK . Celui-ci correspond à la quantité de variation entre les vraisemblances et les variances de ces probabilités pour des valeurs successives de K .

On a estimé les valeurs de F_{ST} et sa signification statistique pour les localités d'échantillonnage prises deux à deux, en utilisant le logiciel FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001).

Pour montrer graphiquement les relations entre les différentes localités d'échantillonnage, on a utilisé le cadrage multidimensionnel non-métrique (Lessa, 1990) appliqué à la matrice des distances génétiques (Nei, 1978) avec le logiciel XLSTAT Version 2012.2.01 (disponible à l'adresse <http://www.xlstat.com>). Les distances sont transformées en conservant au mieux les différences originales entre les données et représentées dans un espace bidimensionnel. L'ajustement (goodness of fit) entre les distances est évalué en utilisant un test de stress.

Pour tester l'existence de corrélation entre les valeurs de différenciation génétique F_{ST} et les distances géographiques (modèle « stepping stone ») on a utilisé le test de Mantel (Mantel, 1967) avec le logiciel XLSTAT Version 2012.2.01. Ce test repose sur la détermination de la corrélation entre deux, ou plus, matrices et permet de produire une distribution empirique de la statistique standardisée de Mantel, le coefficient de corrélation de Pearson, r . S'il n'existe pas de relation entre les matrices, la valeur de r ne s'écartera pas de la distribution des valeurs obtenues par permutations et on acceptera l'hypothèse nulle d'absence de corrélation. Les distances géographiques plus courtes entre les localités d'échantillonnage ont été déterminées par le logiciel SIG : ArcGis 9.3. Deux matrices de distances géographiques ont été construites : une première sur la base du patron général des courants marins, et la deuxième en prenant en compte la distance minimale entre les plate-formes sud-est (Ilot Breton) et nord-est (Ilot Coco).

VII.9.1.2 Diversité génétique

La variabilité génétique a été déterminée à partir du calcul du nombre d'allèles par locus (N_a) et de leur fréquence. On a aussi estimé les valeurs de richesse allélique (R_a) avec le logiciel FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) et l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e) d'après Nei (1987) avec le logiciel ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et Lischer, 2010). Les déviations aux fréquences de l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) ont été évaluées en estimant la valeur exacte de la probabilité de la

statistique F_{IS} (Wright, 1965) modifié par Weir y Cockerham (1984) a partir de la méthode de chaînes de Markov implémenté dans le logiciel GENEPOP 4.0 (Rousset, 2008).

En général, en cas de comparaisons multiples, la valeur du seuil de rejet a été ajustée en réalisant la correction de Bonferroni (Rice 1989) pour un niveau de rejet de 5%. Ce test, disponible dans le logiciel FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) nous permet de diminuer la probabilité d'obtenir des valeurs significatives (rejeter l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie).

VII.9.1.3 Analyse démographique

Pour détecter si les populations ont traversé des réductions démographiques drastiques (goulots d'étranglement) relativement récentes on a utilisé le logiciel Bottleneck (Cornuet et Luikart, 1996). Dans une population qui a souffert récemment d'une réduction drastique de son effectif efficace (N_e), la diversité génétique sera supérieure à la diversité génétique attendue à l'équilibre mutation-dérive à partir du nombre d'allèles observés dans une population de taille constante (Luikart *et coll.*, 1998). Ce logiciel estime pour chaque locus et population la distribution de la diversité génétique attendue qui est comparée à la valeur observée pour déterminer s'il y a un ajustement entre les distributions ou si la distribution observée indique un excès ou déficit d'allèles. La valeur théorique est obtenue par simulation du processus de coalescence des gènes en considérant trois modèles possibles de mutation des microsatellites : IAM, TPM et SMM. L'occurrence d'autres événements démographiques tels que le flux génétique ainsi que le changement de la taille de la population au cours du temps ont été estimés en utilisant l'analyse bayésienne avec le logiciel Lamarc 2.1.6 (Kuhner, 2006). Thêta (Θ) qui représente $4N_e\mu$ est calculé (N_e : taille efficace de la population, μ : le taux de mutation par site par génération). Il est spécifique des organismes diploïdes. Lamarc mesure le taux de migration comme $M = m/\mu$, où m est la probabilité d'une lignée d'immigrer par génération. Une valeur de M égale à 1 indique qu'il est également probable pour une séquence de migrer que pour un site de muter. Pour obtenir les taux de migration en termes de $4Nm$ l'auteur recommande de multiplier M par l'estimation de thêta de la population réceptrice. La croissance de la population est estimée par le taux de croissance exponentiel g . Une valeur négative de g indique que la population décroît. Par contre une valeur positive montre qu'elle est en croissance. Lorsque g est égal zéro la population possède une taille constante dans le temps. Les estimations de g ne sont pas symétriques en ordre de grandeur, étant donné qu'une valeur de $g = 10$ indique une croissance faible, mais

si $g = -10$ on est en présence d'une réduction significative de la taille de la population pour la plupart des valeurs de θ .

VII.9.2 ADN Mitochondrial

VII.9.2.1 Analyse des séquences

Les séquences ont été corrigées avec le logiciel Bioedit 7.0.8.0 (Hall, 1999). La taille moyenne des fragments de la RNC obtenus était de 380 pb pour *S. partitus*, 367 pb pour *H. flavolineatum* et 273 pb pour *A. tractus*, pour lequel la taille obtenue du fragment du gène *cytb* a été de 608 pb. Les séquences ont été alignées en utilisant l'algorithme Clustal-W implémenté dans le logiciel MEGA 4.0 (Tamura et coll., 2007).

Le modèle de substitutions nucléotidiques le plus probable pour décrire la variation des séquences analysées a été sélectionné en utilisant le logiciel jModelTest 0.1.1 (Guindon et Gascuel, 2003; Posada, 2008) et suivant le « Bayesian Information Criterium » (BIC; Schwarz, 1978).

La neutralité des mutations dans les séquences comparées a été estimée en utilisant les statistiques D de Tajima (Tajima, 1989) et F_S de Fu (Fu, 1997) avec le logiciel ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et Lischer, 2010). Sous l'hypothèse de neutralité on attend des valeurs proches de zéro, et par conséquent un écart significatif à cette valeur nous permet de considérer des hypothèses de sélection naturelle ou de changements démographiques. Le statistique D de Tajima produit des valeurs négatives sous l'effet de balayage sélectif, d'expansion de population et de goulots d'étranglement. Par contre, si la sélection naturelle favorise le maintien du polymorphisme, il y aura plus d'haplotypes aux fréquences moyennes qu'on attendait sous la neutralité et D serait positif (Templeton, 2006).

VII.9.2.2 Diversité génétique et différenciation des populations

Pour tester l'hypothèse nulle d'homogénéité des fréquences haplotypiques au cours du temps, les échantillons d'une même localité obtenus à des années différentes ont été comparés en utilisant le test χ^2 . Pour cela on a utilisé le programme CHIRXC (Zaykin et Pudovkin, 1993) qui applique la méthode de simulation de Monte Carlo suivant Roff et Bentzen (1989).

La diversité génétique a été décrite en considérant la quantité d'haplotypes, le nombre de sites polymorphiques, le nombre total de transitions, de transversions et

d'insertions-délétions obtenus avec le logiciel ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et Lischer, 2010).

Pour l'analyse du polymorphisme des séquences, la diversité nucléotidique (π) et haplotypique (h) (Nei, 1987) ainsi que les écarts types ont été calculées. Le premier paramètre donne le nombre moyen de différences nucléotidiques par site entre deux séquences, indépendamment du nombre d'haplotypes et le deuxième donne une information sur le nombre et la fréquence des différents allèles d'un locus, indépendamment du rapport entre les séquences, et elle est équivalente à l'hétérozygotie de l'échantillon. Ces calculs ont été faits en utilisant le logiciel *DnaSP* 5.10 (Librado et Rozas, 2009).

Les réseaux d'haplotypes ont été construits afin d'identifier leurs relations ainsi qu'explorer graphiquement l'existence de possibles associations entre haplotypes et distribution géographique. Cette représentation permet de rendre compte des processus évolutifs qui ont lieu au niveau de l'espèce (Posada et Crandall, 2001). On a utilisé la méthode de « Median Joining » (MJ) (Bandelt *et coll.*, 1999) suivi par un traitement de Maximum de Parcimonie implémentés dans le logiciel Network 4.5.1.6 software (Fluxus Technology).

Pour évaluer l'existence de populations différenciées on a utilisé la méthode bayésienne implémentée dans le logiciel BAPS 5.3 (Corander et Tang, 2007; Corander *et coll.*, 2008). Cette approche permet de trouver le nombre de clusters le plus probables pour l'ensemble des données, l'appartenance de chaque individu à un cluster correspondant, et une information sur l'origine des ancêtres pour chaque individu en tenant compte du nombre de clusters. Les analyses ont été réalisées soit sans donner d'informations sur l'origine des individus soit en les associant à leurs localités d'échantillonnage. L'affinité aux clusters a été déterminée en calculant le changement de valeur du log de la vraisemblance marginale du modèle de mélange (« admixture ») qui a lieu lorsqu'un individu est déplacé d'un cluster source vers un cluster cible. Les fréquences des haplotypes dans les clusters identifiés ont été comparées avec le logiciel CHIRXC (Zaykin et Pudovkin, 1993).

La différenciation des localités prises deux à deux a été estimée en utilisant la statistique *Snn* (Hudson, 2000) avec le logiciel *DnaSP* 5.10 (Librado et Rozas, 2009). Cette statistique est plus puissante que toutes les statistiques basées sur les séquences, décrit par Hudson *et coll.* (1992), lorsque le niveau de variation est faible à modéré.

VII.9.2.3 Analyse démographique

On a examiné la distribution du nombre observé de différences entre paires d'haplotypes « *mismatch distribution* » (Rogers et Harpending, 1992). Cette distribution observée est comparé avec une distribution attendue des différences par paires en utilisant les paramètres d'expansion populationnel. Elle est habituellement multimodale lorsqu'on analyse des populations stables. Au contraire elle est unimodale pour les populations qui sont passées par une expansion démographique récente (Rogers et Harpending, 1992). Cette analyse nous a permis d'estimer le paramètre populationnel θ_0 et après (θ_1) l'événement d'expansion, ainsi que τ , le moment de la croissance mesurée en unités de temps mutationnelles. θ dépend de la taille de la population des femelles par la formule $\theta = 2N_e u$ (N_e : taille efficace de la population ; u : taux de mutation). Cette analyse a été réalisé avec les logiciels ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et Lischer, 2010) en utilisant l'approche non linéaire des moindres carrés et *DnaSP* 5.10 (Librado et Rozas, 2009) pour obtenir la statistique R2 (Ramos-Onsins et Rozas, 2002).

Le taux de migration et le flux génétique ainsi que le changement de la taille de la population au cours du temps ont été estimés en utilisant l'approche bayésienne avec le logiciel Lamarc 2.1.6 (Kuhner, 2006), comme pour les microsatellites.

