

# Délégation IFREMER océan Indien Station de La Réunion

Département Halieutique Méditerranéen et Tropical  
Laboratoire Ressources Halieutiques de la Réunion (RH)  
Programme PG11  
Projet « Evaluation des performances des AMP »

Delphine MUTHS  
Jérôme BOURJEA

Rapport Ifremer RST. Délégation Réunion/2010-01/06

## CAMP – CONNECTIVITE DES AIRES MARINES PROTEGEES

Période Mars 2009 – Février 2010  
Rapport Intermédiaire



Mai 2010

Document élaboré dans le cadre du projet CAMP



Mesure n°1.02 du volet Réunion du POCT OI 2007-2013

## Fiche documentaire

<b>Numéro d'identification du rapport :</b> RST. Délégation Réunion/2010-06 <b>Diffusion :</b> libre, restreinte, interdite <b>Validé par :</b> LE GOFF Ronan (Délégué Ifremer La Réunion) <b>Adresse électronique :</b> <a href="mailto:ronan.le.goff@ifremer.fr">ronan.le.goff@ifremer.fr</a>  Adresse Web : <a href="http://www.ifremer.fr/lareunion/">www.ifremer.fr/lareunion/</a>	<b>date de publication :</b> mars 2010 <b>nombre de pages :</b> 17 pages <b>bibliographie :</b> oui <b>illustration(s) :</b> 3 figures, 4 tableaux. <b>langue du rapport :</b> Français
<b>TITRE :</b>	
Rapport intermédiaire : <b>OUI/NON</b> Rapport définitif : <b>OUI/NON</b>	
<b>Auteur(s) principal(aux) :</b> Delphine MUTHS Jérôme BOURJEA	<b>Organisme / Direction / Laboratoire</b> IFREMER ; Délégation de La réunion ; Département halieutique méditerranéen et tropical ; Laboratoire halieutique de la Réunion.
<b>Collaborateurs :</b>  <b>Référés/relecture :</b> Ronan LE GOFF Emmanuel Tessier	<b>ORGANISME ET REALISATIONS :</b> IFREMER ; Délégation de La réunion ; Département halieutique méditerranéen et tropical ; Laboratoire halieutique de la Réunion.
<b>Cadre de la recherche :</b> Connectivité des Aires Marines Protégées du Sud-Ouest de l'Océan Indien: Etude de génétique des populations de poissons récifaux afin d'élaborer des aides à l'organisation du réseau des Aires Marines Protégées dans le sud ouest de l'océan Indien. (projet CAMP)	
<b>Mots-clés :</b> Aires marines protégées ; génétique ; connectivité ; poissons de récif ; échantillonnage ; Sud Ouest Océan Indien, connectivité	

**Résumé :**

L'objectif principal du projet CAMP (2009-2011) est d'estimer la connectivité effective entre les Aires Marines Protégées (AMP) du sud ouest de l'océan Indien (SOOI) par le biais de la génétique des populations de 3 modèles biologiques : *Epinephelus merra*, *Lutjanus kasmira* et *Myripristis berndti*. L'objectif final est de fournir des éléments de réflexion aux gestionnaires afin de contribuer significativement au dessin du réseau des AMPs dans le SOOI.

La première année du projet a été consacrée essentiellement à l'échantillonnage. Basé sur une coopération avec nos 5 partenaires nationaux et internationaux, cet échantillonnage a permis de collecter plus de 1100 échantillons de tissus de ces 3 espèces de poissons répartis dans 12 sites du SOOI.

Sur ces 1100 poissons, plus de 850 séquences d'ADN mitochondrial ont d'ores et déjà été effectuées. En parallèle, le développement des banques microsatellites pour les 3 espèces est en cours et devrait être disponible pour à la mi 2010.

La deuxième année du projet (2010) aura pour objectif de poursuivre l'échantillonnage sur l'ensemble du SOOI et de réaliser les analyses microsatellites des échantillons collectés en 2009 ainsi que les séquences des échantillons collectés en 2010. Au terme de cette deuxième année, une analyse de la structure génétique de ces populations de poissons de récifs pourra être menée, suivie en 2011 de l'élaboration d'aides à la gestion sur la base de l'ensemble des données acquises dans le cadre de ce projet.

**Abstract :**

The main aim of the CAMP project (2009-2011) is to estimate the efficient connectivity between the Marine Protected Areas (MPA) of the South-West Indian Ocean (SWIO). For that purpose, we use a population genetics approach on 3 reef fishes: *Epinephelus merra*, *Lutjanus kasmira* et *Myripristis berndti*. The overall goal of the project is to provide new elements to MPA managers that will contribute to design the best network of MPAs in the SWIO.

In the first year of the project, most of the time was spent to sample fishes. Based on collaborations with 5 international and national partners, we succeed to sample more than 1100 fishes within 12 sites of the SWIO.

More than 850 of the 1100 fishes were already sequenced. The development of third microsatellite libraries is under-going and should be available for the 2<sup>nd</sup> part of the year 2010.

The second year of the project (2010) will focus on the end of the sampling in the SWIO as well as doing most of the genetic analysis of the samples collected in 2009 (microsatellit analysis) and in 2010 (mtDNA sequencing).

At the end of the second year, we expect to be able to do a first regional analysis of the genetic structure of these reef fishes population. Then, in 2011, the project team will elaborate some recommendations to MPAs managers on the basis of the whole genetic dataset.

