



HAL
open science

Apports de l'analyse de l'ADN environnemental et de la génomique du paysage pour la conservation des requins de récif

Germain Boussarie

► **To cite this version:**

Germain Boussarie. Apports de l'analyse de l'ADN environnemental et de la génomique du paysage pour la conservation des requins de récif. Ecologie, Environnement. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTG014 . tel-02494204

HAL Id: tel-02494204

<https://theses.hal.science/tel-02494204v1>

Submitted on 28 Feb 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Écologie des Communautés

École doctorale GAIA

Unités de recherche UMR MARBEC & UMR ENTROPIE

APPORTS DE L'ANALYSE DE L'ADN ENVIRONNEMENTAL ET DE LA GÉNOMIQUE DU PAYSAGE POUR LA CONSERVATION DES REQUINS DE RÉCIF

Présentée par Germain BOUSSARIE

Le 12 avril 2019

Sous la direction de David MOUILLOT et Laurent VIGLIOLA

Devant le jury composé de

Michel KULBICKI, Directeur de recherche émérite IRD, Perpignan

Philippe LENFANT, Professeur des universités, Perpignan

Claude MIAUD, Directeur d'études EPHE, Montpellier

David MOUILLOT, Professeur des universités, Montpellier

Frédérique VIARD, Directrice de recherche CNRS, Roscoff

Laurent VIGLIOLA, Chargé de Recherche IRD, Nouméa

Examineur

Rapporteur

Examineur, Président du jury

Directeur de thèse

Rapporteur

Co-encadrant



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

APPORTS DE L'ANALYSE DE L'ADN ENVIRONNEMENTAL ET DE LA GÉNOMIQUE DU PAYSAGE POUR LA CONSERVATION DES REQUINS DE RÉCIF



© Matthieu Juncker

Germain Boussarie

Thèse présentée le 12 avril 2019

Sous la direction de David Mouillot et Laurent Vigliola



Résumé : Les requins forment un des groupes de prédateurs les plus diversifiés, jouant des rôles importants au sein des écosystèmes marins. Ils forment également l'un des groupes les plus menacés car vulnérables aux pressions anthropiques du fait de leurs traits de vie particuliers. Leurs populations s'effondrent, avec des chutes d'abondance drastiques dans tous les écosystèmes, et même des espèces relativement communes sont quasi-menacées. Malgré l'importance des ressources déployées pour le suivi des populations de requins, 41% des 482 espèces recensées dans la Liste Rouge de l'UICN n'ont pas de statut de conservation par manque de données. Il devient donc primordial d'améliorer les connaissances sur ces espèces afin de les protéger et enrayer leur déclin. Il s'agit notamment de mieux caractériser la présence, la structure et la connectivité des populations de requins pour mieux définir leur statut UICN, les zones prioritaires de gestion et optimiser les efforts de conservation mis en place. Cette thèse s'appuie sur l'émergence de nouvelles technologies pour combler les lacunes de connaissances sur les requins des récifs coralliens tropicaux et proposer des actions de gestion.

D'une part, une méthode d'analyse des communautés de requins par collecte et séquençage d'ADN présent dans l'environnement (métabarcoding d'ADN environnemental ; ADNe) a été développée au cours de cette thèse, puis mise en parallèle avec des suivis exhaustifs par des méthodes traditionnelles d'étude des populations de requins. Cette approche rapide et non-invasive a permis d'identifier 21 espèces de requins dans les eaux de deux domaines biogéographiques distincts (Caraïbes et Nouvelle-Calédonie). De plus, les patrons de diversité et d'abondance des fragments d'ADNe détectés coïncident avec les gradients de pression anthropique et les niveaux de protection des zones échantillonnées. L'analyse de 22 échantillons d'ADNe dans l'archipel de la Nouvelle-Calédonie a permis de déceler la présence de plus d'espèces que par 2 758 plongées scientifiques réparties sur presque 30 ans et 385 caméras appâtées déployées pendant deux ans, et ce, à la fois proche de l'homme et dans les récifs éloignés.

D'autre part, la structure et connectivité des populations d'une espèce plus commune, *Carcharhinus amblyrhynchos*, ont été caractérisées par une approche de génomique du paysage. Cette thèse s'appuie sur un échantillonnage génétique conséquent en Nouvelle-Calédonie et dans plusieurs autres sites de l'Indo-Pacifique (515 requins). Une approche d'isolement par la résistance via la théorie des circuits a été développée afin de caractériser les paramètres influençant la dispersion de cette espèce. Ainsi, il a été montré que les zones de forte bathymétrie constituent une forte barrière à la dispersion tandis que la proximité à l'habitat récifal en est un facilitateur. La modélisation de la différenciation génétique à haute résolution et à l'échelle de l'aire de répartition de cette espèce (Indo-Pacifique) a permis de définir des unités de conservation hiérarchiques et un nombre important de sites isolés. Enfin, une approche intégrant le déclin des abondances dans les zones anthropisées a montré une fragmentation des populations de *C. amblyrhynchos* et a permis d'identifier certains récifs éloignés de l'homme comme refuges mais aussi sources pour un repeuplement éventuel des récifs où les populations sont menacées.

Cette thèse démontre ainsi le potentiel de l'analyse de l'ADNe pour dévoiler la présence d'espèces rares et furtives telles que les requins, donnant espoir pour combler les lacunes dans leurs statuts de conservation UICN. Elle révèle également la persistance des populations résiduelles en milieu anthropisé, qui pourraient éventuellement montrer des altérations comportementales comme l'utilisation d'habitats plus profonds ou une nocturnité plus importante. Elle décrit enfin non seulement la structure fine à grande échelle des populations d'une espèce quasi-menacée, mais identifie également des unités de conservation et des zones prioritaires à protéger pour une spatialisation des mesures de gestion à différentes échelles.

Mots-clés : requins, génomique du paysage, ADN environnemental, récifs coralliens, écologie, conservation.

Abstract: Sharks represent one of the most diverse groups of predators, playing important functional roles in coastal and oceanic ecosystems. They are also one of the most threatened groups because of their vulnerability to anthropogenic pressures due to their particular life history traits. Shark populations are therefore collapsing with drastic decrease in abundance in all marine ecosystems. Even relatively common species are near-threatened. Despite the deployment of important resources for shark population assessments, 41% of the 482 shark species on the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened Species lack a conservation status due to data deficiency. Improving our knowledge on such species is thus crucial for efficient protection to slow down their decline. More particularly, there is a necessity for a better characterization of presence, structure and connectivity of shark populations to define their conservation status, prioritize spatial management and optimize conservation efforts. This thesis relies on the emergence of new technologies to fill knowledge gaps on tropical coral reef sharks and to suggest conservation measures for better management.

First, a method to survey shark communities has been developed during this thesis, based on the collection and sequencing of DNA present in the environment (environmental DNA metabarcoding; eDNA). Then, this method has been compared to exhaustive surveys of reef shark communities with traditional methods. This quick and non-invasive approach detected at least 21 shark species in waters of two distinct biogeographical areas (Caribbean and New Caledonia). Moreover, diversity and abundance patterns of DNA reads match with anthropogenic impact gradients and protected status of the sampled areas. The analysis of 22 eDNA samples detected more species in both remote reefs and impacted areas of the New Caledonian archipelago than 2758 scientific dives conducted during nearly 30 years and 385 baited remote underwater videos deployed over two years.

Then, population structure and connectivity of a more common reef shark species, *Carcharhinus amblyrhynchos*, have been characterized using a seascape genomics approach. This thesis is based on a substantial genetic sampling in the archipelago of New Caledonia but also in several other sites in the Indo-Pacific (515 sharks in total). An isolation-by-resistance approach using circuit theory has been developed to explore what parameters are driving the genetic differentiation of *C. amblyrhynchos*. Here I show that deep oceanic areas act as strong barriers and proximity to habitat is a facilitator for dispersal. High-resolution modelling of genetic differentiation at the entire distribution range of the species (Indo-Pacific) led to the definition of hierarchical conservation units and a high number of isolated sites. Then, an approach taking into account the decline of abundance in impacted reefs showed an important fragmentation of shark populations and allowed the identification of remote reefs as refuges but also sources through dispersal towards impacted areas, insuring population persistence at a regional scale.

This thesis demonstrates the potential of eDNA analysis for unveiling the presence of rare and elusive species such as sharks and for filling knowledge gaps in the conservation status of sharks. It also reveals the persistence of residual populations in impacted areas, that could show behavioral alterations like shifts in habitat use towards deeper waters or increased nocturnality. Finally, this thesis not only describes the population structure of a near-threatened species at high resolution and global scale, but also identifies conservation units and areas of high conservation priority that could help in the near future for the spatialization of marine management at multiple scales.

Keywords: sharks, seascape genomics, environmental DNA, coral reefs, ecology, conservation.

REMERCIEMENTS

À mon grand-père, vétérinaire et chercheur en ichtyopathologie, grand amoureux et défenseur de la nature, qui m'a transmis sa passion du monde vivant dès mon plus jeune âge et qui, j'en suis certain, aurait tant donné pour me voir arriver au bout de cette aventure.

Je tiens particulièrement à remercier Laurent Vigliola qui m'avait déjà fait confiance à plusieurs reprises lors de mes stages de Master et qui a réitéré cette confiance en m'accompagnant quotidiennement tout au long de ce parcours et dans les moments de doute. Merci de m'avoir offert l'opportunité d'explorer des sites parmi les plus vierges au monde au cours des différentes missions océanographiques, merci de m'avoir appris les ficelles du métier, notamment lors des missions embarquées. Merci pour les échanges scientifiques souvent corsés mais d'autant plus enrichissants. Enfin, merci pour cette météo en mer, les missions *Vigliola* sont passées dans le langage courant sur l'Amborella.

Un grand merci également à David Mouillot pour sa confiance et son aide précieuse malgré 17000 kilomètres nous séparant, pour son apport indispensable pour relever la tête et prendre du recul, et pour sa disponibilité lors de mon séjour à Montpellier. Il a su me pousser toujours plus loin, jusqu'aux derniers instants de la réalisation de cette thèse, et il a, avec Laurent, accepté et guidé mes choix, parfois difficiles, et à des moments clés de cette thèse. Merci à David et Laurent de m'avoir inclus dans les discussions dès les prémices de la réalisation de ce projet.

Ami, collègue de bureau, compagnon de galère, pêcheur de renom, MERCI à Lucas Bonnin qui aura pimenté cette aventure de nombre d'anecdotes et de moments partagés. Plus de 400 requins capturés ensemble, plus de 120 jours en mer, ô combien de coups de palme/pagaie/stress/pêche/blues, de soirs et de weekends partagés et passés à travailler dans l'atmosphère conviviale du bureau 60.

Professionnalisme, convivialité, partage, complémentarité, soutien, efficacité, solidarité, sont autant de mots qui viennent à l'esprit pour parler de l'équipage de l'Amborella. Leur connaissance de la mer et de la pêche, l'ambiance à bord, et les excellents repas familiaux ont été d'un soutien important au cours de ces longues journées en mission, fatigantes psychologiquement et physiquement. Cette thèse aurait eu une toute autre dimension sans eux. Merci infiniment à Napo (Napoléon Colombani), Manu (Manuel Consigny), Tof (Christophe Desgrippes), Guitou (Guy Hnaije), Philou (Philippe Simoni) et Niko (Nikotimo Vuki).

J'aimerais également remercier : William Robbins pour son enseignement à la capture et la manipulation des requins, son aide précieuse et sa bonne humeur tout au long de cette aventure ; Jérémy Kiszka pour son enseignement, sa confiance, ses conseils avisés, et son ouverture scientifique ; Jean-François Cornu pour son aide indispensable à la réalisation des nombreux scripts pour la réalisation de cette thèse ; Judith

Bakker et Stefano Mariani pour m'avoir impliqué et fait confiance dans ce projet eDNA ; Paolo Momigliano pour son aide constante et indispensable en génomique, sans qui ce travail n'aurait pas abouti en si peu de temps ; Stéphanie Manel pour son implications au sein de cette thèse et les nombreuses discussions enrichissantes en génomique du paysage ; Pierre-Édouard Guérin pour son aide sur les scripts de filtration des SNPs ; Kirk Gastrich et Phil Matich pour m'avoir enseigné avec Will la capture des requins et les différents prélèvements, et pour avoir enduré sans fléchir cette première mission dans de rudes conditions ; Fabrice Jaine pour le partage d'expérience, sa patience et pour m'avoir beaucoup appris sur la technique de caméra embarquée ; l'équipe des moyens navigants de l'IRD, Miguel Clarke, Samuel Tereua et Philippe Naudin ; Gérard Mou-Tham pour avoir partagé sa passion des poissons et pour son aide et sa patience lors de la capture des requins dans la zone de Nouméa et Merlet ; Cécile Fauvelot, Laurent Millet et Anne Lorrain pour leur aide en laboratoire ; David Gillikin et son équipe pour le traitement des échantillons d'isotopes stables ; Paco Bustamante, Maud Brault Favrou et Carine Churlaud pour leur accueil et leur aide à La Rochelle pour les analyses de mercure ; Jérôme Lefèvre, Corina Iovan et Éric Mermet pour leur aide ponctuelle mais salvatrice en SIG et pour la réalisation de calculs sur cluster ; Bastien Preuss pour son aide en mission et les nombreuses photographies illustrant cette thèse ; Matthieu Juncker pour ses conseils et le partage de ses photographies dont celle de couverture ; Florian Baletaud, Tom Biscéré, Mark Bond, Bertrand Bourgeois, Julie Buttin, Florent Cadé, Éric Folcher, Jean-Baptiste Juhel, Gilbert Sarrailh, et autres volontaires ayant donné un coup de main sur le terrain.

Enfin, merci au soutien quotidien des amis et collègues sur le Caillou et à Montpellier. Merci à mes parents qui m'ont soutenu et accompagné dans les pires moments. À Julie qui éclaire mon quotidien.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans le soutien de la Fondation Total, le Pew Charitable Trust, le Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie, et l'Agence Nationale de la Recherche pour le financement des projets APEX et REEFISH. Enfin, la bourse de thèse ayant soutenu mes travaux est issue d'un financement de l'École Normale Supérieure de Lyon.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	9
TABLE DES MATIÈRES	11
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
1. LES RÉCIFS CORALLIENS TROPICAUX	15
1.1. Importance globale des écosystèmes coralliens.....	15
1.2. Typologie des récifs coralliens	16
2. LES REQUINS ASSOCIÉS AUX RÉCIFS CORALLIENS	18
2.1. Origine	18
2.2. Diversité taxonomique.....	19
2.3. Diversité des traits d’histoire de vie	21
2.4. Le requin gris de récif, <i>Carcharhinus amblyrhynchos</i>	22
2.5. Le requin à pointes blanches de récif, <i>Carcharhinus albimarginatus</i>	24
2.6. Rôles des requins de récif pour les écosystèmes coralliens	26
3. MENACES, STATUT ET MESURES DE PROTECTION	28
3.1. Déclin global des requins.....	28
3.2. Destruction des habitats et chute de la disponibilité en proies	28
3.3. Liste Rouge de l’Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) pour les Élasmobranches	29
3.4. Aires protégées pour les requins : une solution efficace ?.....	30
4. LIMITES ACTUELLES ET PROBLÉMATIQUE.....	32
5. OBJECTIFS ET STRUCTURATION DES CHAPITRES.....	36
CHAPITRE 1 – MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE & TRAVAIL DE TERRAIN.....	39
1. LE CAS DE L’ARCHIPEL DE NOUVELLE-CALÉDONIE.....	39
1.1. Présentation.....	39
1.2. Récifs coralliens éloignés et Parc Naturel de la Mer de Corail	41
1.3. Contexte scientifique sur les requins de Nouvelle-Calédonie	45
2. CAMPAGNES OCÉANOGRAPHIQUES	46
2.1. Contexte et challenges	46
2.2. Planning et objectif de chaque mission	48
3. MANIPULATION DES REQUINS ET APERÇU DE L’ÉCHANTILLONNAGE	51
3.1. Matériel et méthode de pêche	51
3.2. Capture et manipulation.....	53

3.3.	Mesure et sexage de l'individu	55
3.4.	Résumé des prélèvements	56
3.5.	Prélèvement génétique	57
3.6.	Prélèvement pour analyse des isotopes stables et du mercure	57
3.7.	Marquage acoustique	58
3.8.	Échantillonnage du microbiome	59
3.9.	Vidéo embarquée ('animal-borne')	60
3.10.	Éthique et impact potentiel de la capture et du marquage	60
4.	BILAN DE L'ÉCHANTILLONNAGE RÉALISÉ	63

CHAPITRE 2 – VERS DE NOUVELLES MÉTHODES D'ÉTUDE DES COMMUNAUTÉS DE REQUINS..... 67

1.	INTRODUCTION	67
1.1.	L'ADN environnemental (ADNe)	67
1.2.	Approche ciblée ou métabarcoding	68
1.3.	L'ADN environnemental dans le cadre de la conservation des requins	69
1.4.	Plan d'échantillonnage.....	69
1.5.	Sur le terrain	70
1.6.	Prétraitement en laboratoire.....	71
1.7.	Participation personnelle à ce travail	72
2.	ARTICLE 1 - <i>Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact</i>	73

CHAPITRE 3 – L'ADN ENVIRONNEMENTAL : UNE NOUVELLE LUMIÈRE POUR LA CONSERVATION DES REQUINS ?..... 89

1.	INTRODUCTION	89
2.	ARTICLE 2 - <i>Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks</i>	90
3.	SYNTHÈSE	103

CHAPITRE 4 – GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DU REQUIN GRIS DE RÉCIF, *Carcharhinus amblyrhynchos* 109

1.	INTRODUCTION	109
1.1.	Échantillonnage génétique.....	109
1.2.	Contexte et collaborations	110
2.	EXTRACTION DE L'ADN	111
2.1.	Méthode d'extraction	111
2.2.	Contrôle qualité	112
3.	ANALYSE DE L'ADN MITOCHONDRIAL	114
3.1.	Méthodologie.....	114
3.2.	Résultats.....	115

4.	MARQUEURS DE NOUVELLE GÉNÉRATION (SNP)	117
4.1.	De la génétique à la génomique.....	117
4.2.	DARTseq et appel des SNPs.....	118
4.3.	Filtration des SNPs.....	119
4.4.	Test de détection des SNPs déviants.....	120
4.5.	Premières analyses.....	120
5.	CONCLUSION	126
CHAPITRE 5 – GÉNOMIQUE DU PAYSAGE : DÉLIMITATION HIÉRARCHIQUE D’UNITÉS DE CONSERVATION		
		129
1.	INTRODUCTION	129
1.1.	Objectifs du chapitre.....	129
1.2.	Relier les données génétiques aux données de paysage.....	130
2.	LA THÉORIE DES CIRCUITS POUR MODÉLISER LA CONNECTIVITÉ	132
2.1.	Contexte dans le domaine de la conservation en milieu marin.....	132
2.2.	Principe général et application – cf. Annexe 2.....	133
2.3.	Création des cartes de résistance – cf. Annexe 2.....	133
2.4.	Lancement des calculs de CT via GFLOW – cf. Annexe 2.....	133
3.	OPTIMISATION DES MODÈLES ÉTAPE-PAR-ÉTAPE	134
3.1.	D’un modèle simple à un modèle réaliste.....	134
3.2.	Procédure d’optimisation.....	135
3.3.	Paramétrisation des hypothèses.....	137
4.	DÉLIMITATION D’UNITÉS HIÉRARCHIQUES DE CONSERVATION	141
4.1.	Unités de conservation (CUs).....	141
4.2.	Sélection des sites.....	142
4.3.	Lancement de GFLOW.....	144
4.4.	Délimitation d’unités.....	144
5.	ARTICLE 3 - Seascape genomics reveals isolated sites and hierarchical conservation units of a near threatened shark (<i>Carcharhinus amblyrhynchos</i>) across its entire distribution range.	145
CHAPITRE 6 – CONNECTIVITÉ DES RÉCIFS ÉLOIGNÉS ET IMPLICATIONS POUR LA CONSERVATION DU REQUIN GRIS DE RÉCIF		
		167
1.	INTRODUCTION	167
2.	ARTICLE 4 – Distribution of sources, sinks and refuges for the grey reef shark: implications for the conservation of fragmented populations	169
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		
		179
1.	CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES MAJEURES	181
1.1.	Apport de l’analyse de l’ADN environnemental.....	181
1.2.	Génomique du paysage.....	183

2.	AMÉLIORATION DE LA PROTECTION DES REQUINS DANS L'ARCHIPEL DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE	185
2.1.	Application au contexte local de la Nouvelle-Calédonie.....	185
2.2.	Lutter contre la pêche illégale.....	189
3.	DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE	191
4.	ALLER PLUS LOIN AVEC LES OUTILS DE GÉNOMIQUE.....	195
4.1.	Génomique adaptative	195
4.2.	Connectivité contemporaine	196
4.3.	Taille efficace de population, connectivité historique et démographie	196
5.	MIEUX CONNAÎTRE LES ALTÉRATIONS COMPORTEMENTALES	198
5.1.	Écologie trophique des requins de récif.....	198
5.2.	Comportement individuel des requins de récif.....	200
5.3.	Étudier les habitats plus profonds.....	202
	RÉFÉRENCES.....	205
	ANNEXES	233

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. LES RÉCIFS CORALLIENS TROPICAUX

1.1. Importance globale des écosystèmes coralliens

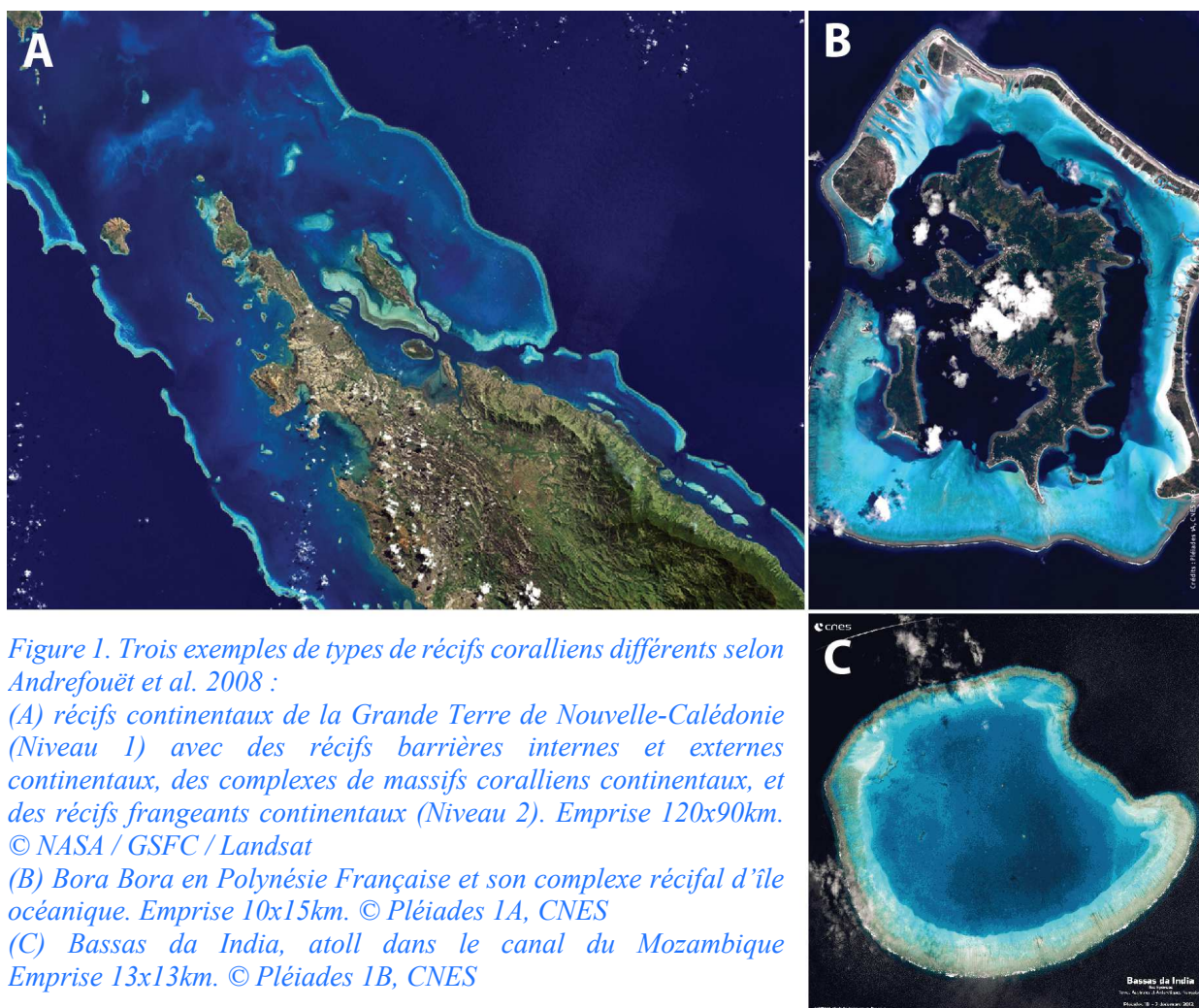
Les récifs coralliens sont souvent appelés les « forêts tropicales » de l’océan. Tout comme pour ces dernières, ils constituent un habitat pour des millions d’espèces (Fisher et al., 2015; Knowlton, 2001). Ils figurent parmi les écosystèmes les plus diversifiés, productifs et complexes sur la planète (Hoegh-Guldberg, 2011; Moberg and Folke, 1999). Bien que les récifs coralliens couvrent moins de 0,1% de la surface des océans (Spalding et al., 2001), ils abritent entre un quart et un tiers de toutes les espèces marines connues (Plaisance et al., 2011), dont plus de 6 000 espèces de poissons (Kulbicki et al., 2013). Plus de 100 pays présentent des récifs coralliens sur leurs côtes (Moberg and Folke, 1999), parmi lesquels certains sont exclusivement constitués d’îles coralliennes ou d’atolls, comme par exemple les Maldives, les Kiribati ou les îles Marshall (Payri and Moatti, 2018). Les récifs coralliens procurent des ressources inestimables pour des centaines de millions de personnes qui en dépendent directement, et parfois exclusivement, pour vivre (Cinner et al., 2009).

Situés aujourd’hui dans la zone tropicale (30° latitude), dans des températures de surface moyennes comprises entre 22 et 29°C (Spalding et al., 2001), les récifs coralliens modernes tirent leur origine de la période du Cambrien (~500Ma). Les premières traces de coexistence avec des poissons remontent au Dévonien, il y a 420 à 359 millions d’années (Bellwood et al., 2015). Depuis, ils créent de nombreuses niches écologiques pour d’autres espèces qui y trouvent nourriture, refuge et protection. Les plus fortes biodiversités marines mondiales se trouvent dans l’Indo-Pacifique central (triangle de corail) et la diversité spécifique mais aussi génétique diminuent avec l’éloignement géographique de l’archipel Indo-Australien (Hughes et al., 2002; Maisano Delser et al., 2018; Plaisance et al., 2011; Ramachandran et al., 2005).

Avec ses collectivités d’outre-mer (dans les Océans Indien, Pacifique et Atlantique), la France se place au 4^e rang mondial en termes de surface corallienne après l’Indonésie, l’Australie et les Philippines. Ses récifs et lagons couvrent 57 557 km² (Andréfouët et al., 2008), soit deux fois la superficie de la Bretagne, dont 90% se trouvent dans l’Océan Pacifique.

1.2. Typologie des récifs coralliens

Bien qu'il n'ait pas été le premier à le faire, Charles Darwin a caractérisé la structure des récifs coralliens en trois classes : les récifs frangeants, de lagon, et de barrière (Darwin, 1837). Andrefouët *et al.* (2008) ont classé de manière précise les récifs coralliens en attribuant différents niveaux de classification géomorphologique (Figure 1). Il y a tout d'abord une distinction entre les récifs continentaux et les récifs océaniques (classification Niveau 1). Seule la Nouvelle-Calédonie dans l'outre-mer français présente des récifs continentaux (Andrefouët *et al.*, 2008).



Ces grands types de récifs coralliens se divisent alors en complexes récifaux (classification Niveau 2) : atolls, bancs, atolls surélevés, îles, massifs coralliens, récifs-barrières, récifs frangeants et structures marginales. Le Niveau 3 de la classification est alors défini en fonction de la géomorphologie, de la position et de la structure de ces récifs (*e.g.* récif-barrière interne, récif-barrière externe, récif-barrière multiple, récif-barrière frangeant), ou encore de leur exposition (*e.g.* récif frangeant océanique, récif frangeant lagonaire).

Certains écosystèmes sont associés aux récifs coralliens au sein des îles océaniques comme par exemple la mangrove ou bien les herbiers. Ils servent d'abris, notamment aux stades juvéniles pour des poissons téléostéens ou des requins (Freitas et al., 2006; Henderson et al., 2010; McMahon et al., 2011; Virly, 2008). Certaines espèces sont alors dépendantes des mangroves présentes uniquement dans certains types géomorphologiques de récifs. Cet exemple illustre le fait que cette diversité géomorphologique des récifs et des habitats associés est à l'origine d'une diversité importante de la faune associée.

Au sein même d'un récif barrière, l'habitat détermine les espèces qui s'y trouvent. Le requin à pointe blanche de lagon (*Triaenodon obesus*) se trouvera principalement sur la partie interne, tandis que le requin à pointe noire (*Carcharhinus melanopterus*) sera observé sur le platier. Le requin gris (*Carcharhinus amblyrhynchos*) sera plutôt présent en pente externe, tandis que le requin à pointe blanche de récif (*Carcharhinus albimarginatus*) sera observé un peu plus au large et dans un habitat plus profond sur cette même pente externe. Les passes de récifs barrières forment également des habitats privilégiés pour certaines espèces de requins.

Cette thèse ciblera principalement les requins de Nouvelle-Calédonie sur l'habitat de front de pente externe des récifs coralliens, de récif barrière externe continental ou de couronne d'atoll.

2. LES REQUINS ASSOCIÉS AUX RÉCIFS CORALLIENS

2.1. Origine

Les requins font partie du groupe des Chondrichthyens, autrement appelés poissons cartilagineux, formant trois grands groupes : les requins modernes, les raies, et les chimères. Les requins modernes et raies constituent le groupe des Néosélaciens, tandis que d'autres groupes fossiles forment avec ces derniers le groupe des Élasmobranches (Cuny and Bénéteau, 2013).

Les Chondrichthyens ont en commun un squelette interne composé exclusivement de cartilage, et les premières traces fossiles de représentants de ce groupe se trouvent dans des roches âgées de 450 millions d'années (Cuny and Bénéteau, 2013), sous la forme de denticules dermiques. Les premières dents de Chondrichthyens ont été découvertes dans des roches du Dévonien inférieur, datant de - 411 millions d'années. Le plus ancien fossile complet (*Ctenacanthus wrightii*, - 380 Ma) montre un animal de 50 à 70 de centimètres de long, qui était à l'époque plus une proie qu'un prédateur supérieur (Figure 2), à la merci des Placodermes pouvant mesurer jusqu'à six mètres de long (e.g. *Dunkleosteus*) (Cuny and Bénéteau, 2013).



Figure 2. Scène de prédation typique du Paléozoïque datant de 370 millions d'années d'un placoderme du genre *Holdenius* (1,5m) sur un Chondrichthyen du genre *Ctenacanthus* (50cm). Le crâne du placoderme a été retrouvé transpercé, au niveau du palais, par une des épines des deux nageoires dorsales du cténacante. © Alain Bénéteau (paleospot.com)

La première diversification des requins date du Dévonien supérieur (- 385 à - 352 Ma). Plus tard, la crise Permien-Trias (- 251 Ma) voit disparaître 95% des espèces marines de la planète. Il faut attendre la fin du Trias (crise Trias-Jurassique, - 200 Ma) pour voir apparaître une diversité importante de Chondrichthyens (Cuny and Bénéteau, 2013; Lecointre, 2009). C'est à cette période que les Téléostéens émergent (Trias, - 237 ~ - 228 Ma) et ne sont plus protégés par d'épaisses écailles. C'est désormais la vitesse qui leur permettra de subsister, et les Hybodontes (dominant les faunes marines du Trias) laissent peu à peu la place aux requins modernes. En effet, ces derniers possèdent alors une colonne vertébrale faite de cartilage calcifié, contrairement à celle des Hybodontes qui est flexible. Ce caractère augmente considérablement leur vitesse de nage, et les requins modernes (Néosélaciens) semblent ainsi mieux adaptés pour capturer les Téléostéens (Cuny and Bénéteau, 2013). Les requins à cette époque commencent ainsi à présenter des traits d'histoire de vie des requins actuels. Vers la fin du Crétacé supérieur, le groupe des Néosélaciens comprend ainsi presque 100 espèces (Underwood, 2006).

2.2. Diversité taxonomique

Il y a aujourd'hui plus de 500 espèces de requins recensées, présentant une très grande diversité taxonomique (Ebert et al., 2013). Ces espèces sont divisées en neuf ordres différents (Figure 3), globalement monophylétiques, tandis que beaucoup de familles au sein de ces ordres ne le sont pas (Stein et al., 2018; Vélez-Zuazo and Agnarsson, 2010). Les Hexanchiformes comprennent les requins à 6 ou 7 arcs branchiaux. L'ordre des Echinorhiniformes ne comprend que deux espèces de requins profonds, et est aujourd'hui remis en cause (Vélez-Zuazo and Agnarsson, 2010). L'ordre des Squaliformes comprend 130 espèces regroupées en six familles, et ses représentants habitent principalement des eaux relativement profondes. L'ordre des Pristiophoriformes comprend les requin-scies (moins de 10 espèces) aujourd'hui fortement menacés, et l'ordre des Squatiniformes contient les requin-anges, souvent tapis dans le sable, bien camouflés à l'affût des proies. Les Heterodontiformes ne comprennent que quelques espèces, à la distribution géographique très réduite.

L'ordre des Lamniformes comprend 7 familles et 15 espèces, principalement des requins pélagiques de grande taille. Aucun de ces requins n'est vraiment associé aux récifs coralliens, bien que certaines espèces puissent y être observées en pente externe, comme par exemple le grand requin blanc (*Carcharodon carcharias*) pendant l'hiver austral en Nouvelle-Calédonie.

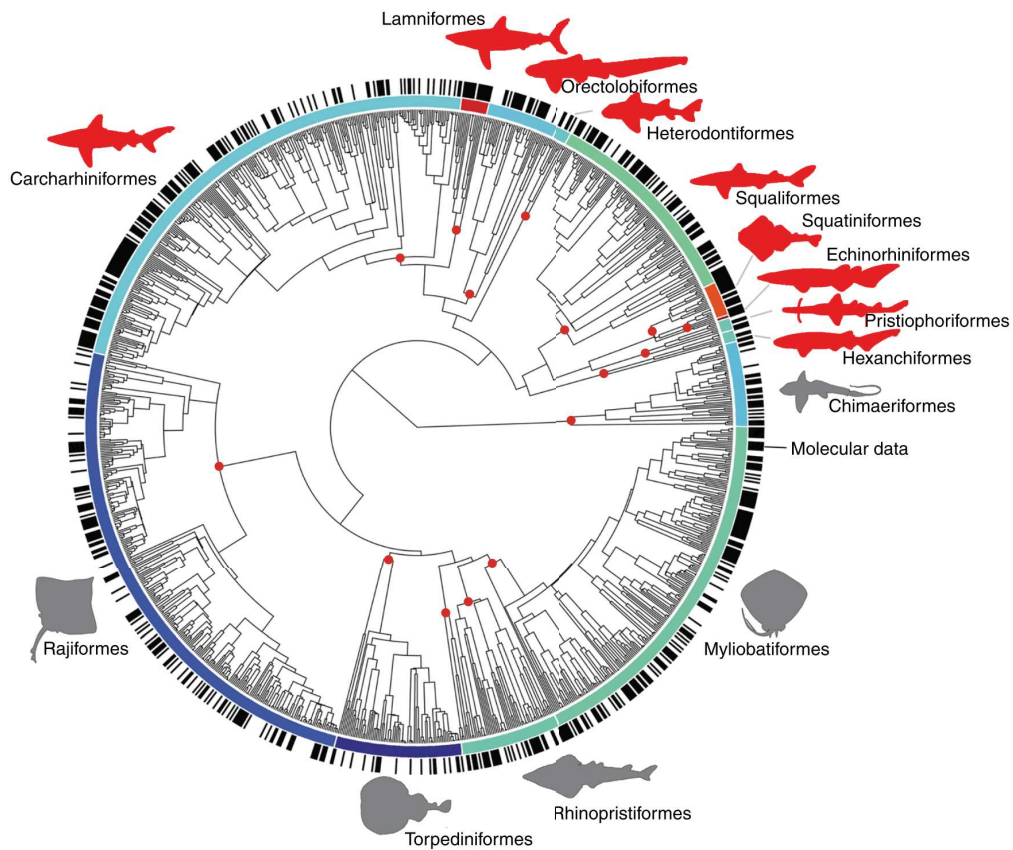


Figure 3. Arbre phylogénétique complet des Chondrichthyens. Les points rouges indiquent la subdivision des ordres. Les silhouettes représentatives des neuf ordres de requins sont en rouge. Figure extraite et adaptée de Stein et al. 2018.

L'ordre des Orectolobiformes comprend 42 espèces réparties en 7 familles. Parmi les requins associés ou rencontrés occasionnellement au sein des récifs coralliens, notamment en Nouvelle-Calédonie, on trouve par exemple le requin-baleine (*Rhincodon typus*), le requin-léopard (*Stegostoma fasciatum*), et le requin-nourrice (*Nebrius ferrugineus*).

Enfin, l'ordre des Carcharhiniformes est le plus diversifié des groupes de requins (Stein et al., 2018). Comprenant 281 espèces regroupées en huit familles, il contient les espèces de requins les plus abondantes des récifs coralliens du monde entier. Parmi elles, les requin-marteaux (Sphyrnidae) et les requins requiem (Carcharhinidae).

2.3. Diversité des traits d'histoire de vie

Outre leur diversité taxonomique importante, les requins présentent une forte diversité de traits d'histoire de vie (Ebert et al., 2013).

Les études paléontologiques ont montré qu'au sein des Élasmobranches, les taxons associés à des habitats proches des côtes se sont diversifiés bien plus rapidement que leurs homologues pélagiques ou des milieux profonds (Sorenson et al., 2014). Les Carcharhinidae associés aux récifs coralliens en sont un bon exemple, présentant un taux de spéciation plus élevé que d'autres taxons. En résulte une diversité de traits de vie importante.

En revanche, parmi les requins, beaucoup d'espèces ont une maturité sexuelle tardive (jusqu'à 18 ans ; Robbins, 2006) et montrent de longues périodes de gestation ainsi qu'un investissement maternel parmi les plus importants du règne animal (Cortés, 2000). Bien que ces caractères reproductifs soient partagés par de nombreuses espèces de requins, celles-ci présentent différents types de reproduction (Ebert et al., 2013), à l'origine de différences dans la capacité de dispersion de ces espèces. Environ 40% des espèces de requins sont ovipares, pondant leurs œufs presque immédiatement après fertilisation et formation d'une capsule protectrice (e.g. requin léopard, *Stegostoma fasciatum*). La plupart des requins sont en revanche vivipares et donnent naissance à des jeunes complètement développés (e.g. requin gris de récif, *Carcharhinus amblyrhynchos*). Enfin, certains sont ovovivipares, comme le requin tigre, *Galeocerdo cuvier* (Randall, 1992), qui donne naissance à un grand nombre de petits, de 10 à 82 par portée (Cox and Francis, 1997).

D'une taille moyenne à l'âge adulte variant de 25 cm (*Rhizoprionodon taylori*) à 12 m (*Rhincodon typus*), et d'une longévité pouvant atteindre plus de 400 ans (*Somniosus microcephalus*) (Nielsen et al., 2016), des requins filtreurs (e.g. requin pèlerin, *Cetorhinus maximus* ; requin baleine, *Rhincodon typus* ; et requin grande-gueule, *Megachasma pelagios*) en passant par des requins se nourrissant en coupant des morceaux de proies bien plus grosses qu'eux (squalelet féroce, *Isistius brasiliensis*) ou bien se nourrissant principalement sur des invertébrés (requin léopard, *Stegostoma fasciatum*), ou enfin de plus gros poissons (requin bouledogue, *Carcharhinus leucas*) ou même des mammifères marins (grand requin blanc, *Carcharodon carcharias*), les fonctions de ces espèces dans les écosystèmes marins sont très diverses. Il a même été montré que certains requins jouaient un rôle de transport des nutriments au sein d'écosystèmes côtiers en incluant des herbes marines comme partie intégrante de leur régime alimentaire (requin-marteau tiburo, *Sphyrna tiburo* ; Leigh et al., 2018).

2.4. Le requin gris de récif, *Carcharhinus amblyrhynchos*

Le requin gris de récif, *Carcharhinus amblyrhynchos* (Figure 4), fait partie de la famille des requins requiem, les Carcharhinidae, du grec « *karcharos* », aiguisé, et « *rhinos* », nez. Cette famille comprend 12 genres et au moins 56 espèces décrites dans le monde entier (Ebert et al., 2013). Les requins requiem constituent le groupe dominant de requins peuplant les eaux tropicales, aussi bien en termes de diversité que d'abondance et de biomasse (Ebert et al., 2013). Cette famille se retrouve également en milieu subtropical et dans les eaux chaudes-tempérées. Elle regroupe des espèces emblématiques telles que le requin tigre (*Galeocerdo cuvier*), le requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*), le requin longimane (*Carcharhinus longimanus*), les requins citron (genre *Negaprion*), ainsi que le requin à pointes blanches de lagon (*Triaenodon obesus*), bien connu des plongeurs et randonneurs palmés.



Figure 4. Requin gris de récif, Carcharhinus amblyrhynchos, dans son habitat naturel privilégié, en pente externe de récif corallien. © Matthieu Juncker

Au même titre que le requin à pointe noire (*Carcharhinus melanopterus*) et le requin à pointes blanches de lagon (*T. obesus*), le requin gris de récif (*C. amblyrhynchos*) est l'un des requins les plus abondants des récifs de l'Indo-Pacifique. Son aire de répartition (Figure 5) s'étend de l'Ouest de l'Océan Indien où il est présent depuis l'Afrique du Sud jusqu'en Mer Rouge, avec toutefois des observations peu fréquentes. Il est observé jusqu'au Pacifique Central où il est présent dans l'Archipel d'Hawaï, aux Tuamotu (Polynésie française), ainsi qu'aux Îles Pitcairn (Ebert et al., 2013).

Son habitat typique correspond aux plateaux continentaux et insulaires, à la zone côtière-pélagique ou côtière. Commun dans les récifs coralliens en particulier, il est souvent observé près des tombants, son habitat privilégié, ainsi que dans les passes. Il peut également être observé à l'intérieur des lagons, notamment en zone présentant de forts courants. Même s'il peut faire des incursions à des profondeurs atteignant 1 000 mètres, il est généralement observé entre 0 et 280 mètres de profondeur (Last and Stevens, 2009).

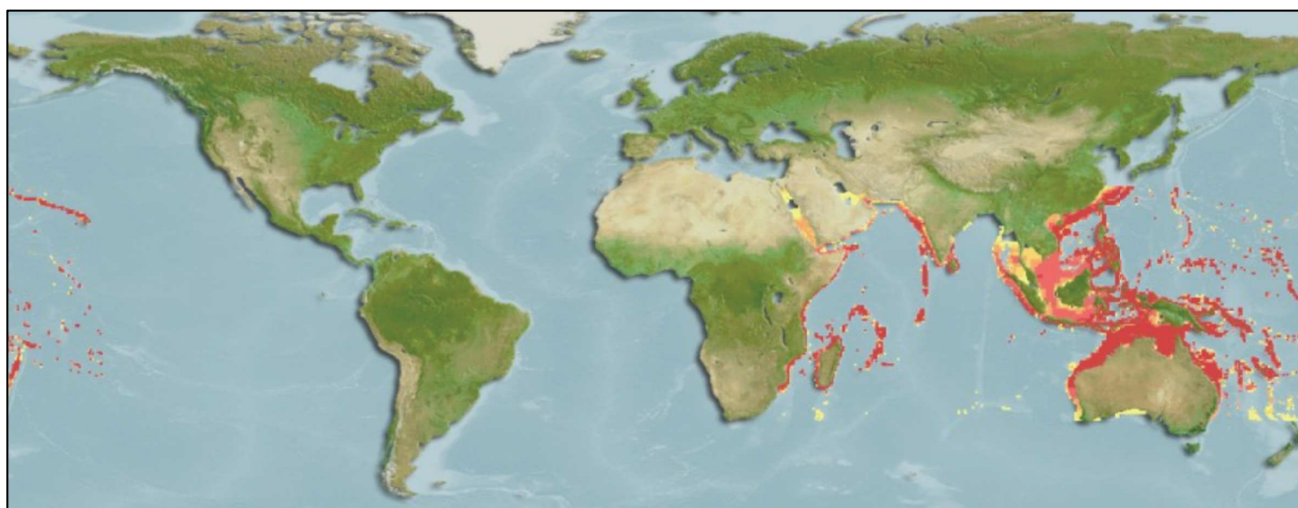


Figure 5. Aire de répartition du requin gris de récif, *Carcharhinus amblyrhynchos*. Figure tirée de Fishbase, montrant le « Native Range ». Rouge = forte probabilité d'occurrence. Jaune = faible probabilité d'occurrence.

Sa taille à la naissance varie entre 45 et 60 centimètres, et le plus gros individu jamais observé mesure une taille totale de 255 cm (Ebert et al., 2013). Une proportion de 50% des femelles sont matures à 11 ans, à une taille entre 130 et 140 cm de taille totale (Robbins, 2006). De même, 50% des mâles sont matures entre 130 et 140 cm de taille totale mais à neuf ans. Comme certains Carcharhinidae (Branstetter, 1981), *C. amblyrhynchos* mettrait bas tous les deux ans (Wetherbee et al., 1997), mais cela n'a pas été formellement démontré (Robbins, 2006). Des représentants de la même famille et de la même classe de taille, e.g. *C. melanopterus* et *C. acronotus*, mettent bas tous les ans, ce qui n'exclut pas cette hypothèse pour *C. amblyrhynchos* (Hazin et al., 2002; Porcher, 2005; Schwartz, 1984). Les jeunes femelles mettraient au monde à chaque portée un à trois petits (trois à quatre pour les plus grandes ; Robbins, 2006). Il est également noté des portées jusqu'à six petits (Ebert et al., 2013). La période de gestation de *C. amblyrhynchos* est de 12 à 14 mois (Robbins, 2006). Ces traits de vie particuliers sont typiques d'organismes de stratégie de reproduction de type K (Pianka, 1977), et font de *C. amblyrhynchos* une espèce vulnérable, avec des populations montrant une faible résilience aux pressions anthropiques.

STATUT LISTE ROUGE UICN (2015)



Un des requins les plus abondants des récifs de l'Indo-Pacifique, *Carcharhinus amblyrhynchos* est toutefois menacé dans beaucoup de régions du globe (Ebert et al., 2013). Ses traits de vie en font un animal très vulnérable.

2.5. Le requin à pointes blanches de récif, *Carcharhinus albimarginatus*

Le requin à pointes blanches de récif, *Carcharhinus albimarginatus*, appartient au même genre que le requin gris de récif. Moins commun que ce dernier, il a toutefois une distribution très large (Indo-Pacifique ; Figure 6). Ce requin se trouve assez rarement à l'intérieur des lagons, et son habitat préférentiel est la pente externe de récif. Il se trouve souvent plus profond et plus au large que *C. amblyrhynchos*, mais reste visible depuis la surface jusqu'à des fonds de 600 à 800 m (Ebert et al., 2013), généralement au-delà de 20 m. Les jeunes se retrouvent sur des fonds relativement proches du récif, tandis qu'ils s'éloignent dans des eaux plus profondes au cours de leur croissance (Figure 7).

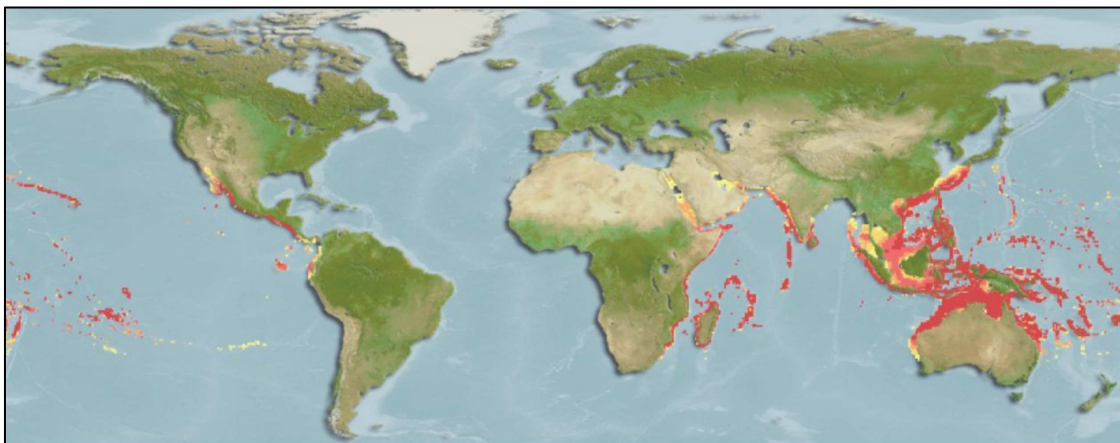


Figure 6. Aire de répartition du requin à pointes blanches de récif, *Carcharhinus albimarginatus*. Figure tirée de Fishbase, montrant le « Native Range ». Rouge = forte probabilité d'occurrence. Jaune = faible probabilité d'occurrence.

Plus gros que *Carcharhinus amblyrhynchos*, ce requin naît entre 60 et 80 cm, avec une taille à maturité avoisinant 160 à 180 cm pour les mâles, et 160 à 200 cm pour les femelles, pour une taille maximale observée de 300 cm. *Carcharhinus albimarginatus* donne généralement naissance à 5 ou 6 petits après une période de gestation de 12 mois (Ebert et al., 2013).



Figure 7. Requin à pointes blanches de récif, *Carcharhinus albimarginatus*, dans son habitat naturel privilégié, en pente externe de récif corallien, généralement plus profond que *C. amblyrhynchos*. © Matthieu Juncker

Cette espèce se nourrit principalement de poissons benthiques et pélagiques (incluant des Scombridae), ainsi que des raies, des céphalopodes et possiblement des petits requins et des crustacés (Ebert et al., 2013).

En dépit de leur vaste répartition dans la région Indo-Pacifique, cette espèce a été très peu étudiée (Barnett et al., 2012; Espinoza et al., 2015; Last and Stevens, 2009). Elle est rare dans la zone de Nouméa (Juhel et al., 2017) et absente des habitats côtiers d’Australie de l’Est (Espinoza et al., 2014a).

Encadré 2

STATUT LISTE ROUGE UICN (2015)

NOT EVALUATED NE	DATA DEFICIENT DD	LEAST CONCERN LC	NEAR THREATENED NT	< VULNERABLE > VU	ENDANGERED EN	CRITICALLY ENDANGERED CR	EXTINCT IN THE WILD EW	EXTINCT EX
---------------------	----------------------	---------------------	-----------------------	-----------------------------------	------------------	-----------------------------	---------------------------	---------------

Ce grand requin à croissance lente est capturé comme prise accessoire à grande échelle, mais est également la cible de pêcheries pour ses grands ailerons et sa chair (Ebert et al., 2013). Certaines populations de zones éloignées ont été reportées décimées par les pêcheries des ailerons de requin, alors que les pêcheries artisanales utilisent la plupart des parties de l’animal (incluant le foie, les mâchoires et le cartilage). Vulnérable à cette pêche à cause de ses traits d’histoire de vie très conservatifs, les populations de ce requin paraissent peu résilientes, également car leur dispersion entre les sites semble très faible. Mais la littérature sur la dispersion de cette espèce reste peu fournie (Espinoza et al., 2015).

2.6. Rôles des requins de récif pour les écosystèmes coralliens

Les requins forment un des groupes de prédateurs les plus diversifiés en termes de nombre d'espèces, jouant des rôles fonctionnels importants, notamment dans le contrôle par le haut de la chaîne trophique et de la structure fonctionnelle des écosystèmes côtiers et océaniques (Dulvy et al., 2014; Ferretti et al., 2010; Heithaus et al., 2008; Stevens, 2000). Malgré plusieurs études pionnières sur le sujet, les conséquences écologiques du déclin des populations de requins sont souvent floues (Heupel et al., 2014; Roff et al., 2016). Le rôle des requins dans la dynamique des écosystèmes coralliens est largement déterminé par l'intensité des interactions avec leurs proies (Bascompte et al., 2005), dépendant de plusieurs facteurs comme par exemple l'abondance, la taille, le niveau trophique et la spécialisation alimentaire (Roff et al., 2016; Wootton and Emmerson, 2005).

Il existe parmi les espèces de requins de récif une diversité importante de ces différents paramètres. Les requins ne sont pas tous des prédateurs apicaux, définis comme des prédateurs occupant la position trophique supérieure dans les communautés animales, n'ayant eux-mêmes pas de prédateurs naturels (Wallach et al., 2015). Il existe cependant plusieurs requins prédateurs apicaux, dont la taille adulte est relativement grande (plus de trois mètres), comme par exemple le requin tigre (*Galeocerdo cuvier*), le requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*), ou encore le grand requin marteau (*Sphyrna mokkaran*). Le régime alimentaire de ces prédateurs apicaux inclut de grandes proies (Roff et al., 2016), y compris d'autres requins (Lowe et al., 1996; Mourier et al., 2013a), des mammifères (Meyer et al., 2010) ou des tortues (Heithaus et al., 2007). Ils exercent probablement une influence forte sur la structure et la diversité des communautés associées aux récifs coralliens par des interactions directes ou indirectes (Heithaus et al., 2007; Mourier et al., 2013a).

La plupart des requins associés aux récifs coralliens sont en revanche des mésoprédateurs, c'est-à-dire des espèces occupant une position trophique haute mais en-dessous des prédateurs apicaux, et vulnérables à la prédation (Heupel et al., 2014; Ritchie and Johnson, 2009). Ces requins mésoprédateurs sont de taille plus modeste (taille totale maximale entre 150 et 300 cm) et présentent de manière générale un degré de fidélité au récif dans lequel ils évoluent relativement fort (Roff et al., 2016). *Carcharhinus amblyrhynchos* et *Carcharhinus albimarginatus* sont par exemple des mésoprédateurs.

Outre le rôle trophique des requins dont le déclin pourrait causer des cascades trophiques au sein des communautés des récifs coralliens (hypothèse toujours débattue, *c.f.* Roff et al., 2016), les requins ont d'importantes fonctions dans ces écosystèmes. Les mouvements à l'échelle locale des

requins mésoprédateurs associés aux récifs coralliens favorisent le cycle des nutriments entre les milieux récifaux et pélagiques adjacents (Heupel and Simpfendorfer, 2015; McCauley et al., 2012), tandis que les mouvements à plus grande échelle des prédateurs apicaux favorisent le flux des nutriments entre les écosystèmes côtiers et océaniques (Meyer et al., 2010). Tout comme les prédateurs terrestres, les requins prélèvent les proies faibles et malades (Lowe et al., 1996; Lucifora et al., 2009). Les prédateurs apicaux (en milieu tropical principalement requin tigre, *Galeocerdo cuvier* et bouledogue, *Carcharhinus leucas*) jouent également le rôle de charognards en se nourrissant de carcasses de mammifères marins (Clua et al., 2013; Dudley et al., 2000). Enfin, les requins mésoprédateurs pourraient exercer un contrôle trophique sur les populations d'espèces invasives (e.g. rascasse volante dans les récifs des Caraïbes, *Pterois volitans* ; Albins and Hixon, 2013).

3. MENACES, STATUT ET MESURES DE PROTECTION

3.1. Déclin global des requins

Le déclin historique et contemporain des requins a fait l'objet de nombreuses études, au vu de son rythme alarmant et de son ampleur globale (Ferretti et al., 2018; Myers et al., 2007). Comme évoqué plus tôt, le groupe des requins inclut des espèces parmi les plus vulnérables aux pressions anthropiques directes comme la pêche, car leurs traits de vie induisent une faible résilience des populations (Dulvy et al., 2014; Ferretti et al., 2018). La pression de pêche n'a cessé d'augmenter depuis que les premières données sur le sujet ont été reportées. La plupart des travaux de recherche ont été réalisés sur quelques années seulement et conduits après les années 1950 (Jackson, 2001). Entre 1950 et 2000, le nombre reporté de requins pêchés a plus que triplé, atteignant 880 000 tonnes en 2000 (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*). En outre, ce chiffre ne concerne que les prises reportées, et il a été estimé par rétro-calcul à partir de données issues du commerce des ailerons de requins que la biomasse de requins capturés pour alimenter ce marché atteint des valeurs trois à quatre fois supérieures aux biomasses reportées légalement (Clarke et al., 2006). Même les requins capturés en tant que prises accessoires par les pêcheries thonières par exemple sont souvent gardés car relativement précieux (Dulvy et al., 2014).

Pêche ciblée et non-ciblée (prises accessoires) sont les principales menaces pour les requins et les raies (Field et al., 2010). Le déclin des requins à l'échelle globale associé à cette pression colossale est estimé à 90-95% en abondance pour beaucoup d'espèces, et même jusqu'à 99% pour certaines espèces pélagiques (Baum et al., 2003; Ferretti et al., 2010, 2018; Myers and Worm, 2005; Robbins et al., 2006a).

3.2. Destruction des habitats et chute de la disponibilité en proies

La surpêche directe n'est pas la seule menace pesant sur les requins. La surpêche des poissons et crustacés en général affecte indirectement le succès reproducteur des requins au sein de nombreux habitats (Essington et al., 2006; Pauly and Palomares, 2005). Cette surpêche induit une chute drastique de la diversité fonctionnelle et de la biomasse à proximité de l'homme (D'Agata et al., 2016; Ruppert et al., 2017). Elle est souvent hétérogène et cible des groupes fonctionnels précis tels que les herbivores, déstabilisant l'ensemble du réseau trophique et menant éventuellement sur le moyen terme à des changements de phase vers une dominance algale (Bellwood et al., 2004; Hughes et al., 2007).

Ce phénomène est d'autant plus marqué dans un contexte de changements climatiques où l'augmentation de la température et de l'intensité des cyclones provoque de plus en plus d'épisodes de blanchissement corallien (Graham et al., 2013; Hughes et al., 2007, 2018). Les fortes pollutions aux nitrates favorisent également la croissance algale (Cheal et al., 2010; Knowlton, 2001). La destruction de l'habitat corallien et la surexploitation des ressources des écosystèmes associés (Pandolfi et al., 2003) agissent en synergie pour mener à une chute de la disponibilité en proies pour les requins associés aux récifs coralliens (Wirsing et al., 2007).

3.3. Liste Rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) pour les Élasmobranches

Les requins représentent un des groupes les plus menacés (Dulvy et al., 2014; McCauley et al., 2015). De plus, seulement 15% des prises de pêche légale des Chondrichthyens sont reportées au niveau de l'espèce, le reste étant reporté comme groupes taxonomiques plus larges (*e.g.* « *dogfish* » pour les Squalidae ou « *skate* » pour les Rajidae), ou même parfois simplement « requin » ou « raie » (Clarke et al., 2006; Dulvy et al., 2008). Ce manque de précision dans les rapports de pêche rend les estimations de stock impossibles, et même si le degré de confiance en ces rapports et leur résolution varient selon les pays (Watson and Pauly, 2001), la sous-estimation des prises est probablement importante pour beaucoup d'espèces de requins (Clarke et al., 2006). Ce flou dans les rapports de suivi des pêcheries est donc en partie responsable du manque de données, ne permettant pas de définir de statut de conservation pour beaucoup d'espèces. Ainsi, en 2018, sur 1 107 espèces de Chondrichthyens, 18,1% sont considérées comme menacées (statut liste rouge CR, EN et VU), et 10,4% quasi-menacées (NT), alors qu'il n'y a pas assez de données sur les populations de 41,5% d'entre elles, soit 459 espèces, pour conclure sur leur statut global (*Data Deficient*, DD ; iucnredlist.org). Si l'on ne s'intéresse qu'aux requins, sur 482 espèces, ce sont 198 soit 41,1% qui sont en statut indéterminé par manque de données, tandis que 16,6% sont menacées, et 11,4% quasi-menacées. Il est nécessaire de trouver des solutions pour mieux estimer les abondances et distributions de ces espèces au statut indéterminé afin de réaliser une évaluation directe ou indirecte des risques d'extinction.

3.4. Aires protégées pour les requins : une solution efficace ?

Il existe des solutions pour les pêcheries permettant de réduire le taux de prises accessoires, comme par exemple l'emploi d'engins de pêche ciblée. Mais la solution qui fonctionne le mieux pour la protection directe des requins, mais également indirecte en réduisant la chute de la disponibilité en proies, est certainement la mise en protection par la délimitation d'aires marines protégées (AMPs).

Selon la définition de l'UICN, une aire protégée est « un espace géographique clairement défini, reconnu, spécialisé et géré par des moyens légaux ou d'autres moyens efficaces, visant à assurer la conservation à long terme de la nature et des services écosystémiques et valeurs culturelles qui y sont associés ». Des catégories ont alors été définies par l'UICN pour caractériser chaque aire protégée en fonction du degré de protection attribué, allant de la catégorie 1 pour une protection stricte à la catégorie 6 pour une « zone d'utilisation durable des ressources naturelles » (iucn.org). L'efficacité de protection associée aux AMPs est relativement faible pour les requins dans les catégories les moins strictes et les AMPs qui ont du sens pour ce groupe sont celles de catégorie 1 (réserve intégrale) ou 2 (pêche interdite). Il n'existe en revanche que très peu d'AMPs de catégorie 1.

Bien que certaines AMPs de taille moyenne se sont montrées bénéfiques pour les populations de requins de récifs dans un contexte d'exploitation (Goetze and Fullwood, 2013; McCook et al., 2010), leur efficacité est souvent limitée (Juhel et al., 2017; Knip et al., 2012). En effet, les requins sont relativement mobiles et parcourent souvent de grandes distances, débordant des limites de ces AMPs (Davidson and Dulvy, 2017; White et al., 2017a). Certains grands requins comme le requin tigre (*Galeocerdo cuvier*) ou le requin baleine (*Rhincodon typus*) effectuent de grandes migrations en parcourant des milliers de kilomètres ; ce sont donc des espèces difficiles à protéger intégralement par l'intermédiaire d'AMPs (Ferreira et al., 2015; Guzman et al., 2018). Même des requins mésoprédateurs plus petits et relativement sédentaires peuvent effectuer des déplacements de plus forte amplitude, débordant des limites des AMPs (Heupel et al., 2010a; White et al., 2017a). Cependant, les AMPs les plus strictes (catégorie 1) et mises en place depuis longtemps permettent de restaurer des populations de requins de récif à des niveaux bien supérieurs à ceux observés dans les zones non protégées (Juhel, 2016; Juhel et al., 2017). En revanche, Juhel et al. ont montré en 2017 que même ces AMPs strictes n'étaient pas aussi efficaces pour les requins de récif que les zones naturellement éloignées de l'homme.

Non seulement les AMPs mises en place sont souvent trop petites pour des espèces mobiles telles que les requins, elles sont parfois peu efficaces car il existe un décalage énorme entre les zones

préférentielles pour ces espèces et les zones protégées. Il a par exemple été montré en Afrique du Sud que les AMPs couvraient moins de 6% des zones importantes pour les requins tigres dans la même région (Daly et al., 2018).

Bien entendu, de nombreux paramètres, y compris géopolitiques, sont à prendre en compte pour une priorisation des actions de conservation afin de créer des AMPs efficaces et réalistes (Davidson and Dulvy, 2017; Edgar et al., 2014). Des réseaux d'AMPs peuvent être mis en place (Fredston-Hermann et al., 2018; Momigliano et al., 2015a), et la sanctuarisation de Zones Économiques Exclusives (ZEEs) en intégralité a été effectuée dans certains territoires (*e.g.* Palau, Galápagos, Îles Marshall, Nouvelle-Calédonie), avec une interdiction de cibler les requins et en réglementant le matériel de capture utilisé (Bradley et al., 2018; Carr et al., 2013; Vianna et al., 2016). En revanche, la lutte contre la pêche illégale est difficile à mettre en place dans ces sanctuaires à grande échelle, surtout pour les nations en voie de développement n'ayant pas les moyens de surveiller et d'intervenir au sein de la zone (Bradley et al., 2018; Cabral et al., 2018).

Les AMPs intégrales et les sanctuaires sont une solution prometteuse, ainsi que certaines AMPs sous des critères bien précis (Edgar et al., 2014), mais elles sont souvent mises en place sans prendre en compte certains paramètres clés pour la conservation de certaines espèces, comme par exemple la structure et la connectivité des populations (Daly et al., 2018; Magris et al., 2014; McCook et al., 2009).

4. LIMITES ACTUELLES ET PROBLÉMATIQUE

Comme nous l'avons vu précédemment, les requins jouent des rôles écologiques importants au sein des récifs coralliens. En revanche, de nombreuses menaces pèsent sur eux, et du fait de leurs traits de vie particuliers, ils sont extrêmement vulnérables aux pressions anthropiques. En conséquence, les populations de requins sont en train de s'effondrer, avec des chutes d'abondance et des réductions drastiques de leur espace vital, même dans des régions peu exploitées comme l'Australie ou dans les sites protégés comme Chagos (Ferretti et al., 2018; Roff et al., 2018). Enrayer leur déclin et les protéger efficacement dans l'Anthropocène est aujourd'hui un véritable défi.

Au-delà des mesures concernant le commerce international de requins qui sont souvent limitées et pas forcément correctement appliquées (Bradley et al., 2018; Cardeñosa et al., 2018; Pala, 2013), la création d'aires marines protégées et de corridors de protection peut être une mesure efficace si ces AMPs sont de taille suffisamment importante et prennent en compte l'écologie des espèces à protéger (Daly et al., 2018; Momigliano et al., 2015a). Or, beaucoup d'aspects de l'écologie des requins restent encore largement méconnus, en grande partie par manque de données et à cause de l'utilisation de protocoles de suivis inadaptés.

Pour cela, il faut donc mieux étudier l'écologie des requins, notamment combler les lacunes des espèces dont le statut UICN est indéterminé par manque de données. Il s'agit également de mieux décrire et de mieux comprendre la présence, la structure et la connectivité des populations afin de définir des statuts de conservation, des zones prioritaires de gestion et d'optimiser les efforts mis en place.

Pour beaucoup d'espèces de requins, leur déclin drastique et leur caractère furtif rendent l'étude de leurs populations compliquée, souvent partielle et biaisée. Par exemple, les estimations d'occurrence ou d'abondance en plongée sous-marine ou par caméra appâtée restent difficiles, tout comme leur capture pour marquage acoustique, satellitaire, ou pour prélèvement d'échantillons en vue d'analyses génétiques ou isotopiques. Ces limitations et ces biais nous empêchent d'obtenir des informations permettant de déterminer un statut de conservation menant éventuellement à une protection au niveau international (UICN, *Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction* – CITES). Ainsi, alors que de nombreuses études déploient des moyens financiers et humains considérables afin de suivre les populations de requins à

travers le monde entier (*e.g.* initiative [Global FinPrint](#)), les résultats restent mitigés et beaucoup d'espèces demeurent encore sans statut de protection (Dulvy et al., 2014, 2017). En effet, la Liste Rouge de l'UICN est incomplète pour les requins, avec 41,1% des espèces (198 sur 482 recensées) n'ayant pas de statut de conservation (iucnredlist.org).

Les nouvelles technologies permettent de combler ces lacunes et sont employées dans le monde entier, toutes disciplines confondues, pour tenter d'améliorer les mesures mises en place pour le suivi des espèces menacées : police scientifique (Cardeñosa et al., 2018; Harper et al., 2018), suivis et échantillonnage par drones (Geoghegan et al., 2018; Kiszka et al., 2016), deep learning (Bogucki et al., 2018; Villon et al., 2018), miniaturisation des capteurs (Kays et al., 2015; Wilmers et al., 2015), imagerie satellitaire (Boerder et al., 2018; Fretwell et al., 2017). À ce panel de méthodes s'ajoutent l'émergence de l'analyse de l'ADN environnemental (Thomsen and Willerslev, 2015), ou encore de l'étude de l'ADN « invertébré » (Meekan et al., 2017; Schubert et al., 2015), qui profitent des nouvelles technologies de séquençage avec une baisse de coût et une augmentation de la puissance de calcul (Allendorf et al., 2010).

Ainsi, avec cette émergence de nouvelles méthodes de génomique environnementale, s'ouvrent des perspectives pour la conservation des espèces encore largement sous-étudiées. L'analyse de l'ADN environnemental (ADNe ; matériel génétique présent dans l'environnement) s'avère de plus en plus utile pour de nombreuses applications (Cristescu and Hebert, 2018), notamment pour le suivi des communautés en milieu terrestre (Bohmann et al., 2014; Pedersen et al., 2015; Thomsen and Willerslev, 2015) ou en milieu aquatique d'eau douce (Jerde et al., 2011; Valentini et al., 2016a), ou encore pour révéler la présence d'espèces invasives (Brown et al., 2016; Hunter et al., 2015; Stat et al., 2018) et d'espèces en danger critique d'extinction (Eva et al., 2016; Simpfendorfer et al., 2016).

Tandis que la plupart des études ont ciblé la détection d'une seule espèce à la fois par barcoding d'ADNe (Simpfendorfer et al., 2016; Thomsen and Willerslev, 2015), l'étude des communautés par une approche de métabarcoding (identification de multiples espèces au sein d'un seul échantillon prélevé dans l'environnement) reste plus rare du fait de la nécessité d'utilisation de plateformes de séquençage de nouvelle génération, du coût associé ainsi que du développement de marqueurs appropriés (Miya et al., 2015; Taberlet et al., 2012a).

L'étude de l'ADNe en milieu marin est un véritable défi, principalement à cause de la masse d'eau considérable, des profondeurs extrêmes et de son dynamisme et sa complexité importants (Pikitch, 2018). Ainsi, la dilution du matériel génétique dans l'environnement est bien plus importante

que dans d'autres écosystèmes. Mais les avancées dans le domaine de la génomique environnementale ont été rapides et la réduction des coûts de séquençage permettent aujourd'hui de tester ces approches en milieu dynamique et complexe tel que le milieu marin (*e.g.* première étude des communautés de poissons en milieu marin : Thomsen et al., 2012).

L'analyse de l'ADN environnemental se montre de plus en plus utile pour l'étude des communautés de poissons en milieu marin (Thomsen et al., 2016; Yamamoto et al., 2016) ainsi que pour révéler la présence d'espèces menacées de Chondrichthyens (approche ciblée de barcoding en eau douce ; Simpfendorfer et al., 2016). Dans le contexte de déclin des requins et de manque de données sur beaucoup d'espèces rares et mobiles malgré les nombreux efforts déployés en utilisant des méthodes traditionnelles de suivi, le développement d'une approche de métabarcoding environnemental pour l'étude des communautés de requins prend tout son sens mais soulève de nombreux défis. Cette thèse proposera la première approche en métabarcoding de l'ADNe pour l'étude des communautés de requins dans le but d'estimer les occurrences et les distributions multi-espèces et de les comparer aux méthodes traditionnelles.

D'autre part, même pour des espèces relativement communes, dont le statut de protection est bien établi et qui sont sujettes à des interdictions de commerce international voire de prélèvement local, l'impact de l'homme reste considérable (Robbins, 2006; Robbins et al., 2006b). Par exemple, en Nouvelle-Calédonie, les travaux de Juhel et al. (2016, 2017) montrent un fort déclin des requins de récif en zone anthropisée et la faible efficacité des mesures de protection mises en place, notamment les aires marines protégées, dont la configuration (taille, emplacement et degré de protection) n'est pas optimale pour ces espèces mobiles. Afin de limiter ce déclin, voire d'amorcer une dynamique positive, il s'agit de mettre en place des mesures de protection adaptées aux espèces étudiées, donc plus ciblées et plus ambitieuses spatialement (Edgar et al., 2014). Il devient donc urgent d'identifier les populations partageant le paysage sous-marin, ainsi que les relations entre ces populations. En effet, si l'utilisation de méthodes classiques peut apporter des informations cruciales sur l'impact de l'homme (Juhel et al., 2017), elles ne permettent pas de caractériser la dynamique de ces espèces à travers leur dispersion et connectivité, pourtant essentielles à intégrer dans les plans de gestion (Magris et al., 2014; Momigliano et al., 2015b). La connectivité génétique augmente la résilience aux déclins démographiques par le rétablissement des populations via la dispersion ainsi que le maintien de la diversité génétique (Jangjoo et al., 2016). La persistance des populations dépend donc de la compréhension et du maintien à long terme de cette connectivité (Andrello et al., 2015; Jacobi and Jonsson, 2011).

Les méthodes de génétique utilisées couramment dans le but de caractériser la structure et la connectivité des populations (*e.g.* étude de l'ADN mitochondrial et des microsatellites nucléaires) sont limitées et ne permettent pas de caractériser avec une résolution suffisante cette structure (Barbosa et al., 2018; Funk et al., 2012). Les barrières à la dispersion étant rarement totales en milieu marin, et la taille efficace (N_e) des populations marines des espèces relativement communes étant très grande, même de faibles taux de migration peuvent homogénéiser la variance génétique (Momigliano et al., 2017a). L'utilisation d'un faible nombre de marqueurs peut alors conduire à caractériser des populations démographiquement indépendantes comme panmictiques du fait du faible pouvoir discriminant associé (Helyar et al., 2011). Les outils récents de séquençage de nouvelle génération (NGS) et de génomique du paysage (Balkenhol et al., 2017; Manel and Holderegger, 2013; Riginos et al., 2016) permettent en revanche de dépasser ces limitations. Ils autorisent de nouvelles avancées pour l'étude des populations marines (Allendorf et al., 2010; Helyar et al., 2011; Selkoe et al., 2016), offrant la possibilité de définir cette structure à très fine résolution grâce à l'utilisation de nombreux marqueurs moléculaires (Momigliano et al., 2017a; Pazmiño et al., 2017; Portnoy et al., 2015). Ils permettent aussi de mieux comprendre les paramètres à l'origine de la dispersion des requins (Chapman et al., 2015) ainsi que les relations sources-puits entre les différentes populations (Selkoe et al., 2008), y compris celles des récifs éloignés de l'homme dont la connectivité reste peu connue.