Le calcul de F_s de Fu (1997) nous permet aussi faire des estimations démographiques et il a été donc utilisé comme une estimation indépendant des changement de la taille des populations. Il est négatif lorsqu'on a un excès d'allèles rares (allèles aux fréquences faibles) et Fu (1997) a montré qu'il est un test approprié pour détecter la croissance des populations et le « genetic hitchhiking ». De façon complémentaire on a calculé la statistique R2 (Ramos-Onsin et Rozas 2002) qui est basée sur les différences entre le nombre de mutations de type singletons et la moyenne des différences nucléotidiques. Ramos-Onsins et Rozas (2002) ont estimé à partir d'une grande variété de cas que F_s de Fu et R2 sont les tests les plus puissants pour détecter la croissance des populations. Le comportement de R2 est supérieur pour les populations de tailles réduites, F_s est meilleur pour les populations de tailles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams SM, JB Lindmeier et D Duvernell (2006). "Microsatellite analysis of the phylogeography, Pleistocene history and secondary contact hypotheses for the killifish, *Fundulus heteroclitus*." Molecular Ecology **15**: 1109-1123.
- Allen GR (1991). Damselfishes of the world, Mergus Publishers, Melle.
- Almada-Villela PC, PF Sale, G Gold-Bouchot et B Kjerfve (2003). "Manual of methods for the MBRS synoptic monitoring system: selected methods for monitoring physical and biological parameters for use in the Mesoamerican region." Mesoamerican Barrier Reef Systems Project (MBRS)(Belize, City).
- Almany GR, ML Berumen, SR Thorrold, S Planes et GP Jones (2007). "Local Replenishment of Coral Reef Fish Populations in a Marine Reserve." Science **316**: 742.
- Amos W, JI Hoffman, A Frodsham, L Zhang, S Best et AVS Hill (2007). "Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions." Molecular Ecology Notes **7**: 10-14.
- Aquadro CF et BD Greenberg (1983). "Human Mitochondrial DNA Variation and Evolution: Analysis of Nucleotide Sequences from Seven Individuals " Genetics **103**: 287-312.
- Aquadro CF, N Kaplan et KJ Risko (1984). "An analysis of the dynamics of mammalian mitochondrial DNA sequence evolution." Molecular Biology and Evolution **1**: 423-434.
- Armour JAL, SA Alegre, S Miles, LJ Williams et RM Badge (1999). Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: Microsatellites: Evolution and Applications. D. B. Goldstein, Schlotterer, C. (Ed.), Oxford University Press, Oxford: 24-33.
- Avise J (1994). "Molecular Markers, Natural History and Evolution." New York, Chapman & Hall.
- Avise JC (2000). Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, Mass., Harvard University Press.447.
- Avise JC (2009). "Phylogeography: retrospect and prospect." Journal of Biogeography **36**: 3-15.
- Avise JC (2010). "Perspective: conservation genetics enters the genomics era." Conservation Genetics **11**: 665-669.
- Avise JC, J Arnold, MR Ball, E Bermingham, T Lamb, JE Neigel, CA Reeb et NC Saunders (1987). "Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics." Annual Review of Ecology and Systematics **18**: 489-522.
- Baensch HA et H Debelius (1997). Meerwasser atlas. Melle, Germany, Mergus Verlag GmbH, Postfach 86, 49302. 1216.
- Baker AJ, T Piersma et L Rosenmeier (1994). "Unraveling the intraspecific phylogeography of snots *Calidris canutus*: a progress report on the search for genetic markers." Journal of Ornithology **135**: 599-608.
- Ballard JWO et MC Whitlock (2004). "The incomplete natural history of mitochondria." Molecular Ecology **13**: 729-744.

- Balloux F et N Lugon-Moulin (2002). "The estimation of population differentiation with microsatellite markers." Molecular Ecology **11**: 155-165.
- Bandelt H-J, P Forster et A Rohl (1999). "Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies." Molecular Biology and Evolution **16**: 37-48.
- Bardach JE (1958). "On the movements of certain Bermuda reef fishes." Ecology **39**: 139-146.
- Bay LK, RH Crozier et MJ Caley (2006). "The relationship between population genetic structure and pelagic larval duration in coral reef fishes on the Great Barrier Reef." Marine Biology **149**: 1247-1256.
- Bernal MA et LA Rocha (2011). "*Acanthurus tractus* Poey, 1860, a valid western Atlantic species of surgeonfish (Teleostei, Acanthuridae), distinct from *Acanthurus bahianus* Castelnau, 1855." Zootaxa **2905**: 63-68.
- Betancourt CA (2005). La ictiofauna costera de Ciudad de La Habana: Efectos acumulativos de agentes estresantes múltiples en varios niveles de organización biológica. Centro de Investigaciones Marinas. La Habana, Universidad de la Habana. **PhD thesis**: 140.
- Birky CW (2001). "The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models." Annual Review of Genetics **35**: 125-148.
- Birky CW, P Fuerst et T Maruyama (1989). "Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes." Genetics **121**: 613-628.
- Boore JL (1999). "Animal mitochondrial genomes." Nucleic Acids Res **27(8)**: 1767-1780.
- Borrell Y, G Espinosa, J Romo, E Vázquez, JA Sánchez et G Blanco (2004). "DNA microsatellites variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp *Litopenaeus schmitti*." Marine Biology **144(2)**: 327-333.
- Bowen BW, AL Bass, A Muss, J Carlin et DR Robertson (2006a). "Phylogeography of two Atlantic squirrelfishes (Family Holocentridae): exploring links between pelagic larval duration and population connectivity." Marine Biology **149(4)**: 899-913.
- Bowen BW, A Muss, LA Rocha et WS Grant (2006b). "Shallow mtDNA coalescence in Atlantic pygmy angelfishes (genus *Centropyge*) indicates a recent invasion from the Indian Ocean." Journal of Heredity **97(1)**: 1-12.
- Brais B, JP Bouchard, YG Xie, DL Rochefort, N Chretien, FM Tomé, RG Lafrenière, JM Rommens, E Uyama, O Nohira, S Blumen, AD Korczyn, P Heutink, J Mathieu, A Duranceau, F Codère, M Fardeau et GA Rouleau (1998). "Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy." Nature Genetics **18**: 164-167.
- Brown WM, G Matthew et AC Wilson (1979). "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences **76(4)**: 1967-1971.
- Buonaccorsi VP, JR Mc Dowell et JE Graves (2001). "Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*)." Molecular Ecology **10**: 1179-1196.
- Burke NC (1995). "Nocturnal foraging habitats of French and bluestriped grunts, *Haemulon flavolineatum* and *H. sciurus*, at Tobacco Caye, Belize." Environmental Biology of Fishes **42(4)**: 365-374.

- Castelloe J et AR Templeton (1994). "Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory." Molecular Phylogenetics and Evolution. **3** (2): 102-113.
- Cervigón F (1993). Los peces marinos de Venezuela. Caracas, Fundación Científica Los Roques.497.
- Chang DD et DA Clayton (1986). "Identification of primary transcription start sites of mouse mitochondrial DNA: accurate in vitro initiation of both heavy- and light-strand transcriptions." Molecular Cell Biology **6**: 1446-1453.
- Chapman MR et DL Kramer (1999). "Gradients in coral reef fish density and size across the Barbados marine reserve boundary: effects of reserve protection and habitat characteristics." Marine Ecology Progress Series **181**: 81-96.
- Chen CA, MC Anonuevo, JW McManus, J Diepernk, VS Tuan, A Sarmiento et K-T Shao (2004). "Population structure and genetic variability of six bar wrasse (*Thalassoma hardwicki*) in Northern South China Sea revealed by mitochondrial control region sequences." Marine Biotechnology **6**: 312-326.
- Chittaro PM, J Gagnon et BJ Fryer (2006). "The differentiation of *Stegastes partitus* populations using lapillar and sagittal otolith chemistry." Journal of Fish Biology **68**: 1909-1917.
- Christie MR, DW Johnson, CD Stallings et MA Hixon (2010). "Self-recruitment and sweepstakes reproduction amid extensive gene flow in a coral-reef fish." Molecular Ecology **19**(5): 1042-1057.
- Claro R (1994). Características generales de la ictiofauna. In: Ecología de los peces marinos de Cuba. R. Claro (Ed.), Centro de Investigaciones de Quintana Roo, CIQR, Mexico e Instituto de Oceanología Academia de Ciencias de Cuba.
- Claro R, JP García-Arteaga, Y Bouchon-Navarro, M Louis et C Bouchon (1998). "Características de la estructura de las comunidades de peces en los arrecifes de Las Antillas Menores y Cuba." Avicennia **8**: 69-86.
- Claro R et KC Lindeman (2003). "Spawning aggregation sites of snapper and grouper species (Lutjanidae and Serranidae) on the insular shelf of Cuba." Gulf Caribbean Research **14**(2): 91-106.
- Claro R, YS Reshetnikov et PM Alcolado (2001). Physical attributes of coastal Cuba. In: Ecology of the marine fishes of Cuba. R. Claro, K. C. Lindeman et L. R. Parenti (Eds.) Washington, DC Smithsonian Institution Press: 1-20.
- Colin PL et IE Clavijo (1988). "Spawning activity of fishes producing pelagic eggs on a shelf edge coral reef, south-western Puerto Rico." Bulletin of Marine Science **43**: 249-279.
- Corander J, P Marttinen, J Sirén et J Tang (2008). "Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations." BMC Bioinformatics **9**: 539.
- Corander J et J Tang (2007). "Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information." Mathematical Biosciences **205**: 19-31.
- Cornuet JM et G Luikart (1996). "Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data." Genetics **144**(4): 2001-2014.
- Courtenay WR et HF Sahlman (1978). Pomadasyidae. In: FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Central Atlantic (Fishing Area 31). W. Fischer (Ed.) Rome, FAO. **4**.

- Cowen RK (2002). Oceanographic Influences on Larval Dispersal and Retention and Their Consequences for Population Connectivity. In: Coral Reef Fishes, Academic Press: 149-170.
- Cowen RK et LR Castro (1994). "Relation of coral reef fish larval distributions to island scale circulation around Barbados, West Indies." Bulletin of Marine Science **54**: 228-244.
- Cowen RK, MML Kamazima, S Sponaugle, CB Paris et DB Olson (2000). "Connectivity of marine populations: open or closed?" Science **287**(5454): 857-859.
- Cowen RK et S Sponaugle (1997). Relationships between early life history traits and recruitment in coral reef fishes. In: Early life history and recruitment in fish populations. R. C. Chambers et E. Trippel (Eds.) London Chapman and Hall: 423-449.
- Crow JF et M Kimura (1970). An Introduction to Population Genetics Theory., Harper and Row, New York, Evanston y London.
- DeSalle R et G Amato (2004). "The expansion of conservation genetics." Nature Reviews Genetics **5**: 720-712.
- Desoutter M (1990). Acanthuridae. In: Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). J. C. Quéro, J. C. Hureau, C. Karrer, A. Post et L. Saldanha (Eds.) JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. **2**: 962-964.
- DeWoody JA et JC Avise (2000). "Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals." Journal of Fish Biology **56**: 461-473.
- Di Rienzo A, AC Peterson, GJ C., AM Valdés, M Slatkin et NB Freimer (1994). "Mutational process of simple sequence repeat loci in human population." Proceedings of National Academy of Science USA **91**: 3166-3170.
- Doherty PJ, MJ Kingsford, MJ Booth et JH Carleton (1996). "Habitat selection before settlement by *Pomacentrus coelestus*." Marine and Freshwater Research **47**: 391-399.
- Doherty PJ, S Planes et P Mather (1995). "Gene flow and larval duration in seven species of fish from the great barrier reef." Ecology **76**(8): 2373-2391.
- Duvernell DD, JB Lindmeier, KE Faust et A Whitehead (2008). "Relative influences of historical and contemporary forces shaping the distribution of genetic variation in the Atlantic killifish, *Fundulus heteroclitus*." Molecular Ecology **17**: 1344-1360.
- Edwards A, HA Hammond, L Jin, CT Caskey et R Chakraborty (1992). "Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups " Genomics **12**: 241-253.
- Edwards AJ (1990). The fish and fisheries of Saint Helena Island. Tyne, Newcastle, University of Newcastle.
- Edwards CE, DE Soltis et PS Soltis (2008). "Using patterns of genetic structure based on microsatellite loci to test hypotheses of current hybridization, ancient hybridization and incomplete lineage sorting in *Conradina* (Lamiaceae)." Molecular Ecology **17**: 5157-5174.
- Ellegren H (2000). "Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences." Nature Genetics **24**: 400-402.
- Ellegren H (2000a). "Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference." Trends in Genetics **16**: 551-558.

