



Isolement et Diversité Génétique des Dugongs de Nouvelle Calédonie

Rapport final

**Marc OREMUS, Claire GARRIGUE
& Christophe CLEGUER**

Opération Cétacés

B.P. 12 827, 98802 Nouméa, Nouvelle-Calédonie

Tél. / fax : 24 16 34, courriel : op.cetaces@lagoon.nc,

site web : www.operationcetaces.nc

Ridet : 476804.001

Juin 2011

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
RESUME	4
1. CONTEXTE	6
2. INTRODUCTION	7
3. MATERIELS ET METHODES	10
3.1 ORIGINE DES ECHANTILLONS	10
3.2 ANALYSES EN LABORATOIRE	12
3.2.1 Préparation des échantillons et extraction de l'ADN	12
3.2.2 Séquençage de la région contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt)	12
3.2.3 Génotypage de 10 microsatellites	13
3.3 ANALYSES DE DONNEES	14
3.3.1 Niveau de diversité génétique	15
3.3.2 Tests de « bottleneck »	15
3.3.3 Connectivité avec les populations australiennes	16
3.3.4 Phylogéographie	16
4. RESULTATS	18
4.1 DONNEES DISPONIBLES	18
4.1.1 Extractions d'ADN	18
4.1.2 Séquençage de l'ADNmt et « fragment consensus »	18
4.1.3 Génotypage	19
4.2 NIVEAU DE DIVERSITE GENETIQUE ET TESTS « BOTTLENECK »	19
4.3 CONNECTIVITE AVEC LES POPULATIONS AUSTRALIENNES	21
4.4 PHYLOGEOGRAPHIE	22
5. DISCUSSION	26
5.1 LIMITES DE L'ETUDE	26
5.2 UNE FAIBLE DIVERSITE GENETIQUE	26
5.3 ISOLEMENT GENETIQUE PAR RAPPORT A L'AUSTRALIE	27
5.4 HISTOIRE EVOLUTIVE EN NOUVELLE-CALEDONIE	28
5.5 CONNEXIONS ANCESTRALES AVEC L'AUSTRALIE ET L'INDO-PACIFIQUE	29
6. CONCLUSIONS	31
7. FUTURES DIRECTIONS	32
8. REMERCIEMENTS	34
9. REFERENCES	35
ANNEXES	37

LISTE DES TABLES

TABLE 1. LISTE ET CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS ANALYSES EN LABORATOIRE.....	11
TABLE 2. LISTE DES LOCI DE MICROSATELLITES UTILISES ET INDICES DE DIVERSITE GENETIQUE. N EST LE NOMBRE D'INDIVIDUS GENOTYPES ; K EST LE NOMBRE D'ALLELES IDENTIFIES ; HWE P INDIQUE LE RESULTAT DES TESTS SUR L'EQUILIBRE DE HARDY-WEINBERG ; H ₀ EST LE TAUX D'HETEROZYGOTIE ; A EST LA RICHESSE ALLELIQUE ; F _{IS} EST L'INDICE DE FIXATION.	14
TABLE 3. INDICES DE DIVERSITE GENETIQUE DE L'ADNMT POUR LA NOUVELLE-CALEDONIE ET L'AUSTRALIE. H EST LA DIVERSITE HAPLOTYPIQUE ET P EST LA DIVERSITE NUCLEOTIDIQUE.	20
TABLE 4. INDICE DE DIVERSITE DES MICROSATELLITES POUR LA NOUVELLE-CALEDONIE ET L'AUSTRALIE. H ₀ EST LE TAUX D'HETEROZYGOTIE ; A EST LA RICHESSE ALLELIQUE ; F _{IS} EST L'INDICE DE FIXATION.	20
TABLE 5. VALEURS DE FST ET DEGRE DE SIGNIFICATIVITE BASES SUR L'ADNMT ENTRE LA NOUVELLE-CALEDONIE ET LES QUATRE REGIONS D'AUSTRALIE.....	21
TABLE 6. VALEURS DE FST ET DEGRE DE SIGNIFICATIVITE BASES SUR LES MICROSATELLITES ENTRE LA NOUVELLE-CALEDONIE ET LES QUATRE REGIONS D'AUSTRALIE.....	21
TABLE 7. VALEURS ET SIGNIFICATIVITE DES TESTS DE TAJIMA ET DE Fu POUR LES DUGONGS DE NOUVELLE-CALEDONIE ET DES QUATRE REGIONS D'AUSTRALIE.	23

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. RESULTATS DE L'ANALYSE BAYESIENNE OBTENUS SUR LA BASE D'UN SCENARIO DE 4 POPULATIONS. NC : NOUVELLE CALEDONIE ; CQ : CENTRE QUEENSLAND ; NQ : NORD QUEENSLAND ; DT : DETROIT DE TORRES ; TN : TERRITOIRES DE NORD ; OA : OUEST AUSTRALIE.	22
FIGURE 2. RESULTATS DE L'ANALYSE BAYESIENNE OBTENUS SUR LA BASE D'UN SCENARIO DE 3 POPULATIONS.	22
FIGURE 3. RESEAU HAPLOTYPIQUE DE TYPE « MEDIAN-JOINING » SUR L'ENSEMBLE DES DONNEES D'ADNMT.	23
FIGURE 4. RECONSTRUCTION PHYLOGENETIQUE DE TYPE NEIGHBOUR-JOININGS AVEC VALEURS DE BOOTSTRAP (10,000 ITERATIONS).....	25

RESUME

- La population de dugongs en Nouvelle-Calédonie est l'une des plus grandes au monde attestant de son importance pour la préservation de l'espèce. Pourtant, son statut de conservation demeure incertain à bien des égards.
- Grâce à l'utilisation d'outils moléculaires, nous avons entrepris d'étudier la diversité génétique de la population calédonienne en la comparant à un jeu de données constitué principalement d'échantillons d'Australie où vivent les plus grandes populations mondiales.
- Notre but précis était de comparer les niveaux de diversité génétique ainsi que la connectivité (ou flux génétique) avec les populations australiennes afin d'obtenir des informations sur le statut de conservation des dugongs calédoniens. L'histoire évolutive de la population a également été étudiée.
- Un total de 32 échantillons de Nouvelle-Calédonie a pu être réuni, comprenant des échantillons de peau, de dent et d'os mais seul 22 échantillons ont pu être exploités avec succès du fait des difficultés liées à l'analyse d'ADN ancien.
- Les séquences de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ainsi que les génotypes d'un panel de 10 loci de microsatellites de l'ADN nucléaire ont été analysés.
- Les dugongs de Nouvelle-Calédonie possèdent nettement moins de diversité génétique que les dugongs d'Australie, tant au niveau mitochondrial qu'au niveau nucléaire.
- Aucun effet de goulot d'étranglement n'a été détecté dans la diversité génétique des dugongs calédoniens. Cependant, l'hypothèse d'une récente diminution des effectifs ne peut pas pour autant être totalement rejetée du fait d'un nombre trop limité de données utilisées pour cette analyse.
- La comparaison des patrimoines génétiques rencontrés en Australie avec ceux de Nouvelle-Calédonie atteste de l'absence d'échanges reproductifs entre ces deux régions. La population calédonienne est donc génétiquement isolée des grandes populations australiennes. En revanche, il est possible qu'un lien existe avec les populations du Vanuatu et des Iles Salomon.
- L'étude de l'histoire évolutive de la population suggère que les dugongs calédoniens entretiennent un lien ancestral plus récent avec l'une des deux

lignées présentent en Australie qu'avec celles des autres populations de l'Indo-Pacifique telles que celles du Sud-est asiatique.

- Nos résultats suggèrent que la colonisation de la Nouvelle-Calédonie s'est probablement effectuée par le Nord de l'Australie puis par l'arc mélanésien plutôt que par des migrations via la mer de Corail. Ce scénario devra cependant être confirmé par l'analyse de données supplémentaires.
- Il est probable que les bouleversements liés à la dernière ère glaciaire, et notamment la quasi-disparition des lagons, ait profondément impacté l'histoire évolutive des dugongs de Nouvelle-Calédonie. L'analyse de l'ADNmt suggère une augmentation importante de effectifs pouvant coïncider avec la remonté du niveau des eaux à la fin de l'ère glaciaire.
- Les résultats des analyses réalisées pour cette étude mettent en évidence le statut précaire des dugongs en Nouvelle-Calédonie. En effet, la faible diversité génétique ajoutée à l'isolement relatif par rapport aux populations australiennes, en font une population 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 en assurer au mieux sa préservation future.

1. CONTEXTE

La Province Sud mène depuis plusieurs années des actions en faveur de la conservation des espèces emblématiques de Nouvelle-Calédonie. La responsable des espèces emblématiques au Service de la Mer de la province Sud, a pris contact avec Opération Cétacés (OC) afin d'étudier quelle action prioritaire pourrait être rapidement réalisée par l'association avec le soutien financier de la province. Après concertation, il a été établi qu'une étude génétique portant sur le statut des dugongs de Nouvelle Calédonie, tel que suggéré par Garrigue et al. (2009) puis repris dans le Plan d'Actions Dugong 2010-2012 (Jacob & Gardes 2010), constituait la meilleure option en termes de priorité, de faisabilité et de coût. OC a donc proposé d'analyser les échantillons en sa possession, collectés entre 1991 et 2010. La réalisation des analyses génétiques en Nouvelle Calédonie a nécessité la mise en place d'un contrat de collaboration entre l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'association OC permettant 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 consiste principalement en une comparaison entre les dugongs de Nouvelle-Calédonie et les dugongs d'Australie où se trouvent les plus grandes populations mondiales. C'est pourquoi une collaboration entre OC et le Professeur Associé David Blair de la School of Marine and Tropical Biology, de l'Université James Cook (JCU), Australie, a été développée afin d'accéder aux informations relatives à la diversité génétique des dugongs en Australie. Une lettre d'accord officielle décrivant les conditions de cette collaboration a été rédigée par les deux parties.

Des échantillons supplémentaires ont été obtenus entre la mise en place du projet et sa réalisation. Au final, le nombre d'échantillons réellement analysés représente plus du double du nombre initialement prévu ce qui a entraîné des difficultés en termes de financement des analyses. Le budget initialement prévu aurait donc été dépassé sans le soutien logistique de nos collaborateurs des Universités d'Auckland (Nouvelle Zélande), d'Oregon State (USA) et de JCU, qui a permis de réduire le coût des analyses.