En revanche, l'utilisation du séquençage de nouvelle génération pour caractériser la structure des populations de requins reste rare, notamment à large échelle spatiale (Momigliano et al., 2017a; Pazmiño et al., 2017; Portnoy et al., 2015). De plus, le couplage prometteur avec le champ de la génomique du paysage n'a jamais été réalisé, notamment à cause de l'échantillonnage conséquent et diversifié d'un point de vue biogéographique et environnemental que requiert l'utilisation de ces méthodes dans un paysage fragmenté (Selkoe et al., 2016). Une étude de grande ampleur, avec un échantillonnage conséquent et couvrant une large échelle géographique en utilisant des méthodes de génomique du paysage est nécessaire pour une meilleure compréhension de la dispersion et de la connectivité entre les populations de requins des récifs coralliens, dans le but proposer des mesures de conservation optimisées (Barbosa et al., 2018; Funk et al., 2012). Cette thèse proposera une approche ambitieuse (515 requins et 4991 marqueurs) pour estimer les patrons de connectivité du requin gris à une échelle régionale.

5. OBJECTIFS ET STRUCTURATION DES CHAPITRES

Les objectifs de cette thèse sont donc multiples mais visent à acquérir des informations sur la diversité et la structure des populations des requins de récif afin de pouvoir mieux optimiser les mesures de protection pour ces espèces menacées.

Il s'agit notamment de répondre aux questions suivantes :

- (A) L'étude des communautés de requins de récif est-elle réalisable via l'analyse de l'ADN environnemental ?
- (B) Si (A) est vérifiée, comment cette technique d'analyse de l'ADN environnemental permettrait de compléter les méthodes traditionnelles pour la conservation des requins ? Notamment, les requins de récif apparaissent absents des zones anthropisées : le sont-ils vraiment ou les méthodes traditionnelles de suivi échouent à les détecter ?
- (C) Pour une espèce quasi-menacée (*Carcharhinus amblyrhynchos*) mais relativement commune dans les récifs coralliens, comment sont structurées les populations et quels sont les patrons de connectivité en paysage hétérogène ?
- (D) Dans quelle mesure la structure des populations de *C. amblyrhynchos* peut-elle être expliquée par des facteurs biogéographiques ? Peut-on délimiter des Unités de Conservation (CUs) à l'échelle locale et globale ?
- (E) Quelle est la connectivité des récifs éloignés avec le reste des récifs et donc quelle est leur place en termes de conservation pour *Carcharhinus amblyrhynchos* ? Sont-ils des refuges isolés pour les dernières populations de requins en bonne santé ou également des sources pour les zones impactées ?

Ce travail de thèse a été réalisé en grande partie en Nouvelle-Calédonie et s'inscrit dans le cadre du projet APEX (Encadré 3). Il est articulé en deux parties.

Ainsi, après une description détaillée de la méthodologie générale et du travail de terrain réalisé au cours de cette thèse (**chapitre 1**), il s'agit dans la première partie d'étudier la faisabilité et les implications pour la conservation des analyses d'ADN environnemental pour les requins de récif en milieu naturel (chapitres 2 et 3).

La **première partie** se décline donc en deux chapitres ayant pour but de répondre aux questions (A) et (B) énoncées dans la partie précédente. Le premier chapitre de cette partie (**chapitre 2**) vise à répondre à la question (A). Après une courte introduction sur l'ADN environnemental permettant de mieux comprendre les tenants et les aboutissants du sujet, seront présentées les méthodes de prélèvement ainsi que l'échantillonnage réalisé sur le terrain, suivis de l'article 1 de cette thèse.

Le second chapitre de cette première partie (**chapitre 3**) répond à la question (B) et a pour objectif de mieux comprendre les implications de l'analyse de l'ADN environnemental en termes de conservation pour le suivi des espèces rares et mobiles telles que les requins. Il présente alors une mise en parallèle des résultats d'analyse de l'ADN environnemental avec des bases de données historiques utilisant des méthodes de suivi traditionnelles (vidéo appâtée et plongée en scaphandre autonome).

La **seconde partie** est centrée sur l'étude de la connectivité génétique (chapitres 4, 5, et 6) et se concentre plus particulièrement sur l'étude de la structure des populations d'un requin relativement commun (bien que quasi-menacé, *NT* liste rouge UICN) assurant un rôle écologique important au sein des écosystèmes coralliens : le requin gris de récif, *Carcharhinus amblyrhynchos*. Pour comprendre cette structure et la connectivité génétique entre les populations de ce requin, cette partie se décompose en trois chapitres ayant pour but de répondre aux questions (C), (D), et (E).

Dans un premier temps (**chapitre 4**) sera présenté le contexte scientifique et méthodologique associé à cette partie. Les résultats de ce chapitre permettent de répondre à la question (C) et ainsi justifier l'utilisation de méthodes de génomique du paysage par la suite.

Dans un deuxième temps (**chapitre 5**) seront développées des approches relativement novatrices de génomique du paysage basées sur la théorie des circuits électriques afin de répondre aux questions (C) et (D). Après une présentation détaillée du contexte méthodologique de ce chapitre, les résultats seront développés.

Enfin, le **chapitre 6** visera à explorer la fragmentation des populations liée aux pressions anthropiques et la place des récifs éloignés de l'homme pour la conservation des espèces mobiles telles que *C. amblyrhynchos*, dans un contexte de débat sur la protection des zones éloignées. Il visera donc à répondre à la question (E).

La thèse s'achèvera sur une **discussion générale** ouvrant quelques perspectives.

Ce travail de thèse fait l'objet de plusieurs publications scientifiques. Quatre d'entre elles sont présentées dans ce manuscrit, rédigées en anglais. Les chapitres 2 et 3 de cette thèse font l'objet d'articles déjà publiés (respectivement *Nature Scientific Reports* publié en Décembre 2017 et *Science Advances* publié en Mai 2018). Les chapitres 5 et 6 incluent deux publications scientifiques qui seront soumises au cours de l'année 2019.

Encadré 3

PROJET APEX

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet APEX (2015-2018), qui avait pour objectif de collecter des informations essentielles sur l'écologie des requins et les facteurs qui influencent leur distribution à l'échelle de l'archipel néo-calédonien, de manière à proposer des mesures de protection appropriées au sein du Parc Naturel de la Mer de Corail. Pour atteindre cet objectif, le projet s'appuie sur une approche pluridisciplinaire. Outre les recherches décrites en détails au sein de ce manuscrit, d'autres analyses s'inscrivant dans le cadre du projet APEX sont également en cours de travaux. C'est dans le cadre de la thèse de Lucas Bonnin qu'ont été réalisés les marquages acoustiques pour mieux comprendre les patrons de déplacements et de migration des requins de récif à l'échelle contemporaine. Nous aborderons dans ce manuscrit (au sein du chapitre 1) la technique de marquage utilisée, au même titre que les travaux réalisés sur les animaux après capture. Néanmoins, bien que le plan d'échantillonnage, la mise en place, et la relève des capteurs du réseau de réception acoustique aient fait partie intégrante de mon travail de thèse au sein du projet APEX, nous n'aborderons pas ces aspects dans ce manuscrit.

MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE & TRAVAIL DE TERRAIN

1. LE CAS DE L'ARCHIPEL DE NOUVELLE-CALÉDONIE

1.1. Présentation

La Nouvelle-Calédonie est un archipel du Pacifique, dont la capitale est située à environ 1 500 km de la côte Est de l'Australie, et 2 000 km au nord de la Nouvelle-Zélande. L'archipel est composé d'une île principale, la Grande Terre, dont la barrière de corail qui l'entoure forme le plus grand lagon du monde (d'une superficie de 23 000 km²), et de plusieurs grandes îles comme les Îles Loyautés (Ouvéa, Lifou et Maré) au nord-est, ainsi que l'Île des Pins au sud, ou encore les Îles Belep au nord de la Grande Terre (Figure 8).

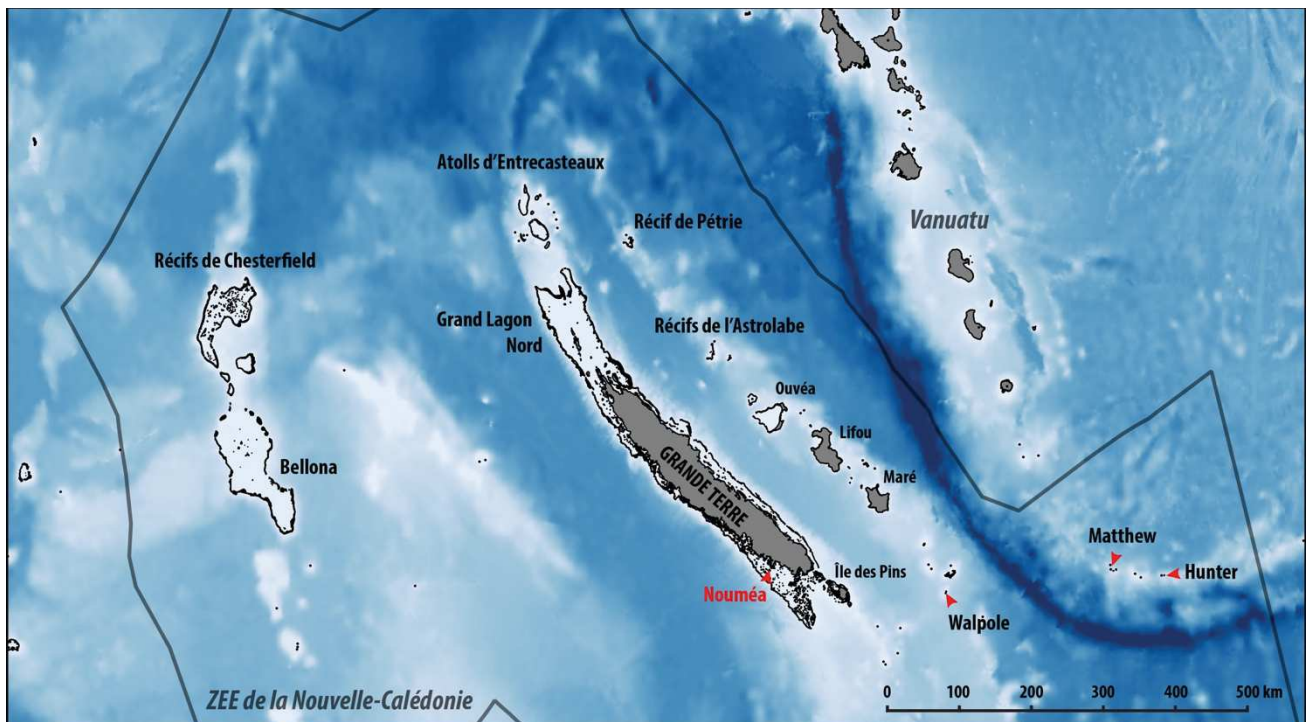


Figure 8. Carte de la Nouvelle-Calédonie montrant Nouméa, la capitale, en rouge au sud de la Grande Terre, ainsi que les nombreux récifs éloignés présents dans la Zone Économique Exclusive (ZEE).

L'année 2018 a célébré le dixième anniversaire de l'inscription au patrimoine mondial de l'UNESCO de près de 15 000 km² de récifs coralliens et lagons de Nouvelle-Calédonie, sur les 40 000 km² qui constituent l'archipel (Andréfouët et al., 2008; Payri and Moatti, 2018). La Nouvelle-Calédonie est ainsi l'un des territoires au monde présentant la plus grande diversité de types de récifs (Payri and Moatti, 2018). Elle présente en effet le complexe de récif-barrière continu le plus long de la planète (1 500 km), composé de récif-barrière extérieur simple (Figure 9) ou double, ou bien imbriqué, avec portions noyées ou non, de récif-barrière côtier (Andréfouët et al., 2009); auquel s'ajoutent des récifs intermédiaires ou lagonaires et frangeants. Plusieurs atolls sont présents dans l'archipel, ainsi que des îles volcaniques récentes présentant ou non un récif frangeant (Figure 10). Les récifs coralliens de l'archipel présentent ainsi une grande diversité de formes et de structures résultant de l'importante hétérogénéité géomorphologique de l'île (Andréfouët et al., 2009). Cette hétérogénéité est à l'origine de nombreux types d'habitats récifaux différents.



Figure 9. Récif barrière au large de Nouméa. © Germain Boussarie



Figure 10. Les récifs frangeants de Lifou abritent une très grande diversité de coraux et de poissons de récif. © Germain Boussarie

Cette diversité de types de récifs et d'habitats, ainsi que la proximité du triangle de corail sont responsables de la forte diversité en poissons récifaux qui avoisine les 1 800 espèces (Kulbicki et al., 2013), et ce ne sont pas moins de 26 espèces de requins qui peuplent les eaux peu profondes de l'archipel (Tirard, 2011). De vastes mangroves et lits de rivières sont également présents sur la Grande Terre (Virly, 2008), servant d'abri aux juvéniles de certaines espèces de téléostéens, et constituant des écosystèmes possiblement importants pour les juvéniles (*e.g.* requins marteaux, citrons, bouledogues), bien qu'aucune étude à ma connaissance n'ait caractérisé les assemblages de requins dans les mangroves de Nouvelle-Calédonie.

1.2. Récifs coralliens éloignés et Parc Naturel de la Mer de Corail

Alors que la planète est en train de voir sa sixième extinction massive se dérouler à une vitesse sans précédent (Butchart et al., 2010; Dirzo et al., 2014), certains endroits très éloignés apparaissent aujourd'hui comme des refuges où le fonctionnement des écosystèmes reste relativement inaltéré par la pression humaine. Bien que ces zones éloignées soient dans un état exceptionnel en comparaison avec les zones anthropisées (D'Agata et al., 2016), elles restent néanmoins soumises aux perturbations globales comme le réchauffement climatique, ou à des altérations telles que la pollution par des déchets plastiques amenés par les courants marins (Figure 11).



*Figure 11. Guy Hnaije, matelot sur l'Amborella, le navire océanographique du Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie, ramasse les déchets plastiques accumulés sur les îlots des atolls d'Entrecasteaux.
© Germain Boussarie*

Malgré ces perturbations que l'on peut qualifier d'indirectes, ces écosystèmes éloignés, et notamment les récifs coralliens à plus de 10 à 20 heures de trajet des populations humaines, montrent une diversité de fonctions et des abondances et biomasses en animaux observées nulle part ailleurs (D'Agata et al., 2016; Graham and McClanahan, 2013; Juhel et al., 2017). L'état de ces écosystèmes est probablement très proche de leur état avant l'arrivée de l'Homme, même si aujourd'hui il n'existe plus d'écosystèmes réellement vierges sur la planète (Jones et al., 2018). Ces récifs éloignés et les écosystèmes associés, notamment les îlots coralliens, sont des refuges reconnus pour de nombreuses espèces menacées (*e.g.* oiseaux, tortues, mammifères marins).

Dans le monde entier, seulement 1,5% des récifs coralliens sont à plus de 20 heures de temps de trajet des populations humaines et ne subissent quasiment pas les pressions anthropiques du fait de cet éloignement (Annexe 1). L'archipel de la Nouvelle-Calédonie abrite un tiers de ces récifs très éloignés. Situés pour la plupart au sein des eaux du Parc Naturel de la Mer de Corail (PNMC), ces récifs ont été mis en protection par le Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie au mois d'août 2018, classés en réserves naturelles (catégorie 2 UICN) ou en réserves intégrales (catégorie 1a UICN). Toute pêche est désormais interdite dans ces zones.

A l'extrême ouest, les atolls de Chesterfield-Bellona se situent à mi-chemin entre la Grande Barrière de Corail (GBR) et la Grande Terre de Nouvelle-Calédonie (Figure 8). D'une superficie cumulée de 24 000 km², outre leur richesse et abondance en poissons (D'Agata et al., 2016; Juhel et al., 2017), ces plateaux sont un lieu de prédilection pour la reproduction de plusieurs espèces emblématiques. Les îlots coralliens servent de sites de ponte pour des populations de tortues marines (*Chelonia mydas*) d'Australie et de Nouvelle-Calédonie (Read et al., 2014, 2015), tandis que les eaux du lagon servent de site de mise bas et d'allaitement pour de nombreuses baleines à bosse (*Megaptera novaeangliae*) (Garrigue et al., 2018). De nombreuses espèces d'oiseaux nichent sur les îlots coralliens. La majorité de l'atoll de Chesterfield (6 600 km² dans la partie nord de Chesterfield-Bellona) est en réserve intégrale, ainsi que de nombreuses zones de récifs et d'îlots dans le reste de cette zone (mer-de-corail.gouv.nc). Le reste du plateau Chesterfield-Bellona a été classé en réserve naturelle (17 400 km²).

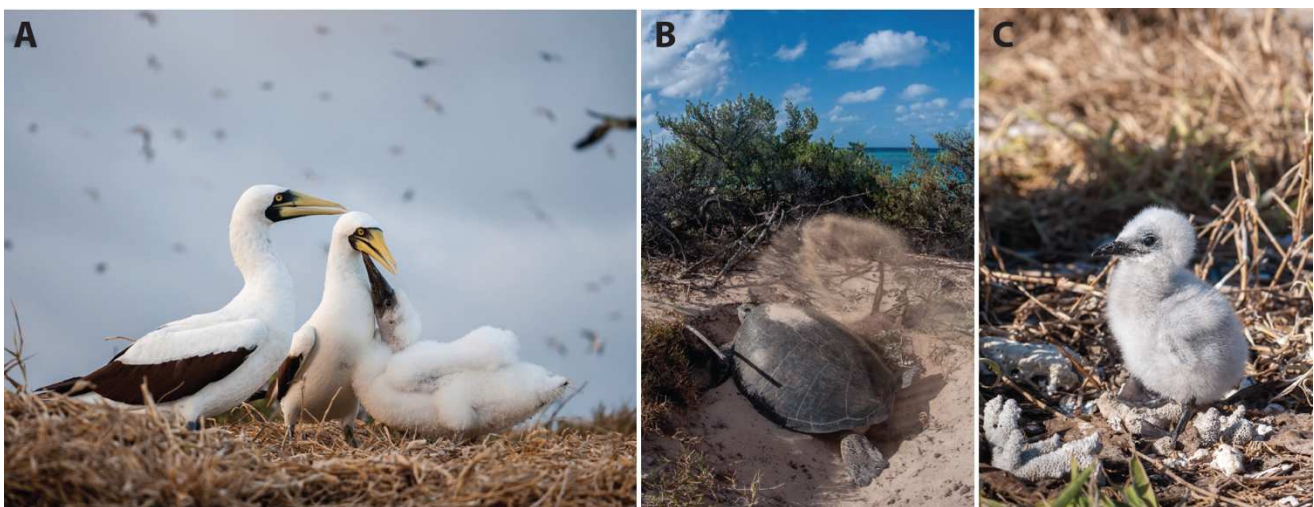


Figure 12. Les îlots coralliens d'Entrecasteaux sont un refuge pour de nombreuses espèces. (A) Fous masqué (*Sula dactylatra*) (B) Tortue verte en train de creuser pour pondre ses œufs (*Chelonia mydas*) (C) Ces îlots servent de nidification pour de nombreux oiseaux marins. © Germain Boussarie

Au nord, les récifs d'Entrecasteaux (Figure 8) couvrent une superficie de 3 240 km² et sont formés de sept atolls de taille très variable et quatre îlots sur lesquels montent en moyenne 47 000 tortues vertes (*Chelonia mydas*) au pic de la période de reproduction (Figure 12). Ce sont également 12 espèces d'oiseaux marins et 30 000 couples nicheurs qui vivent dans ces atolls. Trois de ces atolls, ainsi que trois îlots ont été classés en réserve intégrale, tandis que l'ensemble de ce réseau d'atolls uniques en Nouvelle-Calédonie est une réserve naturelle.

Situés au nord-est de l'archipel, et appartenant à la Ride des Loyautés, les petits atolls et récifs de Pétrie et d'Astrolabe (Figure 8) font respectivement 94 km² et 75 km² (séparés en deux récifs ; Petit et Grand Astrolabe). Ils sont extrêmement riches et c'est là qu'ont été comptés par transects en plongée des biomasses en poissons proches des records mondiaux. Ils sont aujourd'hui classés en réserve intégrale.

Au sud-est de la Grande Terre, à 150 km de l'Île des Pins, se dresse l'île de Walpole (Figure 8). Cette île corallienne d'une altitude de 80 mètres et d'une superficie de 170 ha, a été occupée lors des deux derniers millénaires par des populations océaniques puis exploitée pour le guano au cours de la première moitié du XX^{ème} siècle (Figure 13). Aujourd'hui non habitée, la dégradation des habitats terrestres liée à cette exploitation ainsi que l'introduction de nombreuses espèces envahissantes sont encore bien visibles (Simoni et al., 2014). L'île est entourée d'un étroit récif frangeant au pied de hautes falaises, avec des tombants qui plongent à quelques centaines de mètres de profondeur. Éloignée de l'homme, cette île est réputée riche en requins, même si aucun article scientifique sur ses assemblages de poissons n'a été publié à ce jour.

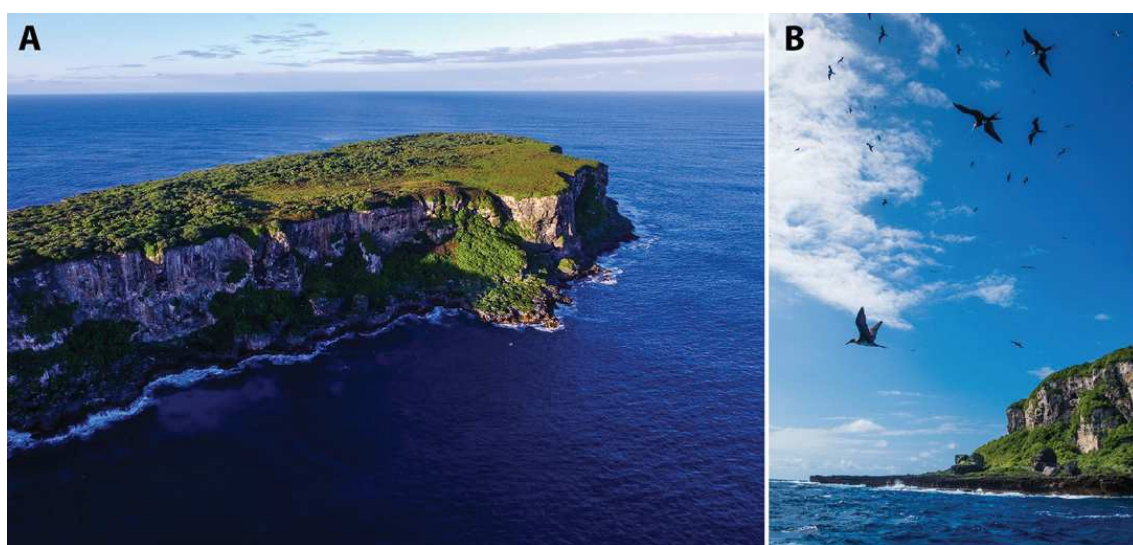


Figure 13. (A) Vue aérienne de l'île corallienne de Walpole avec ses falaises de 80 mètres de haut, son récif frangeant et une végétation rase permettant à de nombreuses espèces d'oiseaux d'y nicher, ici des frégates et fous (B). © Bastien Preuss

Les îles de Matthew et Hunter sont de jeunes îles hautes volcaniques à l'extrême sud-est de l'archipel de Nouvelle-Calédonie, situées de l'autre côté de la Fosse des Nouvelles-Hébrides (Figure 8). Matthew est un volcan toujours en activité, présentant des fumerolles sulfurées, ainsi que des panaches d'oxydes de fer s'échappant dans l'océan (Figure 14). Les flancs de ce volcan plongent très abruptement dans l'océan, si bien qu'un seul site de mouillage est utilisable. Bien que beaucoup d'espèces marines soient des espèces associées aux récifs coralliens, les coraux ne sont que très rares (observations personnelles sur stéréo-vidéos appâtées BRUVS). Les espèces récifales et pélagiques se côtoient, si bien qu'un thon jaune (*Thunnus albacares*) a été remonté comme prise accessoire lors de nos captures de requins, à quelques dizaines de mètres seulement de la paroi rocheuse.

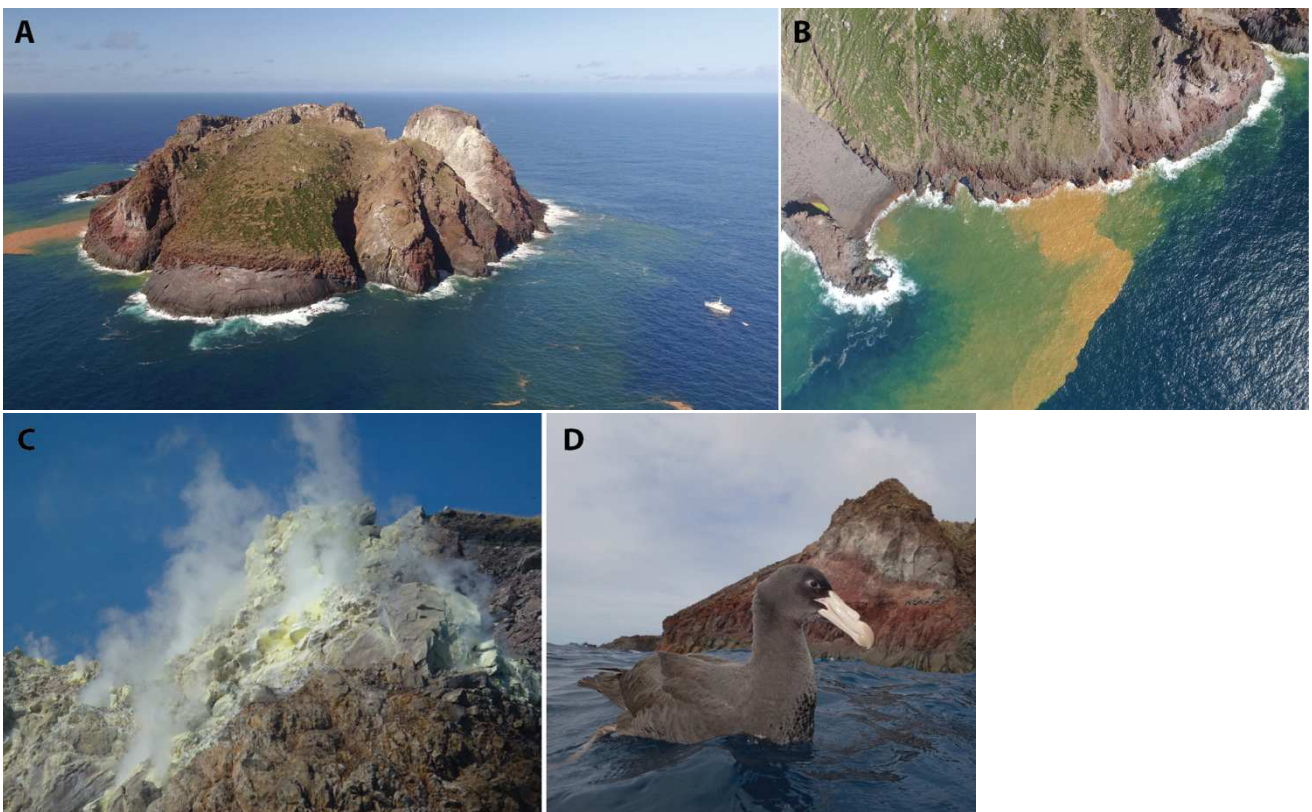


Figure 14. Île volcanique de Matthew.

(A) L'Amborella, navire océanographique du Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie, est présent sur la droite de la photographie et mesure 24 mètres de longueur. D'anciennes coulées de lave sont visibles sur la partie gauche. La végétation est basse et pauvre mais abrite de nombreuses espèces d'oiseaux marins. (B) Panaches d'oxydes de fer. (C) Fumerolles sulfurées s'échappant du flanc de l'île. (D) Rare en Nouvelle-Calédonie, le pétrel géant (*Macronectes giganteus*) a été rencontré lors de notre mission à Matthew. Son envergure peut atteindre plus de deux mètres © Bastien Preuss

1.3. Contexte scientifique sur les requins de Nouvelle-Calédonie

La Nouvelle-Calédonie compte près de 268 000 habitants en 2014, tandis qu'elle en comptait 100 000 à la fin des années 1960. Nouméa, la capitale, abritait près de 180 000 habitants en 2014, soit 67% de la population de l'archipel. En comparaison avec la taille de son récif et l'étendue de sa Zone Économique Exclusive (ZEE de 1,4 millions de km²), le nombre d'habitants est relativement faible et la population est concentrée à Nouméa. Historiquement, la pêche ciblée des requins n'a jamais été développée au niveau industriel dans l'archipel, bien que les marins travaillant dans les pêcheries hauturières racontent qu'ils prélevaient les ailerons des requins lors de leurs pêches. Les pêcheries hauturières et récifales (respectivement 20 et 189 navires professionnels) n'ont débarqué que de faibles quantités déclarées de requins entre 2000 et 2013 (Juhel et al., 2017). Cette pêche des requins a en revanche été interdite en 2014 dans les eaux de Nouvelle-Calédonie (Juhel, 2016).

Les populations de requins de récif de Nouvelle-Calédonie ont été suivies par comptages sous-marins en plongée (*Underwater Visual Census*, UVC), et par stéréo-caméras appâtées (*Baited Remote Underwater Video Station*, BRUVS) (Juhel, 2016; Juhel et al., 2017). Ces travaux ont montré une chute de près de 90% d'abondance de requins de récif en zone anthropisée en comparaison aux récifs éloignés de l'archipel ainsi qu'une forte altération comportementale de *Carcharhinus amblyrhynchos* en réaction à un appât en zone anthropisée (Juhel et al., 2019). Enfin, ce travail montre une faible efficacité des AMPs pour les requins de récif lorsque celles-ci sont relativement proche de l'homme (Juhel et al., 2017). Au regard de la pêche négligeable des requins au cours des 15 dernières années en Nouvelle-Calédonie, Juhel et al. (2017) suggèrent que cette chute drastique d'abondance pourrait être due à un certain nombre de facteurs comme l'existence d'un effet historique, de braconnage ou bien une sensibilité particulière des requins aux pressions avec notamment l'augmentation de l'activité plaisancière (Gonson et al., 2016), la pollution minière (Fabricius, 2005), la destruction des habitats ainsi que la pression de pêche hauturière et récifale impliquant une diminution de la disponibilité en proies.

Pour finir, les autres travaux ayant eu lieu sur les requins en Nouvelle-Calédonie portent principalement sur le déplacement des grands requins tels que les requins tigres (Werry et al., 2014) ou les requins bouledogues (Werry and Clua, 2013).

2. CAMPAGNES OCÉANOGRAPHIQUES

2.1. Contexte et challenges

Dans le cadre du projet APEX et de cette thèse, j'ai participé à neuf missions océanographiques à bord du navire océanographique du Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie, l'Amborella (Figure 15), dont trois en tant que chef de mission scientifique. Celles-ci se sont déroulées entre Juin 2015 et Juillet 2017 et ont duré chacune entre 10 et 17 jours. Le gouvernement de la Nouvelle-Calédonie, partenaire du projet APEX, a mis son navire à disposition pour effectuer des missions de suivi de la mégafaune marine au sein du PNMC. Cinq scientifiques et cinq membres d'équipage ont participé à chaque mission (capacité maximale de l'Amborella).

Le but des premières missions a été de mettre en place un réseau de récepteurs acoustiques et de marquer et d'échantillonner (voir ci-après) des requins de récif, afin de répondre aux questions de cette thèse et de celle de Lucas Bonnin (Encadré 3). Les conditions météorologiques en Nouvelle-Calédonie sont très variables, avec par moments une houle conséquente et un vent continu atteignant très souvent 20 nœuds, compliquant les travaux sous-marins et la capture des requins. L'objectif des deux premières missions était, outre le réseau de récepteurs à mettre en place, de capturer un nombre donné de requins sur chaque station des atolls de Chesterfield et d'Entrecasteaux. Les deux missions qui ont suivi ont permis de réaliser quelques captures supplémentaires et de relever les données des récepteurs acoustiques dans ces même zones. Deux autres missions ont permis d'échantillonner les zones éloignées de Matthew et Walpole, puis de l'Astrolabe. Enfin, les deux dernières missions se sont de nouveau concentrées sur Chesterfield et Entrecasteaux.



Figure 15. Navire océanographique du Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie, l'Amborella, de 24 mètres de long. Son annexe, un semi-rigide (non visible sur ces photographies), permet ensuite d'accéder aux sites de plongée et de réaliser la capture des requins. © Jean-Michel Boré

Durant ce temps, un échantillonnage a été réalisé sur plusieurs mois (janvier à septembre 2016) dans la zone de Nouméa, la capitale, avec des sorties à la journée sur le Diodon et l'Archamia, navires côtiers de l'IRD. Une journée entière de pêche dans cette zone permettait la capture de 0 à 3 requins, ce qui explique que nous ayons dû passer plus de 20 jours en mer sur les récifs d'Aboré (réserve marine) et de Kué, au large de Nouméa, pour à peine 38 requins capturés, en comparaison à 51 requins capturés en deux jours à Petit Astrolabe.

De plus, après avoir reçu une autorisation d'échantillonnage dans la réserve intégrale de Merlet, dans le Grand Lagon Sud, nous y avons réalisé une mission de quelques jours. La balance entre la logistique dans cette zone relativement éloignée et le peu ou même l'absence de captures pendant des journées entières de pêche dans cette réserve intégrale nous ont contraint à abandonner l'étude de cette zone. Cet échec dans la réserve Merlet est en accord avec les travaux de Juhel et al. (2017, 2019) indiquant un effet réserve positif mais relativement faible sur les abondances et le comportement des requins à Merlet, avec des animaux présents en faible nombre et ayant un comportement fuyant envers le dispositif de BRUVS.

2.2. Planning et objectif de chaque mission

Cette partie détaille pour chaque mission les objectifs attendus et réalisés.

Mission 1 : Atolls d'Entrecasteaux et Grand Lagon Nord

DATES 15 Juin – 1^{er} Juillet 2015, 17 jours

OBJECTIF INITIAL Mettre en place le réseau acoustique (44 récepteurs), capturer au moins 40 *C. amblyrhynchos* à Entrecasteaux et 40 au niveau du Grand Lagon Nord.

OBJECTIF RÉALISÉ 44 récepteurs placés, 43 *C. amblyrhynchos* capturés, ainsi que 2 *C. albimarginatus* à Entrecasteaux. 19 *C. amblyrhynchos* et 4 *C. albimarginatus* au Grand Lagon Nord (GLN).

Mission 2 : Récifs de Chesterfield

DATES 1^{er} au 10 Septembre 2015, 10 jours

OBJECTIF INITIAL Mettre en place le réseau acoustique (8 récepteurs) et capturer au moins 40 *C. amblyrhynchos*. Échantillonnage d'ADN environnemental (ADNe).

OBJECTIF RÉALISÉ 8 récepteurs placés, 41 *C. amblyrhynchos* capturés, ainsi qu'un *C. albimarginatus*. 6 *C. amblyrhynchos* additionnels capturés à Entrecasteaux, ainsi qu'un *C. albimarginatus*. Prélèvements d'ADNe réalisés.

Mission 3 : Atolls d'Entrecasteaux et Grand Lagon Nord

DATES 9 – 20 Novembre 2015, 12 jours

OBJECTIF INITIAL Relever le réseau acoustique et capturer des requins gris afin d'atteindre le nombre de 40 dans le GLN (objectif de la première mission). Capturer également d'autres *C. albimarginatus*. Échantillonnage d'ADN environnemental (ADNe).

OBJECTIF RÉALISÉ Récepteurs relevés, 27 *C. amblyrhynchos* additionnels capturés, dépassant ainsi l'objectif initial de 40, ainsi que 11 *C. albimarginatus* dans le GLN. Deux *C. amblyrhynchos* additionnels capturés à Entrecasteaux. Prélèvements d'ADNe réalisés.

Mission 4 : Atolls d'Entrecasteaux et Grand Lagon Nord

DATES 17 – 28 Mai 2016, 12 jours

OBJECTIF INITIAL Relever le réseau acoustique. Échantillonnage d'ADN environnemental (ADNe).

OBJECTIF RÉALISÉ Récepteurs relevés. Deux *C. amblyrhynchos* additionnels capturés au GLN. Prélèvements d'ADNe réalisés.

Mission 5 : Îles de Walpole et Matthew

DATES 20 Juin – 1^{er} Juillet 2015, 12 jours

OBJECTIF INITIAL Capture de *C. amblyrhynchos* et *C. albimarginatus* sur les îles de Walpole, Matthew et Hunter. Déploiement de BRUVS pour une collaboration avec le projet Global FinPrint. Échantillonnage d'ADN environnemental (ADNe).

OBJECTIF RÉALISÉ Les objectifs des BRUVS ont été atteints, bien que des raisons techniques et logistiques nous ont contraint à limiter cette mission aux zones de Walpole et Matthew, et à rediriger une partie de l'échantillonnage sur la Corne Sud. Ont été réalisées à Walpole et Matthew respectivement 27 et 36 captures de *C. amblyrhynchos*, mais seulement 3 *C. albimarginatus*. Prélèvements d'ADNe réalisés.

Mission 6 : Récifs de Petit et Grand Astrolabe

DATES 18 – 29 Juillet 2016, 12 jours

OBJECTIF INITIAL Capture de *C. amblyrhynchos* et *C. albimarginatus*. Test et déploiement de caméras embarquées sur *C. amblyrhynchos*. Déploiement de BRUVS pour une collaboration avec le projet Global FinPrint. Échantillonnage d'ADN environnemental (ADNe).

OBJECTIF RÉALISÉ Les objectifs des BRUVS ont été atteints. Ont été réalisées sur Petit et Grand Astrolabe respectivement 51 et 46 captures de *C. amblyrhynchos*, mais seulement un *C. albimarginatus*. Malheureusement, après des tests convaincants et un déploiement réussi, les caméras embarquées ont été perdues, ce qui a eu pour conséquence de rediriger ma thèse à ce moment. Prélèvements d'ADNe réalisés.

Mission 7 : Récifs de Chesterfield

DATES 3 – 13 Octobre 2016, 11 jours

OBJECTIF INITIAL Relève des récepteurs acoustiques. Échantillonnage d'ADN environnemental (ADNe).

OBJECTIF RÉALISÉ Récepteurs acoustiques relevés. Prélèvements d'ADNe réalisés.

Mission 8 : Atolls d'Entrecasteaux et Grand Lagon Nord

DATES 14 – 25 Novembre 2016, 12 jours

OBJECTIF INITIAL Relève des récepteurs acoustiques. Échantillonnage d'ADN environnemental (ADNe). Compléter l'échantillonnage de *C. amblyrhynchos*, et augmenter le nombre de *C. albimarginatus* capturés.

OBJECTIF RÉALISÉ Récepteurs acoustiques relevés. Prélèvements d'ADNe réalisés. Capture à Entrecasteaux et au GLN de respectivement 3 et 5 *C. amblyrhynchos*, et 14 et 1 *C. albimarginatus*.

Si l'on additionne l'ensemble de ces missions ainsi que les sorties à la journée dans les zones de Nouméa et du lagon Sud (réserve Merlet), et si l'on ne prend pas en compte les semaines passées à l'organisation logistique et administrative de ces missions, j'ai passé au cours de cette thèse plus de 120 jours en mer.

3. MANIPULATION DES REQUINS ET APERÇU DE L'ÉCHANTILLONNAGE

Le déroulement de l'échantillonnage des requins au cours des missions est détaillé dans cette sous-partie, depuis la mise en place du matériel de pêche jusqu'à la remise en liberté des animaux.

3.1. Matériel et méthode de capture

Il existe différentes méthodes adaptées pour l'étude directe des populations de requins.

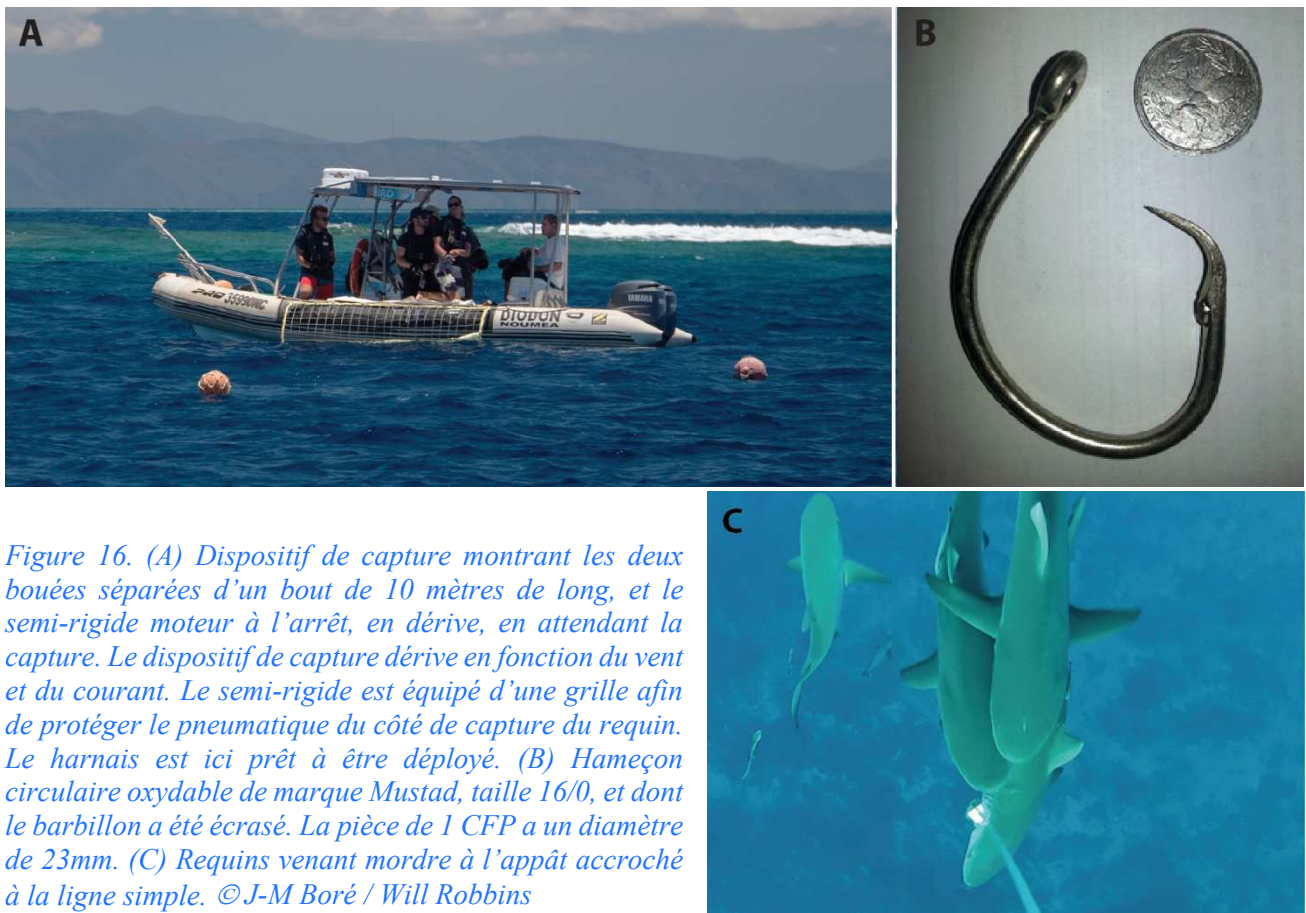
La première consiste à embarquer en tant qu'observateur sur des navires commerciaux afin d'observer et/ou marquer les requins qui sont capturés soit comme prise accessoire, soit comme cible directe. Il est ainsi possible d'obtenir des données de densité, de structure, et de dynamique des populations. Bien que cette méthode soit très efficace pour obtenir des données rapidement, elle n'est pas adaptée pour les nations qui ont interdit les prélèvements de requins (comme la Nouvelle-Calédonie) et qui utilisent des techniques de pêche réduisant le nombre de prises accessoires. De plus, les zones aujourd'hui réglementées (*e.g.* réserves naturelles) ne peuvent pas être étudiées de cette manière. C'est le cas d'une majorité des récifs éloignés de l'archipel de Nouvelle-Calédonie (voir 1.2).

Une autre méthode consiste à appâter en fournissant soit des morceaux de poisson, soit du sang et des fragments de chair de poisson (broumé), ou bien à accompagner des compagnies de tourisme pratiquant le nourrissage. L'avantage est qu'il est possible de prélever des échantillons à distance par biopsie, sans capturer le requin, et donc de fortement limiter l'impact des prélèvements réalisés sur les individus. Cela nécessite par exemple l'utilisation d'une perche depuis un bateau (Meyer et al., 2018), ou d'un fusil sous-marin (Mourier et al., 2013b). Dans des conditions très particulières, il est également possible de travailler en plongée sous-marine sur un requin sans le capturer, en le plongeant en immobilité tonique via une torsion du lobe terminal de la nageoire caudale. Mise en lumière par l'équipe scientifique travaillant en collaboration avec Laurent Ballesta, cette méthode spectaculaire ne permet d'effectuer des prélèvements que dans des conditions anecdotiques.

La méthode de capture la plus utilisée par les scientifiques est la palangre. Des hameçons sont installés en série sur une ligne laissée à la dérive ou ancrée. Elle est parfaitement adaptée à une pêche dans des milieux calmes (*e.g.* pêche de juvéniles de requin bouledogue, *Carcharhinus leucas*, dans les Everglades) et présentant une faible densité de requins. Si cette densité est plus forte, et compte tenu du fait que le temps pour réaliser les prélèvements n'est pas instantané (~10-20 minutes), les requins resteraient longtemps à l'hameçon dans le cas où plusieurs mordraient en même temps, avant que l'on

puisse mieux les oxygéner puis les relâcher. Cela peut avoir des conséquences néfastes voire mortelles pour certaines espèces de requins (Brooks et al., 2012; Gallagher et al., 2014). D'autres, comme *Carcharhinus leucas*, résistent très bien au manque d'oxygène lié à l'immobilisation. De plus, dans un milieu très dynamique comme les récifs de pente externe de Nouvelle-Calédonie, les lignes de pêche et les bouées auxquelles elles sont attachées sont soumises aux courants marins et au vent qui les font souvent dériver à une vitesse élevée. La ligne dériverait donc très vite, soit vers le large, soit vers le récif. Dans la première situation, les hameçons ne pêcheraient que très peu de temps au niveau du tombant, et dans le deuxième cas, la ligne se prendrait dans les coraux du platier. Le maniement en urgence ou avec une fréquence trop élevée d'une palangre dans les deux situations ne serait techniquement pas envisageable, du fait du temps important nécessaire pour relever les lignes.

La technique de pêche la plus adaptée à la capture des requins de récif en Nouvelle-Calédonie est donc la ligne simple. Une ligne de 10 mètres est attachée à une bouée, elle-même reliée à une autre bouée par une corde de 10 mètres de long (Figure 16). Cet engin de pêche relativement maniable permet donc une relève rapide afin de sortir la ligne avant qu'elle n'atteigne les récifs (et pourrait alors capturer des téléostéens récifaux non ciblés ou se prendre dans les coraux), ou encore pour la remettre proche du tombant si elle dérive vers le large. La deuxième bouée permet d'effectuer une traction suffisante si un requin de taille importante est capturé, et permet de mieux visualiser la direction de dérive de la ligne. Ainsi, lors de nos missions, nous avons déployé jusqu'à deux lignes de ce type à la fois, afin de pouvoir intervenir régulièrement en cas de dérive trop rapide, ou rapidement en cas de capture.



3.2. Capture et manipulation

Lors de la prise de l'appât, si l'hameçon prend bien, la différence de pression sur la ligne entraîne un mouvement des bouées facilement observable. L'intervention sur un requin pris à la ligne est donc dans beaucoup de cas très rapide, de l'ordre de moins d'une minute. L'étude de la réponse comportementale du requin à la capture a fait l'objet d'un stage de 2^{ème} année de License par Julie Buttin que j'ai encadrée sur ce sujet. Elle a ainsi analysé des vidéos prises par des caméras de type GoPro que nous avons fixé à la ligne de pêche afin de pouvoir observer et quantifier la réaction directe de capture.

Une fois les bouées récupérées, le requin est remonté doucement, mais généralement en moins d'une minute. Une fois proche de la surface, le requin est placé dans un harnais en toile (Figure 17). La personne à l'avant prend la ligne et sécurise la tête du requin tout en lui couvrant les yeux à l'aide du harnais pour le calmer. La personne à l'arrière sécurise la queue de l'animal, ce qui lui permet également de se calmer. Le harnais est ensuite ouvert à l'avant, permettant d'oxygéner le requin tout au long de la procédure en enclenchant la marche avant de l'embarcation au ralenti.

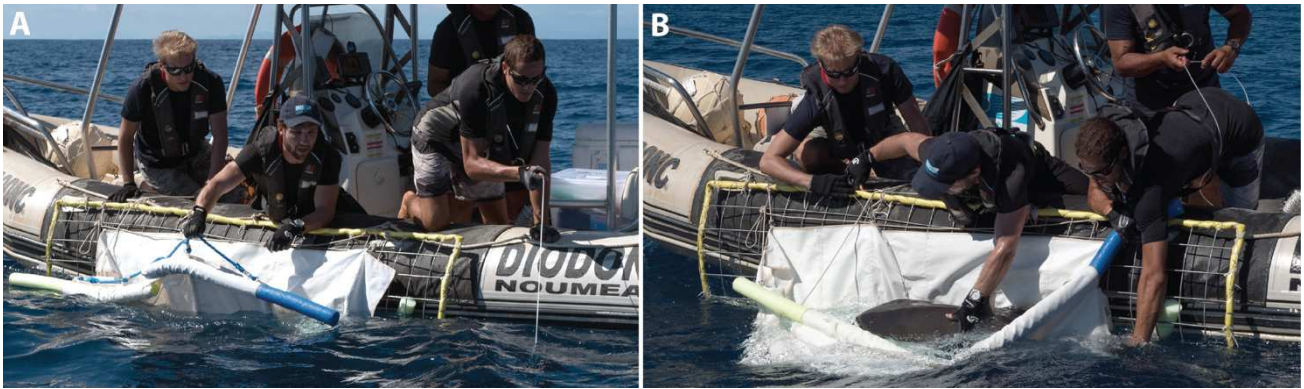


Figure 17. Procédure de capture des requins. (A) L'animal est remonté doucement tandis que le harnais est maintenu ouvert. (B) Le requin est glissé dans le harnais. La personne à l'avant sécurise le requin en maintenant la ligne tendue à l'avant, et la personne à l'arrière maîtrise la queue de l'animal.

Une fois le requin placé dans cette position, les mesures et prélèvements peuvent commencer. La seule manipulation du requin qui aura lieu en dehors de la remise en liberté sera le retournement afin d'effectuer un prélèvement sanguin et d'insérer un émetteur acoustique.

3.3. Mesure et sexage de l'individu

Chaque requin remonté est ensuite mesuré et sexé après détermination de l'espèce. En Nouvelle-Calédonie, 26 espèces de requins habitant les eaux peu profondes sont présentes (Tirard, 2011). Leur reconnaissance est très facile, et contrairement à certains endroits dans le monde comme en Australie (Johnson et al., 2017), il n'y a pas d'espèce qui pose problème à l'identification. Les espèces capturées autres que *C. amblyrhynchos* et *C. albimarginatus* ont été relâchées après un prélèvement de matériel génétique.

Plusieurs mesures existent pour estimer la taille des requins capturés. Trois mesures ont été réalisées, à l'aide d'un décimètre souple (Figure 18) : la longueur standard (*precaudal length*, PCL), mesurée depuis le bout du museau et le creux précaudal ; la longueur à la fourche (*fork length*, FL), mesurée jusqu'à l'encoche postérieure ; la *stretched total length* (STL), mesurée jusqu'à l'extrémité postérieure en passant par le centre de la queue, au niveau du creux précaudal. Cette dernière mesure est particulièrement pertinente pour les requins dont le lobe dorsal de la nageoire caudale est souvent plus développé que le lobe ventral.



Figure 18. Aperçu des mesures effectuées sur chaque individu capturé. PCL = precaudal length = « longueur standard », FL = fork length = « longueur à la fourche », et STL = stretched total length. Le sexe des individus est facilement identifiable, avec la présence ou absence de ptérygopodes (organes reproducteurs mâles) plus ou moins calcifiés selon la maturité. © Illustration Marc Dando

Le sexe des individus est ensuite facilement identifiable, de même que le stade de maturité sexuelle pour les individus mâles. Les ptérygopodes sont les organes reproducteurs mâles chez les requins (Figure 18). Ils sont peu développés et mous dans les premiers stades de vie. Ils se calcifient au cours de la croissance et sont durs une fois la maturité sexuelle atteinte. Pour les femelles, seule la taille peut nous renseigner de manière non invasive sur le stade de maturité sexuelle.

3.4. Résumé des prélèvements

Sur chaque requin capturé (pour *C. amblyrhynchos* et *C. albimarginatus*), plusieurs échantillons sont prélevés : peau, muscle, sang et microbiome (Figure 19). Selon la station de capture, une balise acoustique est insérée dans la cavité abdominale. Ne faisant pas partie des problématiques de cette thèse, le marquage acoustique et l'échantillonnage du microbiome ne seront présentés que succinctement et ne seront pas traités dans ce manuscrit. Les prélèvements d'ADN environnemental seront détaillés dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

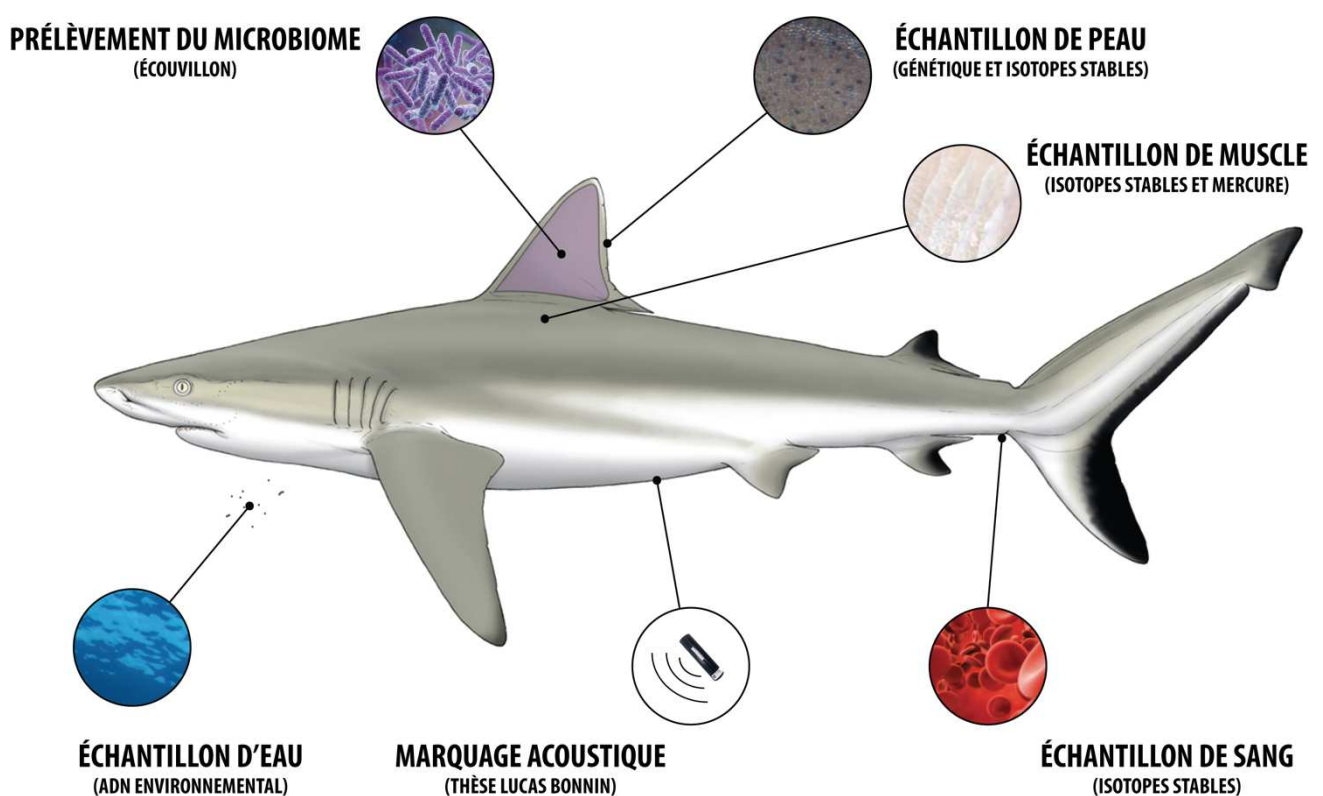


Figure 19. Résumé des prélèvements effectués sur le requin une fois celui-ci capturé. L'ADN environnemental est un cas à part qui sera traité dans la partie suivante de ce manuscrit. © Illustration Marc Dando

3.5. Prélèvement génétique

L'équivalent d'un centimètre carré de tissu (peau) est prélevé sur la marge postérieure de la nageoire dorsale (Figure 19), grâce à des ciseaux de type Lister. Cette partie de la nageoire est fine et ne présente ni nerfs, ni vaisseaux sanguins, ni cartilage. Cet échantillon de peau est ensuite divisé en deux. La première moitié est directement mise dans un tube vissé de 2 mL contenant de l'éthanol 80% et servira pour les analyses de génétique. La quantité prélevée est largement suffisante pour permettre plusieurs extractions d'ADN tout en laissant une partie comme banque de données utilisable par la suite. La seconde moitié est mise dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, pour une congélation future et l'analyse des isotopes stables.

3.6. Prélèvement pour analyse des isotopes stables et du mercure

En plus de l'échantillon de peau, des échantillons de muscle et de sang sont prélevés sur chaque requin capturé, selon le plan d'échantillonnage établi pour chaque objectif scientifique.

La peau étant trop résistante pour effectuer un prélèvement de muscle directement, une incision de deux centimètres est réalisée au scalpel, légèrement en-dessous de la base de la nageoire dorsale. Une biopsie est ensuite réalisée grâce à un *biopsy punch* (Figure 20). La lame est changée pour chaque requin, et le *biopsy punch* est désinfecté entre chaque prélèvement. L'échantillon de muscle ainsi obtenu est ensuite placé dans un tube Eppendorf de 1,5 mL pour congélation future. La congélation du

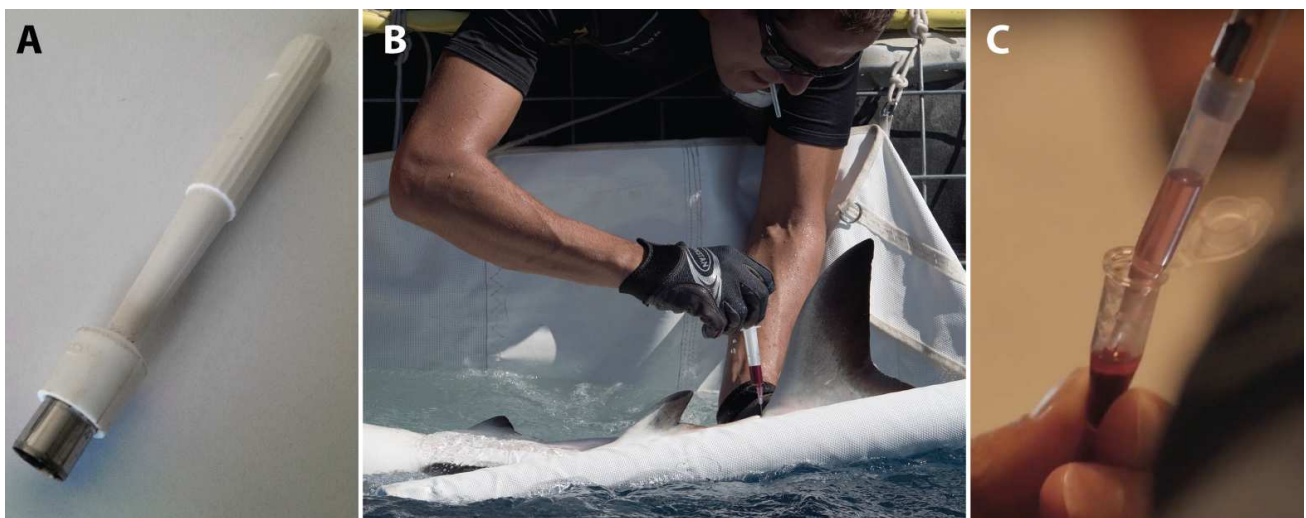


Figure 20. Prélèvement de muscle et de sang pour l'analyse des isotopes stables et du mercure. (A) Biopsy punch, un outil permettant le prélèvement de muscle, utilisé ici sur les requins (8 cm de long). (B) Prélèvement de 4 mL de sang, effectué sur la veine à la base de la nageoire caudale. (C) Séparation des globules rouges et du plasma par centrifugation. © J-M Boré

muscle permet, en comparaison avec une préservation dans l'éthanol, de ne pas altérer les valeurs de $\delta_{13}\text{C}$ (Kim and Koch, 2012).

Le requin est ensuite retourné sur le dos, et la personne à l'arrière effectue un prélèvement de 4 mL de sang en atteignant la veine à la base de la nageoire caudale, à la verticale du creux précaudal. Cette prise de sang est effectuée avec une seringue de 5 mL ainsi qu'une aiguille de type 18G x 1 ½. Seringue et aiguille sont jetées après chaque prélèvement. Environ 1 mL de sang est placé directement dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et le reste du sang prélevé est placé dans un tube à héparine lithium permettant d'empêcher sa coagulation et ainsi séparer ses composants à une étape ultérieure. Il a été montré que cet anticoagulant n'avait pas d'effet sur les isotopes stables (Kim and Koch, 2012).

L'ensemble des échantillons est aussitôt placé dans une glacière. De retour au laboratoire ou au bateau océanographique, le sang contenu dans le tube à héparine est centrifugé afin de séparer les globules rouges du plasma (Figure 20C). Chaque phase est ainsi placée dans un ou plusieurs tubes Eppendorf, et les échantillons sont ensuite congelés à -20°C .

3.7. Marquage acoustique

Dans le cadre de la thèse de Lucas Bonnin et selon un plan d'échantillonnage précis et donc en fonction des stations, les requins capturés ont été marqués avec un émetteur acoustique (VEMCO, V16). Une fois le requin dans le harnais et retourné sur le dos, une incision de 2 à 3 centimètres est réalisée au scalpel sur le ventre de l'individu (Figure 21). Un émetteur acoustique est ensuite inséré dans la cavité abdominale. Deux points de suture sont ensuite réalisés grâce à des pinces hémostatiques, une aiguille recourbée ainsi que du fil de suture biodégradable.

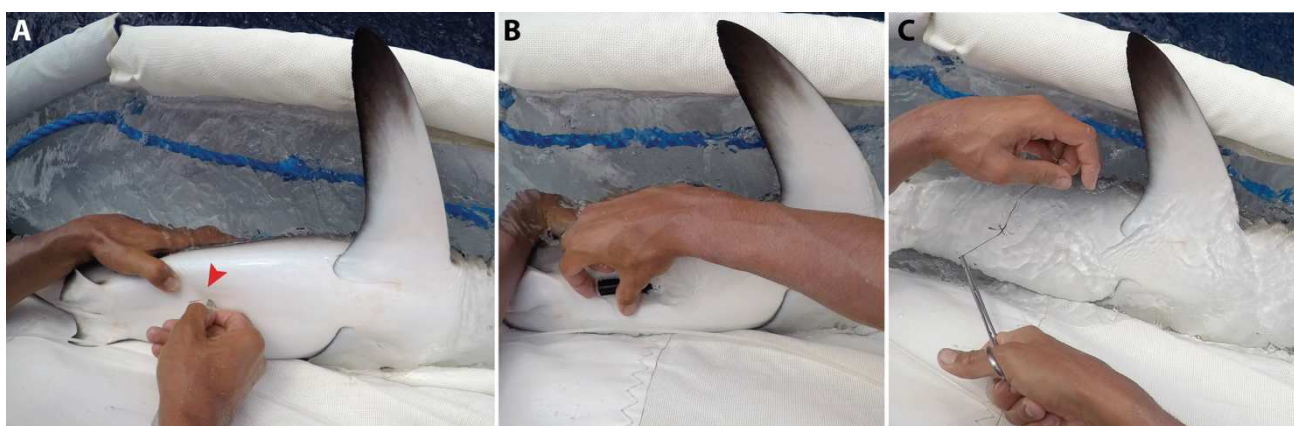


Figure 21. Marquage acoustique des requins. (A) Incision de 2-3 cm sur le ventre à l'aide d'un scalpel. (B) Insertion de l'émetteur acoustique (VEMCO V16) dans la cavité abdominale. (C) Points de suture. © J-M Boré

3.8. Échantillonnage du microbiome

Dans le cadre du projet MICMAC, porté par l'UMR MARBEC (Thierry Bouvier) et ayant fait l'objet de la thèse de Marlène Chiarello (Chiarello, 2017), le microbiome des requins a été investigué dans le but de participer à la création d'un inventaire de biodiversité des micro-organismes peuplant la couche superficielle des macro-organismes récifaux. Décrire cette biodiversité est important car identifier les services biogéochimiques qu'elle assure permettra de mieux comprendre les conséquences de la perte de biodiversité des récifs coralliens observée aujourd'hui, incluant les micro-organismes.

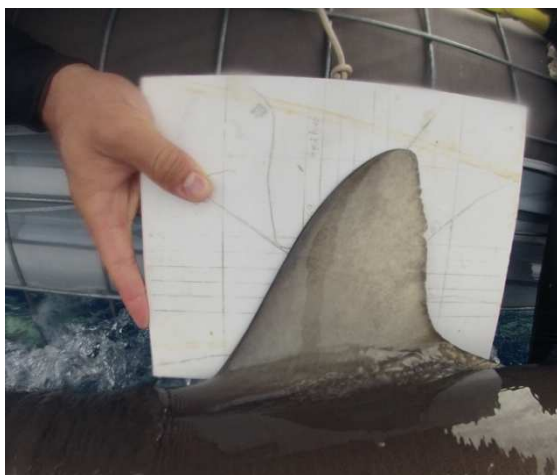


Figure 22. Photographie de la nageoire dorsale d'un requin pour lequel le microbiome a été échantillonné en grattant la surface avec un écouvillon après rinçage à l'eau stérile.

Pour ce faire, outre des échantillons d'eau prélevés le jour des captures à chaque site d'échantillonnage afin d'obtenir des bases de référence, le microbiome cutané a été étudié sur une partie des requins capturés. Après rinçage avec de l'eau stérile, et seulement dans le cas où la nageoire dorsale du requin n'a rien touché d'autre que l'eau environnante durant toute la remontée, l'ensemble de la surface du côté extérieur au bateau est gratté à l'aide d'un écouvillon. Une fois le prélèvement réalisé, une photographie de la nageoire est réalisée pour mesurer la surface échantillonnée avec une

échelle de référence afin de standardiser les mesures (Figure 22).

L'ensemble de la manipulation se déroule avec des gants en latex et l'écouvillon est aussitôt jeté s'il touche autre chose que la nageoire du requin. Dans ce cas, le prélèvement n'a finalement pas lieu sur ce requin. Il en est de même pour le tube s'il entre en contact avec quelque chose avant sa fermeture (y compris les éclaboussures). Cette manipulation n'est donc réalisable que dans des conditions météorologiques clémentes.

3.9. Vidéo embarquée

Lors de la mission 6 (juillet 2016) aux récifs de l’Astrolabe, des tests et déploiements de caméras embarquées sur les requins ont été réalisés. Ces aspects sont évoqués dans la discussion de ce manuscrit.

3.10. Éthique et impact potentiel de la capture et du marquage

Le nombre de requins capturés au cours des différentes missions ne représente qu’une très faible proportion de la taille totale des populations. Les stations de capture sont espacées de plusieurs kilomètres et chaque campagne de pêche ne dure que peu de temps. Le risque d’habituation à l’appât, *i.e.* l’altération comportementale liée à cette activité de pêche, est donc probablement très faible.

La capture et la manipulation des requins peuvent potentiellement se révéler dangereuses pour les animaux si certaines bonnes pratiques ne sont pas mise en place. Les procédures suivantes ont été utilisées afin de minimiser tout risque pour les animaux :

- ✓ Déploiement d’une à deux lignes de pêche à la fois et intervention rapide sur les animaux dès leur capture.

- ✓ Utilisation d’hameçons circulaires oxydables (Figure 16). Ces hameçons sont utilisés pour maximiser les chances de se prendre au niveau de la bouche de l’animal. En cas d’avalé de l’appât, ils glissent à l’intérieur du requin sans s’accrocher, jusqu’à l’arrivée dans la bouche où ils se prennent au niveau de la sortie (Figure 23). Les hameçons « en J » s’enfoncent en revanche directement dans l’estomac si l’appât est avalé. Le fait que ces hameçons soient oxydables assure une dégradation rapide si jamais ils sont accrochés trop



Figure 23. Les hameçons circulaires ont une plus forte probabilité de s’enfoncer au niveau de la bouche, ce qui permet de pouvoir le retirer facilement et de ne pas blesser l’animal. © J-M Boré

profondément à l'intérieur de l'animal pour être retirés. Même si la littérature montre qu'il existe des cas de perforation gastriques entraînant des complications graves pour les animaux (Borucinska et al., 2001), ceux-ci demeurent très rares.

- ✓ Utilisation d'un harnais qui diminue le stress en cachant les yeux et limitant les mouvements.
- ✓ Prélèvements de petites quantités de peau, sang et muscle, que nous pouvons considérer comme négligeables, même pour les plus petits requins.
- ✓ Utilisation d'outils jetables (seringues, aiguilles, lames de scalpel) ou réutilisables mais désinfectés entre chaque capture (à l'aide de Dakin). L'émetteur acoustique est inerte et est également trempé dans du désinfectant plusieurs minutes avant son insertion.
- ✓ Intervention de faible durée, de l'ordre de 5 à 15 minutes par individu. Cet intervalle très court permet de réduire les effets physiologiques néfastes de la capture.

De nombreuses études impliquant la capture de requins et leur marquage à l'aide d'émetteurs acoustiques indiquent que *C. amblyrhynchos* supporte les procédures de marquage puisque la plupart de ces requins fournissent des données jusqu'à la fin de vie des émetteurs. Par exemple, 26 des 29 *C. amblyrhynchos* capturés et marqués par Speed et al. (2011), indiquent des détections régulières longtemps après leur remise en liberté dans le réseau acoustique (323 jours). De la même manière, Heupel and Simpfendorfer (2015) indiquent des signaux acoustiques détectés dans leur réseau jusqu'à 832 jours après le marquage des animaux. Les mêmes techniques de capture et de marquage acoustique ont été utilisées durant le projet APEX.

Enfin, le système immunitaire des requins est très performant, et permet une cicatrisation très rapide des plaies (Chin et al., 2015). Les requins subissent de nombreuses blessures dues à une compétition intra-spécifique lors de la reproduction (mâles envers femelles lors de l'accouplement ou mâles entre eux). La recapture d'un requin trois mois après son marquage a permis d'observer la cicatrisation de l'incision faite lors de l'insertion de l'émetteur dans la cavité abdominale (Figure 24). Seule une marque de couleur différente est visible, la plaie recousue a donc cicatrisé rapidement et

sans infection. Cette observation permet de soutenir l'hypothèse du faible impact du protocole utilisé de capture et marquage.





*Figure 24. Cicatrisation parfaite de l'incision réalisée sur un requin (ici *Carcharhinus albimarginatus*) trois mois avant sa recapture.*

4. BILAN DE L'ÉCHANTILLONNAGE RÉALISÉ

Au total, ce sont 404 requins qui ont été capturés au cours de cette thèse, dont 349 *Carcharhinus amblyrhynchos*, 43 *C. albimarginatus*, 8 *C. melanopterus* (requin à pointes noires de récif) et 4 *Triaenodon obesus* (requin corail, également appelé requin à pointes blanches du lagon). Pour des raisons techniques, logistiques, ou des erreurs de manipulation, certains échantillons n'ont pas été prélevés sur quelques-uns de ces requins capturés. Le Tableau 1 et la Figure 25 montrent un récapitulatif des échantillons prélevés pour chaque grande zone de capture de cette étude.

Tableau 1. Bilan des prélèvements effectués au cours de cette thèse pour les deux espèces principalement étudiées : le requin gris de récif, *Carcharhinus amblyrhynchos*, et le requin à pointes blanches de récif, *Carcharhinus albimarginatus*.

