CARACTERISATION DE LA CONNECTIVITE DES POPULATIONS DE POISSONS SUR DIFFERENTS COURS D'EAU DU GRAND SUD : LE CAS DE 3 ESPECES RARES ET ENDEMIQUES DU SUD CALEDONIEN

Protogobius attiti, Sicyopterus sarasini et Schismatogobius fuligimentus

RAPPORT FINAL



Auteurs : M. Mennesson, C. Lord, P. Keith

Décembre 2017

Observatoire de l'environnement
en Nouvelle-Calédonie

11 rue Guynemer
98800 Nouméa
Tel.: (+ 687) 23 69 69
www.oeil.nc

SOMMAIRE

I Rappel : contexte et enjeux 5
II Objectifs 5
III Analyses moléculaires 6
III.1 Le marqueur : deux échelles 6
III.1.1 Le gène du cytochrome oxydase I (COI) et du cytochrome b (Cytb) 6
III.1.2 Le mitogénome complet : mtDNA 6
III.2 L'extraction d'ADN 7
III.3 Amplification et séquençage d'un fragment des gènes COI, Cytb et du mitogénome complet à partir de l'ADN génomique total 8
III.3.1 Amplification des fragments courts du gène COI et Cytb 8
III.3.2 Amplification du mitogénome complet 9
III.3.3 Le séquençage 10
III.4 Vérification, nettoyage et alignement des séquences 10
III.5 Méthode d'étude de la structuration géographique et de l'histoire démographique des populations 10
III.5.1 Génétique des populations et phylogéographie : principes 10
III.5.2 Analyse de la structuration spatiale des populations 10
III.5.3 Analyses multivariées de la structuration génétique des populations 11
III.5.4 Test de neutralité sélective et d'équilibre des populations 12
III.5.5 Le jeu de données 12
IV Résultats 14
IV.1 Schismatogobius fuligimentus 14
IV.2 Sicyopterus sarasini 18
IV.3 Protogobius attiti 24
V Discussion-Perspectives 31
VI Bibliographie 35

Résumé exécutif

Titre de l'étude	CARACTERISATION DE LA CONNECTIVITE DES POPULATIONS DE POISSONS SUR DIFFERENTS COURS D'EAU DU GRAND SUD : LE CAS DE 3 ESPECES RARES ET ENDEMIQUES DU SUD CALEDONIEN : *Protogobius attiti, Sicyopterus sarasini et Schismatogobius fuligimentus – Rapport final*		
Auteurs	M. Mennesson, C. Lord, P. Keith		
Collaborateurs	BioEko Consultants		
Editeurs	Observatoire de l'environnement en Nouvelle-Calédonie – OEIL, Province Sud, Enercal – Société Néo-Calédonienne d'énergie		
Année édition	2018	**Année des données**	2006-2016

Objectif	L'étude vise à obtenir des données de biologie et d'écologie sur 3 espèces (*Protogobius attiti*, *Sicyopterus sarasini* et *Schismatogobius fuligimentus*) en vue de : - Caractériser la connectivité entre les populations de ces poissons sur plusieurs cours d'eau incluant le creek de la baie Nord, la rivière Kwé et des cours d'eau voisins sur substrat ultramafique ; - Caractériser la durée de phase larvaire marine (DPL) de ces espèces. La DPL interagit avec le recrutement, la connectivité et la dispersion ; - Identifier les principaux bassins versants pouvant jouer le rôle de « réservoirs » pour ces espèces ; - Définir les mesures de gestion adaptées à la conservation de ces espèces.
Contexte	Les cours d'eau dans le périmètre d'influence de l'exploitation minière et industrielle de Vale Nouvelle-Calédonie sont soumis à des pressions chroniques (rejets industriels, décapages miniers, mise en place d'obstacles à la circulation des poissons …). Le creek de la baie Nord, situé en aval du bassin versant abritant le complexe industriel de l'exploitant, a, quant à lui, subi deux épisodes aigus de pollution par déversement d'effluents acides en avril 2009 puis en mai 2014. Associées à ces accidents, de fortes mortalités d'organismes vivants ont été observées. Parmi les espèces impactées par ces pollutions répétées, 3 espèces de poissons endémiques et rares dont deux classés "EN" sur la liste rouge de l'UICN (*Protogobius attiti*, *Sicyopterus sarasini* et *Schismatogobius fuligimentus*) ont été recensées. Face à la nécessité de mieux comprendre la vulnérabilité de ces espèces sensibles, la province Sud et l'OEIL, Observatoire de l'environnement en Nouvelle-Calédonie, ont commandité la présente étude. La maîtrise d'œuvre est assurée par le l'UMR BOREA (Muséum national d'Histoire naturelle -MNHN) et l'association AIMARA.
Méthodologie	La méthodologie employée dans cette étude repose sur : - Des analyses des otolithes provenant de 62 individus (*P. attiti* (28), *S. sarasini* (19), *S. fuligimentus* (15)) afin de déterminer la durée de la phase de vie larvaire marine. - Des analyses génétiques effectuées sur 316 individus (*P. attiti* (136), *S. sarasini* (139), *S. fuligimentus* (41)) permettant de déterminer la structuration spatiale des populations. Les résultats relatifs aux analyses des otolithes ont fait l'objet d'un précédent rapport[1]. Le présent document restitue les résultats des analyses génétiques et constitue le rapport final de cette étude.

[1] Lien vers rapport intermédiaire : http://www.oeil.nc/cdrn/index.php/resource/bibliographie/view/27891

Résultats et conclusions	Deux types de réseau d'haplotypes ont été mis en évidence: un réseau **homogène** pour *S. sarasini* et une structuration en **étoile** pour *S. fuligimentus* et *P. attiti ;* ceci mettant en évidence que ces 3 espèces ne se dispersent pas de la même manière sur le territoire. La population de ***S. sarasini*** étudiée présente un grand nombre d'haplotypes uniques (54 sur 74 haplotypes) et une absence de structuration du jeu de données sur le territoire montrant qu'il y a un **brassage génétique important**, **une seule population**, et que l'espèce ne **subit pas de « barrières » à la dispersion**. Ces haplotypes uniques sont localisés dans les zones 1 (Bwi, Xwé Nuru, Ngoi, Ni) et 4 (Barendeu), ce qui indique que ces zones sont d'une grande importance pour cette espèce. La structure en étoile des réseaux d'haplotypes pour ***S. fuligimentus*** **et** ***P. attiti*** suggère que leurs populations sont issues d'événements de colonisation passée suivit d'expansions démographiques. En plus de cette structuration en étoile, il y a un **écart considérable en terme de proportion d'haplotypes constituant les 3 espèces** : pour ***S. sarasini*** 74 haplotypes ont été observés, soit environ **53%** du jeu de données, dont 54 sont uniques (38,8%) ; ce qui contraste avec ***S. fuligimentus****,* où 8 haplotypes seulement ont été notés (**19,5%**) dont 4 uniques (9,75%) et, ***P. attiti,*** où 7 haplotypes seulement notés (**5,2%**) dont 1 unique (0,7%) ; **ce qui est très faible**. **La diversité haplotypique est aussi clairement très différente entre *S. sarasini* et *S. fuligimentus/P. attiti.*** Ces deux dernières présentant un brassage génétique moindre à celui de *S. sarasini* ce qui rend leurs **populations *a priori* plus vulnérables et nous interroge sur leur cycle de vie et leur mode de dispersion sans doute très différents.** *S. fuligimentus* et *P. attiti* sont plus limitées en termes de distribution et pourraient aussi être des espèces plus exigeantes en termes d'habitats. Chez ces deux espèces, **la Zone 1 (Tô Dé à Ngoi)** semble être une zone à partir de laquelle la diversité génétique pourrait s'accroitre. Cette dernière est donc une zone qui **mériterait une attention particulière en terme de gestion et de conservation** pour ces deux espèces (mais aussi pour *S. sarasini*). C'est plus largement la zone de **la Côte Oubliée qui semble être importante pour la biodiversité des trois espèces étudiées et elle pourrait ainsi constituer une zone dite « réservoir ».** Compte tenu des connaissances déjà acquises sur ***P. attiti*** **et** ***S. fuligimentus***, les résultats obtenus dans notre étude mettent en exergue **la réalité de leur statut d'espèces très menacées. La première est déjà classée « En Danger d'extinction »** par l'UICN. **La seconde** classée « Data Deficient » par l'UICN **mériterait de voir son statut réévalué** car il est sûrement proche de « **En Danger d'extinction** ». L'étude réalisée montre clairement que chaque espèce endémique étudiée a ses caractéristiques propres et que la généralisation des cycles de vie connus « classiques » en milieu dulçaquicole insulaire n'a pas lieu d'être en Nouvelle-Calédonie où l'histoire évolutive des taxons a été très contrainte, notamment sur les milieux ultramafiques.			
Limites de l'étude	Il sera important de compléter par des analyses microchimiques afin de vérifier le caractère migrateur ou non de *P. attiti* et de *S. fuligimentus.* Cette étude sera essentielle pour connaître le cycle de vie de ces espèces patrimoniales de Nouvelle-Calédonie et mettre en place des mesures de gestion-conservation adaptées.			
Evolutions	Version	Finale	Date de la version	27/02/2018

I Rappel : contexte et enjeux

Les cours d'eau dans le périmètre d'influence de l'exploitation minière et industrielle de Vale Nouvelle-Calédonie sont soumis à des pressions chroniques (rejets industriels, décapages miniers, mise en place d'obstacles à la circulation des poissons…). Le creek de la baie Nord, situé en aval du bassin versant abritant le complexe industriel de l'exploitant, a subi deux épisodes aigus de pollution par déversement d'effluents acides en avril 2009 puis en mai 2014. Associées à ces accidents, de fortes mortalités d'organismes vivants ont été observées.

En Juillet 2012, près de 3 années après la pollution de 2009, les communautés de poissons du creek semblaient quasiment revenues à leur état pré-accident sans que l'on sache quel processus avait permis la recolonisation : Recolonisation à partir des effectifs ayant survécu au sein du cours d'eau ? Et/ou depuis des affluents non impactés du cours d'eau ? Ou encore depuis la mer par des post-larves qui étaient en mer lors du passage de l'effluent acide (hypothèse associée à l'amphidromie). Dans ce cas, les poissons venus depuis la mer pourraient être originaires du même cours d'eau ou de cours d'eau voisins.

Parmi les espèces impactées par ces pollutions répétées, 3 espèces de poissons endémiques et rares (*Protogobius attiti*, *Sicyopterus sarasini* et *Schismatogobius fuligimentus*) dont deux classés "EN" (Endangered) sur la liste rouge de l'UICN doivent faire l'objet d'un suivi.

Les commanditaires, maîtres d'ouvrage de cette étude, sont la province Sud et l'OEIL, Observatoire de l'environnement en Nouvelle-Calédonie. La maîtrise d'œuvre est assurée par l'UMR BOREA (Muséum national d'Histoire naturelle -MNHN) et l'association AIMARA.

II Objectifs

A partir du matériel biologique récupéré suite à l'épisode de pollution de 2014 et d'une campagne de terrain complémentaire réalisée pour avoir du matériel génétique sur l'ensemble de l'aire de distribution de ces 3 espèces, il a été réalisé une étude afin de :

- Caractériser la connectivité entre les populations de ces poissons sur plusieurs cours d'eau incluant le creek de la baie Nord et des cours d'eau voisins sur substrat ultramafique.
- Caractériser la durée de phase larvaire marine (DPL) de ces espèces ; la DPL interagit avec le recrutement, la connectivité et la dispersion.
- Identifier les principaux bassins versants pouvant jouer le rôle de « réservoirs » pour ces espèces.
- Définir les mesures de gestion adaptées à la conservation de ces espèces.

Dans un premier temps la phase de dispersion larvaire marine des 3 espèces sélectionnées a été caractérisée au travers de l'étude de leurs otolithes (durée de phase larvaire, marque de recrutement…)(voir rapports précédents)[2].

[2] Lien de téléchargement vers :
- le rapport de mission de terrain : http://www.oeil.nc/cdrn/index.php/resource/bibliographie/view/27762
- le rapport intermédiaire : http://www.oeil.nc/cdrn/index.php/resource/bibliographie/view/27891

La phase 2, qui fait l'objet du présent rapport, avait pour but d'étudier la connectivité entre les populations chez les 3 espèces. Pour cela, des analyses moléculaires ont été réalisées.

III Analyses moléculaires

III.1 Le marqueur : deux échelles

Lorsque des analyses génétiques sont réalisées, le choix des marqueurs moléculaires employés est important car selon l'échelle à laquelle nous voulons effectuer les analyses (ex : échelle de la famille, du genre, de l'espèce …) certains ne nous donneront aucune information ou pas du tout les mêmes informations.

En taxonomie moléculaire et en phylogéographie, ce sont les marqueurs mitochondriaux qui sont principalement utilisés. Avec le génome mitochondrial, nous avons accès à un génome qui est facile à analyser (absence de séquences hétérozygotes).

Au cours de cette étude, nous avons utilisé le gène mitochondrial à deux échelles : une à celle de deux gènes partiels (COI et Cytb) et l'autre à celle du mitogénome complet.

III.1.1 Le gène du cytochrome oxydase I (COI) et du cytochrome b (Cytb)

Le gène COI code pour la 1ère sous-unité de la protéine COI de la chaine respiratoire mitochondriale. Il présente une variabilité interspécifique supérieure à celle intra-spécifique dans une majorité de groupes taxonomiques dont les Téléostéens (Ward *et al.,* 2005 ; Ward *et al.,* 2009). Le gène COI est utilisé comme marqueur de référence pour l'identification taxonomique des organismes vivants *via* la méthode du Barcode (Herbert *et al.,* 2003).

Le gène Cytb code pour la sous-unité principale transmembranaire des complexes du cytochrome bc1 et b6f de la chaine respiratoire mitochondriale. Ce gène est un peu plus variable que le COI et il est considéré comme étant très utile dans la détermination des relations au sein des familles et des genres.

Du fait de leur forte variabilité intra et interspécifique, ces deux gènes sont couramment utilisés pour la phylogénie, la phylogéographie et la génétique des populations.

III.1.2 Le mitogénome complet : mtDNA

De nombreux marqueurs mitochondriaux (COI, Cytb, 12S et 16S) ont été employés pour reconstruire l'évolution des espèces depuis les années 90 ; ce qui a permis de reconstruire les relations parentales de très nombreux groupes. Avec l'arrivée des nouvelles techniques de séquençage, les scientifiques peuvent avoir accès à un plus grand jeu de données incluant le mitogénome complet qui est compatible avec la plupart des marqueurs publiés dans les études au fils des années, les gènes mitochondriaux étant très populaires. D'autant plus que les jeux de données de mitogénomes ont été employés avec succès et de manière répétée sur de nombreux

groupes de Téléostéens (Miya & Nishida, 2015). Chez ces derniers, ce génome circulaire mesure environ 16 000 pb et est composé de 13 gènes codants, 2 ARNr (12*S* et 16*S*) et 22 ARNt (Fig. 1).

Dans le cadre de cette étude, certains spécimens feront l'objet de l'analyse du mitogénome complet afin d'analyser la variabilité intraspécifique des gènes, pour détecter, éventuellement, les plus variables.

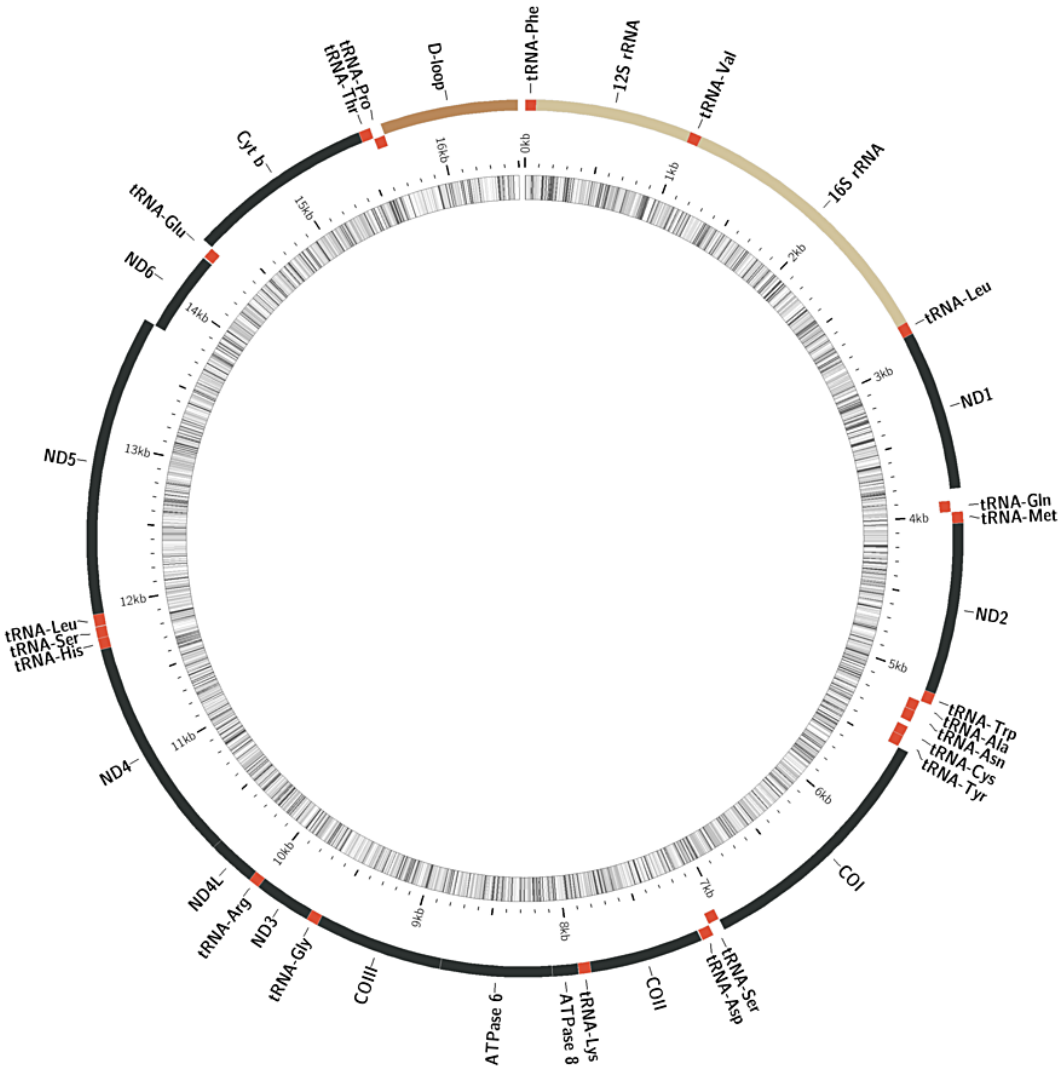


Figure 1 : Organisation du mitogénome complet de *Sicyopterus lagocephalus* (source, MitoFish)

III.2 L'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée à partir de fragment de nageoire d'environ 1 mm^2 ; après avoir été séché, chaque fragment est déposé dans un puits d'une plaque de 96 puits. Les tissus sont ensuite digérés dans 20 mL de tampon de lyse (Lysis buffer) associé à 2,5 mL de protéinase K provenant du kit d'extraction NucleoSpin® 96 Tissue. Les échantillons sont ensuite placés dans une

étuve à 57°C sous agitation pendant 12 à 24h. Après centrifugation, l'ADN est extrait grâce au robot Eppendorf epMotion 5075, semi-automatique. Ce dernier se fixe à une membrane de silicate chargée positivement et les produits de la lyse cellulaire sont filtrés 3 fois par aspiration avec un tampon à base d'éthanol, afin d'éliminer les impuretés et les restes de débris cellulaires. Les traces d'éthanol sont éliminées lors du séchage de la plaque par aspiration. Pour finir, l'ADN est élué par ajout de tampon Tris-Hcl et est conservé à -20°C.

III.3 Amplification et séquençage d'un fragment des gènes COI, Cytb et du mitogénome complet à partir de l'ADN génomique total

L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) a pour objectif de sélectionner une zone précise du génome à partir d'amorces spécifiques, permettant ainsi d'obtenir une grande quantité de fragments d'ADN correspondant à cette zone. Les amorces qui ont été utilisées sont données dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Amorces utilisées pour l'amplification

Gène	Nom des amorces	séquence (5'-3')
COI	TelF1	TCGACTAATCAYAAAGAYATYGGCAC
COI	TelR1	ACTTCTGGGTGNCCAAARAATCARAA
Cytb	CytbF217	TCGAAAYATACATGCCAATGG
Cytb	CytbR1043	GAAGTAYAGGAAGGAYGCAATTT
Complete mitogenome	12S-L1091R	AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT
Complete mitogenome	MtH7061	GGGTTATGTGGCTGGCTTGAAAC
Complete mitogenome	MtL5231	TAGATGGGAAGGCTTCGATCCTACA
Complete mitogenome	MtH11944	CATAGCTTTTACTTGGATTTGCACCA
Complete mitogenome	MtL11910	CAGCTCATCCATTGGTCTTAGGAAC
Complete mitogenome	12S-H1478	TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT

III.3.1 Amplification des fragments courts du gène COI et Cytb

Les PCR sont réalisées dans un volume total de 20 µL avec 2 µL de tampon, 1 µL de DMSO (DiMéthyl SulfOxyde), 1 µL de BSA (Sérum d'Albumine Bovine), 0,8 µL d'un mélange dNTP (DésoxyNucléotide TriPhosphate), 0,32 µL de chaque amorce forward et reverse, 0,06 µL de TAQ (ADN polymérase recombinante, Qiagen). Le volume restant est de l'eau. Une électrophorèse sur gel d'agarose (40 mL de TAE (Tris-acetate-EDTA), 0,8 g d'agarose ; 0,8 µL de Bet (un agent intercalant de l'ADN : Bromure d'Ethydium)) est réalisée afin de visualiser les produits de la PCR. La migration par électrophorèse permet de séparer les amplifias et de contrôler leur taille et leur qualité grâce aux UV, qui révèlent la présence du Bet.

III.3.2 Amplification du mitogénome complet

Au sein du MNHN, nous avons développé un protocole spécifique pour le séquençage nouvelle génération (Hinsinger *et al.,* 2015).
Cette approche consiste à utiliser des PCR longues afin de séquencer plus facilement le génome

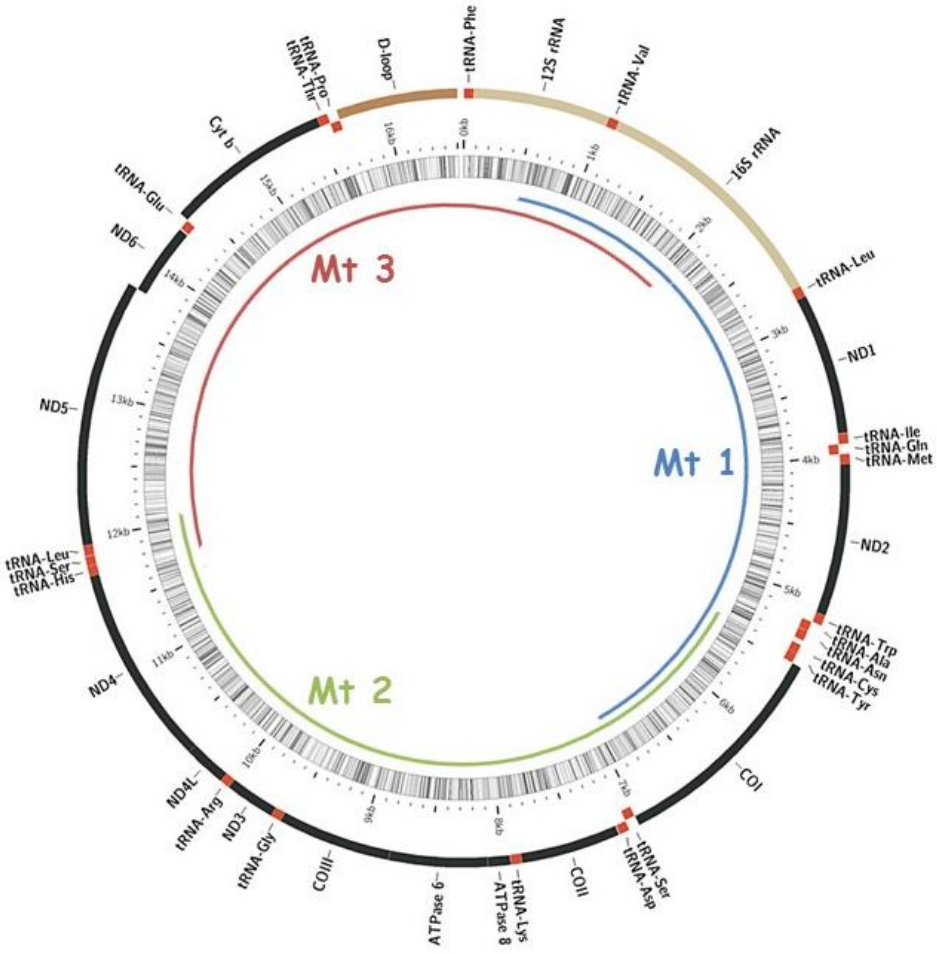


Figure 2 : Schématisation de la position et de la couverture des amorces Mt1, Mt2 et Mt3 utilisées pour obtenir les 3 parties du mitogénome complet (Mennesson, 2016)

mitochondrial complet et pour un coût proche de celui pour séquencer un seul gène avec les méthodes classiques (Méthode de Sanger).

L'amplification du mitogénome consiste donc à le couper en 3 parties chevauchantes utilisant ainsi seulement 3 couples d'amorces (Tableau 1) pour obtenir 16 000 pb. Une 1ère amorce appelée **Mt1** va nous permettre d'amplifier du milieu du 12*S* jusqu'à ARNt-Ser ; l'amorce **Mt2** du ARNt-Cys jusqu'à ARNt-Leu et l'amorce **Mt3** du ARNt-Ser jusqu'au milieu du 16S (Fig. 2).

Les PCR sont réalisées dans un volume total de 18 µL incluant 5X de TAQ (ADN polymérase recombinante, HotStart LongAmp®), 0,4 ng/µL de BSA (Sérum d'Albumine Bovine), 3,5% de DMSO (DiMéthyl SulfOxyde), 300 nM de chaque amorces, 300 µM de dNTP (DésoxyNucléotide TriPhosphate). Le volume restant est de l'eau.

Une électrophorèse sur gel d'agarose (40 mL de TAE (Tris-acetate-EDTA), 0,3 g d'agarose ; 0,8 µL de Bet (un agent intercalant de l'ADN : Bromure d'Ethydium)) est réalisée afin de visualiser les produits de la PCR. La migration par électrophorèse permet de séparer les amplifias et de contrôler leur taille et leur qualité grâce aux UV, qui révèlent la présence du Bet.

III.3.3 Le séquençage

Les produits de PCR pour les gènes COI et Cytb sont ensuite envoyés à Eurofins MWG Operon (Allemagne). Ces derniers y sont séquencés dans les deux sens à l'aide des amorces *forward* et *reverse* que nous leur fournissons. Les 3 fragments issus des mitogénomes sont envoyés à séquencer *via* le PGM™ Ion torrent (Personal Genome Machine™) (Glenn 2011) installé au Service de Systématique Moléculaire (UMS 2700, MNHN).

III.4 Vérification, nettoyage et alignement des séquences

Les séquences sont nettoyées manuellement à l'aide du logiciel *Geneious* 9.0.5 (Kearse *et al.,* 2012) puis alignées avec Muscle Alignement (implémenté dans Geneious).

III.5 Méthode d'étude de la structuration géographique et de l'histoire démographique des populations

III.5.1 Génétique des populations et phylogéographie : principes

L'un des défis majeurs pour les biologistes est d'établir les liens entre l'écologie et l'évolution des espèces. Un tel lien est alimenté par la relation entre la capacité de dispersion et l'échelle spatiale avec laquelle les populations diffèrent génétiquement. La compréhension de l'évolution requiert de connaitre comment le mouvement des gènes au travers des populations (*i.e.,* le flux de gène) interagit avec la dérive génétique et la sélection naturelle. Les études sur la différentiation génétique des populations sont particulièrement utiles, étant donné qu'elles permettent d'inférer sur comment les forces d'évolution ont interagi tout au long de l'histoire de vie de l'espèce.

La phylogéographie fait le lien entre la génétique des populations *i.e.,* la distribution et l'évolution au cours du temps des fréquences alléliques et génotypiques dans les populations, et la phylogénie *i.e.,* l'histoire de la descendance des individus (Avise 2009, Riddle 2009). Elle permet d'étudier la distribution géographique des différentes lignées génétiques d'une espèce, ou d'espèces proches, et les relations généalogiques à l'aide de réseaux d'haplotypes. Ceci permettant de mettre en évidence des patrons d'isolement communs à plusieurs lignées qui sont souvent liés à des événements de l'histoire géologique et/ou climatique (Avise 2000, Riddle 2009).

III.5.2 Analyse de la structuration spatiale des populations

Les indices de diversité

Pour réaliser l'analyse de la structure spatiale des populations, un certain nombre d'indices de diversités sont calculés.

Pour chaque localité, les indices de diversité suivants ont été estimés grâce aux logiciels *Arlequin* v3.11 (Excoffier *et al.,* 2005) et *DNAsp* v5.1 (Librado & Rozas 2009) :

- N : nombre de séquences utilisées.
- π : diversité nucléotidique *i.e.,* nombre moyen de différences nucléotidiques entre paire de séquences prises au hasard dans la même population (Tajima 1983).
- h : nombre d'haplotypes *i.e.,* séquences polymorphes uniques qui peuvent être partagées ou non par plusieurs individus.
- Hd : diversité haplotypique *i.e.,* probabilité que deux séquences tirées au hasard et sans remise dans l'échantillon soient différentes.

Les réseaux d'haplotypes

Ce type de réseau reflète mieux la structure du réseau généalogique au sein d'une espèce que les arbres phylogénétiques (Excoiffier & Smouse 1994, Bandelt *et al.,* 1999) et tient mieux compte des relations entre les haplotypes récents et ancestraux qui peuvent coexister au sein d'une population d'une même espèce. De plus, les réseaux d'haplotypes permettent de bien visualiser les relations généalogiques entre les différents haplotypes et leur distribution géographique ; c'est pourquoi il est recherché les haplotypes partagés par plusieurs individus.

La recherche des haplotypes partagés a été effectuée avec le logiciel *DNAsp* v5.1 (Librado & Rozas 2009). Le réseau d'haplotypes est ensuite conçu dans le logiciel *Network* v5 par la méthode du Median-Joining (Bandelt *et al.,* 1999) afin de déterminer comment sont répartis les haplotypes dans le jeu de données et donc en fonction des localités. Selon la complexité du réseau, le critère « Frequency > 1 » peut avoir été utilisé (*i.e*., que toutes les séquences uniques ne sont pas prises en compte lors de la réalisation du réseau) lorsqu'il existe un grand nombre d'haplotypes correspondant à un seul individu. Ce critère a été utilisé pour le jeu de données de *S. sarasini*.

III.5.3 Analyses multivariées de la structuration génétique des populations

La structuration génétique entre les îles est estimée par le calcul des *F* statistiques implémenté dans *Arlequin* v3.11 (avec 10 000 permutations). Les *F* statistiques permettent de décrire la variabilité génétique entre et au sein des populations (Wright 1951).

Le paramètre de différenciation génétique dans les populations est noté F_{ST} (Wright 1965) et est estimé à partir d'une AMOVA (Analysis of MOlecular VAriances, Excoffier *et al.,* 2005), qui peut être considérée comme l'équivalent d'une analyse de variance hiérarchisée (ANOVA) non paramétrique. Lorsque les populations sont composées de moins de 3 spécimens, celles-ci ne peuvent être incluses dans l'AMOVA.

Les F_{ST} intègrent à la fois les fréquences haplotypiques et le nombre de substitutions nucléotidiques entre les différents haplotypes. La valeur minimale théorique des F_{ST}, soit $F_{ST} = 0$, correspond à une absence de divergence génétique entre les deux populations et donc, plus les F_{ST} sont proches de 1 (valeur maximale), plus la divergence génétique est importante. Plus

précisément, l'indice de fixation F_{ST} correspond à la probabilité que deux allèles choisis au hasard à l'intérieur d'une même sous population soient identiques par ascendance. A mesure que la dérive génétique se poursuit de génération en génération, le F_{ST} change de valeur.

III.5.4 Test de neutralité sélective et d'équilibre des populations

Les tests de Fu (Fu 1997) et de Tajima (Tajima 1983) permettent de voir s'il existe un excès de mutations récentes dans les séquences, ce qui correspondrait à un processus sélectif non neutre tel que la sélection positive ou la croissance d'une population. Si les valeurs de *F* de Fu et de *D* de Tajima sont significativement négatives (*i.e.,* excès de mutations récentes), cela suggère une population en expansion (*i.e.* une zone à partir de laquelle la diversité génétique pourrait s'accroitre).

III.5.5 Le jeu de données

Malheureusement, une partie des échantillons issus de la pollution, sans doute récupérés trop tard, ont révélé un ADN trop dégradé pour tout ou une partie des analyses, en particulier pour *S. fuligimentus* et *S. sarasini* et ce contrairement à *P. attiti* où presque tous les spécimens issus de l'accident ont pu être séquencés. La campagne de terrain réalisée lors de la 1ère phase de l'étude a donc été particulièrement utile. Nous avons aussi associé à cette étude les spécimens issus de nos inventaires précédents et des tissus collectés par Bio Eko Consultants (Tableau 2). Les sites échantillonnés sont représentés sur la Figure 3. L'embouchure de la Carénage qui a une salinité plus élevée, a été distinguée du reste de la rivière.

Tableau 2 : Nombre et localisation des spécimens pour lesquels des séquences ont été obtenues

Rivière	*Schismatogobius fuligimentus*	*Sicyopterus sarasini*	*Protogobius attiti*
Xwé Nuru (XN)	10	9	3
Tô de (TO)	-	-	12
Bwi (Bw)	3	4	5
Ni (Ni)	-	33	7
Ngoi (Ng)	1	10	10
Ouinné (Ou)	-	-	10
Pourina (Po)	-	3	3
Kwaténa (Kw)	-	4	-
Fausse Yaté (FY)	-	11	3
Trou Bleu (TB)	-	8	11
Creek Baie Nord (CN)	1	3	23
Kaoris (Ka)	1	-	25
Carénage (Ca)	7	-	7
Carénage Embouchure	4	-	15
Prony (Pr)	6	-	2
Pirogues (Pi)	3	-	-
Lembi (Le)	3	-	-
La Coulée (Co)	2	-	-
Barendeu (Ba)	-	52	-
Napwémien (Na)	-	1	-
Ponadou (Po)	-	1	-
	N = 41	N = 139	N = 136

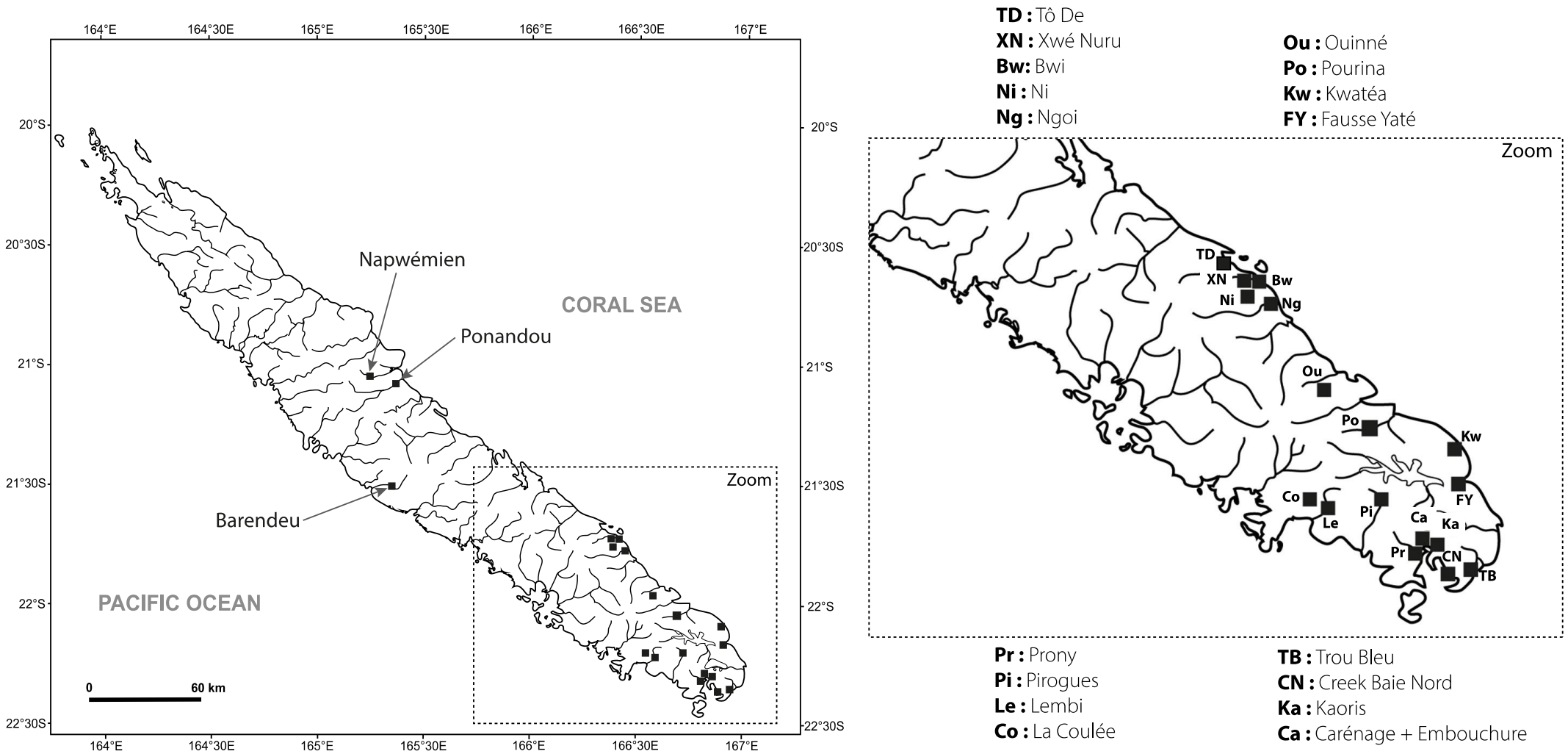


Figure 3 : Localisation des zones d'échantillonnage

IV Résultats

IV.1 Schismatogobius fuligimentus

Malgré quelques difficultés lors du séquençage[3], un total de 41 individus de *S. fuligimentus*, répartis sur 11 rivières de la Province Sud (Tableau 2), a pu être séquencé pour le gène COI (585 pb).

Une diversité haplotypique (Hd) assez élevée est notée au sein du jeu de données (min = 0,38 et max = 0,8) ainsi qu'une faible diversité nucléotidique (π) (Tableau 3) ce qui correspond au signal d'une population à croissance rapide issue d'**une population ancestrale à faible effectif**.

Sur les 41 séquences de COI obtenues, un total de **8 haplotypes** (nommés H1 à H8) **a été identifié** (soit **19,5%** de la totalité du jeu de données) **dont 4 sont uniques** (haplotype représenté par un seul individu) (soit **9,75%**) (Fig. 4). Un haplotype majeur est observé, l'haplotype H1, qui est présent dans toutes les rivières (à l'exception du Creek de la Baie Nord et de Kaoris où un seul individu a été échantillonné) ; deux haplotypes présentent plusieurs spécimens (N ≥ 5), le H2 est présent dans 4 rivières (Bwi, Creek de la Baie Nord, Pirogues, Lembi) et le H7 présent seulement dans les rivières du sud (du Creek de la Baie Nord jusqu'à Prony). Deux haplotypes uniques sont retrouvés dans la rivière Xwé Nuru (H4 et H5) et, deux autres (H3 et H6) plus un haplotype composé de deux individus (H8) dans les rivières à proximité du Creek de la Baie Nord.

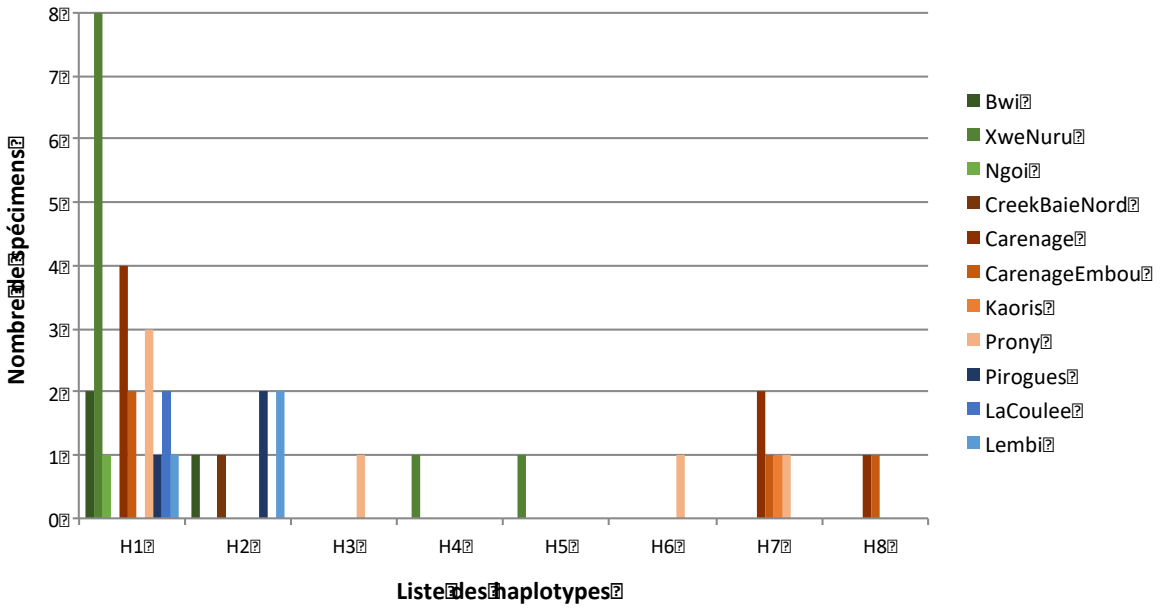
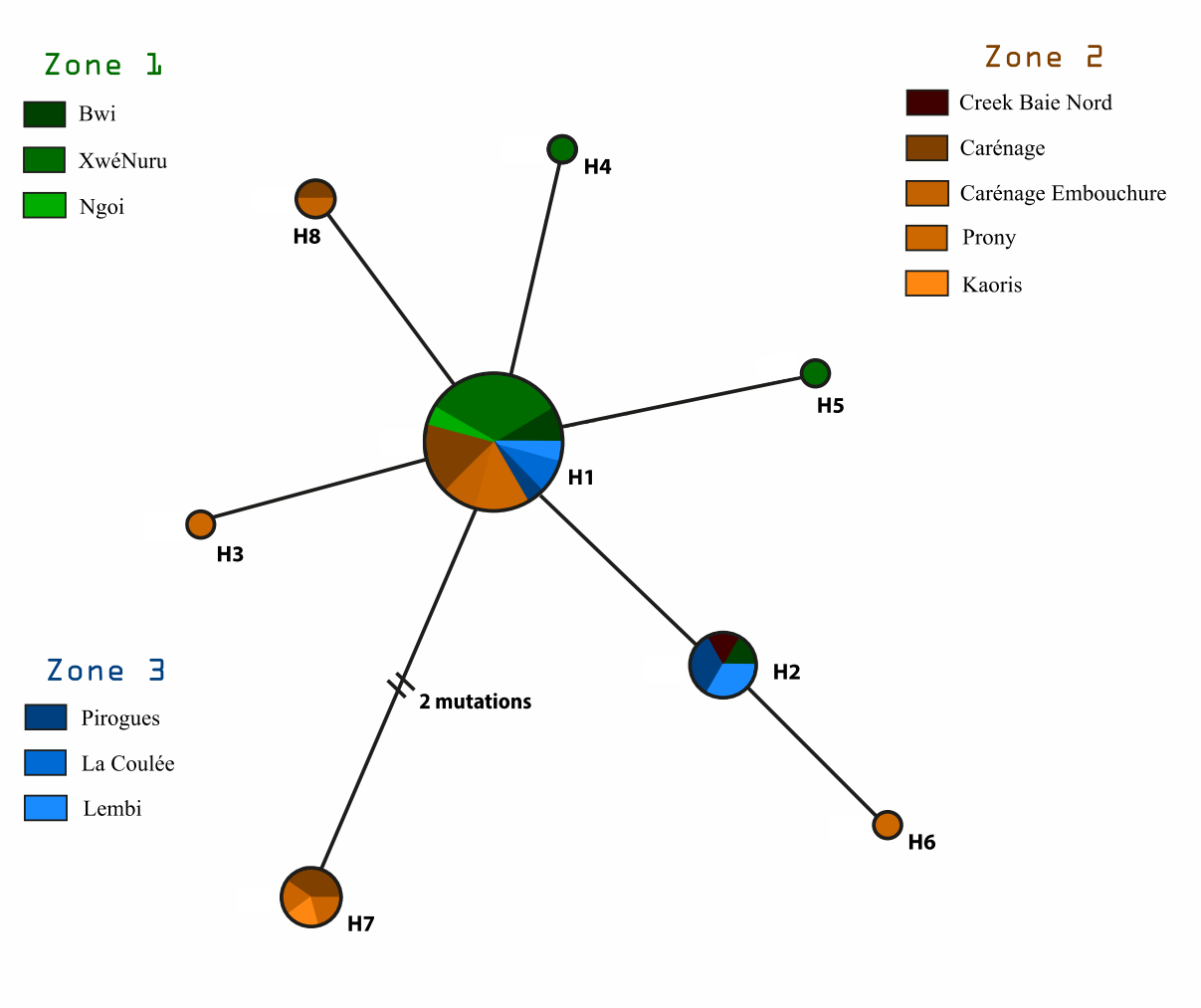


Figure 4 : Répartition du nombre de spécimens de *S. fuligimentus* échantillonnés dans 11 rivières en fonction des 8 haplotypes observés

Le réseau d'haplotype réalisé sur l'ensemble du jeu de données présente une structure en étoile. En effet, on observe un haplotype central (H1) partagé par plusieurs individus, où presque

[3] Les amorces sélectionnées, et déjà utilisées sur d'autres espèces du genre Schismatogobius, ont eu beaucoup de mal à fonctionner avec l'espèce calédonienne et de nombreuses manipulations ont dû être répétées.

toutes les localités sont représentées à l'exception du Creek de la Baie Nord et de Kaoris, depuis lequel plusieurs haplotypes rayonnent, séparés de ce dernier par une ou deux mutations (Fig. 5). Cette structure est typiquement associée à un scénario **d'événements de colonisation passée suivit d'expansions démographiques.**



Une première AMOVA a été réalisée à l'échelle des rivières pour lesquelles au moins 3 individus avaient été collectés (Tableau 3) mais, étant donné l'hétérogénéité du nombre d'individus, les résultats ne sont pas significatifs. De ce fait, les rivières ont été regroupées en 3 zones : Zone 1 comprenant les rivières de Bwi, Xwé Nuru et Ngoi, Zone 2 comprenant les rivières du Creek de la Baie, Carénage, Prony et Kaoris et, Zone 3 comprenant Pirogues, La Coulée et Lembi. Lorsque que l'on regroupe les rivières par zone (Fig. 3 & 5), les résultats de l'AMOVA sont significatifs.

Tableau 3 : Indices de diversité génétique. N : nombre total de spécimens ; F_{ST} : indice de fixation ; Hd : diversité haplotypique ; h : nombre d'haplotypes ; π : diversité nucléotidique ; tests de neutralité F et D.

Rivières	Population	N	Fst	Hd	h	π	Fu's F	Tajima's D
Bwi	Bw	3	0,15	0,67	2	0,001	0,2	0
XweNuru	XN	10	0,171	0,38	3	7E-04	-1,16	**-1,4**
Carénage	Ca	7	4E-04	0,68	3	0,002	0,41	0,05
Carénage Embouchure	CaEm	4	-0,151	0,83	3	0,003	-0,29	-0,75
Prony	Pr	6	-0,079	0,8	4	0,003	-0,83	**-1,34**
Pirogues	Pi	3	0,15	0,67	2	0,001	0,2	0
Lembi	Le	3	0,15	0,67	2	0,001	0,2	0

Avec la 2nde AMOVA, bien que les diversités haplotypique (Hd) et nucléotidique (π) soient légèrement modifiées (Tableau 4), le constat reste le même *i.e.,* elles correspondent au signal d'une **population à croissance rapide issue d'une population ancestrale à faible effectif**.

L'indice de fixation F_{ST} calculé sur l'ensemble du jeu de données est de 0,133 (différentiation génétique assez importante) avec un pourcentage de variation entre les 3 zones de 13,27% contre 86,73% au sein de chaque zone.

Les 3 zones présentent des valeurs moyennes de F_{ST} (Tableau 4) ce qui correspond à une **variabilité génétique modérée**.

Tableau 4 : Indices de diversité génétique. N : nombre total de spécimens ; F_{ST} : indice de fixation (en gras = significatif) ; Hd : diversité haplotypique ; h : nombre d'haplotypes ; π : diversité nucléotidique ; tests de neutralité F et D (en gras = significatif)

Zones	N	Fst	Hd	h	π	Fu's F	Tajima's D
1	14	**0,169**	0,4	4	7E-04	**-2,29**	**-1,67**
2	19	**0,094**	0,72	6	0,002	-1,3	-0,55
3	8	**0,161**	0,57	2	1E-03	0,97	1,44

Tableau 5 : Matrice des valeurs de F_{ST} estimées entre les 3 zones. Les valeurs significatives (p-value < 0,05) sont présentées en gras.

	1	2	3
1	-		
2	**0,093**	-	
3	**0,230**	**0,150**	-

L'observation des valeurs de F_{ST} estimées entre les zones (Tableau 5) montre qu'il existe une différentiation modérée entre les zones 1 et 2 (F_{ST} = 0,093) alors qu'une différentiation plus importante est notée entre les zones 1 et 3 (F_{ST} = 0,230) ainsi que les zones 2 et 3 (F_{ST} = 0,150) (Tableau 6). Ainsi, la Zone 1 est plus proche génétiquement de la Zone 2 que de la Zone 3 et, la Zone 2 semble plus proche de la Zone 1 que de la Zone 3.

Néanmoins, il n'existe qu'une seule population au sein de cette espèce.

Seuls les tests de Fu (indice F) et de Tajima (indice D) pour la Zone 1 se sont révélés significativement négatifs, ce qui suggère que seule la Zone 1 matérialiserait une population en expansion (*i.e.* une zone à partir de laquelle la diversité génétique pourrait s'accroitre).

A la suite de la 2nde AMOVA, un nouveau réseau d'haplotypes a été réalisé où seules les zones sont matérialisées et le pourcentage de présence de chacune d'entre elle est indiqué pour les 2 haplotypes partagés (H1 et H2) (Fig. 6). Avec les indices de diversité génétique (Tableau 4), le réseau d'haplotypes (Fig. 6) et l'histogramme (Fig. 7), nous pouvons constater que **la zone présentant le moins de diversité et l'absence d'haplotype unique est la Zone 3. En revanche, les zones 1 et 2 possèdent plusieurs haplotypes uniques.**

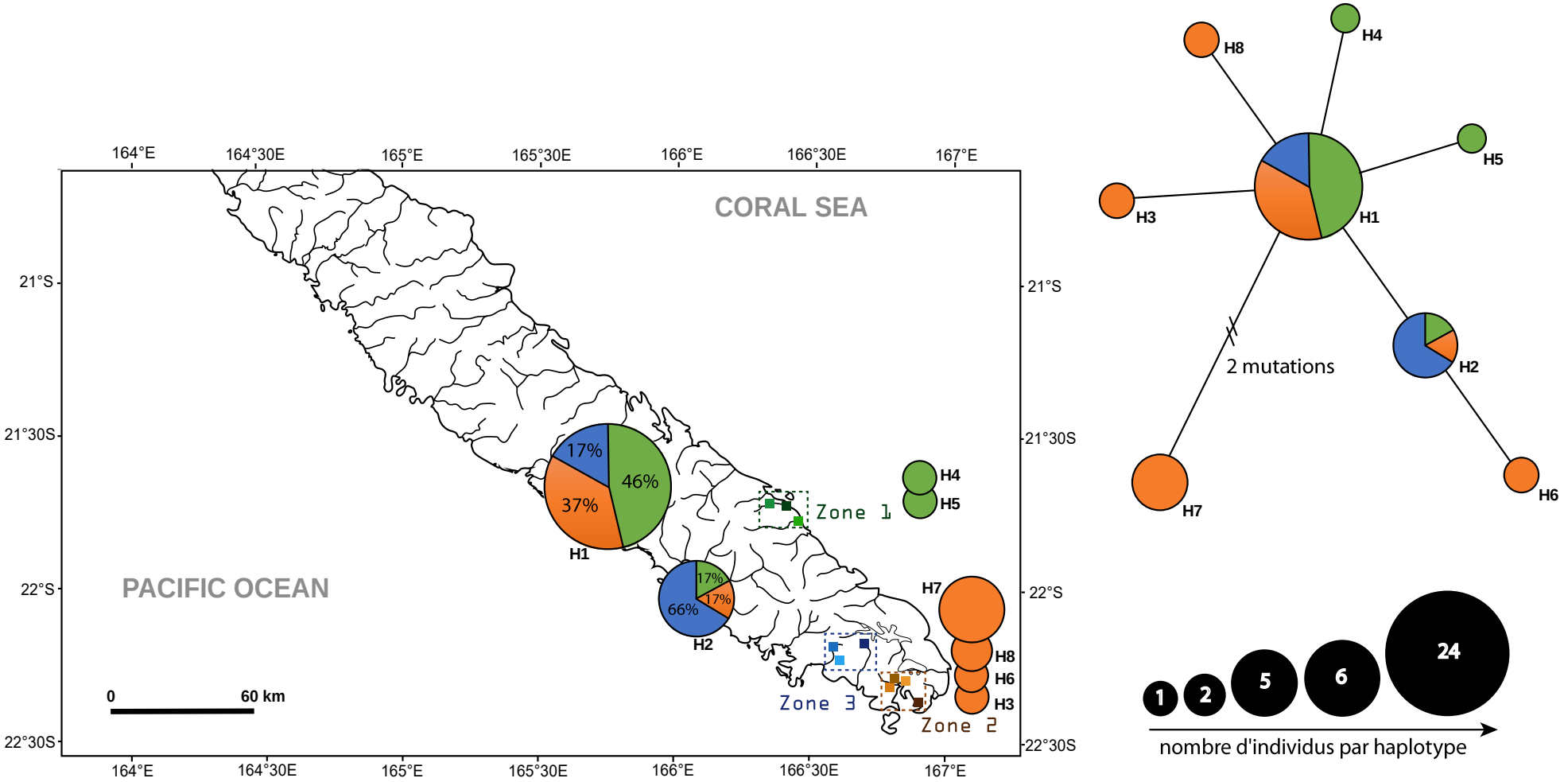


Figure 6 : Réseau d'haplotypes de *S. fuligimentus* à l'échelle des zones. Les haplotypes ont été répartis sur une carte du Sud de la Nouvelle-Calédonie afin d'observer l'emplacement des haplotypes uniques.

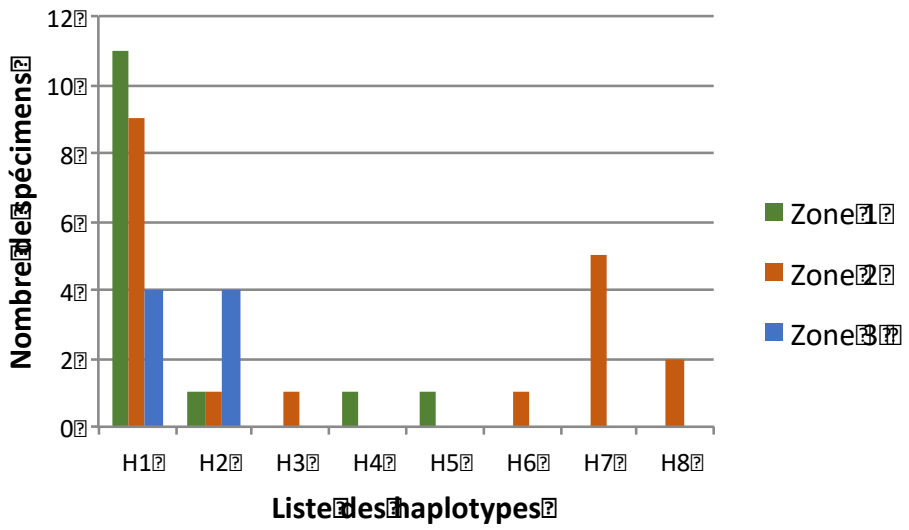


Figure 7 : Répartition du nombre de spécimens de *S. fuligimentus* échantillonnés dans les 3 zones en fonction des 8 haplotypes observés

Bien que les **zones 1 et 2 soient les plus diversifiées** et que seule la Zone 1 semble en expansion, il est important de noter que c'est la **Zone 2 qui présente le plus haut taux** de diversité haplotypique (et avec 4 haplotypes uniques) (Tableau 4, Fig. 6 et 7).

En résumé :

Sur un total de 41 séquences de *S. fuligimentus*, seuls 8 haplotypes sont présents, ce qui est faible, dont 2 sont uniques (ceux-ci sont uniquement dans les zones 1 (Bwi, Xwé Nuru et Ngoi), et 4 (Creek de la Baie du nord, Carénage, Prony et Kaoris)).

La structure en étoile du réseau d'haplotype suggère qu'il n'existe qu'une population et qu'elle est issue d'événements de colonisation passée suivit d'expansions démographiques à partir d'une population ancestrale à faible effectif.

L'observation du jeu de données à l'échelle des zones permet de voir qu'il existe une variabilité génétique modérée au sein des 3 zones. Les zones 1 et 2 sont les plus diversifiées mais seule la zone 1 semble matérialiser une population en expansion (*i.e.* une zone à partir de laquelle la diversité génétique pourrait s'accroitre), tandis que la zone 2 est celle qui contient le plus d'haplotypes uniques. Ces deux zones sont donc importantes pour cette espèce.

IV.2 Sicyopterus sarasini

Un total de 139 individus de *S. sarasini*, répartis sur 12 rivières localisées dans 4 zones (Fig. 8), a pu être obtenu pour le gène Cytb (707 pb). Ce jeu de données comporte des données récentes (2014, 2016 et 2017) et d'autres issues de campagnes de terrain réalisées en 2006 et 2007.

Trois analyses seront présentées dans ce rapport, une 1ère issue de la totalité du jeu de données (toutes années confondues), une 2nde issue du jeu de données « récent » depuis 2014 (après l'accident) à aujourd'hui et une dernière issue du jeu de données compris en 2006 et 2007 (d'après Lord *et al.,* 2012).

Analyse de la totalité du jeu de données (N = 139)

Une très forte diversité haplotypique (Hd) est notée sur l'ensemble du jeu de données (Hd = 0,96) et entre les populations des différentes rivières (min = 0,67 et max = 1). Ainsi qu'une faible diversité nucléotidique (π) (Tableau 6) ce qui correspond au signal d'une population à croissance rapide issue d'**une population ancestrale à faible effectif**.

Sur les 139 séquences de Cytb obtenues, un total de **74 haplotypes** (soit **53,2%**) a été identifié dont **54 sont uniques** (soit **38,8%**) (Fig. 8a), ceci montrant un **brassage génétique important**.

Tableau 6 : Indices de diversité génétique. N : nombre total de spécimens ; F_{ST} : indice de fixation ; Hd : diversité haplotypique ; h : nombre d'haplotypes ; π : diversité nucléotidique ; tests de neutralité F et D (en gras = significatif)

Rivières	Population	N	F_{ST}	Hd	h	π	Fu's F	Tajima's D
Bwi	Bw	4	0,041	1	4	0,006	-0,66	0,31
XweNuru	XN	9	0,013	0,94	7	0,008	-0,90	0,23
Ngoi	Ng	10	0,007	0,98	9	0,009	-2,94	-0,10
Ni	Ni	33	0,005	0,94	23	0,008	-11,59	**-1,48**
Pourina	Po	3	0,038	1	3	0,008	0,45	0
Kwatéa	Kw	4	0,033	1	4	0,007	-0,48	-0,53
FausseYaté	FY	11	0,015	0,98	10	0,008	**-4,14**	-0,45
CreekBaieNord	CN	3	0,073	0,67	2	0,003	1,61	0
TrouBleu	TB	8	0,003	1	8	0,009	-0,31	-0,75
Barendeu	Ba	52	0,002	0,96	32	0,008	**-18,51**	**-1,22**

Etant donné le nombre d'haplotypes uniques, deux réseaux d'haplotypes ont été réalisés. Le premier avec l'ensemble du jeu de données (N = 139) (Fig. 8a) et le second en utilisant le critère « Fréquence > 1 » où toutes les séquences uniques sont éliminées lors de la réalisation du réseau (N = 85) (Fig. 8b). Cependant, ces deux réseaux d'haplotypes montrent la même chose, à savoir, une **absence totale de structure génétique**.

Cette absence de structuration de la population de *S. sarasini* sur le territoire met en évidence que **l'espèce se disperse de manière homogène et ne subit pas de barrière(s) à la dispersion.**

Tableau 7 : Matrice des valeurs de F_{ST} estimées entre les 10 zones (N ≥ 3). Les valeurs significatives (p-value < 0,05) sont présentées en gras et sur fond gris.

	Bw	XN	Ng	Ni	Po	Kw	FY	CN	TB	Ba
Bw										
XN	0,042									
Ng	-0,065	-0,035								
Ni	-0,061	-0,006	-0,040							
Po	0,041	0,021	-0,017	0,023						
Kw	-0,172	0,030	-0,078	-0,066	0,089					
FY	0,002	0,042	0,011	0,052	0,125	-0,015				
CN	**0,514**	0,137	**0,244**	**0,263**	0,327	**0,461**	0,280			
TB	-0,081	-0,001	-0,022	0,005	0,074	-0,074	-0,063	0,251		
Ba	-0,029	-0,017	-0,021	0,002	0,035	-0,033	-0,001	**0,197**	-0,030	

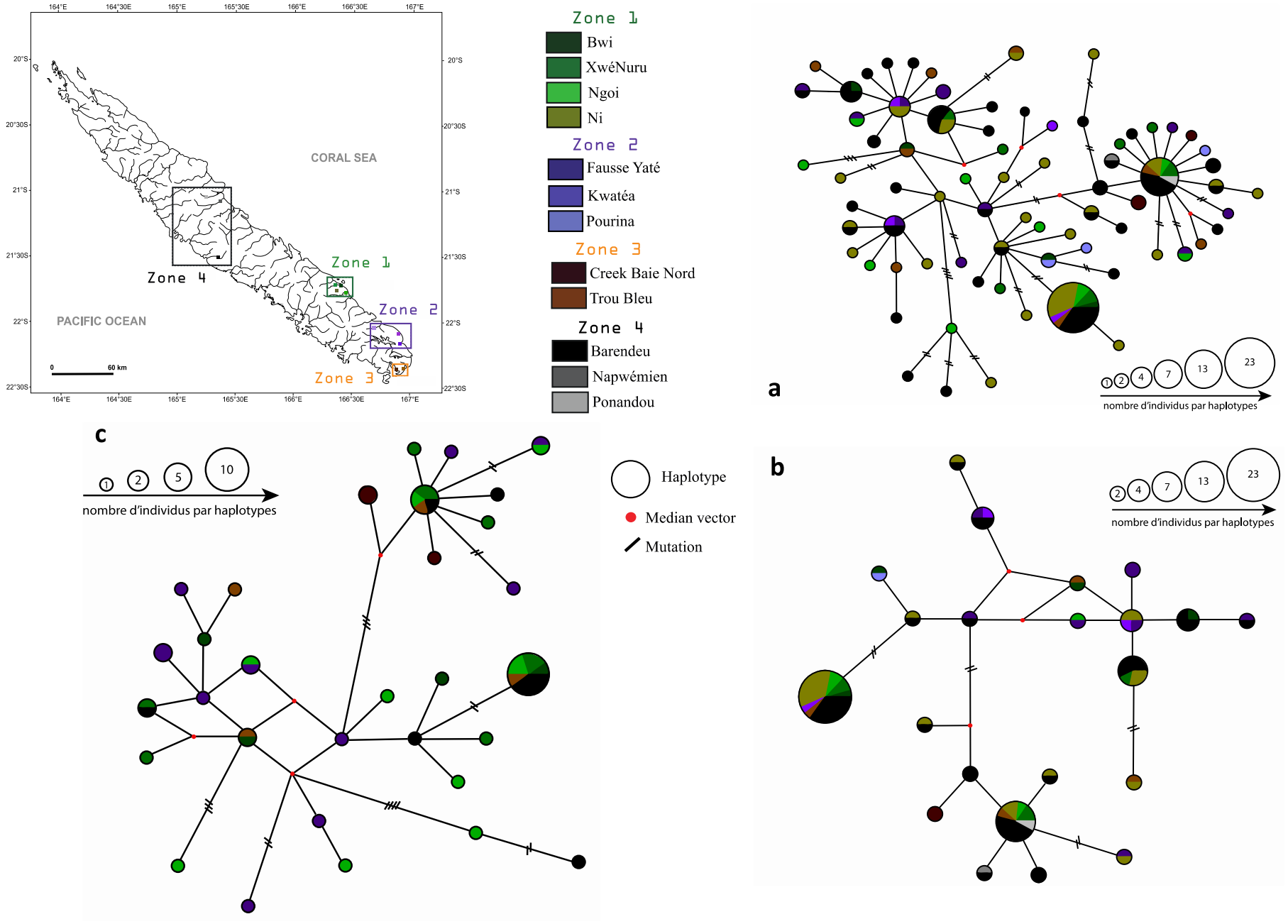


Figure 8 : Carte des localités de prélèvements. Réseaux d'haplotypes de *S. sarasini* à l'échelle des rivières, a- avec l'ensemble du jeu de données ; b- avec seulement les haplotypes présentant au moins 2 individus ; c- avec les données « récentes ». Les median vectors représentent des haplotypes non échantillonnés.

Tout comme précédemment, deux AMOVA ont été réalisées, une à l'échelle des rivières (Tableau 6) et une à l'échelle de zones (Tableau 8) (Zone 1 : Bwi, Xwé Nuru, Ngoi, Ni ; zone 2 : Pourina, Kwatea, Fausse Yaté ; zone 3 : Creek Baie nord, Trou bleu ; zone 4 : Barendeu). Dans les deux cas, une absence de significativité des valeurs de F_{ST} est notée, ce qui signifie qu'il n'y a pas de **structuration de la population** ce qui corrobore les résultats obtenus avec les réseaux d'haplotypes. Et les zones présentant le plus grand nombre d'haplotypes uniques sont la Zone 1 (23 pour 56 séquences) et la Zone 4 (20 pour 52 séquences).

Les tests de Fu et de Tajima mettent en évidence que la Zone 4 (rivière Barendeu) serait en expansion, ce qui n'est pas étonnant car elle présente une diversité haplotypique de presque 1 (Hd = 0,959) et 32 haplotypes sur 52 séquences.

Tableau 8 : Indices de diversité génétique. N : nombre total de spécimens ; F_{ST} : indice de fixation ; Hd : diversité haplotypique ; h : nombre d'haplotypes ; π : diversité nucléotidique ; tests de neutralité F et D (en gras = significatif)

Zones	N	F_{ST}	Hd	h	π	Fu's F	Tajima's D
1	56	0,002	0,94	37	0,008	**-25,21**	-1,69
2	18	0,037	0,98	15	0,008	**-7,18**	-1,02
3	11	0,001	0,98	10	0,009	-3,61	-0,49
4	52	0,001	0,96	32	0,008	**-18,51**	**-1,22**

Bien que les F_{ST} des populations soient non significatives (Tableau 6), certaines issues de la matrice de comparaison entre les populations sont significatives (Tableau 7). Ainsi, nous pouvons observer que **les spécimens de la Creek de la Baie Nord sont plus proches génétiquement des spécimens capturés dans la Barendeu** (F_{ST} = 0,197) **que ceux issus des rivières de la Zone 1** (*i.e.,* Bwi, Ngoi et Ni) (0,244 ≤ F_{ST} ≤ 0,514).

Analyse du jeu de données « récent » (N = 50)

Une très forte diversité haplotypique (Hd) est notée sur l'ensemble du jeu de données (Hd = 0,95) et entre les populations des différentes rivières (min = 0,67 et max = 1). Ainsi qu'une faible diversité nucléotidique (π) (Tableau 9) ce qui correspond au signal d'une population à croissance rapide issue d'une population ancestrale à faible effectif.

Sur les 50 séquences de Cytb obtenues, un total de 31 haplotypes a été identifié dont 23 sont uniques soit 74% de la totalité du jeu de données (Fig. 8c), ceci montrant un brassage génétique important. Et le plus grand nombre d'haplotypes uniques est observé au sein de la Zone 1 avec 11 haplotypes uniques sur 23 séquences.

Comme précédemment, **aucune structuration de la population** de *S. sarasini* n'est observée avec le réseau d'haplotypes (Fig. 8c) et lors l'AMOVA réalisée à l'échelle des rivières (Tableau 9). L'absence de significativité des tests de neutralité met en avant l'absence de populations en expansion.

Tableau 9 : Indices de diversité génétique. N : nombre total de spécimens ; F_{ST} : indice de fixation ; Hd : diversité haplotypique ; h : nombre d'haplotypes ; π : diversité nucléotidique ; tests de neutralité F et D.

Zones	Rivières	Population	N	F_{ST}	Hd	h	π	Fu's F	Tajima's D
1	Bwi	Bw	4	0,092	1	4	0,006	-0,66	0,31
	XweNuru	XN	9	0,045	0,94	7	0,008	-0,90	0,23
	Ngoi	Ng	10	0,035	0,98	9	0,009	-2,94	1
2	FausseYaté	FY	11	0,048	0,98	10	0,008	-4,14	-0,45
3	Creek Baie Nord	CN	3	0,146	0,67	2	0,003	1,61	0
4	Barendeu	Ba	9	0,044	0,83	6	0,008	0,34	-0,58

Analyse du jeu de données de 2006-2007 (N = 87), d'après Lord *et al.,* 2012

Une très forte diversité haplotypique (Hd) est notée sur l'ensemble du jeu de données (Hd = 0,97) et entre les populations des différentes rivières (min = 0,95 et max = 1). Ainsi qu'une faible diversité nucléotidique (π) (Tableau 10) ce qui correspond au signal d'une population à croissance rapide issue d'une population ancestrale à faible effectif.

Sur les 87 séquences de *Cytb* obtenues, un total de 63 haplotypes a été identifié dont 50 sont uniques soit 79% de la totalité du jeu de données (Fig. 8c), ceci montrant un brassage génétique important. Et les zones présentant le plus grand nombre d'haplotypes uniques sont la Zone 1 (22 pour 36 séquences) et la Zone 4 (20 pour 43 séquences).

Tableau 10 : Indices de diversité génétique. N : nombre total de spécimens ; F_{ST} : indice de fixation (en gras = significatif) ; Hd : diversité haplotypique ; h : nombre d'haplotypes ; π : diversité nucléotidique ; tests de neutralité F et D (en gras = significatif)

Zones	N	F_{ST}	Hd	h	π	Fu's F	Tajima's D
1	36	**0,046**	0,95	26	0,008	**-15,44**	**-1,57**
3	8	**0,047**	1	8	0,009	**-3,27**	-1,17
4	43	**0,045**	0,97	29	0,008	**-17,28**	**-1,33**

Contrairement aux analyses précédentes, les valeurs de F_{ST} sont significatives. Ainsi, une F_{ST} de 0,047 est notée sur l'ensemble du jeu de données, avec des F_{ST} à l'échelle des zones (absence de la zone 2) comprises entre 0,045 et 0,047. Ceci caractérisant une population avec une faible structuration car les valeurs sont proches de 0. Cependant, cette structuration faible n'est pas visible sur le réseau d'haplotypes (Fig. 9a).

Seuls les tests de Fu (indice F) et de Tajima (indice D) pour les zones 1 et 4 se sont révélés significativement négatifs, ce qui signifie que ces dernières matérialisent deux populations en expansion.

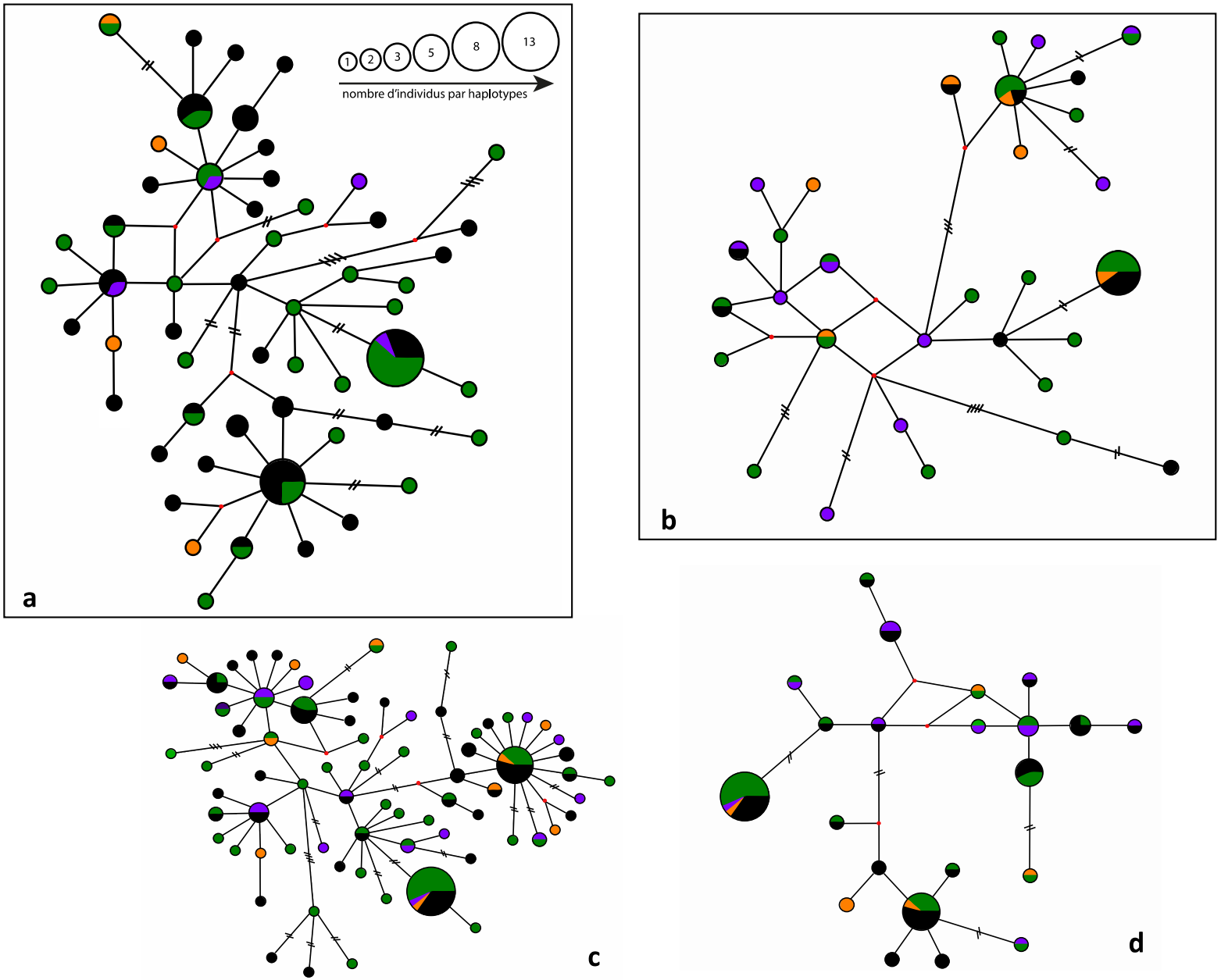


Figure 9 : Comparaison des réseaux d'haplotypes de *S. sarasini* à l'échelle des zones, a- avec les données de 2006 et 2007 ; b- avec les données « récentes » ; c- avec l'ensemble du jeu de données ; d- avec seulement les haplotypes présentant au moins 2 individus.

En résumé :

Aucune différence n'a été observée dans ces 3 analyses et les résultats concordent à chaque fois. Nous pouvons constater que le jeu de données de *S. sarasini* présente une très forte diversité haplotypique (Hd) et une faible diversité nucléotidique (π) ce qui correspond à une population à croissance rapide issue d'une population ancestrale à faible effectif. Un grand nombre d'haplotypes ont été identifiés dont 38,8% sont uniques ; Ceci et l'absence de structuration du jeu de données sur le territoire (réseaux d'haplotypes et F_{ST}) montrent qu'il y a un brassage génétique important, une seule population, et que l'espèce ne subit pas de « barrières » à la dispersion.

Les haplotypes uniques sont localisés dans les zones 1 (Bwi, Xwé Nuru, Ngoi, Ni) et 4 (Barendeu) qui sont les plus diversifiées. Ces zones sont donc d'une grande importance pour cette espèce.

Il semblerait aussi que les spécimens de la Creek de la Baie Nord soient plus proches génétiquement des spécimens capturés dans la Barendeu que de ceux issus des rivières de la Zone 1. Les effectifs de la Barendeu (ainsi que peut être certains cours d'eau voisins) joueraient ou ont joué un rôle important dans la colonisation des rivières du sud-ouest de la Nouvelle-Calédonie.

Enfin, il est à noter que lors de l'étude 2006-2007, la zone 1 matérialisait une population en expansion, ce qui ne semble plus le cas dans le cadre de cette étude.

IV.3 Protogobius attiti

Analyse du gène COI

Un total de 136 individus de *P. attiti,* répartis sur 14 rivières de la Province Sud, a pu être séquencé pour le gène COI (595 pb).

Une diversité haplotypique moyenne assez élevée est notée au sein du jeu de données (Hd = 0,63) - comprenant les deux extrema 0 et 1 car les trois individus échantillonnés dans la Fausse Yaté présentent le même haplotype (donc 0% de divergence) et les deux individus provenant de la rivière Prony présentent deux haplotypes différents (donc 100% de divergence, non visible dans le Tableau 11) - et une faible diversité nucléotidique (π) est notée ce qui correspond au signal d'une population à croissance rapide à l'origine issue d'une **population ancestrale à faible effectif** (Tableau 11).

Sur les 136 séquences de COI obtenues, un total de **7 haplotypes** (nommés H1 à H7), soit **5,2%**, a été identifié dont 1 seul est unique (provenant de la Ouinné) (soit **0,7%**) (Fig. 10). Un haplotype majeur est observé, l'haplotype H1, qui est présent dans toutes les rivières et se compose de 75 spécimens. Cet haplotype est suivi de deux autres dont la composition est inférieure en nombre de spécimens et de localités : H3 (N = 32) qui est présent dans 11 rivières (absence de Pourina, Fausse Yaté et Prony) et H6 (N = 13) qui n'est pas présent dans les rivières plus au nord à l'exception de Ngoi. Et parmi les haplotypes à faible effectif ($3 \leq N \leq 7$), soit H4, H2 et H5, seul le dernier est retrouvé uniquement dans les rivières les plus au sud (Creek de la Baie du nord, Trou Bleu et Kaoris).

Le réseau d'haplotype réalisé sur l'ensemble du jeu de données présente une structure en étoile. En effet, on observe un haplotype central (H1) partagé par plusieurs individus, où toutes les localités sont représentées, depuis lequel l'ensemble des autres haplotypes rayonnent, séparés de ce dernier par une mutation (Fig. 11).

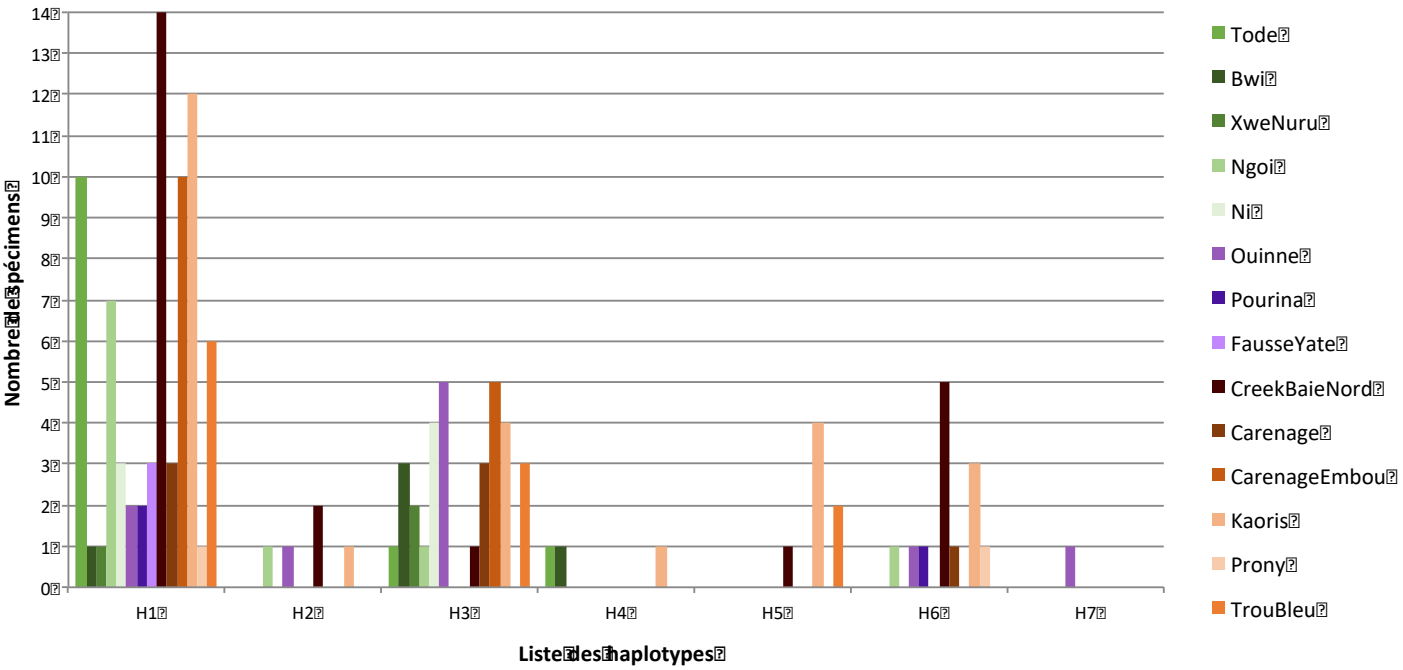


Figure 10 : Répartition du nombre de spécimens de *P. attiti* échantillonnés dans les 14 rivières en fonction des 7 haplotypes observés

structure est typiquement associée à un scénario d'événements de **colonisation passée suivi d'expansions démographiques.**

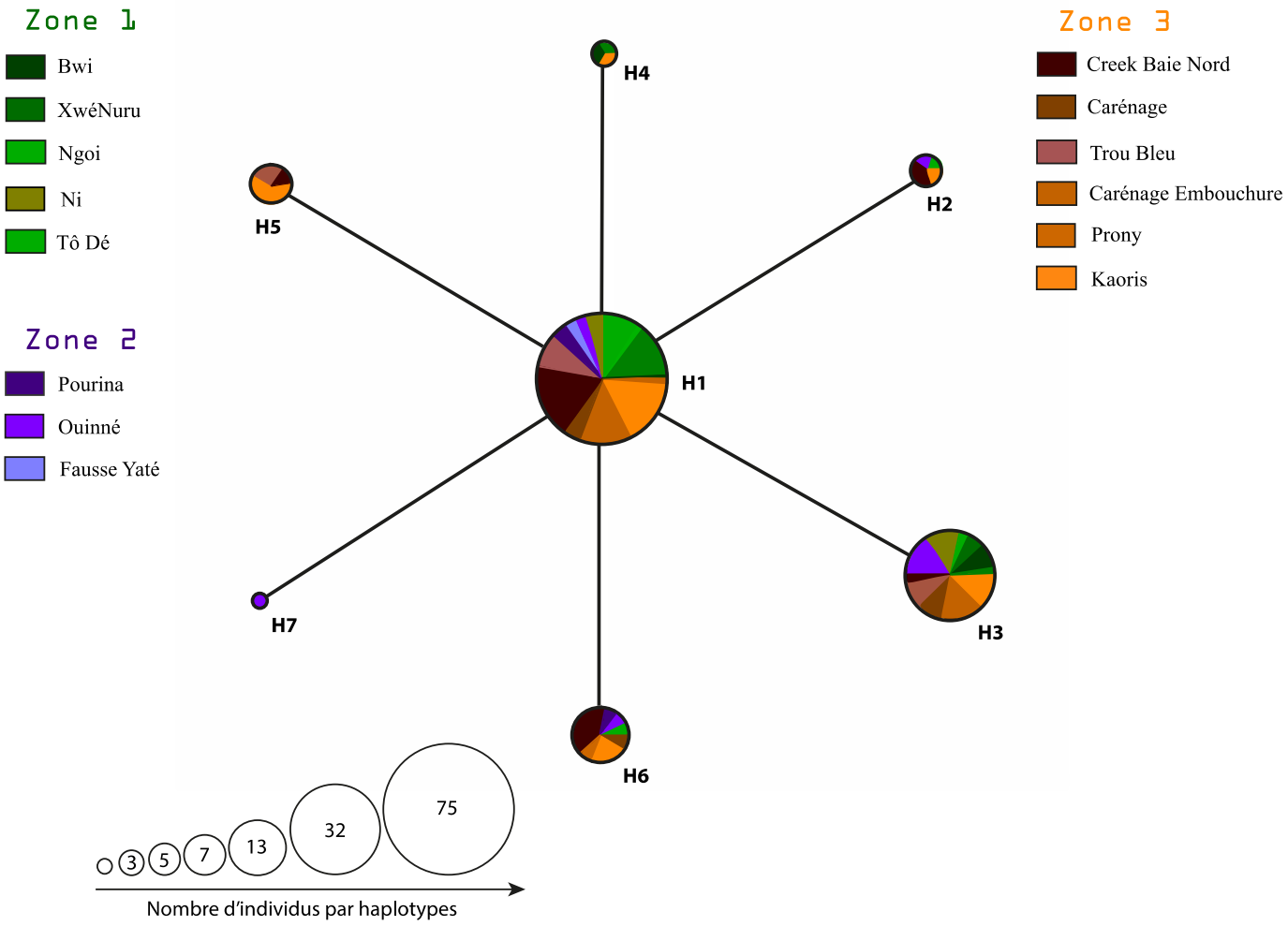


Figure 11 : Réseau d'haplotypes de *P. attiti* à l'échelle des rivières. Lorsque les mutations ne sont pas indiquées cela signifie qu'elles sont égales à un. La taille des cercles des haplotypes est proportionnelle au nombre d'individus partageant l'haplotype.

Tableau 11 : Indices de diversité génétique. N : nombre total de spécimens ; F_{ST} : indice de fixation (en gras = significatif) ; Hd : diversité haplotypique ; h : nombre d'haplotypes ; π : diversité nucléotidique ; tests de neutralité F et D (en gras = significatif)

Rivières	Population	N	F_{ST}	Hd	h	π	Fu's F	Tajima's D
Tô Dé	TD	12	**0,11**	0,32	3	0,0006	-1,32	-1,45
Bwi	Bw	5	**0,04**	0,70	3	0,0017	-0,48	0,25
XweNuru	XN	3	**0,09**	0,67	2	0,0011	0,20	0
Ngoi	Ng	10	**0,08**	0,53	4	0,0010	**-1,96**	-1,56
Ni	Ni	7	**0,09**	0,57	2	0,0010	0,86	1,34
Ouinne	Ou	10	**0,01**	0,76	5	0,0019	-1,90	-0,70
Pourina	Po	3	**0,09**	0,67	2	0,0011	0,20	0
FausseYaté	FY	3	**0,16**	0,00	1	0	-	-
CreekBaie	CN	23	**0,06**	0,60	5	0,0012	-1,89	-0,99
Carenage	Ca	7	**0,05**	0,71	3	0,0014	-0,24	0,21
CarEmbou	CaEm	15	**0,09**	0,48	2	0,0008	1,12	1,12
Kaoris	Ka	25	**0,03**	0,73	6	0,0016	-2,09	-0,83
TrouBleu	TB	11	**0,06**	0,65	3	0,0013	0,07	0,36

Deux AMOVA ont été réalisées, une première à l'échelle des 13 rivières (Tableau 11), où Prony en est absente car seuls 2 individus y ont été échantillonnés, et une seconde à l'échelle de zones. Les rivières ont été réparties selon trois zones : la Zone 1 comprenant les rivières de Bwi, Tô De, Xwé Nuru, Ngoi et Ni, la Zone 2 comprenant les rivières de Pourina, Ouinné et Fausse Yaté et, la Zone 3 comprenant les rivières du Creek de la Baie du nord, Carénage, Trou Bleu, Prony et Kaoris.

L'indice de fixation F_{ST} calculé sur l'ensemble du jeu de données est de 0,06 (différentiation génétique très faible) avec un pourcentage de variation entre les différentes rivières de 6,38% contre 93,62% au sein de chaque rivière. Les valeurs de F_{ST} de chaque localité sont comprises entre 0,01 et 0,16 ce qui signifie qu'il y a une **très légère structuration des populations de *P. attiti*** dans la Province Sud, mais **il n'y a néanmoins qu'une seule population**.

Les valeurs de F_{ST} estimées entre les rivières (Tableau 12) montrent qu'il existe une différentiation plus importante entre celles de la Zone 1 (TD *vs.* Ni : F_{ST} = 0,22 et Ng *vs.* Bw F_{ST} = 0,32) que celle de la Zone 3 (CN *vs.* TB : F_{ST} = 0,1 et CN *vs.* CaEm : F_{ST} = 0,15). Lorsque l'on confronte ces deux zones, deux valeurs de F_{ST} sont notées, une de 0,3 (CN *vs.* Zone 1) et une de 0,13 (Ka *vs.* Zone 1) qui sont proches de celles observées au sein de chacune des deux zones. La rivière Ouinné présente la même F_{ST} (= 0,17) lorsqu'elle est comparée aux Zones 1 et 3. Et entre la Carénage et la Fausse Yaté, seule une F_{ST} de 0,07 est observée, ce qui représente une différentiation génétique très faible. De plus, les tests de Fu et de Tajima ne mettent en évidence **aucune population en expansion à l'échelle des rivières**.

L'observation de la répartition du nombre de spécimens de *P. attiti* échantillonnés dans les 3 zones en fonction des 7 haplotypes (Fig. 12) et le second réseau d'haplotype à l'échelle des zones

permet de voir que tous les haplotypes à l'exception du H7 (uniquement dans la Ouinné) sont présents dans la Zone 3 et ce, avec les plus forts pourcentages de présence (Fig. 13). **Cependant, c'est la Zone 2 qui présente la diversité haplotypique la plus élevée (Hd = 0,73) et seule la Zone 1 semble en expansion (indices F et D significativement négatifs)** (Tableau 13).

Tableau 12 : Matrice des valeurs de F_{ST} estimées entre les 13 rivières (N ≥ 3). Les valeurs significatives (p-value < 0,05) sont présentées en gras et sur fond gris.

	TD	Bw	XN	Ng	Ni	Ou	Po	FY	CN	Ca	CaEm	Ka	TB
TD													
Bw	0,29												
XN	0,41	-0,28											
Ng	-0,03	**0,22**	0,25										
Ni	**0,32**	-0,13	-0,29	0,22									
Ou	**0,17**	-0,08	-0,19	0,09	-0,09								
Po	0,10	0,24	0,33	-0,11	0,33	0,08							
FY	-0,19	0,25	0,50	-0,18	0,34	0,07	0,00						
CN	0,05	**0,30**	**0,31**	-0,05	**0,29**	**0,17**	-0,18	-0,11					
Ca	0,15	-0,08	-0,17	0,05	-0,09	-0,11	0,03	**0,07**	0,12				
CaEm	0,09	0,05	0,02	0,06	0,01	-0,01	0,20	0,06	**0,15**	-0,06			
Ka	0,00	**0,13**	0,12	-0,03	**0,13**	0,08	-0,08	-0,12	0,01	0,02	0,04		
TB	0,05	0,07	0,04	0,02	0,06	0,02	0,07	-0,05	**0,10**	-0,02	-0,02	-0,03	

Tableau 13 : Indices de diversité génétique. N : nombre total de spécimens ; F_{ST} : indice de fixation (en gras = significatif) ; Hd : diversité haplotypique ; h : nombre d'haplotypes ; π : diversité nucléotidique ; tests de neutralité F et D (en gras = significatif)

Zones	N	F_{ST}	Hd	h	π	Fu's F	Tajima's D
1	37	0,012	0,57	5	0,0011	**-1,59**	**-0,80**
2	16	0,003	0,73	5	0,0016	-1,58	-0,68
3	83	0,007	0,64	6	0,0013	-1,30	-0,49

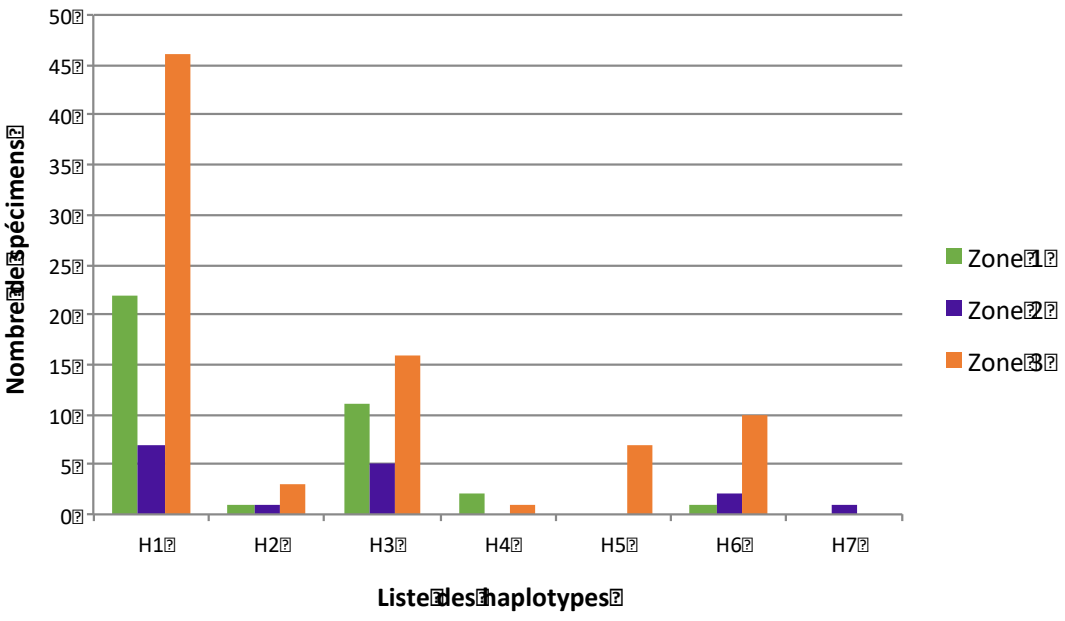


Figure 12 : Répartition du nombre de spécimens de *P. attiti* échantillonnés dans les 3 zones en fonction des 7 haplotypes observés

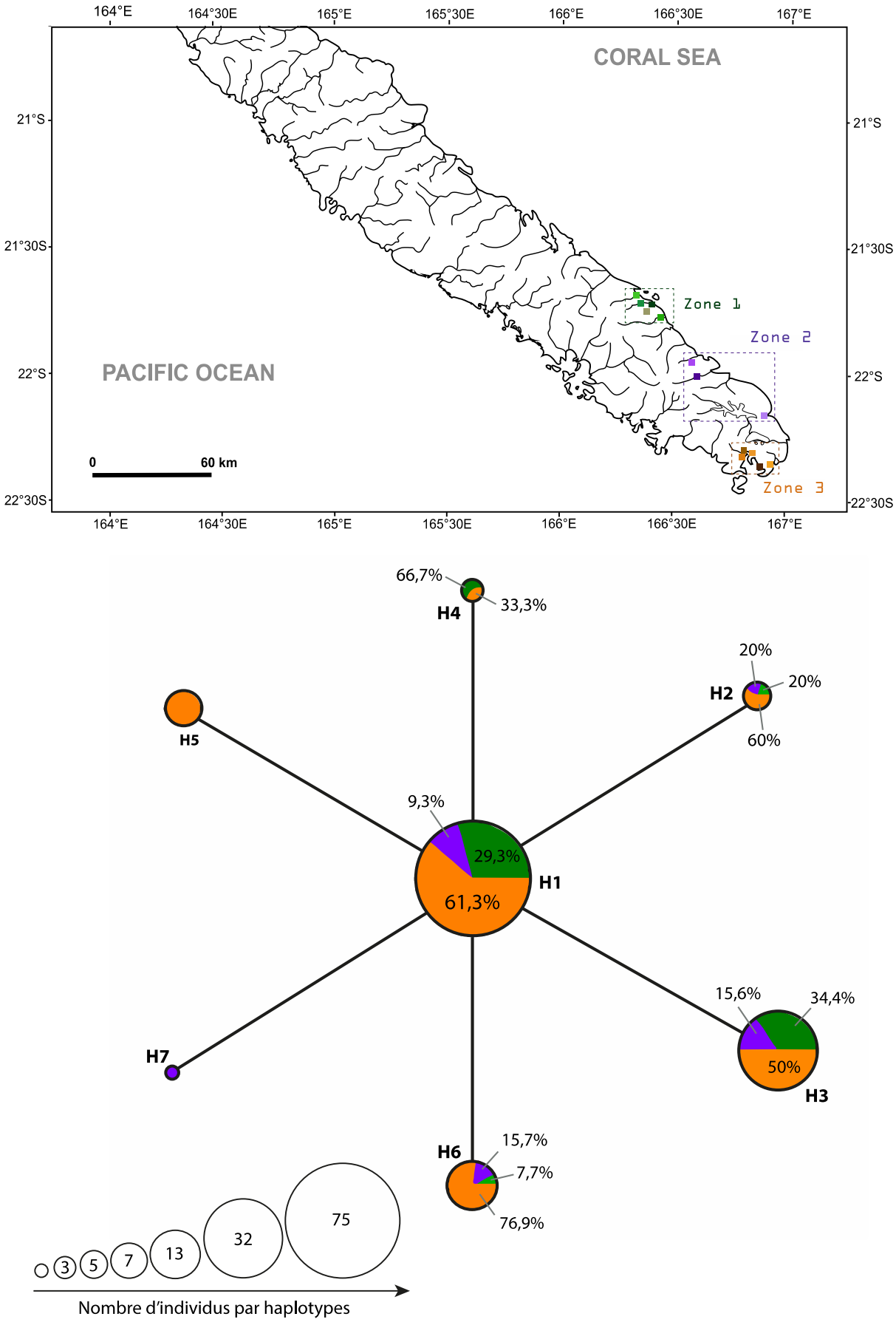


Figure 13 : Carte des lieux de capture des spécimens de *P. attiti* à l'échelle des zones et le réseau d'haplotypes correspondant. Le pourcentage de représentation de chaque zone est indiqué pour chacun des 7 haplotypes.

Analyse du mitogénome complet

L'ensemble du jeu de données utilisé pour l'analyse du mitogénome complet est composé uniquement des 23 spécimens issus de l'accident du Creek de la baie Nord de 2014.

Au total, 3 mitogénomes complets ont pu être obtenus (soit 16 516 pb) et 11 mitogénomes partiels. Etant donné le faible nombre de mitogénomes complets, seule une analyse de la diversité gène par gène a été réalisée afin d'obtenir de meilleurs résultats.

Ainsi, pour les 13 gènes codants, nous obtenons le nombre de séquences suivant :

- 5 pour l'ATPase 6, ATPase 8, COII, COIII, ND3, ND4L et ND4
- 12 pour le ND6
- 13 pour ND1, ND2 et ND5
- 14 pour le Cyt b
- 15 pour le COI

L'analyse de la diversité génétique pour chaque gène codant est très faible ; la plupart des gènes présentent une diversité entre les séquences inférieure à 1% (ND1, ND2, COI, COII, ATPase6, ND4, ND5, ND6, Cyt b) voire aucune différence entre les séquences (ATPase 8, COIII, ND3, ND4L).

Le choix des marqueurs de l'étude (COI, Cytb) est justifié.

Grâce au réseau d'haplotype (Fig. 11), nous pouvons attribuer à chaque mitogénome (complet et partiel) l'haplotype correspondant. Ainsi, les 3 mitogénomes complets appartiennent chacun à un haplotype différent soit les haplotypes H1, H2 et H6 ; avec l'ajout des mitogénomes partiels, nous obtenons des informations concernant l'haplotype H3.

De ce fait, le jeu de données se compose de la manière suivante :

- H1 = 1 mitogénome complet + 8 partiels
- H2 = 1 mitogénome complet + 1 partiel
- H3 = 1 mitogénome partiel
- H6 = 1 mitogénome complet + 1 partiel

Dans le Creek de la Baie Nord et pour ce jeu de données, nous sommes donc en présence de 4 haplotypes différents (présents dans les 3 zones étudiées) et génétiquement très proches (diversité génétique par gène inférieure à 1%). Ceci confirme qu'il n'y a qu' une seule et même population de *P. attiti* sur le territoire Calédonien.

En résumé

Sur un total de 136 séquences de *P. attiti*, seuls 7 haplotypes sont présents, ce qui est faible, et 1 seul est unique. La structure en étoile du réseau d'haplotype suggère qu'il n'existe qu'une population et qu'elle est issue d'événements de colonisation passée suivis d'expansions démographiques à partir d'une population ancestrale à faible effectif.

L'observation du jeu de données à l'échelle des rivières permet de voir qu'il existe une très légère structuration de la population, ce qui pourrait aller dans le sens d'une dispersion faible ou limitée. A l'échelle des zones, seule la Zone 1 (Tô De, Bwi, Xwé Nuru, Ngoi et Ni) est en expansion (*i.e.* une zone à partir de laquelle la diversité génétique pourrait s'accroitre), et c'est la Zone 2 (Pourina, Ouinné et Fausse Yaté) qui présente la diversité haplotypique la plus élevée.

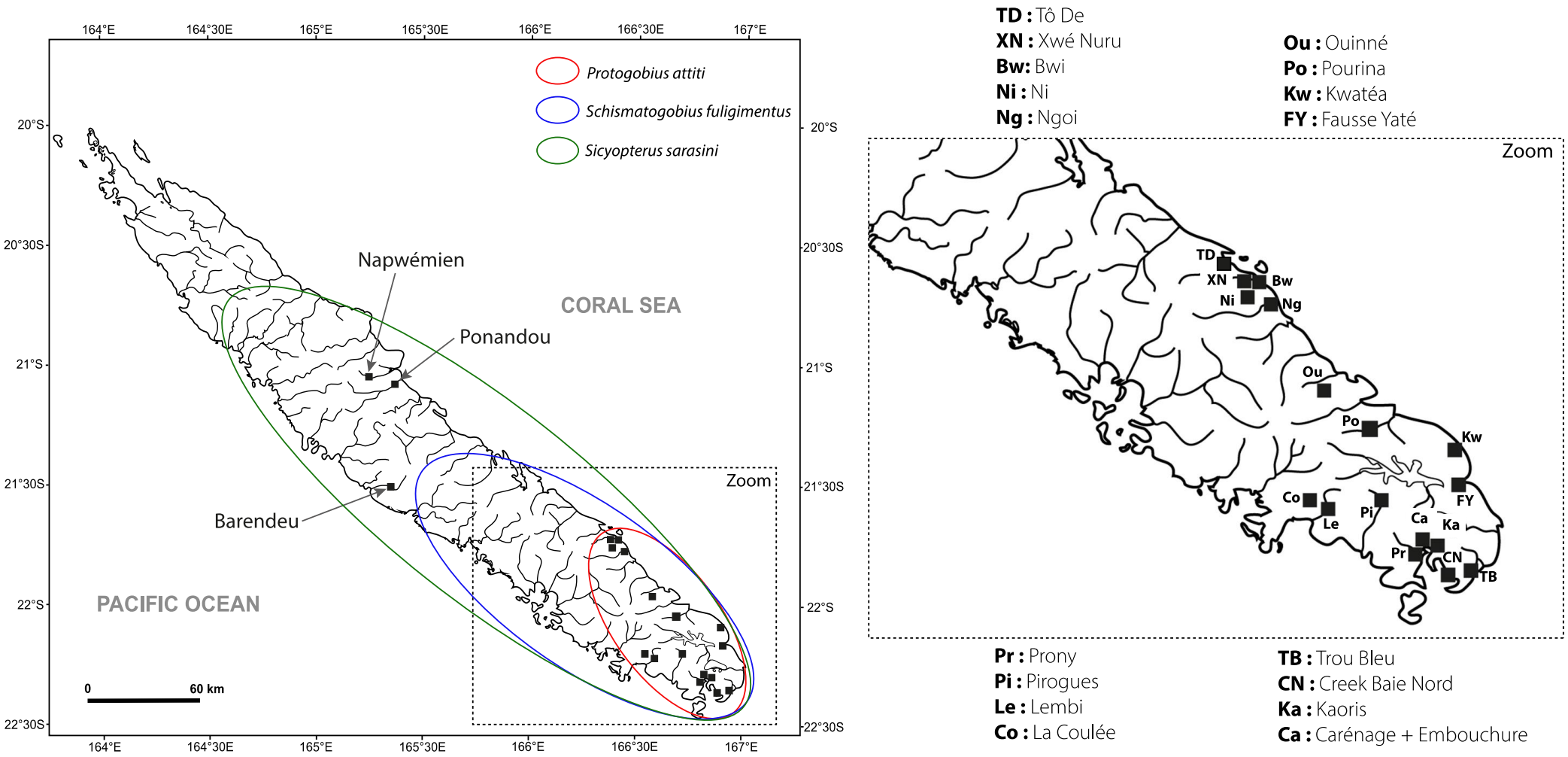


Figure 14 : Carte des aires de répartition des 3 espèces échantillonnées. Ellipse rouge : *P. attiti*, Ellipse Bleu : *S. fuligimentus,* Ellipse verte : *S. sarasini.*

V Discussion-Perspectives

Deux types de réseau d'haplotypes ont été mis en évidence chez les espèces étudiées : un réseau homogène chez *S. sarasini* (Fig. 8) et une structuration en étoile chez *S. fuligimentus* et *P. attiti* (Fig. 6 et 13). Ceci met en évidence que ces 3 espèces ne se dispersent pas de la même manière sur le territoire calédonien. Leur aires de répartition sont par ailleurs différentes (Marquet *et al.,* 2003) (Fig. 14).

S. sarasini

Rappelons que *S. sarasini* est une espèce dont le cycle amphidrome (espèce migratrice avec une dispersion larvaire en mer) a été confirmé (*cf.* rapport précédent).

Les résultats de l'étude phylogéographique réalisée sont en parfaite adéquation avec ce cycle amphidrome. Cette étude révèle que cette espèce présente une population unique, une **diversité haplotypique** moyenne **très importante** (Hd = 0,96) et un grand nombre d'haplotypes uniques, illustrant **un brassage génétique important**. Ce dernier est aussi mis en évidence par l'absence totale de structuration du jeu de données sur le territoire (réseaux d'haplotypes et F_{ST}) montrant que **l'espèce se disperse de manière homogène et ne subit pas de barrière(s) à la dispersion.** Les 78 jours estimés pour la durée de la phase larvaire marine moyenne (rapport précédent, 56 ≤ Durée de phase larvaire ≤ 130 jours) semblent donc permettre à l'espèce de se disperser sur de longues distances autour du territoire Calédonien.

Bien que seule la **Zone 4** (Barendeu) ait été mise en évidence comme étant en expansion (Hd ≈ 0,96 et 20 haplotypes uniques), la **Zone 1** (Bwi, Xwé Nuru, Ngoi et Ni) est la 2nde zone la plus importante avec une diversité haplotypique d'environ 0,94 et 23 haplotypes uniques ; ces deux zones constituent ainsi des **zones importantes pour la pérennité de l'espèce.**

S. fuligimentus et *P. attiti*

Tout comme *S. sarasini*, *S. fuligimentus* et *P. attiti* présentent une diversité haplotypique et diversité nucléotidique associées au signal d'une population à l'origine à croissance rapide issue d'une population ancestrale à faible effectif. Cependant, la structuration des populations de ces 2 espèces est différente de celle de la première. En effet, toutes deux présentent un **réseau d'haplotypes avec une structuration en étoile** suggérant qu'elles sont issues d'événements de colonisation passée suivit d'expansions démographiques.

En plus de cette structuration en étoile, nous avons pu constater un **écart considérable en termes de proportion d'haplotypes constituant les 3 espèces**. Sur les 139 séquences de ***S. sarasini*** 74 haplotypes ont été observés, soit environ **53%** du jeu de données, dont 54 sont uniques (38,8%). Ce qui contraste avec les résultats obtenus pour les deux autres espèces où peu d'haplotypes ont été observés : pour les 41 séquences de ***S. fuligimentus,*** 8 haplotypes seulement ont été notés (**19,5%**) dont 4 uniques (9,75%) et, pour les 136 séquences de ***P. attiti,*** 7 haplotypes seulement notés (**5,2%**) dont 1 unique (0,7%) ; **ce qui est très faible**.

La diversité haplotypique est aussi clairement très différente entre *S. sarasini* et *S. fuligimentus/P. attiti.* Ces deux dernières sont très loin de présenter un brassage génétique similaire à celui de *S. sarasini* ce qui rend leurs **populations *a priori* plus vulnérables et nous interroge sur leur cycle de vie et leur mode de dispersion sans doute très différents.** *S. fuligimentus* et *P. attiti* sont plus limitées en termes de distribution et pourraient aussi être des espèces plus exigeantes en

termes d'habitats. Il est clair que l'espèce *S. sarasini* semble, dans l'état actuel des connaissances, moins fragile que *S. fuligimentus* et que *P. attiti.*

Une très légère structuration génétique est notée pour *S. fuligimentus* et *P. attiti*, mais à deux échelles différentes, respectivement à celle des zones et celle des rivières. Chez ces deux espèces, la **Zone 1** (Tô Dé à Ngoi) semble en expansion (*i.e.,* une zone à partir de laquelle la diversité génétique pourrait s'accroitre). Cette dernière est donc une zone qui mériterait une **attention particulière en termes de gestion et de conservation pour ces deux espèces** (mais aussi pour *S. sarasini* comme il l'a été noté plus haut dans la discussion). **Cette zone jouerait donc un rôle primordial dans le maintien de ces espèces**.

En 2003, Marquet *et al.* (2003) constataient que les zones les mieux préservées pour *P. attiti* étaient situées sur les rivières Pourina et Ni sur la côte oubliée. Ils invitaient à protéger les bassins versant de ces dernières. Avec les analyses phylogéographiques, nous pouvons constater que dans la Province Sud c'est plus largement la zone de la **Côte Oubliée qui semble être importante pour la biodiversité des trois espèces étudiées et elle pourrait ainsi constituer une zone dite « réservoir ».**

Néanmoins, compte tenu des connaissances déjà acquises sur *P. attiti* et *S. fuligimentus* (distributions réduites en Calédonie, effectifs réduits, habitats spécifiques…), les résultats obtenus dans notre étude, (diversités très faibles, nombre d'haplotypes réduits, modes de dispersion inconnus mais sans doute réduits…) mettent en exergue **la réalité de leur statut d'espèces très menacées et la nécessité de connaître le cycle de vie de ces espèces : la première déjà classée « En Danger d'extinction »** par l'UICN, et la seconde étant classée en « Data Deficient » par l'UICN, c'est là l'occasion d'aller jusqu'au bout de l'analyse pour **réévaluer son statut** qui est surement proche de « **En Danger d'extinction** ».

Compte tenu de la faible diversité génétique de ces espèces, en particulier de *Protogobius,* toutes les rivières les hébergeant encore ont probablement un rôle à jouer dans leur maintien.

Quels modes de dispersion pour ces espèces ? Quels cycles de vie ?

Les résultats obtenus précédemment sur les otolithes de *P. attiti* et *S. fuligimentus* étaient surprenants. En effet, ces deux espèces sont considérées depuis toujours comme étant amphidromes, donc migratrices, alors que nous n'observions, dans certains cas, aucune marque de recrutement « classique » sur l'otolithe correspondant à l'arrivée des post-larves de la mer vers l'eau douce, ou, chez *P. attiti,* de nombreuses marques dont la signification restait inconnue. Il ne semblait donc pas certain que tous les individus de ces espèces, voire les espèces, soient finalement migrateurs/migratrices. Ce qui en termes de conservation de ces endémiques change tout, évidemment. Si tout ou une partie des larves émises reste dans le même bassin versant, toute action anthropique négative sur ce dernier aurait pour conséquence de supprimer définitivement, ou d'affaiblir considérablement, les populations.

L'analyse génétique réalisée ici montre que nous avons une seule et même population pour chacune des 3 espèces étudiées mais avec des capacités de dispersion différentes, et encore inconnues pour deux d'entre elles, et avec des diversités génétiques différentes, parfois faibles, voire très faibles, donc avec des sensibilités et fragilités différentes.

S'il a été montré que la structure génétique de *S. sarasini* est dûe à son cycle amphidrome, qu'en est-il pour *S. fuligimentus* et *P. attiti* ? Pour ces deux espèces la structure génétique et la distribution spatiale auraient pu être acquises il y a plusieurs dizaines de milliers d'années, lors des

fluctuations du niveau marin qui a varié de +/- 120 mètres durant le Pleistocène, et pas uniquement et/ou forcément par un caractère diadrome et une dispersion marine larvaire.

Il reste donc à statuer sur le mode de vie et de dispersion de ces deux espèces, si l'on veut avoir toute les données pour leur conservation. Ces espèces bénéficient elles d'un mode de dispersion diadrome total ou partiel (1), ou non diadrome (2) ? Si (1), tout bassin est supposé pouvoir bénéficier à un moment donné d'un pool larvaire venant d'un autre et c'est une sorte de garantie de (re)colonisation ou de survie pour certains bassins en cas d'accidents ou d'aménagements. Si (2), il ne peut pas y avoir de recolonisation naturelle si tout un bassin est impacté. Il est donc extrêmement important de statuer sur ce point.

Pour ce faire, l'utilisation de la microchimie sera indispensable car elle permet de reconstruire l'histoire migratoire et environnementale des poissons. Il conviendra donc **d'effectuer des analyses microchimiques sur un choix d'otolithes dont nous disposons afin de statuer sur la réalité de leur cycle de vie.** Il est en effet nécessaire, pour tout objectif de gestion-conservation, de savoir **si ces espèces sont majoritairement inféodées à des bassins versants, si possible à quelle partie du bassin selon le stade de vie, ou si elles se dispersent via le milieu marin pour coloniser de nouveaux bassins.**

L'étude réalisée montre clairement que chaque espèce endémique étudiée a ses caractéristiques propres et que la généralisation des cycles de vie connus « classiques » en milieu dulçaquicole insulaire n'a pas lieu d'être en Nouvelle-Calédonie où l'histoire évolutive des taxons a été très contrainte, notamment sur les milieux ultramafiques. Tout projet de gestion d'espèces nécessite donc d'être précédé obligatoirement d'études précises sur leur cycle de vie.

Vers quelle gestion ?

La **gestion et la conservation** des espèces doit prendre en compte à la fois la dépendance des populations adultes sur le pool de larves pour leur remplacement, et inversement, la contribution de chaque population génitrice au pool larvaire. Autrement dit, la survie des espèces dépend de la capacité des populations existantes à fournir assez de larves pour maintenir à long terme un nombre suffisant d'adultes permettant une **dispersion large** et le maintien de toutes les populations afin d'assurer un **flux de gènes continu** entre elles. **Néanmoins, la gestion sera nécessairement différente si certaines ne sont pas diadromes ou partiellement diadromes.**

Les variables saisonnières (pluviométrie, épisodes de sécheresse, crues, etc.) et les actions anthropiques ont toutes un impact majeur sur la survie des espèces en raison du rôle qu'elles jouent dans la reproduction et la dispersion des larves. La gestion requiert donc un minimum de connaissances sur ces cycles. Toute action aura des conséquences au niveau local voir régional, selon le cas. **D'où la nécessité de statuer rapidement sur le cycle de vie diadrome ou non des espèces.**

Si les espèces sont amphidromes ou partiellement, plusieurs faits importants qui permettront le **maintien de la connectivité des populations** et donc leur **conservation** sont à retenir :

1- Un **débit minimum** doit être maintenu pour assurer la persistance de zones de type rhéophile (à écoulement rapide) permettant une bonne oxygénation des cours d'eau et ainsi permettant aux espèces adaptées à ce type d'habitat (*S. sarasini*, *S. fuligimentus*…) de compléter leur cycle de vie. Les débits doivent aussi **respecter les variations saisonnières** : l'eau douce qui se déverse en mer donne en effet le signal de démarrage de la colonisation aux post-larves. Une absence de

gestion intégrée des captages d'eau ou ouvrages pourrait ainsi contribuer à l'éradication d'une partie de la faune d'eau douce de certains cours d'eau.

2- La production de larves et le retour des post-larves en rivière sont étroitement liés au maintien d'un **corridor océan-montagnes**. Il est donc essentiel de permettre le **libre accès** de la faune aquatique entre **l'aval et l'amont**, afin de faciliter leur migrations trophiques ou gamiques, aussi bien vers l'aval pour les larves que vers l'amont pour les post-larves et pour les juvéniles. Afin d'assurer la libre circulation, il ne doit y avoir **aucune barrière** dans les cours d'eau qui puisse empêcher le passage dans les deux sens. Il est aussi important de noter que les passes à poissons ne sont efficaces que si elles sont adaptées aux caractéristiques de chaque espèce et si possible limitées en nombre pour un même cours d'eau. Enfin, n'importe quel type de barrière y compris les **'bouchons' vaseux ou de pollution** en estuaire bloquent le recrutement et les migrations.

3- Toute installation de structures artificielles modifiant les débits ou causant de la pollution doit être évitée ou contrôlé strictement. **L'eutrophisation des rivières, la pollution** et son impact au niveau des paramètres physico-chimiques de l'eau, conduisent à la disparition des espèces et à la prolifération des algues filamenteuses au détriment des diatomées, nourriture préférée de certaines espèces amphidromes ou de leurs proies.

4- **Estuaires et embouchures** de rivières doivent être préservés car ce sont des zones où beaucoup d'espèces transitent. Il est essentiel de conserver ces habitats dans un état aussi naturel que possible.

Enfin, évidemment, si certaines espèces ne migrent pas ou peu et sont inféodées à des bassins versants, il est clair que les impacts décrits ci-dessus seront amplifiés, et que certaines populations pourraient disparaître de façon irréversible en cas de perturbation.

Tout ceci devra être décliné à la lumière des études sur le cycle de vie réel des espèces.

VI Bibliographie

Avise J.C. – 2000 – Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA: 1-447.

Avise J.C. – 2009 – Phylogeography: retrospect and propect. Journal of Biogeography, 36: 3-15.

Bandelt H.J., Forster P., Rohl A. – 1999 – Median-Joining network for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology Evolution, 16: 37-48.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. – 2005 – Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 1: 47-50.

Excoffier L. & Smouse P.E. – 1994 – Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. Genetics, 136: 343-359.

Fu Y.X. – 1997 – Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics, 147: 915–925.

Glenn T.C. – 2011 – Field guide to next-generation DNA sequencers. Molecular Ecology Resources, 11: 759-769.

Herbert P.D.N., Ratnasongham S., De Waard J.R. – 2003 – Barcoding animal life: Cytochrome c oxydase subunit 1 divergence among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences, 270 : 96-99.

Hinsinger D.D., Debruyne R., Thomas M., Denys G.P.J, Mennesson M., Utge J., Dettai A. – 2015 – Fishing for barcoding in the Torrent: from COI to complete mitogenomes on NGS platforms. DNA Barcodes, 3: 170-186.

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., et al. – 2012 – Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics, 28: 1647-1649.

Librado P. & Rozas J. – 2009 – Dnasp v5 : software for comprehensive analysis od DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25 : 1451.

Lord C., Lorion J., Dettai A., Watanabe S., Tsukamoto K., Cruaud C., Keith P. – 2012 – From endemism to widespread distribution: phylogeography of three amphidromous *Sicyopterus* species (Teleostei: Gobioidei: Sicydiinae). Marine Ecology Progress Series, 455: 269-285.

Marquet G., Keith P., Vigneux E. – 2003 – Atlas des poissons et crustacés d'eau douce de Nouvelle-Calédonie. Patrimoines Naturels, 58 : 282 p.

Mennesson M.I. – 2016 – Taxonomie, phylogénie et dispersion du genre *Eleotris* (Teleostei: Gobioidei: Eleotridae) dans l'Indo-Pacifique. PhD dissertation, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris.

Miya M. & Nishida M. – 2015 – The mitogenomic contributions to molecular phylogenetics and evolution of fishes: a 15-year retrospect, Ichthyological Research, 62 : 29-71.

Riddle B.R. – 2009 – What is modern biogeography without phylogeography? Journal of Biogeographie, 11: 353-361.

Tajima F. – 1983 – Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics, 105: 437-460.

Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., Herbert P.D.N. – 2005 – DNA barcoding australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royale Society B : Biological Sciences, 360 : 1847-1857.

Ward R.D., Hanner R., Herbert P.D.N. – 2009 – The campaign to DAN barcode all fishes, fush-bol. Journal of Fish Biology, 74 : 329-356.

Wright S. – 1951 – An essay in modal logic. North-Holland Publishing Company.

Wright S. – 1965 – The interpretation of population structure by f-statistics with special regard to systems of mating. Evolution, 19: 395-420.