- Espinosa G, R Díaz, J Matos, U Becquer, J Romo et Y Borrell (2003). "Variación aloenzimática en poblaciones cubanas del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*." Revista de Investigaciones Marinas **24**: 11-19.
- Estoup A et JM Cornuet (1999). Microsatellite evolution: inferences from population data In: Microsatellites: Evolution and Applications. D. B. Goldstein et C. Schlötterer (Eds.), Oxford University Press, Oxford.: 49-65.
- Estoup A, CR Largiader, E Perrot et D Chourrot (1996). "Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes." Molecular Marine Biology and Biotechnology **5**: 295-298.
- Evanno G, S Regnaut et J Goudet (2005). "Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study." Molecular Ecology **14**: 2611-2620.
- Excoffier L et HEL Lischer (2010). "Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows." Molecular Ecology Resources **10**(3): 564-567.
- Falush D, M Stephens et JK Pritchard (2003). "Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies." Genetics **164**: 1567-1587.
- Fauvelot C et S Planes (2002). "Understanding origins of present-day genetic structure in marine fish: biologically or historically driven patterns?" Marine Biology **141**: 773-788.
- Ferreira CEL, SR Floeter, JL Gasparini, BP Ferreira et JC Joyeux (2004). "Trophic structure patterns of Brazilian reef fishes: a latitudinal comparison." Journal of Biogeography **31**: 1093-1106.
- Figueira WF, SJ Lyman, LB Crowder et G Rilov (2008). "Small-scale demographic variability of the bicolor damselfish, *Stegastes partitus*, in the Florida Keys USA." Environmental Biology of Fishes **81**: 297-311.
- Fisher R, D Bellwood et S Job (2000). "The development of swimming abilities in reef fish larvae." Marine Ecology Progress Series **202**: 163-173.
- Floeter SR, LA Rocha, DR Robertson, JC Joyeux, WF Smith-Vaniz, P Wirtz, AJ Edwards, JP Barreiros, CEL Ferreira, JL Gasparini, A Brito, JM Falcon, BW Bowen et G Bernardi (2008). "Atlantic reef fish biogeography and evolution." Journal of Biogeography **35**(1): 22-47.
- Froese R et D Pauly. Eds. (2011). "FishBase. World Wide Web electronic publication." from www.fishbase.org, version.
- Fu Y-X (1997). "Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection." Genetics **147**: 915-925.
- Galarza JA, J Carreras-Carbonell, E Macpherson, M Pascual, S Roques, GF Turner et C Rico (2009). "The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **106**(5): 1473-1478.
- Galindo HM, DB Olson et SR Palumbi (2006). "Seascape Genetics: A Coupled Oceanographic-Genetic Model Predicts Population Structure of Caribbean Corals." Current Biology **16**: 1622-1626.
- García-Cagide A, R Claro et BV Koshelev (2001). Reproductive patterns of fishes of the Cuban shelf. In: Ecology of the marine fishes of Cuba. R. Claro, K. C. Lindeman et L. R. Parenti (Eds.) Washington, Smithsonian Institution Press: 73-114.

- García-Cagides A, R Claro et YBV Koshelev (1994). Reproducción. In: Ecología de los peces marinos de Cuba. R. Claro (Ed.) Mexico, Centro de Investigaciones de Quintana Roo, CIQR: 493.
- García Machado E, A Robainas, G Espinosa, M Oliva, J Paez, N Verdecia et M Monnerot (2001). "Allozyme and mitochondrial DNA variation in Cuban populations of the shrimp *Farfantepenaeus notialis* (Crustacea: Decapoda)." Marine Biology **138**(4): 701-707
- Gaut VC et JL Munro (1983). The Biology, Ecology and Bionomics of the Grunts, Pomadasyidae. In: Caribbean coral reef fishery resources. ICLARM Studies and Reviews 7. J. L. Munro (Ed.) Manila, Philippines, International Center for Living Aquatic Resources Management: 276.
- Gaylord B et SD Gaines (2000). "Temperature or transport? Range limits in marine species mediated solely by flow." American Naturalist **155**: 769-789.
- Godinho R, EG Crespo et N Ferrand (2008). "The limits of mtDNA phylogeography: complex patterns of population history in a highly structured Iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers." Molecular Ecology **17**(21): 4670-4683.
- Goldstein DB et DD Pollock (1997). "Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference." J. Hered **88**: 335-342.
- González-Sansón G et C Aguilar (2003). "Variaciones espaciales y temporales en la abundancia de las especies dominantes de peces de arrecife de coral en la costa de Ciudad de La Habana, Cuba." Revista de Investigaciones Marinas **24**: 99-110.
- Goudet J (2001). "FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>."
- Grant WS et BW Bowen (1998). "Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation." The American Genetic Association **89**: 415-426.
- Guindon S et O Gascuel (2003). "A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood." Systematic Biology **52**(5): 696-704.
- Guitart DJ (1977). Sinopsis de los peces marinos de Cuba, Academia de Ciencias de Cuba. Instituto de Oceanología.283.
- Hall TA (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acids Symposium Series **41**: 95-98.
- Hedgecock D (1994). Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In: Genetic and Evolution of Aquatic Organisms. A. R. Beaumont (Ed.) London, Chapman & Hall: 122-134.
- Hedrick PW (1999). "Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation." Evolution **53**(2): 313-318.
- Helfman GS, BB Collette, DE Facey et BW Bowen (2009). The diversity of fishes. Biology, evolution and ecology. Oxford, Wiley-Blackwell.720.
- Hellberg ME (2007). "Footprints on water: the genetic wake of dispersal among reefs." Coral Reefs **26**(3): 463-473.

- Hellberg ME (2009). "Gene flow and isolation among populations of marine animals." Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **40**(1): 291-310.
- Hellberg ME, RS Burton, JE Neigel et SR Palumbi (2002). "Genetic assessment of connectivity among marine populations." Bulletin of Marine Science **70**: 273-290.
- Hemmer-Hansen J, EE Nielsen, P Gronkjaer et V Loescheke (2007). "Evolutionary mechanisms shaping the genetic population structure of marine fishes; lessons from the European flounder (*Platichthys flesus* L.)." Molecular Ecology **16**: 3104-3118.
- Hepburn RI, PF Sale, B Dixon et DD Heath (2009). "Genetic structure of juvenile cohorts of bicolor damselfish (*Stegastes partitus*) along the Mesoamerican barrier reef: chaos through time." Coral Reefs **28**: 277-288.
- Hoarau G, AD Rijnsdorp, HW Van der Veer, WT Stam et JL Olsen (2002). "Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: microsatellites revealed large-scale spatial and temporal homogeneity." Molecular Ecology **11**(7): 1165-1176.
- Hofmann EE et SJ Worley (1986). "An investigation of the circulation of the Gulf of Mexico." Journal of Geophysical Research **91**: 14221-14236.
- Horne JB, Lv Herwerden, JH Choat et DR Robertson (2008). "High population connectivity across the Indo-Pacific: Congruent lack of phylogeographic structure in three reef fish congeners." Molecular Phylogenetics and Evolution **49**: 629-638.
- Hudson RR (2000). "A new statistic for detecting genetic differentiation." Genetics **155**(4): 2011-2014.
- Hudson RR, DD Boos et NL Kaplan (1992). "A statistical test for detecting geographic subdivision." Molecular Biology and Evolution **9**(1): 138-151.
- Humann P (1994). Reef Fish Identification: Florida, Caribbean, Bahamas, New World Publications, Jacksonville.
- Humann P (2007). Reef fish identification: Florida, Caribbean, Bahamas, New World Publications.
- Johannes RE (1978). "Reproductive strategies of coastal marine fishes in the tropics." Environmental Biology of Fishes **3**: 54-58.
- Johnson MS et R Black (1982). "Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria* sp." Marine Biology **70**: 157-164.
- Jones GP, S Planes et SR Thorrold (2005). "Coral reef fish larvae settle close to home." Current Biology **15**(14): 1314-1318.
- Kajander OA, AT Rovio et K Majamaa (2000). "Human mtDNA sublimons resemble rearranged mitochondrial genomes found in pathological states." Human Molecular Genetics **9**: 2821-2835.
- Kashi Y, D King et M Soller (1997). "Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation." Trends in Genetics **13**: 74-78.
- Kashi Y et M Soller (1999). Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Microsatellites: Evolution and Applications. D. B. Goldstein et C. Schlotterer (Eds.), Oxford University Press, Inc., New York: 10-23.
- Kimura M et JF Crow (1964). "The number of alleles that can be maintained in a finite population." Genetics **49**: 725-738.