	 <i>Carcharhinus amblyrhynchos</i>				 <i>Carcharhinus albimarginatus</i>			
	ADN	Hg $\delta^{13}\text{C}/\delta^{15}\text{N}$	Télémetrie	Microbiome	ADN	Hg $\delta^{13}\text{C}/\delta^{15}\text{N}$	Télémetrie	Microbiome
Chesterfield	40	39	40	0	1	1	0	0
Entrecasteaux	54	44	45	0	17	17	17	0
Grand Lagon Nord	51	38	41	2	16	14	13	1
Petit Astrolabe	51	0	0	20	0	0	0	0
Grand Astrolabe	46	0	0	0	1	0	0	0
Lagon Sud	39	35	28	10	4	4	2	0
Walpole	27	16	0	8	1	1	0	0
Matthew	36	36	0	26	2	2	2	0
TOTAL	344	208	154	64	42	39	34	1

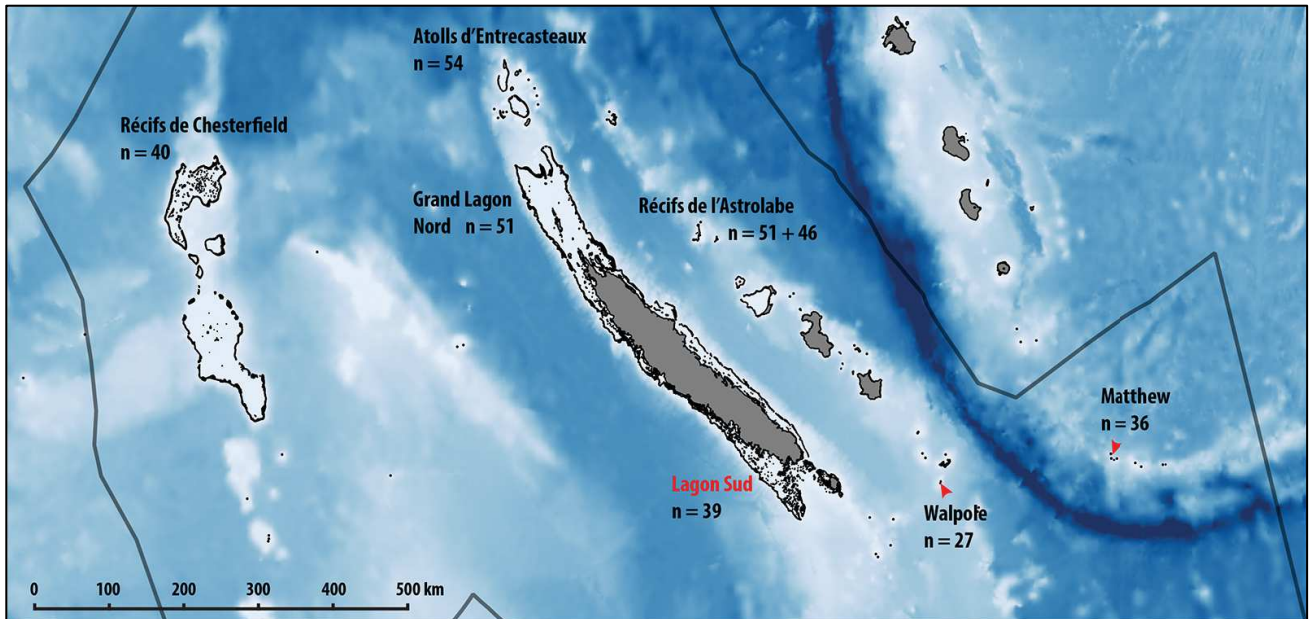


Figure 25. Bilan de l'échantillonnage montrant les sites de prélèvements. Les chiffres indiquent pour chaque zone le nombre de requins pour lesquels les études de génétique ont été réalisées.

PARTIE I

**DÉTECTER ET PROTÉGER LES ESPÈCES RARES ET
MOBILES : UN DÉFI RELEVÉ PAR
L'ÉTUDE DE L'ADN ENVIRONNEMENTAL ?**

VERS DE NOUVELLES MÉTHODES D'ÉTUDE DES COMMUNAUTÉS DE REQUINS

1. INTRODUCTION

1.1. L'ADN environnemental (ADNe)

Les organismes laissent des traces dans l'environnement au sein duquel ils évoluent. Ces traces peuvent être de différentes provenances et contiennent en général l'information génétique de l'organisme qui les a laissées derrière. Nous pouvons penser à des cellules de la peau perdues par desquamation, des poils, des fluides corporels, des déchets métaboliques, ou encore des gamètes ou du sang (Bohmann et al., 2014; Taberlet et al., 2012b). L'analyse de l'ADNe est ainsi basée sur la collecte de ce matériel génétique par prélèvement de matériel environnemental (*e.g.* sol, humus, sédiment, neige, eau). L'ADN des organismes macroscopiques peut alors être présent sous plusieurs formes dans l'environnement : comme ADN libre, intracellulaire, ou lié à des particules (Thomsen et al., 2012). En revanche, l'ADNe est principalement présent sous forme de fragments plus ou moins longs, à cause d'une dégradation relativement rapide dépendant de l'influence de nombreux paramètres biotiques et abiotiques (Barnes and Turner, 2016; Barnes et al., 2014; Turner et al., 2014). Les études analysant l'ADNe se focalisent généralement sur des fragments courts, de moins de 100 à quelques centaines de paires de bases (Ficetola et al., 2008; Minamoto et al., 2012), provenant d'ADN mitochondrial (ADNmt), présent en de nombreuses copies dans la cellule, contrairement à l'ADN nucléaire (Wilcox et al., 2013).

L'analyse de l'ADNe est en train d'émerger comme une nouvelle méthode non invasive permettant la détection et l'identification d'espèces rares et furtives dans toute une diversité d'écosystèmes (Bohmann et al., 2014; Pedersen et al., 2015; Thomsen and Willerslev, 2015). Grâce aux avancées récentes dans le séquençage de nouvelle-génération (NGS), l'étude de l'ADNe est devenue une méthode rapide de suivi, non invasive et économique avec une diminution conséquente des coûts de séquençage (Taberlet et al., 2012a).

DURÉE DE VIE DE L'ADN ENVIRONNEMENTAL

Dans certaines conditions de préservation exceptionnelle dans des sédiments, des fragments d'ADN peuvent être conservés dans l'environnement pendant des dizaines de milliers d'années (Pedersen et al., 2015; Slon et al., 2017; Willerslev et al., 2003). Il n'en est pas de même pour des environnements dynamiques comme l'océan, plus exposés à la dégradation. Plusieurs facteurs biotiques et abiotiques influencent la durée de vie de l'ADN environnemental (Barnes and Turner, 2016; Barnes et al., 2014; Strickler et al., 2015; Turner et al., 2014) et de nombreuses d'études se sont penchées sur la question avec des expériences en milieu contrôlé ou en milieu naturel (Dejean et al., 2011; Minamoto et al., 2017; Pilliod et al., 2014; Thomsen et al., 2012). Les résultats divergent mais s'accordent sur un ordre de grandeur de demi-vie de l'ADNe dans les milieux aquatiques de quelques heures à quelques jours, mais une dernière étude de la persistance de l'ADN environnemental dans le milieu marin donne des valeurs autour de 24h en milieu côtier à 48h en milieu pélagique (Collins et al., 2018).

1.2. Approche ciblée ou métabarcoding

Les analyses d'ADN environnemental peuvent aujourd'hui se diviser globalement en deux approches. La première consiste à étudier une seule espèce cible (barcoding d'ADNe), tandis que la seconde étudie un panel plus diversifié d'espèces (métabarcoding d'ADNe). Le barcoding d'ADNe vise à détecter les fragments d'une seule espèce par réaction en chaîne par polymérase (PCR) ou via des méthodes dérivées de la PCR, e.g. PCR quantitative, qPCR (Sigsgaard et al., 2016), ou encore droplet-digital PCR, ddPCR (Baker et al., 2018). La vérification de l'appartenance des fragments d'ADN amplifiés est souvent vérifiée par séquençage de Sanger (Baker et al., 2018; Mahon et al., 2013; Sigsgaard et al., 2016). Le métabarcoding d'ADNe, correspondant à une approche multi-espèces, permet d'identifier de manière simultanée de multiples organismes sans avoir besoin de savoir *a priori* quelle espèce est présente (Valentini et al., 2016b; Yamamoto et al., 2017). Cette approche ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour les études de suivi de la biodiversité car elle a le potentiel de caractériser toute une communauté d'espèces simultanément dans un site donné et grâce à un seul prélèvement (Miya et al., 2015; Port et al., 2016a). Cette approche de métabarcoding est basée sur du séquençage de nouvelle-génération, couplé à l'utilisation de marqueurs taxonomiques assez généraux, permettant d'amplifier les fragments d'ADN de nombreuses espèces en même temps (Miya et al., 2015; Taberlet et al., 2012a). L'approche adoptée dans ce manuscrit est une approche de métabarcoding, centrée sur l'étude simultanée de plusieurs espèces de requins.

1.3. L'ADN environnemental dans le cadre de la conservation des requins

Avant les travaux de ce manuscrit, plusieurs études se sont intéressées aux Élasmobranches via une approche d'analyse de l'ADN environnemental, en se focalisant notamment sur des espèces en danger. Elles utilisent cependant des approches de barcoding qui ne ciblent qu'une seule espèce à la fois (Gargan et al., 2017; Simpfendorfer et al., 2016; Weltz et al., 2017). Une étude, bien qu'assez limitée dans sa transposabilité à d'autres situations, s'est même penchée sur la structure des populations de requins baleines grâce à l'emploi de deux marqueurs relativement longs (Sigsgaard et al., 2016). Très prometteuses, ces approches ne sont toutefois pas applicables lorsque l'on s'intéresse au suivi simultané de nombreuses espèces rares et furtives, et donc difficilement détectables.

Une approche d'analyse de l'ADN environnemental par métabarcoding n'a jamais été développée pour les Élasmobranches, et la faisabilité d'une telle méthode dans un milieu aussi dynamique qu'un récif corallien reste donc à démontrer. La première étape consiste à développer une approche de ce type, ce qui amène à la question présentée dans l'introduction :

- (A) L'étude des communautés de requins de récif est-elle réalisable via l'analyse de l'ADN environnemental ?

1.4. Plan d'échantillonnage

Afin de vérifier la faisabilité de l'étude des requins via la collecte et l'identification de l'ADN environnemental, des prélèvements d'eau ont tout d'abord été réalisés de manière opportuniste au cours de premières missions de terrain qui étaient déjà très chargées. Par la suite, un échantillonnage plus conséquent (10 échantillons par site en pente externe et 10 en récif intérieur) a été réalisé afin de proposer des pistes d'études plus poussées. Bien que j'aie également contribué à la réalisation de cet échantillonnage et au prétraitement des échantillons, cette deuxième vague d'échantillonnage ne sera pas présentée dans ce manuscrit. La Figure 26 détaille les grandes zones de prélèvement.

Les premières missions n'ont permis de réaliser que 22 prélèvements d'eau pour analyse de l'ADN environnemental. En revanche, bien que leur nombre soit relativement faible, ces échantillons ont tous été prélevés en pente externe de récif corallien et dans des zones très contrastées : en zone

anthropisée dans les récifs Aboré et Kué au large de Nouméa, et dans les récifs éloignés de Chesterfield, d'Entrecasteaux, et de la partie nord du Grand Lagon Nord (GLN).

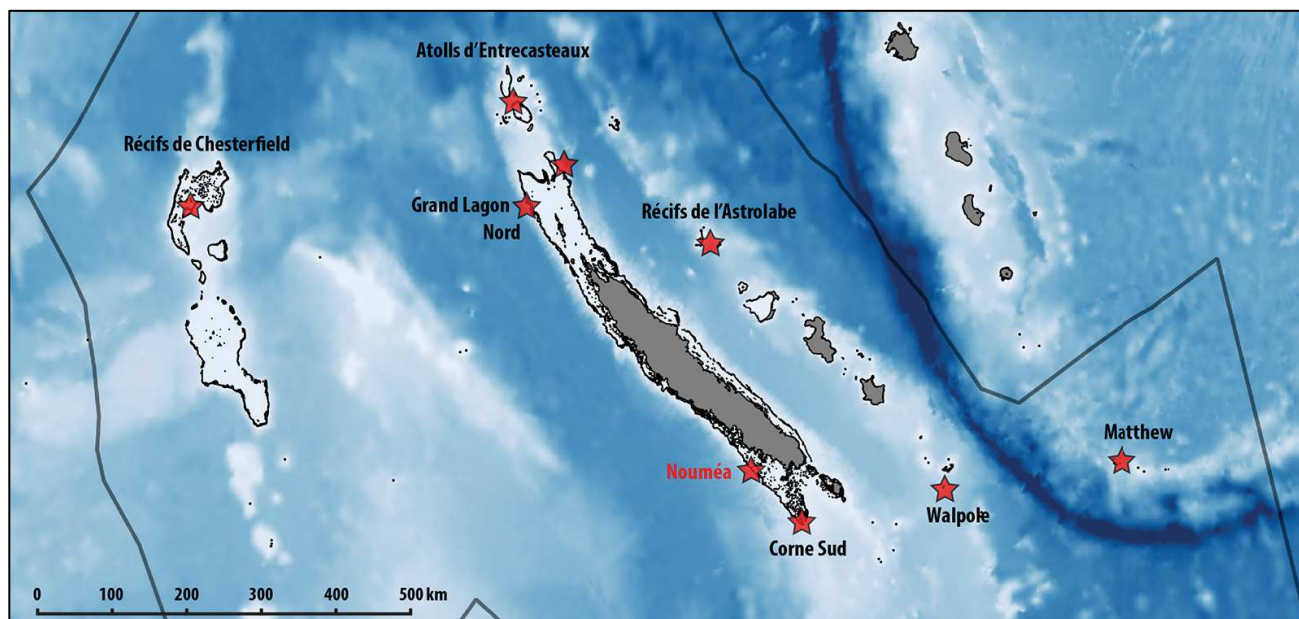


Figure 26. Carte d'échantillonnage montrant les sites de prélèvements d'ADN environnemental au cours de cette thèse.

1.5. Sur le terrain

Les prélèvements d'eau ont été effectués grâce à une bouteille Niskin, permettant de cibler une profondeur donnée (Figure 27). Ils ont tous été réalisés à la même distance du récif, en pente externe de récif corallien et à deux profondeurs (5 et 20 m), sur des fonds de maximum 40 mètres. Deux litres de chaque échantillon provenant des deux profondeurs différentes ont ensuite été rassemblés en un seul échantillon de 4 litres, afin d'augmenter les probabilités de capture de l'ADN environnemental. Deux répliques ont été prélevés sur chaque site au même moment, totalisant deux fois 4 litres, afin de filtrer dans un second temps à deux porosités différentes (0,22 μm et 0,45 μm).



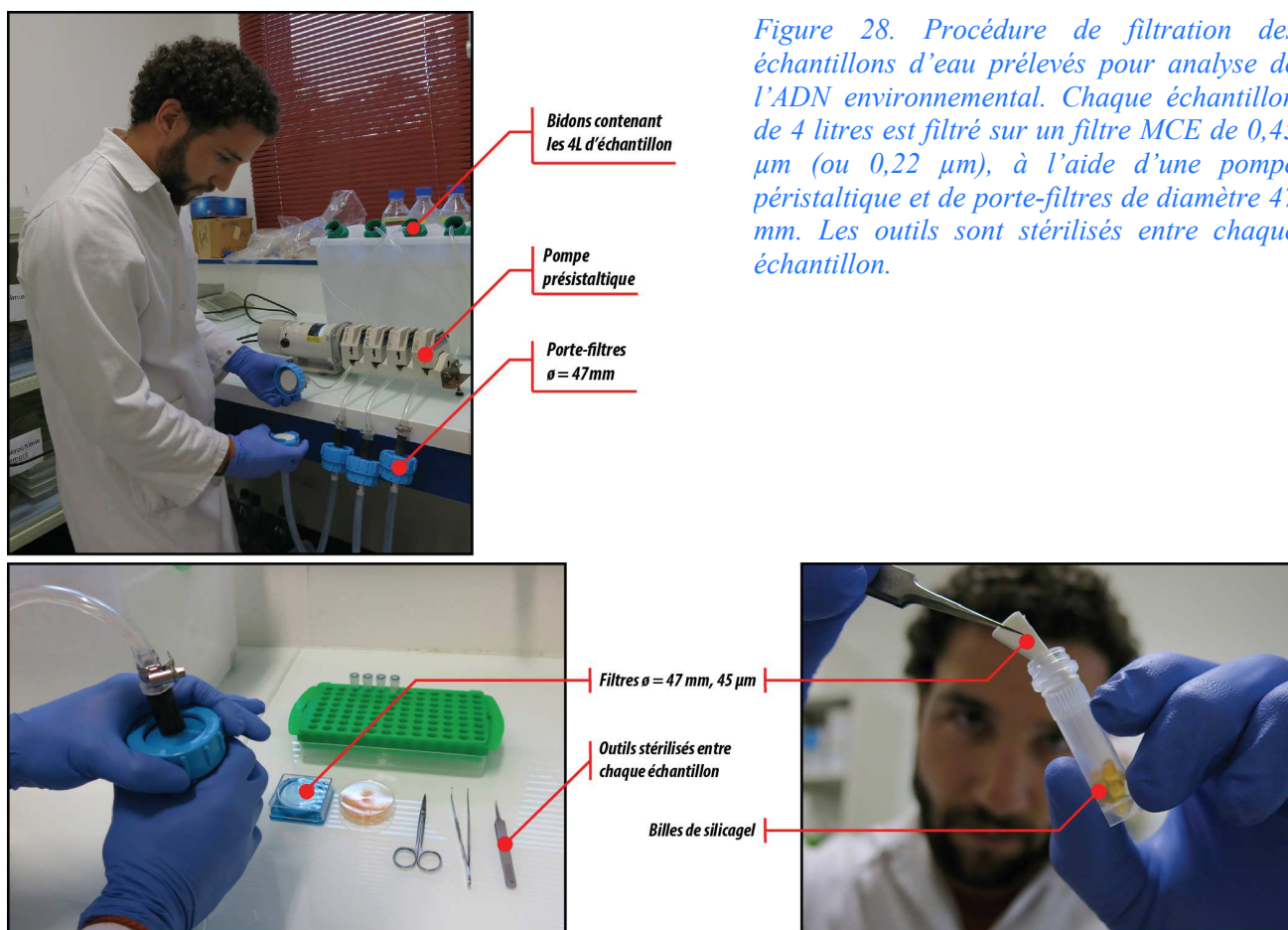
Figure 27. Bouteille Niskin permettant de prélever de l'eau à une profondeur choisie.

Les bouteilles contenant les échantillons d'eau ont ensuite été mises le plus rapidement possible dans une glacière sur l'annexe servant à accéder aux sites d'échantillonnage afin de limiter la dégradation de l'ADN, avant d'être congelées de retour au bateau

océanographique. Des doutes ont été émis sur l'impact de la congélation-décongélation sur la détectabilité de l'ADNe (Yamamoto et al., 2016), mais la possibilité d'avoir une pompe sur le bateau a été testée et n'a pas été compatible avec (i) les conditions de travail rendant très compliquée la maîtrise des contaminations potentielles (ii) le rythme en mission rendant les heures de filtration après une longue journée de travail – incluant entre autres plusieurs plongées – très difficiles.

1.6. Prétraitement en laboratoire

De retour au laboratoire, chaque échantillon de 4 litres a été décongelé puis filtré à l'aide de filtres en esters de cellulose (MCE) de taille de pores soit de 0,22 μm , soit de 0,45 μm (Figure 28). Les filtres ont ensuite été pliés et tamponnés pour évacuer l'excédent d'eau puis placés dans des tubes vissés de 2 mL contenant des billes de silicagel de couleur changeante en fonction de leur degré d'humidité. Les billes ont ainsi été vérifiées une heure après et changées si nécessaire. Les tubes contenant les filtres secs ont enfin été placés à -20°C pour conservation avant extraction.



CONTRÔLE DE LA CONTAMINATION

Un des grands défis associés à l'étude de l'ADN environnemental est d'éviter au maximum les fausses détections (faux positifs principalement). A cause de la sensibilité des méthodes d'analyse de l'ADN environnemental, un des plus gros obstacles est le risque de contamination à toutes les étapes du protocole. Cette contamination peut se produire lors de la préparation de l'équipement d'échantillonnage, lors du prélèvement – ADN cible pouvant être transporté d'un site à un autre, menant à de faux positifs – ou encore pendant les étapes d'extraction et de traitement en laboratoire. Un protocole strict de contrôle et de limitation de la contamination a ainsi été suivi en prévention.

Des bouteilles sèches laissées longuement à la lumière du soleil ont été utilisées, et la bouteille Niskin ainsi que le matériel de transvasement ont été rincés minutieusement avant et après chaque déploiement. Des gants jetables ont été utilisés et changés entre chaque échantillon. Les outils (pinces, ciseaux) ont été stérilisés entre chaque échantillon à l'éthanol 100% et à la flamme, puis refroidis à l'eau stérile. Une fois la filtration effectuée, le matériel de filtration (tubes et porte-filtres) est mis à tremper pendant quelques heures dans de l'eau de javel diluée puis rincé et mis à sécher sous hotte afin d'éliminer toutes traces d'ADN. Dans le laboratoire à la *University of Salford*, des salles séparées ont été utilisées en fonction des étapes de préparation des échantillons : extraction d'ADN environnemental, préparation avant amplification, et procédures post-PCR. Des contrôles négatifs ont également été réalisés à plusieurs étapes pour toutes les préparations des bibliothèques et séquençages (filtration d'eau distillée, blancs d'extraction d'ADN dans du buffer d'extraction, et blancs de PCR).

1.7. Participation personnelle à ce travail

Ces échantillons préliminaires ont été prélevés et traités dans le but de réaliser une étude de faisabilité de la méthode d'analyse de l'ADN environnemental par metabarcoding sur les requins en conditions naturelles. Cette étude a été menée en collaboration avec Stefano Mariani, porteur du projet SeaDNA et professeur à la *University of Salford* (Manchester, UK). Le développement de la méthode d'analyse des échantillons d'ADN environnemental depuis l'extraction d'ADN jusqu'au séquençage et traitement bio-informatique a fait l'objet d'une thèse, réalisée par Judith Bakker, doctorante à la même université. Dans le cadre de cette thèse, Dr. Bakker a effectué des missions d'échantillonnage dans les Caraïbes, une zone géographique où les requins sont très rares (excepté aux Bahamas).

J'ai donc organisé l'échantillonnage pour la partie Pacifique de l'étude, en Nouvelle-Calédonie où les densités de requins sont fortes, notamment dans les récifs éloignés, permettant de réaliser des tests pertinents de faisabilité de la méthode. J'ai ainsi participé à la création du plan d'échantillonnage (bien qu'en partie opportuniste), au développement et à l'optimisation de la méthode sur le terrain et en prétraitement en laboratoire. Enfin, j'ai activement participé au traitement statistique des données et à la rédaction du premier manuscrit qui est présenté dans ce chapitre (Article 1).

[2. ARTICLE 1 - Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact](#)

Résumé en Français : Les requins sont des prédateurs emblématiques, jouant un rôle important au sein des réseaux trophiques. Leur vulnérabilité face à la surexploitation les a récemment dévoilés comme espèces phares dans la conservation des écosystèmes marins. Pourtant, l'estimation et le suivi de la distribution et de l'abondance de telles espèces mobiles dans l'environnement marin reste un véritable défi, souvent nécessitant l'utilisation de méthodes invasives et le déploiement de moyens considérables. Dans cette étude, nous développons une nouvelle approche de metabarcoding de l'ADN environnemental (ADNe), rapide et non-invasive, ciblant de manière spécifique la présence, diversité et abondance de fragments détectés d'ADNe de requins dans les habitats tropicaux. Nous avons identifié la présence de 21 espèces de requins, provenant d'échantillons d'eau de mer des Caraïbes ainsi que du Pacifique Sud-Ouest. Les patrons géographiques de diversité et d'abondance de fragments détectés coïncident avec les différences dans le degré de pression anthropique et d'efforts de conservation mis en place. Nous démontrons que le metabarcoding de l'ADNe peut être employé de manière efficace pour étudier la diversité des requins. Bien que des développements plus approfondis soient nécessaires dans ce domaine, cette approche a le potentiel d'améliorer de manière drastique notre capacité à évaluer et suivre les prédateurs marins furtifs, menant alors à l'implémentation de meilleures stratégies de conservation.

L'article, publié dans *Scientific Reports* le 4 Décembre 2017, est disponible à l'adresse suivante : <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17150-2>

Les données associées sont publiées en ligne à cette adresse, dans la partie « *Electronic supplementary material* », mais deux de ces fichiers (les plus pertinents) sont également présentés après le texte principal :

Supplementary Table S1: data file containing information on sites and reads.

Supplementary Methods S3: metabarcoding pipeline for COI Elasmobranchii Fields et al. primers.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact

Judith Bakker¹, Owen S. Wangensteen¹, Demian D. Chapman², Germain Boussarie^{3,4}, Dayne Buddo⁵, Tristan L. Guttridge⁶, Heidi Hertler⁷, David Mouillot³, Laurent Vigliola⁴ & Stefano Mariani¹

Sharks are charismatic predators that play a key role in most marine food webs. Their demonstrated vulnerability to exploitation has recently turned them into flagship species in ocean conservation. Yet, the assessment and monitoring of the distribution and abundance of such mobile species in marine environments remain challenging, often invasive and resource-intensive. Here we pilot a novel, rapid and non-invasive environmental DNA (eDNA) metabarcoding approach specifically targeted to infer shark presence, diversity and eDNA read abundance in tropical habitats. We identified at least 21 shark species, from both Caribbean and Pacific Coral Sea water samples, whose geographical patterns of diversity and read abundance coincide with geographical differences in levels of anthropogenic pressure and conservation effort. We demonstrate that eDNA metabarcoding can be effectively employed to study shark diversity. Further developments in this field have the potential to drastically enhance our ability to assess and monitor elusive oceanic predators, and lead to improved conservation strategies.

Oceanic ecosystems are increasingly impacted worldwide. Marine predators are under often unsustainable fishing pressure, which has resulted in several documented cases of stock collapses^{1–3}. Elasmobranch (sharks and batoids) populations specifically have suffered from overexploitation and stock declines^{4–9}. They are key species in virtually all marine trophic webs^{10,11} and have long been in conflict with human societies, due to their perceived competition with fishers¹² or hazardous nature^{13,14}. Owing to their relatively slow growth rate and low fecundity¹⁵, they are also particularly vulnerable to overfishing^{16–18}. Only recently have elasmobranchs become the focus of conservation initiatives^{4,19}, as the importance of these charismatic animals for the maintenance and resilience of healthy ecosystems is widely acknowledged^{20–23}.

The development of management strategies for elasmobranchs depends on accurate population assessments in the field. Yet, currently established survey methods, such as fishing by long-lining or gill-netting, acoustic monitoring, baited remote underwater video (BRUV), underwater visual census (UVC) and fisheries-dependent population surveys, are often resource intensive, selective and dependent on taxonomic expertise, and sometimes invasive and potentially traumatogenic^{24–26}. Therefore, biologists and managers worldwide are faced with considerable challenges due to the high effort and cost associated with the assessment and monitoring of elasmobranch biodiversity, abundance and distribution.

Environmental DNA (eDNA), DNA isolated directly from environmental samples such as soil or water, can be amplified, sequenced and assigned back to its species of origin through (meta)barcoding and has been suggested as an alternative to track species presence and abundance in their environment^{27,28}. Due to its limited persistence in the water column — in seawater even small (100-bp) eDNA fragments degrade beyond detectability within days²⁹ — the detection of eDNA from a specific taxon indicates its recent presence in the environment^{30–32}.

¹Ecosystems & Environment Research Centre, School of Environment & Life Sciences, University of Salford, Salford, M5 4WT, UK. ²Department of Biological Sciences, Florida International University, 11200 S.W., 8th Street, Miami, Florida, 33199, USA. ³MARBECC, UMR IRD-CNRS-UM-IFREMER 9190, Université Montpellier, Languedoc-Roussillon, 34095, Montpellier Cedex, France. ⁴IRD (Institut de Recherche pour le Développement), Laboratoire d'Excellence Labex Corail, UMR IRD-UR-CNRS ENTROPIE, Centre IRD de Noumea, BP A5, 98800, Noumea Cedex, New Caledonia, France. ⁵University of the West Indies, Discovery Bay Marine Laboratory and Field Station, P.O. Box 35, Discovery Bay, St. Ann, Jamaica. ⁶Bimini Biological Field Station Foundation, South Bimini Bahamas, Bahamas. ⁷The SFS Centre for Marine Resource Studies, Turks and Caicos Islands, UK. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.M. (email: s.mariani@salford.ac.uk)

Accordingly, over the past couple of years eDNA methods have increasingly been applied for the detection of rare and invasive species^{33–35}. Moreover, it has been demonstrated that eDNA metabarcoding has the ability to outperform traditional survey methods for diverse taxa, including teleost fish, both in freshwater^{36–39} and in marine ecosystems^{40–42}.

The first reported study to detect elasmobranch eDNA in natural water samples employed DNA barcoding (aiming to detect a single species in the environment), for the detection of the largemouth sawfish (*Pristis pristis*)²⁵. Similarly, a species-specific approach was recently applied to amplify whale shark (*Rhincodon typus*) eDNA from oceanic water samples⁴². On the other hand, eDNA metabarcoding has the potential to simultaneously identify several taxa from an environmental sample²⁸, which is clearly essential for community-level assessments. However, previous studies have encountered challenges concerning elasmobranch specific detection, when applying this multispecific approach^{43,44}. And although three species of elasmobranch have recently been detected in a large-scale marine eDNA study using a primer set designed for teleosts⁴⁵, we are still lacking evidence that eDNA metabarcoding can successfully be applied to describe elasmobranch diversity across a range of natural settings, for the purpose of ecosystem assessment and management.

Here, for the first time, we employ eDNA metabarcoding of natural seawater samples to specifically investigate shark communities in Atlantic and Pacific tropical ecosystems, using a previously published primer set targeting a 127 bp stretch of the mitochondrial COI region⁴⁶. We assess the potential of this low-effort approach for multi-species elasmobranch detection, and specifically examine whether patterns of species diversity and eDNA read abundance, reflect the known degree of anthropogenic impact in two independent tropical marine systems.

In the greater-Caribbean, there has been a long and ongoing history of elasmobranch exploitation, and high anthropogenic pressure in coastal zones has led to the broad-scale depauperation of elasmobranchs on Caribbean reefs^{8,47}. However, many species do still occur in populated areas where strong fishing regulations are in place or where specific shark conservation policies have been enacted⁸. In the Bahamas, for instance, gillnet and long-line fishing have been prohibited since 1991 and their national waters have been declared a shark sanctuary in June 2011, prohibiting directed fishing or even the retention of shark by-catch⁴⁸. In the wider Indo-Pacific region, overfishing and poaching are also responsible for declines in elasmobranch populations⁴⁹; nevertheless, elasmobranchs do still occur in relatively high numbers around remote, isolated locations such as coral reefs on uninhabited atolls in the northern Line Islands⁵⁰ and the Chagos Archipelago⁵¹. Furthermore, although several widely-distributed elasmobranch species are in effect cosmopolitan or circum-tropical, significant biogeographical differences exist between the Caribbean and the Pacific Coral Sea, which allows also for a broad-scale eDNA comparison of community composition.

Elasmobranch species inventories and assessment of geographical distributions based on eDNA metabarcoding could potentially represent an important tool for rapid environmental monitoring and hence influence conservation management and policy decisions. This study represents the first targeted effort that demonstrates the effectiveness of an eDNA metabarcoding approach for the detection and monitoring of elasmobranch communities.

Results

eDNA detection of elasmobranchs. A total number of 2,972,832 reads was obtained from an Illumina MiSeq run of pooled amplicon libraries, built from 55 Caribbean and 22 New Caledonian samples (Fig. 1a,b and Supplementary Table S1). A large part of the sequenced reads (80%) originated from non-specific amplification and were shorter than the target length. After sample assignment, quality and sequence-length filtering, 284,252 reads were left; of which 21,542 could be taxonomically assigned to elasmobranchs (Supplementary Table S1). The number of elasmobranch reads per sample ranged from 0 to 5,205 (Supplementary Table S1). After the removal of singletons (MOTUs in a sample that contained only one read), taxonomic assignment from the sampled locations (Fig. 1a,b) resulted in 22 elasmobranch molecular operational taxonomic units (MOTUs), of which 12 were detected in the Caribbean, 16 in New Caledonia and 9 in both locations. Krona-like plots (Fig. 1c) display the complete taxonomic assignment for each of the sampling locations, while a Principal Component Analysis (PCA) (Fig. 1d) depicts the scattering of all the samples containing elasmobranch reads across the two biogeographic areas. Even though several MOTUs are shared between the two regions, there is still a clear spread in MOTU (species) composition between New Caledonia and the Caribbean. No elasmobranch reads were detected in the two PCR negative controls that were performed and sequenced to detect potential contamination.

Using the 127-bp COI fragment, we did not find a wholly unequivocal correspondence between MOTUs and species; since some MOTUs had 100% sequence identity matches with more than one species in the BOLD database. Although this issue mostly pertained to the genus *Carcharhinus*, which is known to be taxonomically problematic and polyphyletic⁵², it also affected the less speciose *Rhizoprionodon* and *Negaprion*. Consequently, this has also resulted in MOTUs containing sequences from both Coral Sea and Caribbean species that share an identical 127 bp sequence. Thus, for a more reflective separation, these particular MOTUs have been split into their Pacific and Caribbean components (see Supplementary Table S2 for a complete data file of all reads per taxa, per sample).

Elasmobranch diversity and read abundance patterns. The Bahamas is the Caribbean sampling location least subjected to fishing pressure, as a result of its shark sanctuary status; hence, it displays the greatest elasmobranch diversity, composed of 11 different MOTUs (Fig. 2). In the samples from the locations most impacted by anthropogenic disturbances, Jamaica and Belize, only 2 and 1 elasmobranch MOTUs respectively, were detected. A similar pattern is apparent for the New Caledonian samples, where the highest diversity is found in the most remote and pristine locations, the Chesterfield Atolls (11 MOTUs) and New Caledonia North (14 MOTUs). Contrastingly, only 5 elasmobranch MOTUs were detected in the capital, Noumea, the most densely populated area of New Caledonia.

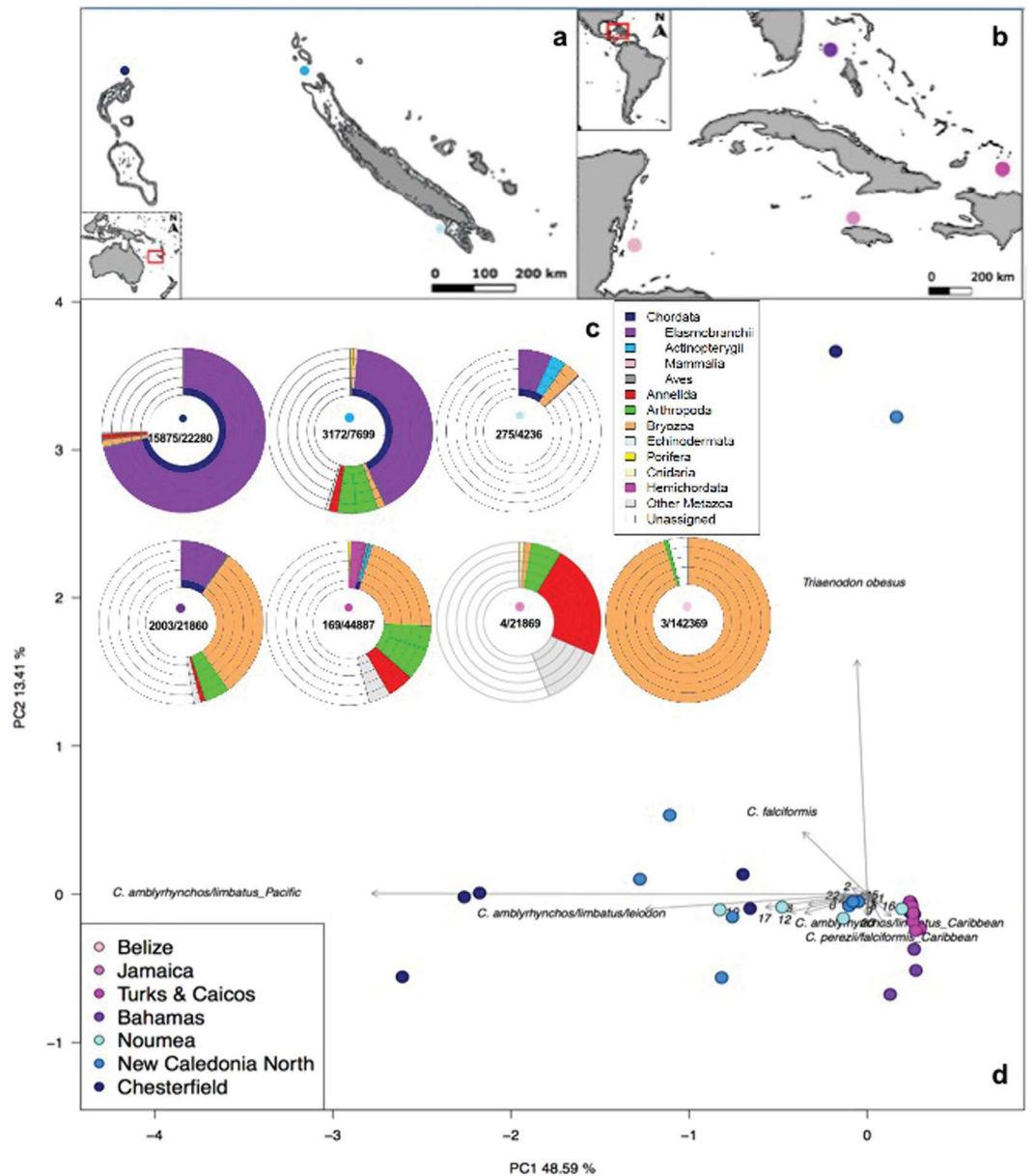


Figure 1. Map of New Caledonian (a) and Caribbean (b) sampling locations. The intensity of dot shading in all panels indicates the level of anthropogenic impact from ‘severely impacted’ (light pink/blue) to ‘least impacted’ (dark pink/blue). The krona-like plots (c) show the complete taxonomic assignment for each of the sampling locations (with elasmobranchs in purple). The different taxonomic levels are represented by the layers of rings, starting with phylum, for the innermost layer, and subsequently class, order, family and genus radiating outwards. In the centre of each location plot, the number of elasmobranch reads compared to the total number of filtered reads, is displayed. The Principal Component Analysis (PCA) (d) depicts the scattering of the samples containing elasmobranch reads, across the two biogeographic areas. The six most discriminating taxa are labelled in full, while the rest are indicated by numbers (following alphabetical order from lines 27–50 in Supplementary Table S2), namely: 1 = *C. acronotus*, 2 = *C. albimarginatus*, 4 = *C. amblyrhynchos/limbatus_Caribbean*, 6 = *C. brachyurus/perezii*, 8 = *C. melanopterus/cautus*, 9 = *C. leucas*, 10 = *C. obscurus/macloiti/longimanus/galapagensis*, 12 = *C. perezii/falciformis_Pacific*, 13 = *C. plumbeus*, 14 = *C. plumbeus/altimus/sorrah*, 15 = *G. cuvier*, 17 = *N. brevirostris/acutidens_Pacific*, 18 = *R. porosus/terraenovae*, 20 = *S. mokarran*, 21 = *D. Americana*, 22 = *S. fasciatum*. Maps made with Natural Earth. Free vector and raster map data @ naturalearthdata.com.

The violin plots of MOTU richness (Fig. 3a) and read abundances (Fig. 3b) show how the different sample values are distributed, by comparing the variable sample size distribution across the different locations. The distribution of density (number of MOTUs, Fig. 3a), and abundance of reads, (Fig. 3b) is represented by the width of the plots. For both the Caribbean (green) and the New Caledonian (blue) locations, MOTU richness (Fig. 3a)

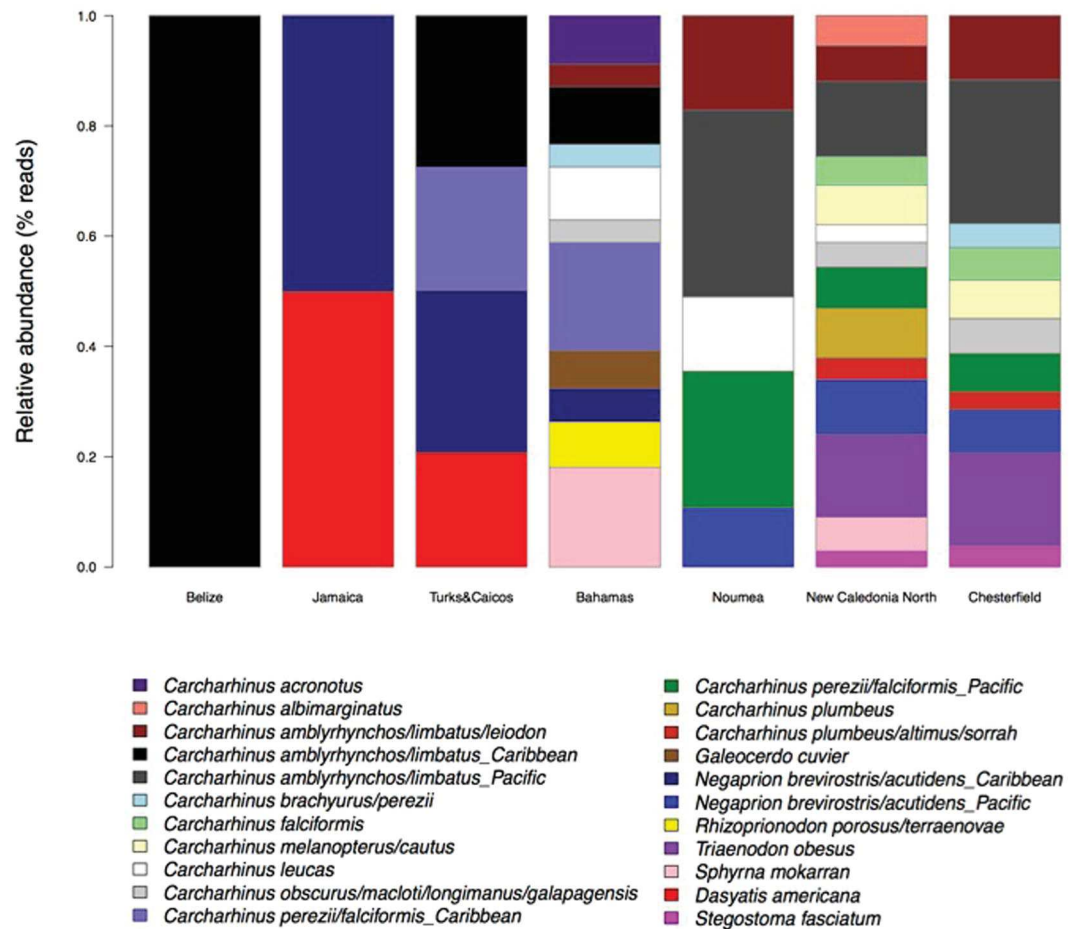


Figure 2. Bar plot showing the relative abundances of reads (fourth-root transformed) for every elasmobranch MOTU detected in the Caribbean and New Caledonian locations.

increases from left to right, following the pattern of decreasing anthropogenic disturbance. While the three least impacted locations, the Bahamas, New Caledonia North and the Chesterfield atolls, show the greatest numbers of MOTUs in one sample (6, 7 and 8 MOTUs respectively), the violin plots for these locations show that richness is more equally spread across the different samples from Chesterfield (thus more samples containing multiple MOTUs); a sample is more likely to contain only 1 or 2 MOTUs in the Bahamas whereas in Chesterfield a sample is more likely to contain 4 or 5 MOTUs. Additionally, every sample from Chesterfield contains at least 3 elasmobranch MOTUs (for detailed MOTU richness per sample, see Supplementary Table S2). The abundance of reads (Fig. 3b) per location follows the same pattern: it increases in both Caribbean and New Caledonian locations, with a decreasing level of human impact. While both New Caledonia North and Chesterfield have samples that contain more than 1000 elasmobranch sequence reads, the number of samples with more than 1000 reads is greater in the more remote Chesterfield atolls. Additionally, Chesterfield is the only location without any samples with less than 80 sequence reads.

Generalized Linear Model (GLM) tests (using location as categorical factor) indicate significant differences in both diversity and read abundance between locations in both the Caribbean and New Caledonia. Pair-wise comparisons (post-hoc Tukey comparisons) show that for diversity (MOTU richness, Fig. 3a), significant differences are detected between the Bahamas and Jamaica ($P = 0.039$) and nearly significant differences between the Bahamas and Belize ($P = 0.095$). While diversity in New Caledonia is significantly different between Chesterfield and Noumea ($P = 0.013$). For read abundances (Fig. 3b), significant differences exist between the Bahamas and the other 3 Caribbean locations ($P < 0.001$). Additionally, read abundances in Turks & Caicos are significantly different from Jamaica ($P = 0.033$) and Belize ($P = 0.047$). In New Caledonia, all abundance comparisons are highly significant ($P < 10^{-10}$).

Species accumulation curves are plotted for each location (Fig. 4). The curves show elasmobranch diversity (MOTU richness) as a function of the number of samples in the locations from the Caribbean (A) and New Caledonia (B). Error bars indicate standard errors after 100 permutations. The results show that none of the Caribbean (Fig. 4a) or New Caledonian (Fig. 4b) samples tend to reach a plateau in MOTU richness, although, with the exception of the Bahamas, the Caribbean slopes tend to flatten after $N = 10$. Non-saturation of species accumulation curves suggests that increased sampling effort would be desirable for capturing total diversity in each location, particularly in the naturally more diverse tropical Pacific.

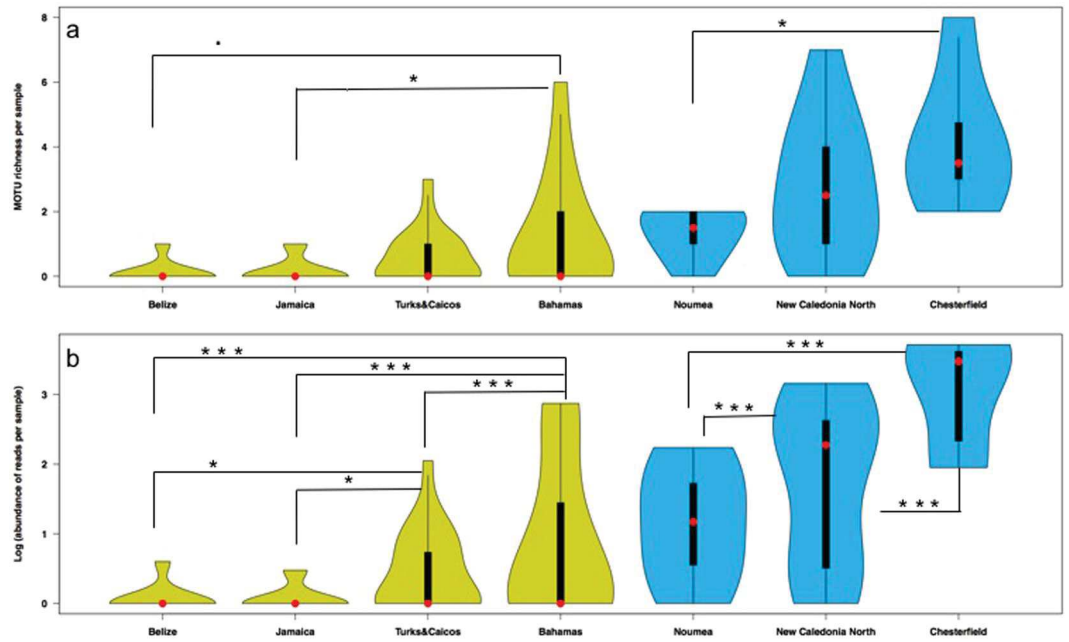


Figure 3. Violin plots showing (a) elasmobranch diversity (MOTU richness) and (b) abundance of reads per sample in the different locations from the Caribbean (green) and New Caledonia (blue). The shapes indicate the density distribution of the samples, extending from the minimum to the maximum observed values. The median values are indicated by the red dots. The thick black bars are the interquartile ranges. The thin black extending lines represent the 95% confidence intervals such that the values in the wider parts of the plots are more probable than those in the narrower parts. Per region, significant differences ($P < 0.05$) are indicated with asterisks. Asterisk significant codes: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, * $P < 0.1$.

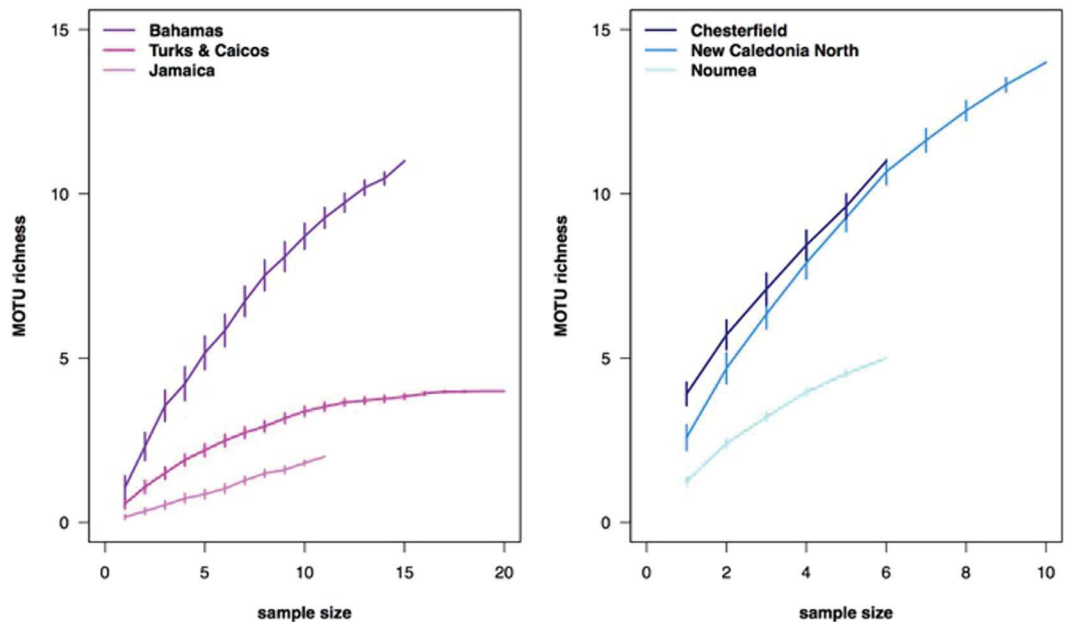


Figure 4. Species accumulation curves showing elasmobranch diversity (MOTU richness) as a function of the number of samples in the locations from the Caribbean (a) and New Caledonia (b). Error bars indicate standard errors after 100 permutations. Belize is absent from the plot as it contains only one elasmobranch MOTU.

Discussion

Our results demonstrate that eDNA metabarcoding can be applied to assess elasmobranch species richness and, potentially, relative abundance in natural seawater samples, the two main components of ecological communities. The derived geographical patterns of diversity and abundance of shark eDNA sequence reads may be used for monitoring purposes and ultimately to inform conservation management and policy decisions. At the

global/macro-scale, the detected elasmobranch MOTUs collectively separate the Caribbean and New Caledonian regions (Fig. 1d), dominated by *Carcharhinus perezii*/*Negaprion brevirostris* and *Carcharhinus amblyrhynchos* / *Triakonodon obesus*, respectively, with the exception of the most depauperate locations (e.g. Belize, Jamaica and Noumea) which are grouped in the center of the ordination plot. Additionally, the patterns of MOTU richness and abundance of sequence reads follow the level of anthropogenic impact in each location. Remote localities such as the Chesterfield atolls and protected areas such as Bimini, Bahamas show both the highest species richness and read abundance among our samples, whereas the less remote and non-protected locations show lower values for both diversity and abundance (Figs 1c, 2 and 3).

In marine ecosystems, the impact on living resources is often framed into the Malthusian theory of human density around such ecosystems⁵³. Several studies have shown proximity to market to be the strongest predictor of overfishing on coral reefs^{54–56}. A particular case study from New Caledonia has demonstrated that travel time from the market is a strong predictor of fish biomass, predator abundance and functional diversity on coral reefs^{53,57}. Thus, remote locations such as the Chesterfield atolls, receive *de facto* protection due to their isolation⁵⁷. The level of elasmobranch diversity and eDNA read abundance, sheds a new light on these wilderness areas that are already known to support high levels of fish biomass^{51,57}.

Likewise, it has previously been shown that sharks on reefs in the Greater Caribbean mostly occur in areas with low human population density or in a few places where strong fishing regulations or conservation measures have been implemented⁸. While none of our Caribbean sampling locations is at more than 1 hour travel away from people, The Bahamas represents one of those locations whose elasmobranch populations in particular receive protection through effective conservation measures⁴⁸.

Environmental DNA metabarcoding has a number of advantages compared to classical approaches for monitoring elasmobranchs. It is a minimally invasive and resource-effective technique. The eDNA sampling and metabarcoding protocols are easy to standardize and the molecular assignment does not require taxonomic expertise. Nevertheless, our findings also reveal a number of concerns that should be addressed in future developments of shark/elasmobranch eDNA metabarcoding approaches. First the taxonomic resolution of the final dataset is strongly dependent on the choice of markers; while the use of COI as a metabarcoding marker has previously been criticized⁵⁸, owing to its high sequence variability, which may impair the design of truly universal primers and complicate bioinformatics analysis - it can also be argued that COI presents two major advantages over other potential markers. First, the steadily growing international effort, headed by the Consortium for the Barcode of Life (CBOL), to develop a public DNA barcoding database with curated taxonomy, greatly facilitates taxonomic assignment. The BOLD database (<http://www.boldsystems.org/>)^{59,60} currently includes >4 million sequences belonging to over 500,000 species, curated and identified by expert taxonomists. Secondly, the high mutation rate of COI enables identification at the species level, whereas the highly conserved sequences of other markers, such as 18S, make it often impossible to distinguish at the species or genus levels; and species-level identification is crucial for studies aimed at detecting rare species, such as is often the case for sharks.

Nevertheless, using the 127 bp elasmobranch specific COI fragment⁴⁶, we still recorded some ambiguity in the taxonomic assignment of some species of the genera *Carcharhinus*, *Rhizoprionodon* and *Negaprion*, owing to the limited sequence variability within the amplicon. Consequently, the sequences of some MOTUs are 100% identical to individuals belonging to different species in the BOLD database. In our dataset, this is presented by several MOTUs belonging to either of two or more species. Furthermore, this has resulted in 3 MOTUs having 100% sequence identity for species occurring in New Caledonia, and species occurring in the Caribbean. One particular example is the *Carcharhinus amblyrhynchos/limbatus* MOTU. The bulk of sequences within this MOTU are from New Caledonia, 16730 compared to 146 in the Caribbean (Supplementary Table S2). In all probability, the sequence reads from New Caledonia belong to both *C. amblyrhynchos*, the grey reef shark (a species abundant in this area and also the species most often visually detected during sampling operations, Supplementary Table S1) and to *Carcharhinus limbatus*, the blacktip shark. Since *C. amblyrhynchos* does not occur in the Caribbean, the 146 reads of this MOTU in the Caribbean samples most likely belong to *C. limbatus*. Similar considerations apply to *Negaprion brevirostris/acutidens* and *Carcharhinus perezii/falciformis*, whose MOTUs are shared between New Caledonia (365 and 206 reads respectively) and the Caribbean (91 and 1045 reads respectively). *Negaprion brevirostris* (lemon shark) is native to the Americas whereas *N. acutidens* (sicklefin lemon shark) is widely distributed throughout the Indo-Pacific. *Carcharhinus falciformis*, the silky shark, is circumtropical, while the distribution of *Carcharhinus perezii* (Caribbean reef shark) is restricted to the tropical western Atlantic Ocean.

In order to resolve the issue with closely related species, it will be essential to design alternative primers that are able to amplify a longer fragment of the gene region, in addition to an improved reference database. In relation to this, it is clear that certain elasmobranch species present in the environment at the time of sampling could not be detected using the selected primer set, as their non-degenerate sequences contain mismatches with the binding regions of several species. This is epitomized by the case of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, which is an abundant species in the Caribbean and some individuals were visually observed at the time of sampling. Yet, eDNA sequence reads of *G. cirratum* were not detected in any of our Caribbean samples. Comparing the available *G. cirratum* COI sequences in public repositories with our primer sequences, it becomes apparent that two mismatches with the primer 3' end are most likely responsible for the prevention of amplification of this species' DNA from environmental samples. In silico mismatch statistics, comparing the 3' half of the primers with full mitochondrial genome sequences available, are listed in Supplementary Table S4, for all elasmobranch Orders. This table shows that the primers are particularly suitable for amplifying Carcharhiniformes, which contains more than half of all shark species, including those of most ecological relevance for this study. However, all the elasmobranch orders may be amplified. Potential mismatch issues may be resolved by decreasing the specificity of the primer set by incorporating degenerate bases or inosine nucleotides. However, this approach may have the undesired effect of an increase in the number of reads belonging to non-target taxa getting amplified. Clearly, this trade-off between taxonomic resolution and non-target amplification needs to be well balanced prior to applying

the eDNA metabarcoding approach for the purpose of informing conservation and management decisions. Here, we focused on large-scale differences and overall patterns in relation to anthropogenic influence, but in alternative contexts it may be necessary to attain greater taxonomic accuracy (e.g. endangered or invasive species); a challenge also faced by currently established ribosomal amplicon-based analysis of other vertebrates^{45,61}.

Quantification of eDNA relating to species abundance could provide clues to habitat use and preference, thus identifying spatial conservation priorities such as home ranges and dispersal and migration corridors⁶². However, whether eDNA metabarcoding can provide quantitative estimates, particularly in the case of community-level abundance, remains a controversial issue. Although amplicon sequencing produces read counts that may contain valuable information about target species abundances^{40,63}, the interpretation of the results of amplicon studies, in the context of quantitative ecology, is not straightforward and remains ambiguous⁶⁴. This is in part because shedding rates between communities, species and individuals may differ. But also because the precise relationship between amplicon abundance and taxon abundance remains unknown and likely varies among taxa^{63,65}, as it is argued that PCR products are not fully proportional to real abundances due to the fact that primer efficiency may vary among species templates (primer bias)^{65,66}. While previous studies have shown positive rank correlations between species abundance and read abundance^{38,43,63,67}, as of yet, no studies have been published, revealing evidence of a relationship between relative abundance of species within a community and their respective eDNA read abundances. And while currently no experiments have been performed to empirically verify the relationship between read abundance and community biomass for elasmobranchs in particular, our data show that read abundances are higher in the more pristine/remote sampling locations and that these patterns of read abundance are coherent with expectations that can be inferred from the contrasting levels of human impact/remoteness of the different locations, for both the Caribbean and New Caledonia (Fig. 3b). While for example the species diversities of New Caledonia North and Chesterfield are very similar (Fig. 2), eDNA read abundance is significantly higher in Chesterfield (Fig. 3b), suggesting that read abundance may be correlated with remoteness. As the relationships between eDNA and species abundance become clearer, the role of eDNA in estimating species abundance in both freshwater and marine environments is likely to become more valuable, increasing the potential of future eDNA applications in research and conservation.

Conservation and management of elasmobranch diversity relies on the effective monitoring of species across large oceanic areas. While direct observation and identification of individuals are often complicated, we have demonstrated that, despite the seemingly daunting task of probing vast stretches of ocean by collecting water samples, eDNA metabarcoding has great potential for developing into an objective and powerful elasmobranch assessment tool, applicable to a wide range of ecological goals, from the mapping of diversity gradients in response to environmental variation, to the monitoring of the effectiveness of spatial protection measures.

Material and Methods

Experimental Design. Aqueous eDNA samples were collected with interoceanic replication, to test for spatial marine protection as a predictor for elasmobranch diversity. During February and March of 2015 (Supplementary Table S1), samples were collected from four Caribbean locations impacted by various levels of anthropogenic pressures (Fig. 1b). Jamaica is known to have one of the most depauperate fish populations in the Caribbean and a severely extirpated elasmobranch fauna⁶⁸; thus it was expected that Jamaica would sit at the lower end of the elasmobranch diversity range and read abundance. In Belize sampling took place around the partially submerged Glover's Reef atoll, which is part of the Mesoamerican Barrier Reef. Even though this region has a relatively large number of marine reserves, including the 'Glovers Reef Marine Reserve', shark sightings in the Caribbean are quite rare and relatively few shark sightings occurred in the Mesoamerican Barrier Reef area during a previously conducted survey^{8,69}.

In the Turks & Caicos Islands, where sampling took place around South Caicos, the establishment of a shark sanctuary is under consideration; however, the islands are currently still experiencing high fishing pressure⁴⁷, which tends to disproportionately reduce densities of longer-lived, larger-bodied individuals⁵⁰. At the other end, the nation of Bahamas is a designated shark sanctuary⁴⁸ and as such, an area characterised by consolidated shark protection. The sampling was conducted around the islands of Bimini, which consequently boast an abundant and diverse elasmobranch fauna^{70,71}.

In the tropical Pacific, eDNA samples were collected from three locations in New Caledonia (Fig. 1a), during September, October and November of 2015 (Supplementary Table S1). New Caledonia has a unique anthropogenic impact gradient from nearly pristine to significant levels of anthropogenic disturbance⁵⁷. The most heavily impacted site is represented by the capital Noumea, the most densely populated area in New Caledonia⁵³. However, most reefs near Noumea are no-take reserves and shark fishing is historically non-existent in New Caledonia so that near Noumea, shark populations may be healthier compared to many other impacted areas. Sampling sites north of the main island Grande Terre, 'New Caledonia North', represent the intermediate level of anthropogenic impact, being between 70–120 km removed from the nearest human settlement and a minimum of 500 km/15 hours travel time, from the Noumea fish market. The isolated Chesterfield atolls, 550 km northwest of Grande Terre (~35 h travel time from the Noumea fish market), are the most remote of all our sampling locations. These samples were expected to show the highest levels of elasmobranch diversity and eDNA read abundance. Within all 7 (Caribbean and New Caledonian) locations, samples were collected from between 6 and 20 different sites covering a variety of habitats (Supplementary Table S1 contains coordinates per site). A total of 55 samples from the Caribbean and 22 samples from New Caledonia were collected and analysed. Each sample consisted of 4 litres of sea water, collected by either a Kemmerer type water sampler or directly with a plastic collection bottle.

Sample processing and DNA extraction. After collection, the water samples were individually covered and stored, in the dark and on ice, during transport to the local laboratory facilities. Vacuum filtration was carried out within two hours after collection. When it was not feasible to carry out filtration within two hours after collection, due to travel time to laboratory facilities, the samples were directly frozen after collection, until further

processing. The sterile mixed cellulose esters (MCE) filters (Merck Millipore; 47 mm diameter; 0.45 µm pore size) containing sample filtrates were stored in 2.0 ml screw-cap microcentrifuge tubes containing silica beads. The silica beads function as a desiccator, drying out the filters and hence preventing the DNA from degrading. The sample filters were then stored at -20°C until extraction. DNA was extracted from the filters with the Mo-Bio PowerSoil DNA Isolation Kit (www.mobio.com), following the manufacturers' protocol. Purified extracts were assessed for DNA concentration in a Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

Contamination Control. Contamination of samples may occur anywhere from preparing sampling equipment and collecting the samples in the field (target DNA being carried unintentionally from one locality to another), to every subsequent step of sample preparation, extraction and analysis in the laboratory. Hence, strict adherence to contamination control was followed at all field and laboratory stages in order to prevent the occurrence of contamination, including the use of disposable gloves and single use-sterile collection bottles and filtration equipment, and the bleaching (50% bleach) of sampling devices and laboratory equipment and surfaces. Additionally, a dedicated controlled eDNA lab at the University of Salford, with separate rooms designated for the physical separation of eDNA extraction, pre-PCR preparations and post-PCR procedures, was used for all laboratory work. Moreover, to identify potential contamination, DNA extraction blanks (elution buffer from extraction kit) and PCR blanks were included.

Library preparation and sequencing. For the amplification of eDNA metabarcoding markers, an elasmobranch specific COI primer set was used. This previously published primer set consisted of a novel reverse primer 'Shark COI-MINIR' 5'-AAGATTACAAAAGCGTGGGC-3'⁴⁶ and two universal fish barcoding forward primers FishF2 5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3' and VF2 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'⁷², yielding an amplicon of 127 bp⁴⁶. For the multiplex Illumina sequencing run, we used 4 sets of 24 primers with attached 8-base sample-specific oligo-tags differing in at least 3 bases⁷³. In order to increase variability of the amplicon sequences, a variable number (2, 3 or 4) of fully degenerate positions (Ns) was added at the beginning of each primer⁷⁴. The full, sequenced PCR product, consisted then of 195 bp, including the amplicon, primers, sample tags and leading N's.

For PCR amplification, a single step protocol was used, directly attaching the 8-base tagged primers. The PCR mix recipe was as follows: a total volume of 20 µl included 2 µl 10x buffer (BioLine), 0.6 µl 50 mM MgCl (BioLine), 0.5 µl of each of the 5 µM forward primers (Eurofins), 1 µl of the 5 µM reverse primer, 0.2 µl 10 mM dNTP mix (BioLine), 0.2 µl BioTaq DNA polymerase (5 u/µl, BioLine), a standardised amount (10 ng) of the filter-extracted eDNA template, and 13 µl sterile water. The PCR profile included an initial denaturing step of 95 °C for 15 min, 35 cycles of 94 °C 1 min, 52 °C 1 min and 72 °C 1 min and a final extension step of 72 °C for 5 minutes. The quality of all amplifications was assessed by electrophoresis, running the products through a 1.5% agarose gel stained with Gel Red (Cambridge Bioscience) and visualized on a UV light platform. All PCR products (including one replicate per sample and 2 PCR negative controls) were pooled into 4 multiplexed sample pools (each composed of 24 individually-tagged samples) and purified using MinElute columns (Qiagen). Four Illumina libraries were subsequently built from the four pools, using the NextFlex PCR-free library preparation kit (BIO Scientific). The libraries were quantified using the NEBNext qPCR quantification kit (New England Biolabs) and pooled in equimolar concentrations along with 1% PhiX (v3, Illumina) serving as a positive sequencing quality control. The libraries with a final molarity of 8 pM were sequenced on an Illumina MiSeq platform in a single MiSeq flow cell using v2 chemistry (2 × 150 bp paired-ends).

Bioinformatic and Statistical Analyses. The bioinformatic analysis was based on the OBITools metabarcoding software suite⁷⁵. The pipeline used for data analysis is summarized in Supplementary Methods S3. Quality of the reads was assessed using FastQC. Paired-end reads were aligned using illumina-paired-end and alignments with quality score >40 were kept. The aligned dataset was demultiplexed using ngsfilter. The length distribution of the demultiplexed reads showed a large percentage of short fragments (<95 bp), originating from non-specific amplifications and primer-dimer artefacts, which were not removed during the size selection step of library preparation. Thus, a length filter (obigrep) was applied to the aligned reads (120–135 bp) in order to select only the fragments with the correct target size. Reads containing ambiguous bases were also removed. The reads were subsequently dereplicated using obiuniq and a chimera removal step was performed using the uchime-denovo algorithm⁷⁶ implemented in vsearch⁷⁷. The MOTUs were delimited using the sumacust algorithm⁷⁵ with a constant similarity threshold of 99%. Taxonomic assignment of the representative sequences for each Molecular Operational Taxonomic Unit (MOTU) was performed using the ecotag algorithm⁷⁵. We built a bespoke elasmobranch reference database using a custom R script for retrieving all COI elasmobranch sequences available from the BOLD database⁶⁰, and subsequently selecting those that included our 127 bp target fragment. In order to add homologous sequences from other, non-elasmobranch taxa, an *in silico* PCR was performed against release R117 of the EMBL-EBI database using ecoPCR⁷⁸. Subsequently, the obtained reference sequences were added to the elasmobranch sequences obtained from BOLD. These additional reference sequences were added to our elasmobranch database in order to avoid the incorrect assignment of amplified sequences, belonging to other taxa, to elasmobranchs. This combined reference database is available from <http://github.com/metabarpark/Reference-databases>. The final refining of the dataset included taxonomy clustering of MOTUs assigned to the same species.

Due to its high sensitivity, an additional challenge associated with eDNA metabarcoding, is the risk of contamination^{79,80}, and hence the possibility of introducing false positive results. While it is certainly possible to detect a species present in a sample, represented by a single sequence read, it is not possible to completely exclude contamination (or sequencing error) as the potential cause of MOTUs containing only a single read, i.e. to dismiss single reads as potential false positives. Accordingly, we have opted for a more conservative approach and have removed all single read MOTUs from our samples.

All statistical analyses were performed in R v 3.3.0 (<https://www.R-project.org/>). The vegan package v. 2.4–0⁸¹ was used for the calculation of sample-based species accumulation curves. A generalized linear model approach was used for testing differences in MOTU richness and read abundances (square-root transformed) as a function of location, using the glm2 package v. 1.1.2⁸². The Poisson distribution family function was used for modelling the residuals and package multcomp⁸³ was used for post-hoc Tukey comparisons. All custom R scripts are publicly available from <http://github.com/metabarpark>.

Data and materials availability. All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Original DNA sequences (after initial quality filtering, paired-end alignment and length filtering) can be found at: <https://data.mendeley.com/datasets/489gckxbz3/1>.

References

- Jackson, J. B. *et al.* Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* **293**, 629–637 (2001).
- Mullon, C., Freon, P. & Cury, P. The dynamics of collapse in world fisheries. *Fish Fish.* **6**, 111–120 (2005).
- Myers, R. A. & Worm, B. Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature* **423**, 280–283 (2003).
- Camhi, M. D., Valenti, S. V., Fordham, S. V., Fowler, S. L. & Gibson, C. The conservation status of pelagic sharks and rays, IUCN Species Survival Commission's Shark Specialist Group. 19–23, doi:978-0-9561063-1-5 (2009).
- Robbins, W. D., Hisano, M., Connolly, S. R. & Choat, J. H. Ongoing Collapse of Coral-Reef Shark Populations. *Curr. Biol.* **16**, 2314–2319 (2006).
- Simpfendorfer, C. A., Hueter, R. E., Bergman, U. & Connett, S. M. H. Results of a fishery-independent survey for pelagic sharks in the western North Atlantic, 1977–1994. *Fish. Res.* **55**, 175–192 (2002).
- Spaet, J. L. Y. & Berumen, M. L. Fish market surveys indicate unsustainable elasmobranch fisheries in the Saudi Arabian Red Sea. *Fish. Res.* **161**, 356–364 (2015).
- Ward-Paige, C. A. *et al.* Large-Scale Absence of Sharks on Reefs in the Greater-Caribbean: A Footprint of Human Pressures. *PLoS One* **5**, e11968 (2010).
- Worm, B. *et al.* Global catches, exploitation rates, and rebuilding options for sharks. *Mar. Policy* **40**, 194–204 (2013).
- Heupel, M. R., Knip, D. M., Simpfendorfer, C. A. & Dulvy, N. K. Sizing up the ecological role of sharks as predators. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **495**, 291–298 (2014).
- Navia Andrés, F., Mejía-Falla Paola, A., López-García, J. & Giraldo Alan, C.-E. V. H. How many trophic roles can elasmobranchs play in a marine tropical network? *Mar. Freshw. Res.* <https://doi.org/10.1071/MF16161> (2017).
- Gilman, E. *et al.* Shark interactions in pelagic longline fisheries. *Mar. Policy* **32**, 1–18 (2008).
- Muter, B. A., Gore, M. L., Gledhill, K. S., Lamont, C. & Huveneres, C. Australian and U.S. news media portrayal of sharks and their conservation. *Conserv. Biol.* **27**, 187–196 (2013).
- Simpfendorfer, C. A., Heupel, M. R., White, W. T. & Dulvy, N. K. The importance of research and public opinion to conservation management of sharks and rays: A synthesis. *Mar. Freshw. Res.* **62**, 518–527 (2011).
- Stevens, J. The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyan), and the implications for marine ecosystems. *ICES J. Mar. Sci.* **57**, 476–494 (2000).
- Bonfil, R. *Overview of world elasmobranch fisheries.* *FAO Fisheries Technical Paper* 341. (1994).
- García, V. B., Lucifora, L. O. & Myers, R. A. The importance of habitat and life history to extinction risk in sharks, skates, rays and chimaeras. *Proc Biol Sci* **275**, 83–89 (2008).
- Musick, J. A., Burgess, G., Cailliet, G., Camhi, M. & Fordham, S. Management of Sharks and Their Relatives (Elasmobranchii). *Fisheries* **25**, 9–11 (2000).
- Dulvy, N. K. *et al.* Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *Elife* **3**, e00590 (2014).
- Baum, J. K. & Worm, B. Cascading top-down effects of changing oceanic predator abundances. *J. Anim. Ecol.* **78**, 699–714 (2009).
- Estes, J. A. *et al.* Trophic Downgrading of Planet Earth. *Science* **333**, 301–306 (2011).
- Ferretti, F., Worm, B., Britten, G. L., Heithaus, M. R. & Lotze, H. K. Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecol. Lett.* **13**, 1055–1071 (2010).
- Heithaus, M. R., Wirsing, A. J. & Dill, L. M. The ecological importance of intact top-predator populations: a synthesis of 15 years of research in a seagrass ecosystem. *Mar. Freshw. Res.* **63**, 1039–1050 (2012).
- Lodge, D. M. *et al.* Conservation in a cup of water: Estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Mol. Ecol.* **21**, 2555–2558 (2012).
- Simpfendorfer, C. A. *et al.* Environmental DNA detects Critically Endangered largemouth sawfish in the wild. *Endanger. Species Res.* **30**, 109–116 (2016).
- Wheeler, Q. D. Taxonomy: Impediment or Expedient? *Science* **303**, 285–285 (2004).
- Ji, Y. *et al.* Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecol. Lett.* **16**, 1245–1257 (2013).
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L. H. Environmental DNA. *Mol. Ecol.* **21**, 1789–1793 (2012).
- Thomsen, P. F. *et al.* Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS One* **7**, e41732 (2012).
- Barnes, M. A. *et al.* Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 1819–1827 (2014).
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L. & Lodge, D. M. 'Sight-unseen' detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Lett.* **4**, 150–157 (2011).
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S. & Waits, L. P. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Mol. Ecol. Resour.* **14**, 109–116 (2014).
- Takahara, T., Minamoto, T. & Doi, H. Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. *PLoS One* **8**, e56584 (2013).
- Turner, C. R., Uy, K. L. & Everhart, R. C. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biol. Conserv.* **183**, 93–102 (2015).
- Wilcox, T. M. *et al.* Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLoS One* **8**, e59520 (2013).
- Civade, R. *et al.* Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. *PLoS One* **11**, e0157366 (2016).
- Deiner, K., Fronhofer, E. A., Mächler, E., Walsler, J.-C. & Altermatt, F. Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nat. Commun.* **7**, 12544 (2016).
- Hänfling, B. *et al.* Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Mol. Ecol.* **25**, 3101–3119 (2016).
- Valentini, A. *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* **25**, 929–942 (2016).
- Port, J. A. *et al.* Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Mol. Ecol.* **25**, 527–541 (2016).