---

## **SOMMAIRE**

<b>1. CONTEXTE GENERAL DU PROJET CAMP</b>	<b>- 5 -</b>
1.1. CONTEXTE THEMATIQUE	- 5 -
1.2. ORGANISATION	- 5 -
<b>2. LES PARTENAIRES DU PROJET CAMP</b>	<b>- 8 -</b>
2.1. PARTENAIRES TECHNIQUES ET SCIENTIFIQUES NATIONAUX	- 8 -
2.2. PARTENAIRES TECHNIQUES ET SCIENTIFIQUES INTERNATIONAUX	- 8 -
<b>3. RAPPEL DES OBJECTIFS DE L'ANNEE 2009</b>	<b>- 9 -</b>
<b>4. ETAT D'AVANCEMENT DE L'ECHANTILLONNAGE 2009</b>	<b>- 10 -</b>
4.1. LES ESPECES ECHANTILLONNEES DANS LE CADRE DU PROJET	- 10 -
4.2. RAPPEL DE L'ORGANISATION DE L'ECHANTILLONNAGE	- 10 -
4.3. BILAN GLOBAL DE LA SAISON D'ECHANTILLONNAGE 2009	- 11 -
4.4. LE STOCKAGE DES DONNEES COLLECTEES	- 13 -
<b>5. LE VOLET GENETIQUE</b>	<b>- 14 -</b>
5.1. DEVELOPPEMENT DES MARQUEURS MICROSATELLITES	- 14 -
5.2. AVANCEMENT DES ANALYSES MITOCHONDRIALES	- 14 -
5.3. MISE EN PLACE D'UNE DEMARCHE QUALITE	- 15 -
<b>6. OBJECTIFS 2010</b>	<b>- 16 -</b>
6.1. ECHANTILLONNAGE / PLANNING PREVISIONNEL	- 16 -
6.2. ANALYSES DES ECHANTILLONS ET TRAITEMENT DES RESULTATS	- 16 -
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>- 17 -</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>- 17 -</b>

# 1. Contexte général du projet CAMP

## 1.1. Contexte thématique

Les aires marines protégées (AMP) sont mises en place pour aider à la préservation de la biodiversité marine. Les AMP sont supposées pouvoir jouer un rôle bénéfique pour les écosystèmes à une échelle supérieure à celle des limites de la réserve. Bien qu'il existe un consensus sur les effets positifs des réserves marines sur la taille et l'abondance des espèces au sein des limites de la zone protégée, des informations manquent sur le rôle des réserves dans l'export des individus à différents stades de vie. Or, **ces notions de dispersion et de connectivité** sont importantes dans la compréhension du renouvellement du stock d'adultes au sein et hors de la réserve.

Examiner la **structure génétique** existant entre populations est un moyen indirect d'estimer le taux moyen d'échange d'individus et ainsi d'évaluer la connectivité entre différentes zones d'une région. Un nombre croissant d'études montre une différenciation génétique conséquente chez les espèces récifales, et ce, même chez celles présentant de fortes capacités de dispersion (longue durée de vie larvaire, investissement fort dans la reproduction en quantité et en durée,..). Autrement dit, l'échelle spatiale de connectivité est souvent réduite et l'idée qu'une aire marine isolée peut servir de source effective de larves pour des populations lointaines est écologiquement exclue. Pour une efficacité réelle des AMP, en terme de protection de la biodiversité, **les AMP se doivent d'être intégrées dans un réseau dense** (Mora et al., 2006).

C'est dans ce contexte que le Projet CAMP a démarré. L'objectif principal du projet est donc d'estimer la connectivité dans le Sud Ouest de l'Océan Indien (SOOI) afin de contribuer significativement au dessin du réseau des AMP. Ce projet vise à comparer les niveaux de diversité et de différenciation génétiques de trois espèces cibles de poissons récifaux, avec une attention particulière sur les relations entre les îles isolées mais aussi des récifs continentaux avoisinants. L'étude de faisabilité (Muths *et al.*, 2008), réalisée de septembre 2007 à septembre 2008, à la demande du GIP-Réserve naturelle Marine de la Réunion, a permis d'identifier trois espèces cibles (espèces choisies selon l'intérêt économique et l'existence de marqueurs génétiques), puis de valider les protocoles d'échantillonnage et d'analyse. Ces trois espèces sont: *Epinephelus merra* (Serranidae), *Lutjanus kasmira* (Lutjanidae) et *Myripristis berndti* (Holocentridae). Cette étude est téléchargeable à l'adresse :

[http://wwz.ifremer.fr/lareunion/les\\_projets/camp](http://wwz.ifremer.fr/lareunion/les_projets/camp) (en bas de page, rubrique « En savoir plus »).

Le projet CAMP vise donc à réaliser l'échantillonnage dans 14 sites et l'analyse génétique de ces trois espèces afin de préciser l'histoire de colonisation des îles du SOOI et comprendre l'origine de la biodiversité locale, et surtout de mieux quantifier les échanges actuels entre les différentes localités échantillonnées. L'intégration de l'ensemble de ces résultats permettra de **cartographier les échanges et de statuer sur l'isolement ou la connectivité** de chacun des sites, et donc d'apporter, en étroite collaboration avec le GIP-Réserve naturelle Marine de la Réunion, des **éléments de réflexion pour le réseau d'AMP du SOOI**, actuellement en cours de montage par la Commission de l'Océan Indien (COI) et qui devrait être connecté aux autres AMPs de la zone (côte Africaine), dans un objectif commun de protection de la diversité marine et de gestion efficace des espèces dans le SOOI.

## 1.2. Organisation

Outre le soutien de la Mesure n°1.02 du volet Réunion du POCT OI 2007-2013 (co-financement UE - DIREN - Région Réunion - IFREMER), le présent projet CAMP bénéficie également d'un financement accordé par la Western Indian Ocean Marine Science Association – WIOMSA ([www.wiomsa.org](http://www.wiomsa.org)) grâce à une bourse régionale du Marine Science for

Management – Masma d'un montant global de 100 000 \$, géré par notre partenaire d'Afrique du Sud, le SAIAB).



Chacune de ces deux sources de financement correspond à l'échantillonnage et à l'analyse génétique de sites bien identifiés (cf Tableau ci-dessous et Figure 1), l'objectif étant de dessiner le schéma le plus complet des connectivités au sein du SOOI. Le projet global prévoit en effet un minimum de 14 sites d'échantillonnage, 9 de ces sites (échantillonnage et coût des analyses génétiques) dépendant directement de la présente convention et les 5 autres sites étant pris en compte par celle passée avec la WIOMSA.

A noter enfin qu'en fonction des opportunités, des échantillons en provenance d'autres sites pourraient être obtenus par le biais de collaboration diverses ; l'analyse génétique de ces échantillons serait alors prise en charge dans la cadre du POCT-OI, dans le respect des coûts maximum annoncés.

Tableau 1. Répartition des sites d'échantillonnage (et des analyses génétiques associées) selon les sources de financement

	POCT-OI	WIOMSA
Réunion		
Maurice		
Rodrigues		
Madagascar		
Seychelles		
Mayotte		
Glorieuses		
Mohéli		
Grande Comore		
Kenya		
Tanzanie		
Afrique du sud		
Europa		
Juan de Nova		
Autres sites		

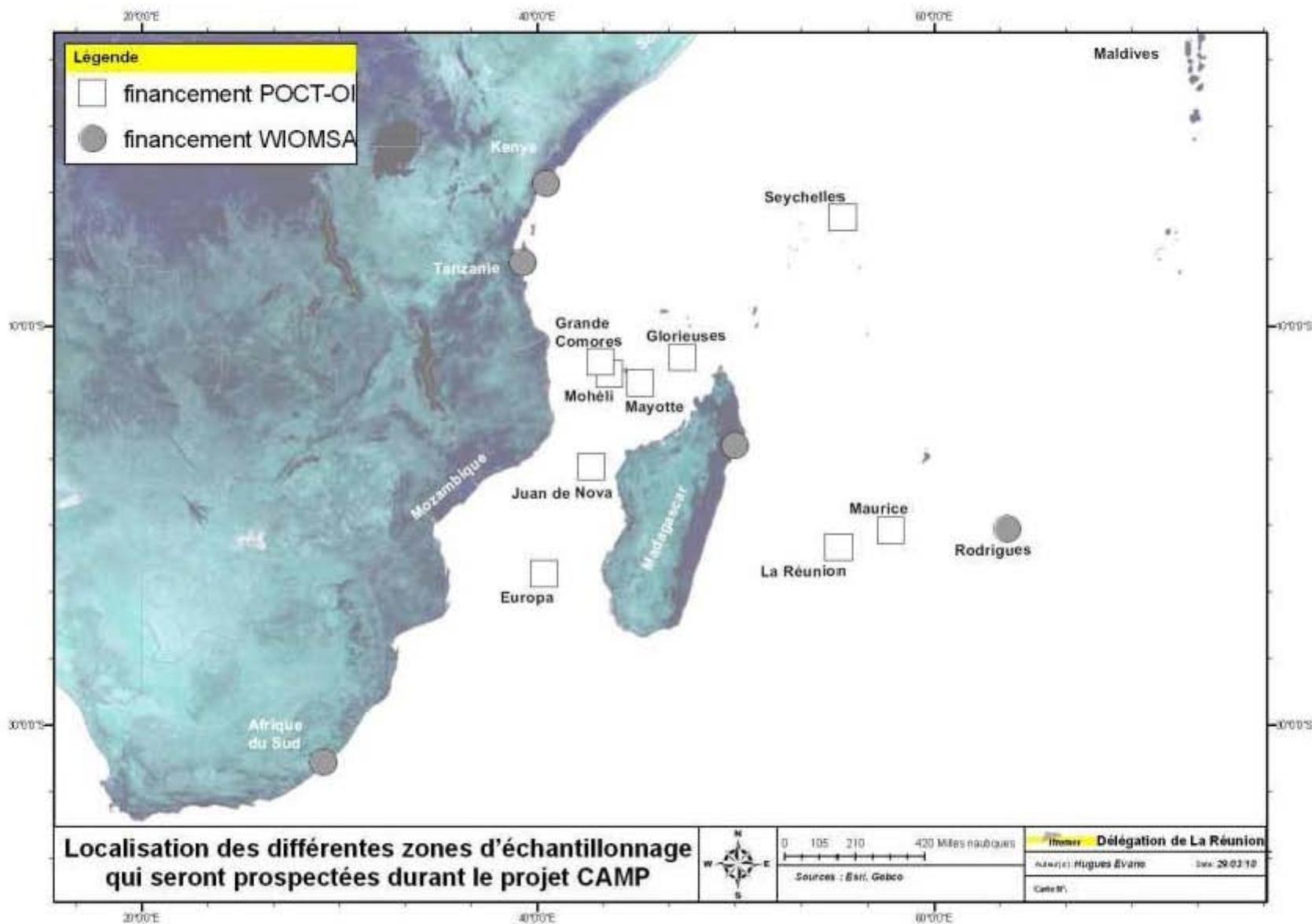
Pour mention, outre le soutien de la Mesure n°1.02 du volet Réunion du POCT OI 2007-2013 et de la bourse régionale MASMA de la WIOMSA, ce projet bénéficie du soutien de la mesure européenne FP7 Capacities, Research Potential RegPot 2008-1 via le projet « RUN Sea Science » porté par l'IRD Réunion. Cette aide correspond à l'embauche d'un d'Ingénieur d'étude (CDD de 17 mois) pour la réalisation des analyses génétiques.



Le projet CAMP comporte 3 actions:

- Prélèvement des échantillons dans le SOOI par les différents partenaires
- Analyses génétiques des échantillons et transfert de compétences
- Synthèse en coopération : élaboration d'aides à la gestion.

Figure 1. Détail de l'échantillonnage tel que prévu à l'origine du projet CAMP, représenté en fonction des deux sources de financement POCT-OI et WIOMSA (qui ont donc à leur charge les frais d'échantillonnage et des analyses génétiques correspondantes pour chacun des sites).



## 2. Les partenaires du projet CAMP

La mesure n°1.02 du volet Réunion du POCT OI 2007-2013 vise à préserver et à valoriser le patrimoine naturel ainsi que les ressources des pays de la zone océan Indien et à renforcer les actions en matière de protection de la biodiversité marine et côtière.

Or, du fait de sa continuité physique, l'environnement marin nécessite une protection qui dépasse le cadre des nationalités et des frontières. C'est pourquoi de fortes coopérations sont nécessaires entre les différentes institutions de la zone SOOI. Le projet CAMP y contribue par la mise en place de partenariats fiables et durables dans le temps.

Les partenaires du projet CAMP interviennent à différents niveaux dans le projet. La première année du projet étant principalement dévolue à l'échantillonnage, les différents partenaires ont surtout offert un soutien logistique sur le terrain. Une collaboration plus poussée sera mise en place avec nos partenaires scientifiques pour la phase d'analyses des données et avec nos partenaires gestionnaires pour la phase de restitution.

Au terme de cette première année, le projet compte 5 partenaires, dont 4 internationaux.

### 2.1. Partenaires techniques et scientifiques nationaux

La Délégation IFREMER Réunion 

La Délégation IFREMER Réunion est à l'initiative du projet CAMP. C'est elle qui mène et coordonne le projet dans sa globalité. Ses responsabilités de maître d'ouvrage sont les suivantes :

- La coordination des actions et des différents partenaires
- L'échantillonnage dans la majorité des zones
- La réalisation des analyses génétiques.

Le GIP Réserve Naturelle Marine de la Réunion



Le GIP Réserve Naturelle Marine de la Réunion est pleinement impliqué depuis le début dans le projet CAMP. Le GIP-RNMR est en effet à l'initiative de l'étude préliminaire, il a contribué à la rédaction du projet et s'implique dans les différentes actions du projet. Sa plus grande contribution se fera dans l'Action 3 « Elaboration d'aides à la gestion ».

### 2.2. Partenaires techniques et scientifiques internationaux

Afrique du Sud : South African Institute for Aquatic Biodiversity



Le SAIAB est un centre de recherche sur la biodiversité aquatique. Son rôle dans le projet CAMP est d'assurer un soutien à l'échantillonnage des poissons sur les côtes africaines, mais également un rôle dans les analyses génétiques. Le SAIAB a en outre la responsabilité du financement WIOMSA. Notre principal interlocuteur au SAIAB est Gavin Gouws.

Mauritius : Mauritius Oceanography Institute



Le MOI est une organisation de recherche d'état qui est responsable de la formulation, la mise en œuvre et la coordination de programmes scientifiques visant à la protection, l'exploration et le développement des ressources marines des eaux territoriales mauriciennes. Son rôle dans le

projet CAMP est d'assurer un soutien à l'échantillonnage des poissons à Maurice et à Rodrigues. Le MOI a également un rôle dans les analyses génétiques, notamment en la personne de Ruby Moothien Pillay.

Comores : Parc Marin de Mohéli



Le PMM est partenaire historique de la Délégation IFREMER Réunion, notamment sur les projets « Tortue ». Dans le cadre du projet CAMP, le PMM offre son soutien logistique et politique pour la bonne réalisation de l'échantillonnage à Mohéli. Du fait de son expérience, ce partenaire interviendra dans le cadre de l'Action 3 « Elaboration d'aides à la gestion ».

Seychelles : SFA



La Seychelles Fishing Authority (SFA) est le service des pêches des Seychelles. C'est un partenaire historique de la Délégation IFREMER Réunion. Ces deux instituts sont liés par une convention cadre. Son rôle dans le projet CAMP est d'assurer un soutien à l'échantillonnage des poissons dans les eaux seychelloises.

### 3. Rappel des objectifs de l'année 2009

#### Objectifs CAMP sur l'année 2009

- 1- Réaliser une grande partie de l'échantillonnage des poissons dans le SOOI : Seychelles, Comores, Réunion, Maurice, 1 des 3 Iles éparses
- 2- Développer les marqueurs génétiques nécessaires à l'analyse des échantillons
- 3- Commencer l'analyse génétique des échantillons (séquençage mitochondrial)

Le présent rapport fait le bilan de la première année du programme CAMP s'étalant sur la période de mars 2009 à février 2010. Ce rapport **intermédiaire n'a pas pour objectif de tirer des conclusions préliminaires** des premières données collectées et analysées durant cette année car les données obtenues à ce stade ne le permettent pas. L'objet du document est de **faire un état des lieux de la première année**, principalement dédiée à l'échantillonnage.

## 4. Etat d'avancement de l'échantillonnage 2009

### 4.1. Les espèces échantillonnées dans le cadre du projet

*Epinephelus merra* vit communément dans les eaux peu profondes du lagon et des récifs de pleine mer. Les juvéniles sont communs dans les coraux branchus d'*Acropora* sp.. *E. merra* est un carnivore nocturne dont la piscivorie va augmenter en vieillissant. Il s'agit d'une espèce hermaphrodite protogyne à fécondation externe ; le changement de sexe se fait aux environs de la 3ème année. Pendant la reproduction (à la pleine lune entre Janvier et Avril pour la Réunion), les poissons s'agrègent sur le récif où ils libèrent leurs oeufs (Heemstra, Randall, 1993; Randall, Heemstra, 1991). La phase larvaire dure 39 jours.

*Lutjanus kasmira* est fréquemment rencontré dans de grandes agrégations autour des formations récifales. Cette espèce apparaît aussi bien dans les eaux peu profondes des lagons que sur les pentes externes du récif. Il s'agit de carnivores nocturnes : consommation de poissons, crevettes, crabes, stomatopodes, céphalopodes et crustacés planctoniques (Oda, Parrish, 1982; Van Der Elst, 1988). La reproduction se déroule une fois par an (en été austral). La phase larvaire dure 45 jours ; les juvéniles se sédentarisent préférentiellement dans les herbiers autour de patates de corail (Lieske, Myers, 1994; Pothin, 2005).

*Myripristis berndti* vit le jour caché dans les cavernes et les rochers des rebords des platiers subtidiaux, et plus sur le rebord des pentes externes la nuit (Lieske, Myers, 1994). Ils forment des bancs dispersés, entre 10 et 50 m de fond. L'alimentation, préférentiellement à base de zooplancton, est nocturne. *M. berndti* possède une phase larvaire pélagique de 40 à 58 jours (Tyler et al., 1993).



Figure 2. Les trois espèces ciblées par le projet CAMP : *Epinephelus merra*, *Lutjanus kasmira* et *Myripristis berndti*

### 4.2. Rappel de l'organisation de l'échantillonnage

L'échantillonnage du projet CAMP est coordonné par la délégation IFREMER Réunion en collaboration avec ses différents partenaires localisés dans le SOOI. L'échantillonnage est réalisé par les agents de la délégation IFREMER Réunion, avec l'aide occasionnelle d'un prestataire de service spécialisé ou directement par nos partenaires (c'est le cas pour toute la côte Est africaine).

Un échantillonnage complet correspond à l'obtention de 50 poissons de chacune des 3 espèces et par site. Ce seuil de 50 poissons par espèce et par site correspond à la taille optimale standard pour des analyses statistiquement robustes en génétique des populations.

L'obtention de ces 50 poissons par espèces nécessite généralement une à deux semaines complètement dédiée à cette tâche et dépend des densités de poissons et des conditions météorologiques sur site. L'échantillonnage se fait soit à la débarque des pêcheurs traditionnels locaux, soit en plongée par des agents habilités (classe 1B). Chaque poisson capturé est mesuré avant d'effectuer le prélèvement de tissu pour la génétique. Une fiche détaillée du protocole est donnée en Annexes.

### 4.3. Bilan global de la saison d'échantillonnage 2009

Le bilan de l'échantillonnage CAMP mené en 2009 est présenté dans le tableau 2 et sur la Figure 3 : plus de 1000 poissons ont été collectés.

L'échantillonnage a été réalisé principalement par le biais de missions directes pour les 8 sites suivants : Réunion, Mayotte, Seychelles, Glorieuses, Geysers, Mohéli, Grande Comore (Rapports de missions : Bourjea et al. 2009, disponible sur demande). Une centaine de poissons provenant d'Afrique du Sud, de Tanzanie et du Kenya, sont en attente de livraison de la part de nos partenaires (cf tableau 2). L'échantillon de Nosy Be nous a été fourni par la société « Antsiva » navire basé au Cratère à Nosy Be. Les échantillons des Maldives ont été fournis par des collègues de l'IRD UR 128 – CoRéUs dans le cadre de leur projet Institut Français de la Biodiversité sur le programme Maldives, et constituent un échantillon précieux en tant qu'« outgroup » (groupe extérieur qui permet de « calibrer » les données génétiques et de les ancrer dans un contexte géographique plus vaste).

Tableau 2. Bilan de l'échantillonnage 2009 du projet CAMP

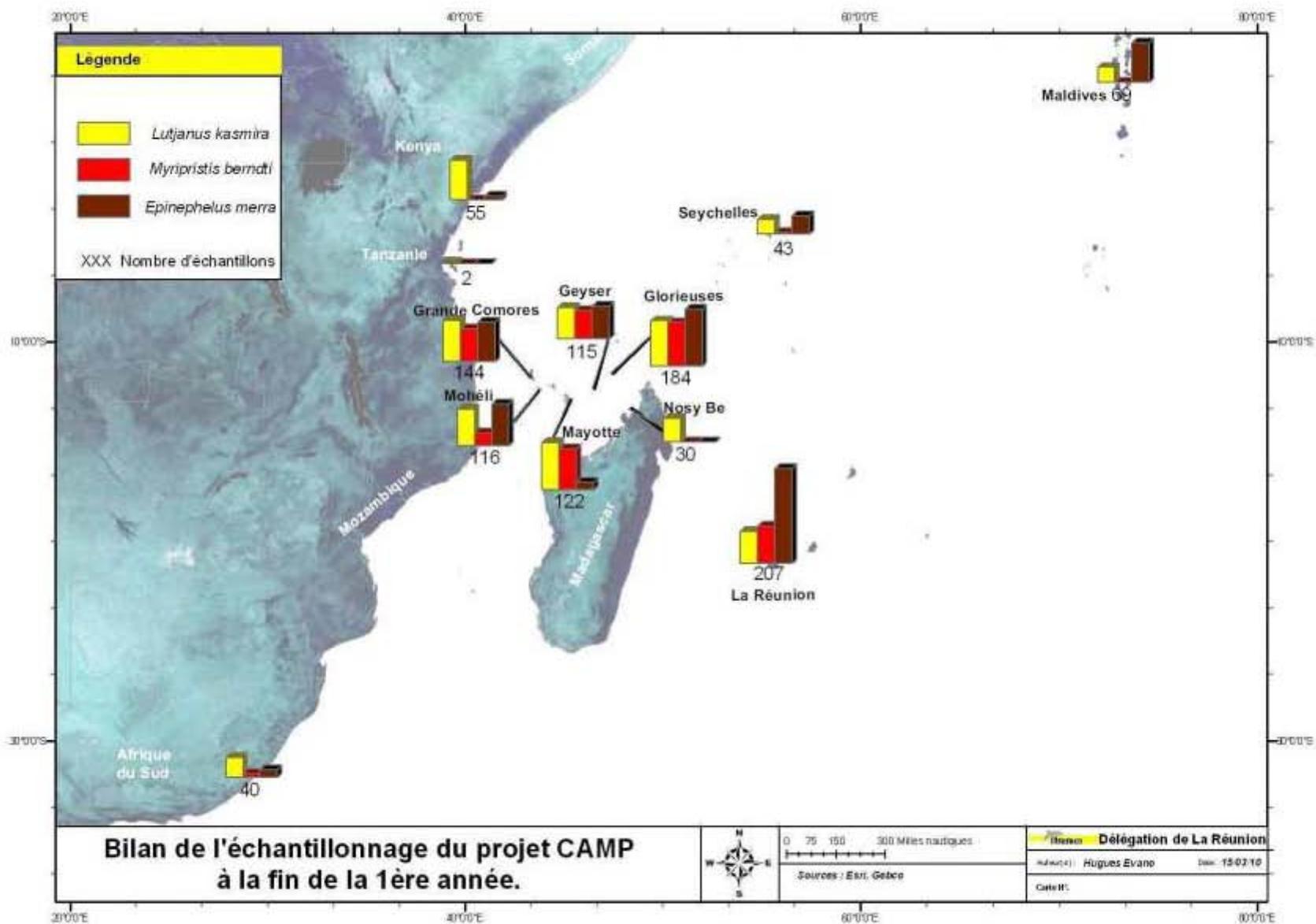
(Type de collecte : D pour Délégation Ifremer de la Réunion & P pour Partenaires / D pour Débarque des pêcheurs locaux & P pour Pêche réalisée par nos soins).

(En gris : attente de livraison de la part de nos partenaires)

	date	<i>Lutjanus kasmira</i>	<i>Myripristis berndti</i>	<i>Epinephelus merra</i>	type de collecte
Réunion	depuis 2008	40	47	120	D / D
Mayotte	depuis 2008	60	52	10	D / D, P
Seychelles	mars-09	18	2	23	D / D, P
Glorieuses	mai-09	57	55	72	D / P
Geysers	mai-09	39	35	41	D / P
Mohéli	oct-09	46	17	53	D / D, P
Grande Comore	oct-09	52	42	50	D / D, P
Nosy Be	juin-08	30	-	-	P / P
Afrique du Sud	nov-09	25	5	10	P / P
Tanzanie	nov-09	2	-	-	P / P
Kenya	déc-09	50	-	< 5	P / P
Maldives	juin-09	19	-	50	P / P
<b>TOTAL</b>		<b>438</b>	<b>255</b>	<b>429</b>	

Avec plus de **1000 échantillons** génétiques prélevés **en 2009** provenant de **12 sites** dans tout le SOOI, l'objectif de cette première année d'échantillonnage est **atteint**.

Figure 3. Détail de l'échantillonnage CAMP réalisé à la fin de l'année 1 du projet (période février 2009 décembre 2009).



## 4.4. Le stockage des données collectées

Afin de stocker les données du projet CAMP de façon pérenne, une base de données est actuellement en cours de création et de validation. Il s'agit d'une base de données simple, de type ACCESS, avec une seule table regroupant

- les données générales des missions (pays, sites, point GPS, dates de mission et de pêche, organisme partenaire...),
- les données propres à chaque échantillon (taille, numéro des échantillons prélevés, sexe quand disponible, ...)
- les différents traitements génétiques effectués (extraction, amplification ADNmt, géotypage microsatellite).

La structure de cette base de données est compatible Q<sup>2</sup> (base national de référence SINPmer, le Système d'Information Nature et Paysage volet mer) ; les métadonnées associées seront injectées à terme dans le ce SINPmer.

La base de données est stockée sur un disque réseau commun de la station IFREMER Réunion et accessible uniquement aux membres du groupe de travail CAMP. Ces membres sont identifiés par leur identifiant et leur mot de passe. La base de donnée est sauvegardée quotidiennement sur bandes à la station IFREMER Réunion, et de manière mensuelle au centre IFREMER de Brest sur les disques sécurisés du SISMER<sup>1</sup>.

Parmi les membres du groupe de travail CAMP, seul l'administrateur de la base de données peut (1) ajouter ou modifier des données, (2) modifier la structure de la base. Les autres utilisateurs ont uniquement la possibilité de consulter les données ou d'effectuer des extractions.

Afin de fiabiliser les données stockées, une procédure de validation des données saisies dans la base de données CAMP a été créée. Cette procédure s'inscrit dans le cadre de la démarche qualité du laboratoire d'analyses génétiques de la station IFREMER Réunion. Elle permet de vérifier pour chaque campagne intégrée dans la base de données la cohérence et l'intégrité des données ajoutées. Ainsi, pour chaque site, une synthèse automatique des données est éditée.

L'objectif clairement affiché de cette base de données associée à une démarche qualité, est de **fiabiliser le processus d'analyses** des données et par conséquent des résultats produits. Ce système est d'autant plus important que ces données ont vocation à être **utilisées par des gestionnaires** dans le cadre d'élaboration de plans stratégiques de **développement d'aires marines protégées** au niveau régional.

<sup>1</sup> SISMER = Systèmes d'Information Scientifiques pour la MER

## 5. Le volet génétique

L'analyse de la structure génétique de ces poissons de récif repose dans ce projet sur l'utilisation conjointe de 2 marqueurs moléculaires différents :

- des marqueurs nucléaires de type microsatellites (une douzaine par espèce)
- un marqueur mitochondrial, le cytochrome b (fragment de 600 à 800 paires de bases, en fonction des espèces).

La complémentarité des informations fournies par ces deux marqueurs devrait permettre de dessiner pour chaque espèce les limites spatiales des différentes populations avec une plus grande fiabilité.

### 5.1. Développement des marqueurs microsatellites

Au démarrage du projet, il n'existait pas de marqueurs microsatellites spécifiques à chacune des 3 espèces retenues. Des tests ont en outre été réalisés pour effectuer des transferts de marqueurs microsatellites intra-espèces/inter-genre. Ces tests ont été infructueux et ont confirmé la nécessité de développer des banques microsatellites spécifiques pour les espèces cibles du projet.

Le développement de trois banques microsatellites a donc été contractualisé avec Genoscreen. Au jour d'aujourd'hui, les trois banques microsatellites ont été constituées, des amorces ont été dessinées et des tests d'amplification ont été réalisés. Il reste donc la dernière étape relative aux tests de polymorphisme qui n'ont pas encore été effectués. Ils sont prévus avant la mi 2010.

Les amorces microsatellites devraient donc être disponibles courant juin 2010, avec un cahier des charges basé sur 12 loci polymorphes par espèce. Le génotypage des individus pourra alors commencer. Ce dernier se fera ensuite en flux continu sur séquenceur à capillaire, au CIRAD de St Pierre (3P).

### 5.2. Avancement des analyses mitochondriales

A ce stade, l'analyse des résultats obtenus serait incomplète, du fait de l'absence de certains sites et des données microsatellites. Le paragraphe suivant décrit donc simplement les protocoles concernant le marqueur mitochondrial et donne les indications concernant la diversité génétique (haplotypique et nucléotidique) observée par espèce et par site.

Les amplifications du gène mitochondrial de la Cytochrome B (CytB) sont réalisées grâce aux amorces CB12F et CB12 R (Marko et al., 2004) pour *E. merra*, CytbH (Song et al., 1998) et CytbR (Taberlet et al., 1992) pour *L. kasmira*, CytbH (Song et al., 1998) et CB12R (Marko et al., 2004) pour *M. berndti*. Les fragments amplifiés font 809 paires de bases pour *E. merra*, 727 pb pour *L. kasmira* et 624 pb pour *M. berndti*.

Les réactions d'amplification (par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR) se font dans les mêmes conditions pour les trois espèces, soit dans 20 µl de Mix contenant 1X de tampon, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 30 µM de chaque dNTP, 0,4 µM de chaque amorce, 0,1 U de Taq-Polymérase et environ 25 ng d'ADN. La réaction d'amplification comporte 25 cycles à trois températures (40 sec à 94°C, 50 sec à 54°C et 40 sec à 72°C) compris entre une phase de dénaturation initiale (7 min à 94°C) et une phase d'élongation finale (7 min à 72°C). Un contrôle d'amplification est réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose (1% dans TBE 1X, visualisation grâce au Bromure d'Ethidium) avant envoi au sous-traitant Genoscreen pour purification et réaction de séquences, réalisée par la technique des Dye Terminators basée sur l'incorporation de dNTPs fluorescents. Afin d'obtenir une information de séquence la plus fiable possible, chaque fragment est séquencé dans les deux sens. Chacune de ces 2 séquences est contrôlée et validée (ou non) visuellement. Les réactions de séquences sont réalisées en flux continu, au fur et à mesure de la réception de nouveaux échantillons.

Les premiers résultats obtenus pour ces 3 espèces montrent des diversités haplotypiques et nucléotidiques respectivement voisines de 0,8 et de 0.003 (cf Tableau 3), plus fortes pour *M. berndti* que pour les 2 autres espèces.

**Tableau 3.** Principales caractéristiques des données de séquences mitochondriales pour les 3 espèces du projet CAMP

(N = nombre d'individus, Nhap = nombre d'haplotypes, Hd = diversité haplotypique,  $\pi$  = diversité nucléotidique)

Espèce	site	N	Nhap	Hd	$\pi$
<i>E. merra</i>	GLO	30	16	0,878	0,0028
	MAY	9	4	0,583	0,0016
	RUN	86	14	0,652	0,0013
	COM	46	16	0,794	0,0027
	MOR	46	15	0,675	0,0021
	MAL	30	11	0,644	0,0013
	<b>TOT</b>	<b>323</b>	<b>60</b>	<b>0,783</b>	<b>0,0025</b>
<i>L. kasmira</i>	GLO	50	19	0,729	0,0022
	GEY	39	15	0,683	0,0019
	MAY	53	26	0,841	0,0029
	RUN	36	18	0,846	0,0032
	COM	46	27	0,703	0,0021
	MOR	48	19	0,729	0,0026
	MAL	19	12	0,836	0,0027
	NBE	35	14	0,807	0,0029
	SEY	9	8	0,972	0,0046
	<b>TOT</b>	<b>335</b>	<b>67</b>	<b>0,770</b>	<b>0,0026</b>
<i>M. berndti</i>	GLO	46	18	0,864	0,0037
	GEY	31	13	0,763	0,0039
	MAY	46	21	0,881	0,0040
	RUN	44	17	0,811	0,0028
	COM	18	11	0,817	0,0030
	MOR	42	15	0,830	0,0039
	<b>TOT</b>	<b>229</b>	<b>45</b>	<b>0,838</b>	<b>0,0037</b>

Des analyses plus poussées de différenciation génétique spatiale ont été effectuées ponctuellement, notamment dans le cadre de présentations orales du projet CAMP (Muths, Bourjea, 2009). Elles seront présentées en détail dans le rapport 2011, lorsque toutes des données mitochondriales seront acquises.

### 5.3. Mise en place d'une démarche qualité

Compte tenu de l'importance des résultats en terme de mesures de gestion associées, une démarche de mise sous Assurance Qualité du laboratoire d'analyses génétiques de la Délégation IFREMER Réunion a été initiée. Cette démarche a pour objectif de garantir la fiabilité et la traçabilité des analyses effectuées dans ce laboratoire. Dans ce cadre, un système documentaire « Qualité » a été mis en place et est consultable à la station IFREMER Réunion. Il comprend notamment le « Manuel Qualité » qui synthétise l'ensemble de la démarche et un « Plan Qualité » qui définit précisément les protocoles et modes opératoires à respecter, depuis la prise de l'échantillon jusqu'à la production finale du résultat d'analyse.

L'année 2009 a été donc consacrée à la mise en place de système pour qu'il soit opérationnel lors de la phase d'analyse génétique en laboratoire de 2010.

#### Bilan du volet génétique

Le développement des 3 banques microsatellites est en cours ; les amorces devraient être disponibles en juin 2010 et le génotypage des échantillons collectés depuis le début du projet pourra ainsi commencer mi 2010.

En parallèle, les analyses de la variabilité associée au marqueur mitochondrial sont réalisées en continu sur les échantillons collectés.

## 6. Objectifs 2010

### 6.1. Echantillonnage / planning prévisionnel

L'objectif pour l'année 2010 est de finaliser la totalité de l'échantillonnage avec, pour chacun des sites, l'objectif de 50 poissons par espèces. Le tableau 4 ci-dessous résume le planning prévisionnel de l'échantillonnage 2010. Pour des questions logistiques, ce planning est sujet à modifications.

Tableau 4. Planning prévisionnel des échantillonnages en 2010

Echantillonnage	2010												Financeurs
	Janv.	Févr	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Août	Sept	Oct	Nov	Déc	
Juan de Nova													POCT-OI
Europa													POCT-OI
Maurice													POCT-OI
Rodrigues													WIOMSA
Madagascar													WIOMSA
Afirque du Sud/ Kenya													WIOMSA

### 6.2. Analyses des échantillons et traitement des résultats

L'objectif pour 2010 est de réaliser le génotypage microsatellite de l'ensemble des échantillons collectés en 2009 ainsi que les analyses microsatellites et mitochondriales de ceux collectés en 2010. Une première analyse des résultats de l'année 1 sera également réalisée afin de préparer la phase d'analyse finale des résultats en 2011.

#### Objectifs CAMP pour l'année 2010

1. Finaliser l'échantillonnage CAMP : Juan de Nova, Europa, Maurice, Rodrigues et Madagascar.
2. Réaliser les analyses génétiques : microsatellites pour l'ensemble des échantillons collectés sur le programme et séquençage mitochondrial des échantillons collectés en 2010.
3. Réaliser une première analyse des résultats génétiques dans leur globalité.

## Bibliographie

- Bourjea J, Muths D (2009) Rapports de mission d'échantillonnage CAMP
- Heemstra PC, Randall JE (1993) Groupers of the World (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date FAO Fisheries Synopsis, No. 125, Vol16, 382pp.
- Lieske E, Myers R (1994) Coral reef fishes: Caribbean, Indian Ocean and Pacific Ocean, including the Red Sea HarperCollins, London.
- Marko PB, Lee SC, Rice AM, et al. (2004) Mislabelling of a depleted reef fish. *Nature* 430, 309-310.
- Mora C, Andrefouet S, Costello MJ, et al. (2006) Ecology. Coral reefs and the global network of Marine Protected Areas. *Science* 312, 1750-1751.
- Muths D, Bourjea J (2009) Using genetic approach to estimate reef fish connectivity in the South-West Indian Ocean and help in the design of Marine Protected Areas network.
- Muths D, Tessier E, Bourjea J (2008) Contribution de la génétique des populations à l'étude de la connectivité régionale de certaines espèces de poissons commerciaux présents dans la Réserve Naturelle Marine de La Réunion : étude de faisabilité, p. 40. IFREMER, Le Port.
- Oda DK, Parrish JD (1982) Ecology of commercial snappers and groupers introduced to Hawaiian reefs. *Proceedings of the 4th International Coral Reef Symposium* 1, 59-67.
- Pothin K (2005) Analyse de la dispersion larvaire des poissons récifaux à La Réunion à travers l'étude de leurs otolithes, Université de La Réunion.
- Randall JE, Heemstra PC (1991) Revision of Indo-Pacific groupers (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae), with descriptions of five new species. *Indo-Pacific Fishes* 20, 1-332.
- Song CB, Near TJ, Page LM (1998) Phylogenetic Relations among Percid Fishes as Inferred from Mitochondrial Cytochrome b DNA Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10, 343-353.
- Taberlet P, Meyer A, Bouvet J (1992) Unusually large mitochondrial variation in populations of the blue tit, *Parus caeruleus*. *Molecular Ecology* 1, 27-36.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Tyler JC, Johnson GD, Brothers EB, Tyler DM, Smith LC (1993) Comparative early life histories of western Atlantic squirrelfishes (Holocentridae): age and settlement of *Rhynchichthys meeki*, and juvenile stages. *Bulletin of Marine Science* 53, 1126-1150.
- Van Der Elst R (1988) A guide to the common sea fishes of Southern Africa (2nd Ed.), C. Struik, Cape Town, 395pp.

## Remerciements