- King DG, M Soller et Y Kashi (1997). "Evolutionary tuning knobs." Endeavour **21**: 36-40.
- Klanten OS, JH Choat et Lv Herwerden (2007). "Extreme genetic diversity and temporal rather than spatial partitioning in a widely distributed coral reef fish." Marine Biology **150**: 659-670.
- Knutsen H, PE Jorde, C André et NC Stenseth (2003). "Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod." Molecular Ecology **12**: 385-394.
- Knutsen H, PE Jorde, H Sannaes et e al. (2009). "Bathymetric barriers promoting genetic structure in the deepwater demersal fish tusk (*Brosme brosme*)." Molecular Ecology **18**: 3151-3162.
- Kuhner MK (2006). "LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters." Bioinformatics **22**(6): 768-770.
- Lacson JM (1992). "Minimal genetic variation among samples of six species of coral reef fishes collected at La Parguera, Puerto Rico, and discovery bay, Jamaica." Marine Biology. **112** (2): 327-331.
- Lacson JM et CP Bassler (1992). "Biochemical systematics of fishes of the genus *Stegastes* (Pomacentridae) from the southern Marianas." Marine Biology **113**(3): 457-462.
- Lacson JM et DC Morizot (1991). "Temporal genetic variation in subpopulations of bicolor damselfish (*Stegastes partitus*) inhabiting coral reefs in the Florida Keys." Marine Biology **110**(3): 353-357.
- Ladoukakis ED et E Zouros (2001). "Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA." Molecular Biology and Evolution **18**: 1168-1175.
- Lee W-J, J Conroy, W Huntting Howell et TD Kocher (1995). "Structure and Evolution of Teleost Mitochondrial Control Regions." Journal of Molecular Evolution **41**: 54-66.
- Leis JM (1991). The pelagic stage of reef fishes: the larval biology of coral reef fishes. In: The ecology of fishes on coral reefs. P. F. Sale (Ed.) San Diego, California, Academic Press, Inc.: 725.
- Leis JM et DS Rennis (1983). The larvae of Indo-Pacific coral reef fishes. Honolulu, University of Hawaii Press.
- Leis JM, KJ Wright et RN Johnson (2007). "Behaviour that influences dispersal and connectivity in the small, young larvae of a reef fish." Marine Biology **153**: 103-117.
- Lessa EP (1990). "Multidimensional analysis of geographic genetic structure." Systematic Zoology **39**(3): 242-252.
- Lessios HA et DR Robertson (2006) "Crossing the impassable: genetic connections in 20 reef fishes across the eastern Pacific barrier." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences DOI: 10.1098/rspb.2006.3543.
- Lester SE et BI Ruttenberg (2005). "The relationship between pelagic larval duration and range size in tropical reef fishes: a synthetic analysis." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **272**: 585-591.
- Lewis SM et PC Wainwright (1985). "Herbivore abundance and grazing intensity on a Caribbean coral reef." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **87**: 215-228.
- Li W et D Graur (1991). Fundamentals of Molecular Evolution, Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Librado P et J Rozas (2009). "DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data." Bioinformatics **25**: 1451-1452.
- Lindeman KC, TN Lee, WD Wilson, R Claro et JS Ault (2001). "Transport of larvae originating in Southwest Cuba and the Dry Tortugas: evidence for partial retention in grunts and snappers." Proceedings of the 52nd Gulf and Caribbean Fisheries Institute **52**: 732-747.
- Lovejoy NR, E Bermingham et AP Martin (1998). "Marine incursion into South America." Nature **396**: 421-422.
- Lubchenco JCSR, SD Gaines et S Andelman (2003). "Plugging a hole in the Ocean: The emerging science of marine reserves." Ecological Applications **13**(1): S170-S184.
- Luikart G, FW Allendorf, JM Cornuet et WB Sherwin (1998). "Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks." The American Genetic Association **89**: 238-247.
- Luiz OJ, JS Madin, DR Robertson, LA Rocha, P Wirtz et SR Floeter (2011) "Ecological traits influencing range expansion across large oceanic dispersal barriers: insights from tropical Atlantic reef fishes." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences DOI: 10.1098/rspb.2011.1525.
- Lunt DH, LE Whipple et BC Hyman (1998). "Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology." Molecular Ecology **7**: 1441-1455.
- Mantel NA (1967). "The detection of disease clustering and generalized regression approach." Cancer Research. **27**: 209-218.
- Maruyama T et PA Fuerst (1985). "Population bottlenecks and non equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck." Genetics **111**: 675-689.
- Mc Farland WN, EB Brothers, JC Ogden, MJ Shulman, E Bermingham et Kotchian-Prentiss (1985). "Recruitment patterns in young french grunts *Haemulon flavolineatum* (Family Haemulidae) at St. Croix, Virgin Islands." Fisheries Bulletin **83**: 413-426.
- McCusker MR et P Bentzen (2010). "Historical influences dominate the population genetic structure of a sedentary marine fish, Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*), across the North Atlantic Ocean." Molecular Ecology **19**(19): 4228-4241.
- McMillan WO et SR Palumbi (1997). "Rapid rate of control-region evolution in Pacific butterflyfishes (Chaetodontidae)." Journal of Molecular Evolution **45**(5): 473-484.
- Muss A, DR Robertson, CA Stepien, P Wirtz et BW Bowen (2001). "Phylogeography of *Ophioblennius*: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution." Evolution **55**(3): 561-572.
- Nagelkerken I, G van der Velde, MW Gorissen, GJ Meijer, T van't Hof et C den Hartog (2000). "Importance of mangroves, seagrass beds and the shallow coral reef as a nursery for important coral reef fishes, using a visual census technique." Estuarine Coastal and Shelf Science **51**(1): 31-44.
- Nei M (1978). "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals." Genetics **89**: 583-590.
- Nei M (1987). Molecular evolutionary genetics. New York, Columbia University Press.512.

- Nelson JS (2006). Fishes of the world. New Jersey, Jhon Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Nielsen JE, P Koefoed, K Abell, L Hasholt, H Eiberg, K Fenger et al (1997). "CAG repeat expansion in autosomal dominant pure spastic paraplegia linked to chromosome 2p21-p24." Human Molecular Genetics **6**:1811-1816.
- O'Reilly PT, MF Canino, KM Bailey et P Bentzen (2004). "Inverse relationship between F_{ST} and microsatellite polymorphism in the marine fish, walleye pollock (*Theragra chalcogramma*): implications for resolving weak population structure." Molecular Ecology **13**(7): 1799-1814.
- Ohta T et M Kimura (1973). "A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population." Genetic Research **22**: 201-204.
- Ovenden JR et R Street (2003). "Genetic population structure of mangrove jack, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal)." Marine and Freshwater Research **54**(2): 127-137.
- Palumbi SR (2003). "Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves." Ecological Applications **13**(1): 146-158.
- Paris CB, RK Cowen, R Claro et KC Lindeman (2005). "Larvae transport pathways from Cuban snapper (*Lutjanidae*) spawning aggregations based on biophysical modeling." Marine Ecology Progress Series **269**: 93-106.
- Planes S (1998). "Genetic diversity and dispersal capabilities in marine fish." Evolutionary Biology **30**: 253-298.
- Planes S, F Bonhomme et R Galzin (1993). "Genetic structure of *Dascyllus aruanus* populations in French Polynesia." Marine Biology **117**(4): 665-674.
- Planes S, PJ Doherty et G Bernardi (2001). "Strong genetic divergence among populations of a marine fish with limited dispersal, *Acanthochromis polyacanthus*, within the great barrier reef and the coral sea." Evolution **55**: 2263-2273.
- Planes S et C Fauvelot (2002). "Isolation by distance and vicariance drive genetic structure of a coral reef fish in the pacific ocean." Evolution **56**: 378-399.
- Planes S, R Galzin et F Bonhomme (1996). "A genetic metapopulation model for reef fishes in oceanic islands: The case of the surgeonfish, *Acanthurus triostegus*." Journal of Evolutionary Biology **9**(1): 103-117.
- Planes S, GP Jones et SR Thorrold (2009). "Larval dispersal connects fish populations in a network of marine protected areas." Proceedings of the National Academy of Sciences USA **106**(14): 5693-5697.
- Poey F (1860). Memorias sobre la historia natural de la Isla de Cuba, acompañadas de sumarios Latinos y extractos en Francés. Havana, Barcina y Compañía.
- Poey F (1868). Ictiología cubana. La Habana, Imagen Contemporánea.515.
- Posada D (2008). "jModelTest: Phylogenetic Model Averaging." Molecular Biology and Evolution **25**: 1253-1256.
- Posada D et KA Crandall (2001). "Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks." Trends in Ecology & Evolution **16**(1): 37-45.
- Pritchard JK, M Stephens et P Donnelly (2000). "Inference of population structure using multilocus genotype data." Genetics **155**: 945-959.
- Purcell JFH, RK Cowen, CR Hughes et DA Williams (2006). "Weak genetic structure indicates strong dispersal limits: a tale of two coral reef fish." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **273**(1593): 1483-1490.

- Purcell JFH, RK Cowen, CR Hughes et DA Williams (2009). "Population structure in a common Caribbean coral-reef fish: implications for larval dispersal and early life-history traits." Journal of Fish Biology **74**(2): 403-417.
- Ramos-Onsins SE et J Rozas (2002). "Statistical properties of new neutrality tests against population growth." Molecular Biology and Evolution **19**: 2092-2100.
- Randall JE (1961a). "A contribution to the biology of the convict surgeonfish of the Hawaii Islands, *Acanthurus triostegus sandvicensis*." Pacific Science **15**: 215-272.
- Randall JE (1961b). "Observations of the spawning of surgeonfishes (Acanthuridae) in the Society Islands." Copeia **2**: 237-238.
- Randall JE (1962). "Tagging reef fishes in the Virgin Islands." Annual Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute **14**: 201-241.
- Reeson PH (1983). The biology, ecology and bionomics of the surgeonfishes, Acanthuridae. In: Caribbean coral reef fishery resources. ICLARM studies and Reviews. J. L. Munro (Ed.) Manila, Philippines, International Center for Living Aquatic Resources Management: 276.
- Rice WR (1989). "Analyzing tables of statistical tests." Evolution. **43**(1): 223-225.
- Riginos C et MW Nachman (2001). "Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*." Molecular Ecology **10**(6): 1439-1453.
- Riginos C et BC Victor (2001). "Larval spatial distributions and other early life-history characteristics predict genetic differentiation in eastern Pacific blennioid fishes." Proceedings of the Royal Society of London Series B **268**(1479): 1931-1936.
- Robainas A (2004). Genética poblacional del camarón rosado *Farfantepenaeus notialis* (Decapoda: Penaeidae): variación espacio temporal de la diversidad y la estructura genética. La Habana, University of Havana, Cuba. **PhD Thesis**.
- Robainas A, G Espinosa, D Hernández et E García-Machado (2005). "Temporal variation of the population structure and genetic diversity of *Farfantepenaeus notialis* assessed by allozyme loci." Molecular Ecology **14**: 2933-2942.
- Robertson D, F Karg, RL De Moura, BC Victor et G Bernardi (2006). "Mechanisms of speciation and faunal enrichment in Atlantic parrotfishes." Molecular Phylogenetics and Evolution **40**(3): 795-807.
- Robertson DR (1985). Sexual-size dimorphism in surgeonfishes. Proceedings of the 5th International Congress on Coral Reefs **5**: 403-408.
- Robertson DR (1988). "Abundances of surgeonfishes on patchreefs in Caribbean Panama: due to settlement, or post-settlement events." Marine Biology **97**: 495-501.
- Robertson DR (1990). "Differences in the seasonalities of spawning and recruitment of some small neotropical reef fishes." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **144**: 49-62.
- Robertson DR (1992). "Patterns of lunar settlement and early recruitment in Caribbean reef fishes at Panama." Marine Biology **114**: 527-537.
- Robertson DR, JL Ackerman, JH Choat, JM Posada et J Pitt (2005). "Ocean surgeonfish *Acanthurus bahianus*. I. The geography of demography." Marine Ecology Progress Series **295**: 229-244.

- Robertson DR, DG Green et BC Victor (1988). "Temporal coupling of production and recruitment of larvae of a caribbean reef fish." Ecology **69**(2): 370-381.
- Rocha LA, AL Bass, DR Robertson et BW Bowen (2002). "Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic surgeonfishes (Teleostei: Acanthuridae)." Molecular Ecology **11**: 243-252.
- Rocha LA, DR Robertson, CR Rocha, JL Van Tassell, MT Craig et BW Bowens (2005a). "Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish." Molecular Ecology **14**(13): 3921-3928.
- Rocha LA, DR Robertson, J Roman et BW Bowen (2005b). "Ecological speciation in tropical reef fishes." Proceedings of the Royal Society of London Series B **272**(1563): 573-579.
- Rocha LA, CR Rocha, DR Robertson et BW Bowen (2008) "Comparative phylogeography of Atlantic reef fishes indicates both origin and accumulation of diversity in the Caribbean." BMC Evolutionary Biology **8**, 16 DOI: 10.1186/1471-2148-8-157.
- Roff DA et P Bentzen (1989). "The statistical analysis of mitochondrial Dna polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples." Molecular Biology and Evolution **6**(5): 539-545.
- Rogers AR et H Harpending (1992). "Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences." Molecular Biology and Evolution **9**(3): 552-569.
- Rousset F (2008). "genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux." Molecular Ecology Resources **8**(1): 103-106.
- Ruzzante DE, CT Taggart, S Lang et D Cook (2000). "Mixed-stock analysis of Atlantic cod near the Gulf of St. Lawrence based on microsatellite DNA." Ecological Applications **10**(4): 1090-1109.
- Sale PF (1970). "Distribution of larval Acanthuridae off Hawaii." Copeia **4**: 765-766.
- Sale PF (2004). "Connectivity, recruitment variation, and the structure of reef fish communities." Integrative and Comparative Biology **44**(5): 390-399.
- Sambrook J, EF Fritsch et T Maniatis (1989). Molecular Cloning - a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schiffer M, WJ Kennington, AA Hoffmann et MJ Blacket (2007). "Lack of genetic structure among ecologically adapted populations of an Australian rainforest *Drosophila* species as indicated by microsatellite markers and mitochondrial DNA sequences." Molecular Ecology **16**(8): 1687-1700.
- Schlötterer C (1998). Microsatellites. In: Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach A. R. Hoelzel (Ed.), Oxford University Press, Oxford: 237-261.
- Schlötterer C (2000). "Evolutionary dynamics of microsatellite DNA." Chromosoma **109**: 365-371.
- Schlueter MA (1998). Population Genetic Structure and Gene Flow Within Three Coral Reef Fish Species in the Florida Keys: Dissertation Abstracts International Part B Science and Engineering **1958**: 5239.
- Schmale MC (1981). "Sexual selection and reproductive success in males of the bicolor damselfish, *Eupomacentrus partitus* (Pisces, Pomacentridae)." Animal Behavior **29**: 1172-1184.
- Schug MD, TFC Mackay et CF Aquadro (1997). "Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*." Nature Genetics **15**: 99-102.