41. Yamamoto, S. *et al.* Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Sci. Rep.* **7**, 40368 (2017).
42. Sigsgaard, E. E. *et al.* Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nat. Publ. Gr.* **1**, 1–4 (2016).
43. Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M. & Crowder, L. B. Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *PLoS One* **9**, e86175 (2014).
44. Miya, M. *et al.* MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.* **2**, 150088 (2015).
45. Thomsen, P. F. *et al.* Environmental DNA from Seawater Samples Correlate with Trawl Catches of Subarctic, Deepwater Fishes. *PLoS One* **11**, e0165252 (2016).
46. Fields, A. T., Abercrombie, D. L., Eng, R., Feldheim, K. & Chapman, D. D. A Novel Mini-DNA Barcoding Assay to Identify Processed Fins from Internationally Protected Shark Species. *PLoS One* **10**, e0114844 (2015).
47. Newton, K., Côté, I. M., Pilling, G. M., Jennings, S. & Dulvy, N. K. Current and Future Sustainability of Island Coral Reef Fisheries. *Curr. Biol.* **17**, 655–658 (2007).
48. Chapman, D. D. *et al.* Give Shark Sanctuaries a Chance. *Science* **339**, 757–757 (2013).
49. Werry, J. M. *et al.* Reef-Fidelity and Migration of Tiger Sharks, *Galeocerdo cuvier*, across the Coral Sea. *PLoS One* **9**, e83249 (2014).
50. Sandin, S. A. *et al.* Baselines and Degradation of Coral Reefs in the Northern Line Islands. *PLoS One* **3**, e1548 (2008).
51. Graham, N. J. & McClanahan, T. R. The Last Call for Marine Wilderness? *Bioscience* **63**, 397–402 (2013).
52. Sorenson, L., Santini, F. & Alfaro, M. E. The effect of habitat on modern shark diversification. *J. Evol. Biol.* **27**, 1536–1548 (2014).
53. Maire, E. *et al.* How accessible are coral reefs to people? A global assessment based on travel time. *Ecol. Lett.* **19**, 351–360 (2016).
54. Cinner, J. E. *et al.* Comanagement of coral reef social-ecological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5219–5222 (2012).
55. Cinner, J. E. *et al.* Evaluating Social and Ecological Vulnerability of Coral Reef Fisheries to Climate Change. *PLoS One* **8**, e74321 (2013).
56. Cinner, J. E. & McClanahan, T. R. Socioeconomic factors that lead to overfishing in small-scale coral reef fisheries of Papua New Guinea. *Environ. Conserv.* **33**, 73–80 (2006).
57. D'agata, S. *et al.* Marine reserves lag behind wilderness in the conservation of key functional roles. *Nat. Commun.* **7**, 12000 (2016).
58. Deagle, B. E. *et al.* DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biol. Lett.* **10**, 1789–1793 (2014).
59. Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & DeWaard, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B* **270** (2003).
60. Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. bold: The Barcode of Life Data System. *Mol. Ecol. Notes* **7**, 355–364, (<http://www.barcodinglife.org>) (2007).
61. Kelly, R. P. *et al.* Genetic signatures of ecological diversity along an urbanization gradient. *PeerJ* **4**, e2444 (2016).
62. Barnes, M. A. & Turner, C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conserv. Genet.* **17**, 1–17 (2016).
63. Evans, N. T. *et al.* Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* **16**, 29–41 (2016).
64. Kelly, R. P. Making environmental DNA count. *Mol. Ecol. Resour.* **16**, 10–12 (2016).
65. Elbrecht, V. & Leese, F. Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass-sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol. *PLoS One* **10**, 1–16 (2015).
66. Clarke, L. J., Soubrier, J., Weyrich, L. S. & Cooper, A. Environmental metabarcodes for insects: in silico PCR reveals potential for taxonomic bias. *Mol. Ecol. Resour.* **14**, 1160–1170 (2014).
67. Klobucar, S. L., Rodgers, T. W. & Budy, P. At the forefront: evidence of the applicability of using environmental DNA to quantify the abundance of fish populations in natural lentic waters with additional sampling considerations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1–5, (<https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0114>) (2017).
68. Hawkins, J. P. & Roberts, C. M. Effects of artisanal fishing on Caribbean coral reefs. *Conserv. Biol.* **18**, 215–226 (2004).
69. Bond, M. E. *et al.* Reef Sharks Exhibit Site-Fidelity and Higher Relative Abundance in Marine Reserves on the Mesoamerican Barrier Reef. *PLoS One* **7**, e32983 (2012).
70. Guttridge, T. L. *et al.* Philopatry and Regional Connectivity of the Great Hammerhead Shark, *Sphyrna mokarran* in the U.S. and Bahamas. *Front. Mar. Sci.* **4**, 3 (2017).
71. Jennings, D. E. *et al.* Assessment of the aquatic biodiversity of a threatened coastal lagoon at Bimini, Bahamas. *J. Coast. Conserv.* **16**, 405–428 (2012).
72. Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **360**, 1847–1857 (2005).
73. Guardiola, M. *et al.* Deep-Sea, Deep-Sequencing: Metabarcoding Extracellular DNA from Sediments of Marine Canyons. *PLoS One* **10**, e0139633 (2015).
74. Wangensteen, O. S. & Turon, X. Metabarcoding Techniques for Assessing Biodiversity of Marine Animal Forests. *Marine Animal Forests* 1–29, (https://doi.org/10.1007/978-3-319-17001-5_53-1) (2016).
75. Boyer, F. *et al.* obitools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* **16**, 176–182 (2016).
76. Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200 (2011).
77. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **4**, e2584 (2016).
78. Ficetola, G. F. *et al.* An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics* **11**, 434 (2010).
79. Goldberg, C. S. *et al.* Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Ecol. Evol.* 1299–1307, (<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>) (2016).
80. Thomsen, P. F. & Willerslev, E. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.* **183**, 4–18 (2015).
81. Oksanen, J. *et al.* Community Ecology Package. R package (2016).
82. Marschner, I. Fitting Generalized Linear Models, Package 'glm2' (2015).
83. Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P. *Simultaneous Inference in General Parametric Models*, Package 'multcomp'. Cran (2016).

Acknowledgements

We thank all staff, students and volunteers from Glover's Reef Research Station, Discovery Bay Marine Laboratory and Field Station, Montego Bay Marine Park, Bimini Biological Field Station (Sharklab), the SFS Center for Marine Studies, and the crew of the research vessel Amborella, for their assistance with sample collection. We also thank Alexandre De Menezes and Ian Goodhead for technical discussions and Andjin Siegenthaler for assistance with our sampling area maps. We are also grateful to Kathryn Matthews and Angelo Villagomez for logistic support. This work was co-funded by the Pew Charitable Trusts, the University of Salford R&E strategy funding, the Total Foundation and the Government of New Caledonia

Author Contributions

S.M. and J.B. conceived, designed and coordinated the study; J.B., S.M., D.D.C., G.B., D.B., T.L.G., H.H., D.M. and L.V. contributed to fieldwork and sample collection; Laboratory experiments and data analyses were conducted by J.B. and O.S.W.; J.B. wrote the manuscript; all authors read and commented on the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17150-2>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

1. Paired-end alignment. Keep reads with quality > 40. Demultiplexing.

```
illuminapairedend -r SHAK_S1_L001_R2_001.fastq SHAK_S1_L001_R1_001.fastq |  
obiannotate -S goodali:"Good_SHAK" if score>40.00 else "Bad_SHAK" | obisplit -t  
goodali  
ngsfilter -t ngsfilter_SHAK_fields.tsv --fasta-output -u unidentified_SHAK.fasta  
Good_SHAK.fasta > SHAK.filtered.fasta
```

2. Filter sequences with lengths between 120 and 135 bp and with only 'ACGT'.

```
obigrep -p 'seq_length>120' -p 'seq_length<135' -s '^[ACGT]+$'  
SHAK.filtered.fasta > SHAK.filtered_length.fasta
```

3. Group unique seqs.

```
obiuniq -m sample SHAK.filtered_length.fasta > SHAK.unique.fasta
```

4. Change IDs to a short index. Change format to vsearch. Remove chimeras.

```
obiannotate --seq-rank SHAK.unique.fasta | obiannotate --set-identifier  
'"'SHAK'%09d" % seq_rank' > SHAK.new.fasta  
owi_obifasta2vsearch -i SHAK.new.fasta -o SHAK.vsearch.fasta  
vsearch --uchime_denovo SHAK.vsearch.fasta --sizeout --nonchimeras  
SHAK.nonchimeras.fasta --chimeras SHAK.chimeras.fasta --uchimeout  
SHAK.uchimeout.txt
```

5. Cluster at 99% with sumacust. Get cluster centers.

```
sumacust -t 0.99 -s count -p 10 SHAK.nonchimeras.fasta > SHAK.sumacust99.fasta  
obigrep -p 'cluster_center' SHAK.sumacust99.fasta >  
SHAK.sumacust99.centers.fasta
```

6. Taxonomic assignment using ecotag.

```
ecotag -d taxo_sharks -R db_Elasmobranchii_Bakker_et_al_2017.fasta  
SHAK.sumacust99.centers.fasta > SHAK.ecotag.fasta
```

7. Add taxa above order level.

```
owi_add_taxonomy -i SHAK.ecotag.fasta -o SHAK.ecotag.fasta.annotated.csv
```

8. Recount abundances by sample.

```
obitab -o SHAK.sumacust99.fasta > SHAK.sumacust99.tab  
owi_recount_sumacust -i SHAK.sumacust99.tab -o SHAK.sumacust99.counts.csv
```

9. Combine ecotag and abundance files.

```
owi_combine -i SHAK.ecotag.fasta.annotated.csv -a SHAK.sumacust99.counts.csv -o  
SHAK_all_MOTUs.csv
```

10. Collapse MOTUs.

```
owi_collapse -s 13 -e 88 -i SHAK_all_MOTUs.csv
```

11. Curate the dataset manually.

12. Re-collapse MOTUs after curating.

```
owi_collapse -s 13 -e 88 -i SHAK_all_MOTUs_curated.csv
```


L'ADN ENVIRONNEMENTAL : UNE NOUVELLE LUMIÈRE POUR LA CONSERVATION DES REQUINS ?

1. INTRODUCTION

Le chapitre précédent vient de démontrer la faisabilité de l'analyse d'ADN environnemental par métabarcoding pour les requins en milieu corallien dynamique. En revanche, persistent plusieurs interrogations, notamment lorsqu'il s'agit de comprendre la significativité des résultats obtenus dans l'Article 1. En effet, ce dernier apporte une preuve de faisabilité à grande échelle pour les requins, montrant des patrons de diversité et d'abondance de fragments détectés d'ADN environnemental qui sont reliés à un gradient d'impact anthropique. Cette méthode de suivi est rapide, non invasive et relativement économique, mais restent à déterminer dans quelle mesure les résultats sont comparables et complémentaires à d'autres méthodes de suivi et quels seraient les apports de cette méthode en termes de conservation. L'Article 1 apporte quelques éléments d'ouverture, mais nous proposons dans ce chapitre d'approfondir et de mettre en parallèle les résultats obtenus par cette méthode avec les résultats de suivi des populations de requins par des méthodes traditionnelles.

Ainsi, nous intégrerons dans ce chapitre des données historiques de suivi par comptages en plongée sous-marine et par caméras appâtées à ces résultats de métabarcoding de l'ADN environnemental afin de répondre à la question suivante, présentée dans l'introduction :

(B) Si (A) est vérifiée, comment cette technique d'analyse de l'ADN environnemental permettrait de compléter les méthodes traditionnelles pour la conservation des requins ? Notamment, les requins de récif apparaissent absents des zones anthropisées : le sont-ils vraiment ou les méthodes traditionnelles de suivi échouent à les détecter ?

2. [ARTICLE 2 - Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks](#)

Résumé en Français : Dans l'ère de la « défaunation de l'Anthropocène », les espèces de grande taille ne sont plus détectées dans les habitats où elles étaient présentes auparavant. En revanche, il n'est pas clair si cette diversité apparemment manquante de la mégafaune, autrement appelée diversité « sombre », est due à des extirpations locales, ou à l'incapacité de détecter des individus furtifs subsistant. Nous montrons que malgré un effort d'échantillonnage de deux ordres de grandeur inférieur, l'analyse de l'ADN environnemental (ADNe) permet la détection de 44% d'espèces de requins en plus par rapport aux méthodes traditionnelles de comptage sous-marins en plongée et de vidéo appâtée dans l'archipel de Nouvelle-Calédonie (Pacific Sud-Ouest). De plus, l'analyse de l'ADNe révèle la présence d'espèces de requins auparavant non observées par ces méthodes traditionnelles dans les zones impactées par l'Homme. Nos résultats révèlent une plus forte fréquence de détection de requins par ADNe comparé au suivi par les méthodes traditionnelles à la fois dans les zones anthropisées et dans les zones éloignées. Ces résultats indiquent le besoin urgent de suivi à large échelle par les méthodes d'analyse de l'ADNe afin d'améliorer le suivi de la mégafaune marine rare et furtive. Enfin, nos conclusions soulignent le besoin d'implémentation d'efforts de conservation ciblés spécifiquement sur la protection des populations résiduelles et furtives.

L'article, publié dans *Science Advances* le 2 Mai 2018, est disponible à l'adresse suivante :

<http://advances.sciencemag.org/content/4/5/eaap9661>

ECOLOGY

Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks

Germain Boussarie,^{1,2*} Judith Bakker,^{3*} Owen S. Wangensteen,^{3,4} Stefano Mariani,³ Lucas Bonnin,^{1,2} Jean-Baptiste Juhel,^{1,2} Jeremy J. Kiszka,⁵ Michel Kulbicki,⁶ Stephanie Manel,⁷ William D. Robbins,^{8,9,10} Laurent Vigliola,^{1†} David Mouillot^{2,11†‡}

In the era of “Anthropocene defaunation,” large species are often no longer detected in habitats where they formerly occurred. However, it is unclear whether this apparent missing, or “dark,” diversity of megafauna results from local species extirpations or from failure to detect elusive remaining individuals. We find that despite two orders of magnitude less sampling effort, environmental DNA (eDNA) detects 44% more shark species than traditional underwater visual censuses and baited videos across the New Caledonian archipelago (south-western Pacific). Furthermore, eDNA analysis reveals the presence of previously unobserved shark species in human-impacted areas. Overall, our results highlight a greater prevalence of sharks than described by traditional survey methods in both impacted and wilderness areas. This indicates an urgent need for large-scale eDNA assessments to improve monitoring of threatened and elusive megafauna. Finally, our findings emphasize the need for conservation efforts specifically geared toward the protection of elusive, residual populations.

INTRODUCTION

Human activities are largely responsible for the ongoing defaunation of ecosystems worldwide, causing massive population declines and local species extirpations (1, 2). This global wave of defaunation may dramatically increase local “dark diversity,” defined as the suite of species that should be present within a certain region, based on their habitat requirements and dispersal ability, yet are absent (3). That is, dark diversity encompasses the diversity of locally absent species, although biogeographic history, as well as ecological and environmental conditions, suggests their presence (4). High dark diversity not only may imperil ecosystem functioning (5) but also represents potential for recovery of purportedly absent species (3, 6). A substantial portion of megafaunal dark diversity is composed of mobile, rare, elusive, and threatened species that are highly challenging to detect (1). Accordingly, an ongoing concern is whether this megafaunal dark diversity has been correctly measured or overestimated as a result of nondetection of remaining individuals by traditional sampling methods. The answer to this question has significant implications in terms of management and conservation because the presence of previously undetected individuals may require immediate action to prevent extirpation of remnant individuals,

whereas the confirmed absence of species requires different management considerations (6).

Detecting species occurrences and extirpations is more challenging in the ocean than on land because most habitats remain hardly accessible and therefore poorly investigated (7). Similarly, accurate assessment of dark diversity is particularly problematic for low-density, mobile species such as sharks. Sharks are one of the most threatened marine taxa (8). They often have a high intrinsic vulnerability to fishing due to slow population growth (9), and with shark products such as dried fins reaching high commercial value (up to \$1697 kg⁻¹), they have a high exposure to international trade (10). Throughout the Pacific, the density of reef sharks has declined to 3 to 10% of prehuman levels (11), and even the most well-managed marine protected areas appear inadequate in maintaining healthy shark populations (8, 12).

It is unclear, however, whether reported levels of dark diversity of sharks are due to local extirpations or to a failure to detect remaining animals. Similar to most terrestrial vertebrates, sharks exhibit learning abilities linked to avoidance behavior, and repeated exposure to negative anthropogenic interactions may increase their elusiveness (13). This raises the possibility that sharks’ prevalence in marine habitats, even close to humans, may be greater than previously thought, with individuals being less detectable, therefore overinflating the apparent level of dark diversity.

Environmental DNA (eDNA) analysis is based on the retrieval of genetic material naturally released by organisms in their environments, and it is emerging as a noninvasive method to detect and identify even rare and elusive species in a wide range of ecosystems (14), including marine waters (15, 16). Here, we assessed the potential of eDNA metabarcoding in providing a more accurate estimate of the dark diversity of sharks on coral reefs of the New Caledonian archipelago by contrasting eDNA analysis with traditional underwater visual census (UVC) and baited remote underwater video station (BRUVS) survey methods.

RESULTS AND DISCUSSION

Lower dark diversity than previously estimated

Of the 26 historically present species in the regional pool (17), only 9 species of sharks were detected in 2758 UVCs and 385 BRUVS

¹IRD (Institut de Recherche pour le Développement), Laboratoire d’Excellence Labex Corail, UMR IRD-UR-CNRS ENTROPIE, Centre IRD de Nouméa, BP A5, 98800 Nouméa Cedex, New Caledonia, France. ²MARBEC, UMR IRD-CNRS-UM-IFREMER 9190, Université de Montpellier, Languedoc-Roussillon, 34095 Montpellier Cedex, France. ³Ecosystems and Environment Research Centre, School of Environment and Life Sciences, University of Salford, Salford M5 4WT, UK. ⁴Norwegian College of Fishery Science, UiT The Arctic University of Norway, Tromsø N-9037, Norway. ⁵Marine Sciences Program, Department of Biological Sciences, Florida International University, 3000 Northeast 151st Street, North Miami, FL 33181, USA. ⁶IRD (Institut de Recherche pour le Développement), Laboratoire d’Excellence Labex Corail, UMR IRD-UR-CNRS ENTROPIE, Université de Perpignan, 66860 Perpignan Cedex 9, France. ⁷EPHE, PSL Research University, CNRS, UM, SupAgro, INRA, UMR 5175 CEFE, F-34293 Montpellier, France. ⁸Wildlife Marine, Perth, Western Australia 6020, Australia. ⁹Department of Environment and Agriculture, Curtin University, Perth, Western Australia 6102, Australia. ¹⁰School of Life Sciences, University of Technology Sydney, Sydney, New South Wales 2007, Australia. ¹¹Australian Research Council Centre of Excellence for Coral Reef Studies, James Cook University, Townsville, Queensland 4811, Australia.

*These authors contributed equally to this work.

†These authors contributed equally to this work.

‡Corresponding author. Email: david.mouillot@umontpellier.fr

(Fig. 1, A to C). The dark diversity of sharks was thus initially estimated at 65% of the regional pool (that is, 17 species were not detected) using traditional survey methods. Despite two orders of magnitude less sampling effort, eDNA detected 44% more species than UVC or BRUVS; with only 22 samples, 13 shark species were detected, reducing

the previously estimated dark diversity to 50% of the regional pool (13 undetected species). Six species were only detected by eDNA, three species were only detected by UVC and BRUVS (of which, one species only by the BRUVS), whereas six species were detected by all three methods (Fig. 2).

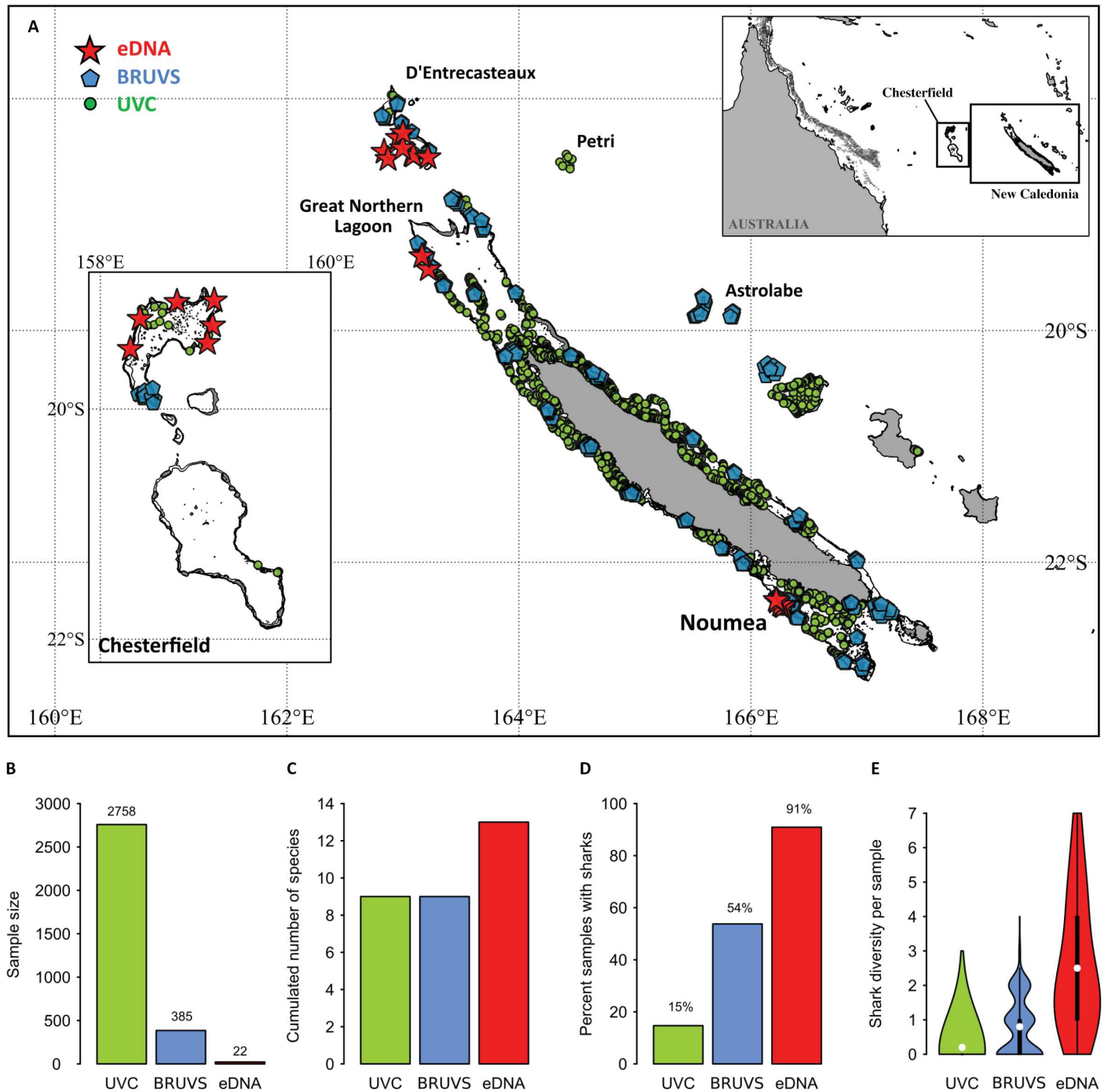


Fig. 1. Sampling design and analyses of surveys across the New Caledonian archipelago, southwestern Pacific. (A) Sampling design in the New Caledonian archipelago (red stars, eDNA; blue pentagons, BRUVS; green dots, UVC). (B) Sample size (UVC, $n = 2758$; BRUVS, $n = 385$; eDNA, $n = 22$). (C) Cumulated number of shark species detected. (D) Frequency of samples with sharks detected. (E) Violin plot showing detected shark species richness, significantly different between techniques ($P < 0.001$, Kruskal-Wallis test), with eDNA detecting more shark species (2.5 ± 1.9) compared to BRUVS (0.8 ± 0.8) and UVC (0.2 ± 0.5) ($P < 0.001$, Dunn's tests). White dots are mean values; thick black bars correspond to interquartile ranges; thin black lines are 95% confidence intervals.

Sharks were observed in only 15% of UVCs ($n = 405$ of 2758) and 54% of BRUVS ($n = 207$ of 385; Fig. 1D). Furthermore, shark diversity was low for each sample, with only 3% of UVCs and 23% of BRUVS recording more than one species. When excluding the two most common species, the gray reef shark (*Carcharhinus amblyrhynchos*) and the whitetip reef shark (*Triaenodon obesus*), other shark species were observed in only 2% of UVCs and 13% of BRUVS.

In contrast, sharks were detected in 91% of eDNA samples (Fig. 1D), with 64% of samples revealing at least two species. No sharks were detected in the negative controls (see Materials and Methods). Even after excluding gray reef and whitetip reef sharks, 68% of eDNA samples revealed one or more shark species. The mean shark diversity per sample was significantly different between techniques ($P < 0.001$, Kruskal-Wallis test), with eDNA detecting at least three times more species (2.5 ± 1.9 ; $P < 0.001$, Dunn's tests; Fig. 1E) than BRUVS (0.8 ± 0.8) and UVC (0.2 ± 0.5). These results suggest that the level of dark diversity of sharks on New Caledonian coral reefs is much lower than previously estimated with traditional techniques.

For any given time interval, eDNA detects biodiversity at a greater spatiotemporal scale than the traditional methods used in this study; this

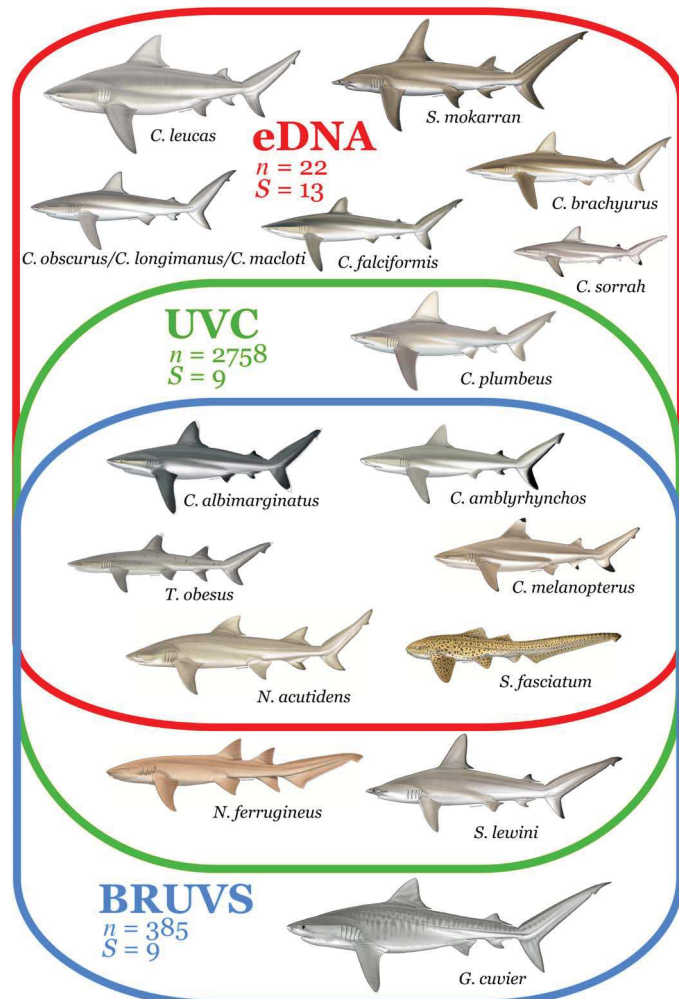


Fig. 2. Detection of shark species with different sampling methods. Venn diagram showing the species detected by eDNA ($n = 22$ samples, $S = 13$ species), UVC ($n = 2758$ samples, $S = 9$ species), and BRUVS ($n = 385$ samples, $S = 9$ species). Scientific drawings courtesy of M. Dando.

may de facto increase the number of species detected by eDNA analysis (18). For example, UVCs sample limited visual areas ($<500 \text{ m}^2$), within specific habitats, over short temporal periods (<2 hours) (19). Similarly, although the bait plume from BRUVS can attract sharks from surrounding habitats, their detection capabilities are constrained by both visual range ($<50 \text{ m}$) and operation time (a few hours) (12). In contrast, eDNA may detect species at a greater temporal scale (a few hours to a few days) due to the persistence of cellular material in the water (20, 21). Moreover, as water masses are in constant movement (particularly along the outer slopes of coral reefs), eDNA transported from different habitats (for example, open ocean) could potentially result in an overestimation of species richness in a given habitat. However, apart from occasional coral reef transients (for example, the great hammerhead, *Sphyrna mokarran*), all shark species detected by eDNA are regularly observed in coral reef habitats (Fig. 2) (22). Hence, it is unlikely that our diversity estimate has been inflated by oceanic inputs of external eDNA. Moreover, recent studies have indicated that eDNA analysis is powerful enough to distinguish species assemblages separated by small distances, even when comparing inshore and offshore habitats (23, 24).

Persisting shark populations in human-impacted areas

Scientific literature has repeatedly highlighted the footprint of anthropogenic activities on shark populations worldwide [for example, see the studies of Edgar *et al.* (25) and Robbins *et al.* (26)]. Similarly, BRUVS and UVC surveys suggest that sharks are quasi-absent near Nouméa, the capital city of New Caledonia (19). Human-induced behavioral changes have been observed in both terrestrial (27) and marine vertebrates (28), resulting in an overestimation of fish densities in marine reserves and an underestimation in impacted areas due to differential responses to diver presence (29). Little is known about the extent of similar behavioral sampling bias in sharks (13). However, our results suggest that this bias may play a role in shark detection, particularly near densely populated areas, where eDNA detected a significantly greater diversity of sharks compared to UVC and BRUVS ($P < 0.001$, Kruskal-Wallis test; $P < 0.001$, Dunn's tests; Fig. 3A). Failure of traditional methods to detect comparative levels of shark diversity around

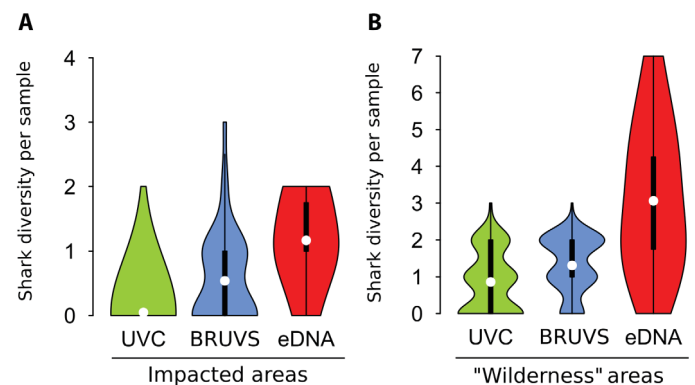


Fig. 3. Number of shark species per sample in contrast to human impacts. Violin plot showing detected shark species richness by the different methods in (A) impacted areas (Nouméa, the capital city) and (B) wilderness areas (Chesterfield, D'Entrecasteaux, Great Northern Lagoon, Petri, and Astrolabe). White dots are mean values; thick black bars correspond to interquartile ranges; thin black lines are 95% confidence intervals. Differences between methods are highly significant for both types of areas ($P < 0.001$, Kruskal-Wallis tests), with eDNA detecting more species per sample than BRUVS and UVC ($P < 0.001$, Dunn's tests).

human-populated areas may be a reflection not only of low shark densities but also of avoidance behavior in the remaining individuals. Conversely, as sharks in relatively undisturbed areas may display curiosity or naivety (29), we would expect BRUVS and UVC to reveal high shark diversity in “wilderness” areas located more than 20 hours travel time from the main regional city (19, 30). However, eDNA detected three times more species in these areas (3.1 ± 2.0) than BRUVS (1.3 ± 0.8) and UVC (0.9 ± 0.8 ; $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test; $P = 0.001$, Dunn’s tests; Fig. 3B), demonstrating that eDNA appears more effective at estimating dark diversity, even when animal behavior may bias direct observations positively or negatively. Because of spatial heterogeneity of our sampling design between the three techniques (Fig. 1A), we performed the same analysis for overlapping collection sites and found consistent results (fig. S1).

Increased species detectability revealed by rarefaction curves

Regional species diversity may be assessed by rarefaction curves linking the number of detected species to sampling effort (31). Rarefaction curves associated with the three methods (UVC, BRUVS, and eDNA) were fitted using six models with contrasted features (asymptotic versus nonasymptotic; two versus three parameters). The best model was nonasymptotic (power) for UVC-based survey and asymptotic for BRUVS and eDNA surveys (negative exponential and rational function, respectively; Table 1). The rarefaction curve for BRUVS reached nine species for the New Caledonian archipelago after 385 samples (Fig. 4, B and C). We then fitted the same asymptotic model (rational function) to the three rarefaction curves to compare their asymptotes. We show that doubling BRUVS sampling effort would result in the detection of only a single additional species (Table 1 and Fig. 4D). Meanwhile, the rarefaction curve for UVC attains nine species after 2758 UVCs (Fig. 4, B and C). According to the common model, doubling the number of UVCs would be required to detect one additional shark species (Table 1 and Fig. 4D), and both BRUVS and UVC rarefaction curves plateau at 10 species. In contrast, a few hundred eDNA samples could provide an accurate assessment of regional shark diversity (Fig. 4, B to D, and Table 1), requiring much less time and equipment than traditional survey methods. Furthermore, this would rapidly reveal a considerable proportion of shark species unseen by traditional methods that tend to overlook rare and elusive species in regional inventories (Fig. 4A). In addition, eDNA sampling was only conducted during 3 months in 2015, whereas BRUVS were deployed over a 3-year period (2012 to 2014) and UVC

surveys were conducted between 1986 and 2014, reinforcing the potential of eDNA metabarcoding to detect species. Our results are very conservative in the sense that traditional methods were carried out over a large spatiotemporal scale; thus, they are more likely to sample unique events like rare species appearance or migration.

Limits and uncertainty of species detection

Using the 127-base pair (bp) cytochrome c oxidase subunit I (COI) fragment, we did not find an unequivocal correspondence between molecular operational taxonomic units (MOTUs) and species because some MOTUs had 100% sequence identity matches with multiple species in the Barcode of Life Data System (BOLD) database (32). This issue mainly concerns the *Carcharhinus* genus, which is recognized as taxonomically problematic and polyphyletic (33). Therefore, although 16 different shark MOTUs were identified, we opted for the conservative approach of merging MOTUs to present the minimum species richness (13 species). With a trade-off between primer universality and taxonomic resolution (16), the imperfect nature of currently available metabarcoding primers introduces a degree of uncertainty regarding the identification of certain species (34).

Only three species (tiger shark, scalloped hammerhead shark, and nurse shark) that were observed by UVC and/or BRUVS were not detected by eDNA (Fig. 2). The primers used in this study have already been shown to be capable of amplifying eDNA from both *Sphyrnidae* (hammerhead sharks) and *Galeocerdo cuvier* (tiger shark), but not *Ginglymostomatidae* (nurse sharks), explaining the absence of *Nebrius ferrugineus* (tawny nurse shark) from eDNA detections (32). Previous studies have indicated that hammerhead and tiger sharks only occur at very low densities in New Caledonia (12). Although our results show the power and potential of eDNA for the detection of shark diversity, our sampling effort was insufficient for an exhaustive survey not only because of stochasticity in polymerase chain reaction (PCR) and sequencing but also because scalloped hammerhead and tiger sharks may not have been present at the specific location and time of sampling. It is thus very likely that increasing the eDNA sampling effort would detect them in New Caledonia because the rarefaction curves show that eDNA can outperform the other methods in terms of species detectability (12), but additional work on refining the design of primers is needed to cement eDNA as a standard tool for the study of dark diversity of sharks.

There are also important caveats associated with eDNA detection, and traditional survey methods still have a number of advantages over

Table 1. Models fitted for species rarefaction curves obtained from UVC, BRUVS, and eDNA using the nls function in the stats package and the AICc for small sample bias (package AICmodavg). The best-fitting model for each sampling technique is in bold, whereas the overall best-fitting model (all three techniques) is underlined.

Model	Formula	Asymptotic	Number of parameters	AICc		
				UVC	BRUVS	eDNA
Power	$S = aX^b$	No	2	-4345	528	14
Exponential	$S = a + b \log(X)$	No	2	-191	210	23
Negative exponential	$S = a(1 - e^{-bX})$	Yes	2	4940	281	24
Negative exponential	$S = a + (b - a)e^{-cX}$	Yes	3	-609	-675	-19
Monod	$S = a/(1 + bX^{-1})$	Yes	2	2321	-185	-5
<u>Rational function</u>	$S = (a + bX)/(1 + cX)$	Yes	3	<u>-2562</u>	<u>-421</u>	<u>-49</u>

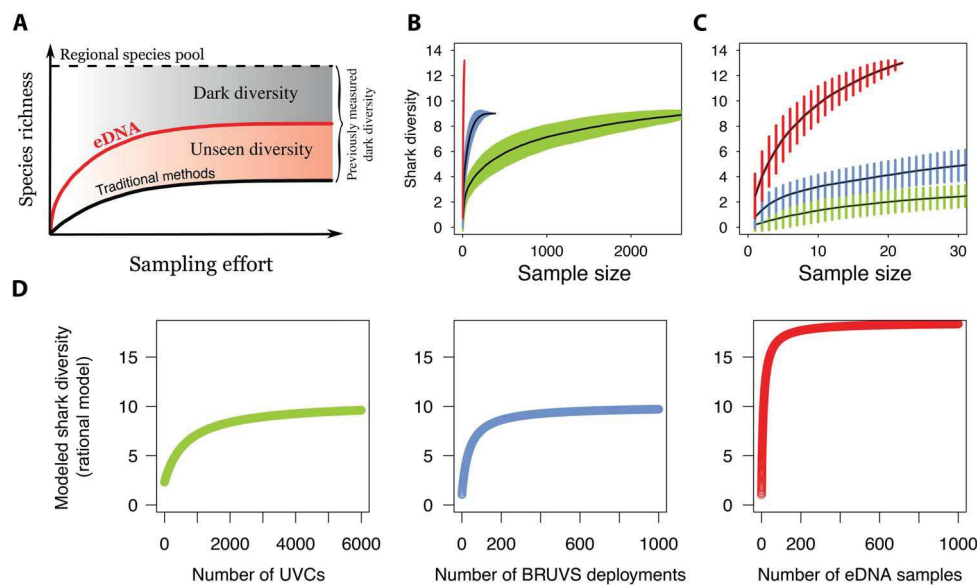


Fig. 4. Sample-based rarefaction curves. (A) Theoretical illustration of dark diversity measured by traditional methods, simply unseen but illuminated by eDNA, revealing a lower amount of dark diversity (absent species). Rarefaction curves showing accumulated sampled shark diversity measured by the different techniques (green, UVC; blue, BRUVS; red, eDNA). (B) Based on all samples. (C) Zoomed in to 30 samples. Error bars indicate SD. (D) Estimated rarefaction curves for UVC, BRUVS, and eDNA when increasing sampling effort, based on the best common model (rational function).

eDNA methodologies. Foremost, eDNA-based methods cannot provide information on size, condition, developmental stage (eggs, larvae, juveniles, and adults), sex, behavior, and movement patterns of the target organism. Furthermore, when using typically maternally inherited mitochondrial markers, it remains impossible to distinguish hybrids, which may be the result of breeding between native and invasive species, from their maternal species. Finally, inferring species abundance from eDNA still remains a challenging but promising avenue and is a key area for further research (32, 35, 36).

New light for megafauna conservation

Here, we highlight the potential of eDNA metabarcoding for the rapid assessment of elusive megafauna species richness and, for the first time, for the determination of the extent of purported local species extirpations. We call for the introduction of eDNA assessments to complement traditional survey methods for the improvement of species detection and, hence, more efficient conservation strategies for threatened and elusive megafauna.

First, eDNA allows the reappraisal of previous estimates of species occurrences, which are used to define Criteria B of International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List Categories. With 46.8% of chondrichthyan species data deficient in IUCN assessments (37), this knowledge may markedly aid Red List classifications and the design and implementation of future conservation measures. For instance, a species is classified as Vulnerable if its extent of occurrence, that is, its continuous geographic range, is less than 20,000 km² and declining. This kind of assessment is hardly achievable, trustable, and repeatable with traditional sampling methods owing to low detectability. However, eDNA provides an affordable, powerful, and standardized tool to assess large-scale occurrences, even for elusive megafauna. IUCN classification can also be based on population size (Criteria C), and although much more research is needed in this field, quantitative methods to infer eDNA concentration offer promise toward good estimates of relative abundance (36, 38). Alternative approaches include detecting and

distinguishing individuals of a given population as a measure of abundance. Differentiating populations from a single shark species has recently been achieved using eDNA (39). This strategy, even in its infancy, opens a new era in the field of population genetics using eDNA and in population size assessment, potentially fueling IUCN Criteria C. Monitoring shark populations of New Caledonia may greatly benefit from these methodological advances because the effectiveness of conservation efforts is still under scrutiny for megafauna (12, 40).

In addition, increased knowledge of dark diversity may guide the direction of conservation-based decision-making because we can learn a lot from absent species (6). To halt biodiversity loss, it is imperative to understand why some species are missing from areas where biogeographic history, as well as current ecological and environmental conditions, predicts their presence. Seeking common characteristics (for example, ecological needs, dispersal ability, and body size) among species constituting the dark diversity can help identify key determinants of vulnerability, decline, or extirpation and guide appropriate management strategies (4). High proportions of dark diversity in a given region or area indicate the need for widespread conservation efforts across multiple species, whereas low proportions of dark diversity suggest that more tailored solutions are required to reduce pressures on specific species apparently missing. Areas showing a high observed diversity and low dark diversity can be considered as refugia and thus potential sources for recolonization. Consequently, such areas deserve high conservation priority (6, 41). By contrast, areas with relatively high dark diversity compared to the observed species richness need restoration efforts focusing on mitigation of species threats and increasing connectivity. In New Caledonia, mapping and monitoring the dark diversity related to the observed diversity of sharks along human gradients would provide a relevant indicator of wildlife status to inform management.

Large-scale efforts to restore local species pools are more feasible in terrestrial than in marine environments. For example, creating habitat connectivity to promote species reestablishment has previously been shown to be successful [for example, see the study

of Di Minin *et al.* (42)]. However, this requires alleviation of the original stressors (through, for instance, protected areas) to avoid affecting newly reconnected populations (42). Assisted reintroduction is another potential solution in terrestrial habitats, albeit costly and controversial (43, 44). Because there are fewer manipulative solutions for the marine environment, the discovery of remaining individuals close to human-impacted areas requires more immediate, alternative actions, such as the establishment of marine reserve networks and connecting suitable habitats, to preserve the remainder of the species and increase population densities by decreasing threats. eDNA will most likely prove progressively useful in marine conservation and hence will be playing an increasingly important role in the formulation of policies to aid species conservation.

MATERIALS AND METHODS

Study sites

The New Caledonian archipelago is located in the southwestern Pacific Ocean (Fig. 1A). It is composed of “Grande Terre” surrounded by one of the largest barrier reefs in the world and numerous isolated islands and remote reefs. Sampling occurred across the New Caledonian Archipelago, including waters from the Coral Sea Marine Park. Study areas encompassed a gradient of human density, from high population density (near the capital, Nouméa) to wilderness reefs at >20 hours travel time from the main regional city [Chesterfield Reefs, D’Entrecasteaux Reefs, Astrolabe Reefs, Petri, and Great Northern Lagoon (12, 19, 30)]. The regional pool of sharks in New Caledonia is inventoried at 49 species, including 26 shallow-water species (17).

UVC and BRUVS data sets

UVC and BRUVS protocols used in this study are described in detail by D’Agata *et al.* (19) and Juhel *et al.* (12). Here, 2758 UVCs were conducted by day in various coral reef habitats at depths of 1 to 15 m from 1986 to 2014 (Fig. 1A). Three hundred eighty-five BRUVS (45) were deployed by day at a mean depth of 16 m (± 10 m SD; range, 3 to 48 m) in different coral reef habitats between September 2012 and October 2014. BRUVS are video systems that record for 1 hour in the presence of standardized bait (1-kg pilchards). Shark occurrence was measured through video analysis, and species identification was double-checked by trained operators.

eDNA collection and sample processing

eDNA samples were collected during September to November 2015, on coral reef external slopes, with a reef topography ranging from 20 to 40 m. Each 4-liter water sample consisted of 2 liters sampled at a depth of 5 m and 2 liters sampled at a depth of 20 m, collected with a Niskin water sampler. After collection, water samples were individually covered and stored on ice before filtration. Water was subsequently filtered using sterile mixed cellulose esters filters (Merck Millipore; diameter, 47 mm; pore size, 0.45 μ m) and then stored at -20°C in 2.0-ml screw-cap microcentrifuge tubes containing silica beads, drying out the filters and preventing DNA degradation (32). DNA was extracted from the filters using the DNeasy PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen), following the manufacturer’s protocol. Purified extracts were assessed for DNA concentration in a Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

Strict adherence to contamination control was followed at all field and laboratory stages to prevent the occurrence of contamination, including the use of disposable gloves and single-use sterile collection

bottles and filtration equipment, and the bleaching (50% bleach) of sampling devices, laboratory equipment, and surfaces. In addition, a dedicated controlled eDNA laboratory at the University of Salford, with separate rooms designated for the physical separation of eDNA extraction, pre-PCR preparations, and post-PCR procedures, was used for all laboratory work. To identify any potential contamination, negative control DNA extraction blanks (elution buffer from extraction kit) and PCR blanks were also ran (32).

Library preparation and sequencing

An elasmobranch-specific COI primer set was used for the amplification of eDNA metabarcoding markers. The previously published primer set consisted of a novel reverse primer (“Shark COI-MINIR”, 5’-AAGATTACAAAAGCGTGGGC-3’) (46) and two universal fish barcoding forward primers (FishF2, 5’-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3’; FishF1, 5’-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3’) (46, 47), yielding an amplicon of 127 bp. Samples were sequenced in a single multiplexed Illumina MiSeq run, along with samples from a related project, which are not included in this study, for a total of 96 samples including two negative controls, using four sets of 24 primers with attached eight-base sample-specific oligo-tags differing in at least three bases (table S1) (48). To increase variability of the amplicon sequences, a variable number (two, three, or four) of fully degenerate positions (Ns) was added at the beginning of each primer (49). The full, sequenced PCR product consisted of 195 bp, including the amplicon, primers, sample tags, and leading Ns.

For PCR amplification, a single-step protocol was used, directly attaching the eight-base tagged primers. The PCR mix recipe was as follows: A total volume of 20 μ l included 2 μ l of 10 \times buffer (BioLine), 0.6 μ l of 50 mM MgCl (BioLine), 0.5 μ l each of the 5 μ M forward primers (Eurofins), 1 μ l of the 5 μ M reverse primer, 0.2 μ l of 10 mM deoxynucleotide triphosphate mix (BioLine), 0.2 μ l of BioTaq DNA polymerase (5 U/ μ l; BioLine), a standardized amount (10 ng) of the filter-extracted eDNA template, and 13 μ l of sterile water. The PCR profile included an initial denaturing step of 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min, 35 cycles of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min and a final extension step of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The quality of all amplifications was assessed by electrophoresis, running the products through a 1.5% agarose gel stained with GelRed (Cambridge Bioscience), and visualized on an ultraviolet light platform. All PCR products (including two PCR-negative controls) were pooled by marker into four multiplex sample pools and purified using MinElute columns (Qiagen). Four Illumina libraries were subsequently built from the four pools, using a NextFlex PCR-free library preparation kit (Bioo Scientific). The libraries were quantified using a NEBNext qPCR quantification kit (New England Biolabs) and pooled in equimolar concentrations along with 1% PhiX (v3, Illumina) serving as a positive sequencing quality control. The libraries with a final molarity of 8 pM were sequenced on an Illumina MiSeq platform in a single MiSeq flow cell using v2 chemistry (2 \times 150-bp paired ends).

Bioinformatics analyses

The bioinformatic analysis was based on an OBITools metabarcoding software suite (50). The pipeline used for data analysis is summarized in table S2. Quality of the reads was assessed using FastQC. Paired-end reads were aligned using illumina paired-end, and alignments with quality scores >40 were kept. The aligned data set was demultiplexed using ngsfilter. A length filter (obigrep) was applied to the aligned reads (120 to 135 bp), and reads containing ambiguous bases were removed. The reads were then dereplicated using obiuniq, and a chimera removal step

was performed using the uchime-denovo algorithm (51) implemented in vsearch (52). The MOTUs were delimited using the sumacust algorithm (50) with a constant similarity threshold of 99%. Taxonomic assignment of the representative sequences for each MOTU was performed using the ecotag algorithm (50). We built a bespoke elasmobranch reference database using a custom R script for retrieving all COI elasmobranch sequences available from the BOLD database (53), subsequently selecting those that included our 127-bp target fragment. The custom R script is available from http://github.com/metabarpark/R_scripts_querying_databases. To add homologous sequences from other non-elasmobranch taxa, an in silico PCR was performed against release R117 of the EMBL-EBI database using ecoPCR (54). Subsequently, the obtained reference sequences were added to the elasmobranch sequences obtained from BOLD. These additional reference sequences were added to our elasmobranch database to avoid the incorrect assignment of amplified sequences, belonging to other taxa, to elasmobranchs. This combined reference database is available from <http://github.com/metabarpark/Reference-databases>. The final refining of the data set included taxonomy clustering of MOTUs assigned to the same species.

The risk of contamination adds to the challenges associated with eDNA metabarcoding (18, 55), with the possibility of introducing false-positive results. It is likely to detect a species represented by a single sequence read in a sample, but the possibility of contamination or sequencing error cannot be excluded as the potential cause of MOTU detection. We subsequently adopted a conservative approach to our analyses and removed single-read MOTUs from our samples to avoid potential false positives.

Statistical analyses

Given the violation of the normality assumption and the unbalanced design with different number of samples depending on the techniques, Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's tests were performed to test for differences in shark diversity per sample among techniques. The vegan package was used for rarefaction analyses, followed by model fitting using the nls function in the stats package and the Akaike information criterion corrected for small sample bias (AICc, package AICmodavg). Models were fitted for the three methods independently (UVC, BRUVS, and eDNA; Table 1); subsequently, a common model was selected by comparing AICc for the three methods simultaneously. Statistical analyses were performed in the R program environment (R Development Core Team 2012, version 3.4.0).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/4/5/eaap9661/DC1>

fig. S1. Number of shark species per sample in overlapping collection sites.

table S1. Full sequences of the 24 tagged primer sets used.

table S2. Metabarcoding pipeline for COI Elasmobranchii Fields *et al.* primers.

REFERENCES AND NOTES

1. R. Dirzo, H. S. Young, M. Galetti, G. Ceballos, N. J. B. Isaac, B. Collen, Defaunation in the Anthropocene. *Science* **345**, 401–406 (2014).
2. H. S. Young, D. J. McCauley, M. Galetti, R. Dirzo, Patterns, causes, and consequences of anthropocene defaunation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **47**, 333–358 (2016).
3. M. Pärtel, R. Szava-Kovats, M. Zobel, Dark diversity: Shedding light on absent species. *Trends Ecol. Evol.* **26**, 124–128 (2011).
4. J. E. Moeslund, A. K. Brunbjerg, K. K. Clausen, L. Dalby, C. Fløjgaard, A. Juel, J. Lenoir, Using dark diversity and plant characteristics to guide conservation and restoration. *J. Appl. Ecol.* **54**, 1730–1741 (2017).
5. S. Soliveres, F. van der Plas, P. Manning, D. Prati, M. M. Gossner, S. C. Renner, F. Alt, H. Arndt, V. Baumgartner, J. Binkenstein, K. Birkhofer, S. Blaser, N. Blüthgen, S. Boch, S. Böhm, C. Börschig, F. Buscot, T. Diekötter, J. Heinze, N. Hölzel, K. Jung, V. H. Klaus, T. Kleinebecker, S. Klemmer, J. Krauss, M. Lange, E. K. Morris, J. Müller, Y. Oelmann, J. Overmann, E. Pašalić, M. C. Rillig, H. M. Schaefer, M. Schloter, B. Schmitt, I. Schöning, M. Schruppf, J. Sikorski, S. A. Socher, E. F. Solly, I. Sonnemann, E. Sorkau, J. Steckel, I. Steffan-Dewenter, B. Stempfhuber, M. Tschapka, M. Türke, P. C. Venter, C. N. Weiner, W. W. Weisser, M. Werner, C. Westphal, W. Wilcke, V. Wolters, T. Wubet, S. Wurst, M. Fischer, E. Allan, Biodiversity at multiple trophic levels is needed for ecosystem multifunctionality. *Nature* **536**, 456–459 (2016).
6. R. J. Lewis, F. de Bello, J. A. Bennett, P. Fibich, G. E. Finerty, L. Götzenberger, I. Hiiesalu, L. Kasari, J. Lepš, M. Májeková, O. Mudrák, K. Riibak, A. Ronk, T. Rychtecká, A. Vitová, M. Pärtel, Applying the dark diversity concept to nature conservation. *Conserv. Biol.* **31**, 40–47 (2017).
7. T. J. Webb, B. L. Mindel, Global patterns of extinction risk in marine and non-marine systems. *Curr. Biol.* **25**, 506–511 (2015).
8. L. N. K. Davidson, N. K. Dulvy, Global marine protected areas to prevent extinctions. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 0040 (2017).
9. A. J. Hobday, A. D. M. Smith, I. C. Stobutzki, C. Bulman, R. Daley, J. M. Dambacher, R. A. Deng, J. Dowdney, M. Fuller, D. Furlani, S. P. Griffiths, D. Johnson, R. Kenyon, I. A. Knuckey, S. D. Ling, R. Pitcher, K. J. Sainsbury, M. Sporic, T. Smith, C. Turnbull, T. I. Walker, S. E. Wayte, H. Webb, A. Williams, B. S. Wise, S. Zhou, Ecological risk assessment for the effects of fishing. *Fish. Res.* **108**, 372–384 (2011).
10. L. McClenachan, A. B. Cooper, N. K. Dulvy, Rethinking trade-driven extinction risk in marine and terrestrial megafauna. *Curr. Biol.* **26**, 1640–1646 (2016).
11. M. O. Nadon, J. K. Baum, I. D. Williams, J. M. McPherson, B. J. Zgliczynski, B. L. Richards, R. E. Schroeder, R. E. Brainard, Re-creating missing population baselines for pacific reef sharks. *Conserv. Biol.* **26**, 493–503 (2012).
12. J.-B. Juhel, L. Vigliola, D. Mouillot, M. Kulbicki, T. B. Letessier, J. J. Meeuwig, L. Wantiez, Reef accessibility impairs the protection of sharks. *J. Appl. Ecol.* **55**, 673–683 (2018).
13. J. Mourier, C. Brown, S. Planes, Learning and robustness to catch-and-release fishing in a shark social network. *Biol. Lett.* **13**, 20160824 (2017).
14. K. Bohmann, A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. W. Yu, M. de Bruyn, Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol. Evol.* **29**, 358–367 (2014).
15. M. Miya, Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh, W. Iwasaki, MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.* **2**, 150088 (2015).
16. P. F. Thomsen, P. R. Møller, E. E. Sigsgaard, S. W. Knudsen, O. A. Jørgensen, E. Willerslev, Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLOS ONE* **11**, e0165252 (2016).
17. P. Tirard, *Requins du Caillou* (2011).
18. C. S. Goldberg, C. R. Turner, K. Deiner, K. E. Klymus, P. F. Thomsen, M. A. Murphy, S. F. Spear, A. McKee, S. J. Oyler-McCance, R. S. Cornman, M. B. Laramie, A. R. Mahon, R. F. Lance, D. S. Pilliod, K. M. Strickler, L. P. Waits, A. K. Fremier, T. Takahara, J. E. Herder, P. Taberlet, Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Ecol. Evol.* **7**, 1299–1307 (2016).
19. S. D'Agata, D. Mouillot, L. Wantiez, A. M. Friedlander, M. Kulbicki, L. Vigliola, Marine reserves lag behind wilderness in the conservation of key functional roles. *Nat. Commun.* **7**, 12000 (2016).
20. T. Minamoto, M. Fukuda, K. R. Katsuhara, A. Fujiwara, S. Hidaka, S. Yamamoto, K. Takahashi, R. Masuda, Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLOS ONE* **12**, e0173073 (2017).
21. P. F. Thomsen, J. Kielgast, L. L. Iversen, P. R. Møller, M. Rasmussen, E. Willerslev, Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLOS ONE* **7**, e41732 (2012).
22. D. A. Ebert, S. Fowler, L. Compagno, *Sharks of the World* (Wild Nature Press, 2013).
23. J. A. Port, J. L. O'Donnell, O. C. Romero-Maraccini, P. R. Leary, S. Y. Litvin, K. J. Nickols, K. M. Yamahara, R. P. Kelly, Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Mol. Ecol.* **25**, 527–541 (2016).
24. J. L. O'Donnell, R. P. Kelly, A. O. Shelton, J. F. Samhuri, N. C. Lowell, G. D. Williams, Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat. *PeerJ.* **5**, e3044 (2017).
25. G. J. Edgar, R. D. Stuart-Smith, T. J. Willis, S. Kininmonth, S. C. Baker, S. Banks, N. S. Barrett, M. A. Becerro, A. T. F. Bernard, J. Berkhout, C. D. Buxton, S. J. Campbell, A. T. Cooper, M. Davey, S. C. Edgar, G. Försterra, D. E. Galván, A. J. Irigoyen, D. J. Kushner, R. Moura, P. E. Parnell, N. T. Shears, G. Soler, E. M. A. Strain, R. J. Thomson, Global conservation outcomes depend on marine protected areas with five key features. *Nature* **506**, 216–220 (2014).
26. W. D. Robbins, M. Hisano, S. R. Connolly, J. H. Choat, Ongoing collapse of coral-reef shark populations. *Curr. Biol.* **16**, 2314–2319 (2006).

27. A. Frid, L. M. Dill, Human-caused disturbance stimuli as a form of predation risk. *Ecol. Soc.* **6**, 11 (2002).
28. S. S. French, M. González-Suárez, J. K. Young, S. Durham, L. R. Gerber, Human disturbance influences reproductive success and growth rate in California sea lions (*Zalophus californianus*). *PLOS ONE* **6**, e17686 (2011).
29. J. Goetze, F. A. Januchowski-Hartley, J. Claudet, T. J. Langlois, S. K. Wilson, S. D. Jupiter, Fish wariness is a more sensitive indicator to changes in fishing pressure than abundance, length or biomass. *Ecol. Appl.* **27**, 1178–1189 (2017).
30. E. Maire, J. Cinner, L. Velez, C. Huchery, C. Mora, S. Dagata, L. Vigliola, L. Wantiez, M. Kulbicki, D. Mouillot, How accessible are coral reefs to people? A global assessment based on travel time. *Ecol. Lett.* **19**, 351–360 (2016).
31. N. J. Gotelli, R. K. Colwell, Quantifying biodiversity: Procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol. Lett.* **4**, 379–391 (2001).
32. J. Bakker, O. S. Wangensteen, D. D. Chapman, G. Boussarie, D. Buddo, T. L. Guttridge, H. Hertler, D. Mouillot, L. Vigliola, S. Mariani, Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact. *Sci. Rep.* 16886 (2017).
33. L. Sorenson, F. Santini, M. E. Alfaro, The effect of habitat on modern shark diversification. *J. Evol. Biol.* **27**, 1536–1548 (2014).
34. M. Stat, M. J. Huggett, R. Bernasconi, J. D. DiBattista, T. E. Berry, S. J. Newman, E. S. Harvey, M. Bunce, Ecosystem biomonitoring with eDNA: Metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Sci. Rep.* **7**, 12240 (2017).
35. T. Jo, H. Murakami, R. Masuda, M. K. Sakata, S. Yamamoto, T. Minamoto, Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Mol. Ecol. Resour.* **17**, e25–e33 (2017).
36. S. Yamamoto, K. Minami, K. Fukaya, K. Takahashi, H. Sawada, H. Murakami, S. Tsuji, H. Hashizume, S. Kubonaga, T. Horiuchi, M. Hongo, J. Nishida, Y. Okugawa, A. Fujiwara, M. Fukuda, S. Hidaka, K. W. Suzuki, M. Miya, H. Araki, H. Yamanaka, A. Maruyama, K. Miyashita, R. Masuda, T. Minamoto, M. Kondoh, Environmental DNA as a ‘snapshot’ of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLOS ONE* **11**, e0149786 (2016).
37. N. K. Dulvy, S. L. Fowler, J. A. Musick, R. D. Cavanagh, P. M. Kyne, L. R. Harrison, J. K. Carlson, L. N. K. Davidson, S. V. Fordham, M. P. Francis, C. M. Pollock, C. A. Simpfendorfer, G. H. Burgess, K. E. Carpenter, L. J. V. Compagno, D. A. Ebert, C. Gibson, M. R. Heupel, S. R. Livingstone, J. C. Sanciangco, J. D. Stevens, S. Valenti, W. T. White, Extinction risk and conservation of the world’s sharks and rays. *eLife* **3**, e00590 (2014).
38. A. Lacoursière-Roussel, G. Côté, V. Leclerc, L. Bernatchez, Quantifying relative fish abundance with eDNA: A promising tool for fisheries management. *J. Appl. Ecol.* **53**, 1148–1157 (2016).
39. E. E. Sigsgaard, I. B. Nielsen, S. S. Bach, E. D. Lorenzen, D. P. Robinson, S. W. Knudsen, M. W. Pedersen, M. A. Jaidah, L. Orlando, E. Willerslev, P. R. Møller, P. F. Thomsen, Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 0004 (2016).
40. H. Bauer, G. Chapron, K. Nowell, P. Henschel, P. Funston, L. T. B. Hunter, D. W. Macdonald, C. Packer, Lion (*Panthera leo*) populations are declining rapidly across Africa, except in intensively managed areas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 14894–14899 (2015).
41. M. Pärtel, R. Szava-Kovats, M. Zobel, Community completeness: Linking local and dark diversity within the species pool concept. *Folia Geobot.* **48**, 307–317 (2013).
42. E. Di Minin, L. T. B. Hunter, G. A. Balme, R. J. Smith, P. S. Goodman, R. Slotow, Creating larger and better connected protected areas enhances the persistence of big game species in the Maputaland-Pondoland-Albany biodiversity hotspot. *PLOS ONE* **8**, e71788 (2013).
43. P. J. Seddon, C. J. Griffiths, P. S. Soorae, D. P. Armstrong, Reversing defaunation: Restoring species in a changing world. *Science* **345**, 406–412 (2014).
44. F. J. Weise, K. J. Stratford, R. J. van Vuuren, Financial costs of large carnivore translocations—Accounting for conservation. *PLOS ONE* **9**, e105042 (2014).
45. E. S. Harvey, M. Cappel, J. J. Butler, N. Hall, G. A. Kendrick, Bait attraction affects the performance of remote underwater video stations in assessment of demersal fish community structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **350**, 245–254 (2007).
46. A. T. Fields, D. L. Abercrombie, R. Eng, K. Feldheim, D. D. Chapman, A novel mini-DNA barcoding assay to identify processed fins from internationally protected shark species. *PLOS ONE* **10**, e0114844 (2015).
47. R. D. Ward, T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last, P. D. N. Hebert, DNA barcoding Australia’s fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **360**, 1847–1857 (2005).
48. M. Guardiola, M. J. Uriz, P. Taberlet, E. Coissac, O. S. Wangensteen, X. Turon, Deep-sea, deep-sequencing: Metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons. *PLOS ONE* **10**, e0139633 (2015).
49. O. S. Wangensteen, X. Turon, Metabarcoding techniques for assessing biodiversity of marine animal forests, in *Marine Animal Forests*, S. Rossi, L. Bramanti, A. Gori, C. Orejas, Eds. (Springer, 2015), pp. 1–26.
50. F. Boyer, C. Mercier, A. Bonin, Y. Le Bras, P. Taberlet, E. Coissac, obitools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* **16**, 176–182 (2016).
51. R. C. Edgar, B. J. Haas, J. C. Clemente, C. Quince, R. Knight, UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200 (2011).
52. T. Rognes, T. Flouri, B. Nichols, C. Quince, F. Mahé, VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* **4**, e2584 (2016).
53. S. Ratnasingham, P. D. N. Hebert, BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol. Ecol. Notes* **7**, 355–364 (2007).
54. G. F. Ficetola, E. Coissac, S. Zundel, T. Riaz, W. Shehzad, J. Bessière, P. Taberlet, F. Pompanon, An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics* **11**, 434 (2010).
55. P. F. Thomsen, E. Willerslev, Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.* **183**, 4–18 (2015).

Acknowledgments: We thank the crew of the research vessels *Amborella* (Government of New Caledonia), *Alis* Institute of Research for Development, and *Plan B* (Waït Institute) for their help with data collection during oceanographic campaigns. We thank G. Mou-Tham and many others for UVC collection and BRUVS analyses. We would also like to thank M. Dando for the scientific drawings used in the manuscript. **Funding:** This work is an outcome of the Pristine, APEX and e(lasmo)DNA projects co-funded by the Total Foundation, the Pew Charitable Trusts, the Government of New Caledonia, and the University of Salford R&E strategy funding. **Author contributions:** G.B., S. Mariani, D.M., and L.V. designed the study with inputs from all coauthors. J.B., O.S.W., and S. Mariani designed and carried out the eDNA laboratory procedures and bioinformatics pipeline. M.K., L.V., J.-B.J., G.B., W.D.R., and many others collected the UVC, BRUVS, and eDNA samples. G.B., J.B., O.S.W., L.V., and D.M. analyzed the data and drafted the manuscript with input from all authors. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Additional data related to this paper may be requested from L.V. (laurent.vigliola@ird.fr).

Submitted 14 September 2017

Accepted 16 March 2018

Published 2 May 2018

10.1126/sciadv.aap9661

Citation: G. Boussarie, J. Bakker, O. S. Wangensteen, S. Mariani, L. Bonnin, J.-B. Juhel, J. J. Kiszka, M. Kulbicki, S. Manel, W. D. Robbins, L. Vigliola, D. Mouillot, Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks. *Sci. Adv.* **4**, eaap9661 (2018).

Science Advances



advances.sciencemag.org/cgi/content/full/4/5/eaap9661/DC1

Supplementary Materials for

Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks

Germain Boussarie, Judith Bakker, Owen S. Wangensteen, Stefano Mariani, Lucas Bonnin, Jean-Baptiste Juhel, Jeremy J. Kiszka, Michel Kulbicki, Stephanie Manel, William D. Robbins, Laurent Vigliola, David Mouillot

Published 2 May 2018, *Sci. Adv.* **4**, eaap9661 (2018)
DOI: 10.1126/sciadv.aap9661

This PDF file includes:

- fig. S1. Number of shark species per sample in overlapping collection sites.
- table S1. Full sequences of the 24 tagged primer sets used.
- table S2. Metabarcoding pipeline for COI Elasmobranchii Fields *et al.* primers.

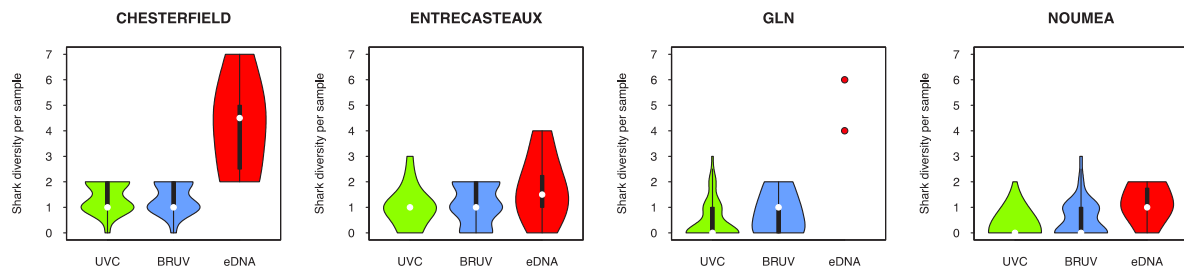


fig. S1. Number of shark species per sample in overlapping collection sites. Violin plot showing detected shark species richness by the different methods in Chesterfield, Entrecasteaux, GLN and Nouméa. Only two eDNA samples were collected in GLN (red dots). White dots are mean values; thick black bars correspond to interquartile ranges; thin black lines are 95% confidence intervals.

table S1. Full sequences of the 24 tagged primer sets used. The primer mix for each PCR included the reverse primer and an equimolar mixture of the two forward primers, all tagged with the same 8-bp tag (in lowercase in this table). A variable number of fully degenerate positions (Ns) was added at the beginning of each primer, to increase sequence diversity.

Reverse primers		Forward primers 1		Forward primers 2	
Shark-COI-MINIR_tag01	NNNNaacaagccAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag01	NNaacaagccTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag01	NNaacaagccTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag02	NNNggaatgagAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag02	NNNggaatgagTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag02	NNNggaatgagTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag03	NNNaattgccgAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag03	NNNNaattgccgTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag03	NNNNaattgccgTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag04	NNNncgaccataAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag04	NNcgaccataTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag04	NNcgaccataTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag05	NNNnatgetgacAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag05	NNNnatgetgacTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag05	NNNnatgetgacTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag06	NNNgagacagAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag06	NNNngagacagTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag06	NNNngagacagTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag07	NNNngagcttacAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag07	NNngagcttacTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag07	NNngagcttacTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag08	NNNttaccaggAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag08	NNNttaccaggTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag08	NNNttaccaggTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag09	NNNgagagctAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag09	NNNngagagctTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag09	NNNngagagctTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag10	NNNnctgacctAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag10	NNnctgacctTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag10	NNnctgacctTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag11	NNNnatgcttggAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag11	NNNnatgcttggTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag11	NNNnatgcttggTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag12	NNNaaccctgAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag12	NNNnaaccctgTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag12	NNNnaaccctgTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag13	NNNntaccgetAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag13	NNntaccgetTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag13	NNntaccgetTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag14	NNNccagatgAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag14	NNNccagatgTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag14	NNNccagatgTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag15	NNNgagatgcAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag15	NNNngagatgcTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag15	NNNngagatgcTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag16	NNNngtcaactAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag16	NNngtcaactTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag16	NNngtcaactTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag17	NNNnacaaccgaAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag17	NNnacaaccgaTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag17	NNnacaaccgaTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag18	NNNgagcctaAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag18	NNNngagcctaTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag18	NNNngagcctaTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag19	NNNnatggaggTAAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag19	NNnatggaggTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag19	NNnatggaggTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag20	NNNtcatagcAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag20	NNNtcatagcTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag20	NNNtcatagcTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag21	NNNctgagtctAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag21	NNNctgagtctTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag21	NNNctgagtctTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag22	NNNngagtgaaAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag22	NNngagtgaaTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag22	NNngagtgaaTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag23	NNNggcatgtaAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag23	NNNggcatgtaTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag23	NNNggcatgtaTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Shark-COI-MINIR_tag24	NNngtgcataAAGATTACAAAAGCGTGGGC	FishF1_tag24	NNNngtgcataTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	FishF2_tag24	NNNngtgcataTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC

table S2. Metabarcoding pipeline for COI Elasmobranchii Fields *et al.* primers.

<p>1. Paired-end alignment. Keep reads with quality > 40. Demultiplexing.</p> <pre>illuminapairedend -r SHAK_S1_L001_R2_001.fastq SHAK_S1_L001_R1_001.fastq obiannotate -S goodali:"Good_SHAK" if score>40.00 else "Bad_SHAK" obisplit -t goodali</pre> <pre>ngsfilter -t ngsfilter_SHAK_fields.tsv --fasta-output -u unidentified_SHAK.fasta Good_SHAK.fasta > SHAK.filtered.fasta</pre>
<p>2. Filter sequences with lengths between 120 and 135 bp and with only 'ACGT'.</p> <pre>obigrep -p 'seq_length>120' -p 'seq_length<135' -s '^[ACGT]+\$' SHAK.filtered.fasta > SHAK.filtered_length.fasta</pre>
<p>3. Group unique seqs.</p> <pre>obiuniq -m sample SHAK.filtered_length.fasta > SHAK.unique.fasta</pre>
<p>4. Change ids to a short index. Change format to vsearch. Remove chimeras.</p> <pre>obiannotate --seq-rank SHAK.unique.fasta obiannotate --set-identifier "'SHAK'%09d" % seq_rank' > SHAK.new.fasta</pre> <pre>owi_obifasta2vsearch -i SHAK.new.fasta -o SHAK.vsearch.fasta</pre> <pre>vsearch --uchime_denovo SHAK.vsearch.fasta --sizeout --nonchimeras SHAK.nonchimeras.fasta --chimeras SHAK.chimeras.fasta --uchimeout SHAK.uchimeout.txt</pre>
<p>5. Cluster at 99% with sumacust. Get cluster centers.</p> <pre>sumacust -t 0.99 -s count -p 10 SHAK.nonchimeras.fasta > SHAK.sumacust99.fasta</pre> <pre>obigrep -p 'cluster_center' SHAK.sumacust99.fasta > SHAK.sumacust99.centers.fasta</pre>
<p>6. Taxonomic assignment using ecotag.</p> <pre>ecotag -d taxo_sharks -R db_Elasmobranchii_Bakker_et_al_2017.fasta SHAK.sumacust99.centers.fasta > SHAK.ecotag.fasta</pre>
<p>7. Add taxa above order level.</p> <pre>owi_add_taxonomy -i SHAK.ecotag.fasta -o SHAK.ecotag.fasta.annotated.csv</pre>
<p>8. Recount abundances by sample.</p> <pre>obitab -o SHAK.sumacust99.fasta > SHAK.sumacust99.tab</pre> <pre>owi_recount_sumacust -i SHAK.sumacust99.tab -o SHAK.sumacust99.counts.csv</pre>
<p>9. Combine ecotag and abundance files.</p> <pre>owi_combine -i SHAK.ecotag.fasta.annotated.csv -a SHAK.sumacust99.counts.csv -o SHAK_all_MOTUs.csv</pre>
<p>10. Collapse MOTUs.</p> <pre>owi_collapse -s 13 -e 88 -i SHAK_all_MOTUs.csv</pre>
<p>11. Curate the dataset manually.</p>
<p>12. Re-collapse MOTUs after curating.</p> <pre>owi_collapse -s 13 -e 88 -i SHAK_all_MOTUs_curated.csv</pre>

3. SYNTHÈSE

Cette première partie avait pour but d'explorer dans un premier temps le potentiel de la méthode d'analyse de l'ADN environnemental par metabarcoding, ciblée spécifiquement sur les communautés de requins, en se penchant sur les patrons de diversité d'espèces et d'abondance de fragments détectés. Dans un second temps, elle visait à mettre en parallèle les résultats de cette méthode novatrice avec des approches plus traditionnellement utilisées pour le suivi des communautés de requins afin d'explorer les implications possibles de l'utilisation de cette technique dans le domaine de la conservation.

