PROTEGE

GÉNÉTIQUE DES PERROQUETS À BOSSE

Étude de la structuration génétique des populations de perroquets à bosse Bolbometopon muricatum en Nouvelle-Calédonie

Rapport final

IRD – UMR ENTROPIE

Juin 2024

Financé par l'Union européenne
Pacific Community Communauté du Pacifique
Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie
Polynésie française
Wallis et Futuna
Îles Pitcairn
IRD Institut de Recherche pour le Développement FRANCE
ENTROPIE

REMERCIEMENTS

Nous souhaitons adresser nos sincères remerciements à Louis-Charles DZIEGALA et Calvin PALADINI (Observatoire des Pêches Côtières de Nouvelle-Calédonie) et toutes les personnes ayant participé à la collecte des échantillons, à Léocadie JAMET et Clarisse MAJOREL (IRD, UMR ENTROPIE) pour leur aide dans l'extraction des ADN, et à Mickael BERUMEN (KAUST, Arabie Saoudite), pour la mise à disposition des amorces microsatellites ayant servi aux analyses moléculaires.

RESUME

Cette étude avait pour objectif la caractérisation génétique des populations de perroquets à bosse *B. muricatum* en Nouvelle-Calédonie afin de tester la présence de différents stocks à l'échelle étudiée. L'analyse moléculaire de 108 spécimens de perroquets à bosse, issus de six sites d'échantillonnage répartis sur la côte ouest de la Grande Terre entre Koumac et Boulouparis, a été réalisée à l'aide de marqueurs de type microsatellites. Les résultats des analyses des données génétiques n'ont pas mis en évidence de structuration génétique à l'échelle étudiée, suggérant que tous les poissons analysés appartiennent à un stock génétique unique. Par ailleurs, nos résultats ont mis en évidence que ces échantillons analysés en Nouvelle-Calédonie sont très nettement génétiquement différenciés de ceux des Iles Salomon, ce qui suggère que le flux de larves entre la Nouvelle-Calédonie et les iles Salomon est extrêmement limité.

Les résultats de la présente étude sont uniquement basés sur l'analyse des échantillons qui ont été collectés le long de la côte ouest de la Grande Terre. Les perspectives de ce travail sont donc d'étendre ces analyses à des perroquets à bosse issus d'autres récifs de la Nouvelle-Calédonie non analysés dans notre étude (côte est de la Grande Terre, Ile des Pins et Iles Loyauté) afin de vérifier l'unité génétique à l'échelle du Territoire, ainsi qu'à l'échelle de la Mer de Corail (en étudiant les poissons des récifs d'Entrecasteaux, des plateaux des Chesterfield et des Bellona, et des Iles Walpole, Matthew et Hunter) pour évaluer l'étendue géographique du stock présent en Nouvelle-Calédonie.

TABLE DES MATIERES

Contexte de l'étude 5
I . Introduction 6
II . Matériel et Méthodes 7
II . 1 - Échantillons 7
II . 2 - Extraction de l'ADN génomique 7
II . 3 - Amplification des marqueurs microsatellites par PCR 8
II . 4 - Analyses de données 10
III . Résultats et Discussion 11
III . 1 - Diversité génétique des perroquets à bosse en Nouvelle-Calédonie 11
III . 2 - Différenciation entre la Nouvelle-Calédonie et les Îles Salomon : validation des marqueurs pour détecter des différences génétiques 12
III . 3 - Différenciation génétique au sein de la Nouvelle-Calédonie 13
IV . Conclusions 15
V . Liste des Figures et Tableaux 16
VI . Références bibliographiques 17
VII . Annexes 18

CONTEXTE DE L'ETUDE

Le 26 octobre 2021, par la Délibération n° 787-2021/BAPS/DDDT portant diverses modifications du code de l'environnement de la province Sud de la Nouvelle-Calédonie, la province Sud a décidé de classer le perroquet à bosse (*Bolbometopon muricatum*) sur la liste des espèces protégées. Pour donner suite aux différents échanges entre les Provinces Sud et Nord ainsi que les organisations professionnelles concernées, il a été envisagé d'émettre des dérogations pour activité économique pour la pêche du perroquet à bosse en province Sud aux pêcheurs pratiquant déjà la commercialisation, basée sur des quotas individuels qui prennent en compte l'historique d'exploitation. En complément, il a été retenu de mettre en place un suivi pilote pour l'obtention de données de qualité afin de mieux comprendre la dynamique d'exploitation et préciser certains paramètres biologiques de l'espèce. Ainsi, un suivi pilote triennal, 2022-2024, réalisé annuellement devrait permettre d'appréhender les éventuelles fluctuations saisonnières dans les captures ainsi que dans la dynamique de la population de l'espèce.

D'un point de vue biologique, la priorité a été donnée à la réalisation d'une analyse génétique pour valider s'il s'agit d'une seule population à l'échelle de la Nouvelle-Calédonie. Les échantillons seraient directement prélevés sur les poissons échantillonnés en septembre 2023 et seraient valorisés dans le cadre de la capitalisation PROTEGE. C'est dans ce contexte, à la demande des collectivités de province Sud et province Nord, que l'ADECAL Technopole au travers de l'Observatoire des Pêches Côtières de Nouvelle-Calédonie a lancé un partenariat avec l'IRD afin d'être appuyé pour la réalisation d'une étude de génétique des populations sur les perroquets à bosse pour caractériser les stocks à l'échelle pays.

Ce rapport présente ainsi les résultats d'une étude visant à la caractérisation génétique des populations de perroquets à bosse *B. muricatum* à l'échelle de la Nouvelle-Calédonie. Cette étude est réalisée par l'UMR ENTROPIE, sous la responsabilité de Cécile FAUVELOT, Directrice de Recherche à l'IRD, et avec la participation de Claire BONNEVILLE et Paolo VERGER. Elle s'appuie sur l'amplification et l'analyse de marqueurs nucléaires de type microsatellites afin d'appréhender la diversité génétique intra spécifique nécessaire à l'analyse de la variabilité spatiale de cette diversité, pour en déterminer la structuration génétique des populations et en déduire l'existence de différents stocks à l'échelle étudiée.

I . INTRODUCTION

Le poisson-perroquet à bosse, *Bolbometopon muricatum*, est la plus grande espèce de poisson-perroquet au monde, dont l'aire de répartition géographique s'étend de la mer Rouge à la Polynésie française (Hamilton & Choat, 2012). Là où il est présent, *B. muricatum* est responsable d'une grande partie de la bioérosion sur les récifs coralliens, prélevant en moyenne cinq tonnes de carbonate par individu chaque année, dont la moitié est constituée de corail vivant (Bellwood, Hoey & Choat, 2003). Outre cette fonction vitale de l'écosystème, cette espèce est également importante pour la pêche de subsistance et la pêche commerciale à petite échelle (Aswani & Hamilton, 2004), mais *B. muricatum* est très sensible à la surpêche en raison des caractéristiques de son cycle de vie, à savoir une taille importante et sa croissance lente, et le fait que cette espèce se regroupe dans des eaux peu profondes pour se nourrir, frayer et dormir (Hamilton, Regetz & Warner, 2008). Par conséquent, le déclin continu de l'abondance dans l'ensemble de son aire de répartition (Dulvy & Polunin, 2004; Bellwood & Choat, 2011) a conduit à l'inscription de *B. muricatum* sur la liste des espèces vulnérables à l'extinction de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN).