- Schultz JK, KA Feldheim, SH Gruber, MV Ashley, TM McGovern et BW Bowen (2008). "Global phylogeography and seascape genetics of the lemon sharks (genus *Negaprion*)." Molecular Ecology **17**(24): 5336-5348.
- Schwarz G (1978). "Estimating the dimension of a model." Annals of Statistics **6**(2): 461-464.
- Shaklee JB et PB Samollow (1984). "Genetic variation and population structure in a spiny lobster, *Panulirus marginatus*, in the Hawaiian Archipelago." Fishery Bulletin **82**(4): 693-702.
- Shulman MJ et E Bermingham (1995). "Early life histories, ocean currents, and the population genetics of Caribbean reef fishes." Evolution **49**(5): 897-910.
- Smith CL (1997). National Audubon Society field guide to tropical marine fishes of the Caribbean, the Gulf of Mexico, Florida, the Bahamas, and Bermuda. Alfred A. Knopf, Inc., New York.
- Sponaugle S et RK Cowen (1996a). "Larval supply and patterns of recruitment for two caribbean reef fishes, *Stegastes partitus* and *Acanthurus bahianus*." Marine and Freshwater Research **47**: 433-447.
- Sponaugle S et RK Cowen (1996b). "Nearshore patterns of larval supply to Barbados, West Indies." Marine Ecology Progress Series **133**: 13-28.
- Sponaugle S, J Fortuna, K Grorud et T Lee (2003). "Dynamics of larval fish assemblages over a shallow coral reef in the Florida Keys." Marine Biology **143**: 175-189.
- Stobutski I et D Bellwood (1994). "An analysis of the sustained swimming abilities of pre- and post-settlement coral reef fishes." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **175**: 275-286.
- Swearer SE, JE Caselle, DW Lea et RR Warner (1999). "Larval retention and recruitment in an island population of a coral-reef fish." Nature **402**(6763): 799-802.
- Swearer SE, JS Shima, ME Hellberg, SR Thorrold, GP Jones, DR Robertson, SG Morgan, KA Selkoe, GM Ruiz et RR Warner (2002). "Evidense of self-recruitment in demersal populations." Bulletin of Marine Science **70**: 251-271.
- Tajima F (1989). "Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism." Genetics **123**: 585-595.
- Tamura K, J Dudley, M Nei et K S (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 " Molecular Biology and Evolution **24**: 1596-1599.
- Tautz D (1993). Notes on the defunction and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences In: DNA Fingerprinting: State of the Science S. D. J. Pena, et. al. (Ed.), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland 21-28.
- Taylor MS et ME Hellberg (2005). "Marine radiations at small geographic scales: speciation in neotropical reef gobies (*Elacatinus*)." Evolution **59**: 374-385.
- Taylor MS et ME Hellberg (2006). "Comparative phylogeography in a genus of coral reef fishes: biogeographic and genetic concordance in the Caribbean." Molecular Ecology **15**(3): 695-707.
- Templeton AR (2006). Population genetics and microevolutionary theory. Hoboken, New Jersey, John Wiley and Sons, Inc 681.
- Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ et Gill P (1994). "Variation in short tandem repeat sequences: a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers." International Journal of Legal Medicine **107**: 13-20.

- Valdes-Muñoz E et AD Mocheke (1994). Estructura etológica de las comunidades de peces. In: Ecología de los peces marinos de Cuba. R. Claro (Ed.) Mexico, Centro de Investigaciones de Quintana Roo, CIQR: 493.
- Väli Ü, A Einarsson, L Waits et H Ellegren (2008). "To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations?" Molecular Ecology **17**: 3808–3817.
- Van Oosterhout C, WF Hutchinson, DPM Wills et P Shipley (2004). "Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data." Molecular Ecology Notes **4**(3): 535-538.
- Vawter AT, R Rosenblatt et GC Gorman (1980). "Genetic diversity among fishes of the eastern pacific and the Caribbena: support for the molecular clock." Evolution **34**: 705-711
- Verweij MC, I Nagelkerken, SLJ Wartenbergh, IR Pen et Gvd Velde (2006). "Caribbean mangroves and seagrass beds as daytime feeding habitats for juvenile French grunts, *Haemulon flavolineatum*." Marine Biology **149**: 1291-1299.
- Victoria del Rio I et I Penié (1998). Hidrología. In: Estudio nacional sobre la diversidad biológica en la República de Cuba. M. Vales, A. Alvarez, L. Montes et A. Avila (Eds.) La Habana, PNUMA/ CENBIO/ IES/ AMA/ CITMA: 117-125.
- Vigilant L, R Pennington, H Harpending, TD Kocher et AC Wilson (1989). "Mitochondrial DNA Sequences in Single Hairs from a Southern African Population" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**: 9350-9354.
- Villegas-Hernández H, C González-Salas, A Aguilar-Perera et MJ López-Gómez (2008). "Settlement dynamics of the coral reef fish *Stegastes partitus*, inferred from otolith shape and microstructure analysis." Aquatic Biology **1**: 249–258.
- Waldick RC, S Kraus et BN White (2002). "Evaluating the effects of historic bottlenecks events: an assesment of microsatellite variability in the endangered, North Atlantic right whale." Molecular Ecology **11**: 2241-2249.
- Walker D (1998). "Phylogeographic uniformity in mitochondrial DNA of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*)." Animal Conservation **1**: 55-60.
- Walsh PS, DA Metzger et R Higuchi (1991). "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material " BioTechniques **10**: 506–510.
- Waples R (1987). " A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes." Evolution **41**(2): 385-400.
- Waples RS (1998). "Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species." Genetics **89**: 438-450.
- Waples RS et O Gaggiotti (2006). "What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity." Molecular Ecology **15**(6): 1419-1439.
- Ward RD, M Woodwark et DOF Skibinsk (1994). "A comparison of genetic diversity levels in marine, fresh-water, and anadromous fishes." Journal of Fish Biology **44**: 213-232.
- Ward RH, A Redd, D Valencia, B Frazier et S Pääbo (1993). "Genetic and linguistic differentiation in the Americas." Proceedings of the National Academy of Science USA **90** 10663-10667.

- Waters JM, LH Dijkstra et GP Wallis (2000). "Biogeography of a southern hemisphere freshwater fish: how important is marine dispersal." Molecular Ecology **9**: 1815-1821.
- Watkins JC (2007). "Microsatellite evolution: Markov transition functions for a suite of models." Theoretical Population Biology **71**: 147-159.
- Weber J et J Brown (2009). "Using lessons learned from six years of reef fish spawning aggregation site validation, collaboration, and outreach in St. Croix, USVI." 61st Gulf and Caribbean Fisheries Institute **61**: 320-323.
- Weber JL et C Wong (1993). "Mutation of Human short tandem repeats. ." Human molecular Genetics **2**: 1123-1128.
- Weir BS et CC Cockerham (1984). "Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure." Evolution **38**: 1358-1370.
- Wellington GM et BC Victor (1989). "Planktonic larval duration of one hundred species of Pacific and Atlantic damselfishes (Pomacentridae) " Marine Biology **101**: 557-567.
- White C, KA Selkoe, J Watson, DA Siegel, DC Zacherl et RJ Toonen (2010). "Ocean currents help explain population genetic structure." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **277**(1688): 1685-1694.
- Williams DA, J Purcell, RK Cowen et CR Hughes (2004). "Microsatellite multiplexes for high-throughput genotyping of French grunts (*Haemulon flavolineatum* , Pisces: Haemulidae) and their utility in other grunt species." Molecular Ecology Notes **4**: 46-48.
- Williams DA, J Purcell, CR Hughes et RK Cowen (2003). "Polymorphic microsatellite loci for population studies of the bicolor damselfish, *Stegastes partitus* (Pomacentridae)." Molecular Ecology Notes **3**: 547-549.
- Williams DM et PF Sale (1981). "Spatial and temporal patterns of recruitment of juvenile coral reef fishes to coral habitats within "One Tree Lagoon", Great Reef Barrier." Marine Biology **65**: 245-253.
- Wilson AB (2006). "Genetic signature of recent glaciation on populations of a near-shore marine fish species (*Syngnathus leptorhynchus*)." Molecular Ecology **15**(7): 1857-1871.
- Wright S (1965). "The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regards to systems of mating." Evolution **19**: 395-420.
- Zaykin DV et AI Pudovkin (1993). "Two programs to estimate significance of X^2 values using pseudo-probability test." Journal of Heredity **84**: 152.
- Zink RM et GF Barrowclough (2008). "Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography." Molecular Ecology **17**: 2107-2121.

ANNEXES

Annexe 1. Valeurs des probabilités associées au test de déséquilibre de liaison par paire des locus microsatellites pour *Stegastes partitus* ($\alpha = 0,0083$ et 120 randomisations).

	GATA16	AAT40	AAC41
AAT40	0.88		
AAC41	0.44	0.54	
GATA40T	0.68	1.00	0.34

Annexe 2. Valeurs de χ^2 pour le test d'homogénéité des fréquences au cours du temps pour un fragment de la RNC de *S. partitus* (* : $p < 0,05$).

	χ^2	P
Ilot Avalos	31.41	0.16
La Bajada	30.14	0.56
Plage Baracoa	33.92	0.56

Annexe 3. Valeurs de χ^2 pour le test d'homogénéité des fréquences au cours du temps pour 6 locus microsatellite de *H. flavolineatum* (**: $p < 0,01$).