Le premier article (chapitre 2) montre ainsi le fort potentiel que peut représenter dans le futur l'analyse de l'ADN environnemental par metabarcoding pour le suivi des communautés de requins. En effet, cette approche rapide et non-invasive a permis d'identifier au moins 21 espèces de requins dans les eaux de deux domaines biogéographiques distincts (les Caraïbes et la Nouvelle-Calédonie). Il a ainsi été montré que les patrons de diversité et d'abondance de fragments détectés coïncident avec les gradients de pression anthropique et les niveaux de protection associés aux zones échantillonnées.

Il interroge également sur le long chemin qu'il reste encore à parcourir sur plusieurs points si l'on veut appliquer cette nouvelle méthode et interpréter les résultats de manière appropriée. Tout d'abord, des efforts devront être déployés pour développer et affiner les marqueurs moléculaires ainsi que les bases de données de référence. Ensuite, afin d'augmenter le niveau de compréhension de l'écologie de l'ADN environnemental, des recherches futures doivent se focaliser de manière plus précise sur les facteurs biotiques et abiotiques qui influencent la production, la répartition et la détection de l'ADN environnemental. Bien que de nombreux travaux aient été conduits sur la question, chaque système d'étude (communautés et environnement dans lequel les espèces qui la composent évoluent) est très différent, et les lacunes dans ce domaine restent donc importantes. Les combler permettra de mieux appréhender les difficultés liées à des spécificités biologiques, et d'augmenter le niveau de confiance que l'on pourra accorder à l'interprétation des résultats des analyses d'ADN environnemental. Quant à l'utilisation de l'ADN environnemental comme proxy de l'abondance, beaucoup d'interrogations demeurent à ce sujet.

Le potentiel de l'analyse de l'ADN environnemental par metabarcoding est ensuite révélé et développé dans le second article (chapitre 3), notamment avec la mise en lumière de cette méthode pour l'étude des espèces rares, mobiles et furtives. Cet article s'intéresse à une métrique simple – la

diversité spécifique – et montre que cette méthode est prometteuse pour l'étude de telles espèces. En effet, malgré un effort d'échantillonnage de deux ordres de grandeur inférieur, l'analyse de l'ADN environnemental permet de déceler la présence de plus d'espèces que par les méthodes traditionnelles, à la fois dans les zones proches de l'homme et dans les récifs éloignés. Pour les Chondrichthyens dont la moitié des espèces ont un statut de conservation inconnu par manque de données, de nouvelles perspectives s'ouvrent alors. Incorporée en complément d'autres méthodes de suivi, cette technique permettrait de rapidement obtenir des informations sur la distribution des espèces qui jusque-là étaient méconnues, afin de proposer des mesures de gestion appropriées ainsi que des statuts de conservation limitant notamment le commerce international (CITES, *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), bien que de nombreuses espèces de requins listées à la CITES restent parmi les espèces les plus commercialisées pour leurs ailerons (Cardenosa et al., 2018).

PARTIE II

CONNECTIVITÉ GÉNÉTIQUE D'UNE ESPÈCE COMMUNE AU RÔLE ÉCOLOGIQUE IMPORTANT ET IMPLICATIONS POUR LA CONSERVATION

Cette deuxième partie est divisée en trois chapitres. Elle se concentre sur la structure des populations d'un requin relativement commun, bien que quasi-menacé (NT Liste Rouge UICN). Cette espèce, le requin gris de récif, *Carcharhinus amblyrhynchos* (Bleeker, 1856), joue un rôle écologique important au sein des écosystèmes coralliens (Roff et al., 2016).

Le premier chapitre (chapitre 4) aura pour but de présenter le contexte scientifique général et les premières bases méthodologiques de cette partie. Certains résultats issus de l'utilisation de méthodes couramment utilisées en génétique des populations seront présentés dans ce premier chapitre dans le but de commencer à répondre à la question suivante : comment sont structurées les populations de *C. amblyrhynchos* au niveau génétique au sein de l'archipel de la Nouvelle-Calédonie et à plus grande échelle ?

Le deuxième chapitre (chapitre 5) s'intéresse plus précisément à la structure génétique caractérisée dans le premier chapitre, en la reliant à des facteurs biogéographiques via des approches de génomique du paysage puis de modélisation permettant de proposer une délimitation d'unités de conservation à grande échelle et résolution fine.

Enfin, le dernier chapitre de cette partie (chapitre 6) vise à explorer la place des récifs éloignés pour la conservation des espèces mobiles telles que *C. amblyrhynchos*. Cette question est très importante pour comprendre le rôle de ces récifs refuges pour de telles espèces, notamment s'ils peuvent jouer ou non le rôle de sources reliées aux zones anthropisées.

GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DU REQUIN GRIS DE RÉCIF, *Carcharhinus amblyrhynchos*

1. INTRODUCTION

Ce premier chapitre introductif aux deux suivants permet de poser dans un premier temps le contexte méthodologique de la partie de génétique des populations de cette thèse. Certains résultats seront ensuite présentés dans le but de commencer à répondre à la question (C) :

(C) Pour une espèce quasi-menacée (*Carcharhinus amblyrhynchos*) mais relativement commune dans les récifs coralliens, comment sont structurées les populations et quels sont les patrons de connectivité en paysage hétérogène ?

1.1. Échantillonnage génétique

La méthode d'échantillonnage génétique a été présentée dans le chapitre 1. Le plan d'échantillonnage a été réalisé conjointement avec le marquage acoustique des requins (Chesterfield, Entrecasteaux, Grand Lagon Nord et Lagon Sud-Nouméa), sauf pour plusieurs missions qui ont permis un échantillonnage dans d'autres zones éloignées (Astrolabe, Matthew et Walpole). Ne sera pas décrit ici l'échantillonnage génétique réalisé de *Carcharhinus albimarginatus*, car les échantillons n'ont pas encore été traités. La Figure 29 présente un rappel des échantillons prélevés et analysés.

La densité de l'échantillonnage a été augmentée dans les récifs de l'Astrolabe (Petit et Grand Astrolabe, $n = 51$ et $n = 46$ respectivement) dans le but de réaliser une étude de parenté/fratrie afin d'étudier la structure fine des populations dans ces petits récifs éloignés de l'homme mais proches l'un de l'autre.

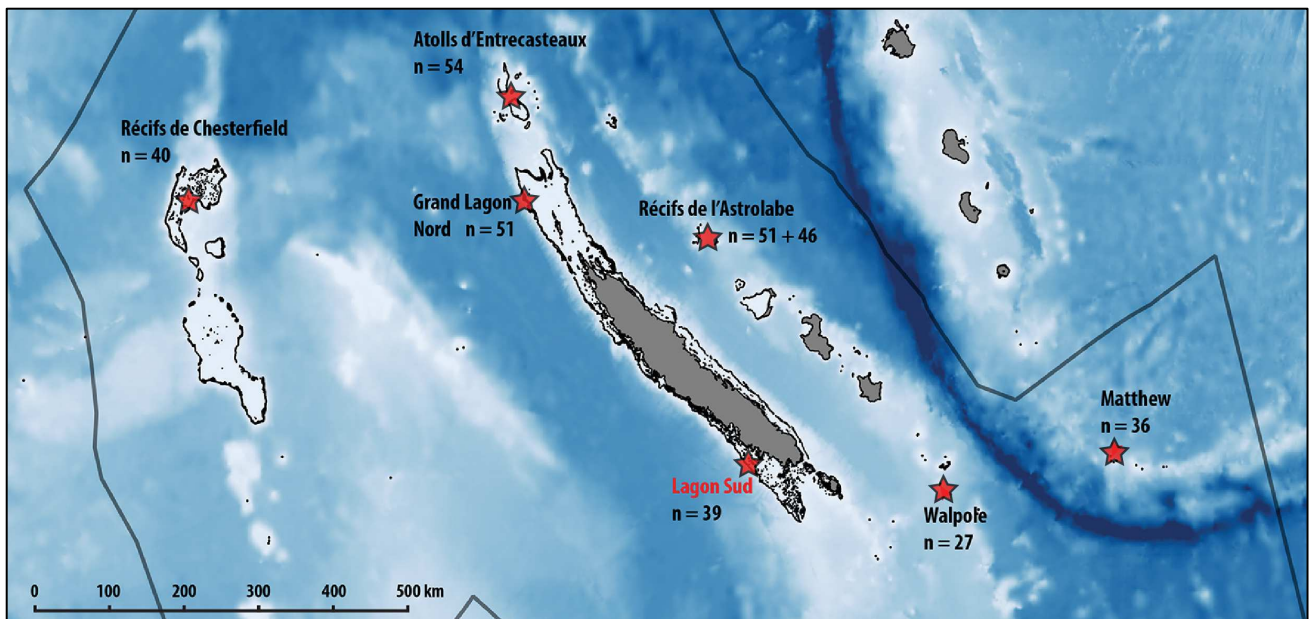


Figure 29. Bilan de l'échantillonnage montrant les sites de prélèvements. Les étoiles rouges sont placées pour indication, la position exacte des sites de prélèvement variant au sein des zones. Les chiffres indiquent le nombre de requins (*Carcharhinus amblyrhynchos*) capturés dans chaque zone et pour lesquels les études de génétique (SNPs) ont été réalisées.

1.2. Contexte et collaborations

Les récifs de Chesterfield sont situés à mi-chemin entre la Grande Terre et la Grande Barrière de Corail australienne (GBR). Dans ce contexte géographique, et en s'interrogeant sur les possibilités de déplacements de cette espèce à relativement grande échelle (Heupel et al., 2010b; White et al., 2017b), il était intéressant d'étendre l'échantillonnage à l'Australie ainsi qu'à d'autres zones géographiques. Une collaboration avec Will Robbins (Wildlife Marine) et Paolo Momigliano (Macquarie University) a permis d'agrandir l'échelle de cette étude, notamment grâce à l'incorporation de données de génétique déjà publiées sur cette espèce (Momigliano et al., 2017a).

Dans l'étude réalisée par Momigliano et al. en 2017, ce sont 171 échantillons qui ont été prélevés entre l'Océan Indien et l'Océan Pacifique (Figure 30), s'ajoutant alors aux 344 *C. amblyrhynchos* échantillonnés et analysés pour la génétique en Nouvelle-Calédonie lors de ma thèse. Parmi ces 171 échantillons, 22 ont été prélevés dans l'archipel des Chagos (Océan Indien), non présenté sur la carte.

Deux analyses ont alors été réalisées, l'analyse de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et l'analyse de l'ADN nucléaire (polymorphisme d'un seul nucléotide, SNP) par séquençage DArTseq (*Diversity Arrays Technology*).

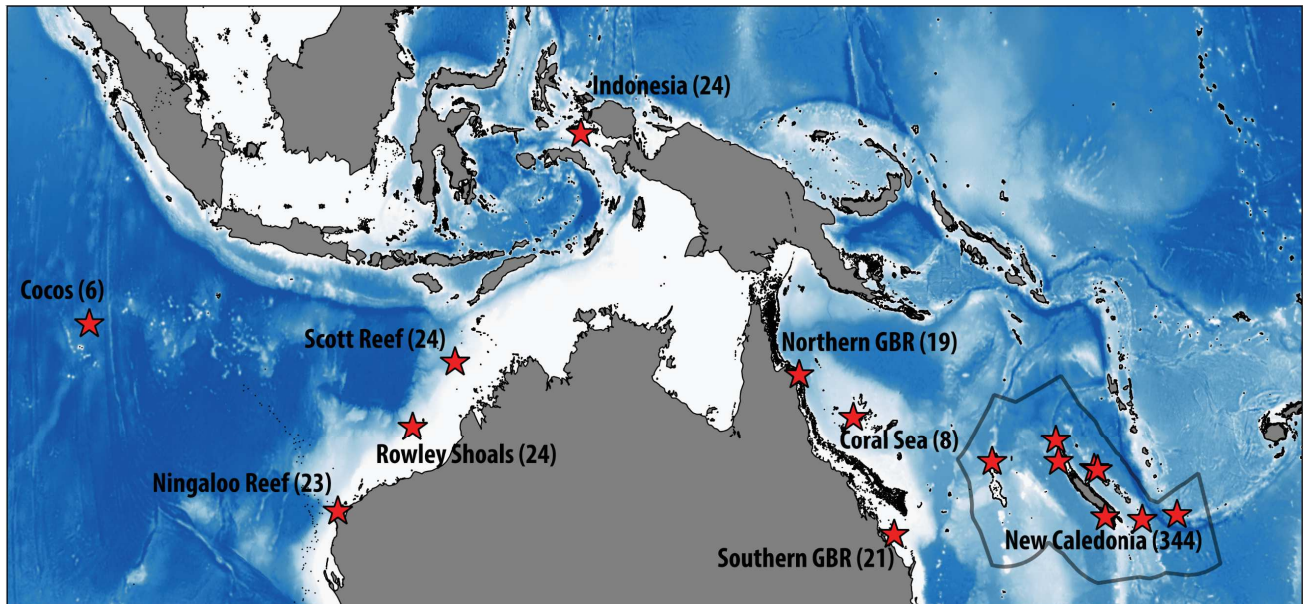


Figure 30. Bilan de l'échantillonnage montrant les sites de prélèvements de cette étude (dans la ZEE de la Nouvelle-Calédonie, encadrée en gris), et dans l'étude de Momigliano et al., 2017. Les chiffres entre parenthèse indiquent le nombre de requins (*Carcharhinus amblyrhynchos*) pour lesquels les études de génétique (SNPs) ont été réalisées.

2. EXTRACTION DE L'ADN

2.1. Méthode d'extraction

De la même manière que pour les échantillons de Momigliano et al., 2017 (GenCatch TM Blood & Tissue Genomic Mini Prep Kit, Epoch Biolabs), j'ai réalisé les extractions d'ADN de cette étude à partir de sous-échantillons du fragment de nageoire grâce à des colonnes d'extraction (DNEasy Blood and Tissue kit, QIAGEN). Une méthode moins onéreuse a été testée (Gentra) mais celle-ci permettait seulement une purification suboptimale de l'ADN (Figure 31). La méthode DArTseq demande une qualité d'ADN relativement bonne donc la méthode d'extraction la plus onéreuse par colonnes d'extraction a été finalement utilisée.

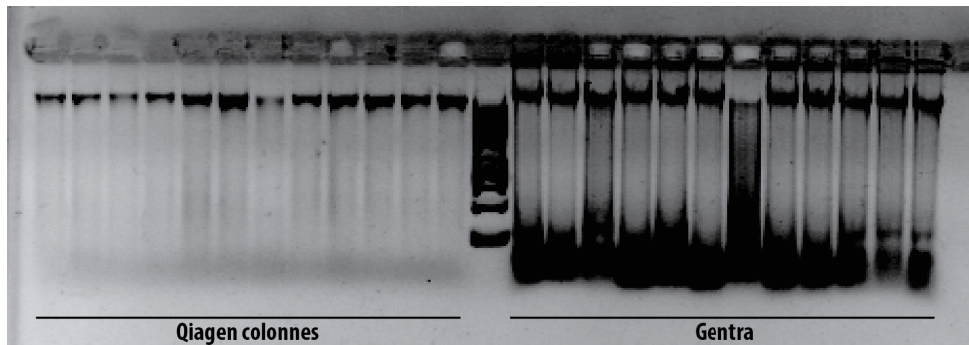


Figure 31. Gel d'électrophorèse montrant la différence entre l'ADN provenant des mêmes individus et extraits avec deux méthodes différentes. La méthode finalement utilisée a été la méthode QIAGEN avec colonnes d'extraction.

2.2. Contrôle qualité

L'ADN extrait doit être de relativement bonne qualité pour un séquençage grâce à une méthode requérant l'utilisation d'enzymes de restriction. La qualité des échantillons (dégradation) a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% avec GelRed dans du tampon 1X TBE, permettant de vérifier l'intégrité de l'ADN (pas de *smear* très marqué).

a. Contrôle des nucléases

Une fausse digestion a été réalisée, consistant à mettre la solution d'ADN extrait en présence de la solution tampon activant les enzymes de restriction, comme cela va être le cas lors du séquençage.

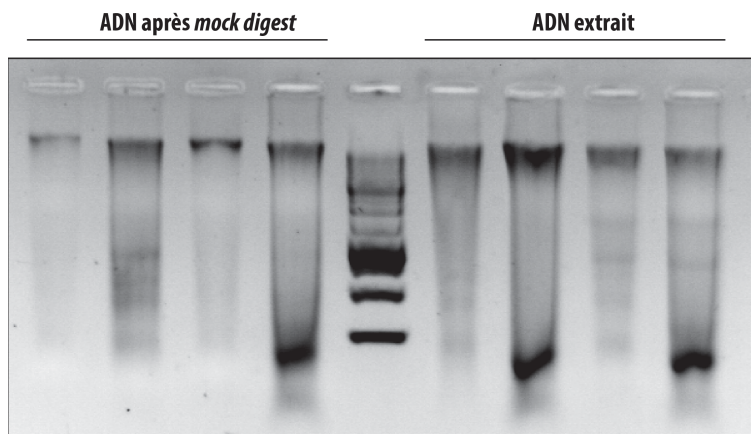


Figure 32. Aucune différence n'est visible avant et après la fausse digestion. Les quatre échantillons sont dans le même ordre de gauche à droite.

Cela permet de contrôler la contamination par des nucléases qui dégraderaient l'ADN au cours de cette fausse digestion. Plusieurs échantillons ont alors subi cette fausse digestion aléatoirement. Pour cela, 1 μ L d'ADN a été mis en présence de tampon pour enzyme de restriction et laissé à incuber pendant 2 heures à 37°C. Un exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% dans du tampon 1X TAE, avant et

après la fausse digestion, est présenté Figure 32 pour quatre individus, ne montrant aucune différence notable.

b. Quantité d'ADN

Une quantité de 2 μL est nécessaire pour l'analyse, mais l'envoi de 12 à 15 μL est recommandé par *Diversity Arrays Technology* à une concentration de 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Une concentration plus importante ($>100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) peut nuire à l'analyse, de même pour des concentrations d'échantillons trop différentes (3 à 4 fois). N'ayant pas de plateforme de séquençage en Nouvelle-Calédonie, l'envoi des échantillons à DArT en Australie prend beaucoup de temps, coûte cher, et nécessite l'obtention de permis d'importation. Afin de ne pas retarder l'analyse en envoyant des échantillons qui auraient pu être refusés car ne passant pas le contrôle qualité à cause de mauvaises concentrations, j'ai mesuré la quantité d'ADN de tous les échantillons par spectrophotométrie (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Les échantillons dont la concentration d'ADN était trop faible ont subi une seconde extraction, sauf ceux dont la concentration était trop faible mais tout de même relativement proche, qui ont alors subi une évaporation au speed-vacuum.

Le Nanodrop ne donne pas une mesure très précise de la quantité d'ADN double brin dans un échantillon. Les mêmes échantillons (20 individus) ont alors été analysés à la fois par spectrophotométrie (Nanodrop) et par fluorimétrie (Qubit), montrant une corrélation importante ($R^2 = 0,92$; Figure 33).

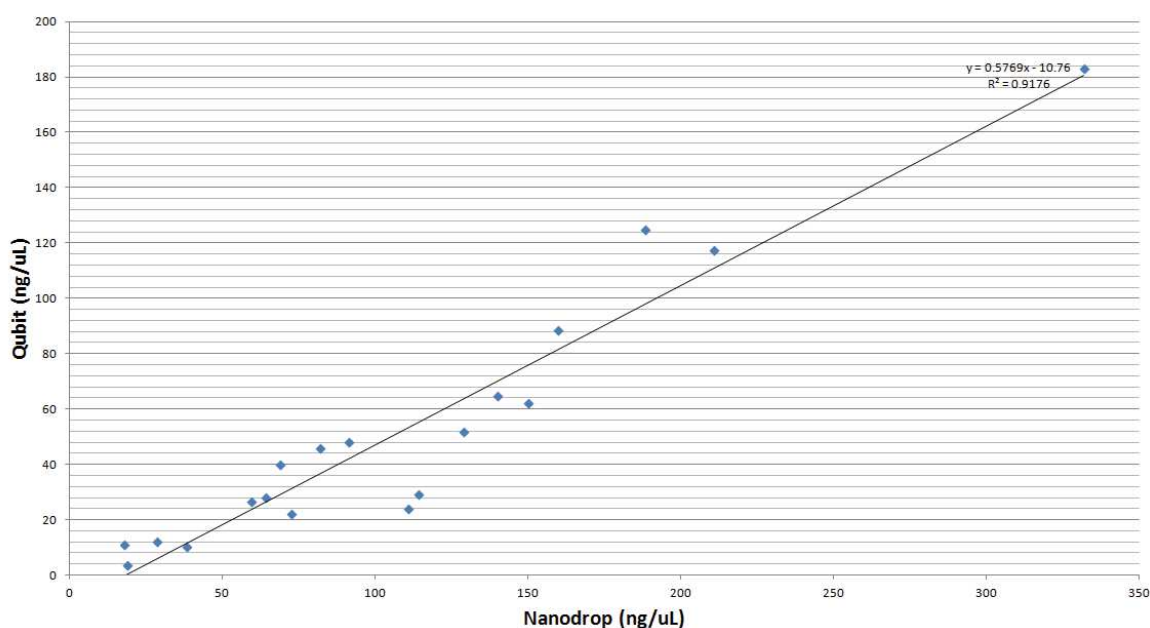


Figure 33. Relation linéaire entre la quantité d'ADN mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop) et par fluorimétrie (Qubit)

J'ai alors préparé les plaques pour envoi à DArT pour séquençage en prenant en compte cette relation linéaire obtenue pour inférer la concentration d'ADN, et en diluant chaque échantillon afin d'atteindre une valeur de concentration de 50 ng.µL⁻¹.

3. ANALYSE DE L'ADN MITOCHONDRIAL

3.1. Méthodologie

Après extraction de l'ADN comme précédemment décrit, le gène de la sous-unité ND4 de la NADH déshydrogénase a été amplifié (813 bp) par réaction en chaîne par polymérase (PCR) grâce aux marqueurs ND4 (Arevalo et al., 1994) et HI12293-Leu (Inoue et al., 2003). Les réactions ont été réalisées dans un volume total de 20 µL contenant 10 µL de 2X Master Mix (contenant la *Taq* polymérase), 6 µL d'eau ultra-pure (sans nucléase), 2 µL de tampon QSol, 0,5 µL de chaque amorce (ND4 et HI12293-Leu), ainsi que 1 µL de l'échantillon contenant l'ADN. L'ADN a été amplifié par un protocole de PCR *touchdown* permettant de s'assurer de la spécificité du produit au début, pour ensuite augmenter le rendement au fur et à mesure : trois minutes de dénaturation initiale à 94°C, suivi de 38 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation (62°C au départ, baisse de 0,5°C à chaque cycle jusqu'à 52°C), 1 minute d'élongation à 72°C. Enfin, une dernière extension de 10 minutes à 72°C a été réalisée.

L'ADN amplifié a été vérifié par électrophorèse. Ont été ré-amplifiés les ADN pour lesquelles les quantités étaient trop faibles. Les ADN amplifiés et vérifiés ont alors été envoyés depuis la Nouvelle-Calédonie pour séquençage par la société GenoScreen (séquençage Sanger, formule Oneshot).

Les électrophorégrammes obtenus ont été alignés, coupés et corrigés grâce à Geneious. Les individus ne présentant pas une qualité de séquençage suffisante ont été supprimés. Les séquences obtenues (n = 321) ont été analysées en même temps que les séquences obtenues par Paolo Momigliano et Will Robbins (n = 247, Momigliano et al., 2017).

Différents packages R (*poppr*, *pegas*, *strataG*) ont été utilisés pour calculer des indices de diversité (nombre d'haplotypes N_H et diversité haplotypique h) ainsi que des réseaux d'haplotypes et des indices d'expansion (Tajima's D (Tajima, 1989) et Fu's F_s (Fu, 1997)). Les valeurs deux-à-deux de Φ_{ST} ont été estimées grâce au logiciel Arlequin v.3.51 (Excoffier and Lischer, 2010).

3.2. Résultats

Dans l'archipel de la Nouvelle-Calédonie, 16 haplotypes distincts ont été identifiés (Figure 34A). Ce total monte à 34 haplotypes différents si on inclut les échantillons de l'ensemble de l'étude (Figure 34B). Le nombre d'haplotypes N_H et la diversité haplotypique h par site s'étendent respectivement de 2 à 10 et de 0,28 à 0,80 (Tableau 2). La diversité haplotypique est relativement faible aux îles Cocos, en Australie de l'Ouest (Ningaloo Reef et Rowley Shoals) ainsi qu'à l'île de Walpole, en comparaison avec les autres sites (Tableau 2). Aucun haplotype n'est partagé entre les requins des îles Chagos et ceux des autres sites (Figure 34B), ce qui n'est pas étonnant au regard de son isolement géographique (au milieu de l'Océan Indien, au sud de l'Inde). Au sein de l'archipel de Nouvelle-Calédonie, il n'est pas facile de décrire une structure du réseau d'haplotypes (Figure 34A), suggérant que les échanges au sein de l'archipel sont relativement fréquents. Il est intéressant de remarquer (Figure 34B) que le réseau comprenant l'échantillonnage total est globalement structuré en deux parties (ouest vs. est de l'Australie). Les requins de Nouvelle-Calédonie partagent de nombreux

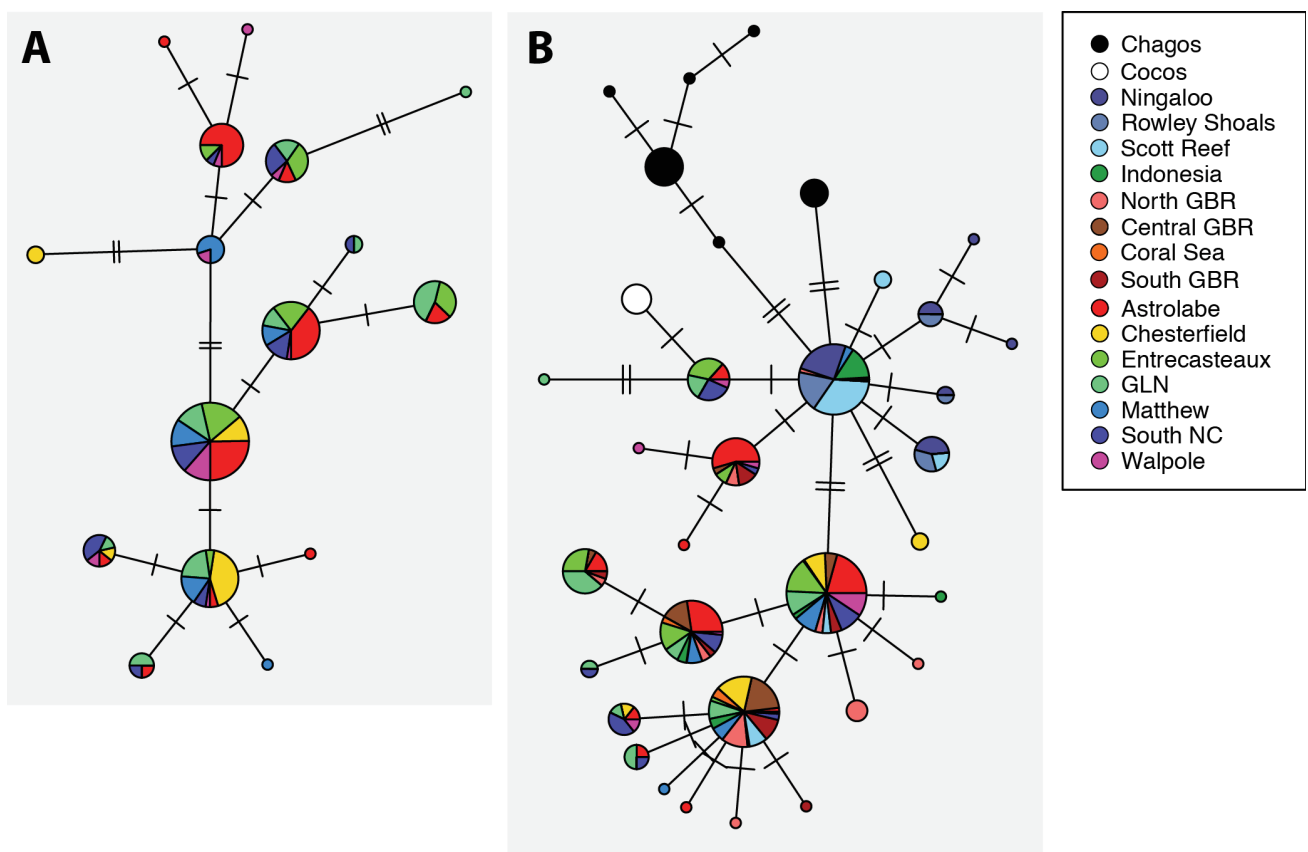


Figure 34. Réseaux d'haplotypes (minimum spanning networks) obtenus à partir des séquences de ND4 (813 bp) comprenant 16 haplotypes distincts pour la Nouvelle-Calédonie (A) et 34 haplotypes distincts pour l'ensemble de l'étude (B).

haplotypes avec ceux de la GBR, certains sont partagés avec l'Indonésie, tandis que très peu le sont avec l'Australie de l'Ouest.

Les valeurs de Tajima's D et Fu's F_s ne montrent pas de signe d'expansion ou de goulot d'étranglement démographique récents (Tableau 2).

Tableau 2. Résumé des différentes métriques calculées à partir de la séquence de ND4 de 813 bp. N = nombre d'échantillons. N_H = nombre d'haplotypes, h = diversité haplotypique. Les valeurs en gris correspondent aux échantillons récoltés par Paolo Momigliano et Will Robbins.

Site	N	N_H	h	Fu's F_s	Tajima's D	p-value
Matthew	36	5	0,67	-0,272	-0,308	0,40
Walpole	25	8	0,43	-6,553	-1,397	0,08
Astrolabe	82	10	0,69	-2,090	-0,561	0,31
Chesterfield	39	4	0,59	0,556	-0,861	0,21
Entrecasteaux	52	6	0,61	-0,017	-0,284	0,41
GLN	49	9	0,79	-2,627	-0,876	0,20
South NC	38	8	0,72	-1,672	-0,765	0,24
Chagos	25	7	0,75	0,258	0,233	0,63
Cocos	7	2	0,28	0,856	-1,237	0,12
Ningaloo	36	6	0,43	-3,199	-1,369	0,05
Rowley	27	5	0,45	-1,913	-1,719	0,03
Scott Reef	56	5	0,55	0,625	0,343	0,67
Misool	29	5	0,66	0,569	0,666	0,78
Northern GBR	32	9	0,80	-2,761	-0,775	0,23
Central GBR	42	5	0,66	-1,016	-0,606	0,29
Coral Sea	8	3	0,61	0,139	0,932	0,84
Southern GBR	27	6	0,73	-0,641	-0,559	0,31

L'ajout des sites d'échantillonnage de cette étude a permis de voir que la différenciation génétique inférée à partir de l'ADNmt (Φ_{ST}) était très importante entre les régions de l'Australie de l'Ouest en comparaison avec l'Australie de l'Est (GBR) et la Nouvelle-Calédonie (Tableau 3), avec des valeurs de Φ_{ST} entre 0,31 et 0,73. Le site de Misool en Indonésie montre également des valeurs de Φ_{ST} relativement importantes et significatives entre l'Ouest (sauf Scott Reef) et l'Est (0,16 à 0,32).

Tableau 3. Valeurs de différenciation génétique (Φ_{ST}) deux-à-deux obtenues entre les sites d'échantillonnage à partir des séquences d'ADNmt (ND4, 813 bp). Les valeurs en gras sont celles pour lesquelles la p-value est inférieure à 0,05.

	Chagos	Cocos	Ningaloo	Rowley	Scott	Indonesia	NorthGBR	SouthGBR	CentralGBR	Chesterfield	Entrecasteau	GLN	Astrolabe	SouthNC	Walpole
Chagos	-														
Cocos	0,61	-													
Ningaloo	0,59	0,72	-												
Rowley	0,55	0,69	-0,02	-											
Scott	0,55	0,57	0,16	0,11	-										
Indonesia	0,52	0,56	0,30	0,24	0,02	-									
NorthGBR	0,64	0,67	0,62	0,57	0,36	0,20	-								
SouthGBR	0,65	0,71	0,65	0,60	0,38	0,22	-0,03	-							
CentralGBR	0,52	0,48	0,47	0,42	0,31	0,17	0,00	0,00	-						
Chesterfield	0,72	0,79	0,73	0,69	0,46	0,32	0,01	0,00	0,01	-					
Entrecasteau	0,66	0,68	0,60	0,56	0,37	0,21	0,10	0,11	0,08	0,19	-				
GLN	0,64	0,65	0,59	0,55	0,37	0,21	0,03	0,03	0,02	0,09	0,02	-			
Astrolabe	0,64	0,64	0,53	0,49	0,31	0,16	0,09	0,08	0,09	0,17	0,00	0,04	-		
SouthNC	0,64	0,66	0,59	0,55	0,34	0,17	0,03	0,03	0,04	0,09	0,01	0,02	0,02	-	
Walpole	0,63	0,69	0,61	0,56	0,32	0,16	0,06	0,07	0,06	0,13	0,03	0,04	0,01	0,00	-
Matthew	0,69	0,75	0,67	0,63	0,38	0,21	0,02	0,02	0,03	0,07	0,03	0,01	0,03	-0,01	0,01

En revanche, ces valeurs de Φ_{ST} diminuent lorsque l'on compare les récifs de l'Australie de l'Est avec ceux de la Nouvelle-Calédonie ($\Phi_{ST} = 0,19$ au maximum). Il est intéressant de noter que les récifs éloignés de Chesterfield au sein de l'archipel de la Nouvelle-Calédonie présentent une différenciation génétique faible avec les sites de la GBR ($\Phi_{ST} = 0,01$ au maximum) tandis que cette différenciation est plus forte avec les autres récifs échantillonnés du reste de l'archipel (Φ_{ST} entre 0,07 et 0,19), suggérant ainsi de plus forts échanges entre la GBR et ces récifs, en comparaison avec des mouvements de dispersion entre Chesterfield et le reste de l'archipel.

4. MARQUEURS DE NOUVELLE GÉNÉRATION (SNP)

4.1. De la génétique à la génomique

Cela fait maintenant plusieurs dizaines d'années que des marqueurs génétiques sont utilisés pour des études de conservation des populations marines, y compris des Éla-smobranches (Dudgeon et al., 2012; Feutry et al., 2014). Depuis, le développement des méthodes de séquençage de nouvelle-génération (NGS) a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine de la biologie de la conservation (Balkenhol et al., 2017; Barbosa et al., 2018; Helyar et al., 2011). Bien que des méthodes plus classiques et plus économiques telles que l'utilisation de marqueurs de type microsatellites ou de marqueurs d'ADN mitochondrial trouvent toujours leur utilité pour répondre à certaines questions (Ahonen et al., 2009; Guichoux et al., 2011; Keeney and Heist, 2006; Keeney et al., 2005), la portée de celles-ci restent limitées en biologie de la conservation (Helyar et al., 2011; Momigliano et al., 2015b). Par exemple les microsatellites ne fournissent qu'un faible nombre de marqueurs au terme d'un processus de développement relativement long. Les méthodes de NGS permettent la découverte et le génotypage simultanés de milliers de marqueurs (polymorphisme d'un seul nucléotide, SNP) permettant d'acquérir des informations plus fines et plus informatives sur la structure des populations que les marqueurs microsatellites ou ADNmt (Funk et al., 2012). Ce grand nombre de marqueurs moléculaires permet donc des études de haute résolution, soulignant alors des processus à l'origine de restrictions potentielles des flux de gènes et d'une structuration au sein de populations qui étaient auparavant considérées panmictiques (DiBattista et al., 2017).

Au vu de ces différents points et de la faible résolution apportée par les marqueurs microsatellites, notamment pour une espèce telle que *Carcharhinus amblyrhynchos*, mobile et évoluant dans le milieu marin sans véritables barrières physiques (Momigliano et al., 2014, 2015b), nous avons donc opté pour une approche de type NGS, utilisant un séquençage de type DArTseq (*Diversity Arrays Technology*, Canberra).

4.2. DArTseq et appel des SNPs

a. *Diversity Arrays Technology*

Le choix de passer par la société *Diversity Arrays Technology* a été fait sur de multiples critères. En effet, le premier a été leur tarif compétitif suite à l'étude de 2017 de Paolo Momigliano et al. Le second critère y est relié car il était important d'utiliser les mêmes enzymes de restriction, et réaliser l'appel des SNPs en incluant les échantillons déjà séquencés de cette étude était un réel avantage. Enfin, la proximité de l'Australie avec la Nouvelle-Calédonie a permis un envoi rapide des échantillons.

b. Séquençage DArTseq

Les 344 échantillons ont alors été séquencés suivant la méthode DArTseq, combinant des marqueurs DArT (Jaccoud et al., 2001) et une approche de génotypage par séquençage (GBS) grâce à une plateforme Illumina (Sansaloni et al., 2011).

Environ 100 ng d'ADN de chaque échantillon (2 μL à la concentration de $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) sont digérés par des enzymes de restriction (*PstI* et *SphI*). Des adaptateurs compatibles avec ces enzymes sont liés à l'ADN de chaque échantillon, ceux liés à *PstI* incluant une séquence d'attache à la cellule de flux Illumina. Les échantillons sont ensuite nettoyés (spin-column Qiagen PCR clean up kit), et amplifiés par PCR selon les conditions suivantes : dénaturation initiale de 1 minute à 94°C , suivie de 30 cycles avec (i) dénaturation de 20 secondes à 94°C (ii) hybridation de 30 secondes à 58°C et (iii) élongation de 45 secondes à 72°C . Une dernière élongation de 7 minutes à 72°C est réalisée. Des quantités égales d'échantillons sont alors regroupées, diluées et dénaturées avec NaOH afin de réaliser l'hybridation à la cellule de flux. La librairie est alors séquencée sur une plateforme Illumina HiSeq2500 à 77 cycles (fragments de 77 bp).

c. Contrôle qualité et SNP calling

Les données de séquences brutes ont été converties en format .fastq grâce au logiciel Illumina HiSeq2500, et les individus ont été dé-multiplexés en fonction des barcodes attachés. Chaque lecture a été évaluée en utilisant les scores de qualité (Q-score) PHRED (Ewing and Green, 1998) et celles présentant un Q-score inférieur à 25 ont été supprimées. Chaque lecture est comparée avec des bases de données afin de vérifier des éventuelles contaminations (bactéries et virus dans GenBank et bases de données DArT).

Diversity Arrays Technology a alors procédé à l'identification et l'appel des SNPs (*SNP calling*) en utilisant une procédure DArTSoft14, similaire à STACKS (Catchen et al., 2013), la seule différence étant que les groupes de séquences (*sequence clusters*) sont appelés à partir de l'ensemble des échantillons regroupés avant d'être appelés pour chaque échantillon. L'appel des SNPs a été réalisé en incluant les échantillons de l'étude précédemment publiée par Momigliano et al. (2017). Les séquences monomorphiques n'ont pas été retenues, et les SNPs n'ont été appelés que si présents sous forme homozygote et hétérozygote. Les loci présentant une très forte couverture (et très faible, < 5) ont été retirés, et n'ont été gardés que les loci avec une reproductibilité technique supérieure à 95%.

4.3. Filtration des SNPs

J'ai ensuite réalisé une filtration additionnelle en fixant les règles suivantes :

- (i) La fréquence d'appel est supérieure à 95%, *i.e.* moins de 5% de données manquantes ;
- (ii) Moins de 10% de données manquantes par site d'étude (et aucune donnée manquante pour Coral Sea et Cocos dont le nombre d'individus échantillonnés est faible) ;
- (iii) Seul le premier locus de chaque fragment est conservé, pour éviter le lien entre les SNPs ;
- (iv) 100% de reproductibilité entre les répliques techniques (et non 95% dans la pipeline DArT) ;
- (v) Profondeur maximale égale à $d+4*\sqrt{d}$, d étant la profondeur moyenne, permettant ainsi de réduire le nombre de faux hétérozygotes dus aux erreurs de séquençage ou à la présence de paralogues (Li, 2014);
- (vi) Fréquence de l'allèle mineur (MAF) supérieure à 2%.

4.4. Tests de détection de SNPs déviants

Pour finir, des tests ont été effectués afin de filtrer les loci potentiellement sous sélection (par la suite appelés SNPs déviants). Les loci pour lesquels la différenciation génétique (F_{ST}) est plus forte qu'attendu par des loci subissant seulement des processus neutres ont été identifiés par l'intermédiaire de deux tests de détection de SNPs déviants : FLK et OUTFLANK. Ces tests étant plus performants lorsque la différenciation génétique est relativement faible (*i.e.* pas à la fois des sites trop éloignés et des sites trop proches ; Whitlock and Lotterhos, 2015), ils ont été réalisés en enlevant les échantillons provenant des zones éloignées et isolées (Matthew, Walpole, Chagos, Cocos).

La méthode FLK (extensions du test de Lewontin-Krakauer, Bonhomme et al., 2010) a été implémentée sous R et Python, et OUTFLANK sous R (Whitlock and Lotterhos, 2015). Les 8 loci aberrants communs aux deux méthodes ont par la suite été retirés des analyses de génétique des populations. Ces loci auraient pu être étudiés afin de chercher des gènes potentiellement sous sélection et/ou définir des unités adaptatives de gestion (*adaptive units*, AUs), mais l'absence de génome de référence ainsi que la nécessité de caractériser tout d'abord la structure des populations en se basant sur les loci neutres m'ont poussé à me concentrer sur les marqueurs neutres.

4.5. Premières analyses

Les résultats principaux sont présentés dans le chapitre suivant (chapitre 5), mais un détail des résultats de structure des populations est présenté ici.

a. Analyses discriminantes, DAPC

Premièrement, plusieurs analyses discriminantes (*Discriminant Analysis of Principal Components*, Jombart et al., 2010) ont été réalisées en utilisant les 4983 SNPs neutres sur le total des échantillons (Figure 35A), en enlevant les Chagos de l'analyse (Figure 35B), et en enlevant également l'Australie de l'Ouest et l'Indonésie afin de voir les structures plus fines des populations au sein de l'archipel de la Nouvelle-Calédonie (Figure 35C). L'île de Matthew a également été enlevée de l'analyse pour les résultats de DAPC présentés en Figure 35C. Dans chaque cas, le nombre de composantes principales (PCs) à retenir a été déterminé grâce à une validation croisée afin d'éviter un sur-ajustement. Un jeu de données d'apprentissage de 80% a été utilisé et j'ai retenu le nombre de PCs pour lequel l'erreur quadratique moyenne était la plus faible.

La première DAPC (Figure 35A) révèle clairement que les requins de Chagos montrent une forte différenciation génétique par rapport aux autres sites. La DAPC de la Figure 35B suggère un modèle de dispersion de type « îles hiérarchiques » (Jombart et al., 2010). Cette île est loin et isolée par de grandes distances à travers des eaux océaniques profondes. Les requins de Cocos montrent également une forte différenciation génétique, tout comme l'île de Matthew (Figure 35B). De manière intéressante, cette dernière est située à la même distance de Walpole que les requins du lagon sud de

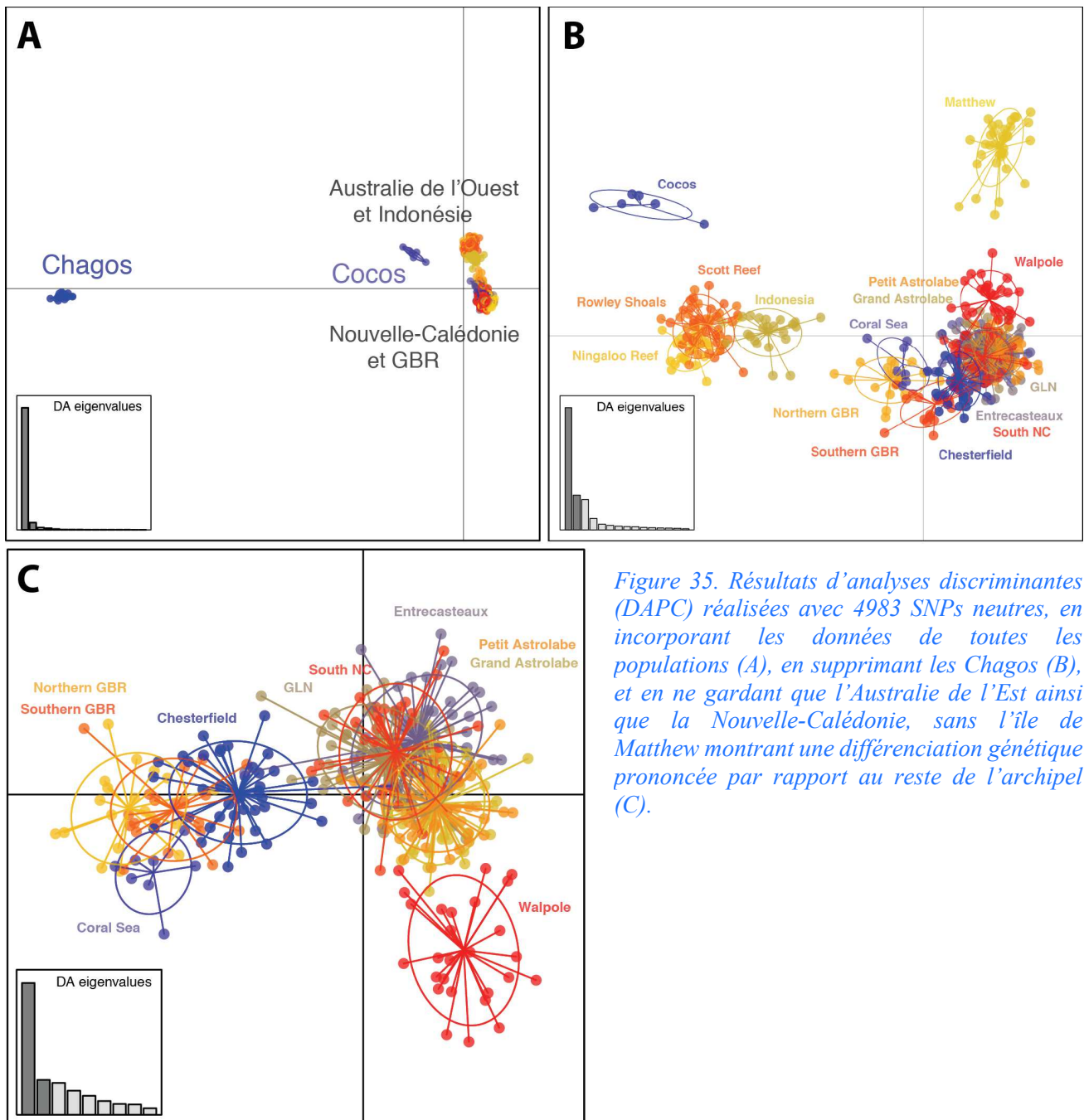


Figure 35. Résultats d'analyses discriminantes (DAPC) réalisées avec 4983 SNPs neutres, en incorporant les données de toutes les populations (A), en supprimant les Chagos (B), et en ne gardant que l'Australie de l'Est ainsi que la Nouvelle-Calédonie, sans l'île de Matthew montrant une différenciation génétique prononcée par rapport au reste de l'archipel (C).

Nouvelle-Calédonie. Les requins de la Grande Terre (South NC, GLN, Astrolabe et Entrecasteaux) montrent une faible différenciation génétique qui laisse à penser que les échanges au sein de ces sites sont relativement courants à l'échelle évolutive. Enfin, le groupe formé par les requins des récifs de Chesterfield est relativement proche des requins de la GBR en comparaison avec ceux du reste de la Nouvelle-Calédonie, suggérant des échanges entre cette zone éloignée et l'Australie.

b. fastSTRUCTURE

La structure génétique des populations de notre étude pour les loci neutres a ensuite été explorée en utilisant le programme fastSTRUCTURE (Raj et al., 2014). Ce dernier consiste en un algorithme relativement rapide et efficace pour l'inférence approximative du modèle sous-jacent au programme STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), en utilisant une procédure Bayésienne. fastSTRUCTURE a été utilisé sur l'ensemble des échantillons, avec les priors simple et logistique, et pour un nombre de populations ancestrales (K) variant entre 1 et 10 (Figure 36). La valeur de K a été choisie selon la méthode préconisée par Raj et al., 2014, en prenant la valeur pour laquelle le log-marginal likelihood lower bound (LLBO) est maximisé ($K*\epsilon$), et à partir de laquelle les erreurs de prédiction restent autour (plus ou moins l'erreur standard).

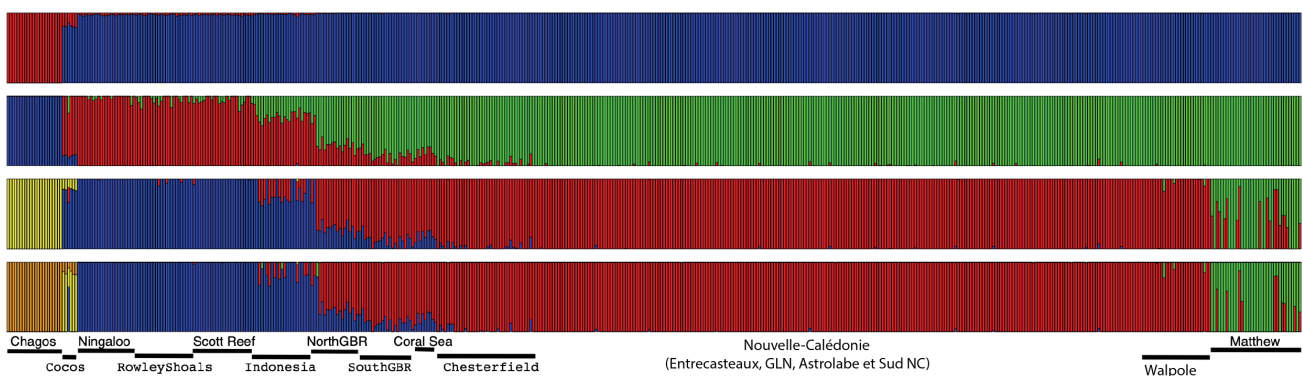


Figure 36. Différences entre les proportions d'ancestralités inférées par le programme fastSTRUCTURE en fonction du nombre de populations ($K=2,3,4$ ou 5).

Le modèle retenu ($K = 4$, prior simple) est présenté Figure 37 et montre de manière intéressante un mélange entre les populations ancestrales des requins de l’Australie de l’Ouest (bleu) et celles du Pacifique Ouest (rouge), montrant potentiellement la signature d’une colonisation de la GBR en plusieurs étapes. L’Indonésie présente un taux de mélange important, représentant possiblement un lieu d’échange entre les populations ancestrales d’Australie de l’Ouest et celles du Pacifique Ouest, notamment lors de l’ouverture du détroit de Torrès il y a 8000 ans suite au réchauffement de la planète faisant augmenter le niveau des mers de -120 mètres il y a 20 000 ans jusqu’à sa hauteur d’aujourd’hui.

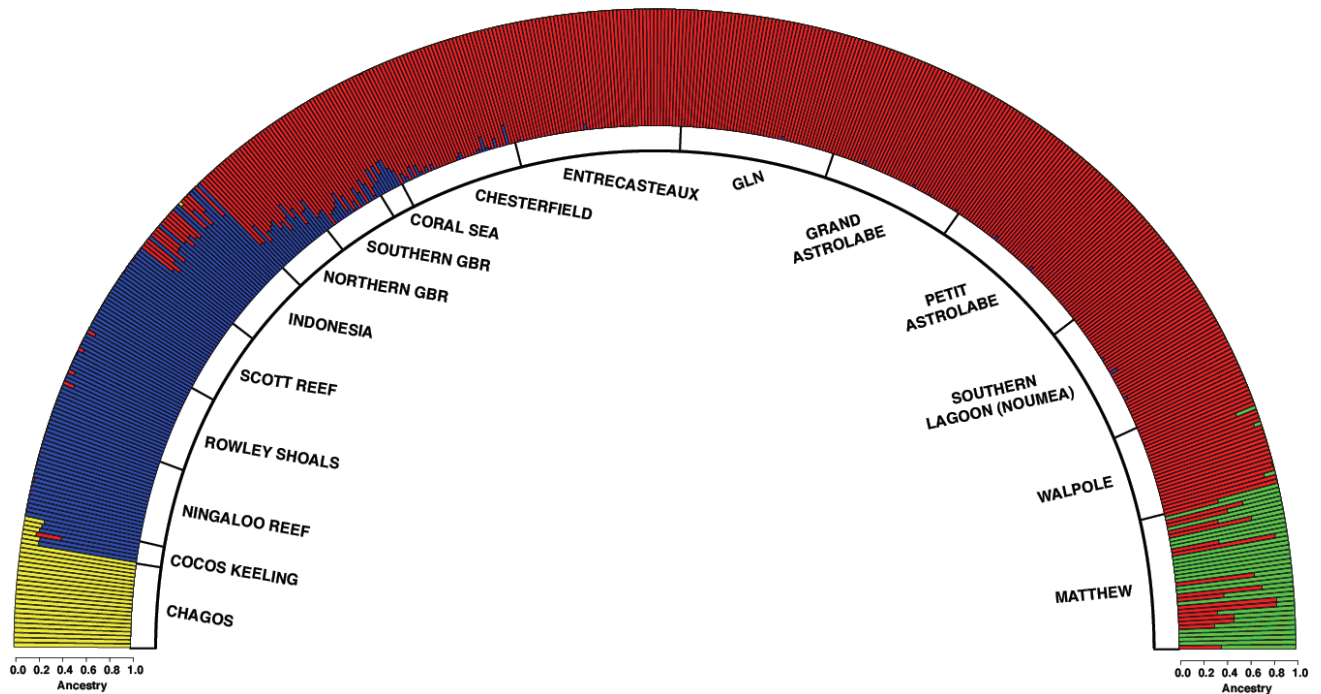


Figure 37. Proportions d’ancestralité inférées par le programme fastSTRUCTURE avec le simple prior et le nombre optimal de populations, $K=4$.

c. Différenciation génétique deux-à-deux, Weir et Cockerham pairwise F_{ST}

L'indice de fixation, F_{ST} , mesurant la différenciation génétique entre deux populations, a été estimé pour chaque paire de sites d'échantillonnage de notre étude et est présenté dans le Tableau 4 ci-dessous (Weir and Cockerham, 1984).

Tableau 4. Indices de fixation, F_{ST} (Weir et Cockerham) calculés pour chaque paire de sites échantillonnés (16 sites). Sa valeur pour les Chagos est très forte et n'est pas présentée ici.

	Cocos	Ningaloo Reef	Rowley Shoals	Scott Reef	Indonesia	Northern GBR	Southern GBR	Coral Sea	Chesterfield Reefs	Entrecasteaux	Great Northern Lagoon (GLN)	Grand Astrolabe	Petit Astrolabe	South NC	Walpole
Ningaloo Reef	0.067														
Rowley Shoals	0.068	0.0021													
Scott Reef	0.064	0.0025	0.0016												
Indonesia	0.068	0.0055	0.0054	0.0039											
Northern GBR	0.073	0.0143	0.0141	0.0125	0.0080										
Southern GBR	0.079	0.0200	0.0183	0.0175	0.0126	0.0048									
Coral Sea	0.077	0.0169	0.0159	0.0144	0.0097	0.0031	0.0032								
Chesterfield Reefs	0.081	0.0193	0.0189	0.0175	0.0128	0.0064	0.0039	0.0035							
Entrecasteaux	0.081	0.0215	0.0204	0.0196	0.0135	0.0082	0.0078	0.0085	0.0048						
GLN	0.080	0.0205	0.0202	0.0189	0.0131	0.0070	0.0074	0.0080	0.0043	0.0010					
Grand Astrolabe	0.081	0.0215	0.0210	0.0197	0.0138	0.0088	0.0090	0.0090	0.0066	0.0026	0.0020				
Petit Astrolabe	0.082	0.0216	0.0212	0.0199	0.0144	0.0088	0.0080	0.0081	0.0057	0.0015	0.0015	0.0010			
South NC	0.080	0.0200	0.0203	0.0189	0.0138	0.0080	0.0077	0.0077	0.0051	0.0019	0.0012	0.0025	0.0018		
Walpole	0.082	0.0229	0.0214	0.0207	0.0152	0.0115	0.0118	0.0098	0.0084	0.0051	0.0046	0.0049	0.0039	0.0052	
Matthew	0.097	0.0355	0.0341	0.0317	0.0265	0.0223	0.0233	0.0213	0.0195	0.0158	0.0153	0.0155	0.0145	0.0160	0.0128

Les valeurs de F_{ST} associées aux récifs de Chesterfield, contrairement aux valeurs de différenciation inférées par l'ADN mitochondrial (Φ_{ST}), montrent que l'écart entre la proximité de Chesterfield à la GBR d'un côté et la Nouvelle-Calédonie de l'autre côté diminue (F_{ST} de 0,0035 à 0,0064 – GBR et de 0,0043 à 0,0066 – NC, sans Walpole et Matthew, contre Φ_{ST} au maximum à 0,01 – GBR et entre 0,07 et 0,19 – NC). La séparation des groupes obtenue par analyse discriminante (DAPC, Figure 35C) va dans le sens des valeurs de Φ_{ST} observées plus tôt, le groupe de requins de Chesterfield se séparant des groupes formés par les requins de Nouvelle-Calédonie et étant plus proche que ceux de la GBR.

Les valeurs de F_{ST} calculées entre tous les sites ont alors été comparées aux valeurs de distance géographique entre les sites d'échantillonnage calculée à partir du package *marmap* sous R, qui mesure le chemin le plus court entre deux points en mer, en évitant les terres émergées (Pante and Simon-Bouhet, 2013). La relation linéaire obtenue entre distance génétique (différenciation génétique linéarisée, $F_{ST}/(1-F_{ST})$) comme recommandé par McRae et Beier, 2007 et Rousset, 1997) et cette distance géographique montre un schéma clair d'isolement par la distance (Figure 38), ainsi que l'avaient remarqué Momigliano et al. (2017). L'ajout des échantillons de Nouvelle-Calédonie permet de confirmer cette observation, mais de nombreuses valeurs aberrantes sont présentes dans cette relation. Lorsqu'identifiées, les valeurs aberrantes au-dessus de la courbe de tendance correspondent à des comparaisons deux-à-deux avec des sites isolés par des eaux profondes (e.g. îles de Cocos et Matthew). De plus, les valeurs aberrantes en-dessous de cette courbe correspondent à des comparaisons entre deux sites séparés par des eaux présentant des récifs continus (e.g. GBR et nord et sud de la Grande Terre en Nouvelle-Calédonie).

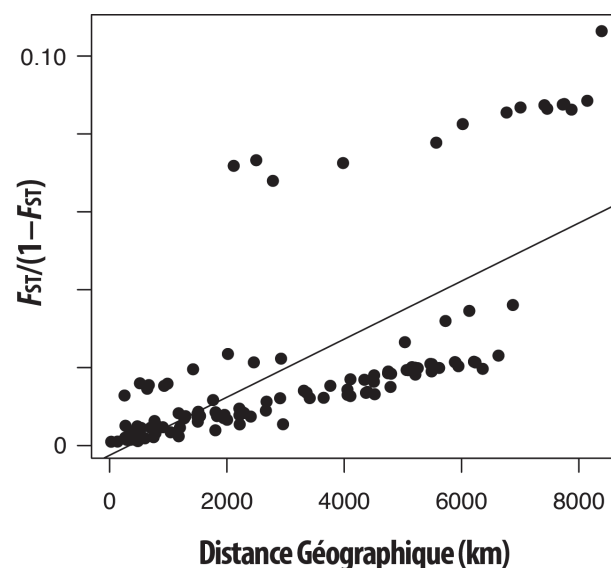


Figure 38. Relation linéaire entre la distance génétique (différenciation génétique linéarisée) et la distance géographique linéaire calculée avec *marmap*.

5. CONCLUSION

J'ai ainsi apporté quelques éléments méthodologiques dans ce chapitre, notamment concernant les protocoles de traitement génétique des échantillons récoltés au cours des différentes missions océanographiques. J'ai également présenté l'ensemble des analyses préliminaires ayant conduit par la suite aux analyses plus poussées qui seront présentées dans les chapitres suivants.

Ces résultats préliminaires montrent que les requins gris de récif (*Carcharhinus amblyrhynchos*) présentent une structure génétique des populations relativement complexe, bien que la plupart de cette différenciation soit expliquée par la distance géographique et une structure des sites en îles hiérarchisées. Les patrons de différenciation génétique observés grâce aux marqueurs neutres sont relativement faibles en comparaison avec des espèces terrestres par exemple. Cela ne veut pas pour autant dire qu'ils ne sont pas informatifs. Des patrons cryptiques de différenciation génétique en milieu marin peuvent être d'importance majeure pour la définition de stratégies de conservation efficaces. En effet, il a été montré par ailleurs que même de faibles niveaux de structure génétique révélés par des marqueurs neutres peuvent refléter une indépendance démographique au sein des populations marines (Ovenden, 2013).

Les observations faites grâce à l'ADN mitochondrial avec un seul marqueur (ND4) ont permis de caractériser la forte différenciation génétique de cette espèce à grande échelle, plus importante que celle observée en utilisant des marqueurs neutres (SNPs filtrés). Ceci pourrait être expliqué par une dispersion biaisée en fonction du sexe, mais il faudrait aller plus loin dans les analyses pour conclure. En revanche, la littérature montre que cette hypothèse de dispersion biaisée par le sexe est largement soutenue, avec notamment les mâles qui disperseraient en effectuant des migrations de reproduction loin de leurs lieux de vie, et les femelles présentant un comportement de philopatrie (*e.g.* Chapman et al., 2015 ; Pardini et al., 2001; Portnoy et al., 2015). De plus, les résultats de marquage acoustique du Projet APEX pourraient apporter des éléments de réponse à cette question qui reste en suspens, car il n'existe à ce jour aucune preuve directe de dispersion autre que les marqueurs génétiques.

Par ailleurs, l'utilisation de milliers de marqueurs a permis d'établir la structure génétique des populations de requins gris de récif à fine résolution et à grande échelle, avec un échantillonnage qui est probablement le plus complet existant à ce jour. Cette résolution obtenue grâce à l'utilisation de méthodes récentes de génomique a permis de confirmer que les populations de *Carcharhinus amblyrhynchos* présentent une hétérogénéité potentiellement due à des flux de gènes via migration,

dépendant de variables que l'on n'a pas pris en compte dans un modèle simple d'isolement par la distance. En effet, contrairement à de nombreuses espèces de poissons osseux (Cowen and Sponaugle, 2009), les requins n'ont pas de phase de dispersion larvaire en milieu pélagique (Momigliano et al., 2015a) et leur dispersion dépend alors non pas de la durée de phase larvaire et des courants marins, mais plutôt de mécanismes comportementaux potentiellement associés au paysage sous-marin séparant les populations entre elles.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que pour un ensemble d'îles telle que la Nouvelle-Calédonie, la structuration observée montre que de nombreux échanges semblent avoir lieu au sein des récifs proches séparés par des eaux relativement peu profondes, ce qui devrait faire de la population de la Grande Terre et de ses environs (Astrolabe, Entrecasteaux, Grand Lagon Nord et Lagon Sud) une population relativement résiliente aux pressions humaines si certaines zones éloignées sont mises en protection rigoureuse. Il est alors important d'explorer plus précisément cette structure génétique afin de mieux caractériser les paramètres permettant de prédire les échanges entre les différentes populations. Bien que les résultats de ce chapitre puissent être utilisés par les gestionnaires afin de proposer des mesures de conservation appropriées pour cette espèce menacée dans certains récifs coralliens, il est clair que de nombreuses questions demeurent quant à l'exploration des éventuels paramètres régissant la dispersion des gènes au sein et entre les populations identifiées.

GÉNOMIQUE DU PAYSAGE : DÉLIMITATION HIÉRARCHIQUE D'UNITÉS DE CONSERVATION

1. INTRODUCTION

1.1. Objectifs du chapitre

Ce chapitre se penche sur les questions suivantes, énoncées dans l'introduction générale de ce manuscrit :

(C) Pour une espèce quasi-menacée (*Carcharhinus amblyrhynchos*) mais relativement commune dans les récifs coralliens, comment sont structurées les populations et quels sont les patrons de connectivité en paysage hétérogène ?

(D) Dans quelle mesure la structure des populations de *C. amblyrhynchos* peut-elle être expliquée par des facteurs biogéographiques ? Peut-on délimiter des Unités de Conservation (CUs) à l'échelle locale et globale ?

Le chapitre précédent (chapitre 4) a permis de développer le contexte scientifique et méthodologique permettant de répondre à la question (C), et a permis d'y apporter quelques éléments de réponse. En particulier, la structure et connectivité entre les populations de *C. amblyrhynchos* a pu être explorée, mais beaucoup d'interrogations demeurent, notamment lorsqu'il s'agit de comprendre quels sont les paramètres biogéographiques, ainsi que les hypothèses associées, qui pourraient expliquer cette structure.

Dans ce chapitre, les analyses sont poussées plus en avant avec l'objectif de développer un modèle permettant d'expliquer et de prédire la différenciation génétique des populations de *Carcharhinus amblyrhynchos* et ainsi contribuer à améliorer les plans de gestion de l'espèce. Cet objectif se décline en deux étapes. Dans un premier temps, il s'agit d'explorer les paramètres

biogéographiques qui pourraient être à l'origine de la structure des populations de cette espèce. La seconde est d'identifier des unités de conservation (CUs) afin de proposer une meilleure gestion des populations de ce requin, qui malgré sa relative abondance, subit un déclin à grande échelle. Pour y parvenir, j'ai donc développé une méthode qui sera décrite en détail avant de présenter le premier article scientifique résultant de ces travaux (article 3 de ce manuscrit).

Ce chapitre se veut didactique, permettant ainsi de justifier tous les choix qui ont été faits au cours de l'analyse des données, et donnant au lecteur la possibilité d'aborder l'article 3 avec le maximum d'éléments de compréhension quant aux choix effectués et aux méthodes utilisées.

1.2. Relier les données génétiques aux données de paysage

Historiquement, la question de la connectivité écologique a été d'intérêt majeur pour les biologistes de la conservation (Dickson et al., 2018; Harris, 1984), notamment pour le maintien des processus écologiques à grande échelle tels que la dispersion et les flux de gènes (McRae and Beier, 2007). Dans les premières années de la biologie de la conservation, les écologues ont commencé à étendre les principes de la théorie de la biogéographie insulaire (MacArthur and Wilson, 1967) à la caractérisation de la connectivité des populations en se basant sur la proximité aux sources (MacArthur and Wilson, 2001), par l'intermédiaire de cartes binaires (présence d'habitat ou non) (With et al., 1997).

Complétant alors les modèles d'isolement par la distance (*isolation-by-distance*, IBD) (Wright, 1943), est alors apparu dans les années 1990 le concept de chemin de moindre coût (*least-cost-path*, LCP), qui a poussé en avant le domaine de la biologie de la conservation en permettant de nombreuses applications auparavant impossibles (Knaapen et al., 1992). Ce concept de LCP est ainsi basé sur l'hypothèse d'un paysage hétérogène, représenté par une surface de coût, autrement appelée surface de résistance. Les cartes de résistance sont devenues une composante essentielle des analyses de génétique du paysage, et sont définies comme des couches spatiales représentant le degré de contrainte des unités du paysage (*e.g.* pixels) sur les mouvements ou les flux de gènes (Spear et al., 2016). Le chemin de moindre coût peut ainsi être calculé comme la route la moins coûteuse empruntée pour relier deux sites, en prenant en compte l'ensemble des unités traversées (*e.g.* pixels de la carte de résistance) et leur coût associé (Etherington and Penelope Holland, 2013).

Bien que fondateur et applicable à certaines situations particulières, le LCP a des limitations qui en font un outil non adapté à certains cas ou organismes (Sawyer et al., 2011). En effet, cette méthode est basée sur l'hypothèse que les animaux connaissent de manière précise le paysage environnant et sélectionnent la route de dispersion optimale, présentant la plus faible résistance entre leur point de départ et un point d'arrivée (Etherington and Penelope Holland, 2013; McRae and Beier, 2007). Il s'agit d'une hypothèse forte et bien que la possibilité d'une dispersion directionnelle avec connaissance de la destination ne soit pas à écarter pour certains organismes (Horton et al., 2017), celle-ci n'est pas vérifiée dans beaucoup de cas au sein des populations naturelles (Block et al., 2011), probablement sujettes à des comportements d'exploration de type *random walk* (Ferreira et al., 2015; Papastamatiou et al., 2013; Sims et al., 2008).

Ainsi, avec l'émergence de nouvelles études focalisées sur le lien entre le paysage et la génétique des populations ou la connectivité en général (Manel et al., 2003), est né le besoin de développer des outils permettant d'incorporer de manière plus précise l'hétérogénéité du paysage dans les études de génétique des populations (McRae, 2006). Une des méthodes alors proposées permettant d'investiguer les questions évoquées plus tôt et de palier aux limitations de modèles de type LCP est l'isolement par résistance (*isolation-by-resistance*, IBR), utilisant par exemple la théorie des circuits (McRae, 2006; McRae et al., 2008). Cette méthode révolutionne alors le champ de la biologie de la conservation, surtout en milieu terrestre, car elle permet alors de prendre en compte l'ensemble du paysage environnant comme variable explicative de la différenciation génétique ou comme outil de restauration de la connectivité écologique (Dickson et al., 2018; McRae and Beier, 2007).

2. LA THÉORIE DES CIRCUITS POUR MODÉLISER LA CONNECTIVITÉ

2.1. Contexte dans le domaine de la conservation en milieu marin

Comprendre la connectivité des populations marines est crucial pour la conservation de ces espèces (Hedgecock et al., 2003). Les flux de gènes et les migrations jouent un rôle clé dans le maintien de populations en bonne santé (Slatkin, 1987). Les récentes avancées des outils moléculaires d'une part (NGS) et de pouvoir de calcul d'autre part (Schadt et al., 2010) ont récemment permis de transformer l'approche de certaines questions posées depuis longtemps par les scientifiques dans le domaine de la conservation (Allendorf et al., 2010; Funk et al., 2012).

Comme évoqué dans l'introduction de ce chapitre, l'importance de la théorie des circuits appliquée dans le champ de la conservation n'est plus à démontrer pour la connectivité terrestre : étude de la fragmentation de l'habitat et restauration de la connectivité du paysage afin de rétablir la connectivité fonctionnelle et génétique sont quelques exemples de l'utilité de cette méthode (Dickson et al., 2018). Bien que très peu utilisée dans le milieu marin, la théorie des circuits peut être pertinente dans certains cas mais non applicable dans d'autres. Par exemple, les variables directionnelles telles que les courants marins ne sont pas implémentables dans ce type d'analyse. Cette approche n'est donc pertinente que pour des organismes dispersant à l'état juvénile ou adulte (Momigliano et al., 2015a), et/ou ne suivant pas des routes de migration via les courants marins (Rodríguez-Zárate et al., 2018). Pour des organismes tels que les requins de récifs n'ayant pas de phase de dispersion larvaire et ayant principalement des mouvements exploratoires de type *random walk* (Papastamatiou et al., 2013; White et al., 2017b), cette méthode apparaît adaptée.

Les trois points suivants (2.2, 2.3 et 2.4) sont présentés en détail dans l'Annexe 2, afin de ne pas surcharger la lecture de ce manuscrit.

2.2. Principe général et application – cf. Annexe 2

Ce point décrit la théorie des circuits, son principe d'application et justifie les choix réalisés, notamment en comparaison avec l'utilisation du chemin de moindre coût.

En résumé, les approches basées sur la CT constituent une extension de la théorie des graphes et considèrent le paysage comme une surface conductrice, en utilisant par analogie des flux d'électrons au travers de circuits électriques pour représenter les mouvements d'individus ou de gènes au sein de ce paysage (McRae et al., 2008). Aux zones de plus forte résistance aux mouvements et/ou aux flux de gènes, sont assignées des fortes résistances dans le circuit électrique équivalent. Cette analogie permet de faciliter la prédiction de multiples chemins entre les zones étudiées et de relier directement les relations entre le paysage et la structure et connectivité des populations étudiées (McRae, 2006; McRae and Beier, 2007). La CT permet alors de calculer des distances de résistance entre deux points à partir de cartes de résistance (également appelées cartes de friction), prenant en compte l'ensemble du paysage environnant. Elle permet également de dresser des cartes de densité de courant électrique.

2.3. Création des cartes de résistance – cf. Annexe 2

Ce point décrit en détail la procédure de création des cartes de résistance et justifie les choix réalisés au cours de cette thèse concernant les différents paramètres de ces cartes.

2.4. Lancement des calculs de CT via GFLOW – cf. Annexe 2

Enfin, ce dernier point détaille le choix de l'utilisation du logiciel libre GFLOW (Leonard et al., 2017) ainsi que le principe de lancement des calculs de CT.

3. OPTIMISATION DES MODÈLES ÉTAPE-PAR-ÉTAPE

3.1. D'un modèle simple à un modèle réaliste

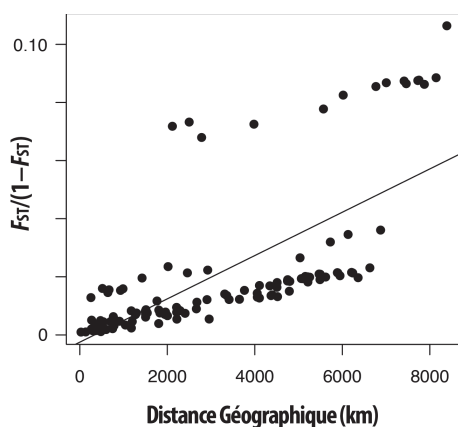


Figure 39. Relation linéaire entre la distance génétique et la distance géographique linéaire.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 4 et dans les travaux précédemment publiés sur *Carcharhinus amblyrhynchos* (Momigliano et al., 2017a), la distance géographique entre les sites n'explique pas entièrement la distance génétique entre les populations associées, notamment lorsque ces sites sont séparés par des eaux profondes (Figure 39, distance géographique linéaire calculée grâce au package R *marmap* (Pante and Simon-Bouhet, 2013)). De plus, une étude de génétique des populations dans des sites relativement éloignés mais le long d'un récif continu (e.g. GBR) montre que de nombreux échanges se font

(Momigliano et al., 2015b). Ces premiers résultats donnent quelques bases afin de créer des cartes de résistance utilisées en variables d'entrée de GFLOW. De plus, les requins dispersent à l'âge adulte (pour certains éventuellement au stade juvénile). Leur dispersion est donc beaucoup moins dépendante des courants marins qu'elle ne peut l'être pour de nombreuses espèces de poissons osseux à phase de dispersion larvaire (Cowen and Sponaugle, 2009). L'implémentation de variables directionnelles comme les courants marins n'est pas possible en CT.

L'étude présentée dans ce manuscrit s'est donc focalisée sur deux paramètres qui pourraient influencer la dispersion de *C. amblyrhynchos* : la bathymétrie et la distance à l'habitat. Sont alors considérés comme habitats les récifs coralliens peu profonds (data.unep-wcmc.org, (Spalding et al., 2001)) ainsi que les îles océaniques volcaniques dont le sommet est à plus de 280 mètres de profondeur, comme l'île de Matthew par exemple. La profondeur de 280 mètres correspond à la fourchette basse de profondeur de vie de *C. amblyrhynchos* (Last and Stevens, 2009). De plus, les cartes de résistance ont été établies avec ou sans les monts sous-marins au-dessus de 280 m (Yesson et al., 2011).

3.2. Procédure d'optimisation

Comme évoqué plus tôt dans ce chapitre, certaines études se basent sur l'utilisation de procédures d'optimisation. *ResistanceGA* est un exemple (Peterman, 2014) permettant de tester de nombreuses combinaisons de formes de relation et de valeurs pour des paramètres environnementaux et/ou biogéographiques afin de trouver le modèle le plus optimal. Cependant, *ResistanceGA* a été développé sur Windows (mais ce package est depuis peu de temps disponible sur Mac et Linux ; github.com/wpeterman/ResistanceGA) et utilise Circuitscape nécessitant donc des temps de calcul importants (Peterman, 2014). De plus, ce package R ne permet pas à ma connaissance d'optimiser des surfaces issues de plusieurs variables fortement corrélées. En effet, optimiser chaque surface indépendamment puis les cumuler en une seule donnerait des résultats très biaisés lorsque les variables dépendent l'une de l'autre. Or, la bathymétrie et la distance à l'habitat montrent une corrélation forte dans certaines zones. Il a donc fallu développer une approche légèrement différente.

L'approche développée dans ce manuscrit est relativement semblable à celle utilisée au travers de *ResistanceGA* et présente comme ce dernier l'avantage de ne se baser sur aucune hypothèse *a priori* sur la forme de relation qui existerait entre les paramètres potentiellement influant sur la différenciation génétique et cette dernière (par l'intermédiaire de la résistance). Mon approche consiste ainsi à créer un nombre très important de cartes de résistance correspondant à différentes formes de relations et différentes valeurs de paramètres explicatifs. La distance de résistance entre les sites échantillonnés en génétique est ensuite calculée grâce à la CT et comparée avec la distance génétique observée (Figure 40). La robustesse de la relation ainsi obtenue est enfin estimée pour chaque carte de résistance. Le modèle explicatif le plus probable montrant l'influence du paysage sur la différenciation génétique est ainsi retenu.

Chaque carte de résistance a donc permis d'obtenir via GFLOW une matrice diagonale de distance de résistance de taille 16x16 du fait de l'incorporation des 16 sites d'échantillonnage (sans les îles Chagos). Les valeurs de distance de résistance de cette matrice sont ensuite comparées deux-à-deux avec les valeurs de distance génétique (valeur de F_{ST} linéarisée) entre chaque paire de sites. Les modèles ainsi obtenus sont comparés pour déterminer quelle carte de résistance explique le mieux la différenciation génétique de *C. amblyrhynchos*.

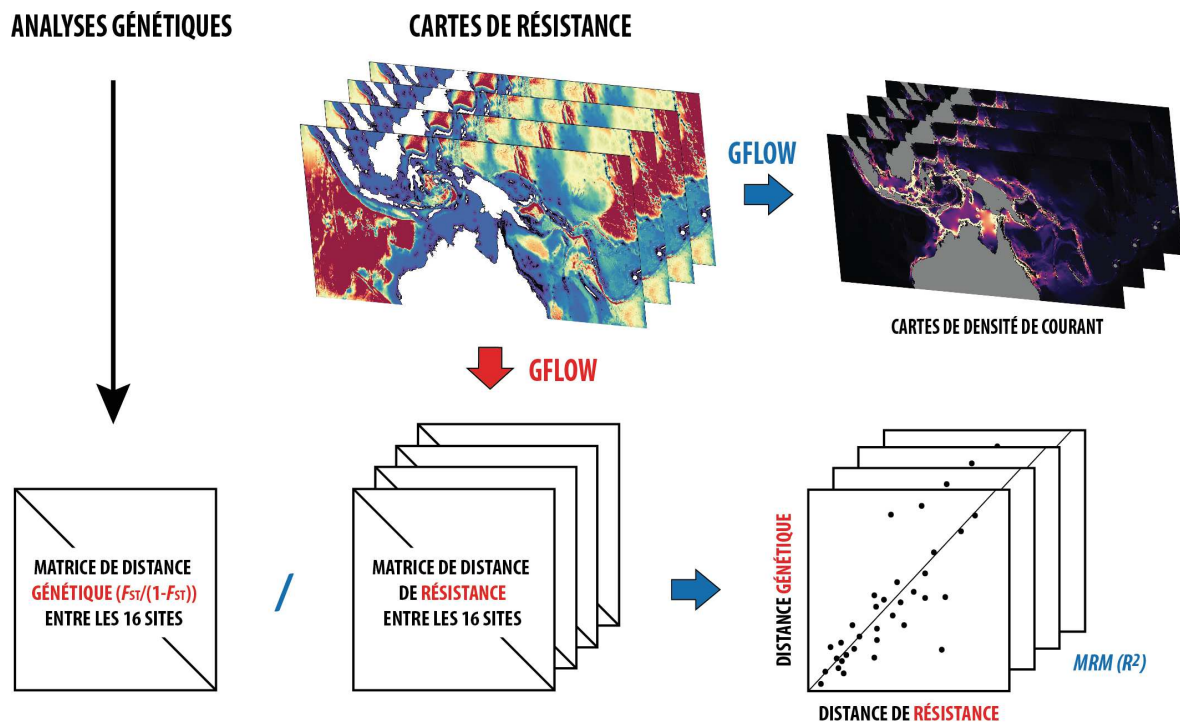


Figure 40. Schéma conceptuel de la procédure d'optimisation des modèles d'isolement par la résistance (IBR) par la théorie des circuits. De nombreuses cartes de résistance sont produites et utilisées en variable d'entrée de GFLOW, donnant ainsi des matrices de distance de résistance. Les valeurs de résistance sont ensuite reliées deux-à-deux aux valeurs de distance génétique (valeur de F_{ST} linéarisée), et la robustesse du modèle ainsi obtenue est comparée grâce au R^2 issu du MRM (régression multiple de matrices de distance).

Tous les modèles sont ainsi comparés entre eux pour déterminer le meilleur modèle, *i.e.* la meilleure combinaison de paramètres, ainsi que la surface de résistance associée. L'utilisation de modèle linéaire classique et de l'AICc est discutée dans la littérature du fait que les résidus de modèles appliqués sur des matrices de distance ne sont pas indépendants (Van Strien et al., 2012; Wagner and Fortin, 2016). En outre, le test de Mantel (Mantel, 1967) est également de plus en plus discuté pour l'utilisation de données deux-à-deux (Legendre et al., 2015; Selkoe et al., 2016). Il est clair que le domaine de la génétique du paysage évolue très vite avec de nombreuses méthodes proposées, ayant chacune leur biais. Aucune méthode n'est idéale, notamment pour distinguer un modèle optimal parmi des modèles issus de cartes de résistance très corrélées (Richardson et al., 2016; Shirk et al., 2010; Zeller et al., 2016). Une approche de type MRM (régression multiple de matrices de distance) aurait été envisageable en multivarié si les variables biogéographiques étudiées (*e.g.* bathymétrie et distance à l'habitat) n'étaient pas fortement corrélées (Balkenhol et al., 2009; Tucker et al., 2017). La difficulté dans le choix des méthodes de comparaison de modèles est exacerbée lorsque plusieurs paramètres servant à établir les surfaces de résistance sont corrélés. Le meilleur modèle est alors choisi grâce à une maximisation du R^2 issu d'une analyse MRM en univarié (Lichstein, 2007).

3.3. Paramétrisation des hypothèses

La première hypothèse simple est celle d'isolement par la distance (IBD). Après avoir montré qu'un modèle d'IBD simple avec des distances géographiques égales à la longueur du chemin le plus court en mer n'expliquait qu'une partie de la différenciation génétique de *C. amblyrhynchos*, un modèle d'IBD calculé par CT a été développé. Ce modèle prend comme carte d'entrée pour les calculs de distance de résistance deux-à-deux via GFLOW une carte homogène de résistance égale à 1 pour tous les pixels, sauf pour les zones non accessibles pour lesquelles est attribuée une résistance infinie (comme pour toutes les autres cartes). Il s'agit en réalité d'un modèle d'isolement par la résistance (IBR) à travers un paysage de résistance homogène. Ce modèle (appelé « *Modèle NUL GFLOW* ») n'explique pas mieux la différenciation génétique de *C. amblyrhynchos* (Figure 41).

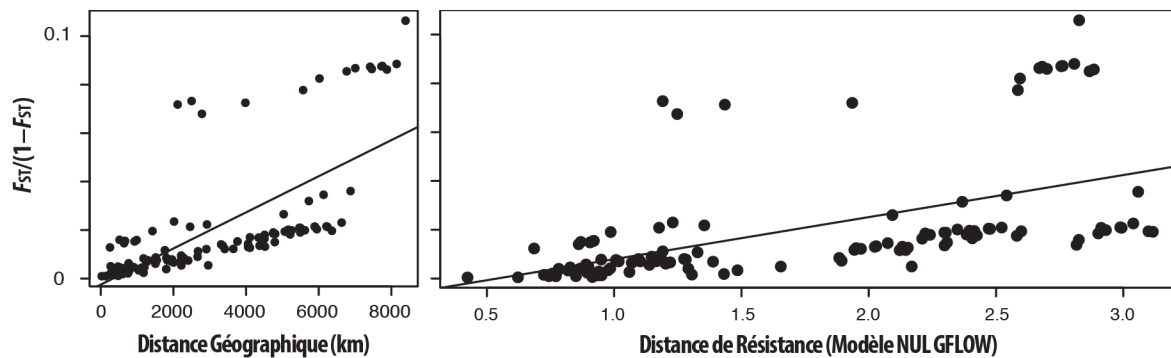


Figure 41. Comparaison d'un modèle simple d'IBD (distance géographique) et d'un modèle d'IBD calculé à partir de la CT (Modèle NUL GFLOW). Chaque point correspond à un couple de sites pour lequel la distance géographique ou la distance de résistance a été estimée.

Un paramètre aurait cependant pu être testé afin de trouver le meilleur modèle nul par GFLOW impliquant une carte de résistance homogène. Il s'agit de la valeur de chaque pixel (résistance) ayant été fixée à 1. Cette valeur peut être modulée. Appelons R_{max} la valeur maximale de résistance présente dans une surface de résistance. Dans le cas de ce modèle en particulier, quel que soit le pixel (en zone accessible), la valeur de résistance associée R est égale à R_{max} . Nous aurions alors pu faire varier R_{max} et voir quel modèle expliquait le mieux la différenciation génétique. C'est ce qui sera fait par la suite lors de la recherche d'un modèle optimal. Concernant ce modèle nul, faire varier R_{max} ne permettra pas de corriger les nombreuses valeurs aberrantes présentes sur la Figure 41.

Comme évoqué précédemment dans ce manuscrit, deux paramètres biogéographiques ont été étudiés afin de déterminer si leur incorporation dans des modèles d'IBR permettrait de mieux expliquer la différenciation génétique. Il s'agit de la *bathymétrie*, et de la *distance à l'habitat*.

Pour ces deux variables continues, différentes formes de relations ont été testées afin de mettre en place des cartes de résistance : exponentielle, logarithmique et linéaire, incluant des plafonds. Un exemple pour la bathymétrie est présenté Figure 42. La forme exponentielle avec plafond inclut deux paramètres variables. La forme logarithmique inclut également deux paramètres variables tandis que la forme linéaire inclut deux plafonds (minimum et maximum) pouvant éventuellement être égaux.

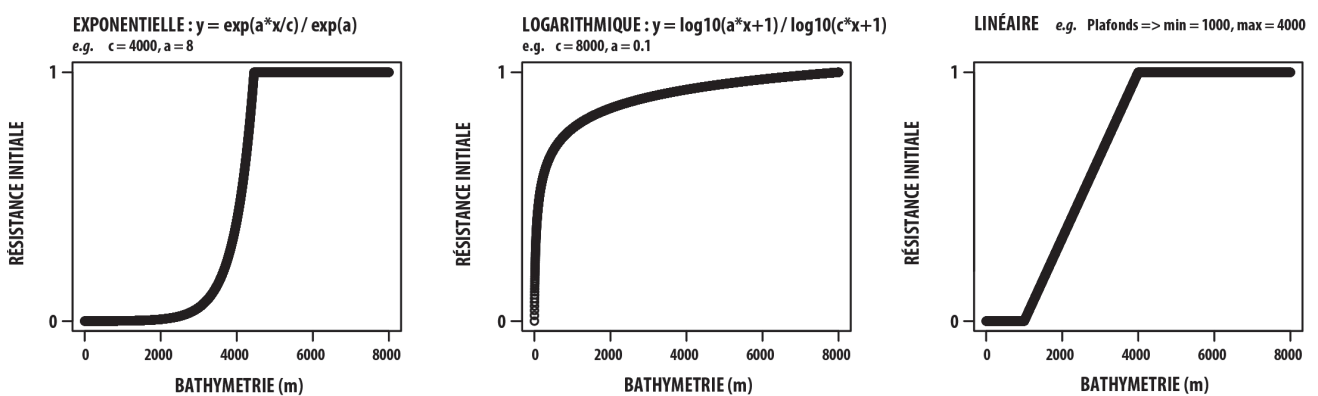


Figure 42. Exemples présentant différentes formes de relations testées entre la bathymétrie et la résistance initiale, ainsi que les formules associées et les paramètres variables. Bien que les valeurs des paramètres changent pour la distance à l'habitat, les formes des relations étudiées restent les mêmes pour cette variable.

Ces relations permettent de calculer ce que j'appelle une « *résistance initiale* » pour chaque valeur de bathymétrie et chaque forme de relation associée à des paramètres donnés. Cette valeur est comprise entre 0 et 1. La même manipulation est alors réalisée pour la distance à l'habitat en testant les mêmes formes de relation et des valeurs différentes des paramètres.

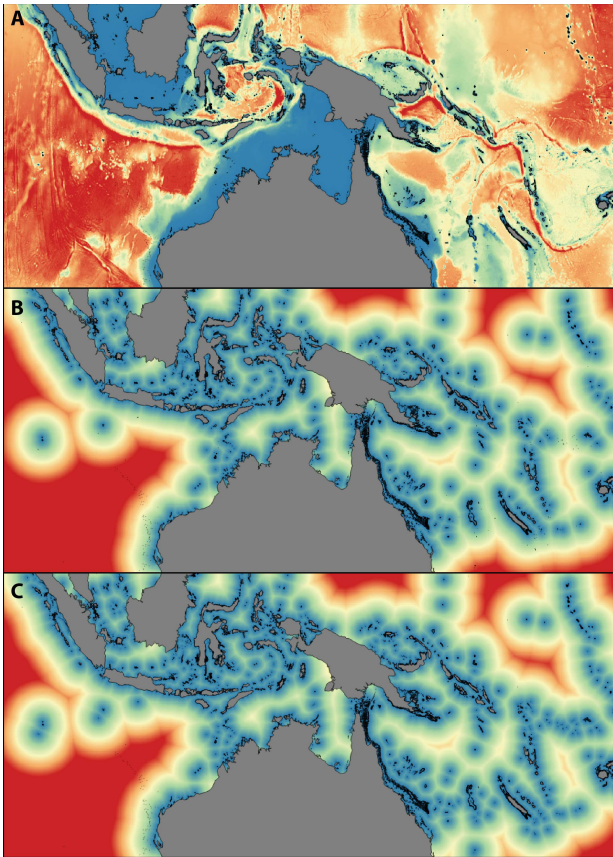


Figure 43. Exemples de cartes de résistance univariées obtenues avec une relation linéaire entre la résistance et (A) la bathymétrie (B) la distance à l'habitat (C) la distance à l'habitat incluant les monts sous-marins >280m.

Pour les modèles incluant soit la bathymétrie, soit la distance à l'habitat (Figure 43), la valeur finale de résistance des pixels de chaque carte est ensuite calculée en ramenant le minimum (R_{min}) à une valeur de 1 et le maximum à une valeur égale à R_{max} . Différentes valeurs de R_{max} sont testées. Les variables de bathymétrie et de distance à l'habitat ont dans un second temps été testées conjointement.

Comme évoqué précédemment dans la partie traitant de la procédure d'optimisation, le meilleur modèle a été proposé via une maximisation du R^2 issu d'une analyse MRM (Lichstein, 2007). Les cartes de résistance pour les modèles multivariés (bivariés) doivent donc être créées en incorporant la bathymétrie et la distance à l'habitat, avant le calcul des distances de résistance via GFLOW. Les deux variables étant très corrélées, il n'est pas intéressant d'ajouter

les surfaces de résistance issues de chaque optimisation univariée comme cela peut être fait dans certaines études (e.g. Creech et al., 2017). Ont donc été cumulées les variables de bathymétrie et de distance à l'habitat de la manière suivante :

- (i) La relation décrite précédemment (Figure 42) est tout d'abord utilisée pour transformer les valeurs de chacune de ces variables en résistance initiale variant entre 0 et 1.
- (ii) La résistance ainsi obtenue est alors multipliée par un « gain », puis est additionnée une valeur « offset » (Figure 44).
- (iii) Les deux relations sont cumulées afin de créer la carte de résistance. La relation entre les deux variables explicatives et la résistance ainsi obtenue peut donc être visualisée sous la forme d'un diagramme à trois dimensions comme celui visible sur la Figure 44.

Les relations alors établies entre les paramètres sont telles que la résistance minimale R_{min} est atteinte à la résistance minimale des deux variables, et la résistance maximale R_{max} est également atteinte à la résistance maximale des deux variables. En effet, dans cet exemple où $R_{maxB} > R_{maxD}$, le *gain* et l'*offset* associés à la bathymétrie sont fixés respectivement à $(R_{maxB} - R_{maxD})$ et R_{maxD} , tandis que le *gain* et l'*offset* associés à la distance à l'habitat sont fixés à $(R_{maxD} - 1)$ et $(1 - R_{maxD})$. L'exemple présenté dans la Figure 44 a été choisi arbitrairement. Il représente un modèle avec une relation entre la bathymétrie et la résistance de forme exponentielle avec un plafond à 4000 m. La relation entre la distance à l'habitat et la résistance est de forme logarithmique.

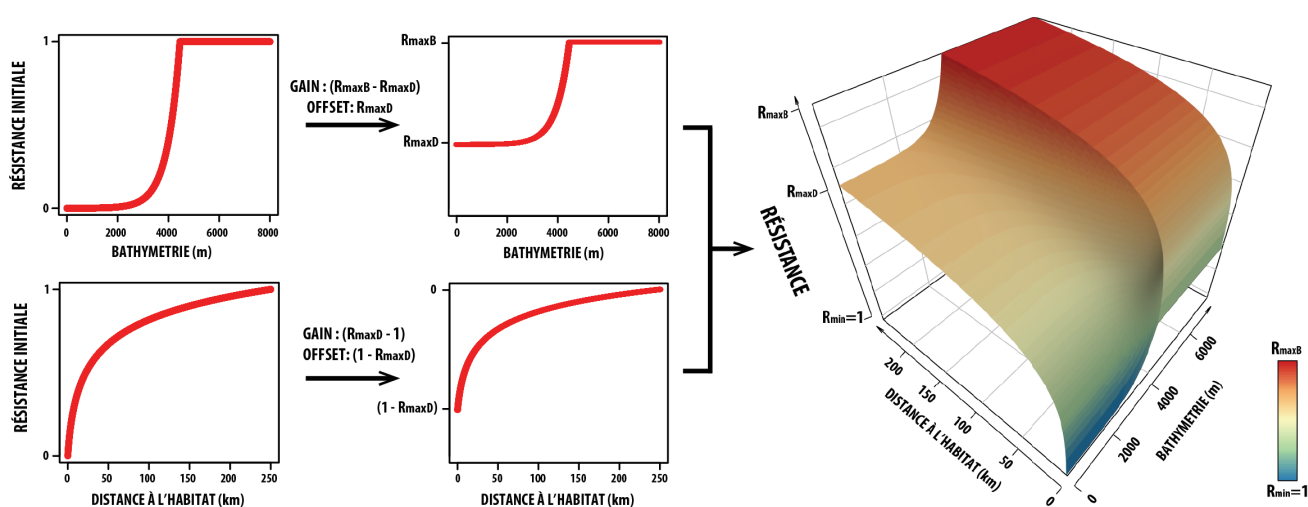


Figure 44. Schéma montrant la combinaison de deux variables explicatives (bathymétrie et distance à l'habitat) pour l'obtention d'une carte de résistance. Cette figure montre un exemple avec une relation exponentielle entre la bathymétrie et la résistance avec un plafond à 4000 m, et une relation de type logarithmique entre la distance à l'habitat et la résistance. Dans cet exemple, la résistance maximale associée à la bathymétrie est plus grande que celle associée à la distance à l'habitat ($R_{maxB} > R_{maxD}$).

De nombreuses valeurs des différents paramètres sont alors testées. Pour résumer, les éléments à faire varier sont donc pour chaque couple de variables : la forme de la relation pour chaque variable explicative incluant alors deux paramètres pour chaque forme, les deux R_{max} , et l'inclusion des monts sous-marins ou non dans la variable de distance à l'habitat. Environ 94 000 cartes ont ainsi été produites et les distances de résistance associées ont été calculées via GFLOW pour les 16 sites échantillonnés. Deux étapes de bracketing ont été réalisées, permettant d'affiner les paramètres autour des optimums observés. Une approche d'optimisation de type Monte-Carlo par chaînes de Markov (MCMC ; Ballnus et al., 2017; Botta et al., 2015; Casella et al., 2006; van Ravenzwaaij et al., 2016) a été envisagée afin de diminuer le temps de calcul et de trouver les paramètres optimaux, mais au vu

du nombre important de paramètres à optimiser dans cette étude, des soucis de convergence auraient pu être rencontrés et l'approche MCMC n'a donc pas été testée.

L'ensemble des codes nécessaires à la manipulation des variables spatiales et la création des cartes a été fait sous Python grâce à l'aide précieuse de Jean-François Cornu, et le lancement par batch de GFLOW a été réalisé en Bash (codes disponibles à la demande, germain.boussarie@gmail.com). Une partie des calculs a été lancée sur un ordinateur portable (MacBook Pro 16Go, 2,2 GHz Intel Core i7), et d'autres calculs ont été lancés en parallèle sur un cluster de calcul au centre IRD de Nouméa.

4. DÉLIMITATION D'UNITÉS HIÉRARCHIQUES DE CONSERVATION

Grâce à la méthodologie décrite ci-dessus, le meilleur modèle explicatif de la différenciation génétique a été obtenu. Il est alors possible de modéliser des prédictions de F_{ST} entre deux points si jamais on calcule une distance de résistance. L'idée de cette partie est alors d'aller plus loin que la caractérisation des paramètres influençant la dispersion en prédisant la différenciation génétique de *Carcharhinus amblyrhynchos* entre tous les habitats favorables à sa présence, et non uniquement les sites échantillonnés pour la génétique. Afin de proposer un support de réflexion et d'aller plus loin dans la gestion de la conservation de cette espèce aux échelles locale et globale, des cartes sont proposées incluant une délimitation hiérarchique d'unités de conservation en prenant en compte la différenciation génétique modélisée entre tous les récifs des emprises étudiées. Ces données pourront être ajoutées dans un second temps à d'autres types de données, dans un cadre de planification de l'espace maritime afin de proposer un design général ou local de corridors de protection et de réseaux d'Aires Marines Protégées (AMPs) alors efficaces pour des prédateurs mobiles telles que les requins.

4.1. Unités de conservation (CUs)

Le concept d'unités de conservation utilisé au sein de cette étude est celui défini dans Funk et al., 2012 (traduction) : « Unité de Conservation (CU) : population considérée distincte dans un but de conservation, comme par exemple une MU, DPS ou ESU ». MU correspond à une unité de

management, DPS à « Distinct Population Segment » (dans le *Endangered Species Act*) et ESU à une unité significative d'évolution (ou unité d'importance sur le plan évolutif).

En d'autres termes, les CUs sont des unités de populations identifiées au sein des espèces, utilisées pour guider la gestion et les efforts de conservation (Funk et al., 2012). Identifier des CUs est un premier pas en conservation pour que les décideurs connaissent les limites des unités de population qu'ils essaient de conserver. Certains types de CUs ont un statut légal (e.g. Weckworth et al., 2018). Sans rentrer dans les détails, il est important de noter que de nombreuses catégories existent pour ces CUs. On retrouve les ESUs évoquées plus tôt, les unités de management (MUs), les unités adaptatives (AUs ; Barbosa et al., 2018; Funk et al., 2012), les *distinct population segments* (DPSs ; Waples, 1991), les *nationally significant populations* (Thomas and Gray, 2002), les *designatable units* (DUs ; COSEWIC, 2011), les unités de conservation fonctionnelles (FCUs ; Maes et al., 2004) et les définitions restent parfois floues et/ou spécifiques (e.g. Lion Conservation Units ; LCUs ; Dubach et al., 2013).

En 2010 a été formulé le besoin clair de définitions précises, en mettant en avant parmi treize besoins prioritaires en génétique de la conservation celui pour les scientifiques de s'accorder sur ces définitions d'unités de conservation (Frankham, 2010). Il était ici intéressant d'étudier les requins de récif dans un contexte local (PNMC) et de connaître la structure des populations à fine échelle, mais également dans un contexte global afin de mieux gérer leur protection. Dans ce cadre, plutôt que de définir plusieurs niveaux d'unités de conservation des requins, j'ai choisi de garder le terme de CUs qui englobe un ensemble de définitions, et de l'étendre à des « unités de conservation hiérarchiques », ou à une délimitation « hiérarchique » d'unités de conservation.

4.2. Sélection des sites

La première étape consiste à définir les points au sein de l'emprise étudiée. Il faut se rendre compte que nous avons utilisé 16 sites d'échantillonnage plus tôt, cumulant un total de 120 calculs deux-à-deux (nombre de combinaisons de 2 parmi 16 = $16 \times 15 / 2$). Si 10^3 points sont choisis, ce sont 5×10^5 paires à calculer. Si 10^4 points, 5×10^7 . Quelle que soit la méthode choisie pour déterminer les points, il a fallu restreindre le nombre de points à un nombre raisonnable.

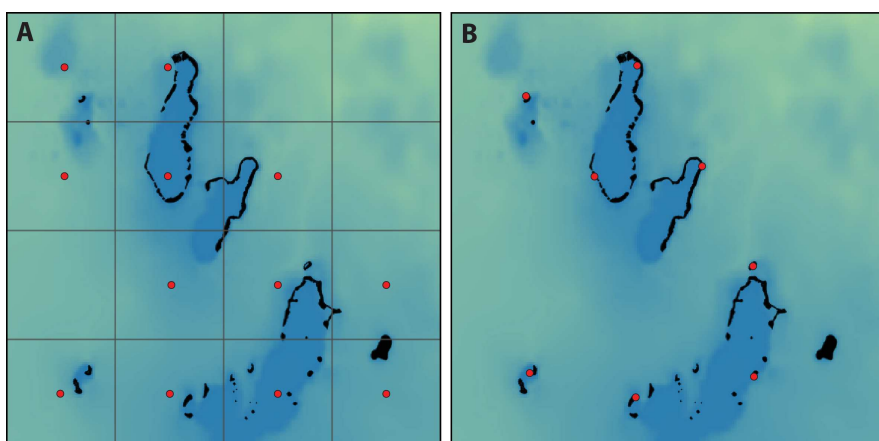


Figure 45. Méthodes possibles de sélection des sites au sein de l'habitat. (A) Processus de sélection par carroyage avec présence d'habitat (en noir) ou non. (B) Sélection résultant de l'utilisation d'un processus de Matérn. Dans les deux cas (A) et (B), les points sont séparés de la même distance minimale.

cette méthode dans notre cas particulier est que l'habitat n'est pas du tout réparti de manière homogène. Il est constitué entre autres de petites îles océaniques et de récifs répartis de manière hétérogène. Cette méthode rendrait donc l'échantillonnage très imprécis et simplifierait de manière conséquente la zone, quelle que soit la métrique utilisée pour choisir les points. En effet, si l'on utilise la condition « un pixel présent dans le carreau de la grille donc on choisit le centre du carreau comme site », cela conduit à une surestimation du nombre de points (Figure 45A). Ou une condition similaire sur le nombre minimum de pixels afin de sélectionner les sites, cela reviendrait à négliger et ne pas prendre en compte une grande partie des petites îles océaniques et petits récifs. De plus, on se retrouve avec des sites éventuellement fortement décalés par rapport à l'habitat.

Une méthode beaucoup plus adaptée spécifiquement à notre problématique consiste à utiliser un processus stochastique de Matérn, utilisé notamment pour définir des points d'échantillonnage pour le design de suivis en forêt (Kiderlen and Hörig, 2013; Matérn, 1960). Ce type de processus adapté à cette étude revient à choisir un point de manière aléatoire parmi les pixels du raster habitat, et à supprimer les pixels d'habitat dans un rayon d'une valeur donnée autour de ce point. L'étape est répétée jusqu'à ce qu'aucun point ne soit plus disponible sur le raster habitat. Cette méthode permet alors de s'affranchir des biais évoqués de l'autre méthode (Figure 45B), les petites îles et récifs sont bien pris en compte, et les plus gros récifs présents aux coins du carroyage de la première méthode ne sont pris en compte qu'une fois (Figure 45).

Pour définir les points, nous pouvons imaginer une méthode consistant à les choisir en traçant une grille régulière et ne gardant que les points pour lesquels la grille contient de l'habitat comme défini plus haut (Figure 45A). Cette grille peut être plus ou moins fine, mais plus elle est fine, plus le nombre de points sera élevé. Le problème de

Un script optimisé sous Python a alors été réalisé afin d'implémenter ce processus avec l'aide de Jean-François Cornu. En revanche, même si l'utilisation de ce script à l'emprise de la zone d'échantillonnage ne pose aucun problème, son application sur un raster fin à l'échelle de l'Indo-Pacifique nécessite un minimum de 32 Gb de mémoire vive.

Pour l'emprise locale et à l'étendue de notre échantillonnage, le script a été utilisé avec une distance minimale de 50 km entre les sites. Pour l'emprise globale, celle-ci a été fixée à 100 km. Ce script a été lancé en batch afin de créer un nombre important de possibilités, et le résultat ayant le plus de sites a été choisi afin de prendre en compte un maximum de points et ne pas négliger certains récifs.

4.3. Lancement de GFLOW

Le nombre important de sites alors sélectionnés (~ 900 - 1000) a impliqué d'effectuer un nombre important de calculs deux-à-deux (~ 400 000 - 500 000). Cela a impliqué des erreurs de convergence qui stoppaient alors le calcul général avant d'avoir effectué le calcul de toutes les paires possibles. J'ai ainsi modifié le code de GFLOW en conséquence. De plus, ce volume important de calculs a engendré d'autres problèmes liés notamment au nombre maximum de fichiers ouverts pour lequel il y a une limite. Celle-ci diffère sur ordinateur portable ou sur cluster, et il a fallu changer ces paramètres afin de pouvoir manipuler les résultats. Les calculs de GFLOW aux deux emprises (locale/échantillonnage et globale/Indo-Pacifique) ont alors été réalisés, prenant une semaine sur cluster (20 cores) pour la plus grande échelle.

4.4. Délimitation d'unités

La différenciation génétique (F_{ST}) entre chaque couple de points a été obtenue grâce aux calculs de distance de résistance avec GFLOW ainsi que la relation obtenue plus tôt en optimisant le modèle (par maximisation du R^2 issus du MRM). A partir de la matrice de distance génétique obtenue, j'ai ainsi réalisé des dendrogrammes (méthode UPGMA) qui ont alors permis de délimiter des unités en effectuant des coupes à des valeurs arbitraires de F_{ST} .

5. ARTICLE 3 - Seascape genomics reveals isolated sites and hierarchical conservation units for a near threatened shark (*Carcharhinus amblyrhynchos*) across its entire distribution range

N.B. Les figures du texte principal suivent la numérotation du manuscrit, mais les figures supplémentaires suivent leur numérotation propre.

Résumé en français : Les requins représentent un des groupes d'espèces les plus importants dans les océans d'un point de vue écologique, mais sont aussi parmi les plus menacés du fait de leur vulnérabilité aux pressions anthropiques. L'implémentation de mesures de conservation efficaces pour ces espèces mobiles est urgente mais représente pour autant un véritable défi. Comprendre la connectivité génétique et la structure des populations de ces prédateurs marins est une des priorités en termes de gestion pour ces populations en déclin. En revanche, les effets de l'habitat et de paramètres biogéographiques sur la connectivité génétique ont souvent été négligés dans la littérature, surtout pour des espèces mobiles telles que les requins et dans l'océan où les barrières à la dispersion ne sont pas absolues. Dans cette étude, nous avons développé une approche de génomique du paysage en utilisant 4491 sites de polymorphisme nucléotidique et un modèle d'isolement par la résistance s'appuyant sur la théorie des circuits, sur 515 requins à large échelle, pour explorer les paramètres reliés à la différenciation génétique d'un requin de récif quasi-menacé, *Carcharhinus amblyrhynchos*. Comme il a été avancé auparavant pour cette espèce, mais jamais validé, nous démontrons que les zones de forte bathymétrie représentent une barrière importante à la dispersion, tandis que la proximité à l'habitat en est un facilitateur. Nous avons alors modélisé la différenciation génétique résultante des populations sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce, fournissant ainsi des unités de conservation aux échelles à la fois locale et globale pour orienter les décideurs vers des mesures de protection efficace. Il en ressort que les populations de requins gris de récif sont bien plus fragmentées qu'attendu pour une espèce aussi mobile, ce qui alarme sur les capacités de résilience des populations isolées, notamment celles subissant de fortes pressions anthropiques. Contrairement aux écosystèmes terrestres, où la restauration de la connectivité des habitats peut être considérée, les écosystèmes marins n'offrent pas de telles possibilités. Par conséquent, une planification spatiale rigoureuse de la réduction des menaces sur les requins de récif doit être entreprise rapidement afin de mieux gérer ces populations fragmentées. Nous recommandons également l'utilisation de la procédure développée dans cette étude pour investiguer sur la manière dont les caractéristiques du paysage sous-marin sont reliées à la différenciation génétique d'autres espèces marines n'ayant pas de phase de dispersion larvaire, dans le but d'aider au design de réseaux d'aires marines protégées et de corridors de protection.

5.1. Abstract

Sharks represent one of the most ecologically important but also most threatened groups of species in the ocean, being highly vulnerable to anthropogenic pressures like overfishing. The implementation of efficient conservation measures for these mobile species is urgent yet challenging. Understanding genetic connectivity and population structure of these marine predators is one of the priorities for management of their declining populations. However, the effects of habitat and biogeographic features on genetic connectivity have often been overlooked in the literature, especially for mobile species such as sharks, and in the ocean where barriers to dispersal are not absolute. Here we developed a seascape genomic approach by using a set of 4491 nuclear single-nucleotide polymorphisms and an isolation-by-resistance modelling framework involving circuit theory on 515 sharks at a wide scale to explore what parameters are driving the genetic differentiation of a near-threatened reef shark, *Carcharhinus amblyrhynchos*. As hypothesized for this species but never validated before, we show that deep oceanic areas act as a strong barrier and proximity to habitat is a facilitator for dispersal. We then modelled the resulting population genetic differentiation at the entire distribution range of the species, providing both local and global-scale conservation units for future guidance of efficient conservation. We found that grey reef shark populations are much more fragmented than expected for such a mobile species, raising concerns about the resilience of isolated populations under high anthropogenic pressures. Contrary to terrestrial ecosystems where the restoration of habitat connectivity can be considered, marine ecosystems do not offer such solution. Therefore, careful spatial planning of threats reduction to reef sharks must be urgently established for efficient management of their fragmented populations. We also recommend the framework used in this study to investigate how seascape features drive the genetic differentiation of other marine species that lack larval dispersal, to further help in the design of marine protected area networks and corridors of protection.

5.2. Introduction

Like many species in the Anthropocene, sharks are subject to massive human-driven defaunation (Dirzo et al., 2014), due to vulnerable life history traits, *e.g.* slow growth, late sexual maturity and low fecundity (Dulvy et al., 2014). Several shark species underwent declines greater than 90% relative to their former abundances (Dulvy et al., 2014; Ferretti et al., 2010, 2018; Myers and Worm, 2003; Roff et al., 2018), leading to the endangered status of many of them (IUCN Red List, *International Union for Conservation of Nature*). Effective conservation of these highly mobile species is challenging since most commonly implemented protection measures are not preventing shark declines (Davidson and Dulvy, 2017). The efficiency of Marine Protected Areas (MPAs) has been demonstrated for many species (Cinner et al., 2018), but their ability to protect sharks is limited, even for some of the oldest and most enforced no-entry MPAs (Juhel et al., 2017). The main reason why MPAs provide limited protection to sharks is because some species (*e.g.* tiger and whale sharks) show very little residency and vast home range exceeding most MPA sizes (Ferreira et al., 2015; Guzman et al., 2018). Yet, some shark species show a high level of residency and small home range but the spatial overlap between MPA locations and population hotspots is often low (Daly et al., 2018). Thus, the implementation of efficient conservation measures requires that space use by highly mobile predators is accounted for in conservation planning, and more specifically that the factors driving the level of connectivity among populations are better understood.

Many studies rely on biophysical and oceanographic models to explain larval connectivity (Galindo et al., 2010; Raitzos et al., 2017; Selkoe et al., 2008) or adult dispersal (Rodríguez-Zárate et al., 2018). However, knowledge about connectivity is very limited for highly mobile species lacking a pelagic larval dispersal phase such as sharks (Momigliano et al., 2015a). Although migrations have been identified, as well as philopatry for some species (Chapman et al., 2015), little is known about dispersal for these animals, especially barriers and resistance to dispersal (behavioral and physical). Genetic connectivity, a measure of gene flow and other evolutionary processes among populations, is one way to investigate population connectivity in such species. Impermeable barriers to movements are rare in the oceans, and because of usually large population sizes in marine organisms, detecting barriers can be a challenge as small migration rates can decrease genetic differentiation (Balkenhol et al., 2017; Momigliano et al., 2015a). Some studies yet suggest the existence of barriers to gene flow for sharks and that continuous reefs may act as facilitators of gene flow (Chin et al., 2017; Momigliano et al., 2015b, 2017a). Yet, given the lack of model linking landscape features to gene flow and

insufficient genetic sampling, no study has tested predictions on how habitat and biogeographic features could influence the genetic structure of shark populations. However, the development of next-generation sequencing methods opens new perspectives for high-resolution seascape genomics (Balkenhol et al., 2017; Barbosa et al., 2018), allowing the identification of finer and more informative structure than mtDNA markers or microsatellites. These numerous genetic markers can therefore highlight restrictions to gene flow and patterns among populations that were once considered panmictic (DiBattista et al., 2017). Additionally, recent developments in landscape genetics, including advances in computational power (Schadt et al., 2010), now allow the development of models providing large-scale and high-resolution hypothesis-testing about how landscape features shape connectivity (Leonard et al., 2017).

Understanding how habitat and biogeographic features explain population connectivity is a first crucial step towards a spatial delineation of units of conservation to help improve management of natural populations. This knowledge would allow better protection of target species, for instance via the identification of key areas for dispersal, along with populations under potential threats (Allendorf et al., 2010; Barbosa et al., 2018; Funk et al., 2012). Although the concept of conservation units, its associated definitions and its implications in the conservation field are debated (Lowe and Allendorf, 2010; Palsbøll et al., 2007; Waples and Gaggiotti, 2006), the importance of their delineation is widely documented and undeniable (*e.g.* Allendorf et al., 2010; Frankham, 2010; Funk et al., 2012). Hierarchical delineation of genetic subdivisions among species, based on genetic connectivity, and leading to multiscale conservation units, can provide significant clues for both local and global management of populations (Dilts et al., 2016). Surprisingly, the degree of habitat fragmentation and the spatial distribution of conservation units are poorly known for reef sharks, while they would ultimately determine a better strategy to protect such mobile predators.

The grey reef shark (*Carcharhinus amblyrhynchos*) is one of the most abundant shark species in Indo-Pacific coral reefs and plays crucial functional roles in coastal ecosystems (Roff et al., 2016). Yet, this species has decreased in abundance by more than 90% in non-protected reefs close to humans and is now classified as near-threatened by the IUCN (Juhel et al., 2017; Robbins et al., 2006b; Ruppert et al., 2017). This species is known as sedentary with a limited home range but some individuals can migrate along reefs and across oceanic waters (Espinoza et al., 2014b; White et al., 2017b). Small MPAs are not efficient in providing substantial protection for this species (Juhel et al., 2017), and finding better conservation solutions is a priority. However, the design of corridors and MPA networks

that could then become efficient for this species requires both a better understanding of the factors driving genetic connectivity among populations and the spatial delineation of conservation units.

In this study we provide for the first time a two-step approach to investigate genetic connectivity at the entire species distribution range of a near-threatened coral reef-associated predator, the grey reef shark (*Carcharhinus amblyrhynchos*). We first explore how seascape features can explain genetic differentiation of this species, with an unprecedented extensive sampling using genome-wide single-nucleotide polymorphisms (SNPs), with isolation-by-resistance (IBR) modelling and electrical circuit theory (CT) (McRae, 2006; McRae et al., 2008). We then use this modelling framework to predict genetic differentiation at the whole distribution range of the species (Indo-Pacific), and we suggest a hierarchical delineation of conservation units at different spatial and management scales, with important consequences for the conservation of this species.

5.3. Materials and Methods

a. Shark sampling and locations

We sampled a total of 515 grey reef shark (*Carcharhinus amblyrhynchos*) fin clips from 17 locations in the Indian and Pacific Oceans (Figure 46A). Samples from the Indian Ocean (n=99), Indonesia (n=24) and the Great Barrier Reef (n=48) were already described and genotyped in a published study (Momigliano et al., 2017a). Samples from Chagos (n=22) from this previous study were not included in the analysis unless specified, leaving a total of 493 sharks. The other samples were collected for the current study in the New Caledonian Archipelago (n=344), between June 2015 and November 2016, using barbless circle hooks for mouth-hooking and easy release after sampling. Sharks were caught on single lines to reduce bycatch and allow a quick intervention.

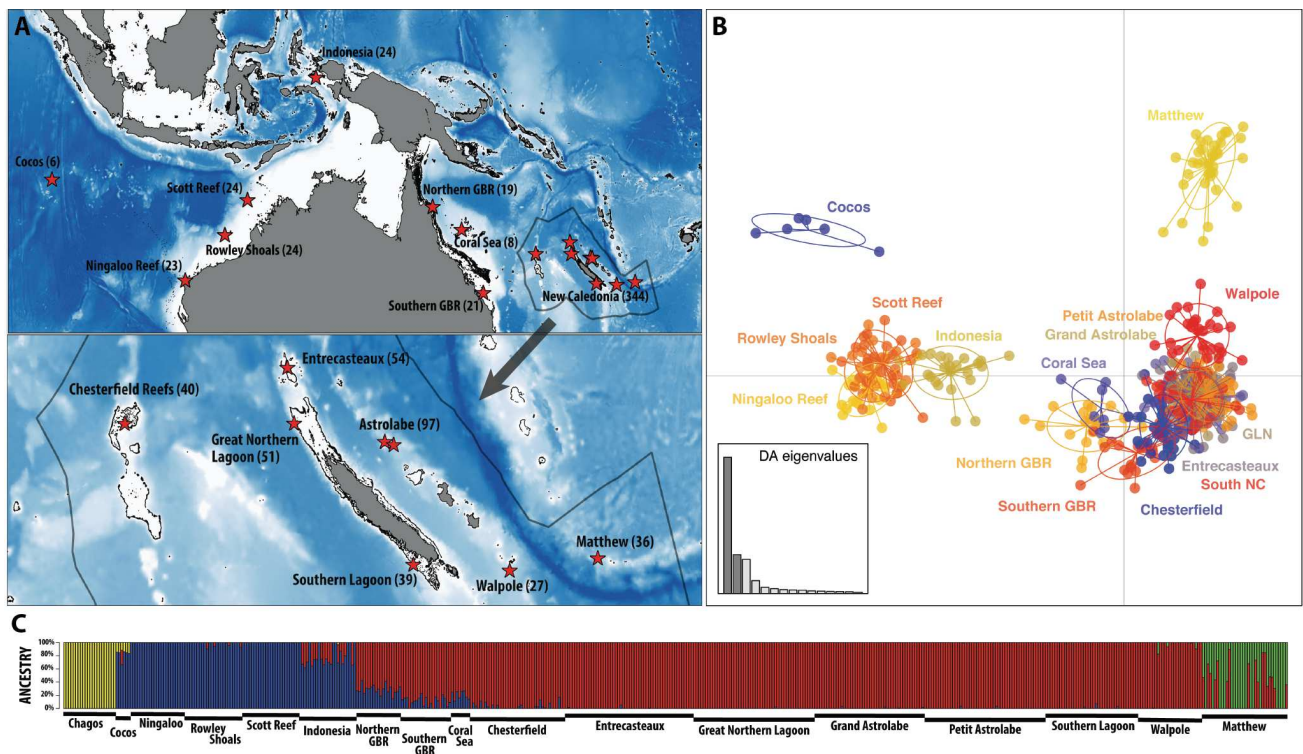


Figure 46. (A) Map of global sampling locations where 493 grey reef shark genetic samples were collected, along with detailed sampling at the scale of the New Caledonian archipelago (EEZ outlined in grey). The number of individuals sampled for SNP analysis in each location is in brackets. (B) Results from Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) analysis performed on the set of 4983 filtered neutral SNP data (excluding outliers) from all locations. The first and second discriminant functions are represented by x and y axes. Colors and inertia ellipses correspond to sampling locations. (C) Results from fastSTRUCTURE using simple prior and $K=4$. Samples from Chagos were included in this analysis.

b. Population genomics: first analysis steps

We extracted DNA from fin clips using DNEasy Blood and Tissue kit (QIAGEN) for the 344 samples from New Caledonia, or GenCatch™ Blood & Tissue Genomic Mini Prep Kit (Epoch Biolabs) for the 171 samples in the previously published study (Momigliano et al., 2017a). Each DNA solution was adjusted, after quality control, to 12-15 μL at 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ prior to DNA sequencing at Diversity Arrays Technology Pty. Ltd (Canberra, Australia), using DArTseq protocol (Sansaloni et al., 2011). Post-extraction laboratory protocols and SNP calling and filtering procedures used were the same as described in Momigliano et al. (2017) (Momigliano et al., 2017a), except for filtration to remove loci with minor allele frequencies, where we filtered SNPs for $\text{MAF} > 0.02$ instead of 0.05, as sampling was extended to numerous additional locations.

Outlier tests were used to filter loci for which genetic differentiation (F_{ST}) is higher than expected under neutral processes only. We only included in these outlier analyses individuals from Australian, Indonesian and New Caledonian sampling locations that show little genetic differentiation at nuclear loci (Momigliano et al., 2017a). We applied a combination of two methods to identify and exclude from further analyses these loci potentially under selection ; OutFLANK (Whitlock and Lotterhos, 2015) and FLK, *i.e.* extensions of the Lewontin–Krakauer test that accounts for population co-ancestry (Bonhomme et al., 2010).

c. Population structure

We applied a Bayesian unsupervised clustering method (fastSTRUCTURE) to investigate genetic structure at neutral loci (Raj et al., 2014). fastSTRUCTURE implements an efficient algorithm for approximate inference of the admixture model from STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). We ran fastSTRUCTURE with simple and logistic priors, at multiple numbers of K ranging from 1 to 10.

We also carried out Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using the R package adegenet, and sampling location of each individual as prior information (Jombart et al., 2010), to investigate patterns of genetic structure at neutral loci. The number of principal components (PCs) to retain for DAPC analyses was determined by cross-validation using a training set of 80% of the data and therefore retained the number of PCs for which the obtained mean square error was lowest.

d. Isolation-by-resistance models

The relationship between genetic distance at neutral SNP loci (F_{ST}) and geographic distance, *i.e.* isolation-by-distance (IBD) pattern, was investigated using multiple regression on distance matrices (MRM ; Lichstein, 2007). Pairwise genetic distances between all sites (Weir and Cockerham F_{ST} , Weir and Cockerham, 1984) were calculated using the R package *diversity* (Keenan et al., 2013), and pairwise geographic distances between all sites, with the R package *marmap* (Pante and Simon-Bouhet, 2013). Isolation-by-resistance (IBR) was then investigated, to check for further effects of seascape features on dispersal of grey reef shark populations (*e.g.* bathymetry, distance-to-habitat). IBR models assume a linear relationship between pairwise genetic distance and pairwise resistance distance, a metric both taking into account geographic distance and landscape features between locations (McRae and Beier, 2007).

Furthermore, we used IBR models implementing electrical Circuit Theory (CT) (McRae and Beier, 2007; McRae et al., 2008), and tested their performance in explaining genetic differentiation across our sampling locations of grey reef sharks across the Indo-Pacific. This allowed us to explore different biological hypotheses about gene dispersal for this adult-disperser species. Methods based on CT allow the calculation of a resistance distance between each pair of sampled locations by simultaneously considering all possible pathways connecting these locations.

e. Resistance maps calculation

In a first step, resistance maps were established with 10-km pixels using custom scripts in Python, based on different hypotheses. Such spatial resolution of 10 km was arbitrarily chosen to reduce computation time, and because grey reef sharks have shown a high residency and relatively small home range in the same order of magnitude (Espinoza et al., 2014b; White et al., 2017b). First, a map was produced with values of resistance 1 for each pixel of the map, to be further used in a ‘CT null model’, corresponding to CT in a homogeneous landscape. Then, bathymetry (GEBCO, gebcoco.net) and distance-to-habitat resistance maps were drawn separately and in combination as seascape features potentially driving gene flow. For the latter, we included coral reefs (data.unep-wcmc.org, (Spalding et al., 2001)) and oceanic islands/volcanoes above 280 m depth as potential habitat (earthworks.stanford.edu/catalog/harvard-glb-volc; 280 m corresponding to the reported depth range for *Carcharhinus amblyrhynchos* (Last and Stevens, 2009)). Distance-to-habitat maps were calculated with or without including seamounts as suitable habitats ((Yesson et al., 2011); above 280

m depth), and both hypotheses were therefore tested. Different shapes of relationships between these parameters and resistance were then explored (e.g. linear relationships with minimum and maximum threshold, negative exponential, logarithmic). Different maximum resistance values were also used to calculate the set of resistance maps to run through CT. Full details on resistance maps parametrization are reported in Figure S1.

f. Pairwise distances computation using Circuit Theory

In a second step, the set of obtained resistance maps was used as input for IBR models using GFLOW (Leonard et al., 2017), which is an optimized version of the Circuitscape software, basically calculating pairwise resistance distances between sampling locations using Circuit Theory (McRae, 2006; McRae and Beier, 2007). This batch of obtained pairwise resistance distances between all sites and for every resistance map was then correlated to pairwise genetic distances (pairwise F_{ST} values linearized using the formula $F_{ST}/(1-F_{ST})$). Multiple regression on distance matrices (MRM ; Lichstein, 2007) was used to find the optimal models representing the most probable hypotheses. Univariate models were first optimized, representing the best correlations between seascape features and genetic distances separately. Then, models accounting for both bathymetry and distance-to-habitat in single resistance maps were also tested with multiple combinations of maximum resistance, relationship shapes and associated parameters. More details on parametrization and model optimization are available in Figure S1.

g. Simulations and clustering at different scales

Locations with possible presence of *Carcharhinus amblyrhynchos* were identified and subsampled at different scales (Froese et al., 2010). The first scale was at the extent of our sampling locations, from the Cocos Keeling Islands to Eastern New Caledonian volcanic islands. Locations were randomly chosen using a custom Python script based on Matérn process (Kiderlen and Hörig, 2013), separated by a distance of at least 50 km. At the scale of the entire distribution range of the species (Indo-Pacific), including hypothetical presences, locations were randomly chosen using the same method, separated by a distance of at least 100 km. Such distances between locations were chosen to keep computation time reasonable. The extent on which locations were randomly chosen was narrower than the extent of the resistance maps used as input from GFLOW. Indeed, the artificial boundaries created by the edges of a map can have a non-negligible impact on the calculations of landscape resistance to gene flow (Koen et al., 2010).

The best CT model obtained with the previously described optimization framework, and thus the resistance map best explaining genetic differentiation between the sampling sites, was used to run GFLOW on the randomly chosen locations. It allowed computation of pairwise resistance distances between all possible locations for grey reef shark presence. Such pairwise resistance distances were then converted to pairwise genetic distances (predicted Weir and Cockerham F_{ST}), using the best relationship between distance matrices obtained in the optimization steps (*i.e.* from empirical data).

The dissimilarity matrix of genetic distances obtained was then subjected to a hierarchical classification using the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA). Resulting trees were then cut at arbitrary F_{ST} values ($F_{ST} = 0.01$ at the scale of the extent of our sampling locations, and $F_{ST} = 0.025$ at the scale of the entire distribution range), therefore attributing cluster assignments to locations.

5.4. Results

OutFLANK and FLK tests identified 8 shared outlier loci, that we excluded before further analyses, leaving a total of 4983 neutral SNPs.

The discriminant analysis (DAPC) indicates four clusters (Figure 46B), also identified by fastSTRUCTURE (Figure 46C). The distribution of clusters along the first two axes of the DAPC displays a hierarchical islands structure (Figure 46B), suggesting a stepping stone model of dispersal (Jombart et al., 2010). Both population structure analyses, DAPC and fastSTRUCTURE (K=4 genetic clusters) performed on data from all locations revealed greater differentiation between areas separated by large distances and/or deep waters (Figure 46B-C). Sharks sampled at the oceanic island of Matthew on the New Hebrides Plate show greater genetic differentiation compared to the other sampling locations. This singularity is also observed in the Chagos Archipelago, and the Cocos Keeling Islands, which are isolated coral reef islands separated by large expanses of oceanic water. The DAPC also suggests that sharks from the remote reefs of Chesterfield are more related to sharks from the Great Barrier Reef (GBR) than to sharks from the rest of the New Caledonian archipelago. Pairwise genetic distances (Weir and Cockerham F_{ST} values) confirm the patterns of differentiation observed by DAPC and fastSTRUCTURE (Table S1).

During model optimization, 618 resistance maps were obtained when testing single parameter hypotheses (bathymetry or distance-to-habitat; with or without including seamounts as suitable

habitat). These maps correspond to three different shapes of relationships between bathymetry and resistance or distance-to-habitat and resistance, along with five subsequently varying parameters for each hypothesis (Figure S1). A total of 93,632 resistance maps including both seascape features in every possible combination were obtained and used as input for GFLOW (Figure S1).

Isolation-by-distance (IBD) calculated with linear geographic distances explained part of the genetic differentiation (R^2 around 0.5), as well as IBD calculated with Circuit Theory (GFLOW Null Model, pixels of value 1, R^2 around 0.3), but many outliers remain (Figure 47). The best distance-to-habitat- and bathymetry-based models were respectively a model with high resistance value when at more than 200 km from any suitable habitat ($R^2 = 0.952$) and a model with low resistance at depth above 2000 m, attaining very high resistance values at depth below 4000 m ($R^2 = 0.985$). The best model combining both bathymetry and distance-to-habitat explained very well the genetic differentiation of grey reef sharks sampled ($R^2 = 0.988$). This best model did not include seamounts as suitable habitat and suggests that deep oceanic water is a strong barrier to dispersal. It also suggests that habitat proximity of less than 50 km is a facilitator of gene flow (Figure S2).

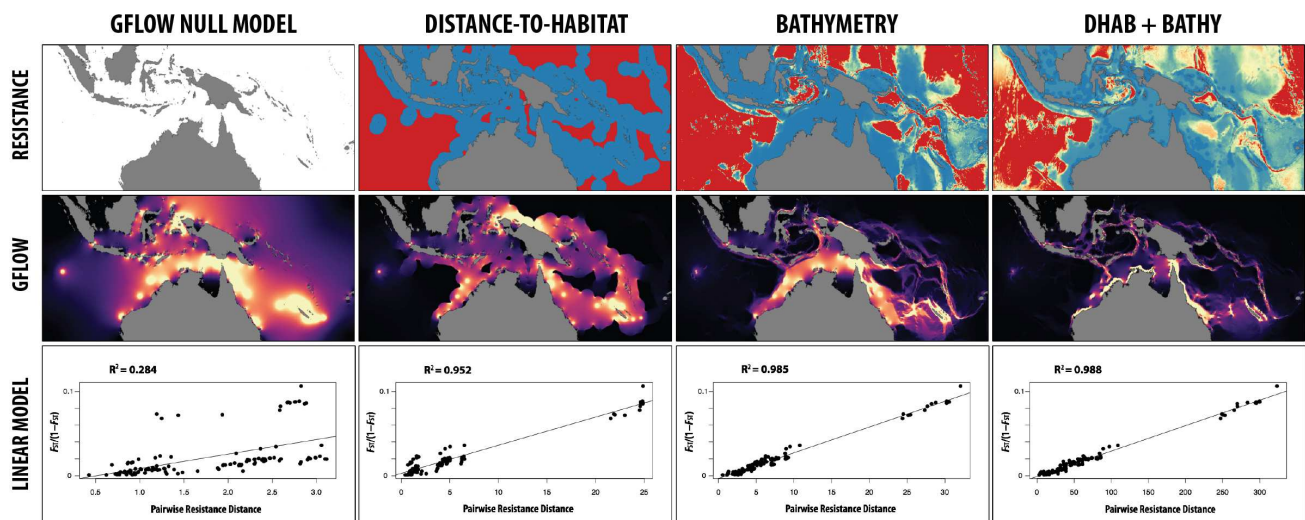


Figure 47. Results of the optimization framework showing (i) the best resistance maps associated with different hypotheses: ‘GFLOW Null Model’, distance-to-habitat alone, bathymetry alone, and the best model: distance-to-habitat and bathymetry combined, without including seamounts in the distance-to-habitat layer; (ii) the associated GFLOW maps of the sum of current flowing between every pair of locations for the given resistance map; (iii) the subsequent linear relationship between pairwise resistance distances obtained with GFLOW and linearized F_{ST} for every pair of locations. R^2 is indicated for each hypothesis (MRM).

At the entire distribution range of the species, 981 simulated locations separated by 100 km were randomly selected. The GFLOW run produced a matrix of 480,690 pairwise resistance distances. A total of 38 units (≥ 2 locations) were delineated at the entire distribution scale of the species with a threshold value of $F_{ST} = 0.025$ (Figure S3), along with 74 isolated locations (Figure 48A). The widest unit was comprised of reefs and oceanic islands of the eastern part of the Indo-Australian plate and encompasses reefs from the Solomon and Bismarck plates, along with reefs from New Caledonia and Vanuatu. Interestingly, Matthew and Hunter were grouped with the Fijian plate as a distinct unit. It also comprises the southeastern part of the Eurasian plate, with the western frontier of the unit delineated by the Java Trench. The Red Sea and the Oman Sea/Persian Gulf were identified as distinct units, while Madagascar, Comores, and Glorieuses Islands in the Mozambique Channel were part of a single unit with the eastern coast of Africa. The Mascarene Archipelago (Maurice, Reunion and Rodrigues Islands) were part of the same unit, distinct from the Seychelles. A unit on the Indian plate was formed of surrounding reefs in India and Sri Lanka, the Laccadive Islands and the Maldives, and included the Chagos Archipelago on the Indo-Australian plate. Lastly, except from some wide units comprised of archipelagos like for instance the western part of Micronesia, or the Tuamotu archipelago in French Polynesia which formed single units, reefs and oceanic islands from the Pacific plate were much fragmented, with the largest proportion of small units and completely isolated patches of habitat.

At a smaller scale, *i.e.* the scale of our sampling extent, a total of 898 simulated locations separated by 50 km were randomly selected. The best resistance map obtained through the previously detailed optimization framework, used as input for GFLOW on the 898 sites gave a matrix of 402,753 pairwise resistance distances between all sites. A total of 19 units (≥ 2 locations) were delineated with a threshold value of $F_{ST} = 0.01$ (Figure S4), along with 26 isolated locations (Figure 48B). At this lower cut value of F_{ST} , the single unit comprising mostly reefs from the Indo-Australian plate was fragmented into several conservation units. Noticeable ones in terms of conservation comprised a western Australian unit, including the Rowley Shoals. Indonesia and northwestern Australia were grouped into a single unit, joined together by Scott Reef and Ashmore and Cartier Islands, except for reefs offshore Sumatra which were identified as a distinct unit. The GBR, along with reefs from the Coral Sea, was connected to Papua New Guinea and Solomon Islands, and interestingly, to the Chesterfield Reefs, belonging to New Caledonia. The rest of the New Caledonian archipelago was formed of a single unit, except from Matthew and Hunter Islands on the far east side. At the east, Vanuatu was separated from New Caledonia by the New Hebrides Trench. Numerous isolated reefs

and oceanic islands were identified. Among them, Cocos (Keeling) and Christmas Islands in the Indian ocean; reefs in the Banda Sea (southeast Asia), Nauru, Tuvalu, and many islands of Kiribati and the Pacific.

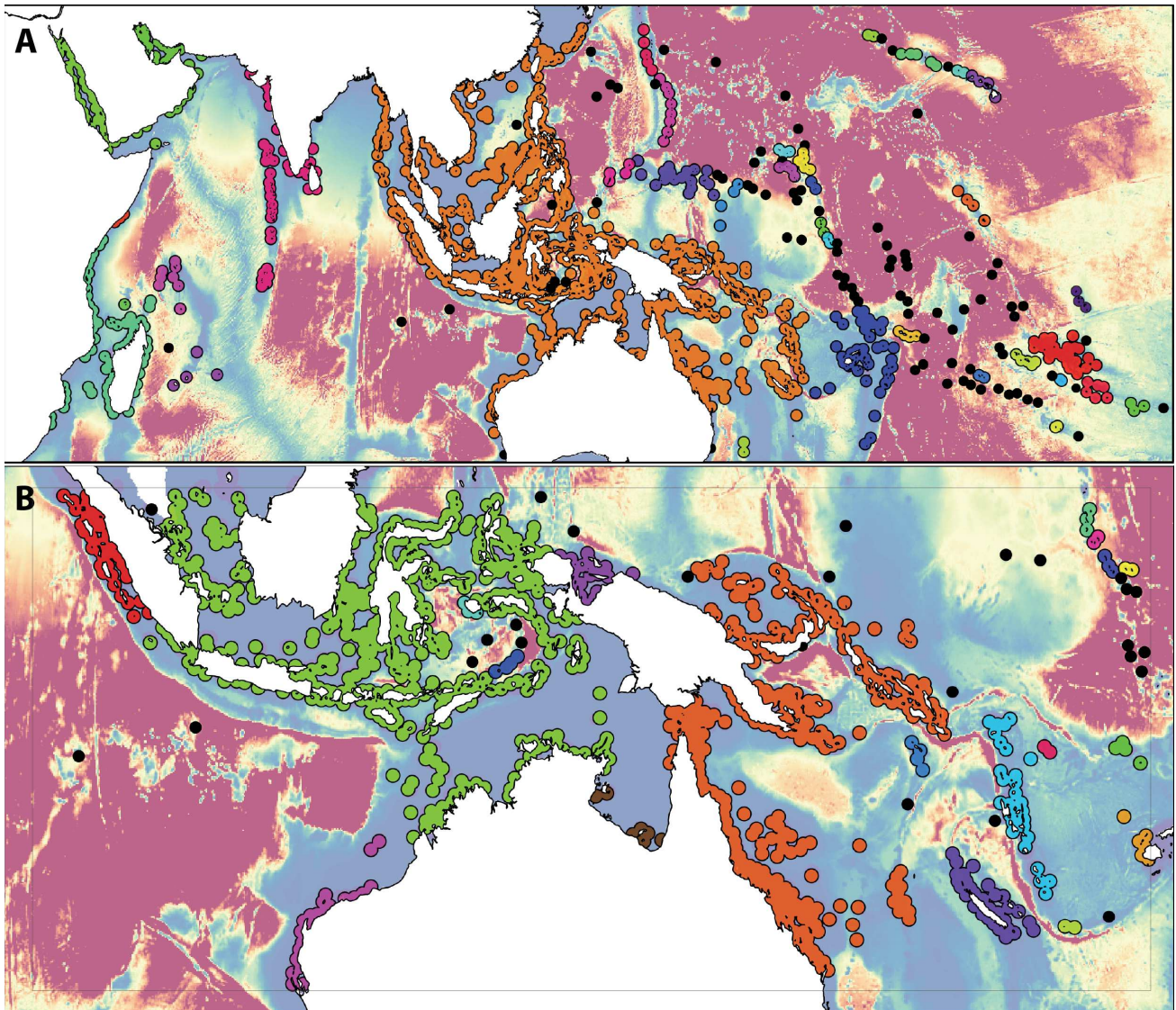


Figure 48. Resistance maps showing the delineation of putative conservation units, and buffers of radius equal to (A) 100 km at the scale of the whole distribution range of *C. amblyrhynchos* with a cut value of $F_{ST}=0.025$ and (B) 50 km at the scale of our sampling extent and a cut value of $F_{ST}=0.01$. Isolated units comprised of a single location are shown in black with a smaller radius. The grey rectangle on (B) corresponds to the extent on which locations were simulated. Color scale in the background corresponds to resistance values in Figure S2.

5.5. Discussion

This study is the first to date linking fine-scale seascape and genetic connectivity at the entire range of a species, and without *a priori* testing of hypotheses. It represents a major step forward for a near-threatened and mobile species such as the grey reef shark. We also provide in this study an analytical framework with a custom pipeline that can be applied to a variety of different species and ecosystems, allowing the delineation of hierarchical conservation units for more targeted protection measures. Our study is the first step towards next-generation conservation, with unprecedented data on a common species at its entire distribution range. Applying this methodology for multiple species would provide high resolution and highly efficient protection, for the implementation of MPA networks of improved effectiveness (Momigliano et al., 2015a).

First, it is important to notice that the simulated locations randomly obtained to calculate pairwise F_{ST} and delineate units are putative. Consequently, probabilities of occurrence might be weak in such locations, rendering F_{ST} less valid as a delineator of conservation units at these locations.

Isolation-by-distance explains only sporadically the genetic structure of grey reef sharks. Although the relationship presents a relatively high correlation coefficient, the explanatory power of this hypothesis is low compared to models including IBR and CT. The underlying hypothesis of IBD is based on the assumption that sharks have knowledge of a direct way between sampling locations (Least Cost Path; LCP), and more importantly, that they disperse through a homogeneous seascape. The hypothesis of a homogeneous seascape is ecologically not supported, especially for species such as *C. amblyrhynchos* which are highly associated to coral reefs and rarely observed far in pelagic waters (White et al., 2017b). Moreover, LCP models are often biased for many organisms (McRae and Beier, 2007), and there is no support in the literature showing that *C. amblyrhynchos* use direct pathways to migrate between locations.

We show that the best model explaining the genetic differentiation of grey reef sharks in our study area is one supported by CT and with a very low resistance associated to waters at less than 50 km from any favorable habitat (coral reefs and small oceanic islands), but with very high resistance associated with deep oceanic waters, acting as barriers to dispersal. Although the majority of grey reef sharks have been found to be highly resident, some individuals are known to travel large distances through pelagic waters (Espinoza et al., 2014b; White et al., 2017b). Altogether, our study is in accordance with these previous studies to highlight the fact that large MPAs could be efficient for a

substantive proportion of individuals, but a small number of sharks might disperse preferentially using continuous habitat patches as travel routes, and would hardly ever cross high resistance barriers, *i.e.* deep water.

These results, based on genetic clues, prove that at a time scale of several generations, a small number of sharks dispersing genes via migration may have a significant impact on the global scale genetic structure of the species, and consequently in maintaining genetic diversity among and between conservation units. However, the genetic structure currently observed, especially when measured with estimators like F_{ST} , might be the result of historical connectivity more than contemporary (Epps and Keyghobadi, 2015; Selkoe et al., 2016), and the maintenance of genetic diversity might be now jeopardized by the massive population depletions that sharks are currently experiencing. Additional data are needed to further investigate current migration rates, and contemporary migrations, such as parentage/sibship and telemetry analyses.

Expanding modelling wider than the sampling extent can somehow be problematic, and we call for extensive sampling at a wider scale to validate the explanatory models outside our sampling locations, or to identify the differences in other regions. The patchiness observed (fragmentation) in the Central Pacific might have to be verified as models were optimized without the presence of locations from the Central Pacific in our sampling. However, studies are yet to demonstrate that sharks from the Central Pacific have a distinct migratory behavior than sharks from the Indo-West-Pacific.

Protecting threatened species requires solid knowledge of how many populations share the surrounding landscape, and of what are the relationships between them. While the concept of ‘populations’ is used to efficiently guide management policy for the conservation of species under pressure, it is declined in multiple definitions (Waples and Gaggiotti, 2006). The study of populations and relationships between them is often approached by the delineation of Conservation Units (CUs) (Funk et al., 2012). There are also various definitions of CUs in the scientific literature, with a major distinction between Evolutionary Significant Units (ESUs) and Management Units (MUs), but a consensus is reached on the fact that identifying CUs is a crucial first step for the conservation of natural populations (Barbosa et al., 2018; Funk et al., 2012). It is also recognized that CUs are often hierarchical, with units of wider scale comprised of multiple smaller units (Barbosa et al., 2018; Funk et al., 2012; Weckworth et al., 2018). A parallel could be drawn in our study between the defined CUs at both large and more local scales with ESUs and MUs, but it should be viewed with caution because

these CUs were delineated only by the study of genetic differentiation (F_{ST}). The investigation of local genetic and demographic additional clues (*i.e.* genetic diversity, N_e , relative abundance) might help implement more targeted management measures (Domingues et al., 2017).

One of the important aspects of our results is that the defined CUs, even at local scale, can be comprised of multiple countries' Exclusive Economic Zones (EEZs), suggesting that spatial marine planning would benefit from the support of international efforts. More importantly, slowing down the decline of natural populations of mobile species like sharks requires not only scientific collaborations, but also cooperation from managers and policy-makers from multiple nations, to define, if not bigger, more efficient MPAs.

Lastly, we call for the use of this framework on multiple species and for the integration of population connectivity in the field of spatial marine planning, along with ecological data, abundance and habitat use.

5.6. Supplementary Material

Table S1. Pairwise measures of genetic differentiation (Weir and Cockerham F_{ST}) between all the sampling locations.