Dans ce contexte, les objectifs spécifiques de ce travail sont de caractériser génétiquement les populations de perroquets à bosse *B. muricatum* en Nouvelle-Calédonie afin de tester l'existence de stocks génétiquement différenciés à l'échelle du territoire qu'il conviendrait de gérer de façon indépendante. L'hypothèse nulle que nous avons donc testé dans cette étude est qu'il existe des différences significatives entre les perroquets à bosse du Nord et du Sud de la Nouvelle-Calédonie, pouvant indiquer un flux de gènes restreint entre ces deux zones géographiques, et donc la présence de deux stocks génétiquement différenciés. Pour ce faire, notre étude repose sur l'utilisation de marqueurs moléculaires de type microsatellites, caractérisés spécifiquement pour *B. muricatum*. Un prérequis à ce travail a été de tester la puissance de ces marqueurs à détecter des différences en comparant les populations de Nouvelle-Calédonie à celles de populations géographiquement éloignées avec lesquelles une différence génétique était attendue, aux îles Salomons, grâce à un jeu de données disponible, issu d'une précédente étude publiée. Dans un second temps, la possible existence de barrières aux flux géniques entre zones d'échantillonnage en Nouvelle-Calédonie a été testée grâce à plusieurs méthodes statistiques.

II . MATERIEL ET METHODES

II . 1 - Échantillons

L'échantillonnage a été réalisé par l'Observatoire des Pêches Côtières de Nouvelle-Calédonie et a eu lieu entre les mois de septembre et décembre 2023. Au total, 108 échantillons ont pu être obtenus, en provenance de 6 sites en Nouvelle Calédonie, du Nord au Sud : Koumac (N = 32), Ouaco (N = 10), Voh (N = 19), Bourail (N = 31), La Foa (N = 5), et Boulouparis (N = 11) (Figure 1). Pour chaque poisson pêché, un morceau de nageoire a été découpé et placé dans un tube individuel contenant de l'éthanol à 96°.

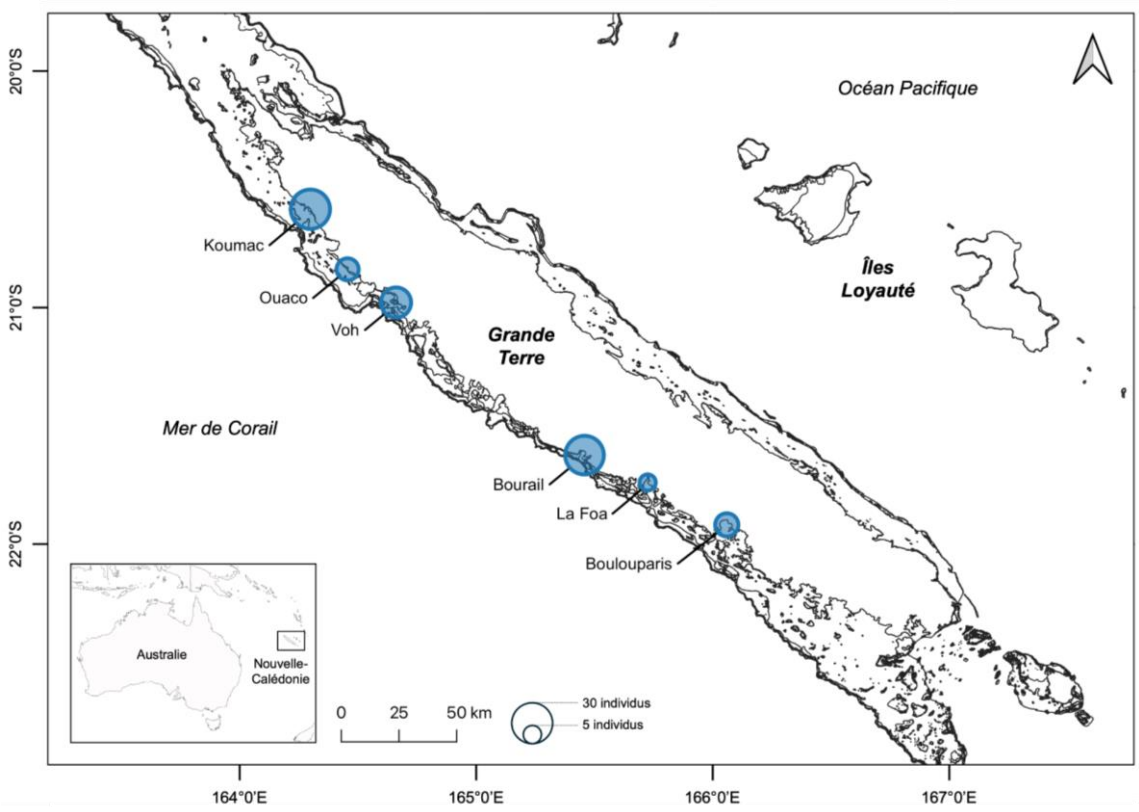

Figure 1 : Localisation des sites d'échantillonnage des perroquets à bosse en Nouvelle-Calédonie, représentés par des cercles dont la taille est proportionnelle au nombre d'individus échantillonnés.

II . 2 - Extraction de l'ADN génomique

À partir des tissus des individus, environ 20 µg d'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit DNEasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Valence CA) en suivant les recommandations du fabriquant. La digestion des tissus a été réalisée au bain marie à 56° durant une nuit entière et les étapes de précipitation et dilution de l'ADN ont été suivies scrupuleusement selon le protocole ; l'ADN a été

resuspendu dans un volume final 100 µl de tampon d'élution. L'intégrité de l'ADN a été vérifiée par migration de 5µl d'ADN extrait sur gel d'agarose à 1 %. La concentration et la pureté de l'ADN ont été estimées au Nanodrop 2000. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à l'amplification des marqueurs moléculaires spécifiques.