	AAC3	AAC10	AAC37	AAC41	AAC43	AAC46
Ilot Avalos	15.51**	21.03	16.92	18.31	19.68	22.36
La Bajada	14.07	19.68	14.07	19.68	21.03	27.59
Plage Baracoa	12.59	25.00	18.31	15.51	21.03	25.00

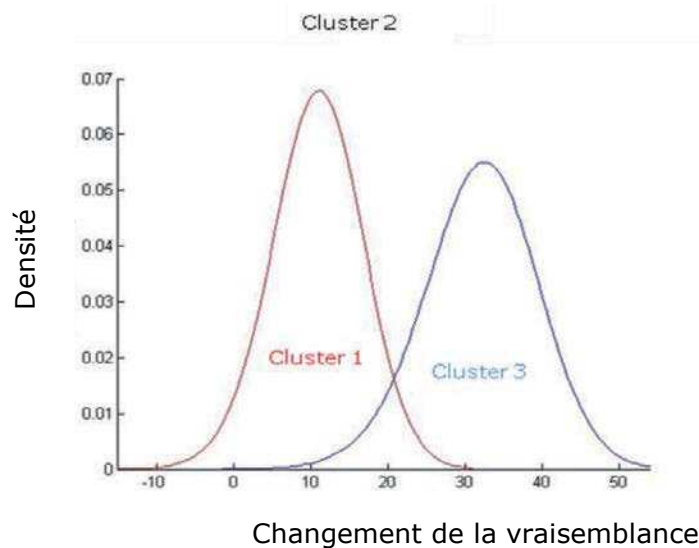
Annexe 4. Valeurs de probabilités associées au test de déséquilibre de liaison par paire de locus microsatellites pour *Haemulon flavolineatum* ($\alpha = 0,0033$ et 300 randomisations).

	AAC3	AAC10	AAC37	AAC41	AAC43
AAC10	0.360				
AAC37	0.483	0.783			
AAC41	0.047	0.677	0.067		
AAC43	0.363	0.397	0.180	0.070	
AAC46	0.140	0.823	0.583	0.543	1.000

Annexe 5. Valeurs de χ^2 pour le test d'homogénéité des fréquences au cours du temps pour un fragment de la RNC de *H. flavolineatum* (* : $p < 0,05$).

	χ^2	p
Ilot Avalos	43,77	0,91
La Bajada	43,77	0,19
Plage Baracoa	47,40	0,04*

Annexe 6. Changement de la vraisemblance marginal du « mixture clustering model » qui a lieu lorsque les individus sont resitués du cluster source (cluster 2) aux clusters cibles (clusters 1 et 3).



Annexe 7. A. tractus. Valeurs de la statistique S_{nn} obtenues pour le locus *cytb* et les localités d'échantillonnage prises deux à deux en utilisant tous les individus. Toutes les valeurs sont non significatives, $p > 0,05$.

	Ilot Breton	Ilot Avalos	La Bajada	Plage Baracoa
Ilot Avalos	0,47			
La Bajada	0,44	0,52		
Baracoa	0,44	0,51	0,44	
Ilot Coco	0,44	0,45	0,50	0,49

Annexe 8. Valeurs de la statistique χ^2 obtenues chez *H. flavolineatum* pour la comparaison des fréquences haplotypiques entre les localités d'échantillonnage prises deux à deux. Toutes les valeurs sont non significatives, $p > 0,05$.

	Ilot Breton	Ilot Avalos	La Bajada	Plage Baracoa
Ilot Avalos	58,19			
La Bajada	47,07	55,86		
Baracoa	56,77	59,81	52,48	
Ilot Coco	40,27	43,32	39,62	35,69

Annexe 9. Amorces d'amplification et séquençage utilisés pour l'étude des populations de *S. partitus*, *H. flavolineatum* et *A. tractus* dans 5 localités de l'archipel cubain.

LOCUS	ESPECES	AMORCES
RNC	Communs	CR-A 5' - AATTCTCACCCCTAGCTCCCAAAG -3'
		CR-E 5' - CCTGAAGTAGGAACCAGATG -3'
	<i>Stegastes partitus</i>	CRAint 5' - CTATTCTCTGTCCGAGATCTGC-3'
		CREint 5' - TGCCAGGAATAGATCACTAAGTG -3'
		RNC-Bf 5' - TTAAAGTAGGGCATTCAAGA -3'
	<i>Haemulon flavolineatum</i>	RNC-Br 5' - AACTGATGGTCGGTTCTTACTACAT -3'
		Hf Aintf 5'- TCACCCCTAGCTCCCAAAGCC-3'
		Hf Eintr 5'- CCAGATGCCAGGAATAGTGC 3'
		Hf 189f 5'- TGAGTGCCAGGAAATCGAATA 3'
		Hf 226r 5'- TACTCGTGAGGGTGTTTTACT 3'
	<i>Acanthurus tractus</i>	Abint1F 5' -CACCCCTAGCTCCCAAAGC 3'
		Abint1R 5' -AGGAACCAGATGCCAGGA3'
		Abint2F 5' -GTATTCTTCATTAATACTATT 3'
		Abint2R 5' -AGGAACCAGATGCCAGGA-3'
	Cytb	<i>Acanthurus tractus</i>
CB3 5' -GGCAAATAGGAARTATCATTC-3'		

Ce travail est l'objet d'une publication accepté sous conditions de modifications dans la revue *Marine Biology*

The surgeonfish, *Acanthurus bahianus*, has crossed the Amazon – Orinoco outflow barrier.

Jessy Castellanos-Gell^{a,b}, Aymée Robainas-Barcia^{a*}, Didier Casane^b, Pedro Chevalier-Monteagudo^c, Fabián Pina-Amargós^d and Erik García-Machado^a.

a Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, Calle 16, No. 114 entre 1ra y 3ra, Miramar, Playa, Ciudad Habana 11300, Cuba

b Laboratoire Evolution Génomes et Spéciation, UPR9034 CNRS, Université Paris-Diderot and Université Paris-Sud, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

c Acuario Nacional de Cuba, Calle 60, Miramar, Playa, Ciudad Habana 11300, Cuba.

d Centro de Investigaciones de Ecosistemas Costeros, Cayo Coco, Morón, Ciego de Ávila, CP 69 400, Cuba.

*: Present address: Universidad de Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, España.

Corresponding author: Erik García-Machado

Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana,
Calle 16, No. 114 entre 1ra y 3ra, Miramar, Playa, Ciudad Habana
11300, Cuba.

Email: egarcia@cim.uh.cu

Running title: *Acanthurus bahianus* crossed the Amazon outflow barrier.

Keywords

Acanthurus bahianus, *Acanthurus tractus*, Amazon-Orinoco barrier, Caribbean, cytochrome *b*, dispersal, mitochondrial DNA, reef fish

Aymée Robainas-Barcia and Jessy Castellanos-Gell contributed equally to this work.

Abstract

Dispersal varies among species according to different biological and environmental factors. It is known that there is strong genetic subdivision within the Ocean Surgeonfish, (*Acanthurus tractus*) and the Barber Surgeonfish (*Acanthurus bahianus*), in the Caribbean and southern Atlantic biogeographic provinces with relation to the Amazon-Orinoco outflows. We analysed *cytb* gene sequence diversity from 149 individuals collected at five localities around Cuba between October, 2006 and February, 2010. As expected, most individuals had haplotypes identical or closely related to those previously reported for the Caribbean. However, South Atlantic lineage haplotypes were also found in all surveyed localities with frequencies around 5%. This finding suggests that *A. bahianus* has dispersed in recent times across the Amazon-Orinoco barrier, probably because environmental perturbations have aided dispersal.

Introduction

The ability of marine species to disperse during different life stages, and how this influences the geographic structure of natural populations, has been one of the most important issues in marine ecology and biodiversity studies (Muss et al. 2001; Lubchenco et al. 2003; Rocha et al. 2008). However, direct and accurate estimates of dispersal are hard to obtain because many physical and biological factors impede observations of this process (Hellberg 2007). In this sense, population genetic analyses have been of the utmost importance in inferring the dynamics, dispersal patterns and connectivity of populations (Palumbi 2003; Purcell et al. 2006; Rocha et al. 2008). For example, a study of three Atlantic surgeonfishes (*Acanthurus bahianus*, *A. coeruleus* and *A. chirurgus*), distributed throughout the tropical western Atlantic from North America to southern Brazil, showed that different habitat preferences and sensitivities to ecological conditions could explain the contrasting levels of population genetic subdivision in these three species across the Amazon-Orinoco outflow barrier (Rocha et al. 2002). *A. chirurgus* shows unrestricted gene flow between both regions, while *A. coeruleus* has an intermediate condition (*i.e.* statistically significant genetic differentiation but no reciprocal monophyly). In contrast, there is strong genetic subdivision within *A. bahianus* with endemic haplotypes in the Caribbean and South Atlantic biogeographic province. Based on caudal and dorsal fin colour differences and genetic distances, Bernal and Rocha (2011) proposed that the Caribbean and the South Atlantic lineages of *A. bahianus* are different species, and they suggested the use of the name *A. tractus* proposed by Poey (Poey 1860) for the Caribbean lineage. We have analysed the genetic diversity of *A. tractus* around Cuba. In this paper we provide evidence for the occurrence of the South Atlantic lineage (*i.e.* *A. bahianus* Bernal and Rocha, 2011) on Cuban reefs.

Materials and Methods

Sample collection and DNA processing

A total of 149 adult fish (males and females) previously recognized as *Acanthurus bahianus* Castelnau, 1855 (Castelnau 1855) (but recently *Acanthurus tractus* Poey, 1860) were collected from five localities around Cuba between October, 2006 and February, 2010. The sample sites were: Avalos Key, Los Canarreos Archipelago (n =

42); La Bajada, Guanahacabibes peninsula (n = 26); Baracoa beach, northwest Havana (n = 23); Breton Key, Jardines de la Reina Archipelago (n = 25); and Coco Key, Jardines del Rey Archipelago (n = 33) (Fig.1). Samples were collected using a polespear while snorkelling or scuba diving. Immediately after capture fin clips were stored in 95% ethanol.

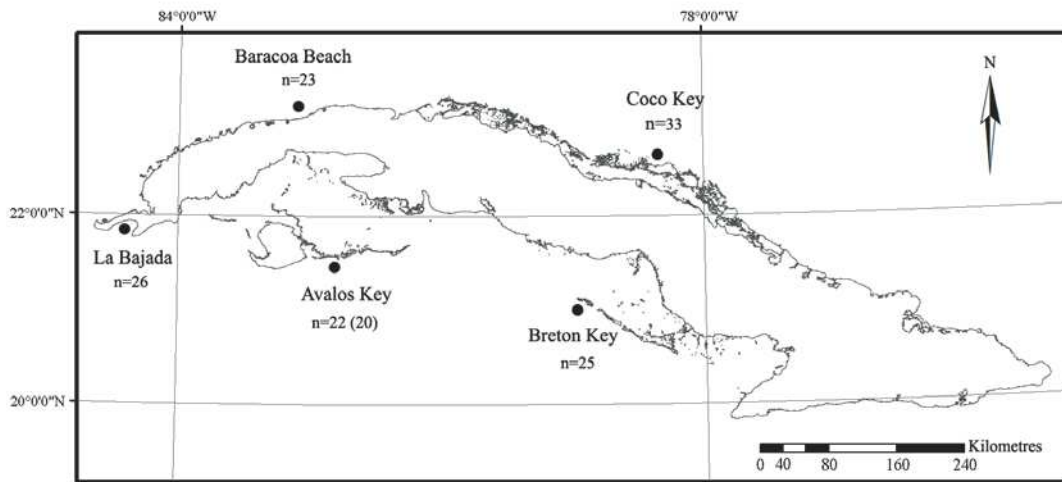


Figure 1. Location of sampling sites of *Acanthurus tractus/bahianus* around Cuba.