	Cocos	Ningaloo Reef	Rowley Shoals	Scott Reef	Indonesia	Northern GBR	Southern GBR	Coral Sea	Chesterfield Reefs	Entrecasteaux	Great Northern Lagoon (GLN)	Grand Astrolabe	Petit Astrolabe	South NC	Walpole
Ningaloo Reef	0.067														
Rowley Shoals	0.068	0.0021													
Scott Reef	0.064	0.0025	0.0016												
Indonesia	0.068	0.0055	0.0054	0.0039											
Northern GBR	0.073	0.0143	0.0141	0.0125	0.0080										
Southern GBR	0.079	0.0200	0.0183	0.0175	0.0126	0.0048									
Coral Sea	0.077	0.0169	0.0159	0.0144	0.0097	0.0031	0.0032								
Chesterfield Reefs	0.081	0.0193	0.0189	0.0175	0.0128	0.0064	0.0039	0.0035							
Entrecasteaux	0.081	0.0215	0.0204	0.0196	0.0135	0.0082	0.0078	0.0085	0.0048						
GLN	0.080	0.0205	0.0202	0.0189	0.0131	0.0070	0.0074	0.0080	0.0043	0.0010					
Grand Astrolabe	0.081	0.0215	0.0210	0.0197	0.0138	0.0088	0.0090	0.0090	0.0066	0.0026	0.0020				
Petit Astrolabe	0.082	0.0216	0.0212	0.0199	0.0144	0.0088	0.0080	0.0081	0.0057	0.0015	0.0015	0.0010			
South NC	0.080	0.0200	0.0203	0.0189	0.0138	0.0080	0.0077	0.0077	0.0051	0.0019	0.0012	0.0025	0.0018		
Walpole	0.082	0.0229	0.0214	0.0207	0.0152	0.0115	0.0118	0.0098	0.0084	0.0051	0.0046	0.0049	0.0039	0.0052	
Matthew	0.097	0.0355	0.0341	0.0317	0.0265	0.0223	0.0233	0.0213	0.0195	0.0158	0.0153	0.0155	0.0145	0.0160	0.0128

Figure S1. Conceptual framework of the parametrization steps used for the creation of resistance surfaces. (A) Relationship shapes tested between explanatory factors and resistance. Exponential, logarithmic and linear relationships were tested, with different parameter values. Bathymetry is shown as an example, but the same relationship shapes were tested with distance-to-habitat. (B) Framework showing the combination of parameters with one example of an exponential relationship between bathymetry and resistance, with a ceiling at 4000 meters, a logarithmic relationship between distance-to-habitat and resistance, and a maximum resistance value associated with bathymetry superior to the one associated with distance-to-habitat ($R_{\max B} > R_{\max D}$).

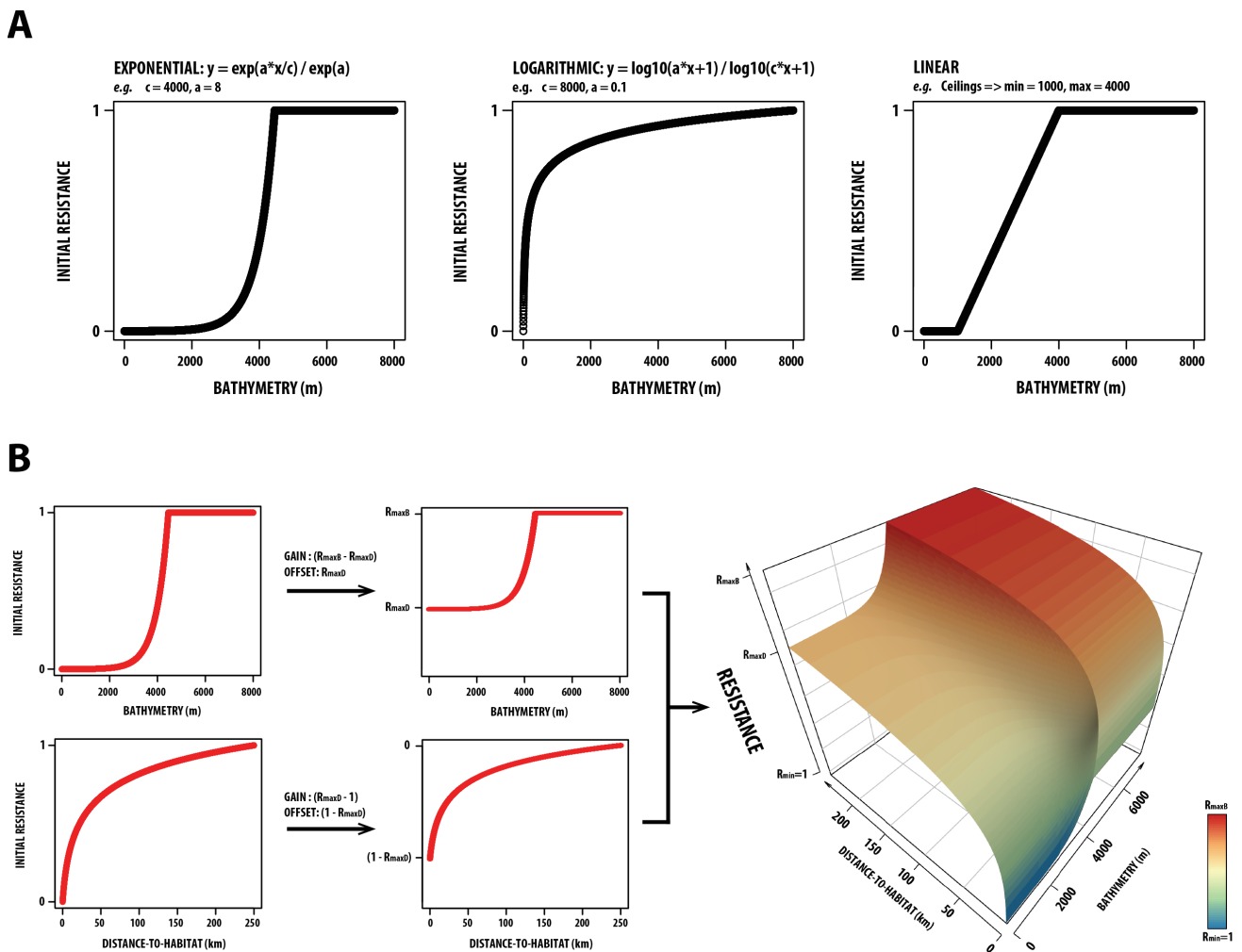


Figure S2. Relationship obtained after model optimization between resistance values (z-axis) and a combination of bathymetry and distance-to-habitat (x- and y-axes). Minimum and maximum resistance value are 1 and 1000. Resistance attains 50 at locations at more than 50 km from any suitable habitat, and quickly attains high values in deep waters.

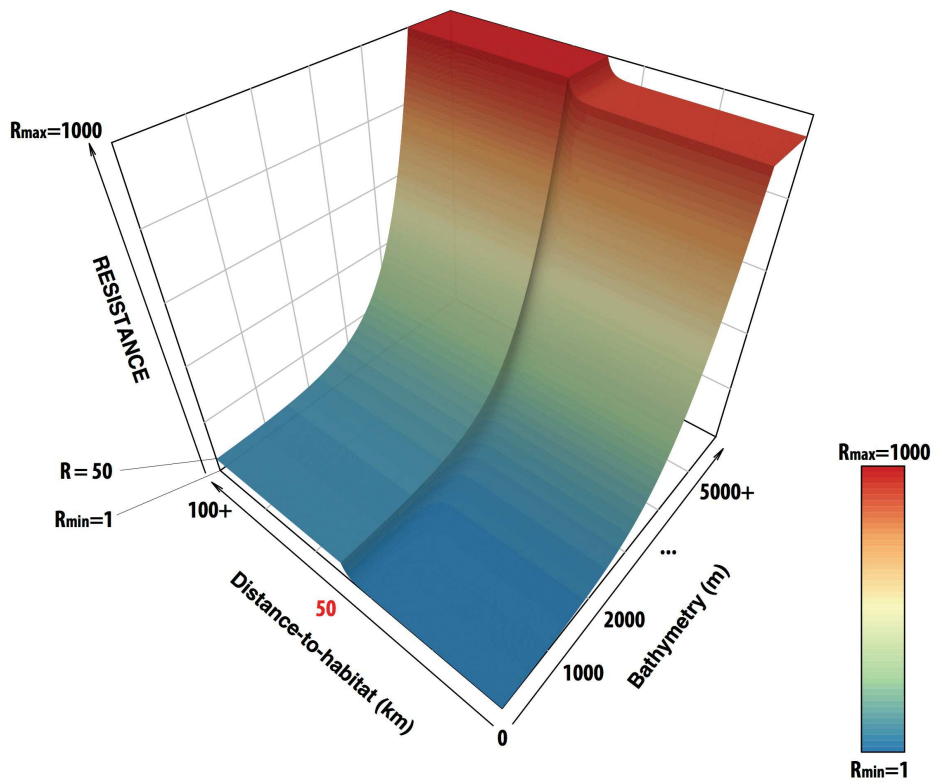


Figure S3. (A) Hierarchical classification of the 981 simulated locations separated by 100 km, using the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA). In red, a cut example at $F_{ST} = 0.025$, delineating the putative conservation units. (B) Resistance map showing the delineation of putative conservation units with matching colors, and buffers of radius equal to 100 km. Isolated units comprised of a single location are shown in black with a smaller radius. Color scale in the background corresponds to resistance values in Figure S2.

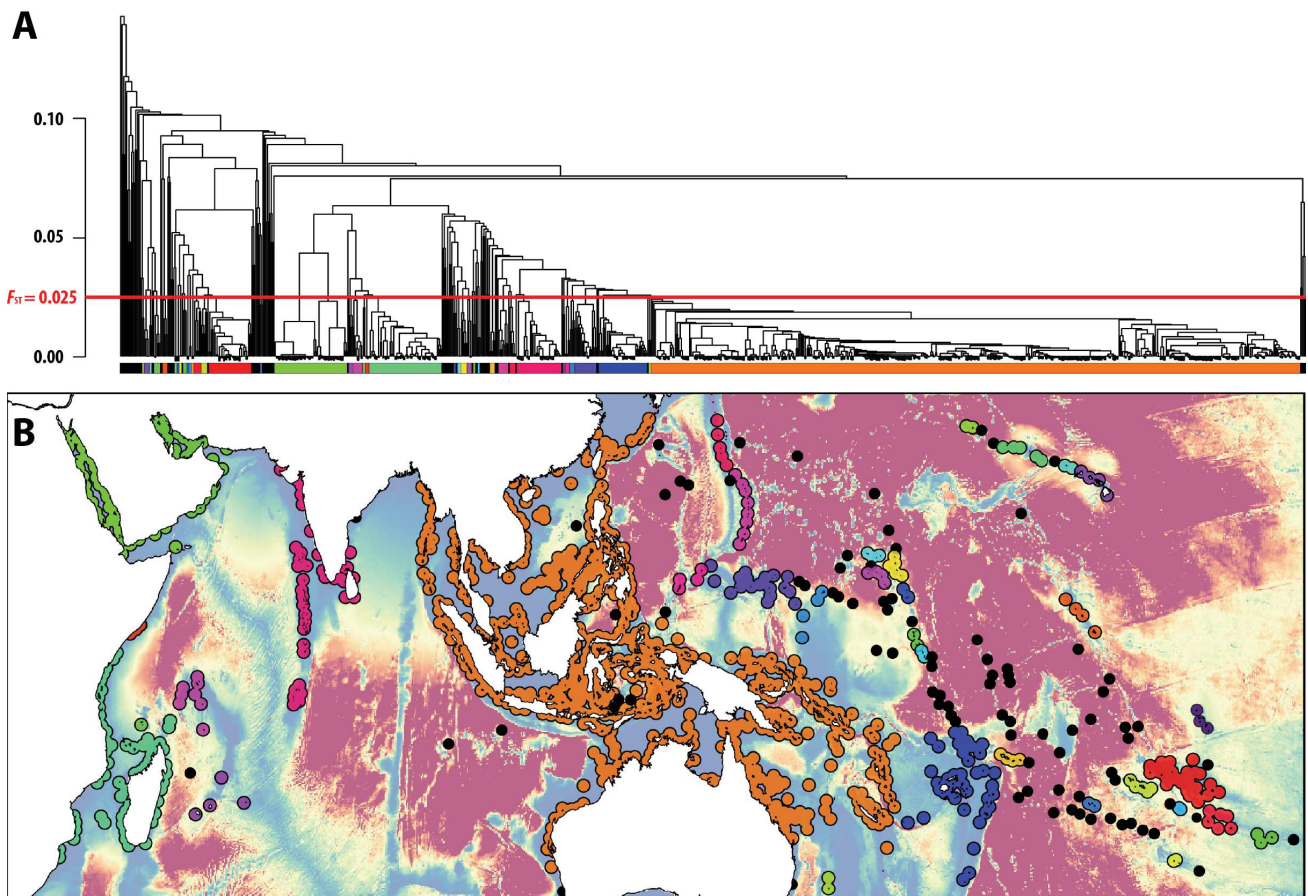
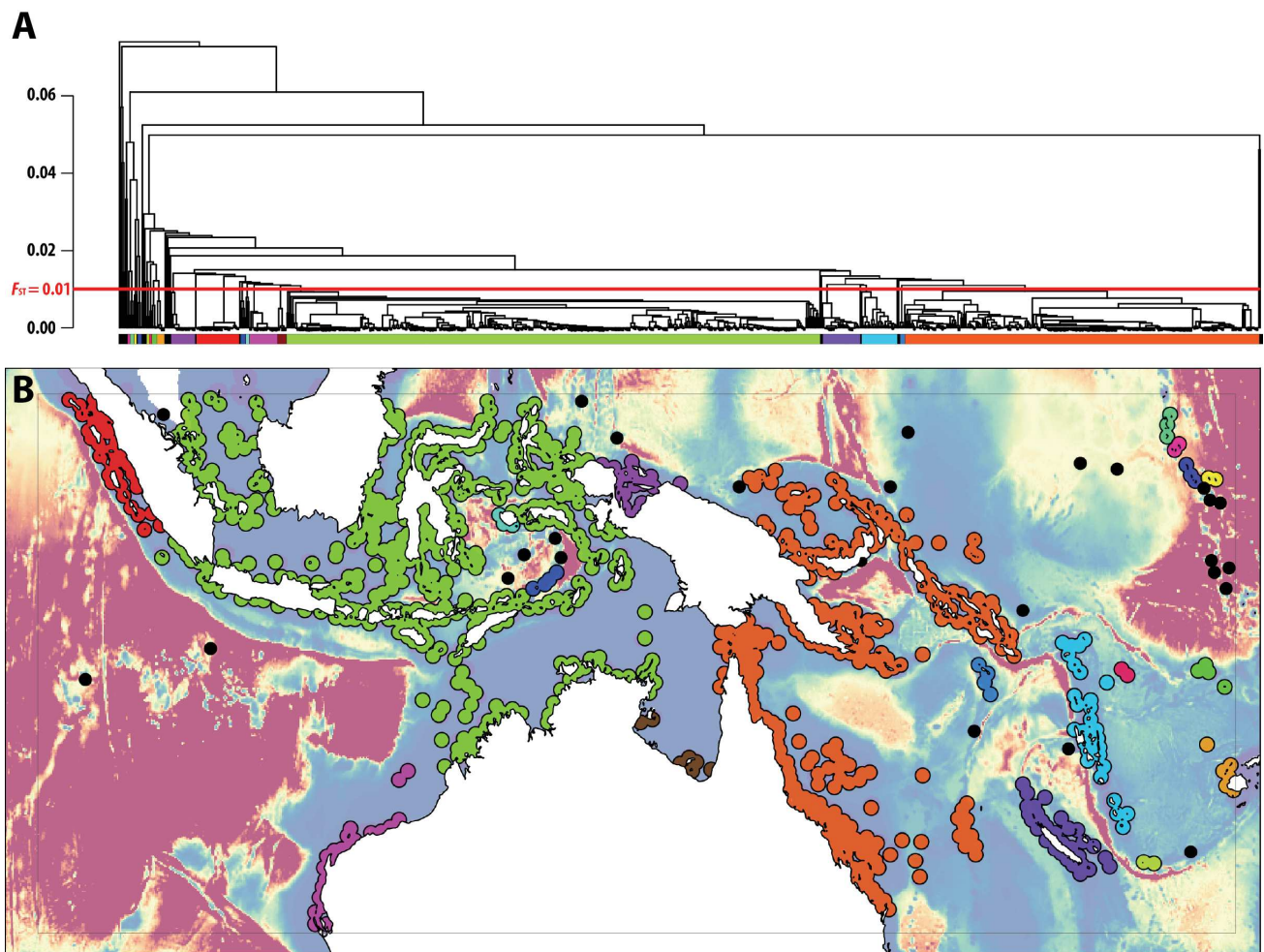


Figure S4. (A) Hierarchical classification of the 898 simulated locations separated by 50 km, using the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA). In red, a cut example at $F_{ST} = 0.01$, delineating the putative conservation units. (B) Resistance map showing the delineation of putative conservation units with matching colors, and buffers of radius equal to 50 km. Isolated units comprised of a single location are shown in black with a smaller radius. The grey rectangle corresponds to the extent on which locations were simulated. Color scale in the background corresponds to resistance values in Figure S2.



CONNECTIVITÉ DES RÉCIFS ÉLOIGNÉS ET IMPLICATIONS POUR LA CONSERVATION DU REQUIN GRIS DE RÉCIF

1. INTRODUCTION

Les zones naturelles éloignées de la présence humaine présentent des niveaux de biodiversité, d'abondance et de biomasse sans égal sur la planète (D'Agata et al., 2016; Graham and McClanahan, 2013; Juhel et al., 2017; Mittermeier et al., 2003). Ces zones où l'empreinte de l'homme est relativement peu visible (Halpern et al., 2008) jouent le rôle de refuge pour de nombreuses espèces (Watson et al., 2016), notamment pour les plus vulnérables ou menacées (Ripple et al., 2014). Elles abritent aussi des populations présentant des niveaux de diversité génétique élevés (Pinsky and Palumbi, 2014) et des capacités importantes de résilience aux pressions anthropiques (incluant le réchauffement climatique ; Houghton et al., 2015; Martin and Watson, 2016). Dans le milieu marin, les récifs coralliens éloignés présentent des fonctions écologiques, des abondances et des biomasses en poissons et prédateurs uniques (D'Agata et al., 2016; Graham and McClanahan, 2013; Juhel et al., 2017).

Malgré l'importance de ces zones éloignées, elles ne sont pas classées comme zones de conservation prioritaires dans les accords environnementaux (Kormos et al., 2016; Watson et al., 2016). Seule une petite proportion de ces zones est légalement protégée (Graham and McClanahan, 2013; Jones et al., 2018), car elles sont supposées de facto naturellement et économiquement protégées contre les menaces humaines de par leur isolement. Ce n'est plus le cas aujourd'hui pour les récifs éloignés car l'éloignement n'est plus un frein à l'exploitation des ressources naturelles marines (Boerder et al., 2018; Kroodsmas et al., 2018; Sala et al., 2018; Watson et al., 2015).

Les récifs éloignés de l'homme sont alors de plus en plus menacés, et définir des plans de gestions adéquats est donc une priorité pour les gestionnaires. En revanche, peu d'informations sont disponibles sur la dispersion des prédateurs mobiles tels que les requins (Momigliano et al., 2015a).

Le chapitre précédent a permis de montrer que la dispersion des requins de récif (*Carcharhinus amblyrhynchos*) était déterminée par des variables biogéographiques, avec des barrières à la dispersion créées par les zones de forte bathymétrie, tandis que les récifs coralliens continus permettent de faciliter cette dispersion. Des unités de conservation à différentes échelles ont été définies en fonction des problématiques de gestion. En revanche, peu d'informations ont été tirées sur le rôle des récifs éloignés pour cette espèce, la plus commune des pentes externes des récifs coralliens de l'Indo-Pacifique.

Comprendre le rôle de ces récifs éloignés pour cette espèce est alors crucial car cela permet d'acquérir des informations directement utilisables par les gestionnaires en termes de planification spatiale, pour la mise en protection des zones les plus importantes et/ou les plus vulnérables. En effet, ces récifs pourraient être des refuges isolés, alors peu résilients aux pressions directes de pêche ayant des conséquences rapides en termes de démographie. Au contraire, ces récifs pourraient jouer un rôle de source et les populations pourraient alors disperser depuis ces récifs pour réensemencer les populations proches des zones impactées, ayant subi des pressions anthropiques fortes et des chutes démographiques importantes. Planifier les routes préférentielles entre ces récifs sources et les récifs impactés pourrait alors permettre de mieux optimiser la protection de cette espèce.

Ce chapitre se penche donc sur les questions suivantes, énoncées dans l'introduction générale de ce manuscrit :

- (E) Quelle est la connectivité des récifs éloignés avec le reste des récifs et donc quelle est leur place en termes de conservation pour *Carcharhinus amblyrhynchos* ? Sont-ils des refuges isolés pour les dernières populations de requins en bonne santé ou également des sources pour les zones impactées ?

Il visera ainsi à explorer la place des récifs éloignés pour les espèces mobiles telles que *Carcharhinus amblyrhynchos* (Article 4) afin d'en tirer des informations aidant dans le futur les gestionnaires à optimiser les mesures de conservation.

2. ARTICLE 4 – Distribution of sources, sinks and refuges for the grey reef shark: implications for the conservation of fragmented populations

Résumé en français : Les populations naturelles sont aujourd’hui menacées par les activités humaines sur l’ensemble de la planète. Ces activités conduisent à un déclin drastique et global des abondances pour une vaste majorité de la mégafaune. Les zones éloignées, où l’empreinte de l’homme reste faible, sont les derniers refuges pour ces espèces. C’est particulièrement le cas pour les requins de récif, pour lesquels les mesures de protection ne sont pas toujours efficaces, notamment lorsque les habitats coralliens sont proches de l’homme. Dans ce cas, les récifs éloignés peuvent être des sources pour les zones anthropisées via la dispersion, et peuvent assurer la persistance des populations à l’échelle régionale. Cependant, cette connectivité des récifs éloignés pour de telles espèces mobiles est toujours méconnue. Le défi est donc de déterminer si les zones éloignées sont seulement des refuges ou également des sources pour le repeuplement des populations de requins dans les zones impactées. Dans cette étude, nous avons évalué le degré de connectivité des récifs éloignés pour une espèce de requin de récif quasi-menacée, *Carcharhinus amblyrhynchos*, par une approche de génomique du paysage complétée par des patrons d’abondance relative basés sur le temps de trajet aux populations humaines et aux marchés comme indicateur d’éloignement. Nous montrons une fragmentation globale des populations avec de faibles niveaux de flux de gènes contemporains entre les populations, menant à un nombre moins important d’individus migrants, et donc à une plus faible résilience aux pressions anthropiques. Nous identifions également les zones éloignées importantes pour *C. amblyrhynchos*, étant des sources potentielles et/ou des carrefours de dispersion permettant la persistance des populations, ce qui donne des informations pour une future planification spatiale de réseaux d’aires marines protégées et de corridors de protection efficaces. Enfin, nous soulignons la présence de récifs éloignés identifiés dans cette étude comme clés pour la connectivité de cette espèce, mais toujours ciblés par des activités industrielles de pêche au requin.

2.1. Abstract

Human activities threaten natural populations worldwide, leading to global and drastic declines in abundance for most of the megafaunal species. Wilderness areas, where the human footprint remains low, are the last refuges on Earth. This is particularly the case for reef sharks, for which protection measures are not always efficient when reef habitats are close to humans. In this case, wilderness areas can be sources through dispersal towards impacted areas and thus insure population persistence at a regional scale. However, this connectivity for such mobile species is still poorly known. The challenge is thus to determine whether wilderness areas are just refuges or also sources for the replenishment of shark populations in impacted areas. In this study we assessed the degree of connectivity of wilderness coral reefs for a near-threatened reef shark species, *Carcharhinus amblyrhynchos*, by using a seascape genomics approach complemented with patterns of relative abundance based on travel time from nearest populations or markets as an indicator of wilderness. We show a global population fragmentation with low levels of contemporary gene flow between populations associated with current declines, leading to lower number of migrants and as such, lower resilience to anthropogenic pressures. We also identify which wilderness areas are key for *C. amblyrhynchos*, being potential sources and/or at the crossroads of dispersal hotspots for metapopulation persistence, therefore providing information for future spatial design of more efficient MPA networks and corridors of protection. Finally, we highlight that some remote reefs identified as key to insure connectivity patterns are still heavily targeted by shark fishing industries.

2.2. Introduction

Despite countless warnings of scientists worldwide, the planet is currently undergoing the sixth mass extinction crisis at an unprecedented rate (Butchart et al., 2010; Dirzo et al., 2014), with dramatic consequences for both natural and human populations (Haddad et al., 2015; Myers et al., 2000; Young et al., 2016). Not only species are disappearing at a fast rate, but a large number of species show dramatical decreases in abundance and distribution range contractions, driving more species on the brink of extinction (Dirzo et al., 2014; WWF, 2018; Young et al., 2016).

Wilderness areas, *i.e.* wide areas biologically and ecologically free of most human perturbations, now remain the last refugia on Earth (Watson et al., 2016), where the human footprint has not yet or only slightly altered ecosystem functioning (Halpern et al., 2008). These places are very rare on Earth and provide high biodiversity, abundance and biomass levels with virtually unaltered ecosystem functioning (D'Agata et al., 2016; Graham and McClanahan, 2013; Juhel et al., 2017; Mittermeier et al., 2003). Ecologically priceless, wilderness areas constitute thriving ecosystems for endangered species (Ripple et al., 2014), provide areas of high genetic diversity (Pinsky and Palumbi, 2014), unique resilience capabilities and defense against anthropogenic threats, including climate change (Houghton et al., 2015; Martin and Watson, 2016). In the marine realm, wilderness reefs also support a variety of ecological functions and wildlife biomass probably close to pre-human baselines (D'Agata et al., 2016; Graham and McClanahan, 2013; Juhel et al., 2017). Densities of sharks in wilderness reefs are 10 times higher than in areas in close proximity to human populations (Juhel et al., 2017; Robbins et al., 2006a). However, how connected such reefs are in terms of dispersion remains unknown for many reef-associated species (Chapman et al., 2015).

More particularly, the connectivity of such areas is unknown for most of the megafauna, and information must be gathered to determine if wilderness areas are more likely to be sources or refuges. This question has important implications in conservation since refuges are isolated, thus vulnerable to threats (*e.g.* overfishing), compared to sources that are connected to surrounding areas and could provide migrants for depleted populations (Lowe and Allendorf, 2010). The maintenance of genetic connectivity enhances resilience to demographic bottlenecks by allowing both direct recovery by migration and recovery of genetic diversity (Jangjoo et al., 2016).

Classifying marine wilderness areas into either refuges and sources or just the former is thus a key step for the effective conservation of species of interest. Such information could be easily

converted into direct conservation measures, such as the implementation of networks of Marine Protected Areas (MPAs) (D'Aloia et al., 2017; Daly et al., 2018), giant MPAs (Pala, 2013), and potentially corridors of protection, if relevant, between sources and depleted populations (Barbosa et al., 2018; LaPoint et al., 2013). This is crucial in the context of growing worldwide legal (Sala et al., 2018) or illegal, unreported and unregulated (IUU) fishing pressures in some areas (Bradley et al., 2018; Cabral et al., 2018), drastically reducing the number of individuals in natural populations (Field et al., 2009).

While such information on connectivity of marine wilderness areas can be assessed for many organisms, especially larval dispersers (Cowen and Sponaugle, 2009), it is mostly unknown and its investigation is a challenge for adult disperser species such as sharks (Momigliano et al., 2015a). Biophysical models of connectivity, coupled with information on pelagic larval duration, mainly explain dispersal and genetic structure of fishes and invertebrates (*e.g.* Cowen and Sponaugle, 2009; Raitzos et al., 2017; Truelove et al., 2017). However, organisms that lack larval dispersal may be more likely influenced by habitat and biogeographic features. Boussarie et al. (*in prep.*) showed that seascape features explained well the genetic structure of populations in a common yet near-threatened shark species inhabiting coral reef ecosystems (*Carcharhinus amblyrhynchos*). In this previous study, both facilitator factors for migration (proximity to habitat) and barriers to dispersal (deep oceanic waters) were identified. The authors then suggested a hierarchical delineation of conservation units, at both local scale and at the entire distribution range of the species. However, the potential importance of wilderness reefs has not been thoroughly discussed in light of these results. The observed genetic structure highlighted in Boussarie et al. (*in prep.*) may represent the past (yet recent) population structure, before the contemporary events of strong anthropogenic pressures. The fact that populations have recently suffered drastic declines and therefore are not homogeneously distributed among reefs has not been taken into account in this previous study. Shark populations declined in many coral reefs by more than 90% abundance (Juhel et al., 2017; Robbins et al., 2006a), potentially resulting in subsequent drastic loss of migrants between reefs, therefore jeopardizing the genetic diversity and connectivity between and among conservation units in the near future. Understanding the capacity of current shark populations to connect through dispersal and thus allow metapopulation persistence, by also including abundance patterns, is critical for the future design of protected areas networks (Jacobi and Jonsson, 2011).

In this current study, we aim at characterizing the degree of connectivity of wilderness coral reefs, by using a seascape genomics approach complemented with patterns of relative abundance. Indeed, based on an isolation-by-resistance (IBR) framework (McRae, 2006), combining circuit theory (CT ; Leonard et al., 2017; McRae and Beier, 2007), accumulation cost surfaces (ACSs), and by including relative abundance patterns based on travel time from nearest populations or markets as an indicator of wilderness (Cinner et al., 2018; Maire et al., 2016), we provide solid information regarding the importance of wilderness reefs for an adult disperser species, the grey reef shark (*Carcharhinus amblyrhynchos*).

2.3. Materials and Methods

This article is based on the analysis of genetic data previously described and published by Boussarie *et al.* (in prep.), encompassing genetic samples from a wide range of locations across the Indo-Pacific. In this latter article, a model linking the genetic differentiation of *Carcharhinus amblyrhynchos* and its surrounding environment was established, and a resulting resistance map was obtained with a combination of bathymetry and distance-to-habitat. This resistance map has a resolution of 10 km and is shown Figure 49.

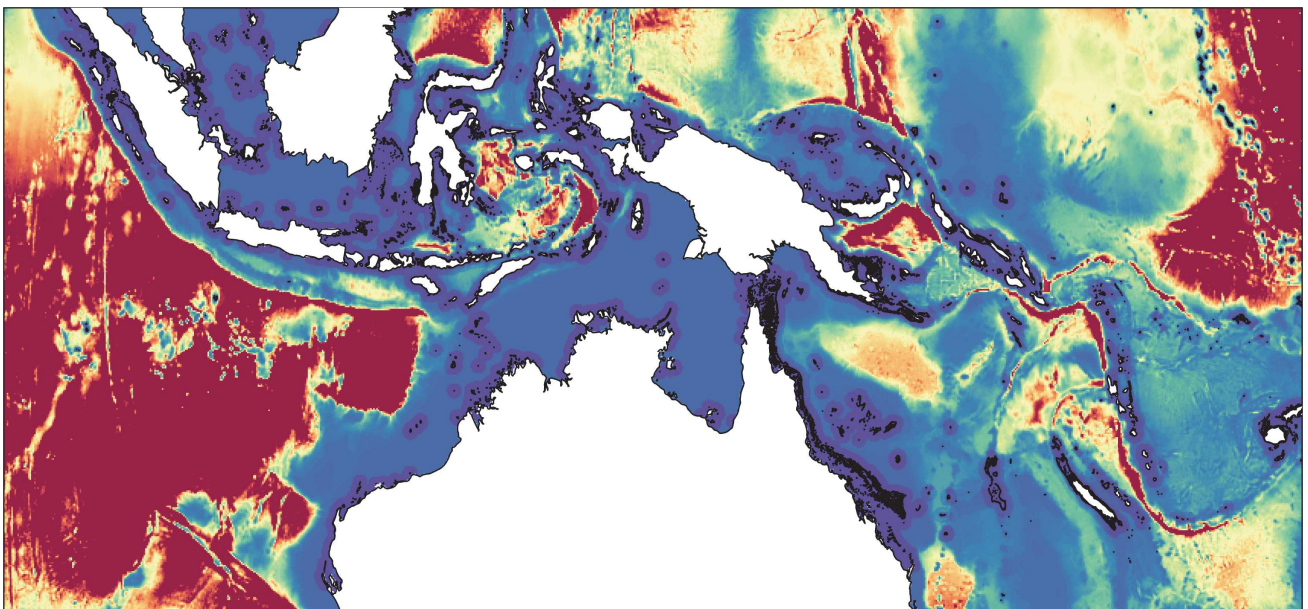


Figure 49. Resistance map obtained through an optimization framework of pairwise resistance distances calculated with circuit theory and combined with genetic distances. Red areas correspond to areas with high resistance values, associated to high bathymetry which constitutes a barrier to gene flow. Blue areas represent areas of facilitated gene flow, associated with low distances to habitat (coral reefs and small oceanic islands). After Boussarie *et al.* (in prep).

Following the methods described in Boussarie *et al.* (in prep), sites in suitable habitat separated by 50 km were randomly selected using a custom Python script based on Matérn process (Kiderlen and Hörig, 2013). Suitable habitat was defined as either coral reefs (data.unep-wcmc.org, (Spalding et al., 2001)) or oceanic islands/volcanoes above 280 m depth (earthworks.stanford.edu/catalog/harvard-glb-volc; 280 m corresponding to the reported depth range for *Carcharhinus amblyrhynchos* (Last and Stevens, 2009)). For each of these sites, an individual accumulation cost surface (ACS) was drawn using a custom Python script, each pixel being characterized by the value of the least-cost-path (LCP) between the site and this pixel.

Travel time from each site to the nearest human population and to the nearest major market were calculated following the methods described in Maire et al. (2016). We then applied a weight at a threshold of different travel times, by applying a decrease in abundance representing shark declines close to human populations or close to major markets (Cinner et al., 2018; Juhel et al., 2017; Maire et al., 2016). We then transformed and summed all the individual ACSs corresponding to the sites, weighted by this relative abundance modification. A weighted sum of transformed accumulation cost surfaces (WACS) was thus obtained for different scenarios: (i) homogeneous abundances across the whole extent of the study, attributing the same weight for each site, (ii) one scenario considering a 90% decrease in shark abundances when sites are closer to 10 hours of travel time to the nearest human populations, and (iii) a theoretical 100% decrease in shark abundances except in wilderness reefs, realistic for some places where sharks have been extirpated (Chabanet et al., 2012).

Pairwise current density maps were then calculated for all pairs of sites using GFLOW (Leonard et al., 2017), an optimized version of Circuitscape (Shah and McRae, 2008) allowing massive parallelization of the computation of circuit theory. All the pairwise current density maps were then summed in a single map to visualize the global connectivity of the area for *C. amblyrhynchos*.

2.4. Results and Discussion

The random sites selected were the same as in Boussarie *et al.* (in prep.). As a result, 898 sites were selected along with the same number of individual accumulation cost surfaces (ACSs).

The global weighted sums of transformed accumulation cost surfaces (WACSs, Figure 50) shows that compared to what could be a historical reference state of connectivity for shark populations (Figure 50A), the drastic decline that sharks are experiencing worldwide have a direct incidence on connectivity, with a global fragmentation of populations at the scale of our geographic extent, with less gene flow between populations (Figure 50B). When taking into account this global decline of

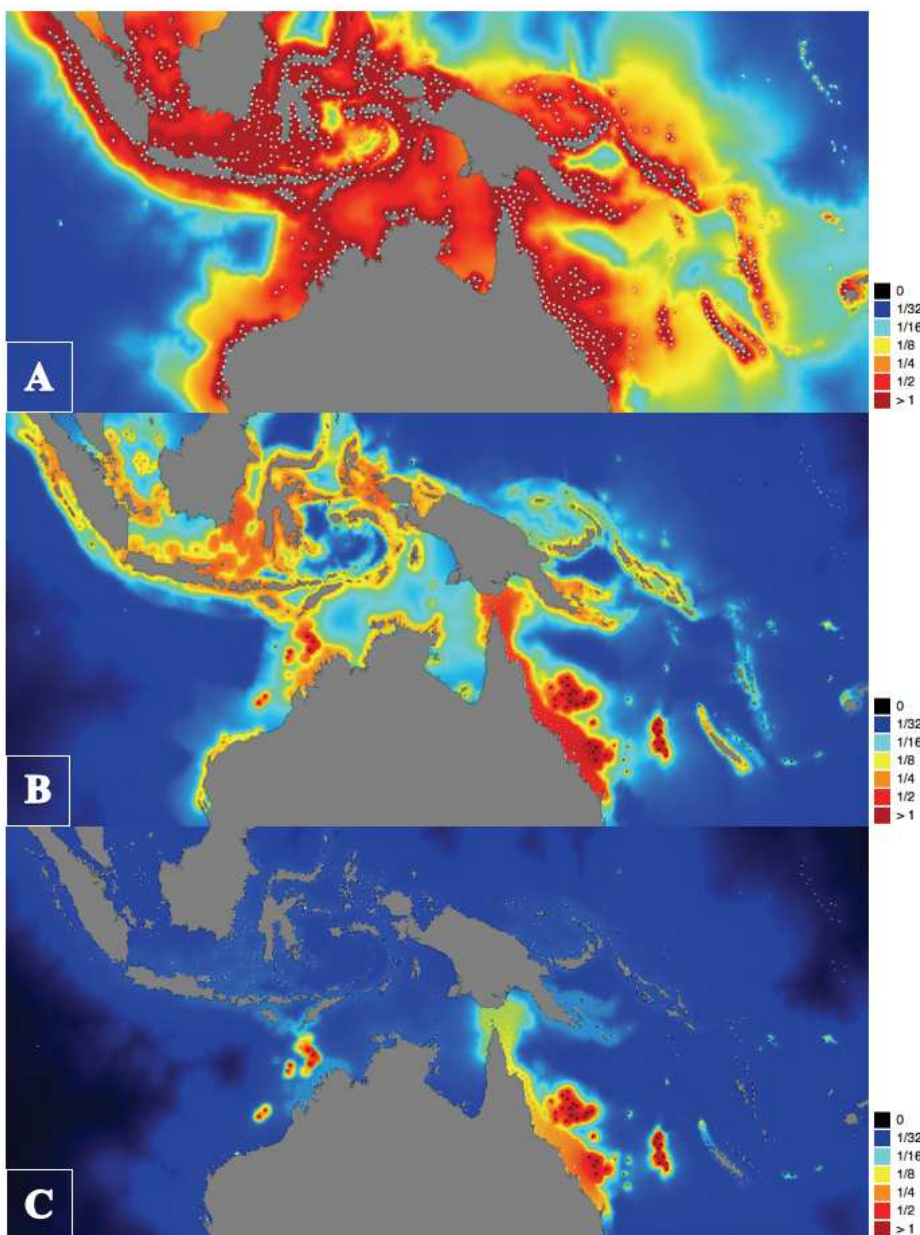


Figure 50. Weighted sums of accumulated cost surfaces (WACS) showing the global fragmentation of connectivity for *C. amblyrhynchos* populations and the place of potential wilderness reefs in this connectivity.

White dots correspond to the selected sites, and black dots correspond to wilderness reefs, that are a travel time of more than 10 hours from any human population.

(A) WACS with all the individual ACS at the same weight, under the hypothesis of homogeneous shark abundances across all sites.

(B) WACS taking into account a decrease of 90% of abundance in non-wilderness reefs.

(C) WACS taking into account a hypothetical 100% decrease in shark abundances except in wilderness reefs.

shark populations in the vicinity of human populations, entire conservation units show limited gene flow and therefore potentially low population recovery. The ongoing global fragmentation of populations, *i.e.* the lower levels of contemporary gene flow between populations, is a major issue for many threatened species (Bruford et al., 2010). Indeed, this loss of absolute number of migrants results in the subdivision of populations, leading to greater differentiation among resulting subpopulations and lower genetic diversity within them (Jangjoo et al., 2016; Keyghobadi et al., 2005).

The Great Barrier Reef (GBR) shows a very high connectivity to wilderness reefs of the Coral Sea and Chesterfield Reefs in New Caledonia (Figure 50B), and the Figure 50C shows that the latter might be a major source for repopulation of the impacted populations in the GBR. Both Australia and Indonesia are linked by the remote reefs of the Timor Sea that present a high degree of connectivity. However, some wilderness reefs in deep oceanic waters show a high degree of isolation by resistance, and do not seem to contribute to the global population connectivity in the area (Figure 50C). It is

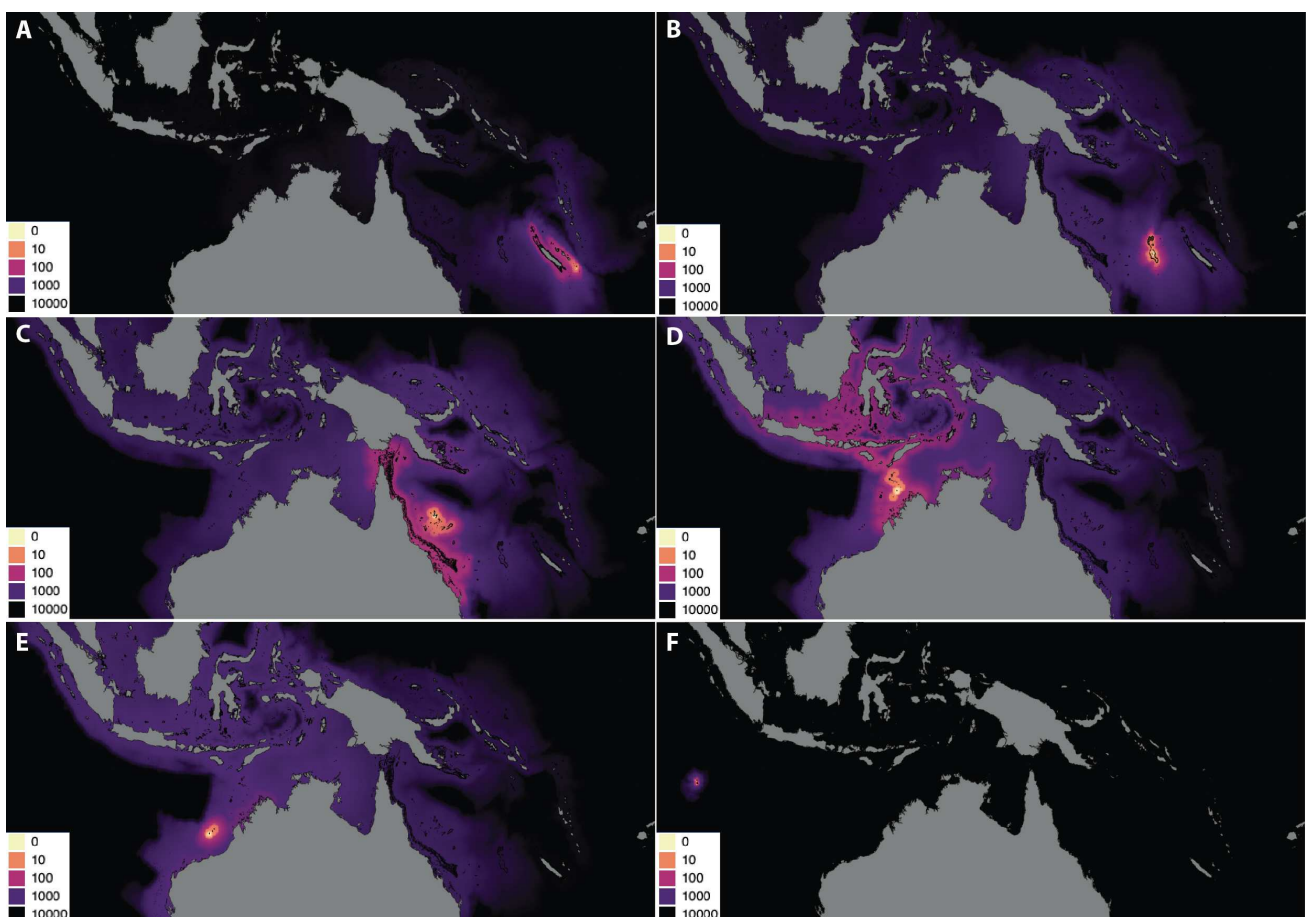


Figure 51. Accumulation Cost Surfaces (ACS) with a starting point in remote locations such as (A) Walpole Island, NC; (B) Chesterfield Reefs, NC; (C) Reefs of the Coral Sea, AU; (D) Heywood Shoal in the Timor Sea, AU; (E) Rowley Shoals in Western Australia; (F) Cocos (Keeling) Islands, AU.

interesting to notice that we also considered in this map remote reefs which have the potential to be wilderness reefs due to their remoteness, but that have potentially been wiped out from shallow waters by shark fishing fleets (e.g. Scott Reef in Northern Australia ; Field et al., 2009; Ruppert et al., 2013).

When considering individual accumulation cost surfaces (Figure 51) associated with wilderness reefs, different types of reefs are clearly identified, in terms of connectivity. For example, ACSs associated with locations such as Walpole Island in the New Caledonian archipelago (Figure 51A), remote reefs of the Coral Sea (Figure 51C) or Heywood Shoal (Figure 51D) show that populations from these locations have a high potential of spillover with low accumulated costs towards impacted reefs. The Rowley Shoals, in Western Australia, show less spillover, but a relatively low cost for dispersal towards other reefs of Australia and Indonesia (Figure 51E). The ACS associated with Chesterfield Reefs (New Caledonia; Figure 51B) shows an accessibility of surrounding reefs in the same order of magnitude than the Rowley Shoals (Figure 51E). However, the Chesterfield Reefs cover a surface of 24,000 km² and therefore present a very high population size, thus a high absolute number of migrants, making these wilderness reefs areas of outmost importance for dispersal towards both the GBR and New Caledonia. These remote reefs are all potential sources for impacted areas.

However, not all remote – thus potentially wilderness – areas are sources for impacted reefs near humans. In particular, remote reefs or islands separated by deep oceanic waters without stepping

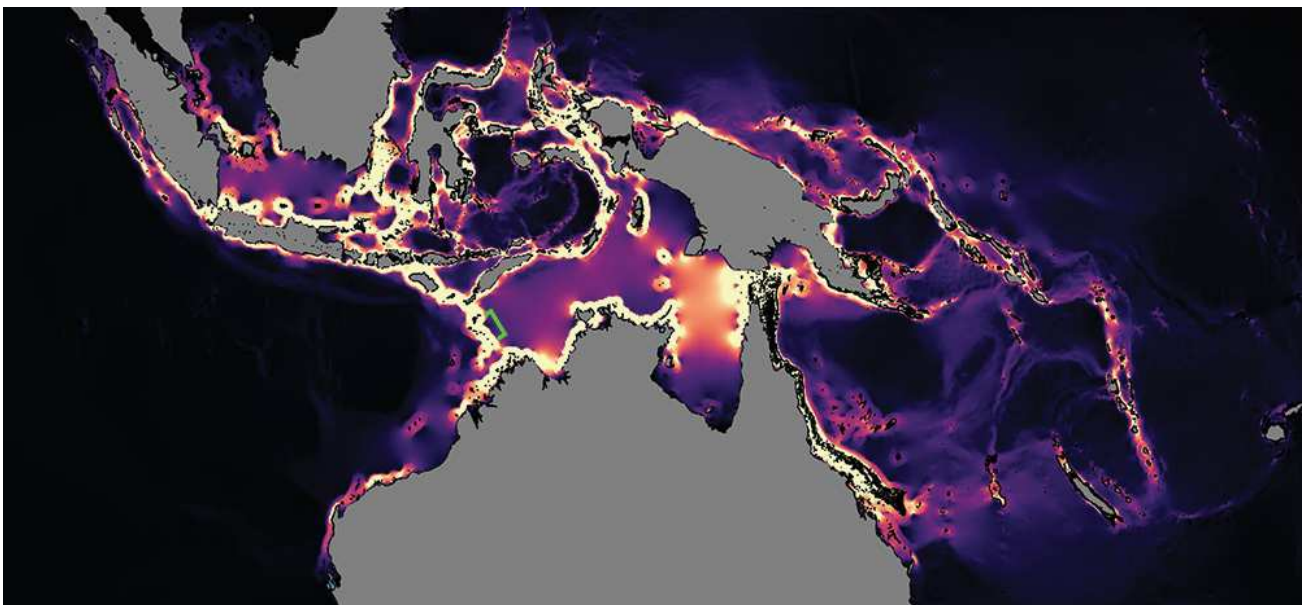


Figure 52. Current density map obtained with circuit theory calculations for 898 sites separated by 50 km (402,753 node pairs), derived from the resistance map in Figure 49. Ashmore and Cartier Islands and Heywood Shoal are indicated in green.

stone reefs nearby such as the Cocos (Keeling) Island (Figure 51F) are more likely to be just refuges and not sources for *C. amblyrhynchos*. The lack of connectivity may render *C. amblyrhynchos* populations from these isolated reefs less resilient to anthropogenic impacts such as industrial or IUU fishing.

Wilderness reefs can also be ideally located for facilitating gene flow between given populations and be therefore very important for the maintenance of resilience. Theoretically, Heywood Shoal and Ashmore and Cartier Islands in the Timor Sea show very high current density values (Figure 52), being at the crossroads between Indonesian and Australian coral reefs. Having also a high potential for spillover with low accumulated costs towards impacted reefs (Figure 51D) and being on the path to maintain gene flow and genetic diversity between Indonesia and Australia, these reefs may be of crucial importance for *C. amblyrhynchos* populations at a wide scale. However, the importance of these reefs had not yet been revealed and industrial fishing might still take place at these locations (Field et al., 2009), drastically reducing shark abundances and lowering their capabilities as potential sources for impacted areas.

This study joins with other studies to call for the protection and immediate incorporation of wilderness areas in international policies (Jones et al., 2018; Watson et al., 2016). Indeed, regardless of their importance, wilderness areas are under threat due to ignorance in environmental agreements and classification as a low priority for conservation efforts (Kormos et al., 2016; Watson et al., 2016). Only a small proportion of these areas is legally protected (Graham and McClanahan, 2013; Jones et al., 2018) and even in these areas, poaching frequently occurs due to their remote nature (Bradley et al., 2018; Graham et al., 2010). Watson et al. tackle the fact that this lack of conservation efforts is due to the nature itself of wilderness areas, being naturally remote and therefore supposedly protected from human threats (Watson et al., 2016). This is yet no longer true in marine environments where fishing in remote places is now more profitable than ever for industrial fishing fleets (Boerder et al., 2018; Kroodsma et al., 2018). Defining which places to protect and target more adequate cost-effective conservation measures is therefore urgent and should be a priority for both local and international decision-makers. This study contributes to the identification of remote reefs of utmost importance that are more than refuges but also sources for repopulation of impacted areas. It also allows the characterization of key remote reefs that are also at the crossroads of dispersal hotspots for metapopulation persistence, therefore helping future spatial design of more efficient MPA networks and corridors of protection.

PARTIE III

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Chaque chapitre de cette thèse a fait l'objet d'une discussion, soit directement dans l'article associé, soit à la suite du texte principal. Néanmoins, il semble important d'aborder plusieurs autres aspects afin de mieux définir la significativité de ce travail de thèse ainsi qu'ouvrir la réflexion à des perspectives de recherche avec des implications pour la conservation.

J'exposerai dans un premier temps quelques éléments soulignant l'apport de cette thèse dans un contexte scientifique général. Je me pencherai ensuite sur les apports de cette thèse spécifiquement pour la conservation des requins de récif de Nouvelle-Calédonie, fournissant des informations sur la dispersion de *Carcharhinus amblyrhynchos* et permettant éventuellement d'aider à définir un plan de gestion adapté, notamment au sein du Parc Naturel de la Mer de Corail. Des éléments de discussion qui n'ont pas été présentés au sein des différents chapitres seront alors abordés. Quelques perspectives en cours d'investigation utilisant des outils de génomique seront ensuite présentées afin d'aller un peu plus loin dans le questionnement sur la dispersion de cette espèce à différentes échelles temporelles. J'aborderai ensuite des perspectives de recherche sur l'écologie comportementale des requins de récif à l'échelle de l'individu ou des populations, elles aussi en cours de finalisation, et qui permettraient d'obtenir plus d'informations sur les mécanismes à l'origine de perturbations comportementales liées à l'anthropisation.

1. CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES MAJEURES

Au-delà d'une évaluation de la diversité des espèces de requins de récif au sein de gradients d'impacts anthropiques et d'une caractérisation de la structure des populations de *Carcharhinus amblyrhynchos*, cette thèse contribue à l'émergence de perspectives encourageants pour une meilleure protection de la mégafaune mobile. En effet, en complément des résultats fournissant des informations importantes sur l'écologie et la dispersion des espèces étudiées, elle révèle le potentiel des méthodes employées, applicables à d'autres systèmes d'étude.

1.1. Apport de l'analyse de l'ADN environnemental

Ainsi, cette thèse montre le potentiel de l'analyse de l'ADN environnemental par métabarcoding qui vient s'ajouter au panel de méthodes disponibles pour l'étude des communautés marines. Les travaux réalisés permettent de poser les fondements pour l'application des méthodes de métabarcoding environnemental aux communautés de Chondrichthyens des récifs coralliens, et donc dans un milieu naturel dynamique, avec des espèces rares et furtives, dans des zones montrant différents degrés de pressions anthropiques. Comme évoqué dans le chapitre 2, de nombreux travaux sur l'analyse de l'ADN environnemental ont été réalisées en milieu aquatique (Pedersen et al., 2015; Port et al., 2016b; Thomsen and Willerslev, 2015). Certaines études ont ciblé les requins en milieu marin (Sigsgaard et al., 2016; Simpfendorfer et al., 2016), mais appliquent toutes une approche de type barcoding, et donc centrée sur une seule espèce. Les travaux réalisés au cours de cette thèse représentent donc la première initiative utilisant une approche de métabarcoding ciblée sur les communautés sélaciennes en milieu dynamique.

De nombreux travaux sont encore nécessaires afin d'aboutir à une estimation rigoureuse de l'abondance inférée par l'ADN environnemental. L'utilisation du métabarcoding de l'ADNe pour la quantification de l'abondance reste controversée, surtout dans le cadre d'une étude à l'échelle de la communauté (Fonseca, 2018; Hansen et al., 2018). Concernant cet aspect, l'article 1 de cette thèse a montré que le nombre de lectures de fragments d'ADN environnemental était corrélé à un gradient de présence humaine, lui-même directement corrélé à l'abondance des requins (Juhel, 2016; Juhel et al., 2017). Il a par ailleurs été montré une correspondance entre le nombre de lectures de fragments d'ADN

et l'abondance et la biomasse en poissons estimées par chalutage (Thomsen et al., 2016). Plusieurs travaux visant une seule espèce ont été réalisés afin d'explorer de manière plus fine la corrélation entre le nombre de lectures de fragments d'ADN et l'abondance (Minamoto et al., 2017; Yamamoto et al., 2016).

En revanche, les travaux réalisés prouvent que l'étude de l'ADN environnemental est complémentaire aux autres méthodes traditionnelles. Elle permet ainsi d'étudier les espèces rares dont le statut UICN est inconnu, représentant à ce jour 41,5% des Chondrichthyens. Il est par ailleurs important de noter que cette méthode nécessite des bases génétiques de référence afin d'assigner les lectures des fragments d'ADN environnemental aux espèces en question, et donc un séquençage préalable des marqueurs utilisés pour chaque espèce. Par exemple, une potentielle nouvelle espèce de requin de la famille des Triakidae a été observée par BRUVS dans les récifs frangeants de l'île de Walpole, mais son ADN mitochondrial nécessite d'être séquencé et référencé pour les marqueurs utilisés afin d'être détectable dans le futur. De même, plusieurs espèces de requins n'ont été recensées qu'en Nouvelle-Calédonie (*Parmaturus albimarginatus*, *Parmaturus albipenis*), et une autre espèce, *Aulohaelurus kanakorum*, n'a été observée qu'une seule fois à 49 mètres de profondeur sur un récif corallien (Séret, 1997). Il est donc important de collecter des échantillons sur ces espèces non recensées afin de pouvoir identifier leur présence via l'analyse de l'ADN environnemental.

Par ailleurs, l'étude de l'ADN environnemental en zone anthropisée de Nouvelle-Calédonie (Nouméa) a montré que la diversité recensée était plus forte que précédemment observée par les méthodes traditionnelles. En effet, les comptages sous-marins (UVC) réalisés et les caméras appâtées (BRUVS) déployées durant plusieurs années ont montré une très faible densité et diversité de requins dans cette zone. De plus amples travaux d'échantillonnage sont nécessaires afin d'étudier plus en détails ce patron observé, mais l'analyse de l'ADN environnemental permet de s'affranchir du biais d'échantillonnage lié à la présence de l'homme. C'est-à-dire par exemple le bruit associé du circuit ouvert en plongée et/ou l'introduction de dispositifs de caméra appâtées, le tout associé au bruit d'un bateau à moteur. Il est probable que les requins des zones éloignées soient attirés par ces bruits, tandis que ceux des zones anthropisées pourraient être plus furtifs (Juhel et al., 2019). L'analyse de l'ADN environnemental permet de s'affranchir de ces biais.

Les deux articles de cette thèse montrent donc que l'étude de l'ADN environnemental devrait être envisagée dans les projets de recherche futurs, en complément des méthodes traditionnelles de

suivi, afin de mieux caractériser les communautés de requins. De futurs projets devraient également envisager la généralisation à d'autres taxons afin de mieux caractériser la diversité et le fonctionnement des écosystèmes coralliens et marins en général. Enfin, l'approche de métabarcoding de l'ADN environnemental est très prometteuse pour l'étude des milieux profonds (Brandt et al., 2018), ouvrant alors de nouvelles perspectives d'étude pour ces milieux méconnus (Everett and Park, 2018).

1.2. Génomique du paysage

La partie de cette thèse qui se penche sur les populations de requins de récif s'inscrit dans la continuité des études classiques de génétique. En revanche, l'apport de l'utilisation de nouvelles méthodes de séquençage a permis de mieux caractériser la structure des populations grâce à de nombreux marqueurs, là où les méthodes plus classiques (*e.g.* microsatellites) auraient conclu à une panmixie (*e.g.* Portnoy et al., 2015 ; Momigliano et al., 2017a ; Pazmiño et al., 2017). Les tailles de population étant relativement importantes dans le milieu marin, et les barrières à la dispersion rarement absolues, un faible taux de migrants entre des populations données peut homogénéiser la variance génétique (Momigliano et al., 2017a), faisant penser à une panmixie alors que celles-ci peuvent être relativement indépendantes d'un point de vue démographique. Une approche de génomique permet ainsi d'observer et de caractériser la différenciation génétique entre les populations de manière bien plus efficace que des approches plus classiques.

L'approche de génomique du paysage a permis d'identifier des barrières à la dispersion, montrant alors que les populations de requins de récif sont bien plus fragmentées que ce à quoi on pourrait s'attendre pour un grand prédateur mobile. C'est inquiétant pour les espèces comme *Carcharhinus amblyrhynchos* qui sont très vulnérables aux pressions anthropiques, pour lesquelles on se rend alors compte que les faibles échanges entre et même au sein de certaines unités de conservation ne seront pas suffisants pour un rétablissement rapide des populations ayant subi une forte perte d'individus, sans mesures de protection (*e.g.* réserve intégrale). Enfin, il a été montré que certains récifs coralliens éloignés de l'homme jouaient le rôle de source pour les populations des récifs situés en zone anthropisée (*e.g.* Chesterfield). Ils doivent donc être protégés par une mise en réserve et être placés sous surveillance afin d'éviter l'impact de la pêche illégale. C'est également le cas des récifs

coralliens qui ne jouent que le rôle de refuge (*e.g.* Matthew). Étant très isolés, les populations de requins associées sont d'autant plus vulnérables.

Pour finir, cette thèse permet également de fournir une approche flexible applicable à d'autres situations ainsi qu'à divers organismes, là où d'autres approches sont disponibles dans la littérature mais non applicables dans certains cas (chapitre 5).

2. AMÉLIORATION DE LA PROTECTION DES REQUINS DANS L'ARCHIPEL DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE

2.1. Application au contexte local de la Nouvelle-Calédonie

L'échelle locale est très importante en biologie de la conservation car il s'agit souvent de l'échelle prise en compte par les décideurs proposant des plans de gestion, qui ne sont que très rarement transfrontaliers. Les analyses proposées dans cette thèse permettent une délimitation d'unités de conservation basée sur les valeurs prédites de F_{ST} à l'échelle très locale, et de nombreux indices pouvant aider à la conservation de cette espèce ont été relevés au cours de cette thèse. Même si les valeurs de F_{ST} prédites et la délimitation d'unités ne permettent pas à elles seules d'établir des plans de gestion, elles sont un premier pas important vers une compréhension de la structure spatiale des populations de cette espèce.

Les implications de ces travaux de génomique des populations peuvent être importantes à l'échelle de l'archipel de la Nouvelle-Calédonie, incluant les eaux du Parc Naturel de la Mer de Corail, dont la proposition d'un plan de gestion est en cours. L'optimisation des modèles incluant les Cocos

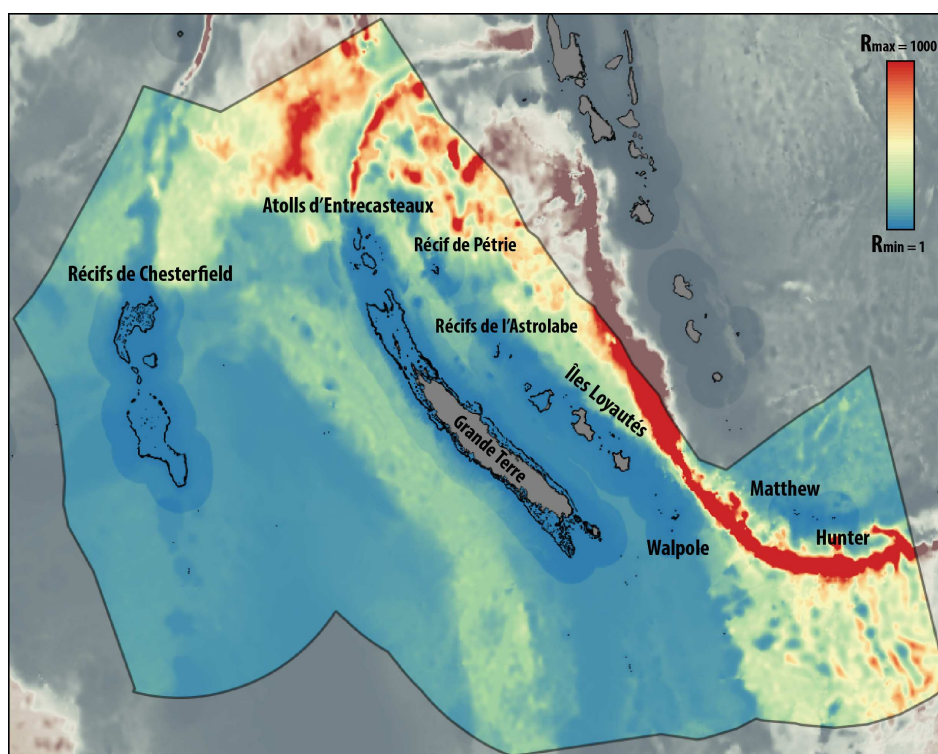


Figure 53. Carte de résistance associée à la Zone Économique Exclusive de la Nouvelle-Calédonie, à une résolution de 1 km. La valeur minimale de la résistance est de 1 (bleu) tandis que la valeur maximale est de 1000 (rouge).

(Keeling) et l’Australie de l’Ouest, l’Indonésie (Misool) et la GBR en plus de la Nouvelle-Calédonie a permis d’obtenir la carte de résistance présentée Figure 53. Cette optimisation a été réalisée avec une résolution de 10 km, mais cette carte ainsi que les autres cartes présentées dans cette section sont à une résolution de 1 km afin d’être mieux visualisées.

La combinaison d’analyses de génétique des populations (fastSTRUCTURE, DAPC) présentées au chapitre 4, de la carte de résistance et des cartes de densité de courant électrique issues de GFLOW ainsi que de la délimitation d’unités de conservation basée sur un seuil de F_{ST} des chapitres 5 et 6, permet de tirer des informations sur l’importance des différents récifs de l’archipel pour les populations de *Carcharhinus amblyrhynchos*.

a. La Grande Terre et ses récifs avoisinants, un ensemble connecté

Les requins de la Grande Terre et des îles, récifs, ou atolls avoisinants, ne présentent qu’une très faible différenciation génétique (chapitres 4 à 6 et Figure 54), résultant de conditions très favorables à la dispersion (Figure 53), avec des récifs continus ou séparés par des zones de profondeur relativement faible. Pour *Carcharhinus amblyrhynchos*, les atolls d’Entrecasteaux se montrent très proches de la zone du Grand Lagon Nord de la Grande Terre. À distance géographique égale, cette proximité devrait être en revanche plus faible avec le récif de Pétrie (non échantillonné) du fait de la plus forte résistance des eaux qui les séparent. En revanche, au sein de la même unité de conservation



(Figure 54), le modèle prédit une dispersion plus importante entre les requins du récif de Pétrie et ceux de l’Astrolabe. Les Îles Loyautés se montrent très connectées aux récifs éloignés de l’Astrolabe et Pétrie ainsi qu’à la Grande Terre, tout comme l’île de Walpole où les requins montrent une différenciation génétique plus importante avec le reste de cet ensemble. Ces échanges sont très visibles sur la carte de cumul de densités de courant électrique présentée en Figure 55. Ces travaux montrent alors que la protection des requins des récifs éloignés de cet ensemble connecté, comme les récifs d’Entrecasteaux, de Pétrie et de l’Astrolabe, pourrait permettre une plus forte résilience aux pressions pour les populations des zones anthropisées de la Grande Terre via la dispersion qui semble relativement importante au sein de cet ensemble. Savoir à quelle échelle cette dispersion s’effectue nécessite des travaux complémentaires afin notamment d’estimer le nombre de migrants par génération (Waples and Gaggiotti, 2006).

N.B. La carte de cumul de densités de courant est présentée ici pour illustrer, par exemple le fait que l’île de Walpole est connectée au reste de la Grande Terre. Cette carte correspond à la somme des cartes de densités de courant établies avec GFLOW, permettant alors de calculer la distance de résistance entre les sites deux-à-deux. L’intensité du courant sur cette carte de cumul correspond à la somme de toutes les intensités de courant deux-à-deux entre les sites choisis. Cette intensité cumulée dépend donc de la densité de l’échantillonnage. Un échantillonnage resserré (deux points à l’Astrolabe) fera ressortir la zone, tandis que l’absence de site (e.g. Pétrie) induira une extinction de la zone. Il est intéressant de présenter les cartes de densité de courant deux-à-deux, permettant par exemple de faire ressortir des corridors de dispersion (Figure 56).

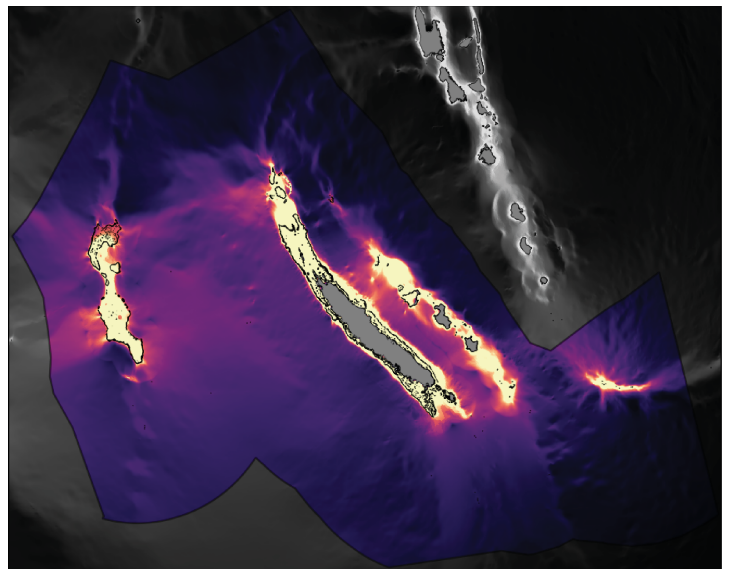


Figure 55. Carte de cumul de densités de courant électrique prenant en compte tous les points d’échantillonnage dans l’archipel de Nouvelle-Calédonie.

b. Les récifs de Chesterfield, le lien avec l’Australie

Les récifs de Chesterfield-Bellona appartiennent à la même unité délimitée avec un seuil de F_{ST} de 0,025 (Figure 54). La connectivité au sein de cet ensemble d’atolls est très forte, avec un récif relativement continu et des fonds peu profonds les séparant (Figure 53). La différenciation génétique avec les requins de la GBR est relativement faible (chapitre 4) et la connectivité entre ces zones est assurée préférentiellement via la partie sud (Bellona), formant un corridor vers des récifs de la Mer de Corail qui jouent un rôle de *stepping stones*. Ces récifs sont donc probablement très importants et la découverte de cette connectivité donne espoir pour le maintien des populations impactées de la GBR. Ils jouent un rôle de lien entre les populations d’Australie/Indonésie et celles de l’ouest du Pacifique. Il est intéressant de noter que ces récifs sont relativement connectés aux bancs et monts sous-marins intermédiaires entre Chesterfield et la Grande Terre (Figure 56A). La Figure 56A montre la densité de courant électrique calculée par GFLOW entre les points de Chesterfield et de Nouméa. Les chemins préférentiels passent très clairement le long des récifs de la Grande Terre, remontant vers le GLN et Entrecasteaux, avec une zone préférentielle de moindre résistance entre ces récifs. Il serait alors intéressant de réfléchir à la mise en protection du corridor de chemins préférentiels entre Chesterfield et Entrecasteaux afin de maintenir la dispersion entre ces zones.

La protection de ces récifs éloignés de Chesterfield-Bellona jouant le rôle de source et abritant probablement une population de très grande taille apparaît alors cruciale.

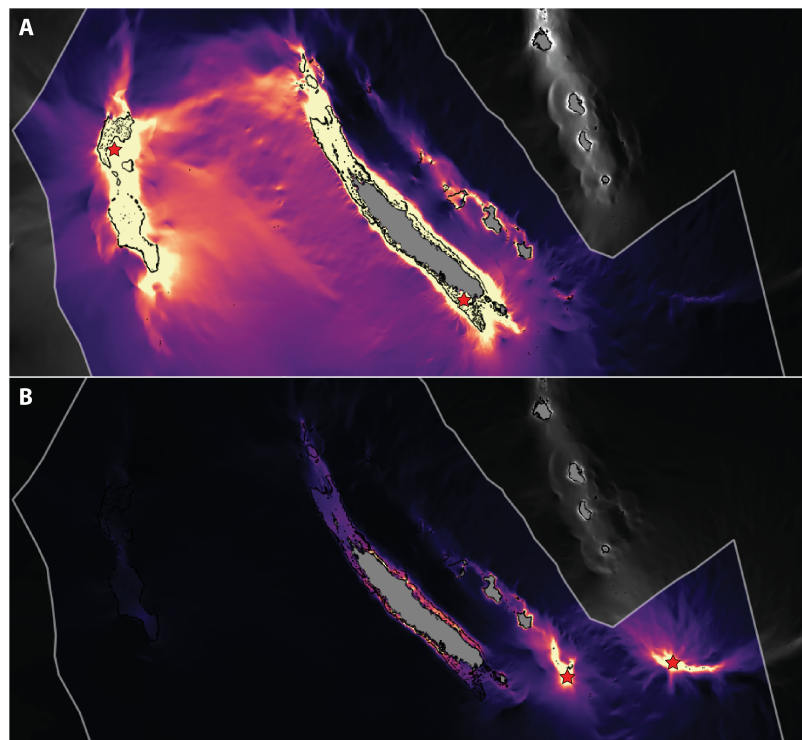


Figure 56. Cartes de densité de courant estimées avec GFLOW entre (A) Chesterfield et Nouméa (B) Walpole et Matthew. Les étoiles rouges correspondent aux sites utilisés pour le calcul des cartes de densité de courant entre elles (Chesterfield et Nouméa d’une part, Walpole et Matthew d’autre part).

c. Matthew et Hunter, des volcans isolés

À l'extrême est de l'archipel, les îles volcaniques de Matthew et de Hunter sont isolées du reste de l'archipel par la faille des Nouvelles-Hébrides, créant une barrière à la dispersion des requins (Figure 54, Figure 55 et Figure 56B). Ces îles sont également peu connectées au Vanuatu situé plus au nord. Abritant une taille de population probablement relativement faible du fait de la surface réduite d'habitat, elles sont alors très vulnérables à une pêche illégale qui aurait des conséquences fortes sur les populations de ces îles. De plus, le statut des populations de requins du Vanuatu est actuellement méconnu, et il est probable qu'elles subissent des déclinés très forts du fait de l'activité de pêche de la Chine dans les eaux vanuataises (Global Fishing Watch, globalfishingwatch.org).

Les échanges entre Matthew et la Grande Terre de Nouvelle-Calédonie sont très faibles et sont réalisés via l'intermédiaire de Walpole, cette île étant elle-même connectée au reste du complexe de la Grande Terre mais tout de même assez isolée. Des activités de pêche dans les récifs avoisinant les îles de Walpole impacteraient donc indirectement le peu de lien de connectivité qui existe entre les populations isolées de Matthew et Hunter et le reste de la Nouvelle-Calédonie.

2.2. Lutter contre la pêche illégale

Au-delà de la mise en protection, la pêche illégale est un réel souci pour les populations de requins de Nouvelle-Calédonie. Des moyens de protection sont mis en place avec un avion de surveillance ainsi qu'une flotte de navires de la marine nationale partant de Nouméa en cas d'observation de navires braconniers (Figure 57). En revanche, au vu de la grande taille de l'archipel de la Nouvelle-Calédonie (ZEE de 1,4 millions de km²), nombreux sont ceux qui ne sont pas repérés et beaucoup ont le temps de s'échapper avant d'être arraisonnés. Entre octobre 2016 et mars 2017, une cinquantaine de « *blue boats* » vietnamiens avaient fait l'objet de rapports d'infraction dans la ZEE de la Nouvelle-Calédonie (defense.gouv.fr), avec pour certains à leur bord des ailerons de requins en grande quantité en plus des cargaisons d'holothuries (*Les Nouvelles Calédoniennes*, Inc.nc et *NCI^{ère}*).