II . 3 - Amplification des marqueurs microsatellites par PCR

Pour chaque individu, une série de quatre réactions en chaîne par polymérase (PCR, pour Polymerase Chain Reaction) a été réalisée pour amplifier un total 29 loci microsatellites polymorphes (Priest et al., 2015). Les microsatellites sont des portions d'ADN constituées de séquences nucléotidiques (un à cinq nucléotides d'ADN) se répétant n fois (n pouvant varier entre 5 et jusqu'à 100, Figure 2). Le polymorphisme des microsatellites est un polymorphisme de longueur (Estoup, Jarne & Cornuet, 2002) amplifié par PCR. Chaque longueur de microsatellite correspond à un allèle. Toute l'utilité des microsatellites résulte dans leur propriété à être hypervariables et libérés de toute contrainte de sélection. Pour chaque loci, les amorces F sont couplées à des fluorochromes différents ; quatre fluorochromes sont utilisés : 6-FAM, PET, NED et VIC. Pour chaque multiplex, les fragments amplifiés sont de deux à trois gammes de tailles différentes, ce qui permet de combiner 8, voire 9 loci en même temps. Ces fragments amplifiés sont ensuite dissociés en fonction de leur fluorescence et gamme de taille attendue.

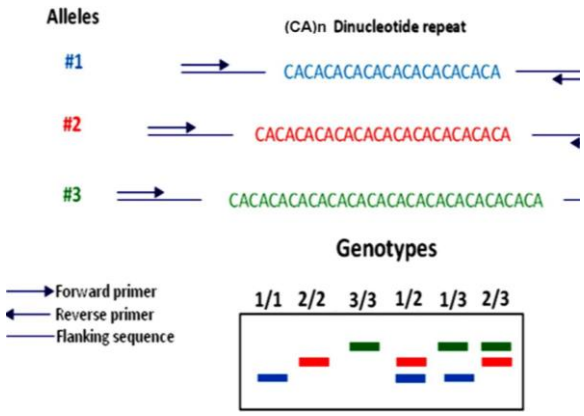

Figure 2 : représentation schématique de trois allèles du même locus microsatellite mais de tailles différentes (ici avec un motif dinucléotidique CA répété en tandem). Les fragments sont amplifiés grâce à des amorces Forward (F) et Reverse (R) qui viennent s'hybrider, par complémentarité, de chaque côté de la partie à amplifier, dans les régions flanquantes de la séquence microsatellite.

Les 29 loci microsatellites utilisés dans la présente étude ont été spécifiquement caractérisés et développés pour l'espèce d'intérêt *B. muricatum* à partir d'individus provenant des îles Salomons

(Priest et al., 2015). Ces 29 loci sont amplifiés dans quatre réactions indépendantes de PCR dites « mutliplex » qui ont permis d'amplifier simultanément 9, 5, 8 et 7 loci microsatellites, respectivement (Figure 3).

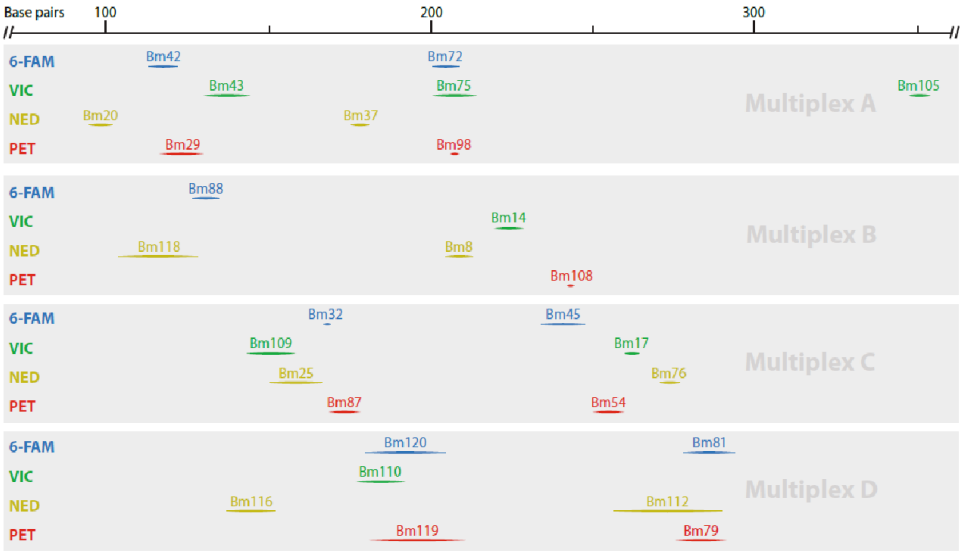

Figure 3 : Représentation schématique des 29 loci microsatellites qui ont été amplifiés pour chaque individu de l'espèce *Bolbometopon muricatum* dans chacune des quatre réactions de PCR Multiplex (A, B, C et D), en fonction de leur fluorochrome et de leur gamme de taille attendue (Priest et al. 2015).

Chaque réaction de PCR a été réalisée à l'aide du kit Multiplex PCR kit (QIAGEN) en suivant les recommandations du fabricant, et dans des thermocycleurs ABI SimpliAmp et Eppendorf Mastercycler. Les réactions de PCR ont été réalisées dans quatre mix distincts, dans un volume final de 5µl contenant 2X Master Mix, 0,5X de Q-solution, un Primer Mix contenant toutes les amorces (F et R) de chacun des locus d'un Multiplex donné, à 2µM en concentration finale et 0,5µl d'ADN. Le programme d'amplification a été fixé selon le protocole conseillé pour l'amplification de ces loci : 15 min à 95°C de dénaturation, suivi de 38 cycles de 30 s à 95°C, 90 s à 54°C d'hybridation des amorces, 30 s à 72°C d'élongation des fragments et une élongation finale de 30 s à 72°C. Les fragments amplifiés obtenus ont ensuite été envoyés à la plateforme de génotypage GENTYANE (INRAE, Clermont-Ferrand) afin d'être séparés en fonction de leur taille sur le séquenceur ABI 3130xl DNA (Applied Biosystems, Carlsbad CA) avec un marqueur de taille standard interne (GS500 LIZ). Les génotypes et les tailles d'allèles microsatellites ont ensuite été obtenus par lecture des chromatogrammes (Figure 4) à l'aide du logiciel Geneious Prime® 2023.2.1 (Biomatters Ltd.).

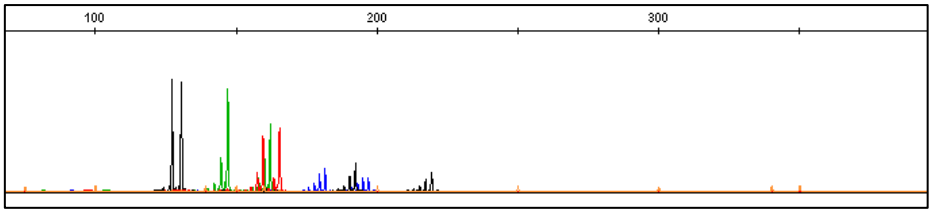

Figure 4 : Exemple de chromatogramme représentant les pics de fluorescences (variables en intensité) obtenus en fonction de la taille des fragments (en paires de bases nucléotidiques). Chaque pic correspond à un allèle d'un locus microsatellite amplifiés (ici on peut voir 2 locus de couleur noir avec chacun 2 allèles, et 1 locus vert, 1 locus bleu et 1 locus rouge avec chacun avec 2 allèles amplifiés).