2. INTRODUCTION

Que ce soit en milieu terrestre ou marin, la fragmentation et l'isolement des habitats représentent un risque majeur pour la conservation et la gestion des espèces. En effet, l'isolement des populations peut engendrer une absence de recrutement (c'est-à-dire une absence d'émigration via d'autres populations) ainsi qu'une diminution significative de la diversité génétique. Ces caractéristiques ont pour conséquence une dégradation de la résilience des populations concernées (Frankham et al. 2002). Ainsi, en cas de pression anthropique trop importante (comme la chasse) ou d'une catastrophe démographique (faisant suite, par exemple, à une destruction de l'habitat, une diminution des ressources ou une attaque virale), ces populations auront une chance de survie plus faible. Les mammifères marins ont longtemps été perçus comme des animaux n'ayant pas à faire face à une telle problématique du fait de leur habitat marin ouvert et de leur grande aptitude à se déplacer (Hoelzel et al. 2002). Cependant, plusieurs études démographiques et génétiques ont révélé des résultats contraires à ces prédictions, indiquant que dans de nombreux cas, ces espèces présentaient une importante structuration dans leurs populations et donc, un isolement éventuel (e.g., Bilgmann et al. 2007).

Le dugong ou vache marine (*Dugong dugon*) est une des espèces de mammifères marins dont les effectifs semblent diminuer à travers le monde, ce qui a mené à son classement d'espèce vulnérable à une échelle globale (IUCN 2008). Distribuées dans la région tropicale 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 strictement herbivore la contraignant à un habitat côtier (Lanyon et al. 1989, Marsh et al. 2002), synonyme de risques anthropiques accrus (pression de chasse, trafic maritime, destruction de l'habitat). Son espérance de vie est longue mais ses taux de reproduction sont faibles, 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 récente a montré que la petite population locale d'environ 1800 individus (SE = 332, CV = 0,18), est néanmoins 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 tant on ignore si cette population est en régression (Garrigue et al. 2009) ou bien encore si elle se trouve isolée génétiquement des grandes populations australiennes.

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 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 le seul 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 la population (Awise 2004). Elle représente une étape préalable obligatoire à l'établissement de plans de gestion et de conservation adaptés.

Nous proposons ici d'étudier le statut génétique des dugongs de Nouvelle-Calédonie grâce à l'analyse des échantillons réunis par Opération Cétacés depuis 1991. Nous avons utilisé des marqueurs de l'ADN mitochondrial (région de contrôle) et nucléaire (microsatellites) afin d'offrir une meilleure compréhension de la population. En effet, ces approches sont complémentaires car l'ADN mitochondrial (ADNmt) qui se transmet uniquement de la mère à sa descendance, reflète uniquement le flux génétique femelle, tandis que les microsatellites permettent eux d'analyser le flux génétique global (mâle et femelle). Dans le but de répondre à trois objectifs principaux, les informations obtenues ont été comparées à un jeu de données existant sur les dugongs d'Australie et de quelques régions périphériques (Sud-est Asiatique, Japon, Micronésie) que nous regrouperons ici sous le terme Indo-Pacifique.

Objectif 1 : Estimer le niveau de diversité génétique de la population de Nouvelle-Calédonie et la comparer à celle observée en Australie. Déterminer si la population de Nouvelle-Calédonie a connu une réduction importante de ces effectifs (effet goulot d'étranglement ou « bottleneck ») au cours des dernières générations. Une diversité réduite indiquerait un statut à risque pour la population calédonienne.

Objectif 2 : Déterminer si la population de Nouvelle-Calédonie est isolée génétiquement des populations australiennes. En effet, bien que les dugongs soient capables de longs déplacements, nous ignorerons s'il existe des échanges trans-océaniques qui permettraient un brassage génétique entre la population calédonienne et les grandes populations australiennes.

Objectif 3 : Etudier l'histoire évolutive de la population de Nouvelle-Calédonie. L'analyse de marqueurs génétiques peut en effet permettre de déterminer les liens ancestraux avec les différentes lignées présentes en Australie et dans la région Indo-Pacifique. Elle peut également mettre en valeur des événements démographiques

forts ayant affectés la population par le passé tels qu'une expansion brutale de la population faisant suite une récente colonisation.



3. MATERIELS ET METHODES

3.1 Origine des échantillons

Lorsque le présent projet a été proposé à la province Sud, OC disposait de 15 échantillons de dugongs de Nouvelle-Calédonie. Ces derniers avaient été collectés de façon opportuniste depuis 1991, soit à l'occasion d'échouages ($n = 12$), soit au moyen d'un fusil hypodermique vétérinaire de type Paxarms au cours d'observation en mer ($n = 3$). Suite à l'acceptation du projet, OC a entrepris d'obtenir des échantillons supplémentaires en faisant appel au public calédonien. Le projet a été présenté par les différents médias locaux (radio, télévision et presse écrite) et un appel a été lancé pour solliciter la collaboration des personnes détenant des échantillons de dugong susceptibles d'être utilisés pour cette étude. Cette initiative s'est révélée fructueuse puisque 16 échantillons supplémentaires, constitués de dents ou de morceaux d'os conservés depuis de nombreuses années, ont ainsi pu être collectés.

Un nouvel échantillon de peau a également été récolté en avril 2011 par la brigade de protection du lagon de Bourail sur une carcasse de dugong retrouvée lors d'une patrouille dans le lagon. Au final, 32 échantillons de dugongs de Nouvelle-Calédonie étaient disponibles pour cette étude : 12 morceaux de peau, 13 dents et 7 morceaux d'os. Le lieu de provenance et la date de collecte approximative de chaque échantillon sont présentés dans la Table 1.

Un échantillon de peau du Vanuatu et une dent des Iles Salomon, mis à disposition du projet par le Consortium de Recherche sur les Cétacés du Pacifique Sud (SPWRC), ont également été analysés. Ces échantillons sont particulièrement intéressants car ils proviennent de régions voisines de la Nouvelle-Calédonie. Enfin, deux échantillons d'ADN australiens, fournis par JCU, ont été re-analysés afin d'effectuer un contrôle des séquences d'ADN mitochondrial et de calibrer les données microsatellites. Le nombre total d'échantillons analysés en laboratoire s'élève donc à 36.

Pour répondre aux objectifs posés par le projet, il était important de comparer les données obtenues de la population de Nouvelle-Calédonie à un jeu de données extérieures. La collaboration mise en place avec JCU a permis d'accéder aux informations existantes sur 177 dugongs appartenant aux populations australiennes ainsi qu'à 11 dugongs de la région Indo-Pacifique (Sud-est Asiatique, $n = 7$; Japon, $n = 2$; Micronésie, $n = 1$). Les informations disponibles pour chaque échantillon comprennent : le lieu d'origine, une séquence de la région contrôle de l'ADNmt et le génotype pour 10 loci de microsatellites.

Table 1. Liste et caractéristiques des échantillons analysés en laboratoire

Code	Date de collecte	Méthode d'échantillonnage	Région	Type d'échantillons	Haplotype ADNmt
DduNCXX-001	1991	Echouage	Ouano	Os	A
DduNC94-001	20/09/1994	Echouage	Nouméa	Dent	A
DduNC02-043	11/12/2002	Biopsie	Nouméa	Peau	A
DduNC03-002	17/05/2003	Biopsie	Nouméa	Peau	A
DduNC03-003	17/05/2003	Biopsie	Nouméa	Peau	A
DduNC04-053	20/12/2004	Echouage	Voh	Peau	A
DduNC06-002	11/01/2006	Echouage	Nouméa	Peau	A
DduNC06-170	25/10/2006	Echouage	Nouméa	Peau	A
DduNC07-161	02/09/2007	Echouage	Nouméa	Peau	A
DduNC08-169	août-2008	Echouage	La Foa	Peau	A
DduNC09-10	19/01/2009	Echouage	Nouméa	Peau	A
DduNC10-219	mars-2007	Echouage	Pindai	Dent	B
DduNC10-220	2007 ou 2008?	Echouage	Népoui	Dent	A
DduNC10-002	23/01/2010	Echouage	Bourail	Peau	A
DduNC10-011	03/05/2009	Echouage	Dumbéa	Os	A
DduNC10-009	19/06/2010	Echouage	Bourail	Peau	A
DduNC11-002	~1990	Chasse	Oundjo	Dent	C
DduNC11-003	~1990	Chasse	Oundjo	Dent	A
DduNC11-004	1996	Chasse	Poum	Dent	D
DduNC11-005	1939-1945	Chasse	Nouméa	Dent	-
DduNC11-006	1980-90	Echouage	Nouméa	Dent	A
DduNC11-007	2009?	?	Bourail	Os	-
DduNC11-008	2010	?	Nouméa	Os	-
DduNC11-009	1975-80	?	Uitoe	Dent	-
DduNC11-010	?	?	Nouméa	Os	-
DduNC11-011	?	?	Uitoé	Os	-
DduNC11-012	?	?	Pouébo	Dent	-
DduNC11-013	?	?	Pouébo	Dent	-
DduNC11-014	?	?	Babouillat	Os	-
DduNC11-015	2008	?	Poé/Bourail	Dent	A
DduNC11-016	?	?	Népoui	Dent	-
DduNC11-017	13/04/2011	Echouage	Bourail	Peau	A
U07-047	18/10/2006	Echouage	Vanuatu	Peau	A
SI10-033	?	?	Iles Salomon	Dent	A

3.2 Analyses en laboratoire

3.2.1 Préparation des échantillons et extraction de l'ADN

Pour les échantillons de peau, un morceau de tissu d'environ 2mm³ a été utilisé. Chaque échantillon a été coupé avec une lame de scalpel stérilisée à la flamme, puis re-découpé en petits morceaux avant de procéder à l'extraction. Les échantillons d'os et de dent ont été percés dans une pièce n'ayant jamais été exposée à de l'ADN de mammifères marins afin de minimiser les risques de contamination entre échantillons. La surface de chaque échantillon a été nettoyée avec de l'éthanol à 70% avant le perçage. Des mèches de 1,5mm de diamètre ont été utilisées après avoir été stérilisées par un nettoyage à la javel, deux passages à la flamme et un passage à l'autoclave. Le perçage s'est effectué sur 5 à 10mm de profondeur et avec une vitesse de rotation lente afin de ne pas détériorer les échantillons. Pour chaque échantillon, la poudre obtenue a été récupérée dans du papier aluminium stérilisé à l'autoclave et transférée dans des tubes stériles de type Eppendorf.

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 et en utilisant un volume de 40µL de protéinase K. L'ADN obtenu a été re-suspendu dans un volume d'eau ultra pure de 50µL pour les échantillons d'os et de dent ou de 100 µL pour les échantillons de peau. Afin de mesurer la concentration et la pureté de l'ADN obtenu, des mesures ont été effectuées 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). Dans un premier temps, des amorces spécifiquement développées pour les siréniens ont été utilisées (Blair et al. in prep). 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). L'amplification de nombreux échantillons d'os et de dent s'est avérée compliquée du fait de la faible concentration d'ADN disponible et/ou de sa mauvaise qualité ce qui est un problème inhérent à ce type d'échantillons. L'amplification de fragments courts donne généralement de meilleurs résultats pour les échantillons d'ADN ancien ; nous avons donc développé de nouvelles amorces à l'aide du programme *Geneious* (Drummond et al. 2009) permettant d'amplifier un fragment plus court de la région de contrôle (~300pb). Ces nouvelles amorces ont été appelées Dlps-F (5' CGC GCG CTA TGT ACT TCGT 3') et Dlps-R (5' TGG AGG TGA TAA GCG TGT TGA 3'). Elles ont permis d'améliorer le rendement du séquençage mais malgré tout, des résultats mitigés ont été obtenus en utilisant les conditions de réaction proposées par Blair et al. (in prep), en particulier pour les échantillons issus d'os ou de dent. Plusieurs essais ont du être

effectués afin d'optimiser les conditions des réactions. Au final, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les conditions de réaction suivantes : Platinum Taq (1U), solution tampon (x1), MgCl₂ (0,5mM), amorces (0,4μmol), dNTP (0,2mM), BSA (0,5mg/mL) et DMSO (0,5%). Divers essais de cycle de transition de température ont également été testés afin d'optimiser les résultats, en particulier en faisant varier la température d'hybridation. Aucune différence significative n'ayant été observée, nous avons retenu un cycle classique de type : 5' à 94°C ; (30'' à 94°, 45'' à 55°, 60'' à 72°) x 35 ; 10' à 72°. Pour les échantillons d'os et de dent, de meilleurs résultats ont été obtenus en effectuant une double amplification consistant à utiliser un volume dilué du produit PCR obtenu lors d'une première réaction d'amplification pour réamorcer une seconde réaction effectuée dans des conditions similaires. 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 s'est 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'), que ce soit avec les amorces DLF/DLR ou Dlps-F/Dlps-R.

3.2.3 Génotypage de 10 microsatellites

Un panel de 10 loci de microsatellites développés par Kellogg-Hunter et al. (2010) a été analysé pour cette étude (Table 2). Ces loci ont été choisis car ils ont été spécifiquement développés pour les dugongs et qu'ils ont été utilisés avec succès par nos collaborateurs de JCU sur leurs échantillons. 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, les amorces de JCU pour ces cinq autres loci, n'ont pas pu être utilisées pour notre étude à cause de légères différences dans le matériel d'analyse. Les 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 comme suit : Platinum Taq (0,5U), solution tampon (x1), MgCl₂ (0,5mM), amorces (0,4μmol) et dNTP (0,2mM). Le cycle de température était comme suit : 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 groupes distincts (ou multiplex) regroupant chacun cinq des loci utilisés.

Table 2. Liste des loci de microsatellites utilisés et indices de diversité génétique. 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 ; A est la richesse allélique ; F_{IS} est l'indice de fixation.

Locus	N	k	HWE p	H_o	A	F_{IS}
B01	6	5	0.3595	0.833	5	-0,163
B02	8	3	1.0000	0.250	2,5	-0,037
C05	9	4	1.0000	0.556	3,471	-0,176
D08	9	3	0.0134*	0.222	2,901	0,624
E04	7	1	-	0.000	1	NA
E09	7	5	1.0000	0.857	4,703	-0,143
G11	9	4	0.5212	0.667	3,662	0,086
G12	7	2	1.0000	0.429	2	-0,2
H04	9	4	0.3723	0.444	3,333	0,238
H09	6	3	1.0000	0.667	3	0,07

3.3 Analyses de 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 moins 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).

Les données de microsatellites issues du séquenceur ont été analysées à l'aide du programme *Genemapper* 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 même 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).

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 requise pour pouvoir comparer ce type de marqueur. Elle a été effectuée en comparant les génotypes obtenus pour les deux échantillons australiens ayant été analysé à l'IRD ainsi qu'à JCU.

3.3.1 Niveau de diversité génétique

Deux indices standard 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 la Nouvelle-Calédonie dans son ensemble ainsi que pour l'Australie et pour quatre régions à l'intérieur de celle-ci : la côte Ouest, le territoire du Nord, le détroit de Torres et le Queensland. Pour cela nous avons employé le logiciel *Arlequin* (Excoffier et al. 2005). Il n'y a malheureusement pas assez de données disponibles pour calculer et comparer les diversités génétiques de la Nouvelle-Calédonie avec celles des autres régions de l'Indo-Pacifique où les dugongs sont présents.

La diversité génétique présente au niveau des microsatellites a été ici estimée par trois indices qui sont : le taux d'hétérozygotie observée (H_O), la richesse allélique (A) 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 et consanguinité, $F_{IS} = 0$: population en équilibre de Hardy-Weinberg. $F_{IS} < 0$: hétérozygotie excédentaire). Ces indices ont été calculés au moyen du programme F_{STAT} (Goudet 2001).

3.3.2 Tests de « bottleneck »

Des tests ont été réalisés sur les données de microsatellites pour détecter une réduction de la diversité génétique au cours des dernières générations qui serait liée à une diminution de la taille de la population. Pour cela le test unilatéral de Wilcoxon, développé dans le programme *Bottleneck* (Luikart et al. 1998) a été utilisé. 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. De plus, nous avons 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. Ces deux approches complémentaires tentent de détecter le même phénomène en utilisant des paramètres différents.

3.3.3 Connectivité avec les populations australiennes

Afin de déterminer si la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie est génétiquement différente des grandes populations australiennes, nous avons procédé à des Analyses MOléculaire de la VAriance, ou AMOVA, sur la base des données d'ADNmt et de microsatellites, grâce au logiciel *Arlequin*. Ces analyses permettent d'estimer le degré de différences génétique entre les groupes ou les populations préalablement identifiés. Un test de permutations permet d'établir la significativité des différences observées. Etant 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.

Nous avons également étudié la structure de population au moyen d'analyses Bayésiennes de groupage (ou 'clustering analyses') en utilisant le programme *Structure* (Pritchard et al. 2000). Ce type d'analyse a pour but de détecter une éventuelle structure de population dans le jeu de données et ce sans apporter d'information *a priori* sur l'origine des échantillons. Elle est basée sur les génotypes de microsatellite et prend donc en compte le flux génétique global provenant des mâles et des femelles. Plusieurs scénarii ont été testés sur la totalité des données intégrant Nouvelle-Calédonie et 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). Comme pour l'AMOVA, nous avons confronté les données de Nouvelle-Calédonie aux données des quatre régions d'Australie. Nous avons effectué ces analyses trois fois afin de vérifier l'adéquation des résultats (100.000 itérations).

3.3.4 Phylogéographie

Afin de visualiser la répartition géographique de la diversité génétique au niveau mitochondrial, nous avons construit un réseau haplotypique avec le logiciel *Network* (Bandelt et al. 1999) regroupant toutes les séquences disponibles pour cette étude. Cette approche peut permettre d'établir des scénarii concernant la répartition géographique des différentes lignées et donc de retracer l'histoire évolutive des populations. La répartition de la diversité génétique d'une même population au sein d'un réseau haplotypique peut également apporter 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.

En complément de cette analyse, 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 *Arlequin*. Ces deux tests peuvent permettre de détecter si la population a connue une augmentation soudaine de ses effectifs au cours de son histoire évolutive. Ce type d'événements est intéressant à identifier car ils font généralement suite à une réduction massive des effectifs ou à un événement fondateur, c'est-à-dire la colonisation d'un habitat. Ils nous renseignent donc sur l'histoire évolutive de la population en détectant des événements ayant pu se produire il y a plusieurs dizaines de générations. Il est important de noter que ces tests se distinguent des tests de « bottleneck » décrits plus haut, qui sont basés sur les microsatellites et s'attachent à détecter une réduction des effectifs survenue au cours des dernières générations.

Enfin, les données d'ADNmt ont été utilisées pour réaliser des arbres phylogénétiques au moyen de trois méthodes classiques de reconstruction phylogénétique : Neighbour-Joinings (méthode de distance), Maximum de Parcimonie, et Maximum de Vraisemblance. L'ensemble des reconstructions a été réalisée avec le logiciel *Mega* (Kumar et al. 2004). Ces analyses sont complémentaires des réseaux haplotypiques car elles permettent de tester la fiabilité d'une topologie (i.e., ordre de branchement des haplotypes) grâce à une procédure de 'bootstrap'. Le 'bootstrap' consiste à répéter la reconstruction d'un arbre une multitude de fois et à déterminer le pourcentage de fiabilité des différents branchements suggérés par la méthode de reconstruction choisie. En général, un branchement soutenu par $\geq 90\%$ des réplifications est considéré comme très significatif et un soutien de $\geq 70\%$ est considéré comme robuste (Hillis & Bull 1993). Ici, notre but était de déterminer si les dugongs de Nouvelle-Calédonie forment une lignée distincte et/ou s'ils sont génétiquement connectés à des lignées représentées par les échantillons australiens ou ceux de l'Indo-Pacifique.

4. RESULTATS

4.1 Données disponibles

4.1.1 Extractions d'ADN

L'ADN de la totalité des 34 échantillons de tissu disponibles (Nouvelle-Calédonie, Vanuatu et Iles Salomon) a été extrait au moins une fois. Une deuxième extraction a été réalisée pour 10 échantillons d'os ou de dents dont l'amplification de l'ADNmt avait échoué lors de la première tentative. Malheureusement, aucune de ces secondes extractions n'a permis d'obtenir de meilleurs résultats de PCR. Les concentrations et indices de puretés des ADN extraits, tel que révélés par l'analyse spectrophotométrique, montrent d'importantes variations entre les différents échantillons (Annexe 1) mais ces variations ne semblent pas corrélées à la réussite des analyses qui suivent.

4.1.2 Séquençage de l'ADNmt et « fragment consensus »

Des séquences de bonne qualité ont été obtenues pour 26 des 36 échantillons d'ADN analysés pour cette étude (22 Nouvelle-Calédonie, 2 Australie, 1 Vanuatu et 1 Iles Salomon). Aucune séquence exploitable n'a pu être obtenue pour 10 échantillons de Nouvelle-Calédonie, même après répétition des différentes analyses. Ces échantillons étaient soit des os soit des dents. Des fragments longs de plus de 500pb (amorces DLF/DLR) ont été obtenus pour 19 échantillons. De plus, grâce à l'utilisation de nouvelles amorces (DlpsF/DlpsR), des fragments courts (292pb) ont pu être obtenus pour 7 échantillons supplémentaires. Au final, la longueur des fragments exploitables varie de 292 à 537pb en fonction des échantillons et des amorces utilisées. Le plus grand fragment disponible pour l'ensemble des échantillons, ou « fragment consensus », présente donc une longueur de 292pb.

Les séquences des échantillons australiens (n = 2) se sont révélées en adéquations avec les séquences obtenues par nos collègues de JCU ; elles représentent deux haplotypes distincts. L'analyse des 22 échantillons de Nouvelle-Calédonie, ainsi que des échantillons du Vanuatu et des Iles Salomon, a révélé la présence de quatre haplotypes définis par quatre sites polymorphiques, tous situés dans le « fragment consensus » de 292pb (Annexe 2). Aucun autre site polymorphique n'a pu être détecté parmi les échantillons pour lesquels nous disposons de séquences plus longues. C'est pourquoi les analyses suivantes (niveau de diversité, structure et phylogéographie) ont été uniquement menées sur la base du « fragment consensus » sans perte d'information. En effet, afin de pouvoir comparer au mieux la diversité génétique de différentes régions, il est préférable d'utiliser des fragments de longueur équivalente et représentant la même partie du génome.

4.1.3 Génotypage

La mauvaise qualité de certains extraits d'ADN n'a pas permis d'amplifier avec succès les microsatellites pour certains échantillons, essentiellement des os et des dents. Au final, seuls quatorze des échantillons d'ADN disponibles pour cette étude ont fourni des données pour ce type de marqueur. Une moyenne de 7 loci sur les 10 analysés a été génotypée 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. Un allèle nul est un allèle dont l'amplification a échoué et qui peut donc faire apparaître un individu hétérozygote comme étant homozygote. Le test de Hardy-Weinberg implémenté dans *Genepop* indique que tous les loci utilisés sont en équilibre mis à part D08 (Tableau 2), ce qui n'est pas surprenant étant donné la possibilité d'allèles nuls pour ce locus. Les résultats des analyses suivantes menées avec ou sans le locus D08 ne présentent aucune différence notable. Nous avons donc conservé ce locus dans les résultats présentés ci-dessous. Aucun déséquilibre de liens entre loci n'a été détecté par le programme *Genepop*.

Une calibration entre les données de génotypage obtenue en Nouvelle-Calédonie et celles provenant de JCU a été réalisée, mais celle-ci s'est révélée problématique, en particulier pour les loci dont les amplifications ont été réalisées avec des amorces d'origine différente. Une calibration complète nécessitera l'analyse des échantillons de Nouvelle-Calédonie à JCU.

4.2 Niveau de diversité génétique et tests « bottleneck »

L'analyse de la diversité génétique a révélé d'importantes différences entre la Nouvelle-Calédonie et l'Australie tant au niveau de l'ADNmt que de l'ADN nucléaire. Le nombre d'haplotypes représentés dans la population de Nouvelle-Calédonie est largement inférieur à celui existant en Australie (Table 3). Seuls quatre haplotypes ont été identifiés en Nouvelle-Calédonie parmi lesquels trois ne sont représentés que par un seul individu. Les 19 individus restant partagent tous le même haplotype majoritaire, l'haplotype A. Ces quatre haplotypes ne sont pas représentés dans la population australienne qui, prise dans son ensemble, présente une diversité génétique bien plus élevée que celle estimée en Nouvelle-Calédonie, en particulier au niveau nucléotidique. Cette différence peut potentiellement s'expliquer par la présence de plusieurs sous-populations distinctes de dugongs le long de la côte australienne. Afin de prendre en compte cet effet, nous avons également estimé la diversité génétique au sein de quatre régions géographiques d'Australie telle que définies au chapitre Matériels et Méthodes. Chacune de ces régions présente une diversité génétique au niveau mitochondrial bien plus élevée que celle mesurée en Nouvelle-Calédonie (Table 3). La diversité nucléotidique en particulier, se trouve être au minimum dix fois plus importante dans chacune des populations australiennes considérées qu'en Nouvelle-Calédonie.

Table 3. Indices de diversité génétique de l'ADNmt pour la Nouvelle-Calédonie et l'Australie. h est la diversité haplotypique et π est la diversité nucléotidique.

	n	# haplotype	h	π
Nouvelle-Calédonie	22	4	0.2597 +/- 0.1202	0.124% +/- 0.139%
<u>Australie</u>	177	34	0.8953 +/- 0.0132	2.802% +/- 1.444%
Ouest Australie	28	12	0.9048 +/- 0.0300	1.261% +/- 0.731%
Territoire du Nord	9	7	0.9444 +/- 0.0702	1.884% +/- 1.134%
Détroit de Torres	57	13	0.6942 +/- 0.0659	2.014% +/- 1.083%
Queensland	83	16	0.8357 +/- 0.0276	2.475% +/- 1.298%

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 = 3,4) dans la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie par rapport à celle d'Australie (Table 4). Cette tendance est confirmée lorsque l'on regarde la diversité au sein des différentes régions d'Australie (Table 4). La différence entre la Nouvelle-Calédonie et l'Australie s'exprime aussi bien au niveau du taux d'hétérozygotie (H_o) qu'au niveau de la richesse allélique (A), cette dernière prenant en compte les différences de taille d'échantillons entre les groupes qui sont comparés.

L'indice de fixation en Nouvelle-Calédonie est proche de 0 ($F_{IS} = 0,045$), ce qui suggère que la population est à l'équilibre de Hardy-Weinberg et ne présente pas de signe évident de consanguinité. Des résultats similaires ont été obtenus pour les différentes régions d'Australie (Table 4).

Table 4. Indice de diversité des microsatellites pour la Nouvelle-Calédonie et l'Australie. H_o est le taux d'hétérozygotie ; A est la richesse allélique ; F_{IS} est l'indice de fixation.

	n	# allèles	H_o	A	F_{IS}
Nouvelle-Calédonie	11	3,4	0,5156	3,157	0,045
<u>Australie</u>	166				
Ouest Australie	16	6,2	0,7334	4,8159	0,073
Territoire du Nord	9	6,8	0,8299	5,7987	0,049
Detroit de Torres	74	11,1	0,7984	5,6636	0,042
Queensland	67	8,6	0,7498	5,0051	0,079

Les tests effectués avec le programme *Bottleneck* n'indiquent pas que la population de dugongs en Nouvelle-Calédonie a subi un effet de goulot d'étranglement génétique au cours des dernières générations ($p = 0,32$). De même, la méthode *M-Ratio* indique que la valeur observée de M ne diffère pas significativement de la distribution théorique nulle pour une population à l'équilibre ($M = 0,656$; $p > 0,05$).

4.3 Connectivité avec les populations australiennes

Une AMOVA a permis d'analyser le niveau de connectivité entre les dugongs de Nouvelle-Calédonie et d'Australie. Une différence très significative a été mise en évidence pour le marqueur de l'ADNmt (Table 5). Des résultats similaires ont été obtenus en comparant la Nouvelle-Calédonie à chacune des quatre régions d'Australie définies ici. Ce résultat indique un flux génétique femelle faible ou nul qui ne permet pas d'homogénéiser le patrimoine génétique de l'ADNmt entre les quatre régions australiennes et la Nouvelle-Calédonie. Les valeurs de F_{ST} (Table 5) indiquent une différenciation similaire entre la Nouvelle-Calédonie et chacune des quatre régions australiennes. La différence entre la Nouvelle-Calédonie et chacune de ces régions est supérieure à la différence observée entre chacune des quatre régions (Table 5).

Table 5. Valeurs de F_{ST} et degré de significativité basés sur l'ADNmt entre la Nouvelle-Calédonie et les quatre régions d'Australie

	Nouvelle-Calédonie	Ouest Australie	Territoire du Nord	Detroit de Torres	Queensland
Nouvelle-Calédonie	-				
Ouest Australie	0,352***	-			
Territoire du Nord	0,328***	0,150*	-		
Detroit de Torres	0,593***	0,530***	0,386***	-	
Queensland	0,499***	0,439***	0,284**	0,032*	-

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

La même analyse (AMOVA) a été conduite sur les données issues des microsatellites permettant d'estimer le flux génétique nucléaire, c'est-à-dire le flux génétique global provenant des mâles et des femelles. Les résultats montrent une différenciation génétique importante au niveau nucléaire entre la Nouvelle-Calédonie et les différentes régions d'Australie (Table 6). Ils suggèrent donc l'absence, ou tout du moins la faiblesse du flux génétique pour les deux sexes.

Table 6. Valeurs de F_{ST} et degré de significativité basés sur les microsatellites entre la Nouvelle-Calédonie et les quatre régions d'Australie

	Nouvelle-Calédonie	Ouest Australie	Territoire du Nord	Detroit de Torres	Queensland
Nouvelle-Calédonie	-				
Ouest Australie	0,135***	-			
Territoire du Nord	0,234**	0,105**	-		
Detroit de Torres	0,153***	0,139***	0,038 ^{ns}	-	
Queensland	0,382***	0,163***	0,000 ^{ns}	0,107***	-

ns : $p > 0,05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

L'analyse Bayésienne de structure de la population suggère l'existence de quatre populations dans le jeu de données comme indiqué par les valeurs de $\ln P(D)$ (Annexe 3). Les échantillons de Nouvelle-Calédonie se détachent clairement pour former une population distincte (Figure 1). Les trois autres populations détectées par cette analyse sont la côte Ouest australienne (OA), le centre Queensland (CQ) et l'ensemble Nord Queensland (NQ), détroit de Torres (DT) et territoire du Nord (TN). Il est intéressant de noter que lorsqu'un scénario limité à trois populations est testé sur le jeu de données, les échantillons de Nouvelle-Calédonie se rattachent alors à l'ensemble Nord Queensland, détroit de Torres et territoire du Nord (Figure 2).

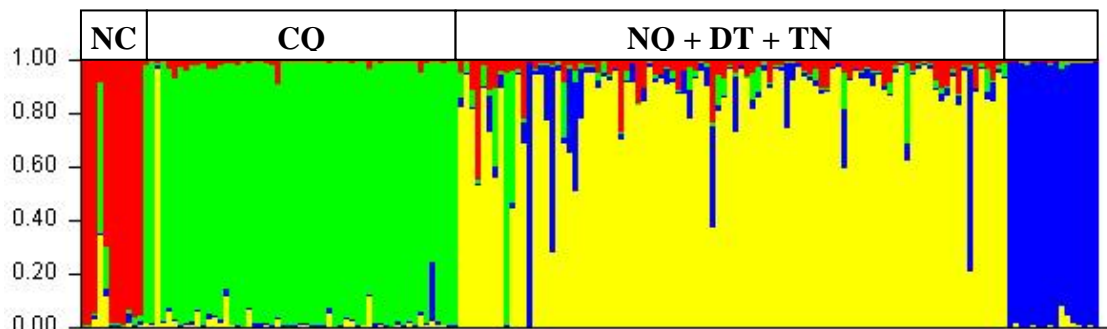


Figure 1. Résultats de l'analyse Bayésienne obtenus sur la base d'un scénario de 4 populations. NC : Nouvelle Calédonie ; CQ : Centre Queensland ; NQ : Nord Queensland ; DT : Détroit de Torres ; TN : Territoires de Nord ; OA : Ouest Australie.

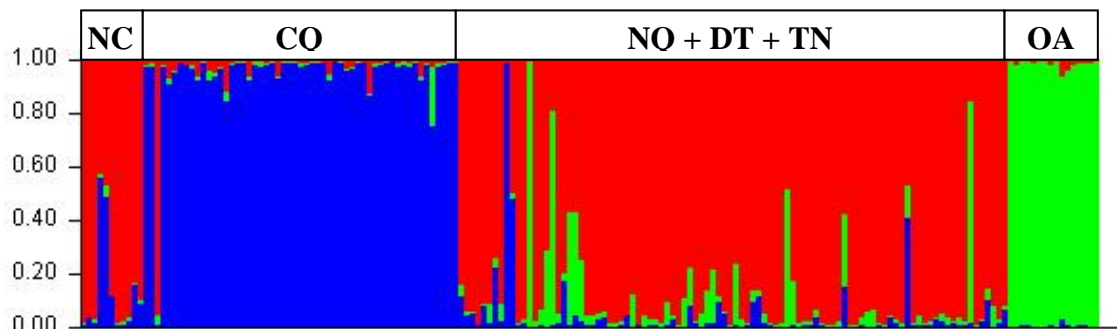


Figure 2. Résultats de l'analyse Bayésienne obtenus sur la base d'un scénario de 3 populations.

4.4 Phylogéographie

Le réseau haplotypique basé sur les séquences de l'ADNmt indique que les échantillons du Vanuatu et des Iles Salomon sont porteurs de l'haplotype majoritairement représenté en Nouvelle-Calédonie (i.e., Haplotype A) (Figure 3). En revanche, aucun des haplotypes identifiés en Australie ou en Asie du Sud-est, au

Japon ou en Micronésie ne correspond aux haplotypes identifiés dans la population de Nouvelle-Calédonie.

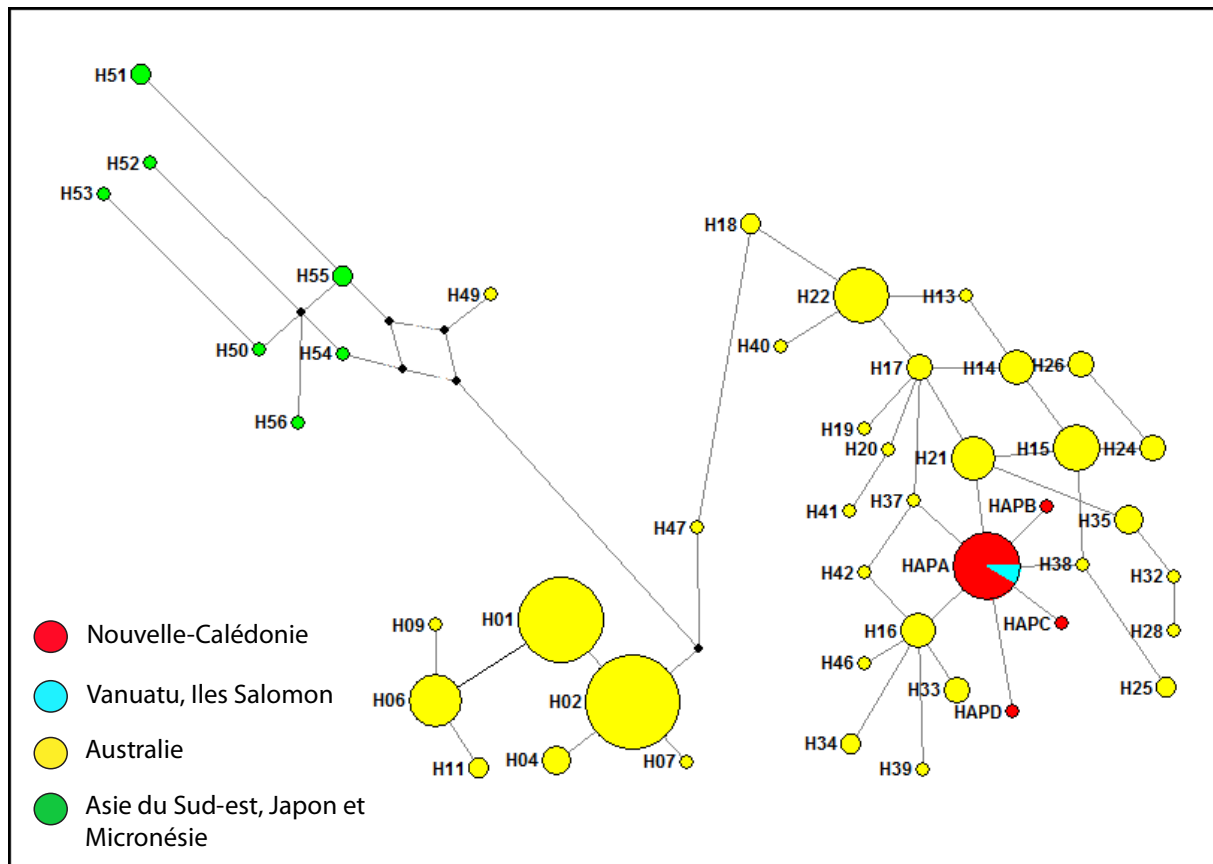


Figure 3. Réseau haplotypique de type « median-joining » sur l'ensemble des données d'ADNmt.

Table 7. Valeurs et significativité des tests de Tajima et de Fu pour les dugongs de Nouvelle-Calédonie et des quatre régions d'Australie.

	Tajima (D)	Fu (Fs)
Nouvelle-Calédonie	-1,877**	-2,206**
Australie	0,731 ^{ns}	-3,584 ^{ns}
Ouest Australie	-0,863 ^{ns}	-2,491 ^{ns}
Territoire du Nord	-1,046 ^{ns}	-1,009 ^{ns}
Detroit de Torres	0,907 ^{ns}	0,475 ^{ns}
Queensland	1,715 ^{ns}	1,571 ^{ns}

ns : $p > 0,05$; ** : $p < 0,01$

Le réseau suggère cependant que les haplotypes existants en Nouvelle-Calédonie se rattachent à une lignée composée uniquement d'haplotypes présents en Australie. Ils apparaissent en revanche, éloignés de deux autres lignées, l'une se composant du reste des haplotypes australiens et la deuxième semblant regrouper

l'ensemble des haplotypes représentés dans d'autres régions de l'Indo-Pacifique. Il est également possible de constater que les quatre haplotypes calédoniens présentent un minimum de différence les uns avec les autres. L'agencement et la fréquence des quatre haplotypes présente une structure, dite « en étoile », avec l'haplotype majoritaire se situant au centre de cette étoile. Les résultats de tests de Tajima et de Fu indiquent que des valeurs de D et Fs significatives ont été trouvées pour la Nouvelle-Calédonie (Table 7).

Enfin, les analyses de reconstruction phylogénétique ont permis d'appréhender plus en détails les liens ancestraux entre les dugongs de Nouvelle-Calédonie et les lignées d'ADNmt représentées dans le jeu de données. Les trois types d'analyses (Neighbour-Joinings, Maximum de Parcimonie, et Maximum de Vraisemblance) ont abouti à des typologies essentiellement similaires. Nous présentons ici l'arbre obtenu par la méthode de Neighbour-Joinings (Figure 4) mais les deux autres reconstructions peuvent être visualisées en Annexe 4. L'existence de trois lignées distinctes telles que suggérées par le réseau haplotypique (Figure 4) est confirmée. La première lignée (Clade jaune rayé) se compose d'haplotypes australiens ainsi que de ceux identifiés dans la région mélanésienne. Ces derniers se regroupent à l'intérieur de la première lignée pour former un clade à part (Clade rouge) ; cependant les valeurs de 'bootstrap' validant la significativité de ce clade sont faibles. La deuxième lignée comprend le reste des haplotypes portés par les dugongs australiens (Clade jaune pointillé), à l'exception d'un individu (haplotype h49). L'haplotype de cet individu se trouve dans la troisième lignée constituée de l'ensemble des échantillons du reste de l'Indo-Pacifique (Clade vert). Les deuxième et troisième lignées se regroupent ensemble, en marge de la première lignée.

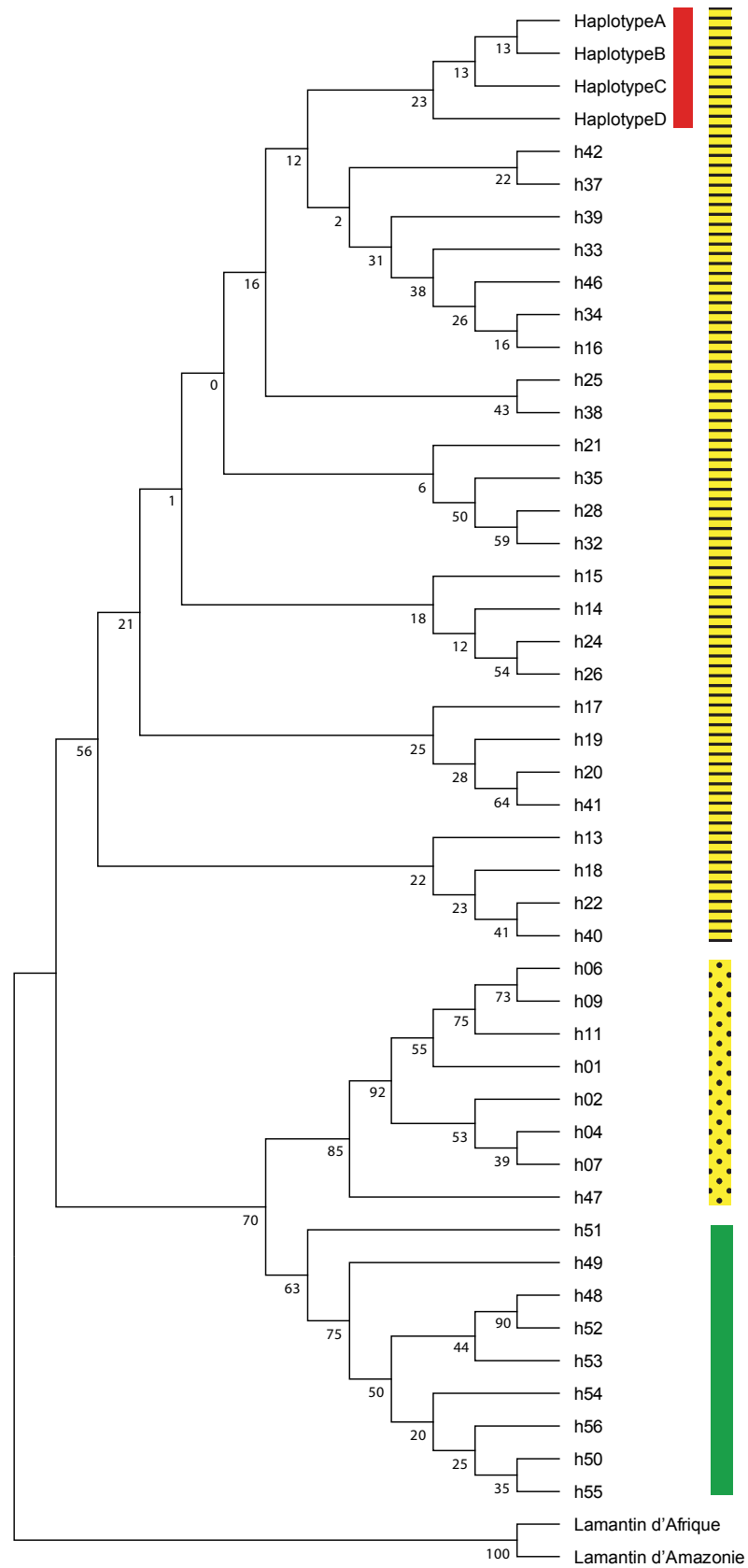


Figure 4. Reconstruction phylogénétique de type Neighbour-Joinings avec valeurs de bootstrap (10,000 iterations).

5. DISCUSSION

5.1 Limites de l'étude

Des difficultés ont été rencontrées au cours de l'analyse des échantillons d'os et de dents dont l'ADN peut être qualifié d'ancien (dégradé et en faible concentration). L'absence de résultats pour certains de ces échantillons a été compensée par l'obtention d'échantillons supplémentaires principalement obtenus suite à un appel lancé par les médias locaux au public calédonien.

Finalement des séquences d'ADN mitochondrial ont été obtenues pour 22 individus permettant de constituer un échantillonnage suffisant pour une estimation précise du niveau de diversité génétique et de la connectivité avec les populations australiennes. La taille des séquences utilisées est relativement courte (292pb) du fait de l'usage des nouvelles amorces permettant d'exploiter certains échantillons d'ADN ancien. Ce compromis n'a pas eu de conséquence sur les résultats puisque l'analyse comparative des séquences les plus longues (> 500pb) suggère que l'essentiel de la diversité de ce marqueur chez les dugongs de Nouvelle-Calédonie se trouve dans la première partie de la région de contrôle de l'ADNmt ; c'est-à-dire dans le fragment présentement utilisé.

L'analyse en laboratoire des microsatellites s'est révélée plus compliquée que celle des séquences d'ADNmt. Ce résultat est logique car une cellule animale contient généralement plusieurs dizaines de mitochondries, donc de copies d'ADNmt, alors qu'elle ne contient qu'un seul noyau et sa copie unique du génome nucléaire où sont distribués les microsatellites. Des informations n'ont pu être obtenues que pour 11 dugongs de Nouvelle-Calédonie, ce qui a constitué une limitation pour certaines des analyses réalisées.

Comme indiqué dans le chapitre Matériels et Méthodes, une calibration est nécessaire pour pouvoir comparer les résultats des génotypages obtenus dans différents laboratoires. Il nous est difficile d'attester à ce stade de l'exactitude de la calibration ayant été effectuée entre nos données microsatellitaires et celles issues de JCU car trop peu d'échantillons ont été analysés à la fois au laboratoire de l'IRD et à celui de JCU. Cependant, malgré ces limitations, les résultats des analyses basées sur ces marqueurs n'ont pas révélés d'incohérences comme nous aurions pu nous y attendre en cas de mauvaise calibration. Ceci laisse donc penser que cette dernière a été correctement effectuée.

5.2 Une faible diversité génétique

Cette étude a permis d'obtenir des informations importantes sur le statut de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie. En premier lieu, il a été possible

d'estimer le niveau de diversité génétique de cette population et de le comparer aux grandes populations d'Australie. Les résultats montrent très clairement que la diversité génétique de la population de Nouvelle-Calédonie est largement inférieure à celle de chacune des populations australiennes telles que définies dans cette étude. Cette conclusion est valable pour les deux types de marqueurs utilisés, la région de contrôle de l'ADN mitochondrial et les microsattellites de l'ADN nucléaire. L'estimation de l'indice de fixation F_{IS} ne semble pas indiquer de niveau élevé de consanguinité au sein de la population mais il serait intéressant de recalculer ce paramètre avec un nombre plus important d'échantillons afin d'en confirmer la valeur. En effet, il a été montré qu'un niveau élevé de consanguinité peut entraîner une diminution du succès reproducteur (Hedrick & Kalinowski 2000). Il est donc important d'évaluer avec précision le niveau de consanguinité d'une population dont le statut de conservation est incertain.

Les tests de 'bottleneck' menés sur les données de microsatellite n'ont pas révélé d'effet de goulot d'étranglement, et ne permettent donc pas d'imputer le faible niveau de diversité génétique à une récente diminution des effectifs. Cependant, ces tests ne sont pas robustes lorsque le nombre de données utilisées est trop limité (Luikart et al. 1998), ce qui est clairement le cas ici. Il serait donc prématuré de rejeter, sur la seule base de ces résultats, l'hypothèse selon laquelle les pressions subies par les dugongs en Nouvelle-Calédonie au cours des dernières générations, et en particulier la chasse, n'ont pas eu d'impact sur la diversité génétique de la population. Néanmoins, il convient de préciser que la faible diversité génétique observée en Nouvelle-Calédonie pourrait en partie être due aux caractéristiques démographiques propres à cette population et notamment à son abondance inférieure à celles des populations australiennes.

5.3 Isolement génétique par rapport à l'Australie

La différence génétique entre les populations d'Australie et la population de Nouvelle-Calédonie est très significative aussi bien au niveau du flux génétique femelle qu'au niveau du flux génétique global (mâle + femelle). Les dugongs de Nouvelle-Calédonie n'ont donc pas d'échange reproductif avec les dugongs d'Australie. Par conséquent, les grandes populations australiennes ne sont pas en mesure de représenter un réservoir potentiel d'individus susceptibles de renouveler les effectifs de la population de Nouvelle-Calédonie. Cet isolement semble concerner toutes les populations australiennes, de l'Ouest Australien jusqu'au Queensland. L'absence de connectivité entre la Nouvelle-Calédonie et le Queensland confirme par ailleurs que même si des migrations trans-océaniques sont possibles via la mer de Corail, celles-ci ne sont pas assez fréquentes pour influencer sur la diversité génétique des dugongs de Nouvelle-Calédonie.

Bien que nous ne disposions que de données fragmentaires pour le reste de la Mélanésie (un échantillon du Vanuatu et un des Iles Salomon), il semble qu'une connexion actuelle ou récente avec la Nouvelle-Calédonie soit possible. En effet, malgré son caractère anecdotique, le partage d'un même haplotype de l'ADNmt entre la Nouvelle-Calédonie, le Vanuatu et les Iles Salomon, couplé à l'absence de ce même haplotype parmi 177 dugongs d'Australie, sont suffisamment significatifs pour être relevé. Ce résultat suggère en effet un lien ancestral plus récent entre les îles mélanésiennes qu'entre la Nouvelle-Calédonie et l'Australie. En revanche, il est impossible actuellement de déduire le niveau de structure génétique existant au sein de la région mélanésienne. La structure insulaire de ces territoires, ainsi que l'éloignement et la profondeur des eaux qui les séparent, laissent néanmoins penser que les échanges doivent être limités.

5.4 Histoire évolutive en Nouvelle-Calédonie

L'analyse des séquences de l'ADNmt a révélé des caractéristiques intéressantes de la diversité génétique au sein de la population de Nouvelle-Calédonie, susceptibles de nous fournir des informations sur son histoire évolutive. Le très faible niveau de diversité nucléotidique suggère que la population calédonienne a connu, à un moment de son histoire, de très petits effectifs. Il n'est pas surprenant que cette période n'ait pas été détectée par les tests de « bottleneck » décrit ci-dessus car elle remonte probablement à plusieurs dizaines de générations, c'est-à-dire au delà de l'échelle de temps couverte par ces tests. Ainsi, l'effet goulot d'étranglement peut ne plus être visible au niveau des microsatellites tout en continuant à influencer la diversité génétique de la population actuelle au niveau de son ADN mitochondrial.

La présence d'un seul haplotype majoritaire (A) et de quelques haplotypes 'frères' (c'est-à-dire ne se différenciant de l'haplotype majoritaire que par 1 ou 2 pb) suggère que l'ensemble de la population actuelle pourrait descendre d'une femelle unique portant l'haplotype A. Il est en effet probable que la présence des haplotypes 'frères' ne soit due qu'à de récentes mutations ayant affecté l'ADNmt des porteurs de l'haplotype A qui l'ont transmis à leur descendance. Ceci est également suggéré par les reconstructions phylogénétiques où la constitution d'un ensemble regroupant les haplotypes de Mélanésie indique la possibilité d'un ancêtre commun pour la région (Clade rouge, Figure 4). Il est néanmoins possible que des haplotypes plus distants de l'haplotype A, existent dans la population calédonienne mais n'aient pas encore été détectés. L'existence hypothétique de tels haplotypes ne serait cependant pas en mesure d'affecter de manière significative le niveau de diversité génétique de la population estimé dans la présente étude.

Les résultats des tests de Tajima et de Fu, ainsi que par la configuration en étoile des haplotypes de Nouvelle-Calédonie (Figure 3), indiquent que la population a

connu une phase d'expansion démographique importante faisant suite à cette période d'effectifs réduits. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent deux scénarii possible pouvant expliquer les caractéristiques de la diversité génétique observée au niveau de l'ADNmt des dugongs de Nouvelle-Calédonie :

- Au cours de son histoire évolutive, la population locale a connu une diminution drastique de ses effectifs suite un événement dramatique et elle s'est ensuite reformée à partir des individus survivants ;

ou,

- La population de dugongs en Nouvelle-Calédonie est récente, elle s'est formée à la suite d'un événement fondateur, c'est-à-dire la migration d'individus venant d'une autre région, et incluant une ou quelques femelles.

Qu'il s'agisse de l'un ou l'autre des scénarii, il est très probable que l'histoire de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie ait été marquée par les dernières ères glaciaires, lesquelles semblent avoir fortement influencé les dugongs d'Australie (Blair et al. in prep). A la fin de la dernière glaciation, il y a environ -20,000 ans, le niveau de la mer était inférieur de 120 mètres par rapport à son niveau actuel (Lambeck & Chappell 2001). A cette époque l'essentiel du lagon calédonien, tel qu'on le connaît actuellement, s'est retrouvé émergé (Chevillotte et al. 2005) ce qui a dû entraîner des conséquences catastrophiques sur les écosystèmes d'herbiers de phanérogames dont les dugongs se nourrissent. Les herbiers se développant majoritairement dans les eaux peu profondes du lagon, il ne devait donc en rester que quelques poches résiduelles au plus fort des périodes glaciaires. Ceci pourrait expliquer la diminution drastique, voir la disparition complète des dugongs en Nouvelle-Calédonie. En revanche, il est possible que cette diminution du niveau de la mer ait créé des corridors de migration favorisant la dispersion des dugongs dans la zone Indo-Pacifique et notamment dans l'arc mélanésien. Les deux scénarii proposés plus haut sont donc crédibles et aucun des deux ne peut être écarté avec les données actuellement disponibles.

5.5 Connexions ancestrales avec l'Australie et l'Indo-Pacifique

Les reconstructions phylogénétiques ont permis de comparer les dugongs de Nouvelle-Calédonie aux dugongs d'Australie mais également à ceux d'autres régions de l'Indo-Pacifique. L'ensemble des arbres phylogénétiques obtenus indiquent un regroupement des haplotypes de Nouvelle-Calédonie au sein d'un clade ne contenant que des haplotypes australiens (Clade jaune rayé, Figure 4). L'histoire évolutive des dugongs de Nouvelle Calédonie semble donc rejoindre celle des dugongs australiens avant de rejoindre celle des populations d'Asie du Sud-est et, vraisemblablement, du Japon et de la Micronésie (mais trop peu d'échantillons de ces régions sont disponibles pour s'avancer sur ce point).

L'ensemble des reconstructions phylogénétiques obtenues indiquent la présence de deux lignées maternelles distinctes parmi les dugongs australiens (Clades jaunes, Figure 4). Ce résultat est en accord avec les études précédemment menées à JCU qui avaient montré l'existence de ces deux grandes lignées (Blair et al. in prep). La première lignée, dite «restreinte », se trouve principalement cantonnée à l'Est du pays (Queensland) ; la seconde lignée, dite « dispersée », se rencontre sur l'ensemble de la côte australienne mais devient plus rare dans le Sud du Queensland. Il semble très probable que cette répartition phylogéographique résulte de la séparation de la population lors de la fermeture du Détroit de Torres survenue lors de la dernière ère glaciaire (Blair et al. in prep).

Nos résultats indiquent clairement que la connexion de la Nouvelle-Calédonie (et potentiellement de la Mélanésie entière) avec l'Australie s'établie par la lignée « dispersée ». Cette dernière s'est probablement formée à l'Ouest du détroit de Torres lorsque celui-ci était émergé, et elle se serait ensuite étendue au reste de la côte lorsque le niveau de la mer est remonté (Blair et al. in prep). La connexion établie entre les haplotypes mélanésiens et les haplotypes australiens de la lignée « dispersée » suggère donc que la colonisation de la Nouvelle-Calédonie, située en limite de répartition de l'espèce, s'est établie via une dispersion par l'arc mélanésien plutôt que via des événements migratoires trans-océaniques par la mer de Corail. Cette hypothèse est également appuyée par l'analyse Bayésienne de structure de population qui suggère, sur la base de données microsatellites, que les dugongs de Nouvelle-Calédonie entretiennent un lien ancestral plus récent avec les populations du nord de l'Australie qu'avec les populations du Queensland.

6. CONCLUSIONS

Les résultats mis en évidence par cette étude ne sont pas favorables au statut de conservation des dugongs de Nouvelle-Calédonie. En effet, nous avons montré que la population se caractérise par un faible niveau de diversité génétique mais aussi que celle-ci est isolée des grandes populations de la côte australienne. La faible diversité génétique ne dénote pas nécessairement une réduction récente des effectifs pouvant être due à la pression de chasse sur la population au cours des dernières générations bien que cette hypothèse ne puisse pas être rejetée tant que des analyses plus poussées n'auront pas été menées. Quoiqu'il en soit, une faible diversité génétique (naturelle ou non) réduit l'habilité des espèces à évoluer pour faire face aux maladies, aux changements environnementaux et aux pressions anthropiques (Frankham et al. 2002). Les risques d'extinction s'en retrouvent donc accrus, soulignant le statut précaire de cette population vulnérable. L'isolement des dugongs calédoniens vis-à-vis des grandes populations australiennes accentue ce risque car la résilience d'une population est d'autant plus faible que celle-ci se trouve isolée des populations voisines susceptibles d'apporter de nouveaux individus reproducteurs par migration.

La population de dugongs en Nouvelle-Calédonie a connue une pression de chasse au cours du siècle dernier. L'impact réel sur la population est difficile à établir car la taille des effectifs historiques n'est pas connue. Bien que la présente étude n'ait pas permis d'établir de lien entre ces événements récents et les caractéristiques génétiques de la population, elle a en revanche mis en valeur la précarité de son statut de conservation. Il est donc primordial de maintenir l'effort de conservation sur cette population mais aussi de continuer à accumuler des connaissances sur son écologie et sa trajectoire démographique. Cela permettra, le cas échéant, de mettre 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, etc.) mais aussi de détecter plus rapidement des menaces pesant sur la population.

7. FUTURES DIRECTIONS

Les analyses effectuées pour cette étude n'ont pas permis d'obtenir d'information sur un certain nombre d'échantillons d'os et de dent. Les analyses génétiques sur ce type d'échantillons « anciens » sont compliquées du fait de la difficulté à en extraire un ADN de bonne qualité et suffisamment concentré. Des pistes sont actuellement explorées avec nos collègues australiens pour permettre une meilleure exploitation de ces échantillons.

Comme indiqué dans le Matériels et Méthode, la comparaison de données de microsatellites obtenues dans des laboratoires différents nécessite une phase de calibration essentielle qui requiert l'échange d'un certain nombre d'échantillons entre les laboratoires concernés. Une calibration a été effectuée à l'IRD pour la présente étude afin de comparer les données de Nouvelle-Calédonie et d'Australie mais elle n'a pas pu être complétée par l'analyse d'échantillons calédoniens à JCU. Cela ne semble pas avoir eu d'incidence sur les résultats de l'étude mais il serait tout de même recommandé d'effectuer une calibration complète, notamment dans l'optique d'une publication des résultats dans un journal à comité de lecture. Il est déjà prévu que des échantillons d'ADN de dugongs de Nouvelle-Calédonie soient envoyés à JCU pour cette analyse.

Les analyses génétiques menées pour cette étude ont permis de répondre à des questions prioritaires sur le statut des dugongs en Nouvelle-Calédonie. Néanmoins, des analyses supplémentaires pourraient être conduites afin d'améliorer la précision de certains résultats obtenus mais aussi d'aborder de nouvelles questions ne pouvant être adressées avec les données actuelles.

L'obtention de données supplémentaires de microsatellites permettraient notamment d'obtenir des résultats plus robustes aux tests de « bottleneck ». Cette analyse est importante car elle permettrait d'établir si la pression de chasse exercée au cours de l'histoire récente sur les dugongs de Nouvelle-Calédonie a eu un impact sur la diversité génétique de la population. La collecte de nouveaux échantillons provenant de l'ensemble de la Grande Terre permettrait de rechercher la structure de la population de Nouvelle-Calédonie qui ne peut actuellement être abordée du fait d'un nombre d'échantillons trop restreint. En effet, la présence de plusieurs sous-populations distinctes pourrait avoir d'importantes implications pour la gestion locale de l'espèce.

Les études génétiques axées sur la conservation des dugongs en Nouvelle-Calédonie bénéficieraient également d'une comparaison avec les autres populations de Mélanésie qui n'a pu être réalisé ici car seuls deux échantillons (du Vanuatu et des Iles Salomon) étaient disponibles. Il est possible, bien que peu probable, que des échanges migratoires soient maintenus entre ces différentes régions. L'impact sur la dynamique de la population calédonienne serait alors dépendant de la fréquence de ces échanges et de la taille des effectifs présents aux Vanuatu et aux

Iles Salomon. Il n'existe pour l'heure aucune donnée quantifiée sur le statut des dugongs dans ces régions.

L'obtention de nouveaux échantillons d'ADN de Nouvelle-Calédonie ne sera pas chose aisée. Cependant, des initiatives peuvent être développées pour tenter de contourner cette difficulté. Il peut s'agir notamment de développer, sur le modèle d'autres pays comme la France ou la Nouvelle Zélande, un réseau territorial d'échouages qui permettrait de documenter plus précisément ce type d'événements et de collecter des échantillons. L'échantillonnage de fécès de dugong comme source d'ADN peut également être explorée, nos collègues australiens bénéficiant encore une fois d'une certaine expérience dans ce domaine (Tikel et al. 1996).

Enfin, les analyses conduites pour cette étude pourraient également bénéficier de l'utilisation de marqueurs génétiques supplémentaires (e.g., introns, SNPs) ainsi que de séquences plus longues de l'ADNmt. Cela permettrait notamment d'approfondir les analyses de reconstruction phylogénétique et donc d'améliorer notre compréhension de l'histoire évolutive des dugongs de Nouvelle-Calédonie.



8. REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Service de la Mer / Protection du Lagon, par l'intermédiaire de Melle. Laurence Bachet et du Dr. Christophe Chevillon, pour avoir permis d'initier ce projet. Cette action a été financée par la province Sud dans le cadre du Plan d'Actions Dugong 2010-2012 animé par l'Agence Française des Aires Marines Protégées et regroupant les différents acteurs impliqués dans la conservation de cette espèce en Nouvelle-Calédonie (la province Nord, la province Sud, la province des Iles Loyauté, le gouvernement de la Nouvelle-Calédonie, l'Etat, le WWF et Opération Cétacés).

Nous remercions également nos collaborateurs de l'Université James Cook, Australie, et particulièrement au Prof. David Blair, 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.

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. Nous remercions Mme. Nathalie Duong, Mme. Clarisse Majorelle et Melle. Laure Barrabé pour leur aide durant la réalisation des analyses en laboratoire.

Merci à nos collaborateurs des laboratoires d'Ecologie Moléculaire de l'Université d'Auckland, Nouvelle Zélande, et du Marine Mammal Institute de l'Université d'Oregon State, USA, pour leur soutien logistique. Nous remercions en particulier Dr. Shane Lavery, Melle. Vibha Thakur, Prof. Scott Baker et Melle. Debbie Steel.

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 gentiment accepté de nous confier des os et des dents nous permettant d'accroître ainsi le nombre d'échantillons utilisés pour cette étude. Merci également aux différents média locaux qui ont relayé les informations sur le projet, permettant ainsi l'acquisition de nouveaux échantillons.

9. REFERENCES

- 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
- Bilgmann K., Möller L.M., Harcourt R.G., Gibbs S.E., Beheregaray L.B. (2007) Genetic differentiation in bottlenose dolphins from South Australia: association with local oceanography and coastal geography. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 341:265–276
- Blair D., McMahon A., McDonald B., Tikel D., Waycott M., Marsh H. (in prep) Pleistocene sea level fluctuations around Australia and the phylogeography of a large, herbivorous, shallow-water marine mammal, the dugong.
- Chevillotte V., Douillet P., Cabioch G., Lafoyd Y., Lagabrielle Y., Maurizot Y. (2005) Évolution géomorphologique de l'avant-pays du Sud-Ouest de la Nouvelle-Calédonie durant les derniers cycles glaciaires. *C. R. Geosci.* 337:695-701
- 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., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press
- Fu X.Y. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925
- Garrigue C., Oremus M., Schaffar A., Patenaude N.J. (2009) Etude du statut de la population de dugongs en provinces Nord et Sud 2008. Rapport final Zoneco-WWF:76
- 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. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:139-162
- Hillis D.M., Bull J.J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:182-192
- 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
- Hoelzel A.R., Goldsworthy S.D., Fleischer R.C. (2002) Population genetics. In: Hoelzel AR (ed) *Marine Mammal Biology: An Evolutionary Approach*, Blackwell Science, Oxford

- Jacob T., Gardes L. (2010) Propositions relatives au développement des connaissances de la population de dugongs de Nouvelle-Calédonie. Période 2010-2012:33 p+annexes
- Kellogg Hunter M., 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
- Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163
- Lambeck K., Chappell J. (2001) Sea Level Change Through the Last Glacial Cycle. *Science* 292:679-686
- 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
- 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
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- 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
- Tikel D., Blair D., Marsh H. (1996) Marine Mammal Faeces as a source of DNA. *Mol. Ecol.* 5:456-457

ANNEXES

Annexe 1: Résultat de l'analyse spectrophotométrique sur Nanodrop.

CODE	Concentration (ng/ul)	A260	A280	260/280
NC94-001	9,9	0,198	0,132	1,5
NC02-043	83,22	1,664	0,819	2,03
NC03-002	57,98	1,16	0,585	1,98
NC03-003	97,02	1,94	0,971	2
NC04-053	18,47	0,369	0,182	2,03
NC06-002	12,01	0,24	0,12	2
NC06-170	19,08	0,382	0,173	2,2
NC07-161	114	2,28	1,105	2,06
NC08-169	16,69	0,334	0,188	1,78
NC09-010	371,06	7,421	3,605	2,06
NC10-002	17,09	0,342	0,147	2,32
NC10-009	86,77	1,735	0,9	1,93
NC10-011	2,92	0,058	0,036	1,62
NC10-219	1,95	0,039	0,013	3,05
NC10-220	4,91	0,098	0,061	1,62
NC11-002	8,92	0,178	0,076	2,36
NC11-003	8,19	0,164	0,087	1,88
NC11-004	8,95	0,179	0,066	2,71
NC11-005	15,89	0,318	0,116	2,74
NC11-006	6,27	0,125	0,048	2,61
SI10-033	7,98	0,16	0,056	2,84
U07-047	148,44	2,969	1,484	2
NCXX-001	25,81	0,516	0,22	2,35
NC11-007	34,56	0,691	0,204	3,38
NC11-008	10,69	0,214	0,093	2,29
NC11-009	1,42	0,028	0,021	1,34
NC11-010	4,19	0,084	0,031	2,74
NC11-011	25,22	0,504	0,373	1,35
NC11-012	4,8	0,096	0,07	1,38
NC11-013	1,37	0,027	0,036	0,75
NC11-014	0,07	0,001	0,009	0,16
NC11-015	6,84	0,137	0,078	1,74
NC11-016	1,3	0,026	0,03	0,87
NC11-017	178,64	3,573	1,805	1,98

Annexe 2 : Séquence des quatre haplotypes (292 pb) de l'ADN mitochondrial détectés parmi les dugongs de Nouvelle-Calédonie.

>Haplotype A

GCGCTATGTA CTTTCGTGCATTATGTGCTCCTCCCCATAATAGTACTATATATGTT
TTATCTTACATACACCATCCTATGTATAATCGTGCATTACACTACTTACCCCATGC
ATATAAGCCAGTACGGTAGGATTCATGCTCTAAAGCCTAAGTAAT-
TAATCTCCATTATAACAACCTCTACACCATGGATATTGTCCAGTCCATGTACCTCTT
GATCTTGCATAGTACATTCAACCCTTTATCGTACATAGCACATCTCTGAGATAGT
TCTCGTCAACACGCTTATCACCTCC

> Haplotype B

GCGCTATGTA CTTTCGTGCATTATGTGTTCCCTCCCCATAATAGTACTATATATGTTT
TATCTTACATACACCATCCTATGTATAATCGTGCATTACACTACTTACCCCATGCA
TATAAGCCAGTACGGTAGGATTCATGCTCTAAAGCCTAAGTAAT-
TAATCTCCATTATAACAACCTCTACACCATGGATATTGTCCAGTCCATGTACCTCTT
GATCTTGCATAGTACATTCAACCCTTTATCGTACATAGCACATCTCTGAGATAGT
TCTCGTCAACACGCTTATCACCTCC

> Haplotype C

GCGCTATGTA CTTTCGTGCATTATGTGCTCCTCCCCATAATAGTATTATATATGTTT
TATCTTACATACACCATCCTATGTATAATCGTGCATTACACTACTTACCCCATGCA
TATAAGCCAGTACGGTAGGATTCATGCTCTAAAGCCTAAGTAAT-
TAATCTCCATTATAACAACCTCTACACCATGGATATTGTCCAGTCCATGTACCTCTT
GATCTTGCATAGTACATTCAACCCTTTATCGTACATAGCACATCTCTGAGATAGT
TCTCGTCAACACGCTTATCACCTCC

> Haplotype D

GCGCTATGTA CTTTCGTGCATTATGTGCTCCTCCCCATAATAGTACTATATATGTT
TTATCTTACATACACCATCCTATGTATAATCGTGCATTACACTACTTACCCCATAC
ATATAAGCCAGTACGGTAAGATTCATGCTCTAAAGCCTAAGTAAT-
TAATCTCCATTATAACAACCTCTACACCATGGATATTGTCCAGTCCATGTACCTCTT
GATCTTGCATAGTACATTCAACCCTTTATCGTACATAGCACATCTCTGAGATAGT
TCTCGTCAACACGCTTATCACCTCC

Annexe 3 : Résumé des analyses Bayésiennes réalisées avec le programme *Structure* pour k populations, où k varie de 1 à 6.

K	Ln P(D)	Var[LnP(D)]	a1	Fst_1	Fst_2	Fst_3	Fst_4	Fst_5	Fst_6
1	-7012.9	55.9	-	0.0014	-	-	-	-	-
1	-7013.5	57.0	-	0.0015	-	-	-	-	-
1	-7012.8	55.7	-	0.0019	-	-	-	-	-
2	-6490.4	136.9	0.0539	0.1778	0.0084	-	-	-	-
2	-6491.2	138.5	0.0540	0.1786	0.0077	-	-	-	-
2	-6491.3	137.1	0.0529	0.0065	0.1796	-	-	-	-
3	-6301.2	234.2	0.0449	0.1259	0.1796	0.0306	-	-	-
3	-6300.3	233.9	0.0449	0.0310	0.1787	0.1266	-	-	-
3	-6301.5	235.4	0.0452	0.0306	0.1261	0.1781	-	-	-
4	-6162.4	277.6	0.0389	0.1328	0.4054	0.0329	0.1793	-	-
4	-6221.5	389.7	0.0399	0.3733	0.1803	0.1345	0.0329	-	-
4	-6159.3	271.4	0.0384	0.0333	0.1329	0.1782	0.4078	-	-
5	-6155.9	448.5	0.0372	0.0337	0.1898	0.0407	0.1584	0.4081	-
5	-6196.6	522.6	0.0373	0.4087	0.0314	0.1896	0.0398	0.1600	-
5	-6162.2	458.4	0.0369	0.4095	0.0392	0.1888	0.0330	0.1596	-
6	-6308.4	811.3	0.0377	0.1993	0.4132	0.0483	0.1745	0.0309	0.0323
6	-6311.8	840.1	0.0377	0.4108	0.0471	0.0358	0.1979	0.1722	0.0376
6	-6256.1	730.9	0.0373	0.4140	0.0412	0.1984	0.0404	0.1713	0.0384

Annexe 4 : Reconstruction phylogénétique de type (a) Maximum de Parcimonie et (b) Maximum de Vraisemblance avec valeurs de bootstrap (10,000 itérations).