Figure 57. Blue boat vietnamien pêchant illégalement dans les eaux de Nouvelle-Calédonie, arraisonné et escorté par un zodiac de la marine nationale. © Archives LNC

De plus en plus de solutions existent pour combattre la pêche illégale. Les navires peuvent être équipés de systèmes d'identification automatique (AIS), conçus à l'origine pour prévenir les collisions. Ces outils incluent aujourd'hui un système de positionnement par satellite (S-AIS) diffusant quasiment en temps réel des informations sur le navire, sa position et son allure (accessible en ligne ; [Global Fishing Watch](#)). Ce système est rapide, de quelques minutes à une heure, mais dépend de la couverture satellitaire de la zone et ne renseigne pas sur les activités de pêche. Bien que l'Organisation Maritime Internationale (OMI) ait appelé à l'équipement de tous les navires commerciaux en 2004, de nombreux navires de pêche ne le sont toujours pas, rendant la surveillance compliquée (Bradley et al., 2018; McCauley et al., 2016).

Bien que présentant une faible couverture, les satellites d'observation de la Terre (radar ou optique) permettent de fournir des détections de navires de jour comme de nuit ([newsdeeply.com](#)), et le recoupement des observations avec des données de suivi AIS permet d'identifier des actes de pêche illégale. Par exemple, c'est ainsi qu'a été dérouté un navire vietnamien en 2016 pêchant illégalement dans les récifs d'Entrecasteaux, grâce à un des satellites d'observation Pléiades, amenant à la saisie d'une tonne et demi d'holothuries ([colsbleus.fr](#)).

En revanche, la disponibilité d'une flotte adéquate est nécessaire pour une intervention rapide et souvent lointaine, conduisant éventuellement à l'arraisonnement des navires criminels. La lutte contre la pêche illégale est donc délicate pour les pays en voie de développement.

Le déploiement de drones autonomes de surveillance guidés par intelligence artificielle ([CNN](#)) permet de relever les gardes côtes dans leur tâche de surveillance, leur accordant ainsi plus de temps et de ressources pour la poursuite et l'arraisonnement des navires braconniers. Contrairement aux images satellitaires, ces drones facilitent l'identification à la fois du navire et de ses activités de pêche, déclenchant immédiatement la chaîne d'intervention en cas d'infraction. De plus, leur discrétion en comparaison avec des avions permet de garder un effet de surprise important. Enfin, leur coût diminuant rapidement, ils sont peut-être une solution idéale pour de nombreux gouvernements afin de lutter efficacement contre la pêche illégale, mais leur utilisation reste controversée (Toonen and Bush, 2018).

3. DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE

a. Dispersion de *Carcharhinus amblyrhynchos*

Les résultats sur la dispersion de *Carcharhinus amblyrhynchos*, *i.e.* les barrières de dispersion liées à la forte bathymétrie ainsi que la dispersion facilitée le long des récifs continus, ont été soupçonnés dans plusieurs études (Espinoza et al., 2014b; Heupel et al., 2010b; Momigliano et al., 2015b, 2017a). C'est en revanche la première fois que ces patrons de dispersion sont reliés de manière rigoureuse à des variables biogéographiques, et qu'ils sont représentés spatialement dans une étude avec un échantillonnage aussi vaste et dense : 515 requins ont été capturés sur une étendue de 100° de longitude et 20° de latitude, et la différenciation génétique a été modélisée pour l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce.

La différenciation génétique observée à travers les calculs de F_{ST} résulte de migrations potentiellement réparties sur de nombreuses générations (une génération de *Carcharhinus amblyrhynchos* peut être considérée d'un ordre de grandeur de 10-12 ans). Les patrons de dispersion associés ne sont pas forcément encore pertinents à l'heure actuelle. Le déclin global mais hétérogène des requins entraîne une fragmentation des populations (chapitre 6), et le nombre absolu de migrants entre les différents sites n'est probablement pas le même aujourd'hui que par le passé, même récent. Par exemple, la relative homogénéité génétique observée au sein de l'ensemble de la Grande Terre et de ses récifs avoisinants suggère de nombreux flux de gènes (passés ou présents) entre les récifs, mais il se peut que cette dispersion ne se fasse plus de la même façon aujourd'hui et que le nombre de migrants soit faible, diminuant ainsi la capacité de résilience des populations. Se posent alors des questions liées aux mécanismes comportementaux qui peuvent être à l'origine de modifications de la dispersion des individus. Par exemple, il peut être éventuellement envisagé que la chute de la disponibilité en proies observée proche de l'homme (Cinner et al., 2018; D'Agata et al., 2016) soit à l'origine de modifications du comportement liées au manque de ressources trouvées en cours de migration ou sur le lieu de reproduction.

Plusieurs questions se posent alors. La première concerne les lieux de reproduction. Aucune étude ne montre l'existence de lieux préférentiels de reproduction et/ou de mise bas pour *Carcharhinus amblyrhynchos*. L'identification de ces lieux pourrait être une étape cruciale pour leur protection (Chapman et al., 2015). Des travaux montrent que la dispersion pourrait être biaisée en fonction du sexe pour cette espèce (Momigliano et al., 2017a), comme c'est également le cas pour d'autres espèces

de requins de récif, suggérant un mécanisme de philopatrie pour les femelles et de migration de reproduction pour les mâles (Green et al., 2018; Portnoy et al., 2015). C'est là que la télémétrie acoustique fournira des informations cruciales sur les mécanismes comportementaux à l'origine de la dispersion chez cette espèce, ainsi que sur les patrons spatiaux de migration éventuellement observés (thèse de Lucas Bonnin). Les mécanismes de philopatrie sont en revanche plus compliqués à observer à l'échelle temporelle de l'étude (Feldheim et al., 2014).

Afin de vérifier si les patrons de dispersion sont toujours les mêmes aujourd'hui que dans le passé, la dispersion à l'échelle contemporaine peut être étudiée plus en détails par la télémétrie acoustique, mais la limitation du nombre d'individus marqués risque de rendre difficile cette observation, car au vu des grandes tailles de populations que l'on peut avoir pour ces requins en Nouvelle-Calédonie, un faible taux de migrants pourrait être responsable de l'homogénéisation de la variance génétique (Momigliano et al., 2017a), diminuant fortement la probabilité de marquage des individus potentiellement migrants. L'utilisation de balises satellitaires pourrait également donner des indices sur les migrations contemporaines sans dépendre d'un réseau de récepteurs comme c'est le cas pour la télémétrie acoustique (*e.g.* White et al., 2017), mais le coût de ces balises rend leur utilisation compliquée pour de telles applications. Une autre manière d'étudier les patrons de dispersion à l'échelle contemporaine serait d'effectuer des analyses de parenté (Städele and Vigilant, 2016). Cet aspect est abordé plus loin.

b. Unités de conservation

Les unités de conservation hiérarchiques qui ont été définies au sein de ce manuscrit sont basées seulement sur un seuil de F_{ST} fixé de manière arbitraire. Cette méthode relativement simple a été utilisée car elle permet de définir ces unités à grande échelle, et la F_{ST} est également une des seules métriques modélisables par le type d'analyse spatiale de cette thèse. Pour des résultats à cette échelle, la méthode utilisée permet largement d'observer la structure globale des populations et les patrons de dispersion entre ces dernières. À l'échelle plus locale en revanche, il serait intéressant d'étudier la robustesse des unités de conservation en faisant varier le seuil de F_{ST} ou en utilisant une méthode plus spécifique à ce genre de problématique (Campello et al., 2013).

Le terme d'unité de conservation a été utilisé dans cette thèse sans évoquer le concept d'unité de gestion à cause de la méthode de définition de ces unités qui, par principe, utilise une modélisation et non des données empiriques permettant de calculer plusieurs métriques. Il faut donc être bien

conscient des limitations des données obtenues par cette modélisation et utiliser d'autres données issues d'indices complémentaires afin d'optimiser la protection de ces populations : notamment des paramètres démographiques (*e.g.* nombre de migrants, donc relié aux flux de gènes et à la taille efficace de population N_e), de diversité génétique et de pressions anthropiques (Funk et al., 2012; Palsbøll et al., 2007).

Même si cette méthode de définition des unités de conservation a des limites, c'est la première fois qu'un modèle de connectivité à grande échelle et haute résolution est défini pour une espèce évoluant dans le milieu marin avec un stade de dispersion juvénile et adulte. Des corridors de migration préférentielle peuvent alors être proposés et le type de modèle développé dans cette étude aiderait à déceler des patrons de dispersion prioritaires pour la conservation d'espèces dans des endroits où l'échantillonnage des requins est impossible pour des raisons logistiques ou à cause de densités de population trop faibles.

c. Rôle des monts sous-marins

Durant le chapitre 5, l'optimisation des modèles de théorie des circuits a permis de trouver la carte la plus représentative de la résistance à la dispersion des requins (*Carcharhinus amblyrhynchos*). Lors de cette optimisation ont été testées deux hypothèses concernant leur habitat préférentiel. La première a été retenue et ne considérait pas les monts sous-marins comme habitat pour cette espèce. La seconde incluait en revanche les monts sous-marins comme habitat possible afin d'établir la carte de distance à l'habitat. Les analyses réalisées lors de cette thèse n'ont pas permis de trancher car même si la première hypothèse a été retenue, les cartes incluant les monts sous-marins expliquent également très bien la différenciation génétique de cette espèce ($R^2 = 0,987$ avec monts sous-marins *vs.* $R^2 = 0.988$ sans monts sous-marins).

À ma connaissance, la faune sélacienne des monts sous-marins n'a pas fait l'objet d'étude poussée et même si la résidence pour *Carcharhinus amblyrhynchos* sur un mont sous-marin a été étudiée par télémétrie acoustique (Osprey Reef, Mer de Corail en Australie ; Barnett et al., 2012), ce mont sous-marin est également classé comme un atoll et son récif est bien présent sur les couches d'habitat de type récif corallien (WCMC). Shark Reef est en revanche un mont sous-marin coulé (à 15 mètres de profondeur au minimum) et est absent de la couche WCMC. C'est un exemple de mont sous-marin que j'ai inclus dans la seconde hypothèse, mais il est à seulement 14 kilomètres d'Osprey Reef, et n'est donc pas isolé. Lors d'études de marquage acoustique, il a été montré que certains requins de

cette espèce avaient un comportement montrant une forte résidence tandis qu'ils pouvaient également effectuer de grandes distances à partir de ces monts sous-marins (Barnett et al., 2012; Espinoza et al., 2014b).

L'importance des monts sous-marins est claire pour certaines espèces. Ils sont des lieux de passage pour les mammifères marins (Garrigue et al., 2015), ils représentent une zone de forte productivité avec des biomasses et une richesse en poissons importantes (Bouchet et al., 2015; Morato et al., 2010). Bien que les monts sous-marins soient des lieux de rassemblement de requins pélagiques (Litvinov, 2007), l'utilisation de ces endroits particuliers par les requins de récif reste méconnu. Des études sont donc nécessaires afin notamment de déterminer s'il s'agit de lieux de résidence ou de passage, lorsqu'ils sont au centre de larges étendues pélagiques comme cela peut être le cas dans l'archipel de la Nouvelle-Calédonie. Des missions océanographiques sont nécessaires afin d'obtenir des indices sur l'importance de ces lieux pour la dispersion de cette espèce et des requins de récif en général. Une combinaison de techniques telles que l'analyse de l'ADN environnemental, le déploiement de stéréo-caméras appâtées benthiques profondes ou pélagiques (Bouchet et al., 2018) ainsi que la capture peut être efficace afin d'étudier le rôle des monts sous-marins pour les requins de récif et donc mieux définir des priorités de gestion.

4. ALLER PLUS LOIN AVEC LES OUTILS DE GÉNOMIQUE

Avec les avancées technologiques récentes à la fois sur les méthodes de séquençage et en puissance de calcul, de plus en plus de possibilités s'ouvrent dans le domaine de la génétique de la conservation. Il est maintenant possible à moindre coût de produire et manipuler des données à l'échelle de génomes entiers pour des organismes non-modèles, multipliant ainsi les chances de répondre à des questions de plus en plus précises. Il est alors possible d'explorer de manière relativement efficace la structure des populations et la connectivité dans l'espace et dans le temps, ainsi que les mécanismes écologiques et évolutifs sous-jacents. Parmi les applications permises par ces avancées, quelques-unes en cours d'investigation sont présentées.

4.1. Génomique adaptative

Après avoir effectué des tests de détection de SNPs déviants (*outliers*) potentiellement sous sélection et avoir filtré en conséquence les SNPs utilisés pour ne s'intéresser qu'à la variabilité neutre des populations (chapitre 5), il pourrait être intéressant de se pencher sur l'étude de ces SNPs déviants afin de chercher des signatures locales de sélection. Des analyses de type PCA et DAPC ont été réalisées en ne gardant que les SNPs potentiellement sous sélection, mais aucun patron n'a été observé de manière triviale. En revanche, il serait intéressant de chercher à mieux définir la variabilité adaptative pour cette espèce et éventuellement la relier à des paramètres environnementaux (Balkenhol et al., 2017; Capblancq et al., 2018) afin de prédire les conséquences d'extirpations et la résilience des populations notamment face à des changements environnementaux rapides (Barbosa et al., 2018; Funk et al., 2012). Le fait que je n'aie pas intégré la variabilité adaptative dans mes travaux est la raison pour laquelle j'ai gardé le terme d'unités de conservation, sans parler d'ESUs (*Evolutionary Significant Units*) ou d'unités de gestion (MUs), car de nombreuses études recommandent l'intégration de la variabilité adaptative lors de leur délimitation (Barbosa et al., 2018; Funk et al., 2012; De Guia and Saitoh, 2007). Pour le moment, cette variabilité adaptative des requins n'a été caractérisée que de manière anecdotique (Momigliano et al., 2017a; Pazmiño et al., 2018; Portnoy et al., 2015).

Le séquençage et l'annotation d'un génome entier requièrent un investissement économique et une puissance de calcul encore aujourd'hui relativement importants, mais disposer d'un génome de référence pour la famille des Carcharhinidae serait une avancée considérable pour la conservation des

espèces de cette famille (Manel et al., 2016). Le génome le plus proche séquencé est celui d'un Chondrichthyen mais de la sous-classe des Holocephali (chimères ; Venkatesh et al., 2014).

4.2. Connectivité contemporaine

Comme évoqué plus tôt, les patrons de dispersion à l'échelle contemporaine peuvent être étudiés grâce à des analyses de parenté, en plus d'éventuels suivis directs de mouvements par télémétrie (Chapman et al., 2015; Feutry et al., 2016). Au-delà de l'étude des interactions sociales entre requins apparentés au sein d'une même espèce, distinguer des individus sans lien de parenté proche par rapport à des individus apparentés peut être intéressant pour estimer les patrons de dispersion à une échelle de temps relativement réduite (Schunter et al., 2012; Städele and Vigilant, 2016). Des analyses de parenté et de fratrie vont être réalisées sur le jeu de données de Nouvelle-Calédonie.

4.3. Taille efficace de population, connectivité historique et démographie

Un paramètre intéressant pour la définition d'unités de gestion est la taille efficace de population (N_e), permettant, lorsque l'on connaît l'indice de fixation F_{ST} , d'approximer un nombre absolu de migrants (Funk et al., 2012; Palsbøll et al., 2007). Au-delà des unités de gestion et des taux de migration, une estimation des tailles efficaces des populations de requins permettrait d'évaluer des flux de migrations et d'identifier les populations qui seraient potentiellement en danger (Waples et al., 2016). Plusieurs méthodes existent pour estimer N_e (Wang, 2005; Waples et al., 2016), comme « LDNE », ou sa réimplémentation NeEstimator, basés sur le déséquilibre de liaison permettant les calculs de N_e au sein des populations actuelles (Do et al., 2014; Reid-Anderson et al., 2019; Waples and Do, 2008).

Il est également possible d'explorer la démographie historique des populations de requins dans la zone Australie-Indonésie-Nouvelle-Calédonie. C'est notamment intéressant d'après la structure des populations révélée par le programme fastSTRUCTURE (chapitre 4), montrant une colonisation éventuelle de la GBR en plusieurs étapes, venant de l'ouest de l'Australie et de la Nouvelle-Calédonie.

Cette histoire démographique est en cours d'étude par Cameron Walsh, étudiant en Master. Les patrons d'expansion et de colonisation vont être étudiés dans un premier temps en se focalisant sur l'étude du déclin de la diversité génétique en fonction de l'éloignement au centre d'origine des populations (Maisano Delser et al., 2018; Ramachandran et al., 2005). Dans un second temps,

différents scénarios de colonisation/divergence vont être identifiés et comparés par des méthodes bayésiennes d'inférence démographique de type ABC (Beaumont et al., 2002; Momigliano et al., 2017b) couplées avec des approches basées sur l'étude du spectre des fréquences alléliques, SFS ($\partial a \partial i$, fastsimcoal2) permettant de prendre en compte des flux de gènes entre les populations (Excoffier and Foll, 2011; Excoffier et al., 2013).

5. MIEUX CONNAÎTRE LES ALTÉRATIONS COMPORTEMENTALES

Les analyses de l'ADN environnemental de cette étude ont montré que des requins étaient peut-être toujours présents en zone anthropisée, mais que leur comportement pouvait être altéré (chapitre 3). Ce n'est qu'une hypothèse mais les implications qui découlent de celles-ci sont importantes. Les travaux de Juhel et al. (2019) suggèrent que les requins restants des zones anthropisées (Nouméa) sont en nombre très faible mais ont surtout un comportement d'évitement par rapport à l'appât, observé lors du déploiement de caméras appâtées. Pour aller plus loin et savoir dans quelle mesure le comportement des requins est altéré directement et indirectement par la présence de l'homme, plusieurs analyses peuvent être réalisées. Ces aspects sont importants afin de comprendre les mécanismes à l'origine du déclin des requins observé à l'échelle globale, mais surtout dans des endroits comme la Nouvelle-Calédonie où ils font l'objet de nombreuses mesures de protection.

5.1. Écologie trophique des requins de récif

Le rôle écologique des requins de récif et leur place au sein du réseau trophique des récifs coralliens est de plus en plus connu, même si de nombreuses questions demeurent sans réponse au sein de la communauté scientifique (Frisch et al., 2016; Roff et al., 2016). Par exemple, il a été découvert seulement aujourd'hui que certaines espèces ont un régime alimentaire incluant des herbes marines (Leigh et al., 2018). La place par exemple de *Carcharhinus amblyrhynchos* est aujourd'hui relativement bien connue, assurant un rôle de mésoprédateur, mais celle de certaines espèces comme *Carcharhinus albimarginatus* l'est moins (Roff et al., 2016; Speed et al., 2012). L'écologie trophique apporte des réponses sur la place des populations naturelles par l'intermédiaire de techniques d'étude non invasives, contrairement à l'analyse des contenus stomacaux (e.g. Frisch et al., 2016). Ces techniques non invasives consistent par exemple à analyser les isotopes stables et la quantité de mercure présents dans des tissus prélevés sur les animaux (Ben-David and Flaherty, 2012; Fry, 2006; Peterson et al., 2017). L'intégration de l'étude de traceurs biogéochimiques peut donner des informations cruciales pour la conservation des prédateurs supérieurs (Christiansen et al., 2015; Ramos and González-Solís, 2012). Plus précisément, dans le contexte de ma thèse, visant à trouver des informations permettant d'optimiser la conservation des requins de récif, il est particulièrement pertinent de se pencher sur les différences observées dans les milieux anthropisés en comparaison avec les récifs éloignés. En effet, l'étude des similarités dans différents paramètres (mercure, isotopes

stables) pourrait révéler des différences voire des altérations comportementales liées directement ou indirectement à l'homme.

Ainsi, plusieurs questions énoncées ci-dessous seront abordées suite à cette thèse. Elles sont intéressantes car peu de choses sont connues pour les requins de récif, mais également car l'impact de l'homme sur leur comportement n'a quasiment jamais été étudié (Juhel et al., 2019). Le rôle de l'homme dans une éventuelle modification de ce comportement est encore sous-étudié alors que cette question apparaît centrale. Cette étude se focalisant sur *Carcharhinus amblyrhynchos* et *C. albimarginatus* permettra de fournir des éléments de comparaison entre les différentes zones plus ou moins anthropisées.

- (i) Quelle est le niveau trophique des requins de récif dans notre zone d'étude ? Ce niveau trophique est inféré à partir de l'étude du mercure (bioaccumulation ; Bustamante et al., 2016; Escobar-Sánchez et al., 2011; Matulik et al., 2017) et des isotopes stables de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$; Olin et al., 2013; Shiffman et al., 2012).
- (ii) Quel est l'habitat d'alimentation préférentiel ou majoritaire de ces requins ? Se nourrissent-ils plutôt sur des proies récifales ou plutôt pélagiques ? Cela sera inféré à partir des isotopes stables du carbone notamment $\delta^{13}\text{C}$ (Cortés, 1999; Roff et al., 2016). Les isotopes stables du mercure sont également de bons traceurs de la profondeur d'alimentation (Houssard et al., 2017) mais ne seront probablement pas étudiés.
- (iii) Quel est le degré de spécialisation alimentaire de ces requins ? Cette spécialisation est estimée à partir des différences observées de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ dans les tissus prélevés ayant des temps de renouvellement différents (*e.g.* muscle et plasma), en calculant des métriques de type BIC, WIC et TNW (Bearhop et al., 2004; Bond et al., 2016; Matich and Heithaus, 2015).
- (iv) Comment ces paramètres varient en fonction du sexe et de la taille des individus ? En particulier, un changement est souvent observable au cours de la croissance, correspondant à un changement de régime alimentaire (Lowe et al., 1996; Matich and Heithaus, 2015; Matich et al., 2017).
- (v) Comment varient l'ensemble de ces variables en fonction du degré d'anthropisation et de facteurs abiotiques et biotiques (*e.g.* disponibilité en proies, compétition intra- et inter-espèces) ? Cet aspect est crucial pour comprendre l'impact indirect de l'homme sur le succès reproducteur des individus.

Les deux espèces principales de cette thèse sont *C. amblyrhynchos* et *C. albimarginatus* sur lesquelles j'ai pu prélever des échantillons de peau, chair et sang au cours des différentes missions océanographiques (chapitre 1). J'ai analysé les échantillons de chair et de plasma par lyophilisation suivie de dosage du mercure dans le muscle (spectrophotomètre Advanced Mercury Analyser – Altec AMA 254), ou de préparation du muscle et plasma lyophilisés dans des capsules d'étain pour analyse par spectrométrie de masse en flux continu Thermo Delta Advantage couplée à un analyseur Costech Elemental Analyzer via a ConFlo IV. Les résultats sont en cours d'analyse et feront l'objet de publications.

5.2. Comportement individuel des requins de récif

Un autre axe d'étude consiste à se focaliser sur le comportement individuel des requins de récif, en étudiant une combinaison de facteurs afin d'en savoir plus sur le succès reproducteur des individus en milieu anthropisé ou dans les récifs éloignés. Pour cela, la méthode de caméra embarquée semble adaptée et apporte des informations jamais obtenues auparavant par d'autres méthodes (Hays, 2015; Nifong et al., 2014). Une caméra est alors fixée pour une durée donnée (plusieurs heures) sur l'aileron des requins (Figure 58A) afin de non seulement filmer mais également enregistrer de nombreux paramètres : accélération 3D, vitesse angulaire, cap, profondeur, température, luminosité (Figure 59). Un lien magnésium-zinc se dissolvant dans l'eau de mer permet de larguer la caméra vers la surface après un temps donné en fonction de la taille de ce lien magnésium (Gleiss et al., 2009). La caméra flotte alors en surface avec un émetteur VHF qui transmet un signal repérable grâce à une antenne et un récepteur réglé sur la fréquence de l'émetteur (Figure 58B).



Figure 58. (A) Fixation d'une caméra embarquée sur un requin gris (*Carcharhinus amblyrhynchos*) lors d'une mission aux récifs de l'Astrolabe. © Fabrice Jaine (B) Recherche du signal VHF transmis par l'émetteur relié à la caméra embarquée. © Éric Folcher.

Cette méthode existe depuis longtemps mais l'évolution rapide des technologies associées, incluant la miniaturisation des instruments (Moll et al., 2007; Wilmers et al., 2015), permet aujourd'hui de nombreuses applications et la méthode est très prometteuse (Laplanche et al., 2015; Payne et al., 2016; Thomson and Heithaus, 2014; Watanabe and Takahashi, 2013). Des déploiements étaient prévus en zone éloignée (Astrolabe, deux déploiements réalisés) ainsi qu'à Nouméa, mais la perte de matériel a contraint à abandonner ce sujet dans le cadre de ma thèse. Il aurait été intéressant d'avoir des informations sur les variations du budget énergétique (Moll et al., 2007; Qasem et al., 2012) et autres variables en lien avec l'anthropisation (*e.g.* recherche de proie, dérangement, utilisation de l'habitat, stratégie d'alimentation, interactions intra- et inter-espèces).

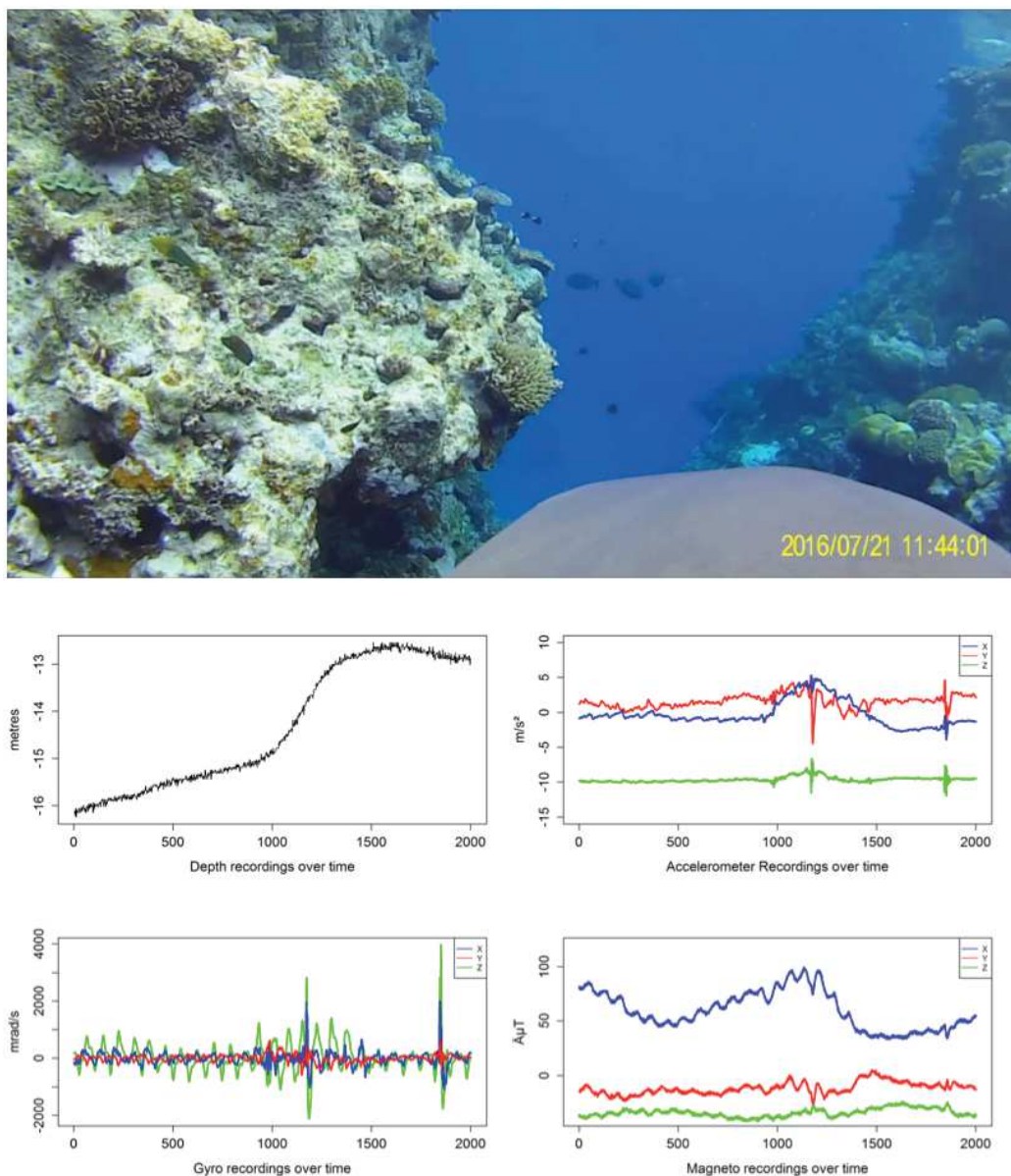


Figure 59. Résultats bruts obtenus lors du déploiement d'une caméra embarquée sur un requin gris (*Carcharhinus amblyrhynchos*), exemple sélectionné d'une durée de 30 secondes, montrant un ensemble de paramètres : vidéo, profondeur affichant une remontée douce, accéléromètre couplé à l'enregistrement du gyroscope et magnétomètre donnant des informations sur le trajet de l'animal, l'accélération et les battements de queue.

5.3. Étudier les habitats plus profonds

Pour finir, une des hypothèses possibles expliquant la faible détection des requins en zone anthropisée par les méthodes traditionnelles en comparaison avec l'analyse de l'ADN environnemental pourrait être que les requins ont un changement de comportement vis-à-vis de l'utilisation de l'habitat. Il se peut par exemple que les requins de Nouméa soient passés à une activité plus nocturne et/ou utiliseraient des habitats plus profonds dans les zones proches de l'homme.

En milieu terrestre, de nombreuses études montrent que le comportement des prédateurs supérieurs est altéré par la présence de l'homme (Tucker et al., 2018), notamment indirectement via une baisse de la disponibilité en proies (e.g. Blecha et al., 2018; Boutin, 2018). L'utilisation de l'habitat par ces prédateurs peut donc être déterminée par cette accessibilité des proies. Or, dans le milieu marin, l'exploitation des ressources halieutiques et la pression de pêche associée dans les eaux peu profondes entraîne une abondance relative et une taille des proies supérieures dans les milieux plus profonds par rapport aux couches supérieures (Frank et al., 2018). Ce phénomène appelé « *deepening* » pourrait être à l'origine d'un changement d'utilisation de l'habitat par les requins de récif vers des milieux plus profonds en réponse à ces changements de disponibilité en proies en zone anthropisée.

De plus, l'utilisation commerciale et récréative des eaux côtières s'est fortement intensifiée au cours des dernières décennies (Gonson et al., 2016), menant à de nombreuses perturbations diurnes. L'hypothèse d'une augmentation de la nocturnalité des requins en réponse à ces perturbations diurnes croissantes n'est pas à écarter, étant largement vérifiée pour de nombreuses espèces en milieu terrestre (Gaynor et al., 2018).

Outre la caméra embarquée qui donnera des indices pour vérifier cette hypothèse avec des déploiements longs et durant la nuit, il est possible d'utiliser des balises enregistrant des profils de plongée mais nécessitant la capture des individus (Howey et al., 2016), ou encore des caméras appâtées profondes afin d'échantillonner des zones qui sont aujourd'hui très peu connues car difficilement accessibles.

RÉFÉRENCES

Ahonen, H., Harcourt, R.G., and Stow, A.J. (2009). Nuclear and mitochondrial DNA reveals isolation of imperilled grey nurse shark populations (*Carcharias taurus*). *Mol. Ecol.* *18*, 4409–4421.

Albins, M.A., and Hixon, M.A. (2013). Worst case scenario: Potential long-term effects of invasive predatory lionfish (*Pterois volitans*) on Atlantic and Caribbean coral-reef communities. *Environ. Biol. Fishes* *96*, 1151–1157.

Allendorf, F.W., Hohenlohe, P.A., and Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 697–709.

Almany, G.R., Connolly, S.R., Heath, D.D., Hogan, J.D., Jones, G.P., McCook, L.J., Mills, M., Pressey, R.L., and Williamson, D.H. (2009). Connectivity, biodiversity conservation and the design of marine reserve networks for coral reefs. *Coral Reefs* *28*, 339–351.

Andréfouët, S., Chagnaud, N., Chauvin, C., and Kranenburg, C.J. (2008). Atlas of French Overseas Coral Reefs.

Andréfouët, S., Cabioch, G., Flamand, B., and Pelletier, B. (2009). A reappraisal of the diversity of geomorphological and genetic processes of New Caledonian coral reefs: A synthesis from optical remote sensing, coring and acoustic multibeam observations. *Coral Reefs* *28*, 691–707.

Andrello, M., Jacobi, M.N., Manel, S., Thuiller, W., and Mouillot, D. (2015). Extending networks of protected areas to optimize connectivity and population growth rate. *Ecography (Cop.)* *38*, 273–282.

Arevalo, E., Davis, S.K., and Sites, J.W. (1994). Mitochondrial DNA Sequence Divergence and Phylogenetic Relationships among Eight Chromosome Races of the *Sceloporus grammicus* Complex (Phrynosomatidae) in Central Mexico. *Syst. Biol.* *43*, 387–418.

Baker, C.S., Steel, D., Nieukirk, S., and Klinck, H. (2018). Environmental DNA (eDNA) From the Wake of the Whales: Droplet Digital PCR for Detection and Species Identification. *Front. Mar. Sci.* *5*, 1–11.

Balkenhol, N., Gugerli, F., Cushman, S.A., Waits, L.P., Coulon, A., Arntzen, J.W., Holderegger, R., Wagner, H.H., Arens, P., Campagne, P., et al. (2009). Identifying future research needs in landscape genetics: Where to from here? *Landscape Ecol.* *24*, 455–463.

Balkenhol, N., Dudaniec, R.Y., Krutovsky, K. V., Johnson, J.S., Cairns, D.M., Segelbacher, G., Selkoe, K.A., von der Heyden, S., Wang, I.J., Selmoni, O., et al. (2017). Landscape Genomics: Understanding Relationships Between Environmental Heterogeneity and Genomic Characteristics of Populations.

Ballnus, B., Hug, S., Hatz, K., Görlitz, L., Hasenauer, J., and Theis, F.J. (2017). Comprehensive benchmarking of Markov chain Monte Carlo methods for dynamical systems. *BMC Syst. Biol.* *11*, 63.

- Barbosa, S., Mestre, F., White, T.A., Paupério, J., Alves, P.C., and Searle, J.B. (2018). Integrative approaches to guide conservation decisions: using genomics to define conservation units and functional corridors. *Mol. Ecol.* 1–14.
- Barnes, M.A., and Turner, C.R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conserv. Genet.* 17, 1–17.
- Barnes, M.A., Turner, C.R., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Chadderton, W.L., and Lodge, D.M. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1819–1827.
- Barnett, A., AbrantesKá, K.G., Seymour, J., and Fitzpatrick, R. (2012). Residency and spatial use by reef sharks of an isolated seamount and its implications for conservation. *PLoS One* 7, e36574.
- Bascompte, J., Melian, C.J., and Sala, E. (2005). Interaction strength combinations and the overfishing of a marine food web. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5443–5447.
- Baum, J.K., Myers, R.A., Kehler, D.G., Worm, B., Harley, S.J., and Doherty, P.A. (2003). Collapse and conservation of shark populations in the Northwest Atlantic. *Science* (80-.). 299, 389–392.
- Bearhop, S., Adams, C.E., Waldron, S., Fuller, R.A., and Macleod, H. (2004). Determining trophic niche width: A novel approach using stable isotope analysis. *J. Anim. Ecol.* 73, 1007–1012.
- Beaumont, M.A., Zhang, W., and Balding, D.J. (2002). Approximate Bayesian Computation in Population Genetics. *Genetics* 162, 2025–2035.
- Bellwood, D.R., Hughes, T.P., Folke, C., and Nyström, M. (2004). Confronting the coral reef crisis. *Nature* 429, 827–833.
- Bellwood, D.R., Goatley, C.H.R., Cowman, P.F., and Bellwood, O. (2015). The evolution of fishes on coral reefs: fossils, phylogenies and functions. *Ecol. Fishes Coral Reefs* 55–63.
- Ben-David, M., and Flaherty, E.A. (2012). Stable isotopes in mammalian research: a beginner's guide. *J. Mammal.* 93, 312–328.
- Blecha, K.A., Boone, R.B., and Alldredge, M.W. (2018). Hunger mediates apex predator's risk avoidance response in wildland–urban interface. *J. Anim. Ecol.* 87, 609–622.
- Block, B. a., Jonsen, I.D., Jorgensen, S.J., Winship, a. J., Shaffer, S. a., Bograd, S.J., Hazen, E.L., Foley, D.G., Breed, G. a., Harrison, a.-L., et al. (2011). Tracking apex marine predator movements in a dynamic ocean. *Nature* 475, 86–90.
- Boerder, K., Miller, N.A., and Worm, B. (2018). Global hot spots of transshipment of fish catch at sea. *Sci. Adv.* 4, 1–11.
- Bogucki, R., Cygan, M., Khan, C.B., Klimek, M., Milczek, J.K., and Mucha, M. (2018). Applying deep learning to right whale photo identification. *Conserv. Biol.* 0, 1–9.
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M.T.P., Carvalho, G.R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D.W.,

and de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol. Evol.* *29*, 358–367.

Bond, A.L., Jardine, T.D., and Hobson, K.A. (2016). Multi-tissue stable-isotope analyses can identify dietary specialization. *Methods Ecol. Evol.* *7*, 1428–1437.

Bonhomme, M., Chevalet, C., Servin, B., Boitard, S., Abdallah, J., Blott, S., and SanCristobal, M. (2010). Detecting selection in population trees: The Lewontin and Krakauer test extended. *Genetics* *186*, 241–262.

Borucinska, J., Martin, J., and Skomal, G. (2001). Peritonitis and pericarditis associated with gastric perforation by a retained fishing hook in a blue shark. *J. Aquat. Anim. Health* *13*, 347–354.

Botta, F., Eriksen, C., Fontaine, M.C., and Guillot, G. (2015). Enhanced computational methods for quantifying the effect of geographic and environmental isolation on genetic differentiation. *Methods Ecol. Evol.* *6*, 1270–1277.

Bouchet, P., Meeuwig, J., Huvneers, C., Langlois, T., Letessier, T., Lowry, M., Rees, M., Santana-Garcon, J., Scott, M., Taylor, M., et al. (2018). Marine Sampling Field Manual for Pelagic Stereo BRUVS (Baited Remote Underwater Videos). (NESP Marine Biodiversity Hub).

Bouchet, P.J., Meeuwig, J.J., Salgado Kent, C.P., Letessier, T.B., and Jenner, C.K. (2015). Topographic determinants of mobile vertebrate predator hotspots: Current knowledge and future directions. *Biol. Rev.* *90*, 699–728.

Boutin, S. (2018). Hunger makes apex predators do risky things. *J. Anim. Ecol.* *87*, 530–532.

Bradley, D., Mayorga, J., McCauley, D.J., Cabral, R.B., Douglas, P., and Gaines, S.D. (2018). Leveraging satellite technology to create true shark sanctuaries. *Conserv. Lett.* e12610.

Brandt, M.I., Zeppilli, D., Dussart, C., Aublet, E., Pradillon, F., and Arnaud-haond, S. (2018). Metabarcoding on the deep seafloor: optimizing multigene approaches and sampling methods for large-scale biodiversity assessments. *PeerJ* 3–4.

Branstetter, S. (1981). Biological notes on the sharks of the north central Gulf of Mexico. *Contrib. Mar. Sci.*

Brooks, E.J., Mandelman, J.W., Sloman, K.A., Liss, S., Danylchuk, A.J., Cooke, S.J., Skomal, G.B., Philipp, D.P., Sims, D.W., and Suski, C.D. (2012). The physiological response of the Caribbean reef shark (*Carcharhinus perezi*) to longline capture. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* *162*, 94–100.

Brown, E.A., Chain, F.J.J., Zhan, A., MacIsaac, H.J., and Cristescu, M.E. (2016). Early detection of aquatic invaders using metabarcoding reveals a high number of non-indigenous species in Canadian ports. *Divers. Distrib.* *22*, 1045–1059.

Bruford, M.W., Ancrenaz, M., Chikhi, L., Lackman-Ancrenaz, I., Andau, M., Ambu, L., and Goossens, B. (2010). Projecting genetic diversity and population viability for the fragmented orangutan population in the Kinabatangan floodplain, Sabah, Malaysia. *Endanger. Species Res.* *12*, 249–261.

- Bustamante, P., Carravieri, A., Goutte, A., Barbraud, C., Delord, K., Chastel, O., Weimerskirch, H., and Cherel, Y. (2016). High feather mercury concentrations in the wandering albatross are related to sex, breeding status and trophic ecology with no demographic consequences. *Environ. Res.* *144*, 1–10.
- Butchart, S.H.M., Walpole, M., Collen, B., van Strien, A., Scharlemann, J.P.W., Almond, R.E.A., Baillie, J.E.M., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., et al. (2010). Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science* (80-). *328*, 1164–1168.
- Cabral, R.B., Mayorga, J., Clemence, M., Lynham, J., Koeshendrajana, S., Muawanah, U., Nugroho, D., Anna, Z., Mira, Ghofar, A., et al. (2018). Rapid and lasting gains from solving illegal fishing. *Nat. Ecol. Evol.* *2*, 650–658.
- Campello, R.J.G.B., Moulavi, D., and Sander, J. (2013). Density-Based Clustering Based on Hierarchical Density Estimates. In *Advances in Knowledge Discovery and Data Mining*, J. Pei, V.S. Tseng, L. Cao, H. Motoda, and G. Xu, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 160–172.
- Capblancq, T., Luu, K., Blum, M.G.B., and Bazin, E. (2018). Evaluation of redundancy analysis to identify signatures of local adaptation. *Mol. Ecol. Resour.* 0–1.
- Cardeñosa, D., Fields, A.T., Babcock, E.A., Zhang, H., Feldheim, K., Shea, S.K.H., Fischer, G.A., and Chapman, D.D. (2018). CITES-listed sharks remain among the top species in the contemporary fin trade. *Conserv. Lett.* *11*, 1–7.
- Carr, L.A., Stier, A.C., Fietz, K., Montero, I., Gallagher, A.J., and Bruno, J.F. (2013). Illegal shark fishing in the Galapagos Marine Reserve. *Mar. Policy* *39*, 317–321.
- Casella, G., Fienberg, S., and Olkin, I. (2006). *An Introduction to Statistical Learning*.
- Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A., and Cresko, W.A. (2013). Stacks: An analysis tool set for population genomics. *Mol. Ecol.* *22*, 3124–3140.
- Chabanet, P., Durville, P., Fricke, R., Amir, H., and Vigliola, L. (2012). Checklist of the Coral Reef Fishes of Baa Atoll, Maldives.
- Chapman, D.D., Feldheim, K.A., Papastamatiou, Y.P., and Hueter, R.E. (2015). There and Back Again: A Review of Residency and Return Migrations in Sharks, with Implications for Population Structure and Management. *Ann. Rev. Mar. Sci.* *7*, 547–570.
- Cheal, A.J., MacNeil, M.A., Cripps, E., Emslie, M.J., Jonker, M., Schaffelke, B., and Sweatman, H. (2010). Coral-macroalgal phase shifts or reef resilience: Links with diversity and functional roles of herbivorous fishes on the Great Barrier Reef. *Coral Reefs* *29*, 1005–1015.
- Chiarello, M. (2017). Biodiversité du microbiome cutané des organismes marins : variabilité, déterminants et importance dans l'écosystème.
- Chin, A., Mourier, J., and Rummer, J.L. (2015). Blacktip reef sharks (*Carcharhinus melanopterus*) show high capacity for wound healing and recovery following injury. *Conserv. Physiol.* *3*, 1–9.

Chin, A., Simpfendorfer, C.A., White, W.T., Johnson, G.J., McAuley, R.B., and Heupel, M.R. (2017). Crossing lines: a multidisciplinary framework for assessing connectivity of hammerhead sharks across jurisdictional boundaries. *Sci. Rep.* 7, 46061.

Christiansen, H., Fisk, A., and Hussey, N. (2015). Incorporating stable isotopes into a multidisciplinary framework to improve data inference and their conservation and management application. *African J. Mar. Sci.* 37, 189–197.

Cinner, J.E., McClanahan, T.R., Daw, T.M., Graham, N.A.J., Maina, J., Wilson, S.K., and Hughes, T.P. (2009). Linking Social and Ecological Systems to Sustain Coral Reef Fisheries. *Curr. Biol.* 19, 206–212.

Cinner, J.E., Huchery, C., Maire, E., Macneil, M.A., Nicholas, A.J., Mora, C., McClanahan, T.R., Kittinger, J.N., Christina, C., Hoey, A., et al. (2018). The gravity of human impacts mediates coral reef conservation gains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 1–40.

Clarke, S.C., McAllister, M.K., Milner-Gulland, E.J., Kirkwood, G.P., Michielsens, C.G.J., Agnew, D.J., Pikitch, E.K., Nakano, H., and Shivji, M.S. (2006). Global estimates of shark catches using trade records from commercial markets. *Ecol. Lett.* 9, 1115–1126.

Clua, E., Chauvet, C., Read, T., Werry, J.M., and Lee, S.Y. (2013). Behavioural patterns of a Tiger Shark (*Galeocerdo cuvier*) feeding aggregation at a blue whale carcass in Prony Bay, New Caledonia. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 46, 1–20.

Collins, R.A., Wangensteen, O.S., O’Gorman, E.J., Mariani, S., Sims, D.W., and Genner, M.J. (2018). Persistence of environmental DNA in marine systems. *Commun. Biol.* 1, 185.

Cortés, E. (1999). Standardized diet compositions and trophic levels of sharks. *J. Mar. Sci.* 56, 707–717.

Cortés, E. (2000). Life History Patterns and Correlations in Sharks. *Rev. Fish. Sci.* 8, 299–344.

COSEWIC (2011). Designatable units for caribou (*Rangifer tarandus*) in Canada.

Cowen, R.K., and Sponaugle, S. (2009). Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 1, 443–466.

Cox, G.J., and Francis, M. (1997). *Sharks and rays of New Zealand* (Canterbury University Press).

Creech, T.G., Epps, C.W., Landguth, E.L., Wehausen, J.D., Crowhurst, R.S., Holton, B., and Monello, R.J. (2017). Simulating the spread of selection-driven genotypes using landscape resistance models for desert bighorn sheep. *PLoS One* 12, 1–26.

Cristescu, M.E., and Hebert, P.D.N. (2018). Uses and Misuses of Environmental DNA in Biodiversity Science and Conservation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 49, 209–230.

Cuny, Gi., and Bénéteau, A. (2013). *Requins de la préhistoire à nos jours*.

D'agata, S., Vigliola, L., Graham, N.A.J., Wantiez, L., Parravicini, V., Villéger, S., Mou-Tham, G., Frolla, P., Friedlander, A.M., Kulbicki, M., et al. (2016). Unexpected high vulnerability of functions in wilderness areas: evidence from coral reef fishes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*

D'Agata, S., Mouillot, D., Wantiez, L., Friedlander, A.M., Kulbicki, M., and Vigliola, L. (2016). Marine reserves lag behind wilderness in the conservation of key functional roles. *Nat. Commun.* 7.

D'Aloia, C.C., Daigle, R.M., Côté, I.M., Curtis, J.M.R., Guichard, F., and Fortin, M.J. (2017). A multiple-species framework for integrating movement processes across life stages into the design of marine protected areas. *Biol. Conserv.* 216, 93–100.

Daly, R., Smale, M.J., Singh, S., Anders, D., Shivji, M., K. Daly, C.A., Lea, J.S.E., Sousa, L.L., Wetherbee, B.M., Fitzpatrick, R., et al. (2018). Refuges and risks: Evaluating the benefits of an expanded MPA network for mobile apex predators. *Divers. Distrib.* 1217–1230.

Darwin, C. (1837). On Certain Area of Elevation and Subsidence in the Pacific and Indian Ocean, as deduced from the Study of Coral Formations. 1837 A Pap. Read before the. *Geol. Soc.* May 31. *Proc. Geol. Soc.* 2, 552–554.

Davidson, L.N.K., and Dulvy, N.K. (2017). Global marine protected areas to prevent extinctions. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 0040.

Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., and Miaud, C. (2011). Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One* 6, 8–11.

DiBattista, J.D., Travers, M.J., Moore, G.I., Evans, R.D., Newman, S.J., Feng, M., Moyle, S.D., Gorton, R.J., Saunders, T., and Berry, O. (2017). Seascape genomics reveals fine-scale patterns of dispersal for a reef fish along the ecologically divergent coast of Northwestern Australia. *Mol. Ecol.*

Dickson, B.G., Albano, C.M., and Beier, P. (2018). Circuit-theory applications to connectivity science and conservation. *Conserv. Biol.*

Dilts, T.E., Weisberg, P.J., Leitner, P., Matocq, M.D., Inman, R.D., Nussear, K.E., and Esque, T.C. (2016). Multiscale connectivity and graph theory highlight critical areas for conservation under climate change. *Ecol. Appl.* 26, 1223–1237.

Dirzo, R., Young, H.S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N.J.B., and Collen, B. (2014). Defaunation in the Anthropocene. *Science* (80-.). 345, 401–406.

Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillett, B.J., and Ovenden, J.R. (2014). NeEstimator v2: Re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 209–214.

Domingues, R.R., Hilsdorf, A.W.S., and Gadig, O.B.F. (2017). The importance of considering genetic diversity in shark and ray conservation policies. *Conserv. Genet.* 1–25.

Dubach, J.M., Briggs, M.B., White, P.A., Ament, B.A., and Patterson, B.D. (2013). Genetic perspectives on “Lion Conservation Units” in Eastern and Southern Africa. *Conserv. Genet.* 14, 741–755.

Dudgeon, C.L., Blower, D.C., Broderick, D., Giles, J.L., Holmes, B.J., Kashiwagi, T., Krück, N.C., Morgan, J.A.T., Tillett, B.J., and Ovenden, J.R. (2012). A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *J. Fish Biol.* *80*, 1789–1843.

Dudley, S.F.J., Anderson-Read, M.D., Thompson, G.S., and McMullen, P.B. (2000). Concurrent scavenging off a whale carcass by great white sharks, *Carcharodon carcharias*, and tiger sharks, *Galeocerdo cuvier*. *Fish. Bull.* *98*, 646–649.

Dulvy, N.K., Baum, J.K., Clarke, S., Compagno, L.J.V., Cortés, E., Domingo, A., Fordham, S., Fowler, S., Francis, M.P., Gibson, C., et al. (2008). You can swim but you can't hide: The global status and conservation of oceanic pelagic sharks and rays. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* *18*, 459–482.

Dulvy, N.K., Fowler, S.L., Musick, J.A., Cavanagh, R.D., Kyne, P.M., Harrison, L.R., Carlson, J.K., Davidson, L.N. k, Fordham, S. V., Francis, M.P., et al. (2014). Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *Elife* *3*, e00590.

Dulvy, N.K., Simpfendorfer, C.A., Davidson, L.N.K., Fordham, S. V., Bräutigam, A., Sant, G., and Welch, D.J. (2017). Challenges and Priorities in Shark and Ray Conservation. *Curr. Biol.* *27*, R565–R572.

Ebert, D.A., Fowler, S., and Compagno, L. (2013). *Sharks of the World*.

Edgar, G.J., Stuart-Smith, R.D., Willis, T.J., Kininmonth, S., Baker, S.C., Banks, S., Barrett, N.S., Becerro, M.A., Bernard, A.T.F., Berkhout, J., et al. (2014). Global conservation outcomes depend on marine protected areas with five key features. *Nature* *506*, 216–220.

Epps, C.W., and Keyghobadi, N. (2015). Landscape genetics in a changing world: Disentangling historical and contemporary influences and inferring change. *Mol. Ecol.* *24*, 6021–6040.

Escobar-Sánchez, O., Galván-Magaña, F., and Rosiles-Martínez, R. (2011). Biomagnification of mercury and selenium in blue shark *Prionace glauca* from the Pacific Ocean off Mexico. *Biol. Trace Elem. Res.* *144*, 550–559.

Espinoza, M., Cappo, M., Heupel, M.R., Tobin, A.J., and Simpfendorfer, C.A. (2014a). Quantifying shark distribution patterns and species-habitat associations: Implications of Marine Park zoning. *PLoS One* *9*, e106885.

Espinoza, M., Heupel, M.R., Tobin, A.J., and Simpfendorfer, C.A. (2014b). Residency patterns and movements of grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*) in semi-isolated coral reef habitats. *Mar. Biol.* *162*, 343–358.

Espinoza, M., Heupel, M.R., Tobin, A.J., and Simpfendorfer, C.A. (2015). Movement patterns of silvertip sharks (*Carcharhinus albimarginatus*) on coral reefs. *Coral Reefs* *34*, 807–821.

Essington, T.E., Beaudreau, A.H., and Wiedenmann, J. (2006). Fishing through marine food webs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3171–3175.

Etherington, T.R., and Penelope Holland, E. (2013). Least-cost path length versus accumulated-cost as connectivity measures. *Landsc. Ecol.* *28*, 1223–1229.

van Etten, J. (2012). *gdistance*: Distances and routes on geographical grids. URL [Http//CRAN.R-Project.Org/Package= Gdistance](http://CRAN.R-project.org/package=Gdistance). R Packag. Version 1.

Eva, B., Harmony, P., Thomas, G., Francois, G., Alice, V., Claude, M., and Tony, D. (2016). Trails of river monsters: Detecting critically endangered Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas* using environmental DNA. *Glob. Ecol. Conserv.* 7, 148–156.

Everett, M. V., and Park, L.K. (2018). Exploring deep-water coral communities using environmental DNA. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 150, 229–241.

Ewing, B., and Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using PHRED. *Genome Res.* 8, 186–194.

Excoffier, L., and Foll, M. (2011). Fastsimcoal: a Continuous-Time Coalescent Simulator of Genomic Diversity Under Arbitrarily Complex Evolutionary Scenarios. *Bioinformatics* 27, 1332–1334.

Excoffier, L., and Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567.

Excoffier, L., Dupanloup, I., Huerta-Sánchez, E., Sousa, V.C., and Foll, M. (2013). Robust Demographic Inference from Genomic and SNP Data. *PLoS Genet.* 9.

Fabricius, K.E. (2005). Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: Review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 125–146.

Feldheim, K.A., Gruber, S.H., Dibattista, J.D., Babcock, E.A., Kessel, S.T., Hendry, A.P., Pikitch, E.K., Ashley, M. V., and Chapman, D.D. (2014). Two decades of genetic profiling yields first evidence of natal philopatry and long-term fidelity to parturition sites in sharks. *Mol. Ecol.* 23, 110–117.

Ferreira, L.C., Thums, M., Meeuwig, J.J., Vianna, G.M.S., Stevens, J., McAuley, R., and Meekan, M.G. (2015). Crossing latitudes-long-distance tracking of an apex predator. *PLoS One* 10, e0116916.

Ferretti, F., Worm, B., Britten, G.L., Heithaus, M.R., and Lotze, H.K. (2010). Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecol. Lett.* 13, 1055–1071.

Ferretti, F., Curnick, D., Liu, K., Romanov, E. V., and Block, B.A. (2018). Shark baselines and the conservation role of remote coral reef ecosystems. *Sci. Adv.* 4.

Feutry, P., Kyne, P.M., Pillans, R.D., Chen, X., Naylor, G.J.P., and Grewe, P.M. (2014). Mitogenomics of the Speartooth Shark challenges ten years of control region sequencing. *BMC Evol. Biol.* 14, 1–9.

Feutry, P., Berry, O., Kyne, P.M., Pillans, R.D., Hillary, R., Peter, M., Marthick, J.R., Johnson, G., Gunasekera, R.M., Bax, N.J., et al. (2016). Inferring contemporary and historical genetic connectivity from juveniles. 444–456.

Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., and Taberlet, P. (2008). Species detection using

environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* *4*, 423–425.

Field, I.C., Meekan, M.G., Buckworth, R.C., and Bradshaw, C.J.A. (2009). Protein mining the world's oceans: Australasia as an example of illegal expansion-and-displacement fishing. *Fish Fish.* *10*, 323–328.

Field, I.C., Meekan, M.G., Buckworth, R.C., and Bradshaw, C.J.A. (2010). Susceptibility of sharks, rays and chimaeras to global extinction (Elsevier Ltd.).

Fisher, R., O'Leary, R.A., Low-Choy, S., Mengersen, K., Knowlton, N., Brainard, R.E., and Caley, M.J. (2015). Species richness on coral reefs and the pursuit of convergent global estimates. *Curr. Biol.* *25*, 500–505.

Foltête, J.C., Clauzel, C., and Vuidel, G. (2012). A software tool dedicated to the modelling of landscape networks. *Environ. Model. Softw.* *38*, 316–327.

Fonseca, V.G. (2018). “Pitfalls in relative abundance estimation using eDNA metabarcoding.” *Mol. Ecol. Resour.* *18*, 923–926.

Frank, K.T., Petrie, B., Leggett, W.C., and Boyce, D.G. (2018). Exploitation drives an ontogenetic-like deepening in marine fish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, 6422–6427.

Frankham, R. (2010). Where are we in conservation genetics and where do we need to go? *Conserv. Genet.* *11*, 661–663.

Fredston-Hermann, A., Gaines, S.D., and Halpern, B.S. (2018). Biogeographic constraints to marine conservation in a changing climate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1–13.

Freitas, R.H.A., Rosa, R.S., Gruber, S.H., and Wetherbee, B.M. (2006). Early growth and juvenile population structure of lemon sharks *Negaprion brevirostris* in the Atol das Rocas Biological Reserve, off north-east Brazil. *J. Fish Biol.* *68*, 1319–1332.

Fretwell, P.T., Scofield, P., and Phillips, R.A. (2017). Using super-high resolution satellite imagery to census threatened albatrosses. *Ibis (Lond. 1859).* *159*, 481–490.

Frisch, A.J., Ireland, M., Rizzari, J.R., Lönnstedt, O.M., Magnenat, K.A., Mirbach, C.E., and Hobbs, J.P.A. (2016). Reassessing the trophic role of reef sharks as apex predators on coral reefs. *Coral Reefs* *35*, 459–472.

Froese, R., Pauly, D., and others (2010). FishBase.

Fry, B. (2006). Stable Isotope Ecology.

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

Funk, W.C., McKay, J.K., Hohenlohe, P.A., and Allendorf, F.W. (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends Ecol. Evol.* *27*, 489–496.

Galindo, H.M., Pfeiffer-Herbert, A.S., McManus, M.A., Chao, Y., Chai, F., and Palumbi,

S.R. (2010). Seascape genetics along a steep cline: Using genetic patterns to test predictions of marine larval dispersal. *Mol. Ecol.* *19*, 3692–3707.

Gallagher, A.J., Serafy, J.E., Cooke, S.J., and Hammerschlag, N. (2014). Physiological stress response, reflex impairment, and survival of five sympatric shark species following experimental capture and release. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *496*, 207–218.

Gargan, L.M., Morato, T., Pham, C.K., Finarelli, J.A., Carlsson, J.E.L., and Carlsson, J. (2017). Development of a sensitive detection method to survey pelagic biodiversity using eDNA and quantitative PCR: a case study of devil ray at seamounts. *Mar. Biol.* *164*, 112.

Garrigue, C., Clapham, P.J., Geyer, Y., Kennedy, A.S., and Zerbini, A.N. (2015). Satellite tracking reveals novel migratory patterns and the importance of seamounts for endangered south pacific humpback whales. *R. Soc. Open Sci.* *2*.

Garrigue, C., Derville, S., and Bonneville, C. (2018). Searching for humpback whales two centuries post-whaling: what is left in the Chesterfield-Bellona archipelago? *Int. Whal. Comm. Sci. Reports SC/67B/SH1*.

Gaynor, K.M., Hojnowski, C.E., Carter, N.H., and Brashares, J.S. (2018). The influence of human disturbance on wildlife nocturnality. *Science* (80-.). *360*, 1232–1235.

Geoghegan, J.L., Pirotta, V., Harvey, E., Smith, A., Buchmann, J.P., Ostrowski, M., Eden, J.S., Harcourt, R., and Holmes, E.C. (2018). Virological sampling of inaccessible wildlife with drones. *Viruses* *10*, 1–7.

Gleiss, A.C., Norman, B., Liebsch, N., Francis, C., and Wilson, R.P. (2009). A new prospect for tagging large free-swimming sharks with motion-sensitive data-loggers. *Fish. Res.* *97*, 11–16.

Goetze, J.S., and Fullwood, L.A.F. (2013). Fiji's largest marine reserve benefits reef sharks. *Coral Reefs* *32*, 121–125.

Gonson, C., Pelletier, D., Gamp, E., Preuss, B., Jollit, I., and Ferraris, J. (2016). Decadal increase in the number of recreational users is concentrated in no-take marine reserves. *Mar. Pollut. Bull.* *107*, 144–154.

Graham, N.A.J., and McClanahan, T.R. (2013). The Last Call for Marine Wilderness? *Bioscience* *63*, 397–402.

Graham, N.A.J., Spalding, M.D., and Sheppard, C.R.C. (2010). Reef shark declines in remote atolls highlight the need for multi-faceted conservation action. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* *20*, 543–548.

Graham, N.A.J., Bellwood, D.R., Cinner, J.E., Hughes, T.P., Norström, A. V., and Nyström, M. (2013). Managing resilience to reverse phase shifts in coral reefs. *Front. Ecol. Environ.* *11*, 541–548.

Green, M.E., Anastasi, B.R.D., Hobbs, J.A., Feldheim, K., Mcauley, R., Peverell, S., Stapley, J., Johnson, G., Appleyard, S.A., White, W.T., et al. (2018). Mixed-marker approach suggests maternal philopatry and sex-biased behaviours of narrow sawfish *Anoxypristis cuspidata*. *37*, 45–54.

De Guia, A.P.O., and Saitoh, T. (2007). The gap between the concept and definitions in the Evolutionarily Significant Unit: The need to integrate neutral genetic variation and adaptive variation. *Ecol. Res.* 22, 604–612.

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., L??ger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., et al. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 591–611.

Gustafson, E.J., and Gardner, R.H. (1996). The Effect of Landscape Heterogeneity on the Probability of Patch Colonization. *Ecology* 77, 94–107.

Guzman, H.M., Gomez, C.G., Hearn, A., and Eckert, S.A. (2018). Longest recorded trans-Pacific migration of a whale shark (*Rhincodon typus*). *Mar. Biodivers. Rec.* 11, 8.

Haddad, N.M., Brudvig, L.A., Clobert, J., Davies, K.F., Gonzalez, A., Holt, R.D., Lovejoy, T.E., Sexton, J.O., Austin, M.P., Collins, C.D., et al. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Sci. Adv.* 1, 1–10.

Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., Fox, H.E., et al. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* (80-.). 319, 948–952.

Hansen, B.K., Bekkevold, D., Clausen, L.W., and Nielsen, E.E. (2018). The sceptical optimist: Challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish Fish.* 1–18.

Harary, F. (1969). *Graph Theory*. Reading, MA, USA.

Harper, C., Ludwig, A., Clarke, A., Makgopela, K., Yurchenko, A., Guthrie, A., Dobrynin, P., Tamazian, G., Emslie, R., van Heerden, M., et al. (2018). Robust forensic matching of confi scated horns to individual poached African rhinoceros. *Curr. Biol.* 28, 1–16.

Harris, L.D. (1984). *The fragmented forest: island biogeography theory and the preservation of biotic diversity* (University of Chicago press).

Hays, G.C. (2015). New insights: Animal-borne cameras and accelerometers reveal the secret lives of cryptic species. *J. Anim. Ecol.* 84, 587–589.

Hazin, F.H. V, Hazin, F.H. V, Oliveira, P.G., Oliveira, P.G., Broadhurst, M.K., and Broadhurst, M.K. (2002). Reproduction of the blacknose shark (*Carcharhinus acronotus*) in the coastal waters off northeastern Brazil. *Fish. Bull.* 148, 143–148.

Hedgecock, D., Barber, P.H., and Edmands, S. (2003). *Genetic Approaches to Measuring Connectivity*. *Oceanography* 20, 70–79.

Heithaus, M.R., Frid, A., Wirsing, A.J., Dill, L.M., Fourqurean, J.W., Burkholder, D., Thomson, J., and Bejder, L. (2007). State-dependent risk-taking by green sea turtles mediates top-down effects of tiger shark intimidation in a marine ecosystem. *J. Anim. Ecol.* 76, 837–844.

Heithaus, M.R., Frid, A., Wirsing, A.J., and Worm, B. (2008). Predicting ecological

consequences of marine top predator declines. *Trends Ecol. Evol.* 23, 202–210.

Helyar, S.J., Hemmer-Hansen, J., Bekkevold, D., Taylor, M.I., Ogden, R., Limborg, M.T., Cariani, A., Maes, G.E., Diopere, E., Carvalho, G.R., et al. (2011). Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: New opportunities and challenges. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 123–136.

Henderson, A.C., McClellan, K., and Calosso, M. (2010). Preliminary assessment of a possible lemon shark nursery in the turks and Caicos Islands, British West Indies. *Caribb. J. Sci.* 46, 29–38.

Heupel, M.R., and Simpfendorfer, C.A. (2015). Long-term movement patterns of a coral reef predator. *Coral Reefs* 34, 679–691.

Heupel, M.R., Simpfendorfer, C.A., and Fitzpatrick, R. (2010a). Large-scale movement and reef fidelity of grey reef sharks. *PLoS One* 5, 1–5.

Heupel, M.R., Simpfendorfer, C.A., and Fitzpatrick, R. (2010b). Large-scale movement and reef fidelity of grey reef sharks. *PLoS One* 5, e9650.

Heupel, M.R., Knip, D.M., Simpfendorfer, C.A., and Dulvy, N.K. (2014). Sizing up the ecological role of sharks as predators. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 495, 291–298.

Hoegh-Guldberg, O. (2011). Coral reef ecosystems and anthropogenic climate change. *Reg. Environ. Chang.* 11, 215–227.

Horton, T.W., Hauser, N., Zerbini, A.N., Francis, M.P., Domeier, M.L., Andriolo, A., Costa, D.P., Robinson, P.W., Duffy, C.A.J., Nasby-Lucas, N., et al. (2017). Route Fidelity during Marine Megafauna Migration. *Front. Mar. Sci.* 4.

Houghton, R.A., Byers, B., and Nassikas, A.A. (2015). A role for tropical forests in stabilizing atmospheric CO₂. *Nat. Clim. Chang.* 5, 1022–1023.

Houssard, P., Lorrain, A., Tremblay-Boyer, L., Allain, V., Graham, B.S., Menkes, C.E., Pethybridge, H., Couturier, L.I.E., Point, D., Leroy, B., et al. (2017). Trophic position increases with thermocline depth in yellowfin and bigeye tuna across the Western and Central Pacific Ocean. *Prog. Oceanogr.* 154, 49–63.

Howey, L.A., Tolentino, E.R., Papastamatiou, Y.P., Brooks, E.J., Abercrombie, D.L., Watanabe, Y.Y., Williams, S., Brooks, A., Chapman, D.D., and Jordan, L.K.B. (2016). Into the deep: the functionality of mesopelagic excursions by an oceanic apex predator. *Ecol. Evol.* 6, 5290–5304.

Hughes, T.P., Bellwood, D.R., and Connolly, S.R. (2002). Biodiversity hotspots, centres of endemism, and the conservation of coral reefs. *Ecol. Lett.* 5, 775–784.

Hughes, T.P., Rodrigues, M.J., Bellwood, D.R., Ceccarelli, D., Hoegh-Guldberg, O., McCook, L., Moltschanivskyj, N., Pratchett, M.S., Steneck, R.S., and Willis, B. (2007). Phase Shifts, Herbivory, and the Resilience of Coral Reefs to Climate Change. *Curr. Biol.* 17, 360–365.

Hughes, T.P., Anderson, K.D., Connolly, S.R., Heron, S.F., Kerry, J.T., Lough, J.M., Baird, A.H., Baum, J.K., Berumen, M.L., Bridge, T.C., et al. (2018). Spatial and temporal patterns of mass

bleaching of corals in the Anthropocene. *Science* (80-.). 359, 80–83.

Hunter, M.E., Oyler-McCance, S.J., Dorazio, R.M., Fike, J.A., Smith, B.J., Hunter, C.T., Reed, R.N., and Hart, K.M. (2015). Environmental DNA (eDNA) sampling improves occurrence and detection estimates of invasive Burmese pythons. *PLoS One* 10, 1–17.

Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K., and Nishida, M. (2003). Evolution of the Deep-Sea Gulper Eel Mitochondrial Genomes: Large-Scale Gene Rearrangements Originated Within the Eels. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1917–1924.

Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., and Kilian, A. (2001). Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res.* 29.

Jackson, J.B.C. (2001). Historical Overfishing and the Recent Collapse of Coastal Ecosystems. *Science* (80-.). 293, 629–637.

Jacobi, M.N., and Jonsson, P.R. (2011). Optimal networks of nature reserves can be found through eigenvalue perturbation theory of the connectivity matrix. *Ecol. Appl.* 21, 1861–1870.

Jangjoo, M., Matter, S.F., Roland, J., and Keyghobadi, N. (2016). Connectivity rescues genetic diversity after a demographic bottleneck in a butterfly population network. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 10914–10919.

Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L., and Lodge, D.M. (2011). “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Lett.* 4, 150–157.

Johnson, G.J., Buckworth, R.C., Lee, H., Morgan, J.A.T., Oviden, J.R., and McMahon, C.R. (2017). A novel field method to distinguish between cryptic carcharhinid sharks, Australian blacktip shark *Carcharhinus tilstoni* and common blacktip shark *C. limbatus*, despite the presence of hybrids. *J. Fish Biol.* 90, 39–60.

Jombart, T., Devillard, S., and Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 11, 94.

Jones, K.R., Klein, C.J., Halpern, B.S., Venter, O., Grantham, H., Kuempel, C.D., Shumway, N., Friedlander, A.M., Possingham, H.P., and Watson, J.E.M. (2018). The Location and Protection Status of Earth’s Diminishing Marine Wilderness. *Curr. Biol.* 28, 2506–2512.e3.

Juhel, J.-B. (2016). Base de référence, impacts anthropiques et mesures de protection pour les requins récifaux de Nouvelle-Calédonie. Thèse de doctorat de l’Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa.

Juhel, J.-B., Vigliola, L., Wantiez, L., Letessier, T.B., Meeuwig, J.J., and Mouillot, D. Isolation and no-entry marine reserves mitigate anthropogenic impacts on grey reef shark behavior. *Sci. Rep.*

Juhel, J.B., Vigliola, L., Mouillot, D., Kulbicki, M., Letessier, T.B., Meeuwig, J.J., and Wantiez, L. (2017). Reef accessibility impairs the protection of sharks. *J. Appl. Ecol.* 55, 673–683.

Kays, R., Crofoot, M.C., Jetz, W., and Wikelski, M. (2015). Terrestrial animal tracking as an

eye on life and planet. *Science* (80-.). *348*, 1222–1232.

Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T.F., Crozier, W.W., and Prodöhl, P.A. (2013). DiveRcity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods Ecol. Evol.* *4*, 782–788.

Keeney, D.B., and Heist, E.J. (2006). Worldwide phylogeography of the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) inferred from mitochondrial DNA reveals isolation of western Atlantic populations coupled with recent Pacific dispersal. *Mol. Ecol.* *15*, 3669–3679.

Keeney, D.B., Heupel, M.R., Hueter, R.E., and Heist, E.J. (2005). Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Mol. Ecol.* *14*, 1911–1923.

Keyghobadi, N., Roland, J., Matter, S.F., and Strobeck, C. (2005). Among- and within-patch components of genetic diversity respond at different rates to habitat fragmentation: An empirical demonstration. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *272*, 553–560.

Khimoun, A., Peterman, W., Eraud, C., Faivre, B., Navarro, N., and Garnier, S. (2017). Landscape genetic analyses reveal fine-scale effects of forest fragmentation in an insular tropical bird. *Mol. Ecol.*

Kiderlen, M., and Hörig, M. (2013). Matérn's hard core models of types I and II with arbitrary compact grains.

Kim, S.L., and Koch, P.L. (2012). Methods to collect, preserve, and prepare elasmobranch tissues for stable isotope analysis. *Environ. Biol. Fishes* *95*, 53–63.

Kiszka, J.J., Mourier, J., Gastrich, K., and Heithaus, M.R. (2016). Using unmanned aerial vehicles (UAVs) to investigate shark and ray densities in a shallow coral lagoon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *560*, 237–242.

Klein, D.J., and Randić, M. (1993). Resistance distance. *J. Math. Chem.* *12*, 81–95.

Knaapen, J.P., Scheffer, M., and Harms, B. (1992). Estimating habitat isolation in landscape planning. *Landsc. Urban Plan.* *23*, 1–16.

Knip, D.M., Heupel, M.R., and Simpfendorfer, C.A. (2012). Evaluating marine protected areas for the conservation of tropical coastal sharks. *Biol. Conserv.* *148*, 200–209.

Knowlton, N. (2001). The future of coral reefs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 5419–5425.

Koen, E.L., Garroway, C.J., Wilson, P.J., and Bowman, J. (2010). The effect of map boundary on estimates of landscape resistance to animal movement. *PLoS One* *5*, 1–8.

Kormos, C.F., Bertzky, B., Jaeger, T., Shi, Y., Badman, T., Hilty, J.A., Mackey, B.G., Mittermeier, R.A., Locke, H., Osipova, E., et al. (2016). A Wilderness Approach under the World Heritage Convention. *Conserv. Lett.* *9*, 228–235.

Kroodsma, D.A., Mayorga, J., Hochberg, T., Miller, N.A., Boerder, K., Ferretti, F., Wilson,

A., Bergman, B., White, T.D., Block, B.A., et al. (2018). Tracking the Global Footprint of Fisheries. *Science* (80-.). *908*, 904–908.

Kulbicki, M., Parravicini, V., Bellwood, D.R., Arias-González, E., