

Etude génétique complémentaire sur le statut de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie

Rapport final

Etude réalisée par
Opération cétacés

Claire GARRIGUE, Christophe CLEGUER, Marc OREMUS et Aline SCHAFFAR

Dans le cadre du projet

Plan d'actions dugong



en Nouvelle-Calédonie

Etude génétique complémentaire sur le statut de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie

Rapport final

Marc OREMUS, Claire GARRIGUE et Christophe CLEGUER
Opération Cétacés
Juin 2015

Ce rapport a été financé et élaboré dans le cadre du projet

Plan d'actions dugong



en Nouvelle-Calédonie

Soutenu par :



Référence à citer : Oremus M., Garrigue C. et Cleguer C. 2015. *Etude génétique complémentaire sur le statut de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie. Rapport final. 44p. + annexes.*

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| SOMMAIRE | 3 |
| RESUME | 5 |
| 1. CONTEXTE | 7 |
| 2. INTRODUCTION | 8 |
| 3. MATERIELS ET METHODES | 11 |
| 3.1. ORIGINE DES ECHANTILLONS..... | 11 |
| 3.2. ANALYSES EN LABORATOIRE | 13 |
| 3.2.1. Préparation des échantillons et extraction de l'ADN | 13 |
| 3.2.2. Séquençage de la région de contrôle de l'ADNmt..... | 13 |
| 3.2.3. Génotypage de 10 microsatellites | 13 |
| 3.3. ANALYSES DE DONNEES..... | 14 |
| 3.3.1. Préparation des données..... | 14 |
| 3.3.2. Calibration des données microsatellites | 15 |
| 3.3.3. Structure des populations | 15 |
| 3.3.4. Taux de migration récente | 16 |
| 3.3.5. Niveau de diversité génétique | 17 |
| 3.3.6. Taille efficace actuelle de la population..... | 17 |
| 3.3.7. Test de « bottleneck » | 18 |
| 3.3.8. Réseau des haplotypes mitochondriaux..... | 19 |
| 3.3.9. Analyses de calculs Bayésiens approximatifs (ou ABC)..... | 19 |
| 4. RESULTATS | 21 |
| 4.1. DONNEES DISPONIBLES | 21 |
| 4.1.1. Extractions d'ADN et séquençage de l'ADNmt..... | 21 |
| 4.1.2. Génotypage des microsatellites..... | 21 |
| 4.1.3. Calibration et estimation du taux d'erreur..... | 22 |
| 4.2. CONNECTIVITE AVEC LES POPULATIONS AUSTRALIENNES | 22 |
| 4.2.1. Analyse Bayésienne de groupage | 22 |
| 4.2.2. Analyse moléculaire de la variance | 24 |
| 4.2.3. Taux de migration asymétrique récente | 25 |
| 4.3. NIVEAU DE DIVERSITE GENETIQUE | 25 |
| 4.3.1. Indices classiques de diversité génétique | 25 |
| 4.3.2. Taille effective contemporaine de population | 25 |
| 4.4. HISTOIRE DEMOGRAPHIQUE ET ORIGINE EVOLUTIVE DE LA POPULATION | 28 |
| 4.4.1. Test de réduction des effectifs en Nouvelle-Calédonie | 28 |
| 4.4.2. Relation généalogique des ADNmt | 28 |
| 4.4.3. Analyses ABC..... | 29 |
| 5. DISCUSSION | 31 |
| 5.1. TAILLE D'ECHANTILLON ET QUALITE DES DONNEES..... | 31 |
| 5.2. UNE POPULATION ISOLEE GENETIQUEMENT | 31 |
| 5.3. FAIBLE DIVERSITE GENETIQUE | 33 |
| 5.4. REDUCTION RECENTE DES EFFECTIFS DE DUGONGS EN NOUVELLE-CALEDONIE..... | 35 |
| 5.5. HISTOIRE DEMOGRAPHIQUE ET ORIGINE EVOLUTIVE DE LA POPULATION DE DUGONGS EN NOUVELLE-CALEDONIE | 36 |
| 6. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS | 39 |
| 7. REMERCIEMENTS | 41 |
| 8. RÉFÉRENCES | 42 |
| ANNEXES | 45 |

LISTE DES TABLES

| | |
|---|----|
| Table 1. Liste des échantillons de dugongs collectés en Nouvelle-Calédonie. L'encadré indique les nouveaux échantillons analysés pour cette étude. [ADN] et 260/280 représentent respectivement la concentration d'ADN en ng/μL et son degré de pureté tels qu'estimés par Nanodrop. | 12 |
| Table 2. Liste des loci de microsatellites utilisés et indices de diversité génétique en Nouvelle-Calédonie. N est le nombre d'individus génotypés ; k est le nombre d'allèles identifiés ; HWE p indique le résultat des tests sur l'équilibre de Hardy-Weinberg ; H_o est le taux d'hétérozygotie ; F_{IS} est l'indice de fixation. | 14 |
| Table 3. Valeurs de F_{ST} (sous la diagonale) et ϕ_{ST} (au-dessus de la diagonale) basées sur l'ADNmt entre la Nouvelle-Calédonie et les trois populations identifiées en Australie (***) indique $p < 0,001$). | 24 |
| Table 4. Valeurs de F_{ST} (sous la diagonale) et R_{ST} (au-dessus de la diagonale) basées sur les microsatellites entre la Nouvelle-Calédonie et les trois populations d'Australie (***) indique $p < 0,001$). | 24 |
| Table 5. Moyenne (et intervalle de confiance à 95%) des taux de migration asymétrique récente estimée avec <i>BayesAss</i> . Le taux de migration représente la proportion d'individus d'une population qui a immigré à partir d'une population source par génération. Les valeurs de la diagonale représentent la proportion de non-immigrants dans une population. | 25 |
| Table 6. Indices de diversité génétique de l'ADNmt pour la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie et pour celles d'Australie. h est la diversité haplotypique et π est la diversité nucléotidique. | 26 |
| Table 7. Indice de diversité des microsatellites pour la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie et celles d'Australie. H_o est le taux d'hétérozygotie ; RA est la richesse allélique ; F_{IS} est l'indice de fixation, les valeurs entre parenthèses représentent les écart-types. | 26 |
| Table 8. Comparaison par tests de Wilcoxon des niveaux d'hétérozygotie des populations de dugongs de Nouvelle-Calédonie et d'Australie (au dessus de la diagonale) et des richesses alléliques (au-dessous de la diagonale). *** : $p < 0,001$; * : $p < 0,05$; ns : non significatif. | 27 |
| Table 9. Estimation des tailles effectives contemporaines des populations de dugongs obtenues avec le programme LDNe corrigé à +15%. | 27 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Scénarios d'histoire démographique des populations de dugongs d'Australie et de Nouvelle-Calédonie testés par analyses de calculs Bayésiens approximatifs avec le logiciel DiyABC. | 20 |
| Figure 2. Résultats de l'analyse Bayésienne obtenus sur la base des scénarios K = 2 à 5. NC : Nouvelle Calédonie ; CQ : Centre Queensland ; NQ : Nord Queensland ; DT : Détroit de Torres ; TN : Territoires de Nord ; OA : Ouest Australie. | 23 |
| Figure 3. Réseau haplotypique de type « median-joining » avec l'ensemble des données d'ADNmt. | 29 |
| Figure 4. Évaluation de la probabilité des scénarios d'histoire démographique des populations de dugongs d'Australie et de Nouvelle-Calédonie testés par analyses de calculs Bayésiens approximatifs. | 30 |

RÉSUMÉ

- Les dugongs de Nouvelle-Calédonie constituent une population importante à l'échelle mondiale bien que leurs effectifs soient bien inférieurs à ceux des grandes populations australiennes. Protégée depuis les années 60, il demeure néanmoins nécessaire d'accroître les connaissances relatives au statut de cette population et d'intensifier les mesures de gestion pour assurer une conservation efficace de l'espèce dans cet archipel.
- L'utilisation d'outils moléculaires permet d'évaluer plusieurs aspects cruciaux du statut de conservation d'une population qui ne pourraient pas être abordés par d'autres méthodes. Nous avons entrepris ici une étude génétique de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie visant à compléter et affiner les résultats d'une étude préliminaire menée en 2011, en utilisant un plus grand jeu de données et de nouveaux types d'analyses.
- Les objectifs principaux de cette étude visaient à : (1) évaluer le niveau de connectivité avec les grandes populations australiennes, (2) caractériser la diversité génétique de la population, (3) tester le scénario selon lequel la population a connu une réduction importante de ses effectifs au cours de son histoire récente et, (4) investiguer l'origine évolutive et l'histoire démographique de la population.
- Un total de 41 échantillons de Nouvelle-Calédonie a été utilisé, à partir desquels de longues séquences de la région contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont pu être analysées. Il a également été possible d'obtenir les génotypes de 33 échantillons pour un panel de 10 loci de microsatellites.
- Les analyses Bayésiennes de groupage illustrent l'isolement de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie vis-à-vis des dugongs australiens, lesquels peuvent être séparés en trois grandes populations distinctes. Cette conclusion est également appuyée par des analyses moléculaires de la variance effectuées à la fois sur l'ADNmt et les microsatellites, et qui suggèrent un isolement strict et durable de la population de Nouvelle-Calédonie.
- Les estimations des taux de migration récente suggèrent qu'aucun échange significatif n'a eu lieu entre la population de Nouvelle-Calédonie et les populations australiennes au cours des deux dernières générations.
- L'ensemble des indices estimés pour caractériser la diversité génétique des populations étudiées montre que les dugongs de Nouvelle-Calédonie présentent une diversité génétique plus faible que les populations australiennes.

- L'estimation de la taille effective actuelle de la population, bien que peu précise, suggère néanmoins un risque important de dépression de consanguinité à l'échelle de quelques générations.
- Un effet de goulot d'étranglement a été détecté par deux tests basés sur les données de microsattellites. Ces résultats suggèrent que la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie a connu une réduction soudaine de ses effectifs dans un passé récent (à l'échelle d'une dizaine de générations), laquelle pourrait potentiellement résulter d'une pression anthropique ou d'une catastrophe écologique.
- Les analyses visant à éclairer l'origine évolutive et l'histoire démographique de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie suggèrent que cette population est issue d'un évènement fondateur s'étant produit il y a moins de 7 000 ans et n'impliquant qu'un petit nombre d'individus.
- Contrairement à l'hypothèse envisagée lors de l'étude préliminaire, il semble que les individus fondateurs aient été apparentés à la population australienne du Centre Queensland plutôt qu'à la population regroupant les individus des Territoires du Nord, du Détroit de Torres et du Nord Queensland. Une colonisation de la Nouvelle-Calédonie via la Mer de Corail semble donc probable.
- Les résultats des analyses réalisées au cours de cette étude confirment le statut précaire des dugongs de Nouvelle-Calédonie. En effet, la faible diversité génétique ajoutée au strict l'isolement par rapport aux populations australiennes, rendent la population néo-calédonienne fragile et suggèrent une faible résilience.
- Il convient donc de maintenir, et même de renforcer, l'effort de conservation ainsi que de continuer à améliorer nos connaissances sur cette population pour assurer au mieux sa préservation future.

1. CONTEXTE

Cette étude est menée dans le cadre du Plan d'actions dugong 2010-2015 piloté par l'Agence des Aires Marines Protégées (AAMP). Elle fait suite à une analyse préliminaire sur l'isolement et la diversité génétique des dugongs de Nouvelle-Calédonie (Oremus et al. 2011) réalisée par Opération Cétacés (OC) pour la Direction de l'Environnement de la Province Sud, Nouvelle-Calédonie, sous l'impulsion de la responsable des espèces emblématiques.

Ce travail s'appuie sur l'analyse des échantillons de dugongs collectés par OC entre 1991 et 2010 mais il bénéficie également de l'apport de nombreux échantillons collectés sur les animaux échoués depuis 2010 et sur ceux capturés pour le programme d'acquisition de données de suivi télémétrique dans le cadre de la thèse de Christophe Cleguer (Cleguer et al. 2012, Garrigue & Cleguer 2013).

Tout comme pour l'étude préliminaire, la réalisation des analyses génétiques en Nouvelle-Calédonie a été possible grâce une collaboration établie entre l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'association OC. Elle a permis au Dr Marc Oremus, responsable du projet pour OC, d'être accueilli dans l'équipe CoReUs du Professeur Claude Payri pour la durée du projet et d'avoir accès à la Plateforme du Vivant et à ses équipements de biologie moléculaire.

La présente étude s'articule autour d'une comparaison entre les dugongs de Nouvelle-Calédonie et ceux d'Australie comme pour l'étude préliminaire. Les données d'ADN mitochondrial (ADNmt) des populations australiennes ont été publiées par Blair et al. (2014) et sont dorénavant publiques. En revanche, ce n'est toujours pas le cas des données de génotypage basées sur l'analyse des microsatellites. C'est pourquoi, la collaboration initiée avec le Professeur Associé David Blair de la School of Marine and Tropical Biology, de l'Université James Cook (JCU), Australie, est fondamentale puisqu'elle a permis d'accéder à cette source d'informations, essentielle à la caractérisation du statut de conservation de la population des dugongs de Nouvelle-Calédonie.

Le présent document constitue le rapport final de l'analyse des données de génétiques réalisée par Opération Cétacés.

2. INTRODUCTION

Le dugong ou vache marine (*Dugong dugon*) est un mammifère marin appartenant à l'ordre des Siréniens, considéré comme un des trois ordres de mammifères dont le risque d'extinction est le plus élevé (Purvis et al. 2000). Les effectifs de dugongs semblent diminuer à travers le monde, ce qui a mené à son classement d'espèce vulnérable à une échelle globale (IUCN 2008). Distribuées dans les régions tropicales et subtropicales de l'Indo-Pacifique, les plus grandes populations des dugongs se trouvent le long des côtes australiennes (>70.000 individus, Marsh et al. 2011). L'espèce se caractérise par une alimentation majoritairement herbivore la contraignant à un habitat côtier (Lanyon et al. 1989, Marsh et al. 2002), synonyme de risques anthropiques accrus (chasse, capture non-intentionnelle dans les filets de pêche, trafic maritime, destruction de l'habitat). Son espérance de vie est longue mais son taux de reproduction est faible, constituant une difficulté supplémentaire pour la conservation ou la reconstitution des populations (Marsh et al. 2011).

En Nouvelle-Calédonie, le dugong est une espèce emblématique bénéficiant d'une protection contre la chasse depuis 1963, exception faite d'une chasse coutumière réglementée. Depuis 2009, sa chasse est totalement interdite en province Sud (Code de l'Environnement de la province Sud, 2009) tandis que des dérogations peuvent encore être délivrées en province Nord dans le cadre de cérémonies coutumières (Code de l'Environnement de la province Nord, 2009). Une étude réalisée en 2003 a estimé la taille de la population locale à environ 1800 individus (SE = 332, CV = 0,18, Garrigue et al. 2008). Ainsi, bien que relativement petite par rapport aux populations australiennes, la population calédonienne est apparue comme étant l'une des plus importantes en termes d'effectif au niveau mondial (Garrigue et al. 2008). Elle constitue donc une population de première importance pour la conservation de l'espèce. Cependant, le statut écologique des dugongs de Nouvelle-Calédonie reste incertain. Les estimations les plus récentes de la taille de la population de dugongs de l'archipel Calédonien indiquent une abondance d'environ un millier de dugongs autour de la Grande-Terre (Cleguer et al. in prep.). Ces résultats suggèrent une baisse des effectifs par rapport à l'estimation de 2003 mais un certain degré d'incertitudes subsiste quant à la réalité ou non de cette régression (Cleguer et al. in prep.).