Total DNA was extracted by proteinase K digestion and phenol/chloroform extraction using the Phase Lock Gel kit (Eppendorf). The primers Glufish 5'-CCAATGACTTGAARAACCA YCGTTG-3', modified from GluDGL (Meyer et al. 1990), and CB3 5'-GCCAAATAGGAARTATCATTC-3' (Palumbi 1996) were used to amplify 830bp of the cytochrome b gene (*cytb*). Polymerase chain reactions (PCRs) were carried out in 50 μ l reaction volume with 5 ng to 100 ng of genomic DNA containing 1 unit of GoTaq DNA polymerase (Promega), 0.2 μ M of each primer, 0.2 nM of dNTPs, and 1.5 mM MgCl₂. The reaction profile was 94°C for 3 min for initial denaturing, followed by 40 cycles at 94°C for 45 s, 50°C for 1 min, 72°C for 1:30 min and a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were purified using the NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel), and cycle-sequenced in both directions, using an ABI Prism Big Dye terminator sequencing kit V.3 (Applied Biosystems). The fragments were resolved with an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems). The sequences of selected haplotypes were deposited in GenBank: accession numbers FJ905179 and FJ905180. The complete data set is available from the authors on request.

DNA data analysis

Sequences were edited using Bioedit 7.0.8.0 (Hall 1999) and aligned with the ClustalX alignment method using MEGA 5.04 (Tamura et al. 2011). The length of the analysed sequences was restricted to 608 bp in order to identify the haplotypes with respect to those previously defined by Rocha et al. (2002). The substitution model used in the phylogenetic analysis was the Tamura and Nei (1993) substitution matrix with a gamma distribution of substitution rate variation across sites (TrN + Γ with $\alpha = 0.259$) as suggested by the Bayesian Information Criterion (BIC) (Schwarz 1978) implemented in jModelTest version 0.1.1 (Guindon and Gascuel 2003; Posada 2008). The neighbor joining (NJ) method was used to estimate the phylogenetic tree. The robustness of the nodes was assessed by bootstrap with 1,000 replicates. The available sequences of the species *A. bahianus* (accession numbers AY029306 and AY029307) and *A. tractus* (accession numbers AY029308 and AY029309) were included in the analysis. Additionally, the sequences of *A. chirurgus* (AY029304 and AY029305) and *A. coeruleus* (AY029311) were included as outgroups.

Haplotype relationships were represented by a network constructed using the program Network 4.5.1.6 software (Fluxus Technology). The network was obtained by applying the Median Joining (MJ) network algorithm (Bandelt et al. 1999), and was post processed using maximum parsimony calculations to reduce the number of superfluous network links.

Results

The 608 bp of the mtDNA *cytb* gene fragment analysed from Cuban samples had a total of 74 polymorphic sites, all at third codon positions, and a total of 61 haplotypes for the 149 sequenced individuals.

The NJ tree inferred with the *cytb* sequences is shown in Fig. 2A. The Cuban sequences belong to two clades. The first is comprised of most of the individuals ($n = 142$) as well as the Caribbean haplotypes ABA1 and ABA2 representing *A. tractus*. The second one is comprised of seven sequences and the haplotypes ABA3 and ABA4 representing the species *A. bahianus*, which previous studies have only detected in the South Atlantic (Rocha et al. 2002; Bernal and Rocha 2011).

The relationships among the *cytb* haplotypes from Cuban localities further support the existence of two major haplotype groups separated by 9 mutational changes (eight transitions and one transversion) (Fig. 2B).

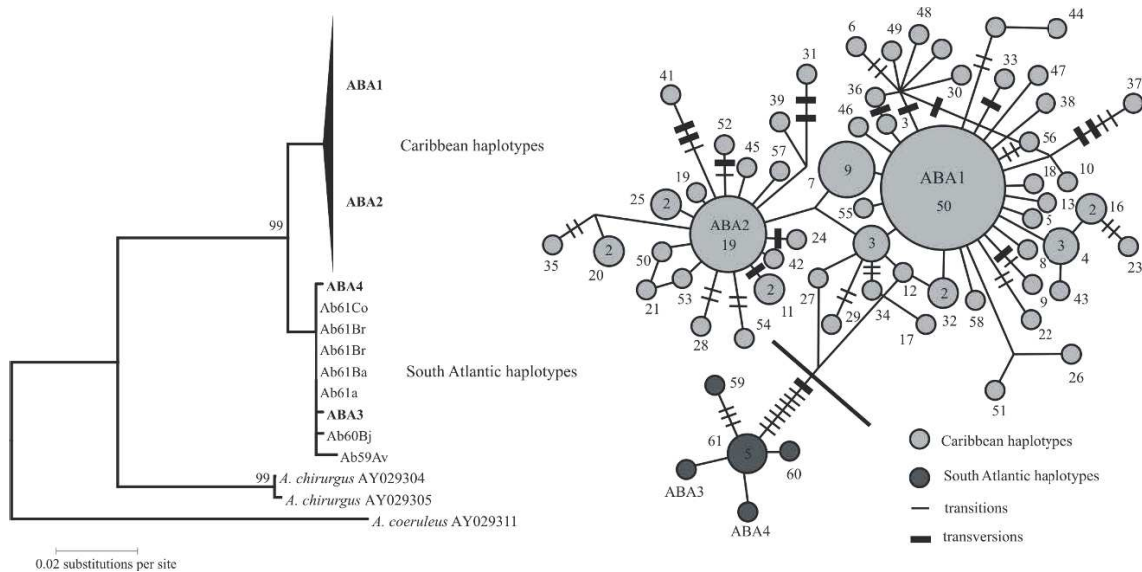


Figure 2. A) Phylogenetic tree showing the relationships among Caribbean and Brazilian haplotypes of *A. tractus/bahianus* with other atlantic acanthurids. Av: Avalos key; Ba: Baracoa beach; Bj: La Bajada; Br: Breton key; Co: Coco key. B) *Acanthurus tractus* and *A. bahianus* Maximum Parsimony network of *cytb* haplotypes found around Cuba. Numbers inside circles indicate number of individuals excepted for haplotypes found in only one individual. Numbers outside circles correspond to haplotype identification. ABA1, ABA2, ABA3 and ABA4 haplotypes were available from Genebank (Rocha et al. 2002). Network branches correspond to one mutation unit except when indicated by slashes. Southern haplotypes were distributed as follow: 59 from Av; 60 from Bj; 61 from Co, Br and Ba.

The first group contains two common haplotypes which correspond to haplotypes ABA1 and ABA2. These haplotypes were found in 50 and 19 individuals respectively (Supplementary material 1), and appear to represent the diversification cores of *A. tractus* mtDNA haplotypes. Among the other haplotypes, eight were found in two to nine individuals and 48 were found in only one individual. The average number of nucleotide differences within this cluster was $k = 2.93 \pm 0.034$. The haplotypes from this group were identified as At-C1 to At-C58.

The second Cuban group comprised three haplotypes connected by one to four transitions substitutions to haplotypes ABA3 and ABA4 (Fig. 2B). Of the 3 haplotypes, one was present in 5 of the 7 individuals (Supplementary material 1), and was distributed among the sampled localities. The average number of nucleotide differences within this cluster (excluding haplotypes ABA3 and ABA4) was $k = 1.143 \pm 0.182$. The mean genetic distance estimated between groups ($d = 0.020 \pm 0.006$) was roughly the same as estimated previously by Rocha et al. (2002). Haplotype and nucleotide diversity estimates for *A. tractus* were relatively high $h = 0.856 \pm 0.026$ and $\pi = 0.0048 \pm 0.0003$. On the other hand the *A. bahianus* like clade was represented by only 3 haplotypes ($h = 0.524 \pm 0.209$ and $\pi = 0.0019 \pm 0.0009$) in Cuba.

Discussion

The mtDNA evidence

Compared to the other two species of the genus within the same area (*A. chirurgus* and *A. coeruleus*), *A. bahianus* and *A. tractus* appears highly sensitive to the ecological constraint imposed by the Orinoco-Amazon freshwater outflows (Rocha et al. 2002) and has been considered a textbook example of deep population structuring due to long evolutionary separation by a geographic barrier (Fig 17.1 in Helfman et al. 2009). Our analysis of *cytb* haplotype relationships of *A. tractus* from Cuba grouped seven Cuban individuals within the southern lineage with the ABA3 and ABA4 haplotypes described as the South Atlantic *A. bahianus* (Rocha et al. 2002). These haplotypes were separated by nine mutations from the second cluster that defines the resurrected *A. tractus* for the Caribbean (Bernal and Rocha 2011).

While our results do not negate previous results showing deep population structuring, the presence of mtDNA haplotypes from the southern region in the Caribbean (*i.e.* Cuba) suggests that *A. bahianus* may be able to overcome the Orinoco-Amazon freshwater outflow barrier. Our survey sample size is about four times larger (149 vs. 38) than that of Rocha et al. (2002). The southern haplotype individuals represent only about 5% of our sample, therefore these haplotypes may not be detected in a much smaller sample despite being widespread in the Caribbean.

Larval or adult dispersal

The juvenile and adult stages of both *A. bahianus* and *A. tractus* are highly vagile (Robertson et al. 2005). However, its paucity in deep and muddy sea beds and its

occurrence almost exclusively in shallow reefs have been considered major factors in explaining the isolation between the Caribbean and South Atlantic lineages of these species (Rocha et al. 2002). On the other hand, it lays pelagic eggs and the larvae have a planktonic phase of up to 69 days (Sponaugle and Cowen 1996). Both these characteristics are known to enhance opportunities for dispersal driven by marine currents (Muss et al. 2001). The widespread occurrence of *A. bahianus* from Brazil to the mid-Atlantic ridge, with no genetic differentiation, suggests that low salinity conditions around the Amazon-Orinoco outflow barrier are more effective at preventing larval dispersal than current patterns (Rocha et al. 2002).

Lessios and Robertson (2006) and Floeter et al. (2008) shed considerable light on this issue when they compared population structure and gene flow in several fish species from the Pacific and Atlantic Ocean. Both studies showed that there is no single shared pattern of genetic divergence and separation times between the populations of different species. This suggests that fish larvae may sporadically disperse through a barrier as a result of environmental fluctuations that eventually modify the effectiveness of the barrier. This appears also to apply for the Amazon-Orinoco barrier in the case of *A. bahianus*. The dispersal of *A. tractus* to the South Atlantic cannot be ruled out but it is less likely as the main current runs from south to the Caribbean. Nonetheless, this needs to be verified, as it is known that other species migrate across both sides of the barrier (Floeter et al. 2008; Rocha et al. 2008).

One or more dispersal events

The available data is insufficient to estimate the approximate time of the dispersal event to the Caribbean. The haplotypes identified in the present study have terminal and internal positions in the network (Fig. 2B) but they do represent just a small fraction of the diversity revealed by the previous study. However, as the number of nucleotide substitutions between the southern haplotypes found in Cuba and the available sequences of ABA3 and ABA4 haplotypes are small (one to four changes), it suggests that the migration of *A. bahianus* into the Caribbean region has occurred quite recently. The current haplotype distribution also suggests that at least one ancient colonization event occurred much earlier in the *A. bahianus* / *A. tractus* evolutionary history. If we assume the widely used divergence rate of 2% million years⁻¹ for estimating evolutionary time (Brown et al. 1979), the sequence divergence of $d = 2.0\%$ for the *cytb* gene between these two species indicates that they diverged about 1 million years ago,

well after the origin of the present configuration of the Amazon–Orinoco basin (*c.* 10 million years ago, Lovejoy et al. 1998). This suggests that a colonization event mediated by restricted dispersal across the established freshwater barrier, and probably associated with or followed by demographic reduction, explains the reciprocal monophyly and population divergence on each side of the barrier.

Final considerations

The occurrence of *A. bahianus* haplotypes in the Greater Caribbean biogeographic province gives further support to the faunal enrichment hypothesis (Robertson et al. 2006; Rocha et al. 2008). The color pattern identifying *A. bahianus* was not observed in the analyzed sample. However, its low frequency at the surveyed localities and the natural variation that have coloration tonalities of this species may lead them eventually undetected to a rapid inspection. During future sampling the collectors need to carefully examine the morphological difference that separates *A. tractus* and *A. bahianus* of the fish sampled to assess the match between them and genetic patterns. We suggest that further data (including nuclear DNA and color) are necessary to clarify *Acanthurus* speciation. In particular, we can ask the following question: is *Acanthurus bahianus* really present in the Caribbean or are these mtDNA haplotypes a result of ancient hybridization that led to introgression? Assessing whether these two species are interbreeding or simply coexisting in overlap areas is a crucial aspect of future work. Since the two lineages split around 1 million years ago, resolution of this situation would provide important information about how long it takes sister species to become fully reproductively isolated.

Acknowledgements

We thank Oscar Valmaña and Luis Sanchez for essential support in field work, and Gaspar González Sansón and Consuelo Aguilar Betancourt for the valuable discussions about the ecology of marine fish species. We thank Cushla Metcalfe for improving of the English of the manuscript. This study was partially financed by the Research Grant A4139-1 from the International Foundation for Science assigned to ARB and the Embassy of France in Cuba.

References

- Bandelt H-J, Forster P, Rohl A (1999) Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* **16**: 37-48.
- Bernal MA, Rocha LA (2011) *Acanthurus tractus* Poey, 1860, a valid western Atlantic species of surgeonfish (Teleostei, Acanthuridae), distinct from *Acanthurus bahianus* Castelnau, 1855. *Zootaxa* **2905**: 63-68.
- Brown WM, George M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1967-1971.
- Castelnau FL (1855) Poissons. In: Animaux nouveaux or rares recueillis pendant l'expédition dans les parties centrales de l'Amérique du Sud, de Rio de Janeiro a Lima, et de Lima au Para; exécutée par ordre du gouvernement Français pendant les années 1843 a 1847. Paris, Bertrand: xii-112.
- Floeter SR, Rocha LA, Robertson DR, Joyeux JC, Smith-Vaniz WF, Wirtz P, Edwards AJ, Barreiris JP, Ferreira CEL, Brito A, Falcon JM, Bowen BW, Bernadi G (2008) Atlantic reef fish biogeography and evolution. *J Biogeogr* **35**: 22-47.
- Guindon S and Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696–704.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**: 95-98.
- Helfman GS, Collette BB, Facey DE, Bowen BW (2009) The diversity of fishes. Biology, evolution and ecology. Oxford, Wiley-Blackwell.720.
- Hellberg M (2007) Footprints on water: the genetic wake of dispersal among reefs. *Coral Reefs* **26**: 463-473.
- Lessios HA, Robertson DR (2006) Crossing the impassable: genetic connections in 20 reef fishes across the Eastern Pacific barrier. *Proc R Soc Lond, B* doi10.1098/rspb.2006.3543.
- Lovejoy NR, Bermingham E, Martin AP (1998) Marine incursion into South America. *Nature* **396**: 421-422.
- Lubchenco JCSR, Gaines SD, Andelman S (2003) Plugging a hole in the ocean: The emerging science of marine reserves. *Ecol Appl* **13**: S170-S184.
- Meyer A, Kocher TD, Basasibwaki P, Wilson AC (1990) Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* **374**: 550-553.
- Muss A, Robertson DR, Stepien CA, Wirtz P, Bowen BW (2001) Phylogeography of *Ophioblennius*: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution* **55**: 561-572.
- Palumbi SP (2003) Population genetics, demographic connectivity and the design of marine reserves. *Ecol Appl* **13**: S146–S158.
- Palumbi SR (1996) Nucleic acids I: the polymerase chain reaction. In: Molecular systematics. D. M. Hillis, C. Moritz and B. K. Mable, Sunderland, MA: Sinauer Associates: 205–247.
- Poey F (1860) Memorias sobre la historia natural de la Isla de Cuba, acompañadas de sumarios Latinos y extractos en Francés. Habana, Barcina y Compañía.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* **25**: 1253-1256.
- Purcell JFH, Cowen RK, Hughes CR, William DA (2006) Weak genetic structure indicates strong dispersal limits: a tale of two coral reef fish. *Proc R Soc Lond, B* **273**: 1483-1490.

- Robertson DR, Ackerman JL, Choat JH, Posada JM, Pritt J (2005) Ocean surgeonfish *Acanthurus bahianus*. I. The geography of demography. *Mar Ecol Prog Ser* **295**: 229–244.
- Robertson DR, Karg F, Leao de Moura R, Victor BC, Bernardi G (2006) Mechanisms of speciation and faunal enrichment in Atlantic parrot fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**: 795-807.
- Rocha LA, Bass AL, Robertson DR, Bowen BW (2002) Adult habitat preferences, larval dispersal, and the comparative phylogeography of three Atlantic surgeonfishes (Teleostei: Acanthuridae). *Mol Ecol* **11**: 243-252.
- Rocha LA, Rocha CR, Robertson DR, Bowen BW (2008) Comparative phylogeography of Atlantic reef fishes indicates both origin and accumulation of diversity in the Caribbean. *BMC Evol Biol* **8**: 157 doi:10.1186/1471-2148-8-157.
- Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann of Stat* **6**: 461-464.
- Sponaugle S, Cowen RK (1996) Larval supply and patterns of recruitment for two Caribbean reef fishes, *Stegastes partitus* and *Acanthurus bahianus*. *Mar Freshwater Res* **47**: 433-447.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**: 512-526.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.

ABSTRACT

Dispersal of marine fishes mainly depends on passive transport of planktonic larvae driven by ocean currents. It allows populations to be connected through thousands of kilometers but also make them sensitive to factors limiting larval dispersion. In this regard it is known that there are several physical and biological factors that determine the distribution of marine species larvae and therefore population connectivity.

The present work aims to study the effects of geographic traits of Cuban archipelago and biological characteristics of reef fishes inhabiting it on the genetic structure of their populations. Three different species with distinct biological characteristics and broadly distributed within the Caribbean were selected: *Stegastes partitus*, *Haemulon flavolineatum* and *Acanthurus tractus*.

Individuals were sampled from five localities distributed around Cuba during the time period from 2005 to 2010. We analyzed mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism: a fragment of the non coding region (NCR) for the three species and *cytb* for *A. tractus*. The polymorphism of nuclear microsatellite loci was studied for *S. partitus* and *H. flavolineatum*.

Genetic diversity, assessed by means of H_o and H_e have high values when analysing microsatellite loci. These molecular markers revealed the presence of contrasting geographic structure patterns for the two species. Low but significant pairwise F_{ST} estimates were obtained for *S. partitus* while *H. flavolineatum* was genetically homogenous. These results were supported by mtDNA analyses. Likewise, *A. tractus* showed no evidence of significant genetic differentiation at the level of the NCR and *cytb* gene. Differences in population genetic structure of surveyed species could be the result of extant marine currents acting distinctly on species dispersion according to their reproductive behaviour (*i.e.* spawning sites, benthonic or pelagic eggs and capacity of larvae to staying close to the natal reef or being driven away from it).

Mitochondrial markers showed high levels of haplotypic diversity for the three species and contrasted nucleotide diversity, low for *S. partitus*, intermediate for *H. flavolineatum* and high for *A. tractus*. According to these observations and results of neutrality tests and mismatch distribution analyses, it is suggested that recent population expansion occurred in these species. However differences in population parameter estimations suggest that the time and the rate of population expansion were different for the different species.

The analysis of *A. tractus cytb* haplotype relationships grouped some Cuban individuals with two haplotypes previously described as *A. bahianus*. This latter species has been recently proposed as restrict to South Atlantic and separated from *A. tractus* by the Amazon-Orinoco outflow barrier. The presence of mtDNA haplotypes from the southern region in Cuba suggests that *A. bahianus* may be able to overcome this barrier.

RESUME

La dispersion des poissons des récifs coralliens dépend, pour une large part, de l'existence de larves pélagiques qui peuvent être transportées au sein des courants marins loin de la population source. De l'efficacité de ce transport dépendra l'existence de populations formant un continuum, plus ou moins connectées, tout le long des zones de récifs. Toutefois, ce phénomène de dispersion est complexe et il implique aussi d'autres facteurs, physiques et biologiques, qui influent sur la dispersion de ces organismes.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier les effets des caractéristiques géographiques de l'archipel cubain et de la biologie des espèces sur la structure génétique et la connectivité des populations de poissons de récifs en utilisant comme modèle trois espèces présentant des traits d'histoire de vie différents : *Stegastes partitus*, *Haemulon flavolineatum* et *Acanthurus tractus*.

Nous avons échantillonné des individus adultes dans cinq localités situées autour de l'archipel cubain pendant la période 2005-2010. Le polymorphisme de marqueurs microsatellites a été étudié chez *S. partitus* et *H. flavolineatum*, celui de la région non codante de l'ADNmt chez les trois espèces et celui du gène *cytb* chez *A. tractus*.

L'analyse de la diversité génétique des locus microsatellites révèle des taux d'hétérozygotie observés (H_o) et attendus (H_e) élevés à chaque locus et pour les deux espèces, mais elles présentent différents patrons d'organisation de la diversité génétique. Chez *S. partitus*, la comparaison des localités prises deux à deux nous montre une différenciation exprimée par des valeurs de F_{ST} très faibles mais significatives, alors que chez *H. flavolineatum* aucune structuration géographique n'est observée. Ces résultats sont confirmés au niveau de l'ADN mitochondrial, lequel indique aussi une absence de différenciation d'*A. tractus* pour l'ensemble des localités étudiées. Les différences de structuration génétique des espèces étudiées pourraient être le résultat des effets des courants marins autour de l'île qui agissent de façon différente sur la dispersion des espèces en fonction de leur comportement reproducteur (e.g. sites de fraie, œufs pélagiques ou benthiques et capacité des larves de rester près des récifs natals ou d'être transportés au loin).

Pour les marqueurs mitochondriaux, nous avons obtenu des valeurs élevées de diversité haplotypique pour les trois espèces, mais la diversité nucléotidique est très différente selon les espèces, faible chez *S. partitus*, grande chez *H. flavolineatum*, et très grande chez *A. tractus*. La distribution du nombre de différences entre les séquences suggère que ces populations sont passées par des périodes d'expansion démographique. Ceci est confirmé par les estimations des paramètres de tests de neutralité. Les paramètres caractérisant la croissance des populations qui ont été obtenus pour les trois espèces ne sont pas semblables, ce qui suggère que le temps et l'ampleur des événements d'expansion ont été différents pour les trois espèces.

L'analyse du gène *cytb* nous a permis d'identifier des haplotypes chez *A. tractus* qui n'avaient été observés préalablement que chez *A. bahianus*. L'aire de répartition de cette dernière espèce a été récemment restreinte à l'Atlantique Sud sur la base de la divergence génétique avec *A. tractus* et de la séparation géographique qui est maintenue par la barrière que constitue l'embouchure des rivières Orénoque et Amazone. La présence d'haplotypes du sud à Cuba suggère que des individus du sud ont été capables de traverser cette barrière.