II . 4 - Analyses de données

Dans un premier temps, le logiciel MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004) a été utilisé pour tester l'éventuelle présence d'allèles nuls, de « stutters » provoqués par des erreurs de la Taq polymérase lors de l'amplification des allèles ou encore des grands allèles qui n'amplifient pas autant que les petits allèles (« large allele drop-out »). Les allèles nuls se caractérisent par des allèles qui ne sont jamais amplifiés lors des PCRs. La diversité génétique a ensuite été estimée au sein de chaque échantillon (i.e. site d'échantillonnage). Le logiciel GENETIX 4.02 (Belkhir et al., 1996) a permis d'estimer les hétérozygoties attendue (He) et observée (Ho) et les F_{IS} pour chaque locus et pour l'ensemble des loci (multilocus). La significativité des écarts à l'équilibre attendu sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg a été déterminée par un test exact dans GENEPOP 4.7 en ligne (Raymond & Rousset, 1995). La fréquence (r) des allèles nuls a été estimée dans chaque population par l'estimateur n°2 de Brookfield (1996) (avec r = (He-Ho)/(Ho+He)) quand ils étaient détectés par MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004).

La structuration génétique sur l'ensemble des échantillons de *B. muricatum* a été estimée et testée par plusieurs méthodes. L'estimation de la corrélation des gènes entre individus dans une population par rapport à l'ensemble des populations (F_{ST}) a été déterminée pour chaque paire d'échantillons en utilisant l'estimateur de Weir et Cockerham (Weir & Cockerham, 1984) dans GENETIX. Leur significativité a été testée par permutations des individus entre les échantillons (1000 permutations). La différenciation génétique a également été testée grâce à des tests exacts, via des tests de Chi2 d'homogénéité des génotypes entre paires d'échantillons sous GENEPOP 4.7 en ligne (Raymond & Rousset, 1995). La structure génétique a été visualisée par une Analyse des Factorielle des Correspondances (AFC), réalisée à partir des distances génétiques (différences de fréquences alléliques) entre les échantillons sous GENETIX 4.02 (Belkhir et al., 1996). Néanmoins, l'AFC inclut la variabilité totale des individus au sein des populations et entre ces dernières, c'est la raison pour laquelle une analyse par inférence bayésienne reposant sur une approche basée sur la similitude des génotypes multilocus des individus a également été réalisée. Le logiciel STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard, Stephens &

Donnelly, 2000; Falush, Stephens & Pritchard, 2007) détermine l'assignement de chaque individu à un ou plusieurs clusters (K) inférés selon un ensemble de fréquences alléliques déterminées pour chaque locus. Pour chaque valeur de K donnée, 30 réplicas de 500.000 itérations de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ont été réalisées après avoir supprimé 50.000 burn-in itérations dans le but de diminuer les biais par la configuration du logiciel. Le modèle admixture et l'option locprior ont été choisis. Cela signifie que chaque individu est libre d'appartenir à un ou plusieurs clusters (K). L'ensemble des assignements des individus pour chaque K répliqué a été moyenné puis visualisé à l'aide du logiciel CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg, 2007). Les valeurs de K=1, 2 et 3 ont été testées.

III . RESULTATS ET DISCUSSION

III . 1 - Diversité génétique des perroquets à bosse en Nouvelle-Calédonie

L'ensemble des 29 loci microsatellites caractérisés par Priest et al. (2015) a été amplifié avec succès. Ces loci présentaient en moyenne quatre allèles par locus, avec un minimum de deux allèles (Bm43 et Bm105) et un maximum de huit allèles (Bm118). Le jeu de données final présentait 1,62 % de données manquantes. La présence de potentiels allèles nuls a été détectée pour les loci Bm45, Bm109 et Bm119 et des écarts à l'équilibre d'Hardy-Weinberg significatifs ont été mis en évidence pour les loci Bm45, Bm98, Bm109 et Bm119 (Tableau supplémentaire S1). L'hétérozygotie attendue était en moyenne de 0,4475 par locus avec une valeur minimale de 0,0092 et une valeur maximale de 0,7729. L'hétérozygotie observée était en moyenne de 0,4281 par locus avec une valeur minimale de 0,0093 et une valeur maximale de 0,7944. Sur l'ensemble des loci, un déficit en hétérozygote significatif a été détecté à l'échelle de la Nouvelle-Calédonie (p = 0,0017), ainsi qu'au sein du groupe de perroquets à bosse échantillonnés à Koumac (p = 0,0152).

Des écarts à l'équilibre d'Hardy Weinberg peuvent avoir plusieurs origines (consanguinité, effet Walhund, raisons techniques). Dans notre jeu de données, la présence d'allèles nuls a été détectée de façon certaine en raison de la présence d'homozygotes nuls (i.e. deux allèles n'amplifient pas à un locus chez un individu, alors que tous les autres loci amplifient correctement) pour certains loci (notamment Bm14, Bm42, Bm45 et Bm119), traduisant d'avantage un déséquilibre résultant d'un problème technique plutôt que l'absence de panmixie. En effet, si on retire du jeu de données ces quatre loci précédemment cités pour n'en garder que 25, il n'est plus observé de déficit en hétérozygote significatif à l'échelle de la Nouvelle-Calédonie (p = 0.152).

III . 2 - Différenciation entre la Nouvelle-Calédonie et les Îles Salomon : validation des marqueurs pour détecter des différences génétiques

Afin de tester le pouvoir résolutif des marqueurs microsatellites qui ont été développés par des collègues australiens (Priest et al. 2015) et qui ont été utilisés dans notre étude, des premières analyses de structuration ont été réalisées en intégrant les génotypes de perroquets à bosses (N = 450) issus des îles Salomons, et analysés par Hamilton et al. (2021) avec les mêmes marqueurs microsatellites que ceux avec lesquels nous avons analysé les perroquets à bosse de Nouvelle-Calédonie. Seuls 20 loci ont été conservés pour cette comparaison en raison d'allèles nuls détectés sur les loci exclus, et qui auraient pu biaiser les analyses.

Une estimation de l'indice de différenciation génétique F_{ST} entre la Nouvelle-Calédonie et les îles Salomon a permis de mettre en évidence que la population calédonienne est fortement différenciée de la population salomonaise (F_{ST} = 0,252 ; p < 0,0001). Cette nette différenciation a été confirmée en utilisant une méthode de clustering sans *a priori* par une approche K-means, testée avec STRUCTURE (Figure 5). Ces résultats indiquent un flux génique très limité entre ces deux localités qui peut s'expliquer par une grande distance géographique entre ces iles couplée à une durée de vie larvaire (environ 25 jours, Taylor et al. 2018) relativement courte pour une espèce inféodée aux récifs coralliens.

Ces résultats mettent en évidence que les marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude sont hautement informatifs et ont un pouvoir résolutif attendu pour permettre une caractérisation de la structuration spatiale et des différences génétiques entre les populations de perroquet à bosse à plus fine échelle en Nouvelle-Calédonie.

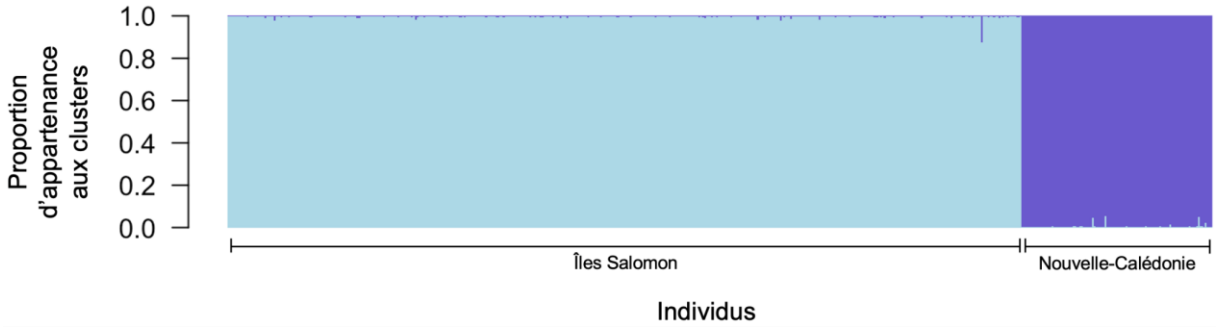

Figure 5 : Probabilité d'appartenance individuelles à chaque cluster génétique pour un nombre de potentiels clusters de K = 2 basée sur l'analyse des marqueurs microsatellites des populations de perroquets à bosse de Nouvelle-Calédonie et des Îles Salomon.

III . 3 - Différenciation génétique au sein de la Nouvelle-Calédonie

A l'échelle de la Nouvelle-Calédonie, l'analyse des génotypes obtenus aux marqueurs microsatellites a mis en évidence des valeurs de l'indice de F_{ST} estimées deux à deux entre les différents sites d'échantillonnage très faibles (Tableau 1) et non significativement différentes de 0 (*p*-values supérieures à 0,05). Ce résultat suggère que les échantillons de perroquets à bosse collectés dans ces six sites ne sont pas génétiquement différenciés.

Tableau 1 : Différenciation génétique des sous-populations putatives de perroquets à bosse de Nouvelle-Calédonie. Les valeurs de l'indice de F_{ST} estimées entre populations deux à deux sont présentées dans la moitié inférieure du tableau. Les p-values associées à chaque valeur et traduisant leur significativité sont présentées dans la partie supérieure du tableau.

	Koumac	**Ouaco**	**Bourail**	**La Foa**	**Boulouparis**	**Voh**
Koumac	-	0.604	0.418	0.089	0.505	0.198
Ouaco	0.00000	-	0.383	0.141	0.305	0.736
Bourail	0.00030	0.00139	-	0.076	0.986	0.951
La Foa	0.02424	0.02065	0.02292	-	0.271	0.172
Boulouparis	0.00000	0.00546	0.00000	0.01192	-	0.457
Voh	0.00409	0.00000	0.00000	0.01425	0.00022	-

Aussi, lorsque l'on regroupe les échantillons par zone afin d'augmenter le nombre d'échantillons comparés entre le Nord et le Sud (c'est-à-dire en regroupant Koumac, Ouaco et Voh d'un côté, et Bourail, La Foa et Boulouparis de l'autre), l'indice de différentiation reste très faible et non significativement différent de zéro (F_{ST} = 0,00234, p = 0,154). L'absence de structuration probable dans la population de Nouvelle-Calédonie est également visible sur l'AFC (Figure 6) puisque les échantillons se répartissent aléatoirement dans l'espace, indépendamment de leur origine géographique.

Une éventuelle structuration de la variabilité génétique a ensuite été testée par une approche individuelle, via une méthode de clustering sans *a priori*, avec le logiciel STRUCTURE. Cette analyse confirme le résultat trouvé précédemment : le nombre de clusters génétiques expliquant le mieux la variabilité des données est K = 1 (Figure 7). En effet, lorsque deux ou trois clusters sont recherchés, les individus présentent des probabilités équivalentes d'appartenir à un cluster plutôt qu'à un autre.

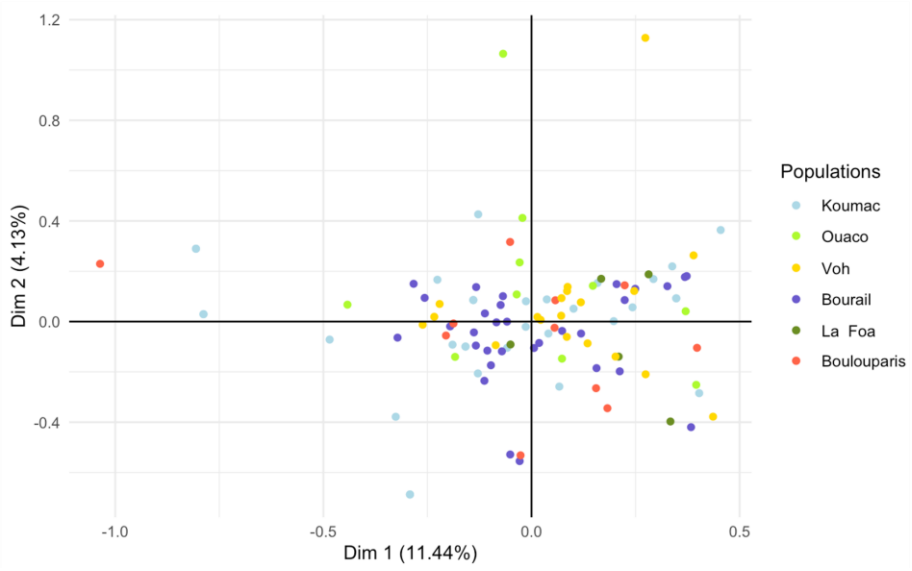

Figure 6 : Analyse factorielle des correspondances (AFC) réalisée sur les données de génotypages à 29 marqueurs microsatellites. Chaque site d'échantillonnage est représenté par une couleur différente.

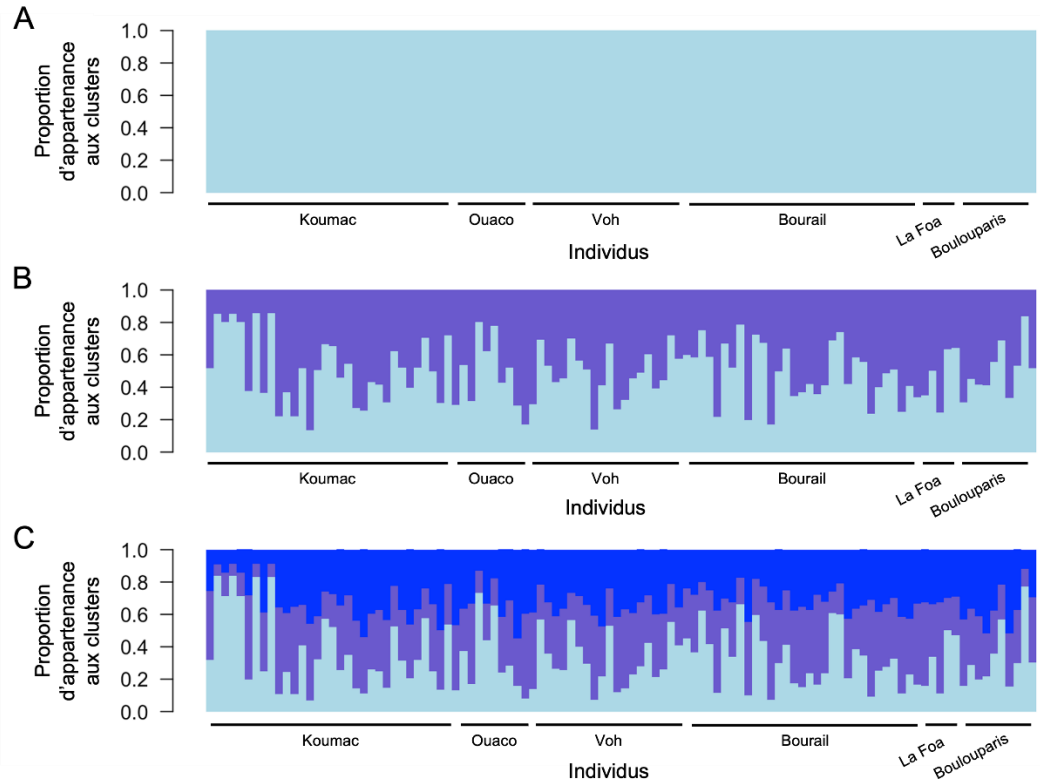

Figure 7 : Probabilité d'appartenance de chaque individu à chaque cluster génétique pour un nombre de potentiels clusters de K = 1 (A), K = 2 (B) et K = 3 (C) à partir de l'analyse des marqueurs microsatellites.

IV . CONCLUSIONS

Les différentes analyses de données effectuées sur les perroquets à bosse de Nouvelle-Calédonie collectés et génétiquement analysés dans notre étude n'ont pas mis en évidence de différentiation génétique significative entre les échantillons issus des différentes localités. L'absence de différentiation n'est pas liée au type de marqueurs utilisés puisque les perroquets à bosse analysés en Nouvelle-Calédonie sont apparus nettement différentiés de ceux des iles Salomon. Notre étude suggère donc que les perroquets à bosse de Nouvelle-Calédonie analysés dans la présente étude appartiennent à une seule et unique population, et donc à un seul stock génétique. Notre recommandation est donc de prendre en compte cette unité du pool génétique des perroquets à bosse de Nouvelle-Calédonie collectés sur la côte Ouest entre Koumac et Boulouparis lors de la mise en place éventuelle de mesures de protection et de conservation de l'espèce à l'échelle locale.

Nos résultats ont mis en évidence que la population de Nouvelle-Calédonie est cependant très différente génétiquement de la population des Iles Salomon, ce qui suggère qu'elle ne reçoit pas de larves issues des iles Salomon.

Les perspectives de ce travail sont d'étendre ces analyses à des perroquets à bosse issus d'autres récifs de la Nouvelle-Calédonie non analysés dans notre étude (côte est de la Grande Terre, Ile des Pins et Iles Loyauté) afin de vérifier l'unité génétique à l'échelle du Territoire, ainsi qu'à l'échelle de la Mer de Corail (en étudiant les poissons des récifs d'Entrecasteaux, des plateaux des Chesterfield et des Bellona, et des Iles Walpole, Matthew et Hunter) pour évaluer l'étendue géographique du stock présent en Nouvelle-Calédonie et estimer les connections avec d'éventuels stocks différents qui pourraient être présents à l'échelle de la Mer de Corail.

V . LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Localisation des sites d'échantillonnage des perroquets à bosse en Nouvelle-Calédonie, représentés par des cercles dont la taille est proportionnelle au nombre d'individus échantillonnés.

Figure 2 : représentation schématique de trois allèles du même locus microsatellite mais de tailles différentes (ici avec un motif dinucléotidique CA répété en tandem). Les fragments sont amplifiés grâce à des amorces Forward (F) et Reverse (R) qui viennent s'hybrider, par complémentarité, de chaque côté de la partie à amplifier, dans les régions flanquantes de la séquence microsatellite.

Figure 3 : Représentation schématique des 29 loci microsatellites qui ont été amplifiés pour chaque individu de l'espèce *Bolbometopon muricatum* dans chacune des quatre réactions de PCR Multiplex (A, B, C et D), en fonction de leur fluorochrome et de leur gamme de taille attendue (Priest et al. 2015).

Figure 4 : Exemple de chromatogramme représentant les pics de fluorescences (variables en intensité) obtenus en fonction de la taille des fragments (en paires de bases nucléotidiques). Chaque pic correspond à un allèle d'un locus microsatellite amplifiés (ici on peut voir 2 locus de couleur noir avec chacun 2 allèles, et 1 locus vert, 1 locus bleu et 1 locus rouge avec chacun avec 2 allèles amplifiés).

Figure 5 : Probabilité d'appartenance individuelles à chaque cluster génétique pour un nombre de potentiels clusters de K = 2 basée sur l'analyse des marqueurs microsatellites des populations de perroquets à bosse de Nouvelle-Calédonie et des Îles Salomon.

Figure 6 : Analyse factorielle des correspondances (AFC) réalisée sur les données de génotypages à 29 marqueurs microsatellites. Chaque site d'échantillonnage est représenté par une couleur différente.

Figure 7 : Probabilité d'appartenance de chaque individu à chaque cluster génétique pour un nombre de potentiels clusters de K = 1 (A), K = 2 (B) et K = 3 (C) à partir de l'analyse des marqueurs microsatellites.

Tableau 1 : Différenciation génétique des sous-populations putatives de perroquets à bosse de Nouvelle-Calédonie. Les valeurs de l'indice de F_{ST} estimées entre populations deux à deux sont présentées dans la moitié inférieure du tableau. Les p-values associées à chaque valeur et traduisant leur significativité sont présentées dans la partie supérieure du tableau.

Tableau supplémentaire S1 : Diversité génétique des perroquets à bosse de Nouvelle-Calédonie par sites de d'échantillonnage pour chaque locus microsatellites analysé. N : taille de l'échantillon ; H exp.: Hétérozygotie attendue selon l'équilibre d'Hardy-Weinberg ; H obs. : hétérozygotie observée, F_{IS}: estimateur du coefficient de consanguinité. Les cases surlignées indiquent un écart significatif entre les valeurs observées et attendues.

VI . RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aswani, S. & Hamilton, R.J. (2004). Integrating indigenous ecological knowledge and customary sea tenure with marine and social science for conservation of bumphead parrotfish (*Bolbometopon muricatum*) in the Roviana Lagoon, Solomon Islands. *Environmental Conservation*, 31(1), 69–83. https://doi.org/10.1017/S037689290400116X

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. (1996). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Bellwood, D.R. & Choat, J.H. (2011). Dangerous demographics: the lack of juvenile humphead parrotfishes *Bolbometopon muricatum* on the Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, 30(2), 549–554. https://doi.org/10.1007/s00338-011-0738-2

Bellwood, D.R., Hoey, A.S. & Choat, J.H. (2003). Limited functional redundancy in high diversity systems: resilience and ecosystem function on coral reefs. *Ecology Letters*, 6(4), 281–285. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00432.x

Chapuis, M.P. & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol*, 24(3), 621–31. https://doi.org/10.1093/molbev/msl191

Dulvy, N.K. & Polunin, N.V.C. (2004). Using informal knowledge to infer human-induced rarity of a conspicuous reef fish. *Animal Conservation*, 7(4), 365–374. https://doi.org/10.1017/S1367943004001519

Estoup, A., Jarne, P. & Cornuet, J.-M. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11(9), 1591–1604. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01576.x

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574–578. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x

Hamilton, R.J. & Choat, J.H. (2012). Bumphead Parrotfish: *Bolbometopon muricatum*. In: Sadovy de Mitcheson Y, & , Colin PL (eds). Springer: Dordrecht, Netherlands, pp. 490–496.

Hamilton, S.L., Regetz, J. & Warner, R.R. (2008). Postsettlement survival linked to larval life in a marine fish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(5), 1561–6. https://doi.org/10.1073/pnas.0707676105

Jakobsson, M. & Rosenberg, N.A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801–6. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233

Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129

van Loon, E.E., Cleary, D.F.R. & Fauvelot, C. (2007). ARES: software to compare allelic richness between uneven samples. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 579–582. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01705.x

Priest, M.A., Almany, G.R., Braun, C.D., Hamilton, R.J., Lozano-Cortés, D.F., Saenz-Agudelo, P., et al. (2015). Isolation and characterization of 29 microsatellite markers for the bumphead parrotfish, *Bolbometopon muricatum*, and cross amplification in 12 related species. *Marine Biodiversity*, 45(4), 861–866. https://doi.org/10.1007/s12526-014-0278-4

Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959. https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945

Raymond, M. & Rousset, F. (1995). GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3), 248–249. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573

Taylor, B. M., Hamilton, R. J., Almany, G. R., & Choat, J. H. (2018). The world's largest parrotfish has slow growth and a complex reproductive ecology. Coral Reefs, 37(4), 1197–1208. https://doi.org/10.1007/s00338-018-1723-9

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P. (2004). micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358–1370. https://doi.org/10.2307/2408641

VII . ANNEXES

Tableau supplémentaire S1 : Diversité génétique des perroquets à bosse de Nouvelle-Calédonie par sites de d'échantillonnage pour chaque locus microsatellites analysé. N : taille de l'échantillon ; H exp.: Hétérozygotie attendue selon l'équilibre d'Hardy-Weinberg ; H obs. : hétérozygotie observée, F_{IS}: estimateur du coefficient de consanguinité. Les cases surlignées indiquent un écart significatif entre les valeurs observées et attendues.

	Population	Koumac	Ouaco	Bourail	La Foa	Boulouparis	Voh	Nouvelle-Calédonie
	N	32	10	31	5	11	19	108
Bm42	H exp.	0,4225	0.2650	0.4150	0.5400	0.3642	0.4460	0.4171
	H obs.	0.4194	0.3000	0.3333	0.4000	0.2222	0.5000	0.3800
	Fis	0.0238	-0.0800	0.2148	0.3600	0.4386	-0.0929	0.0939
Bm72	H exp.	0.1738	0.2550	0.1223	0.1800	0.0868	0.1925	0.1630
	H obs.	0.1875	0.3000	0.1290	0.2000	0.0909	0.2105	0.1759
	Fis	-0.0629	-0.1250	-0.0390	NA	NA	-0.0667	-0.0745
Bm43	H exp.	0.3750	0.4200	0.4121	0.0000	0.2355	0.4778	0.3928
	H obs.	0.5000	0.4000	0.3871	0.0000	0.2727	0.6842	0.4444
	Fis	-0.3191	0.1000	0.0769	NA	-0.1111	-0.4096	-0.1268
Bm75	H exp.	0.5791	0.6250	0.6067	0.3200	0.5124	0.5928	0.5885
	H obs.	0.4688	0.8000	0.6774	0.4000	0.7273	0.5789	0.6019
	Fis	0.2058	-0.2308	-0.1004	-0.1429	-0.3793	0.0504	-0.0180
Bm105	H exp.	0.2637	0.1800	0.2482	0.1800	0.0868	0.3006	0.2392
	H obs.	0.1875	0.2000	0.2903	0.2000	0.0909	0.3684	0.2407
	Fis	0.3034	-0.0588	-0.1538	NA	NA	-0.2000	-0.0018
Bm20	H exp.	0.6519	0.3350	0.6639	0.3200	0.5950	0.5665	0.6387
	H obs.	0.5625	0.4000	0.8065	0.4000	0.5455	0.6316	0.6204
	Fis	0.1526	-0.1429	-0.1990	-0.1429	0.1304	-0.0882	0.0334
Bm37	H exp.	0.4175	0.1850	0.4480	0.4800	0.4339	0.4654	0.4308
	H obs.	0.5313	0.2000	0.4839	0.4000	0.2727	0.3158	0.4167
	Fis	-0.2578	-0.0286	-0.0638	0.2727	0.4118	0.3455	0.0374
Bm29	H exp.	0.3179	0.3750	0.4344	0.1800	0.3099	0.4474	0.3828
	H obs.	0.3125	0.3000	0.3871	0.2000	0.2727	0.6316	0.3796
	Fis	0.0328	0.2500	0.1252	NA	0.1667	-0.3891	0.0129
Bm98	H exp.	0.0308	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0092
	H obs.	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0093
	Fis	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Bm88	H exp.	0.5493	0.6400	0.4537	0.1800	0.4339	0.4654	0.4977
	H obs.	0.6563	0.2000	0.4839	0.2000	0.3636	0.4211	0.4722
	Fis	-0.1793	0.7143	-0.0502	NA	0.2079	0.1220	0.0559
Bm14	H exp.	0.6356	0.6100	0.6294	0.5800	0.5547	0.6385	0.6304
	H obs.	0.6207	0.6000	0.7000	0.6000	0.7500	0.7368	0.6733
	Fis	0.0409	0.0690	-0.0953	0.0769	-0.2923	-0.1275	-0.0631

	Population	Koumac	Ouaco	Bourail	La Foa	Boulouparis	Voh	Nouvelle-Calédonie
	N	32	10	31	5	11	19	108
Bm118	H exp.	0.7627	0.7400	0.7700	0.6600	0.7562	0.7546	0.7729
	H obs.	0.7813	0.9000	0.7419	0.8000	0.9091	0.7778	0.7944
	Fis	-0.0085	-0.1655	0.0528	-0.1034	-0.1561	-0.0021	-0.0232
Bm8	H exp.	0.6948	0.6950	0.6686	0.6200	0.6488	0.6991	0.6891
	H obs.	0.7188	0.6000	0.7097	1.0000	0.3636	0.7778	0.6916
	Fis	-0.0186	0.1880	-0.0451	-0.5385	0.4771	-0.0843	0.0011
Bm108	H exp.	0.4043	0.4550	0.3980	0.4200	0.3967	0.4114	0.4093
	H obs.	0.4375	0.3000	0.2903	0.6000	0.3636	0.3684	0.3704
	Fis	-0.0663	0.3864	0.2857	-0.3333	0.1304	0.1310	0.0997
Bm32	H exp.	0.1440	0.1800	0.1800	0.0000	0.2355	0.1454	0.1618
	H obs.	0.1563	0.2000	0.1333	0.0000	0.2727	0.1579	0.1589
	Fis	-0.0690	-0.0588	0.2750	NA	-0.1111	-0.0588	0.0228
Bm45	H exp.	0.4968	0.4898	0.4770	0.5000	0.5000	0.4770	0.4938
	H obs.	0.2800	0.2857	0.4286	0.6000	0.2727	0.5000	0.3778
	Fis	0.4528	0.4783	0.1196	-0.0909	0.4915	-0.0111	0.2403
Bm109	H exp.	0.2935	0.3642	0.2622	0.4200	0.2355	0.1884	0.2756
	H obs.	0.2188	0.2222	0.1724	0.6000	0.2727	0.1053	0.2095
	Fis	0.2694	0.4386	0.3578	-0.3333	-0.1111	0.4627	0.2443
Bm17	H exp.	0.4995	0.4938	0.4786	0.5000	0.5000	0.4972	0.4997
	H obs.	0.4063	0.4444	0.4483	0.6000	0.2727	0.6316	0.4571
	Fis	0.2020	0.1579	0.0808	-0.0909	0.4915	-0.2450	0.0900
Bm25	H exp.	0.2188	0.2650	0.2828	0.0000	0.2975	0.1482	0.2307
	H obs.	0.1250	0.3000	0.3333	0.0000	0.1818	0.1579	0.2056
	Fis	0.4414	-0.0800	-0.1623	NA	0.4286	-0.0385	0.1135
Bm76	H exp.	0.5578	0.4753	0.5048	0.6250	0.2778	0.4244	0.5138
	H obs.	0.4839	0.7778	0.5172	1.0000	0.3333	0.5000	0.5326
	Fis	0.1485	-0.6000	-0.0072	-0.3333	NA	-0.1504	-0.0312
Bm87	H exp.	0.6890	0.6914	0.6831	0.3400	0.7066	0.6607	0.6848
	H obs.	0.6875	0.7778	0.7241	0.4000	0.7273	0.5263	0.6667
	Fis	0.0180	-0.0667	-0.0426	-0.0667	0.0184	0.2291	0.0313
Bm54	H exp.	0.1440	0.1049	0.0981	0.0000	0.0000	0.1925	0.1167
	H obs.	0.1563	0.1111	0.1034	0.0000	0.0000	0.2105	0.1238
	Fis	-0.0700	NA	-0.0377	NA	NA	-0.0327	-0.0563
Bm120	H exp.	0.7627	0.6850	0.6805	0.6800	0.6901	0.6898	0.7333
	H obs.	0.6875	0.5000	0.6452	0.8000	0.5455	0.7222	0.6542
	Fis	0.1143	0.3182	0.0683	-0.0667	0.2547	-0.0184	0.1124
Bm81	H exp.	0.5913	0.6600	0.5588	0.4200	0.6488	0.5762	0.5925
	H obs.	0.5938	0.7000	0.4516	0.6000	0.6364	0.8421	0.6111
	Fis	0.0117	-0.0080	0.2075	-0.3333	0.0667	-0.4400	-0.0268

	Population	Koumac	Ouaco	Bourail	La Foa	Boulouparis	Voh	Nouvelle-Calédonie
	N	32	10	31	5	11	19	108
Bm110	H exp.	0.1997	0.2550	0.3559	0.5800	0.2355	0.4363	0.3283
	H obs.	0.2188	0.3000	0.3871	0.2000	0.2727	0.4211	0.3148
	Fis	-0.0796	-0.1250	-0.0714	0.7143	-0.1111	0.0619	0.0458
Bm116	H exp.	0.6338	0.4600	0.6436	0.6600	0.6860	0.6427	0.6422
	H obs.	0.5938	0.6000	0.6774	0.6000	0.6364	0.6842	0.6389
	Fis	0.0790	-0.2558	-0.0362	0.2000	0.1195	-0.0377	0.0099
Bm112	H exp.	0.4604	0.4750	0.3950	0.5400	0.3967	0.5087	0.4544
	H obs.	0.4688	0.5000	0.4333	0.8000	0.5455	0.6471	0.5143
	Fis	-0.0022	-0.0000	-0.0802	-0.3913	-0.3333	-0.2438	-0.1271
Bm119	H exp.	0.7018	0.3750	0.7266	0.0000	0.2778	0.6598	0.7393
	H obs.	0.4762	0.5000	0.3529	0.0000	0.3333	0.3846	0.4035
	Fis	0.3432	NA	0.5362	NA	NA	0.4495	0.4612
Bm79	H exp.	0.2974	0.1800	0.2347	0.1800	0.1694	0.2784	0.2505
	H obs.	0.3438	0.2000	0.2581	0.2000	0.1818	0.3158	0.2778
	Fis	-0.1405	-0.0588	-0.0835	NA	-0.0256	-0.1077	-0.1042
Tous les loci	H exp.	0.4472	0.4115	0.4425	0.3484	0.3887	0.4477	0.4476
	H obs.	0.4245	0.4110	0.4306	0.4069	0.3700	0.4762	0.4282
	Fis	0.06748	0.06459	0.04484	-0.04889	0.10328	-0.03482	0.04838