Placés en périphérie de la zone de répartition de l'espèce, les dugongs de Nouvelle-Calédonie font face à un plus grand risque d'isolement génétique que les populations centrales comme celles du Sud-est asiatique. Ce risque est d'autant plus important que la Grande Terre est une île relativement éloignée des régions voisines habitées par des dugongs comme l'Australie ou le Vanuatu. De plus, elle en est séparée par des eaux océaniques profondes peu propices à la navigation de ces animaux. Les dugongs sont capables de parcourir plusieurs centaines de kilomètres en quelques jours mais ces longs déplacements se font généralement en milieu

côtier ou en eaux peu profondes (Sheppard et al. 2006). Bien que des déplacements en milieu océanique soient également possibles, comme l'atteste certaines observations (Hobbs et al. 2007), on ignore à quelle fréquence ces derniers peuvent se produire. Une analyse de la variabilité génétique représente donc le meilleur moyen d'établir avec précision le degré de connectivité d'une population locale avec les populations voisines, offrant ainsi une meilleure connaissance du statut de conservation (Avisé 2004).

En 2011, une étude préliminaire a permis d'apprécier le degré d'isolement reproductif et de diversité génétique de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie (Oremus et al. 2011). Cette étude, bien que basée sur un nombre restreint de données, a mis en évidence une diversité génétique relativement faible et une différenciation génétique importante (impliquant donc un isolement reproductif) vis-à-vis des grandes populations australiennes. Une analyse de réseau basée sur les séquences d'ADN mitochondrial (ADNmt) a néanmoins montré un lien ancestral étroit entre les dugongs de Nouvelle-Calédonie et ceux d'une des deux grandes lignées identifiées en Australie, la lignée dite « widespread » (Blair et al. 2014). Ils apparaissent en revanche, éloignés de la seconde lignée, dite « restricted » mais également d'une lignée regroupant l'ensemble des haplotypes identifiées dans les autres régions de l'Indo-Pacifique dont le Sud-est asiatique, le Japon et la Micronésie (Oremus et al. 2011, Blair et al. 2014). En outre, l'inclusion dans cette analyse de deux échantillons des Iles Salomon et du Vanuatu suggérait une possible colonisation de l'habitat calédonien via l'arc Mélanésien plutôt que par la mer de Corail.

Notre étude souffrait néanmoins d'un nombre de données trop limité, en particulier pour l'utilisation des informations issues des microsatellites car il n'avait été possible d'obtenir les génotypes que pour 11 des individus échantillonnés en Nouvelle-Calédonie. De plus, il n'avait pas été possible d'effectuer une calibration en bonne-et-due forme entre les machines utilisées pour obtenir les données microsatellites de Nouvelle-Calédonie et d'Australie. A l'époque, seuls deux échantillons avaient pu être échangés entre les laboratoires, ce qui était insuffisant pour une comparaison efficace permettant la calibration entre les machines utilisées.

Nous proposons ici une étude complémentaire à celle d'Oremus et al. (2011) basée sur l'analyse d'une base de données élargie en termes de nombre d'échantillons de Nouvelle-Calédonie et supportée par la réalisation de nouvelles analyses statistiques. Nous avons utilisé des marqueurs de l'ADNmt (région de contrôle) et de l'ADN nucléaire (microsatellites), ces approches étant complémentaires. Nous rappelons au lecteur que l'ADNmt se transmet uniquement de la mère à sa descendance et reflète donc uniquement le flux génétique femelle tandis que les microsatellites situés dans l'ADN nucléaire (ADNnu) sont transmis par les pères et les mères et permettent donc d'analyser le flux génétique global provenant de l'ensemble des animaux mâles et femelles. La calibration des données microsatellites ayant, cette fois, pu être réalisée, l'analyse de données supplémentaires, en particulier pour les microsatellites, a permis une meilleure

caractérisation du niveau de diversité et d'isolement génétique des dugongs de Nouvelle-Calédonie vis-à-vis des populations australiennes. Pour la présente étude, seuls les échantillons de Nouvelle-Calédonie et d'Australie ont été considérés car l'absence de données de microsatellite pour les dugongs des autres régions représentés dans l'étude précédente (ex : Asie du Sud-Est, etc...) ne permettrait pas d'obtenir plus de résultats que ceux déjà obtenus auparavant.

Ainsi, quatre objectifs principaux ont été définis :

Objectif 1 : Confirmer et évaluer avec plus de précision l'isolement génétique entre la population de Nouvelle-Calédonie et les populations australiennes. De nouvelles analyses basées notamment sur les données de microsatellite permettront d'obtenir des résultats plus robustes mais aussi d'estimer les taux de migration entre la Nouvelle-Calédonie et l'Australie.

Objectif 2 : Obtenir une meilleure caractérisation de la diversité génétique présente en Nouvelle-Calédonie en estimant notamment la taille effective contemporaine de la population (N_e) grâce aux données de microsatellites.

Objectif 3 : Tester si la population de Nouvelle-Calédonie a connu une réduction importante de ses effectifs (effet « bottleneck ») au cours de son histoire récente. Des tests ont été conduits lors de l'étude initiale n'indiquant pas d'effet « bottleneck » clair. Cependant ces tests sont connus pour être sensibles à la taille de l'échantillon qui, en l'occurrence, se trouvait être très réduit. L'ajout de nouvelles données permettra d'obtenir des résultats plus robustes.

Objectif 4 : Reconstruire les relations généalogiques des haplotypes d'ADNmt et conduire des analyses de type ABC (Approximate Bayesian Computation) pour permettre des inférences sur l'origine évolutive et l'histoire démographique de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. *Origine des échantillons*

Pour cette nouvelle étude, nous avons souhaité analyser un fragment d'ADNmt similaire à celui rapporté par Blair et al. (2011) (411 paires des bases ou pb) ainsi que les génotypes (microsatellites) d'un maximum d'échantillons de Nouvelle-Calédonie. C'est pourquoi certains échantillons de dents et d'os analysés au cours de l'étude préliminaire n'ont pas été considérés ici car ils n'avaient permis d'obtenir qu'une courte séquence de l'ADNmt et aucun génotype de microsatellite. Au final, seuls les résultats obtenus précédemment pour 12 échantillons de peau et quatre échantillons de dent ou d'os ont été utilisés dans la présente étude.

En revanche, plusieurs nouveaux échantillons de peau ont été collectés depuis l'étude préliminaire. La majorité d'entre eux ($n = 16$) sont issus du projet de balisage des dugongs conduit par C. Cleguer dans le cadre de sa thèse (Cleguer et al. 2012, Garrigue & Cleguer 2013). Au cours de ce projet des dugongs ont été capturés afin d'être équipés de balises satellitaires. L'immobilisation temporaire de ces animaux a permis de prélever un petit morceau de peau sur chacun d'entre eux. Neuf échantillons ont également été collectés sur des animaux échoués depuis 2010. Au total, ce sont donc 25 nouveaux échantillons de peau qui ont pu être analysés au cours de cette étude.

La taille de l'échantillon global considéré pour cette étude est donc de 41 individus, représentés par 37 échantillons de peau et quatre échantillons d'os ou de dent. Le lieu de provenance et la date de collecte de chaque échantillon sont présentés dans la Table 1.

La collaboration mise en place avec l'Université de James Cook (JCU), Australie, a permis d'accéder aux génotypes de 167 dugongs (10 loci de microsatellites) appartenant aux différentes populations australiennes. Pour l'étude de l'ADNmt, nous avons également utilisé les séquences disponibles sur GenBank et les fréquences haplotypiques associées ($n = 177$) publiées par Blair et al. (2011).

Table 1. Liste des échantillons de dugongs collectés en Nouvelle-Calédonie. L'encadré indique les nouveaux échantillons analysés pour cette étude. [ADN] et 260/280 représentent respectivement la concentration d'ADN en ng/μL et son degré de pureté tels qu'estimés par Nanodrop.

| | Code | Date de collecte | Type d'échantillon | Région | ADNmt (411 pb) | [ADN] | 260/280 |
|----|-------------|-------------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|--------------|----------------|
| 1 | NCXX-001 | 1991 | os | Ouano | A | 25,81 | 2,35 |
| 2 | NC94-001 | 20/09/1994 | dent | Noumea | A | 9,9 | 1,5 |
| 3 | NC02-043 | 11/12/2002 | Peau | Noumea | A | 83,22 | 2,03 |
| 4 | NC03-002 | 17/05/2003 | Peau | Noumea | A | 57,98 | 1,98 |
| 5 | NC03-003 | 17/05/2003 | Peau | Noumea | A | 97,02 | 2 |
| 6 | NC04-053 | 20/12/2004 | Peau | Voh | A | 18,47 | 2,03 |
| 7 | NC06-002 | 11/01/2006 | Peau | Nouméa | A | 12,01 | 2 |
| 8 | NC06-170 | 25/10/2006 | Peau | Nouméa | A | 19,08 | 2,2 |
| 9 | NC07-161 | 02/09/2007 | Peau | Nouméa | A | 114 | 2,06 |
| 10 | NC08-169 | Aout 2008 | Peau | La Foa | A | 16,69 | 1,78 |
| 11 | NC09-010 | 19/01/2009 | Peau | Noumea | A | 371,06 | 2,06 |
| 12 | NC10-002 | 23/01/2010 | Peau | Bourail | A | 17,09 | 2,32 |
| 13 | NC10-009 | 19/06/2010 | Peau | Bourail | A | 86,77 | 1,93 |
| 14 | NC10-219 | Mars 2007 | dent | Pindai | B | 1,95 | 3,05 |
| 15 | NC10-220 | 12/01/2008 | dent | Népoui | A | 4,91 | 1,62 |
| 16 | NC11-017 | 13/04/2011 | Peau | Bourail | A | 178,64 | 1,98 |
| 17 | NC11-265 | 07/12/2011 | Peau | Voh | A | 14,73 | 1,58 |
| 18 | NC12-001 | 09/01/2012 | Peau | Païta | A | 83,82 | 1,87 |
| 19 | NC12-002 | 2011 | Peau | Voh | A | 393,77 | 1,97 |
| 20 | NC12-155 | 26/09/2012 | Peau | Païta | F | 108,31 | 1,93 |
| 21 | NC12-156 | 16/10/2012 | Peau | Mont Dore | A | 14,88 | 1,29 |
| 22 | NC12-158 | 01/02/2012 | Peau | Boat Pass | A | 892,17 | 2,06 |
| 23 | NC12-159 | 02/03/2012 | Peau | Nouméa | A | 601,78 | 2,06 |
| 24 | NC12-160 | 02/03/2012 | Peau | La Foa | A | 57,44 | 1,85 |
| 25 | NC12-161 | 03/03/2012 | Peau | La Foa | A | 254,35 | 1,99 |
| 26 | NC13-128 | 2013 | Peau | ? | A | 22,16 | 2,3 |
| 27 | NC13-129 | 24/09/2013 | Peau | Nouméa | E | 99,49 | 2,23 |
| 28 | NC13-130 | 27/09/2013 | Peau | Nouméa | A | 65,31 | 2,12 |
| 29 | NC13-131 | 27/09/2013 | Peau | Nouméa | A | 207,2 | 2,09 |
| 30 | NC13-132 | 28/09/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 103,87 | 2,15 |
| 31 | NC13-134 | 02/10/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 89,3 | 2,09 |
| 32 | NC13-136 | 02/10/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 184,5 | 2,05 |
| 33 | NC13-137 | 03/10/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 236,57 | 2,07 |
| 34 | NC13-138 | 03/10/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 146,13 | 2,08 |
| 35 | NC13-139 | 03/10/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 182,19 | 2,08 |
| 36 | NC13-140 | 04/10/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 84,5 | 2,08 |
| 37 | NC13-141 | 04/10/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 127,84 | 2,11 |
| 38 | NC13-142 | 04/10/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 234,33 | 2,08 |
| 39 | NC13-143 | 04/10/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 86,49 | 2,01 |
| 40 | NC13-144 | 04/10/2013 | Peau | Bourail-Poya | A | 141,49 | 2,08 |
| 41 | NC14-001 | 10/02/2014 | Peau | Païta | A | 22,23 | 2,25 |

3.2. Analyses en laboratoire

3.2.1. Préparation des échantillons et extraction de l'ADN

Pour chaque échantillon de peau, un morceau de tissu d'environ 2mm³ a été prélevé avec une lame de scalpel stérilisée à la flamme, puis découpé en petits morceaux afin de procéder à l'extraction.

L'ADN de tous les échantillons a été extrait au moyen de kits d'extraction par colonne silica de type « Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit ». Le protocole standard recommandé par Qiagen a été suivi, à l'exception de la phase initiale de digestion qui a été étendue à cinq heures en utilisant un volume de 40µL de protéinase K. L'ADN obtenu a été re-suspendu dans un volume d'eau ultra pure de 200 µL. La concentration et la pureté de l'ADN obtenu ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre 'Nanodrop'.

3.2.2. Séquençage de la région de contrôle de l'ADNmt

Pour chaque échantillon d'ADN, nous avons tenté d'amplifier un fragment de la région de contrôle de l'ADNmt par réaction de polymérase en chaîne (PCR). Pour cela, nous avons utilisé des amorces spécifiquement développées pour les siréniens (Blair et al. 2014). Celles-ci sont DLF (5' CAT ATT ACA ACG GTC TTG TAA ACC 3') et DLR (5' GTC ATA AGT CCA TCG AGA TGT C 3') ; elles amplifient un fragment de 600 paires de base (pb). Les PCR ont été réalisées sur un volume final de 20µL, dont 2µL d'extrait d'ADN, dans les conditions de réaction suivantes : Platinum Taq (1U), solution tampon (x1), MgCl₂ (0,5mM), amorces (0,4µmol), dNTP (0,2mM). Un cycle de transition de température classique a été utilisé : 5' à 94°C ; (30'' à 94°, 45'' à 55°, 60'' à 72°) x 35 ; 10' à 72°. Une électrophorèse en gel d'agarose 1,6% a été réalisée pour chaque PCR afin de vérifier les résultats des amplifications.

La purification des produits PCR ainsi que des produits issus de la réaction de séquençage a été effectuée par gel-filtration sur résine Sephadex® G50. Les fragments ont ensuite été analysés avec un séquenceur automatique de type ABI 3100. Tous les échantillons ont été séquencés dans les deux directions (3'-5' et 5'-3').

3.2.3. Génotypage de 10 microsatellites

Un panel de 10 loci de microsatellites développés par Hunter et al. (2010) a été analysé pour cette étude (0). Ces loci ont été choisis car ils ont été spécifiquement développés pour les dugongs et ils ont été utilisés avec succès par nos collaborateurs de JCU. Une PCR a d'abord été effectuée pour chaque paire d'amorces. Cinq paires d'amorces ont été fournies par JCU, permettant une uniformité entre les analyses faites dans les deux laboratoires. En revanche, pour ces cinq autres loci les amorces de JCU n'ont pas pu être utilisées pour notre étude à cause de légères différences dans le matériel d'analyse. Ces cinq autres paires d'amorces ont donc dû être commandées indépendamment afin de pouvoir être utilisées sur l'appareillage de la Plateforme du Vivant. La même réaction

d'amplification et le même cycle de transition de température ont été utilisés pour toutes les PCR. Les conditions de réaction étaient les suivantes : Platinum Taq (0,5U), solution tampon (x1), MgCl₂ (0,5mM), amorces (0,4μmol) et dNTP (0,2mM). Le cycle de température était: 5' à 94°C ; (30'' à 94°, 60'' à 58°, 60'' à 72°) x 35 ; 10' à 72°. Une électrophorèse en gel d'agarose 1,6% a été réalisée pour chaque PCR afin de vérifier les résultats de l'amplification.

Les échantillons amplifiés avec succès ont ensuite été génotypés au moyen d'un séquenceur ABI3100, et en utilisant un marqueur de taille de type LIZ500. Les données ont été analysées en deux lots distincts (ou multiplex) regroupant chacun cinq des loci utilisés.

Table 2. Liste des loci de microsatellites utilisés et indices de diversité génétique en Nouvelle-Calédonie. N est le nombre d'individus génotypés ; k est le nombre d'allèles identifiés ; HWE *p* indique le résultat des tests sur l'équilibre de Hardy-Weinberg ; H_o est le taux d'hétérozygotie ; F_{is} est l'indice de fixation.

| Locus | N | k | HWE <i>p</i> | H _o | F _{is} |
|-------|----|---|--------------|----------------|-----------------|
| B01 | 32 | 3 | 1,000 | 0.375 | -0,163 |
| B02 | 33 | 2 | 1,000 | 0.121 | -0,037 |
| C05 | 33 | 4 | 0.179 | 0.364 | -0,176 |
| D08 | 33 | 4 | 0.020 | 0.394 | 0,624 |
| E04 | 33 | 1 | - | 0.000 | NA |
| E09 | 30 | 4 | 0.050 | 0.733 | -0,143 |
| G11 | 32 | 4 | 0.759 | 0.625 | 0,086 |
| G12 | 33 | 4 | 0,002 | 0.636 | -0,2 |
| H04 | 32 | 4 | 0.863 | 0.594 | 0,238 |
| H09 | 33 | 3 | 0.099 | 0.455 | 0,07 |

3.3. Analyses de données

3.3.1. Préparation des données

Les séquences d'ADNmt obtenues ont été alignées et éditées manuellement en utilisant le logiciel *Geneious* (Drummond et al. 2009). Seules les séquences de haute qualité ont été conservées pour les analyses. En cas d'échec, l'échantillon a été re-amplifié et re-séquencé au minimum une fois. L'inspection visuelle des pics sur chromatogramme a permis d'identifier les sites polymorphiques (i.e., différences dans les séquences entre les différents échantillons) et de déterminer les haplotypes uniques (i.e., les différentes versions d'un même fragment observées parmi les échantillons). Afin de comparer les haplotypes d'Australie long de 411 pb (Blair et al. 2014) aux haplotypes de Nouvelle-Calédonie, les séquences nouvellement obtenues ont été tronquées pour ne conserver que le fragment de 411 pb utilisé par Blair et al. (2014).

Les données de microsatellites issues du séquenceur ont été analysées à l'aide du programme *Peak Scanner* v.1 qui a permis de déterminer le génotype de chaque échantillon pour chacun des 10 loci utilisés. Le logiciel *Microchecker* (Oosterhout et al. 2004) a été utilisé pour détecter et corriger d'éventuelles erreurs dans le jeu de données. Afin de répondre aux conditions d'applications de certaines analyses telles que décrites ci-dessous, nous avons utilisé le programme *Genepop* (Raymond & Rousset 1995) qui permet de déterminer pour chaque locus si la population dévie ou non de l'équilibre de Hardy-Weinberg. Ce programme a également été utilisé pour détecter des déséquilibres de liens entre loci. Une correction de Bonferroni a été appliquée aux tests appariés afin de prendre en compte le biais lié aux comparaisons multiples (Rice 1989).

3.3.2. Calibration des données microsatellites

Contrairement aux séquences d'ADNmt, il n'est pas possible de comparer directement les résultats des génotypages obtenus dans différents laboratoires. Une phase de calibration a donc été nécessaire pour pouvoir comparer ces marqueurs. Il n'était pas possible de l'effectuer dans le laboratoire de JCU où les échantillons australiens avaient été initialement analysés. La calibration entre les échantillons de Nouvelle-Calédonie et ceux d'Australie a donc été réalisée dans le laboratoire du Professeur Associé Jennifer Seddon de l'Université du Queensland, qui travaille sur la génétique des populations de dugongs de la côte Est australienne. Les génotypes de 10 loci sélectionnés ont été analysés sur 16 aliquots d'ADN de dugongs de Nouvelle-Calédonie et 15 échantillons australiens. La comparaison des résultats obtenus par les trois équipes a ainsi permis une calibration entre les deux jeux de données.

Cette seconde analyse des 16 échantillons de Nouvelle-Calédonie par l'Université du Queensland a également permis d'estimer un taux d'erreur pour notre jeu de données de microsatellites.

3.3.3. Structure des populations

L'étude préliminaire avait permis de montrer que la délimitation *a priori* des échantillons australiens en quatre populations (Ouest Australie, Territoires du Nord, Détroit de Torres et Queensland) ne correspondait pas aux résultats de l'analyse Bayésienne de groupage, laquelle regroupait notamment les dugongs des Territoires du Nord et du Détroit de Torres au sein d'une seule et même population (Oremus et al. 2011). C'est pourquoi, pour cette nouvelle étude, nous avons préféré commencer par conduire une nouvelle analyse Bayésienne de groupage (ou 'clustering analyses') avec le programme *Structure* v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000).

Ce type d'analyse a pour but de détecter une éventuelle structure de population dans le jeu de données sans apporter d'information *a priori* sur l'origine

des échantillons. Elle est basée sur les microsatellites et prend donc en compte le flux génétique global provenant des mâles et des femelles. Plusieurs scénarii ont été testés sur l'ensemble des échantillons de Nouvelle-Calédonie et d'Australie afin de rechercher le nombre de populations distinctes qui explique le mieux les données disponibles ($K = 1$ à 6 , où K est le nombre de populations distinctes). Nous avons effectué ces analyses trois fois afin de vérifier l'adéquation des résultats (1.000.000 itérations). Afin de déterminer le scénario le plus probable, nous avons sélectionné les plus hautes valeurs de $\ln P(D)$, qui est une mesure logarithmique de probabilité (P) des données (D) fournie par *Structure*.

Dans un deuxième temps, afin de caractériser précisément le niveau de diversité génétique entre les populations identifiées grâce aux analyses Bayésiennes de groupage, nous avons procédé à des Analyses MOléculaire de la VAriance, ou AMOVA, sur la base des données d'ADNmt et de microsatellites, à l'aide du logiciel *Arlequin* v.3.1.1 (Excoffier et al. 2005). Ces analyses permettent d'estimer le degré de différence génétique entre les groupes ou les populations préalablement identifiés en estimant les valeurs d'indice de différenciation (F_{ST} ou équivalent). Pour l'ADNmt, la différenciation a été estimée avec la valeur F_{ST} conventionnelle basée sur les haplotypes, ainsi qu'avec son équivalent nucléotidique ϕ_{ST} , lequel prend en compte les informations sur la distance génétique entre les haplotypes. Pour les microsatellites, la différenciation a été estimée sur la base des fréquences alléliques (F_{ST}) ainsi qu'avec la mesure de Slatkin spécifique aux microsatellites, R_{ST} . Un test de permutations ($n = 10\,000$) permet d'établir la significativité des différences observées. Étant donnée les différences dans la transmission héréditaire de l'ADNmt et des loci de microsatellite (cf. INTRODUCTION), les AMOVA réalisées ici reflètent soit le flux génétique femelle (pour l'ADNmt), soit le flux génétique global (pour les microsatellites). L'utilisation de ces deux marqueurs offre ainsi une approche complémentaire.

3.3.4. Taux de migration récente

Les taux de migration récente (au cours des deux dernières générations) entre les différentes populations identifiées dans notre jeu de données ont été estimés avec la méthode Bayésienne implémentée dans le programme *BayesAss* v3.0.3 (Wilson & Rannala 2003). Cette analyse se base uniquement sur les données de microsatellites et permet d'estimer les taux asymétriques de migration entre les populations. Dans un premier temps, des analyses préliminaires ont été effectuées tel que recommandé par Rannala (2013). Elles ont pour but d'ajuster les paramètres de mélange MCMC (Markov Chain Monte Carlo) des taux de migration (m), des fréquences alléliques (a) et des coefficients de consanguinité (f) afin que les taux d'acceptation proposés se situent autour de 30%. Une fois ces ajustements effectués, nous avons réalisé cinq analyses similaires avec les paramètres suivant : 'burnin' (b) = 1×10^6 , itérations (i) = 1×10^7 et fréquence d'échantillonnage (n) = 1

000. La convergence des valeurs obtenues entre les cinq analyses a permis d'évaluer l'exactitude des résultats.

3.3.5. Niveau de diversité génétique

Deux indices standards de la diversité génétique ont été estimés pour les séquences de l'ADNmt. Il s'agit de la diversité haplotypique (h) et de la diversité nucléotidique (π). h est une mesure de l'unicité d'un haplotype particulier dans une population donnée. Ainsi, plus h est élevé, plus il y a de chances d'observer des haplotypes différents chez deux individus sélectionnés au hasard. π est également une mesure de la diversité génétique mais elle intègre également le degré réel de différence entre les séquences étudiées. Ainsi, plus les haplotypes présents dans une population sont distants les uns des autres en termes de nombre de sites polymorphiques les différenciant, plus π sera élevé. Cette mesure intègre un caractère évolutif puisque deux séquences présentant une seule paire de base de différence auront un ancêtre commun plus proche que deux séquences avec cinq paires de bases différentes (ce qui n'est pas pris en compte par h). Ces mesures ont été estimées pour l'ensemble des dugongs de Nouvelle-Calédonie ainsi que pour les différentes populations identifiées grâce à l'analyse Bayésienne de groupage. Pour cela nous avons employé le logiciel *Arlequin* (Excoffier et al. 2005).

La diversité génétique présente au niveau des microsatellites a été ici estimée par trois indices : le taux d'hétérozygotie observée (H_O), la richesse allélique (RA) et l'indice de fixation (F_{IS}). L'hétérozygotie observée peut être calculée à partir de la fréquence mesurée des hétérozygotes ; elle correspond au nombre des individus hétérozygotes divisé par le nombre total des individus de l'échantillon. La richesse allélique est un autre indicateur, relatif au nombre d'allèles. Cet indicateur permet de s'affranchir du biais dû aux différences de taille entre les échantillons à comparer. Enfin, le paramètre F_{IS} , dénommé aussi indice de fixation et appelé auparavant coefficient de consanguinité, reflète la différenciation des individus à l'intérieur des populations ($F_{IS} = 1$ signifie fixation complète (cas d'autofécondation), $F_{IS} > 1$: homozygotie excédentaire ou forte consanguinité, $F_{IS} = 0$: population en équilibre de Hardy-Weinberg. $F_{IS} < 0$: hétérozygotie excédentaire). Ces indices ont été calculés au moyen des programmes *Arlequin* et *F_{STAT}* (Goudet 2001). Les moyennes de H_O et RA ont été comparées entre les différentes populations au moyen d'un test de Wilcoxon pour données appariées.

3.3.6. Taille efficace actuelle de la population

La taille efficace d'une population (N_e) est un paramètre génétique important en génétique des populations (Frankham 1995). Elle représente le nombre d'individus d'une population idéale pour lequel on aurait un degré de dérive génétique équivalent à celui de la population réelle. Bien qu'abstrait au premier abord, ce paramètre participe à évaluer le statut de conservation d'une population,

notamment en le comparant à l'abondance réelle de la dite population. Il existe plusieurs types de N_e pouvant illustrer la taille efficace actuelle (contemporaine) ou historique d'une population.

Ici, nous avons estimé la ' N_e ' actuelle de la population de dugongs en Nouvelle-Calédonie avec une méthode basée sur les déséquilibres de lien implémentée dans le programme LDNe (Waples & Do 2008). Pour comparaison, des estimations ont également été faites pour les populations identifiées en Australie. Les fréquences alléliques $< 0,02$ (P_{crit}) ont été exclues de l'analyse afin d'éviter les biais causés par les allèles rares. Ce type de correction permet cependant de conserver une bonne précision des résultats (Waples & Do 2010).

Les individus de notre base de données appartiennent à des cohortes et des classes d'âges différents, entraînant un biais vers le bas des estimations obtenues pour N_e avec ce type d'analyses (Waples et al. 2014). Afin de prendre en compte ce biais, nous avons appliqué une correction de 15% à nos estimations, ce qui correspond approximativement au biais observé par Waples et al. (2014) chez le grand dauphin commun, une espèce avec des traits d'histoire de vie proche de ceux du dugong.

3.3.7. Test de « bottleneck »

Des tests ont été réalisés sur les données de microsatellites et d'ADNmt pour détecter une réduction historique de la diversité génétique qui serait liée à une diminution importante de la taille de la population de dugongs en Nouvelle-Calédonie. L'intérêt d'utiliser plusieurs méthodes réside dans le fait que différents tests présentent différents niveaux d'efficacité en fonction de la sévérité, la durée et la date de l'événement de « bottleneck ».

Sur la base des données de microsatellite, nous avons d'abord réalisé le test unilatéral de Wilcoxon, développé dans le programme *Bottleneck* v.1.2.02 (Luikart et al. 1998). Il permet de détecter un excès d'hétérozygotie tel qu'on peut s'y attendre en cas de réduction drastique des effectifs dans une population. Plusieurs modèles de mutations ont été testés, notamment le modèle le plus réaliste pour les microsatellites dit TPM (two-phase models) pour lequel différents paramétrages ont été utilisés. Ce test est généralement performant pour détecter des 'bottlenecks' récents (de l'ordre d'une douzaine de générations, Luikart et al. 1998). Nous avons également utilisé le test *M-Ratio* (Garza & Williamson 2001), basé sur le rapport entre le nombre d'allèles pour un locus donné et l'étendue de taille de ces allèles.

Avec les séquences d'ADNmt, nous avons effectué les tests de neutralité de Tajima (Tajima 1989) et de Fu (Fu 1997) sur les séquences d'ADNmt, au moyen du logiciel *DNA_{sp}* v5.10.01. Ces deux tests peuvent permettre de détecter si la population a connue une réduction et/ou une augmentation soudaine de ses effectifs au cours de son histoire évolutive. Ce type d'événements est intéressant à identifier

car il fait généralement suite à une réduction massive des effectifs ou à un événement fondateur, c'est-à-dire la colonisation d'un habitat.

3.3.8. Réseau des haplotypes mitochondriaux

Afin de visualiser la répartition géographique de la diversité génétique au niveau mitochondrial, nous avons construit un réseau haplotypique avec le logiciel *Network* v.4.6.1.3 (Bandelt et al. 1999) regroupant toutes les séquences de Nouvelle-Calédonie et d'Australie. Cette analyse vise notamment à confirmer l'existence de deux grandes lignées mitochondriales au sein des populations australiennes, tel que décrit par Blair et al. (2014). Elle vise également à confirmer le positionnement des dugongs calédoniens au sein de ces lignées (Oremus et al. 2011). Ces informations permettent d'établir des scénarii possibles d'histoire démographique de la population de dugongs en Nouvelle-Calédonie (cf. analyses ABC ci-dessous). La répartition de la diversité génétique d'une même population au sein d'un réseau haplotypique apporte également des informations sur son histoire démographique. Ainsi, une augmentation importante des effectifs survenue il y a plusieurs générations peut être détectée grâce à cette méthode.

3.3.9. Analyses de calculs Bayésiens approximatifs (ou ABC)

Afin d'explorer l'origine évolutive la plus probable de la population de dugong en Nouvelle-Calédonie vis-à-vis des populations australiennes, nous avons mené des analyses de calculs Bayésiens approximatifs (ou analyse ABC) avec le programme DiyABC (Cornuet et al. 2014). Ces analyses permettent de combiner les données de microsatellites et les séquences d'ADNmt et d'obtenir ainsi une meilleure précision.

Nous avons tenté de déterminer la topologie la plus probable entre les populations telles qu'identifiées par l'analyse Bayésienne de groupage. Pour cela nous avons testé des scénarios de topologies variés tels qu'illustrés par la Figure 1, l'objectif principal étant de déterminer de quelle population australienne la population de Nouvelle-Calédonie est la plus proche.

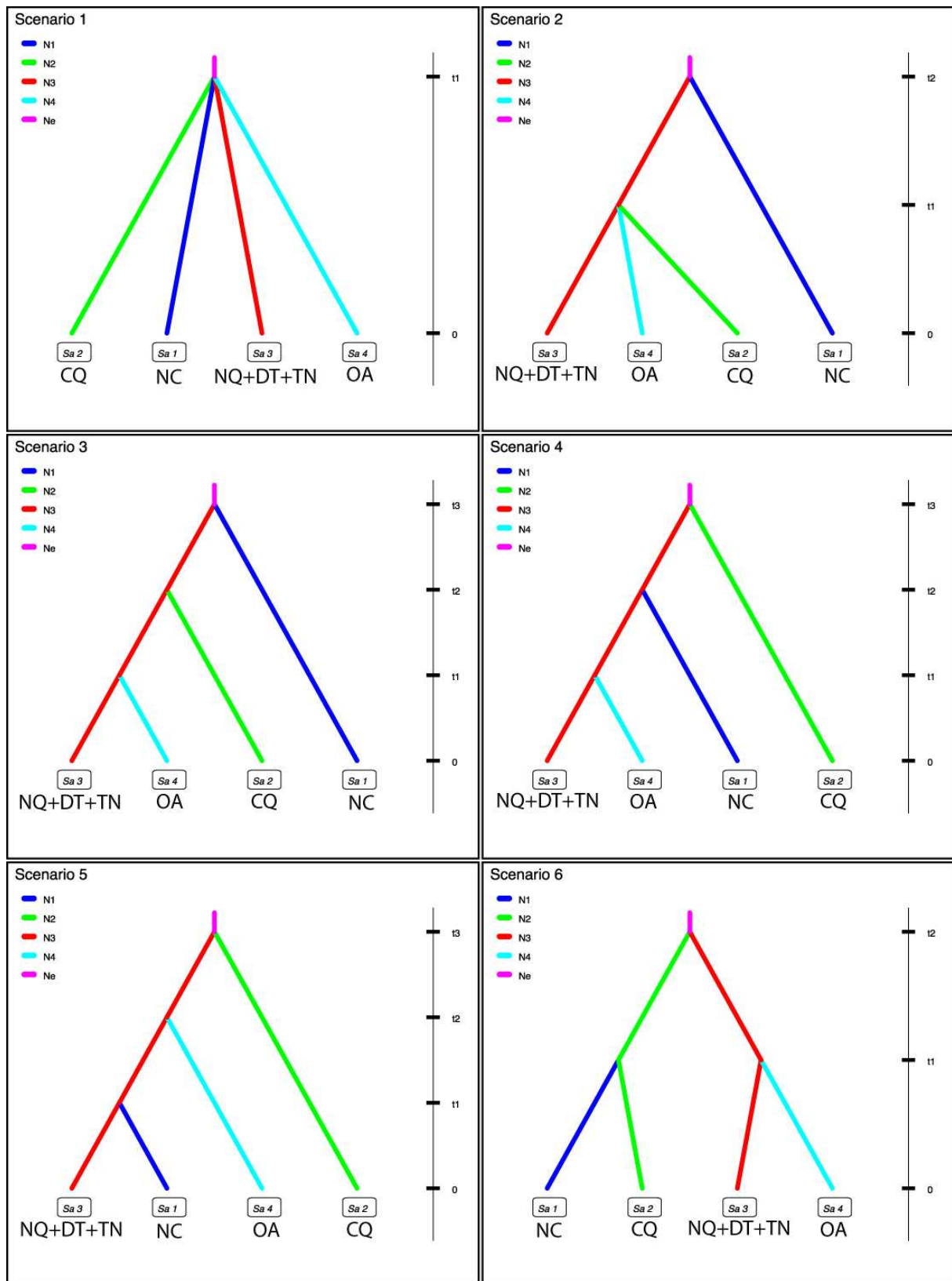


Figure 1. Scénarios d'histoire démographique des populations de dugongs d'Australie et de Nouvelle-Calédonie testés par analyses de calculs Bayésiens approximatifs avec le logiciel DiyABC.

4. RESULTATS

4.1. Données disponibles

4.1.1. Extractions d'ADN et séquençage de l'ADNmt

L'ADN des 25 nouveaux échantillons de tissu disponibles pour la Nouvelle-Calédonie a été extrait sans difficulté. Les concentrations et indices de pureté des ADN extraits, tel que révélés par l'analyse spectrophotométrique, montrent dans l'ensemble des valeurs satisfaisantes (Table 1).

Toutes les séquences d'ADNmt obtenues pour ces nouveaux échantillons sont de bonne qualité. Le plus grand fragment disponible d'une longueur d'environ 550pb comprend la séquence de 411pb utilisée par Blair et al. (2014).

Quatre haplotypes (A, B, E et F), définis par quatre sites polymorphiques, ont été identifiés parmi les 37 échantillons de peau de Nouvelle-Calédonie. Ces quatre sites polymorphiques sont situés dans le fragment de 411bp de Blair et al. (2014). Par conséquent, le fait de tronquer nos séquences pour ne considérer que le fragment de 411bp dans les analyses suivantes n'induit pas de perte d'information au niveau des ADNmt de Nouvelle-Calédonie.

4.1.2. Génotypage des microsatellites

Au total, 33 des 37 échantillons de peau de Nouvelle-Calédonie ont fourni des données de microsatellite suffisantes pour être utilisées dans les analyses qui suivent. En moyenne, 9,5 loci sur les 10 analysés ont été génotypés avec succès. L'analyse effectuée avec le programme *Microchecker* n'a pas détecté d'erreur potentielle dans le jeu de données, hormis la présence possible d'allèles nuls pour le locus D08, qui avait déjà été observée avec les seules données de l'étude préliminaire (Oremus et al. 2011). Un allèle nul est un allèle dont l'amplification a échoué et qui peut donc faire apparaître comme homozygote un individu étant en fait un hétérozygote.

Le test de Hardy-Weinberg implémenté dans *Genepop* indique que les loci utilisés sont en équilibre à l'exception de G12 et, dans une moindre mesure, de D08 Table 2. La raison de ce possible déséquilibre n'est pas connue. Dans le cas de D08, ce déséquilibre pourrait être dû à la présence d'allèles nuls. Les résultats des analyses suivantes menées avec ou sans ces loci ne présentant aucune différence notable ; nous les avons donc conservés pour réaliser les analyses dont les résultats sont présentés ci-dessous. Le locus E04 s'est révélé mono morphique sur l'ensemble des échantillons de Nouvelle-Calédonie ce qui signifie qu'il ne présente qu'un seul allèle. Aucun déséquilibre de liens entre loci n'a été détecté par le programme *Genepop*.

4.1.3. Calibration et estimation du taux d'erreur

La comparaison d'un sous échantillon de données de génotypage obtenues pour les dugongs de Nouvelle-Calédonie et d'Australie par J. Seddon au laboratoire de l'Université du Queensland (Australie) a permis d'effectuer une calibration sans ambiguïté de 8 des 10 loci utilisés. Pour la plupart des locus une correction de 3 à 4 pb a dû être appliquée pour faire correspondre les génotypes des deux jeux de données. En revanche, la calibration de deux loci (D08 et G11) s'est révélée plus problématique. A ce stade, le problème, qui n'a pas été identifié précisément, semble lié aux données provenant de JCU. Il sera probablement nécessaire d'effectuer de nouvelles vérifications avant de pouvoir calibrer avec confiance les génotypes obtenus par les deux équipes sur ces deux loci. Pour l'heure, il a été décidé de les exclure des analyses nécessitant une comparaison directe entre les génotypes de Nouvelle-Calédonie et ceux d'Australie (ex : analyse Bayésienne de groupage) mais ils ont été conservés pour les comparaisons indirectes (ex : niveau de diversité génétique).

En outre, l'analyse de réplicas d'un certain nombre d'échantillons de Nouvelle-Calédonie a permis d'obtenir estimation du taux d'erreur de génotypage au sein de notre jeu de données. Ce taux d'erreur est estimé à 1,5% (c'est-à-dire 5 erreurs pour 317 génotypes analysés en double).

4.2. Connectivité avec les populations australiennes

4.2.1. Analyse Bayésienne de groupage

L'analyse Bayésienne de groupage réalisée avec le programme *Structure* à partir de tous les échantillons (Nouvelle-Calédonie et Australie) indique clairement l'existence de plusieurs populations distinctes (Figure 2). Ainsi dans un scénario permettant l'existence de deux populations distinctes ($K = 2$), les dugongs de Nouvelle-Calédonie (NC) sont regroupés avec ceux du Centre Queensland (CQ) tandis que les dugongs du Nord Queensland (NQ), du Détroit de Torres (DT), des Territoires du Nord (TN) et de l'Ouest Australien (OA) se regroupent dans une seconde population. Dans un scénario permettant l'existence de trois populations distinctes ($K = 3$), les dugongs de NC forment une population distincte de celle du CQ, l'autre population restant identique. Dans un scénario permettant l'existence de quatre populations distinctes ($K = 4$), les dugongs de l'OA se séparent du groupe NQ+DT+TN, les autres populations restent inchangées (Figure 2). Les scénarios testant $K > 4$ ne permettent pas de mettre en évidence des découpages supplémentaires (ex : $K = 5$, Figure 2).

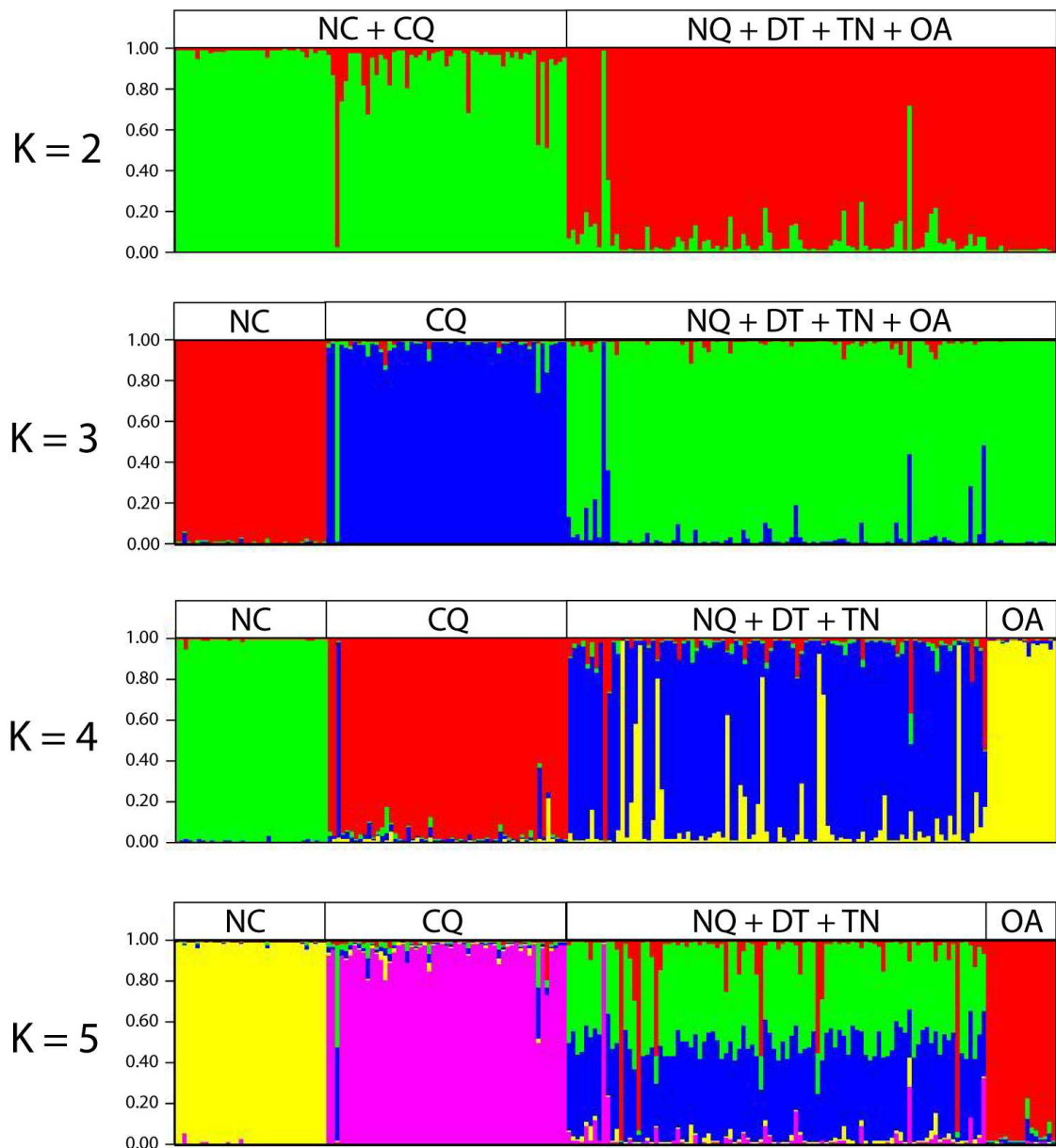


Figure 2. Résultats de l'analyse Bayésienne obtenus sur la base des scénarios K = 2 à 5. NC : Nouvelle Calédonie ; CQ : Centre Queensland ; NQ : Nord Queensland ; DT : Détroit de Torres ; TN : Territoires de Nord ; OA : Ouest Australie.

Les plus hautes valeurs de $\ln P(D)$ censées représenter le scénario le plus probable sont obtenues pour le scénario K = 4 (Annexe 1) dans lequel les dugongs de Nouvelle-Calédonie se détachent clairement des dugongs d'Australie, qui eux-mêmes constituent trois populations. Ce résultat, ainsi que les autres paramètres estimés par *Structure* restent stables pour l'ensemble des analyses répétées trois fois selon chaque scénario (Annexe 1).

4.2.2. Analyse moléculaire de la variance

Une AMOVA a permis de caractériser le niveau de connectivité entre les dugongs de Nouvelle-Calédonie et ceux d'Australie. Pour cela le jeu de données a été découpé en quatre populations selon le scénario $K = 4$ proposé par *Structure*.

Globalement, un fort niveau de différenciation génétique a été trouvé entre les quatre populations considérées sur la base du marqueur de l'ADNmt ($F_{ST} = 0.284$, $p < 0,001$; $\phi_{ST} = 0,496$, $p < 0,001$). La comparaison des populations une à une montre également qu'elles sont toutes significativement différentes les unes des autres (Table 3). Les plus fortes valeurs de F_{ST} sont observées entre la Nouvelle-Calédonie et les trois populations australiennes, sans différence notable entre ces valeurs. Les valeurs obtenues entre les populations australiennes sont plus faibles, en particulier entre OA et TN+DT+NQ, mais elles restent néanmoins significatives. Les valeurs de ϕ_{ST} révèlent un schéma sensiblement différent. Les valeurs entre la Nouvelle-Calédonie demeurent importantes avec une différenciation un peu plus forte avec CQ. Entre les populations australiennes, les valeurs de ϕ_{ST} sont également élevées avec une différenciation un peu moins marquée entre CQ et TN+DT+NQ.

Table 3. Valeurs de F_{ST} (sous la diagonale) et ϕ_{ST} (au-dessus de la diagonale) basées sur l'ADNmt entre la Nouvelle-Calédonie et les trois populations de dugongs identifiées en Australie (***) indique $p < 0,001$).

| | NC | OA | CQ | TN+DT+NQ |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| NC | - | 0,487*** | 0,734*** | 0,510*** |
| OA | 0,492*** | - | 0,651*** | 0,430*** |
| CQ | 0,496*** | 0,153*** | - | 0,125*** |
| TN+DT+NQ | 0,426*** | 0,082*** | 0,137*** | - |

La même analyse (AMOVA) a été conduite sur les données issues des microsatellites afin d'estimer le flux génétique global (mâles et femelles). Comme pour l'ADNmt, un fort niveau de différenciation génétique est globalement observé entre les quatre populations ($F_{ST} = 0.177$, $p < 0,001$; $R_{ST} = 0,187$, $p < 0,001$). Les résultats montrent une différenciation génétique importante au niveau nucléaire entre la Nouvelle-Calédonie et les différentes régions d'Australie, particulièrement avec l'OA (Table 4). Les valeurs de F_{ST} et R_{ST} sont globalement proches.

Table 4. Valeurs de F_{ST} (sous la diagonale) et R_{ST} (au-dessus de la diagonale) basées sur les microsatellites entre la Nouvelle-Calédonie et les trois populations d'Australie (***) indique $p < 0,001$).

| | NC | OA | CQ | TN+DT+NQ |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| NC | - | 0,522*** | 0,253*** | 0,307*** |
| OA | 0,407*** | - | 0,192*** | 0,087*** |
| CQ | 0,230*** | 0,180*** | - | 0,083*** |
| TN+DT+NQ | 0,290*** | 0,086*** | 0,095*** | - |

4.2.3. Taux de migration asymétrique récente

Les estimations de taux de migration obtenues avec le programme *BayesAss* sont similaires pour chacune des cinq analyses effectuées. Par conséquent, nous présentons ici les résultats d'une seule analyse (Table 5). Les estimations du taux de migration récente entre les différentes populations sont faibles (< 3% de migrants par génération), et un taux de migration nulle (valeur 0) est systématiquement inclus dans l'intervalle de confiance à 95%. Cette analyse ne permet donc pas de détecter de mouvement significatif de migrant entre les populations considérées et notamment entre les populations australiennes et la population de Nouvelle-Calédonie.

Table 5. Moyenne (et intervalle de confiance à 95%) des taux de migration asymétrique récente estimée avec *BayesAss*. Le taux de migration représente la proportion d'individus d'une population qui a immigré à partir d'une population source par génération. Les valeurs de la diagonale représentent la proportion de non-immigrants dans une population.

| De/Vers | NC | CQ | TN | OA |
|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| NC | 0,974 (0,947-1,000) | 0,009 (0,000-0,025) | 0,009 (0,000-0,025) | 0,009 (0,000-0,025) |
| CQ | 0,006 (0,000-0,017) | 0,973 (0,949-0,997) | 0,016 (0,000-0,035) | 0,006 (0,000-0,017) |
| TN | 0,004 (0,000-0,011) | 0,014 (0,000-0,032) | 0,962 (0,933-0,991) | 0,020 (0,000-0,043) |
| OA | 0,017 (0,000-0,048) | 0,017 (0,000-0,049) | 0,027 (0,000-0,070) | 0,939 (0,881-0,997) |

4.3. Niveau de diversité génétique

4.3.1. Indices classiques de diversité génétique

L'analyse de la diversité génétique a révélé d'importantes différences entre les dugongs de Nouvelle-Calédonie et ceux d'Australie tant au niveau de l'ADNmt que de l'ADN nucléaire. Le nombre d'haplotypes présents dans la population de Nouvelle-Calédonie est nettement inférieur à celui existant dans chacune des quatre populations australiennes (Table 6). Parmi les quatre haplotypes identifiés en Nouvelle-Calédonie, trois ne sont représentés que par un seul individu (haplotypes B, E et F ; Table 1). Les 38 individus restant partagent tous le même haplotype majoritaire: l'haplotype A. Aucun de ces quatre haplotypes n'est représenté dans les populations australiennes.

Les indices de diversité haplotypique (h) et nucléotidique (π) montrent également une différence importante du niveau de diversité génétique des dugongs de Nouvelle-Calédonie par rapport à ceux d'Australie. En revanche, les différences sont moindres au sein des populations australiennes. On notera tout de même que la population TN+DT+NQ présente une diversité nucléotidique sensiblement supérieure aux populations CQ et OA.

Table 6. Indices de diversité génétique de l'ADNmt pour la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie et pour celles d'Australie. h est la diversité haplotypique et π est la diversité nucléotidique.

| | Nombre d'échantillons | Nombre d'haplotypes | h | π |
|---------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|----------------------|
| Nouvelle-Calédonie | 41 | 4 | 0.154 +/- 0.078 | 0,04 +/- 0,06 |
| OA | 28 | 15 | 0.926 +/- 0.028 | 1,11 +/- 0,63 |
| TN+DT+NQ | 66 | 24 | 0.903 +/- 0.026 | 2,16 +/- 1,12 |
| CQ | 63 | 15 | 0.774 +/- 0.044 | 1,52 +/- 0,81 |

Une tendance similaire a été observée pour la diversité génétique de l'ADN nucléaire avec un nombre d'allèles inférieur pour les loci de microsatellite (moyenne = 3,1) au sein de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie par rapport à celles d'Australie (Table 7). La plus faible diversité génétique observée en Nouvelle-Calédonie s'exprime aussi au niveau des taux d'hétérozygotie et des richesses alléliques. Concernant ces deux derniers paramètres, des tests de Wilcoxon confirment une différence significative des niveaux de diversité génétique entre la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie et celles d'Australie (Table 8). En revanche, la plupart des comparaisons effectuées entre les populations australiennes ne montrent pas de différence significative.

Table 7. Indice de diversité des microsatellites pour la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie et celles d'Australie. H_o est le taux d'hétérozygotie ; RA est la richesse allélique ; F_{IS} est l'indice de fixation, les valeurs entre parenthèses représentent les écart-types.

| | Nombre d'échantillons | Nombre d'allèles moyen | H_o | RA | F_{IS} |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|------------------|--------------|
| Nouvelle-Calédonie | 33 | 3,1 (1,1) | 0,434 (0,265) | 2,9 (1,0) | 0,030 |
| OA | 16 | 6,1 (2,0) | 0,717 (0,245) | 6,1 (1,9) | 0,068 |
| TN+DT+NQ | 82 | 11,1 (4,2) | 0,802 (0,106) | 8,1 (3,0) | 0,025 |
| CQ | 63 | 8,5 (3,0) | 0,737 (0,109) | 6,4 (1,7) | 0,030 |

L'indice de fixation estimé pour la Nouvelle-Calédonie est proche de 0 ($F_{IS} = 0,03$) et n'est pas significativement différent des valeurs attendues pour une population à l'équilibre de Hardy-Weinberg. La population ne présente donc pas de signe de consanguinité. Des résultats similaires ont été obtenus pour chacune des populations identifiées en Australie (Table 8).

Table 8. Comparaison par tests de Wilcoxon des niveaux d'hétérozygotie des populations de dugongs de Nouvelle-Calédonie et d'Australie (au dessus de la diagonale) et des richesses alléliques (au-dessous de la diagonale). *** : $p < 0,001$; * : $p < 0,05$; ns : non significatif.

| | NC | CQ | NT+DT+NQ | OA |
|----------|-----|----|----------|-----|
| NC | - | ns | *** | *** |
| CQ | *** | - | ns | ns |
| NT+DT+NQ | *** | ns | - | ns |
| OA | *** | ns | * | - |

4.3.2. Taille effective contemporaine de population

L'estimation de N_e pour la Nouvelle-Calédonie suggère une taille effective de population de seulement quelques dizaines d'individus (Table 9). Une estimation relativement similaire a été obtenue pour OA, tandis que l'estimation pour CQ se trouve être environ deux fois plus importante. Cependant les intervalles de confiance obtenus pour ces deux dernières se chevauchent. En revanche, il semble clair que la population TN+DT+NQ possède une N_e beaucoup plus importante que les autres populations puisque sa limite inférieure à 95% se trouve bien au-delà des limites supérieures de OA et CQ.

On remarque que l'analyse n'a pas permis de définir la limite supérieure des intervalles de confiance à 95% pour les populations de NC et de TN+DT+NQ. Du fait que cet intervalle a pu être calculé pour OA avec un même nombre de loci analysés mais avec un plus petit échantillon ($N = 16$), il est probable que l'incapacité à déterminer cette limite pour la population de NC soit due à une diversité génétique plus faible. En ce qui concerne la population TN+DT+NQ, cette incapacité est moins surprenante car plus la taille effective d'une population est importante et plus le nombre de données nécessaire est important pour obtenir une estimation précise de N_e et de son intervalle de confiance.

Table 9. Estimation des tailles effectives contemporaines des populations de dugongs obtenues avec le programme LDNe corrigé à +15%.

| | LDNe |
|----------|-------------------------|
| NC | 37 (28-indéfini) |
| OA | 43 (21-232) |
| CQ | 83 (58-133) |
| TN+DT+NQ | 914 (383-indéfini) |

4.4. Histoire démographique et origine évolutive de la population

4.4.1. Test de réduction des effectifs en Nouvelle-Calédonie

La signature d'un effet de goulot d'étranglement est uniquement détectée dans la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie avec le programme *Bottleneck* sous certaines conditions ($p < 0,05$; TPM : variance = 30, probabilité = 60%). Cependant, l'utilisation de paramètres sensiblement différents (TPM : variance = 30, probabilité = 70%), amène à conclure que le taux d'hétérozygotie dans la population n'est pas significativement différent à 95% de celui attendu pour une population à l'équilibre ($p = 0,08$).

En revanche, l'utilisation de la méthode *M-Ratio* suggère clairement une diminution des effectifs au cours des générations passées puisque la valeur observée $M = 0,627$ est inférieure à la valeur critique simulée à partir de populations à l'équilibre, $M_c = 0,775$. Elle est également inférieure à 95% des valeurs simulées pour des populations à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Les résultats des tests de neutralité de Fu et de Tajima indiquent également une déviation significative avec, respectivement, $F_s = -3,79$ ($p > 0,01$) et $D = -1,72$ ($p < 0,05$).

4.4.2. Relation généalogique des ADNmt

Le réseau haplotypique basé sur les séquences d'ADNmt de 411 pb illustre bien la présence des deux lignées mitochondriales distinctes au sein des populations australiennes : la lignée dite « widespread » représentée par des dugongs de chacune des trois populations identifiées en Australie, et la lignée dite « restricted » représentée que par des dugongs des populations CQ et TN+DT+NQ (Blair et al. 2014) (Figure 3). Les haplotypes identifiés pour les dugongs de Nouvelle-Calédonie sont très clairement regroupés avec ceux de la lignée « widespread ».

Les quatre haplotypes calédoniens ne diffèrent les uns des autres que par une seule paire de bases. L'agencement et la fréquence de ces haplotypes présentent une structure, dite « en étoile », avec l'haplotype majoritaire au centre.

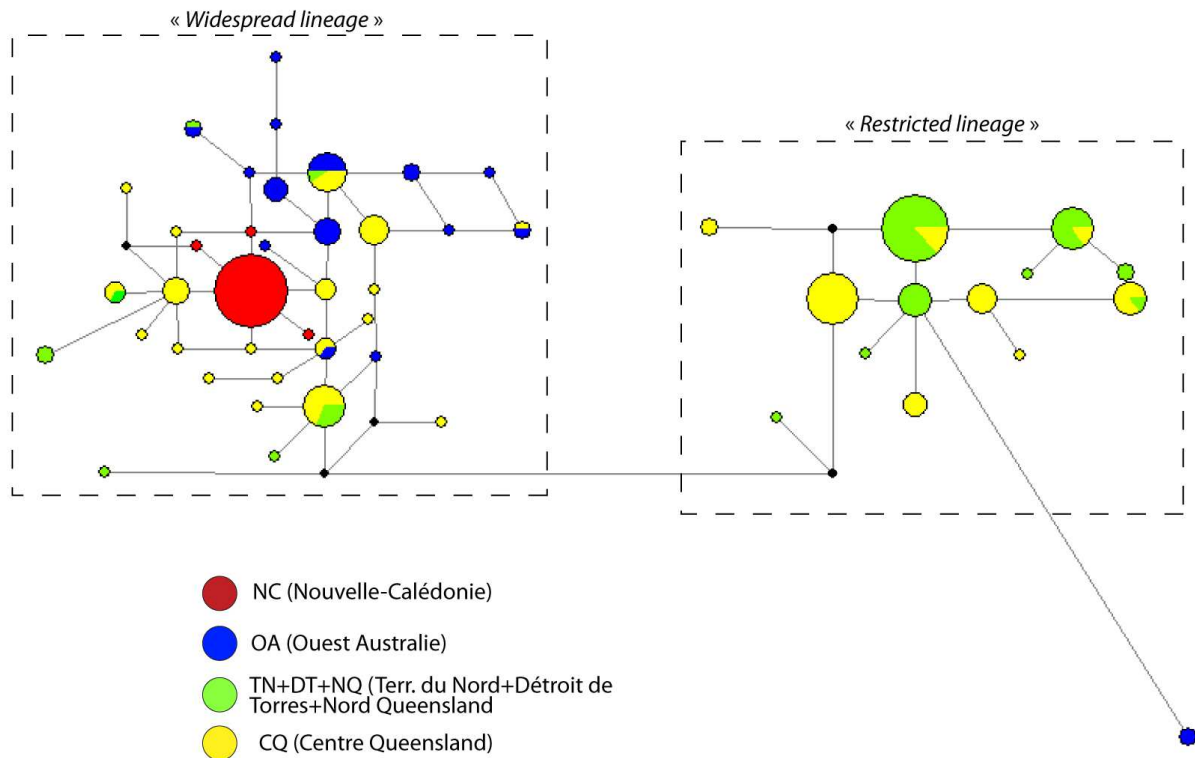


Figure 3. Réseau haplotypique de type « median-joining » avec l'ensemble des données d'ADNmt.

4.4.3. Analyses ABC

Afin de définir l'origine évolutive la plus probable entre la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie et les populations australiennes, nous avons testé six scénarios (ou topologies) différents (Figure 1). Parmi ces scénarios, le scénario 6 correspond le mieux aux données observées, avec une probabilité Ppr de 74,5% (Intervalle de confiance 95% : [67,7 – 81,2]) (Figure 4). Ce scénario suppose que la population NC ait été créée à partir de la population CQ, tandis que la population OA serait issue de la population NQ+DT+TN. Ces deux ensembles se seraient eux même séparés à une date antérieure. La probabilité du scénario 5 est également non négligeable (Ppr = 20,5% [1,3 – 39,7]) mais elle reste beaucoup plus faible que celle obtenue pour le scénario 6. Tous les autres scénarios ont une probabilité inférieure à 3%.

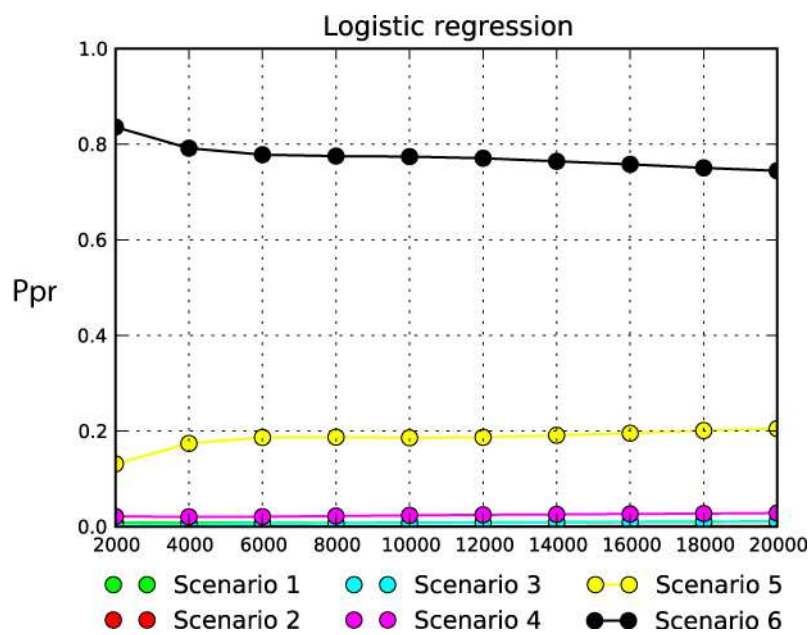


Figure 4. Évaluation de la probabilité des scénarios d'histoire démographique des populations de dugongs d'Australie et de Nouvelle-Calédonie testés par analyses de calculs Bayésiens approximatifs.

5. DISCUSSION

5.1. *Taille d'échantillon et qualité des données*

Cette étude s'inscrit dans un large programme de recherche visant à accroître les connaissances sur le statut de conservation de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie. L'étude génétique préliminaire menée en 2011 avait permis de mettre en évidence un degré d'isolement manifeste entre la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie et celles, plus importantes, d'Australie (Oremus et al. 2011) mais certaines analyses, conduites sur un petit nombre d'échantillons, limitaient la précision des résultats.

L'apport d'un nombre important d'échantillons, issus du projet de balisage conduit dans le cadre de la thèse de C. Cleguer mais également de récents échouages, a permis de constituer un jeu de données permettant d'obtenir des résultats plus précis. Le nombre d'échantillons pour lesquels des génotypes ont été obtenus a été multiplié par trois alors que celui permettant l'obtention de séquences d'ADNmt l'a été par deux. La taille des haplotypes utilisés au cours de cette étude est supérieure à celle utilisée au cours de l'étude préliminaire (411 vs. 292 pb).

La réalisation d'une calibration fiable entre les données de génotypage de JCU pour les dugongs d'Australie et celles d'OC pour les dugongs de Nouvelle-Calédonie a permis de confirmer quelques erreurs sur les analyses des microsatellites de l'étude préliminaire. Ce biais, lié à la calibration très sommaire réalisée en 2011, avait d'ailleurs été envisagé à l'époque (Oremus et al. 2011). Le fait qu'il n'ait pas été possible de calibrer deux des 10 loci analysés malgré la comparaison de plus de 30 échantillons, illustre bien la difficulté de ce type d'analyse néanmoins indispensable à la comparaison de données issues de laboratoires différents.

Le taux d'erreur de génotypage estimé pour cette étude est faible et équivalent à ceux d'études similaires (ex : Louis et al. 2014). Il est hautement improbable qu'il entraîne des erreurs d'interprétations des résultats d'autant plus que nos analyses se basent sur les fréquences alléliques à l'échelle des populations, c'est-à-dire sur des analyses moins sensibles à ce type d'erreur que, par exemple, les analyses de parenté.

5.2. *Une population isolée génétiquement*

Nous avons constaté que le groupement ou la dissociation d'échantillons de dugongs provenant de certaines régions sur la simple base de critères géographiques pouvait s'avérer en contradiction avec la structure réelle des populations. Ce type d'erreur est d'autant plus dommageable que la majorité des

analyses effectuées nécessitent un classement *a priori* des échantillons en populations distinctes. C'est pourquoi il nous a semblé préférable de débiter l'étude par une analyse Bayésienne de groupage.

Les résultats de cette analyse rejoignent en partie ceux obtenus lors de l'étude préliminaire (Oremus et al. 2011). Le scénario le plus probable considère quatre populations distinctes (Figure 2): la Nouvelle-Calédonie (NC), le Centre Queensland (CQ), l'Ouest Australien (OA) et le groupement des régions Nord Queensland, Détroit de Torres et Territoires du Nord (NQ+DT+TN). En revanche, on remarque que lorsque le scénario $K = 3$ est considéré, les individus de l'OA rejoignent le groupe NQ+DT+TN. Dans l'étude initiale, un schéma différent avait été obtenu pour $K = 3$, où les individus de NC se regroupaient avec ceux des régions NQ+DT+TN. Ce résultat pouvait suggérer une connexion ancestrale entre ces deux régions. Cependant, cela était vraisemblablement dû au trop faible nombre d'échantillons provenant de Nouvelle-Calédonie et utilisés pour l'analyse. Nous considérons maintenant qu'il s'agissait d'une erreur.

L'analyse moléculaire de la variance effectuée entre les quatre populations confirme très clairement un flux génique faible ou inexistant entre ces régions. Ceci signifie qu'il y a peu ou pas d'échanges reproductifs entre ces populations. Au niveau mitochondrial (Table 3), les plus forts niveaux de différenciation sont obtenus entre la population de Nouvelle-Calédonie et les populations australiennes. Cela pourrait s'expliquer par une absence totale de flux génique lié aux femelles entre la Nouvelle-Calédonie et ces régions alors que quelques échanges de femelles pourraient persister entre les populations australiennes. Il est également possible que l'histoire démographique des dugongs de Nouvelle-Calédonie (cf. ci-dessous) influe sur les valeurs actuelles de différenciation, en particulier au niveau de l'ADNmt.

Ces conclusions s'appliquent également aux données microsatellitaires (Table 4). Les résultats de l'AMOVA témoignent d'un niveau de différenciation plus important entre la population de Nouvelle-Calédonie et celle de l'Ouest Australien qu'entre la Nouvelle-Calédonie et les deux autres populations australiennes, suggérant un flux génique plus réduit entre les deux premières. Ce résultat n'est pas surprenant étant donné que ces deux populations sont les plus éloignées géographiquement. Il faut cependant noter que cela n'implique pas que la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie maintienne des échanges avec celles du Centre Queensland ou de l'ensemble Nord Queensland + Détroit de Torres + Territoires du Nord. En effet, la différence entre les valeurs de F_{ST} ou R_{ST} peut simplement refléter une persistance plus ou moins ancienne dans le temps de l'absence de flux génique entre deux régions. Ainsi, les valeurs de différenciation plus importantes entre la population de Nouvelle-Calédonie et celle de l'Ouest Australien peuvent indiquer une séparation plus ancienne qu'entre la population de Nouvelle-Calédonie et les deux autres populations australiennes.

Afin de mieux appréhender cette question, nous avons estimé les taux de migration récente entre les quatre populations de dugongs, lesquels reflètent les

échanges entre populations à l'échelle des dernières générations (une ou deux). Les résultats indiquent que chacune des quatre populations a été sujette à un niveau très faible d'émigration et d'immigration au cours des dernières générations. Cette tendance est d'autant plus marquée pour la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie que l'intervalle de confiance supérieur de la proportion de non-immigrants atteint la valeur de 1 et que tous les intervalles de confiance inférieurs des taux de migration avec les autres populations incluent la valeur 0 qui indique une absence d'échange.

Ces analyses confirment donc de façon très claire, l'isolement extrême de la population de dugongs en Nouvelle-Calédonie par rapport aux grandes populations australiennes. Par conséquent, il est fort probable que ces dernières ne constituent pas un réservoir potentiel d'individus susceptibles de rejoindre la population de Nouvelle-Calédonie pour en augmenter ses effectifs et sa diversité génétique.

5.3. Faible diversité génétique

La présente étude confirme que le niveau de diversité génétique de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie est significativement inférieur à celui observé au sein de chacune des trois populations australiennes. L'indice le plus flagrant de cette différence est le nombre d'haplotypes de l'ADNmt détecté dans chaque population. Seuls quatre haplotypes ont été identifiés en Nouvelle-Calédonie, tandis qu'un minimum de 15 a été trouvé dans chacune des populations australiennes. Il faut cependant préciser que l'exclusion pour la présente étude de certains échantillons de dent ou d'os ($n = 8$) a mené à ne pas répertorier dans ce rapport deux haplotypes, détectés dans l'étude préliminaire à partir d'une courte séquence de l'ADNmt (haplotypes C et D, 292 pb, Oremus et al. 2011). Cette exclusion n'affecte en rien les conclusions présentées ici. En effet, l'écrasante majorité des individus ($n = 38$) sont porteurs du même haplotype, A, et c'est ce qui induit la faible diversité de l'ADNmt observée en Nouvelle-Calédonie. De plus, tous les haplotypes néo-calédoniens autres que l'haplotype A diffèrent de ce dernier par seulement une paire de bases, là où chacune des populations australiennes est porteuse d'haplotypes plus variables les uns par rapport aux autres (Figure 3). Cela se traduit par une diversité haplotypique et nucléotidique beaucoup plus faible de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie (Table 7).

Ce schéma de l'ADNmt s'explique en partie par l'histoire démographique de la population (cf. ci-dessous). Les microsatellites sont sujets à un taux de mutation plus rapide que l'ADNmt, le niveau de diversité de ces marqueurs ne reflète donc pas la même chose. Néanmoins, on constate que les indices estimés à partir des microsatellites indiquent également et sans équivoque un niveau de diversité bien plus faible pour la population de Nouvelle-Calédonie que pour celles d'Australie (Table 8). Le meilleur indice reflétant cette tendance est certainement la richesse

allélique (RA) qui prend en compte la taille de chacun des échantillons. Cette valeur deux fois plus faible en Nouvelle-Calédonie, montre une différence statistiquement significative avec les trois populations australiennes. Ce résultat n'est pas surprenant puisque la diversité génétique d'une population est indirectement liée à sa taille et que la population de Nouvelle-Calédonie possède un effectif bien inférieur à celles des populations australiennes (Garrigue et al. 2008). Seule une dynamique de métapopulation aurait pu permettre le maintien d'un niveau de diversité génétique plus important en Nouvelle-Calédonie. Une métapopulation est un réseau de plusieurs populations indépendantes démographiquement ce qui signifie que les fluctuations subies par chacune d'entre elles n'affectent pas significativement les autres mais que ces populations restent connectées à l'échelle évolutive par un certain niveau de flux génique pouvant générer une diversité intra-population plus importante qu'attendue. Ainsi, dans l'hypothèse où la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie ait appartenu à une métapopulation incluant les populations australiennes, une plus grande diversité génétique aurait pu être observée en Nouvelle-Calédonie. Ce n'est vraisemblablement pas le cas comme le suggère également les forts niveaux de différenciation génétique et les faibles taux de migration estimés plus haut.

En dépit de la faible diversité génétique estimée, aucun signe de consanguinité (F_{IS}) n'a été décelé dans la population de Nouvelle-Calédonie. Ce paramètre est important pour évaluer le statut de conservation d'une population car des études ont montré qu'un niveau de consanguinité élevé pouvait entraîner une diminution du succès reproducteur (Hedrick & Kalinowski 2000).

Les estimations de taille effective contemporaine de populations constituent également un indice important de la diversité génétique de la population. Pour la population de Nouvelle-Calédonie, la petite taille effective de population (N_e) est sans comparaison avec la taille réelle de la population, ce qui peut entraîner des conséquences importantes sur la conservation de la population dans le futur. En effet, une population isolée présentant une $N_e < 100$ sera probablement sujette à des problèmes de dépression de consanguinité¹ à court termes (cinq prochaines générations, Frankham et al. 2014). Ce résultat suggère donc une certaine précarité du statut de conservation de cette population. Il faut néanmoins noter qu'il n'a pas été possible de définir l'intervalle de confiance supérieur de ce paramètre et que, par conséquent, il convient de ne pas apporter de conclusion définitive quant à la taille effective actuelle de la population. Les populations australiennes d'OA et de CQ présentent également des N_e beaucoup plus petites que la taille réelle des populations, mais les intervalles de confiance indiquent que les N_e pourraient être supérieurs à 100. La population NQ+DT+TN présente quant à elle une estimation de

¹ Ou dépression endogamique, est la réduction de la valeur sélective d'une population donnée liée à la reproduction entre individus apparentés. Ainsi, la reproduction entre individus étroitement apparentés fait apparaître plus de caractères récessifs délétères.

N_e beaucoup plus grande, qui résulte probablement des effectifs actuels plus important ainsi que de l'histoire démographique de cette population.

5.4. Réduction récente des effectifs de dugongs en Nouvelle-Calédonie.

Contrairement aux résultats obtenus au cours de l'étude préliminaire, les tests de 'bottleneck' menés à partir des données de microsatellite ont permis de détecter la signature d'une réduction des effectifs dans l'histoire de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie. Cette différence de résultat s'explique sans aucun doute par l'utilisation d'un jeu de données plus important pour la présente étude.

La confrontation des résultats obtenus avec *M-Ratio* et *Bottleneck* nous offre l'opportunité de mieux appréhender l'histoire de cette réduction d'effectif. En effet, après un événement de 'bottleneck', l'excès d'hétérozygotie et la distribution des fréquences alléliques (paramètres utilisés par *Bottleneck*) se retrouvent plus rapidement à l'équilibre que le ratio *M*. Ce dernier permet donc de détecter une réduction d'effectif plus longtemps après que celle-ci se soit produite que le test du programme *Bottleneck* (Garza & Williamson 2001). Pour un jeu des données proche de celui disponible pour les dugongs de Nouvelle-Calédonie, des simulations montrent que le test basé sur l'excès d'hétérozygotie de *Bottleneck* est susceptible de détecter une réduction d'effectif ayant eu lieu il y a moins de 20 générations (Peery et al. 2012). Le programme *M-Ratio* devient performant après environ cinq générations. Le fait que *Bottleneck* (sous certaines conditions) et *M-Ratio* détectent une diminution significative d'effectif au cours de l'histoire démographique de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie suggère que cette dernière ait eu lieu récemment, vraisemblablement dans une période située entre 5 et 20 générations. Sachant que 15 ans représentent une durée générationnelle raisonnable pour les dugongs, on peut en déduire que cette réduction a dû se produire il y a environ 75 à 300 ans. Cela reste une estimation grossière qui vise simplement à donner une idée de l'âge approximatif de cet événement. On constate ainsi qu'il s'est produit bien après l'arrivée de l'homme en Nouvelle-Calédonie (il y a au moins 3000 ans). Il est donc possible qu'une forte pression anthropique en soit à l'origine. Cependant d'autres scénarios 'catastrophes' sont envisageables, tels qu'une épidémie dans la population de dugongs ou une destruction de l'habitat, et des herbiers en particulier, résultant d'un événement climatique.

5.5. Histoire démographique et origine évolutive de la population de dugongs en Nouvelle-Calédonie.

D'autres tests visant à détecter une évolution des effectifs ont été menés sur la base des séquences de l'ADNmt. Du fait du faible taux de mutation de ce marqueur génétique par rapport à celui des microsatellites, il est possible de détecter des événements situés dans un passé beaucoup plus lointain que celui suggéré au paragraphe précédent (plusieurs centaines de générations en arrière). Les tests de Tajima et de Fu produisent tous deux un résultat significatif. Il a été montré que pour détecter un 'bottleneck', le second est particulièrement efficace notamment lorsque le nombre de site de ségrégation est limité (ce qui est le cas ici). En revanche, le test de Tajima marche en général moins bien pour la détection d'événements démographiques (Ramos-Onsins & Rozas 2002). Cependant, si l'on se base sur les résultats de simulations de Ramirez-Soriano et al. (2008), le fait que les deux tests aient donné des résultats significatifs suggère que la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie a connu un 'bottleneck' assez sévère suivi d'une phase d'expansion dans un passé assez récent à l'échelle évolutive que nous estimons à quelques centaines de générations.

Le réseau haplotypique et la configuration en étoile des haplotypes des dugongs de Nouvelle-Calédonie (Figure 3) soutiennent également l'hypothèse d'une réduction suivie d'une expansion des effectifs. Il reste cependant difficile de déterminer, sur la base de ces seules données, si cet événement démographique correspond à l'acte fondateur de la population de dugongs en Nouvelle-Calédonie (l'arrivée des dugongs en Nouvelle-Calédonie) ou plutôt à une diminution drastique de ses effectifs s'étant produite plus tard et faisant suite à un événement dramatique. Pour répondre à cette question, la confrontation du réseau haplotypique et des résultats d'analyse ABC offre certains indices.

Il est d'abord possible de confirmer le lien étroit entre l'ADNmt des dugongs de Nouvelle-Calédonie et les haplotypes de la lignée « widespread » d'Australie (Figure 3). Blair et al. (2014) suggère que les deux lignées australiennes actuelles sont issues de la coupure d'une population australienne ancestrale suite à l'assèchement du Déroit de Torres pendant plusieurs dizaines de milliers d'années (Chivas et al. 2001, Raymo et al. 2006). La lignée « widespread » aurait ainsi évolué à partir de la population cantonnée à l'Ouest du Déroit de Torres, tandis que la lignée « restricted » aurait évolué à partir de population située à l'Est de celui-ci. Cet historique de la répartition phylogéographique des deux lignées n'est pas en mesure de nous renseigner sur les liens ancestraux entre les dugongs de Nouvelle-Calédonie et ceux d'Australie. En effet, après la réouverture du déroit de Torres il y a environ 7000 ans, des mouvements d'individus ont entraîné un mélange des deux lignées sur une large portion de l'actuelle aire de répartition des dugongs en Australie (Annexe 2). La région d'Australie à partir de laquelle des dugongs ont migré

pour finalement coloniser directement ou indirectement la Nouvelle-Calédonie ne peut donc pas être identifiée sur la seule base de l'ADNmt.

L'analyse ABC suggère de son côté un lien ancestral proche entre la population de Nouvelle-Calédonie et celle du Centre Queensland (CQ) par rapport aux autres populations australiennes. C'est donc vraisemblablement la migration d'individus issus du CQ, sur la côte Est australienne, qui a abouti à la colonisation de la Nouvelle-Calédonie. Ce résultat peut paraître contre-intuitif car les dugongs de la côte Est australienne sont à l'origine de la lignée « restreinte » d'ADNmt, alors que la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie se caractérise par des haplotypes de la lignée « widespread », issue à l'origine des dugongs de l'ouest de l'Australie. Cependant, comme indiqué ci-dessus, les deux lignées se sont depuis en partie mélangées après l'ouverture du Détroit de Torres. Ainsi, certains dugongs du CQ sont désormais porteurs d'haplotypes de la lignée « widespread ». La confrontation de ces résultats suggère donc que la migration des individus à l'origine de la population de dugongs en Nouvelle-Calédonie n'a pu se faire qu'après l'ouverture du Détroit de Torres, il y a moins de 7000 ans. L'événement fondateur de cette population est donc relativement récent. La réduction des effectifs (et expansion démographique qui a suivi), telle que détectée par les tests de Tajima et de Fu, semble donc correspondre à l'événement fondateur de la population actuelle de dugongs de Nouvelle-Calédonie.

Comme déjà indiqué dans l'étude préliminaire, la présence d'un haplotype majoritaire (A) et de quelques haplotypes 'frères' ne se différenciant de A que par 1 ou 2 pb, suggère que l'ensemble de la population actuelle pourrait descendre d'une femelle unique porteuse de l'haplotype A. Les haplotypes 'frères' ne résultent probablement que de récentes mutations ayant affecté l'ADNmt de porteurs de l'haplotype A, lesquels l'ont ensuite transmis à leur descendance.

L'hypothèse d'une colonisation de la Nouvelle-Calédonie par le Détroit de Torres puis l'Arc Mélanésien telle que suggérée dans l'étude préliminaire (Oremus et al. 2011) est en partie contestée par ces nouveaux résultats. En effet, le scénario d'une colonisation via le nord de l'Australie semble très improbable tant l'analyse ABC aurait dû dans ce cas établir un lien entre la population de Nouvelle-Calédonie et la population NQ+DT+TN. Il paraît donc plus probable que la Nouvelle-Calédonie ait été colonisée via la mer de Corail suite à une ou plusieurs migrations de dugongs de la côte Est australienne. Bien qu'une telle migration puisse paraître surprenante pour un animal côtier comme le dugong, il a déjà été montré que cette espèce est capable de longs déplacements trans-océaniques (> 1.000 km, Hobbs et al. 2007). De plus, la présence de haut fonds en mer de Corail, en particulier l'archipel de Chesterfield, aurait pu favoriser une telle migration comme suggéré pour le grand-dauphin de l'Indo-Pacifique (Oremus et al. 2015). Il faut noter cependant que rien ne permet d'établir si la colonisation de la Nouvelle-Calédonie s'est faite directement à partir de l'Australie ou bien indirectement à partir de l'Australie via la colonisation d'autres archipels de l'Arc Mélanésien avant d'arriver en Nouvelle-Calédonie.

Afin d'être en mesure de retracer avec plus de certitude l'histoire de cette colonisation, il conviendrait d'intégrer des données issues des populations de Papouasie Nouvelle-Guinée, des Iles Salomon et du Vanuatu. L'utilisation des deux seuls échantillons des Iles Salomon et du Vanuatu dans l'étude préliminaire avait montré une similitude avec l'haplotype majoritairement présent en Nouvelle-Calédonie. Bien que ces données restent anecdotiques, il est intéressant de noter que cet haplotype n'a pas été retrouvé au sein des populations australiennes, et ce malgré un échantillonnage important. Il semble donc évident qu'il existe un lien rapproché entre les dugongs des différents archipels de Mélanésie.

6. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Les résultats de cette nouvelle étude ont permis de caractériser précisément le niveau de diversité génétique de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie qui se révèle être faible comparé à celui observé dans les grandes populations australiennes. Cette faible diversité s'explique en partie par l'histoire démographique de la population et notamment par la colonisation récente des lagons calédoniens (< 7000 ans).

Il semble cependant qu'une réduction importante des effectifs se soit produite plus récemment (quelques centaines d'années au plus), ce qui a également affecté le niveau de diversité génétique de la population. Il est difficile de déterminer la ou les raisons de cette chute de l'effectif mais nous pouvons néanmoins émettre l'hypothèse qu'elle soit due à un impact anthropique. Il est notamment possible que la chasse est joué un rôle significatif.

Quoiqu'il en soit, une faible diversité génétique (naturelle ou non) réduit la capacité des espèces à évoluer pour faire face aux maladies, aux changements environnementaux et/ou aux pressions anthropiques (Frankham et al. 2002). Les risques d'extinction s'en retrouvent accrus, soulignant le statut précaire de cette population vulnérable.


Cette étude confirme également l'isolement des dugongs calédoniens vis-à-vis des grandes populations australiennes puisqu'elle montre des taux de migration récente très faibles voire nuls. Cette caractéristique limite la résilience de la population calédonienne puisque les populations voisines ne peuvent pas servir de réservoirs susceptibles de fournir de nouveaux individus reproducteurs par migration.

Il faut cependant noter que le statut des populations voisines du Vanuatu et des Iles Salomon reste quasiment inconnu. Il paraît évident que les effectifs présents dans ces archipels sont bien inférieurs à ceux d'Australie. Néanmoins, ces populations, voisines de la Nouvelle-Calédonie pourraient avoir une influence sur la résilience de cette dernière. Il conviendrait donc de collecter des données permettant d'obtenir des indications sur l'abondance et la diversité génétique de ces populations et d'analyser leur niveau de connectivité avec la population de Nouvelle-Calédonie.

En ce qui concerne la Nouvelle-Calédonie, nous recommandons de poursuivre les analyses en utilisant un nombre plus important de loci de microsatellite afin d'estimer plus précisément la taille effective contemporaine (N_e) de la population. En effet, comme nous l'avons expliqué plus haut, ce paramètre est critique lorsqu'il s'agit d'établir le statut de conservation d'une population. Il présente également d'importantes implications dans la classification des espèces et populations sur la liste rouge de l'UICN.

L'ensemble des résultats présentés dans ce rapport met en valeur la précarité du statut de conservation de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie. Il est

donc primordial de maintenir ou d'intensifier l'effort de conservation sur cette population et de continuer à accumuler des connaissances sur son écologie et sa trajectoire démographique. La mise en place des mesures de protection adaptées aux risques variés auxquels doivent faire face les dugongs (e.g., collisions avec bateau, dégradation de l'habitat, braconnage, etc.) semble donc plus que jamais urgente.



7. REMERCIEMENTS

Nous remercions l'Agence des Aires Marines Protégées qui en tant qu'animateur du Plan d'Actions Dugong 2010-2015 a commandité cette étude complémentaire auprès d'Opération Cétacés. Nous remercions également la Direction de l'Environnement de la Province Sud qui a permis d'initier l'étude génétique des dugongs de Nouvelle-Calédonie en soutenant l'étude préliminaire.

Nous tenons à remercier nos collaborateurs de l'Université James Cook, Australie, et particulièrement l'Associate Prof. David Blair, le Prof. Helene Marsh et Mr. Brendan Jones, pour nous avoir permis l'accès à leur base de données dugong. Le présent projet n'aurait pas été possible sans eux. Merci également de nous avoir soutenus en partageant certaines amorces de microsatellites. Nous remercions également l'Associate Prof. Jennifer Seddon de l'Université du Queensland pour avoir facilité l'étape de calibration des données de microsatellite.

Un grand merci à l'ensemble des participants du projet balisage dugongs grâce auquel il a été possible d'obtenir de nouveaux échantillons de tissu.

Merci à l'équipe COREUS du Prof. Claude Payri, ainsi qu'à la direction de l'IRD pour nous avoir accueillis à la plateforme du vivant et permis de réaliser les analyses génétiques en Nouvelle-Calédonie. Merci également à nos collaborateurs du Marine Mammal Institute de l'Université d'Oregon State, USA, pour leur soutien logistique.

Enfin, un grand merci aux équipes de protection du lagon de la province Sud et au service de l'environnement de la province Nord pour les échantillons collectés sur le terrain ainsi qu'à toutes les personnes qui ont permis de recueillir des échantillons au fil des années.

8. RÉFÉRENCES

- Avise J.C. (2004) *Molecular markers, natural history, and evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Bandelt H., Forster P., Rohlf A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48.
- Blair D., McMahon A., McDonald B., Tikel D., Waycott M., Marsh H. (2014) Pleistocene sea level fluctuations and the phylogeography of the dugong in Australian waters. *Mar. Mamm. Sci.* 30:104-121. doi: 10.1111/mms.12022
- Chivas A.R., Garcia A., van der Kaars S. (2001) Sea-level and environmental changes since the last interglacial in the Gulf of Carpentaria, Australia: An overview. *Quaternary International* 83-5:19-46.
- Cleguer C., Oremus M., Garrigue C. (2012) Etude pilote sur la faisabilité d'équiper des dugongs de balises satellitaires afin d'étudier leurs déplacements en Nouvelle-Calédonie. Rapport non publié pour l'Agence des Aires Marines Protégées:33p
- Cornuet J.-M., Pudlo P., Veyssier J., Dehne-Garcia A., Gautier M., Leblois R., Marin J.-M., Estoup A. (2014) DIYABC v2.0: a software to make Approximate Bayesian Computation inferences about population history using Single Nucleotide Polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics* 30:1187-1189. doi: 10.1093/bioinformatics/btt763
- Drummond A.J., Ashton B., Cheung M., Heled J., Kearse M., Moir R., Stones-Havas S., Thierer T., Wilson A. (2009) Geneious v4.8, Available from <http://www.geneious.com/>
- Excoffier L., Laval L.G., Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Frankham R. (1995) Effective population size/adult population size ratios in wildlife : a review. *Genet. Res.* 66:95-107. 10.1017/S0016672300034455
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press
- Frankham R., Bradshaw C.J.A., Brook B.W. (2014) Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biol. Conserv.* 170:56-63.
- Fu X.Y. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925.
- Garrigue C., Cleguer C. (2013) Acquisition de données télémétriques des dugongs dans les régions de Nouméa et Bourail-Poya. Rapport non publié pour l'Agence des Aires Marines Protégées:28p
- Garrigue C., Patenaude N.J., Marsh H. (2008) Distribution and abundance of the dugong in New Caledonia, southwest Pacific. *Mar. Mamm. Sci.* 24:81-90.
- Garza J.C., Williamson E.G. (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 10:305-318.

- 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>.
- Hedrick P.W., Kalinowski S.T. (2000) A review on inbreeding depression and its importance in conservation biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31:139-162.
- Hobbs J.-P.A., Frisch A.J., Hender J., Gilligan J.J. (2007) Long-Distance Oceanic Movement of a Solitary Dugong (*Dugong dugon*) to the Cocos (Keeling) Islands. *Aquat. Mamm.* 32:175-178.
- Hunter M.K., Broderick D., Ovenden J.R., Tucker K.P., Bonde R.K., McGuire P.M., Lanyon J.M. (2010) Characterization of highly informative cross-species microsatellite panels for the Australian dugong (*Dugong dugon*) and Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) including five novel primers. *Molecular Ecology Resources* 10:368-377.
- Lanyon J.M., Limpus C.J., Marsh H. (1989) Dugong and turtles: grazers in the seagrass system. In: Larkum AWD MA, Shepherd SA (ed) *Biology of Seagrasses: a Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region*, Elsevier, Amsterdam, p 610-634
- Louis M., Viricel A., Lucas T., Peltier H., Alfonsi E., Berrow S., Brownlow A., Covelo P., Dabin W., Deaville R., de Stephanis R., Gally F., Gauffier P., Penrose R., Silva M.A., Guinet C., Simon-Bouhet B. (2014) Habitat-driven population structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the North-East Atlantic. *Mol. Ecol.* 23:857–874. doi: 10.1111/mec.12653
- Luikart G.H., Allendorf F.W., Cornuet J.-M., Sherwin W.B. (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J. Hered.* 89:238-247.
- Marsh H., O'Shea T.J., Reynolds J.E.I. (2011) *The ecology and conservation of sirenia: dugongs and manatees*. Cambridge University Press.
- Marsh H., Penrose H., Eros C., Hughes J. (2002) *The dugong (Dugong dugon) status reports and action plans for countries and territories in its range*. Early Warning and Assessment Report Series, Townsville. 162 pp.
- Oosterhout C.V., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4:535 - 538.
- Oremus M., Garrigue C., Cleguer C. (2011) *Isolement et diversité génétique des dugongs de Nouvelle-Calédonie*. Rapport non publié pour la Direction de l'Environnement de la Province Sud, Nouvelle-Calédonie:40p
- Oremus M., Garrigue C., Tezanos-Pinto G., Scott Baker C. (2015) Phylogenetic identification and population differentiation of bottlenose dolphins (*Tursiops* spp.) in Melanesia, as revealed by mitochondrial DNA. *Mar. Mamm. Sci.* doi: 10.1111/mms.12210
- Peery M.Z., Kirby R., Reid B.N., Stoelting R., Doucet-B eer E., Robinson S., Vasquez-Carrillo C., Pauli J.N., Palsb oll P.J. (2012) Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Mol. Ecol.* 21:3403-3418. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05635.x

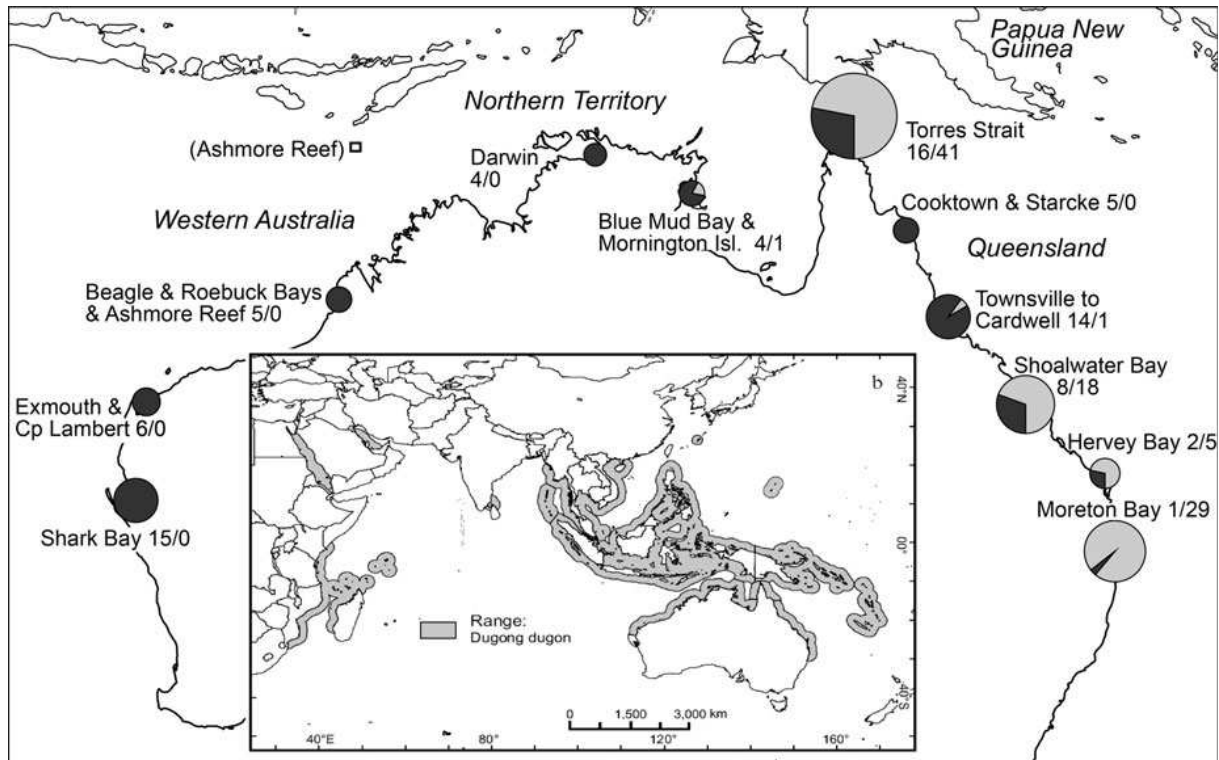
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Purvis A., Gittleman J.L., Cowlshaw G., Mace G.M. (2000) Predicting extinction risk in declining species. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. Ser. B* 267:1947-1952.
- Ramirez-Soriano A., Ramos-Onsins S.E., Rozas J., Calafell. F., Navarro A. (2008) Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics* 179:555-567. doi: 10.1534/genetics.107.083006
- Ramos-Onsins S.E., Rozas J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19:2092-2100.
- Raymo M.E., Lisiecki L.E., Nisancioglu K.H. (2006) Plio-Pleistocene ice volume, Antarctic climate, and the global delta O-18 record. *Science* 313:492–495.
- Raymond M., Rousset F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86:248-249.
- Rice W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.
- Sheppard J., Preen A.R., Marsh H., Lawler I.R., Whiting S., Jones R.E. (2006) Movement heterogeneity of dugongs, *Dugong dugon* (Müller) over large spatial scales. *Experimental Marine Biology and Ecology* 334:64-83.
- Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Waples R.S., Antao T., Luikart G. (2014) Effects of overlapping generations on linkage disequilibrium estimates of effective population size. *Genetics* 197:769-780.
- Waples R.S., Do C. (2010) Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications* 3:244-262. doi: 10.1111/j.1752-4571.2009.00104.x
- Waples R.S., Do S. (2008) LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8:753–756.
- Wilson G.A., Rannala B. (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163:1177-1191.

ANNEXES

Annexe 1: Résumé des analyses de groupage Bayésiennes réalisées avec le programme *Structure* pour K populations, où K varie de 1 à 6.

| Run | K | Ln P(D) | Var[LnP(D)] | α_1 | Fst_1 | Fst_2 | Fst_3 | Fst_4 | Fst_5 | Fst_6 |
|-----|---|---------|-------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 1 | -6252,9 | 43,5 | - | 0,000 | - | - | - | - | - |
| 2 | 1 | -6252,8 | 43,2 | - | 0,001 | - | - | - | - | - |
| 3 | 1 | -6252,5 | 42,7 | - | 0,001 | - | - | - | - | - |
| 4 | 2 | -5721,1 | 143,6 | 0,077 | 0,211 | 0,005 | - | - | - | - |
| 5 | 2 | -5719,8 | 142,5 | 0,078 | 0,210 | 0,006 | - | - | - | - |
| 6 | 2 | -5719,6 | 142,1 | 0,076 | 0,006 | 0,209 | - | - | - | - |
| 7 | 3 | -5275,7 | 145,7 | 0,035 | 0,016 | 0,547 | 0,184 | - | - | - |
| 8 | 3 | -5276,2 | 146,4 | 0,035 | 0,547 | 0,015 | 0,184 | - | - | - |
| 9 | 3 | -5275,9 | 146,2 | 0,036 | 0,546 | 0,016 | 0,184 | - | - | - |
| 10 | 4 | -5153,8 | 254,2 | 0,035 | 0,107 | 0,191 | 0,030 | 0,549 | - | - |
| 11 | 4 | -5152,8 | 252,4 | 0,035 | 0,030 | 0,549 | 0,108 | 0,191 | - | - |
| 12 | 4 | -5152,7 | 252,4 | 0,035 | 0,191 | 0,549 | 0,030 | 0,108 | - | - |
| 13 | 5 | -5219,8 | 505,6 | 0,034 | 0,554 | 0,140 | 0,201 | 0,033 | 0,029 | - |
| 14 | 5 | -5261,8 | 573,2 | 0,034 | 0,141 | 0,033 | 0,023 | 0,555 | 0,201 | - |
| 15 | 5 | -5209,6 | 486,1 | 0,034 | 0,554 | 0,200 | 0,032 | 0,139 | 0,031 | - |
| 16 | 6 | -5372,3 | 846,5 | 0,034 | 0,043 | 0,157 | 0,210 | 0,018 | 0,562 | 0,037 |
| 17 | 6 | -5513,6 | 1115 | 0,035 | 0,210 | 0,026 | 0,563 | 0,026 | 0,157 | 0,038 |
| 18 | 6 | -5327,2 | 764,1 | 0,034 | 0,560 | 0,037 | 0,156 | 0,026 | 0,039 | 0,210 |
| 19 | 6 | -5297,4 | 676,8 | 0,034 | 0,040 | 0,158 | 0,563 | 0,048 | 0,000 | 0,210 |

Annexe 2: Illustration tirée de Blair et al. (2011) montrant l'origine géographique des échantillons australiens pour lesquels l'ADNmt a été analysé. Pour chaque région, le nombre de séquences représentant chaque lignée (« widespread »/« restricted ») est indiqué. Les graphiques en camembert illustrent également le nombre et la proportion des deux lignées (gris sombre pour « widespread » et gris clair pour « restricted »).



Annexe 3 : Séquence des quatre haplotypes (411 pb) de l'ADN mitochondrial détectés parmi les dugongs de Nouvelle-Calédonie considérés pour la présente étude.

>Haplotype A

```
AATTCTACTTAAACTACTCCCTGCGCGCGCTATGTA CTTCGTGCATTATGTGCTC
CTCCCCATAATAGTACTATATATGTTTTATCTTACATAACCATCCTATGTATAAT
CGTGCATTACACTACTTACCCCATGCATATAAGCCAGTACGGTAGGATTCATGCT
CTAAAGCCTAAGTAATTAATCTCCATTATAACAACCTCTACACCATGGATATTGTCC
AGTCCATGTACCTCTTGATCTTGCATAGTACATTCAACCCTTTATCGTACATAGC
ACATCTCTGAGATAGTTCTCGTCAACACGCTTATCACCTCCAATGAACAGTCCTT
GACTACCAAGCTTCGAGAAACCAGCAACCCGCTCCGATTACGCTTCTCTTCTCG
CTCCGGGGCCCATAACTTGTGGGGG
```

>Haplotype B

```
AATTCTACTTAAACTACTCCCTGCGCGCGCTATGTA CTTCGTGCATTATGTGTTTC
CTCCCCATAATAGTACTATATATGTTTTATCTTACATAACCATCCTATGTATAAT
CGTGCATTACACTACTTACCCCATGCATATAAGCCAGTACGGTAGGATTCATGCT
CTAAAGCCTAAGTAATTAATCTCCATTATAACAACCTCTACACCATGGATATTGTCC
AGTCCATGTACCTCTTGATCTTGCATAGTACATTCAACCCTTTATCGTACATAGC
ACATCTCTGAGATAGTTCTCGTCAACACGCTTATCACCTCCAATGAACAGTCCTT
GACTACCAAGCTTCGAGAAACCAGCAACCCGCTCCGATTACGCTTCTCTTCTCG
CTCCGGGGCCCATAACTTGTGGGGG
```

>Haplotype E

```
AATTCTACTTAAACTACTCCCTGCGCGCGCTATGTA CTTCGTGCATTATGTGCTC
CTCCCCATAATAGTACTATATATGTTTTATCTTACATAACCATCCTATGTATAAT
CGTGCATTACACTACTTACCCCATGCATATAAGCCAGTACGGTAGGATTCATGCT
CTAAAGCCTAAGTAATTAATCTCCATTATAACAACCTCCACACCATGGATATTGTC
CAGTCCATGTACCTCTTGATCTTGCATAGTACATTCAACCCTTTATCGTACATAG
CACATCTCTGAGATAGTTCTCGTCAACACGCTTATCACCTCCAATGAACAGTCCT
TGACTACCAAGCTTCGAGAAACCAGCAACCCGCTCCGATTACGCTTCTCTTCTC
GCTCCGGGGCCCATAACTTGTGGGGG
```

>Haplotype F

```
AATTCTACTTAAACTACTCCCTGCGCGCGCTATGTA CTTCGTGCATTATGTGCTC
CTCCCCATAATAGTACTATATATGTTTTATCTTACATAACCATCCTATGTATAAT
CGTGCATTACACTACTTACCCCATGCATATAAGCCAGTACGGTAGGATTCATGCT
CTAAAGCCTAAGTAATTAATCTCCATTATAACAACCTCTACACCATGGATATTGTCC
AGTCCATGTACCTCTTGATCTTGCATAGTACATTCAACCCTTTATCGTACATAGC
ACATCTCTGAGATAGTTCTCGTCAACACGCTTATCACCTCCAATGAACAGTCCTT
GACTACCAAGCTTCGAGAAACCAGCAACCCGCTCCGATTATGCTTCTCTTCTCG
CTCCGGGGCCCATAACTTGTGGGGG
```

Contacts et renseignements

Marc OREMUS
Biologiste Marin
oremusm@gmail.com

Claire GARRIGUE
Océanographe biologiste
claire.garrigue@ird.fr et op.cetaces@lagoon.nc

Opération Cétacés
BP12827
98802 Nouméa, Nouvelle Calédonie
Tél : 00 687 24 16 34
Fax : 00 687 24 16 34

Damien Grima et Lionel Gardes

Agence des Aires Marines Protégées
Antenne Nouvelle-Calédonie
damien.grima@aires-marines.fr
lionel.gardes@aires-marines.fr

Tél : 00 687 23 17 03

Plan d'actions dugong



en Nouvelle-Calédonie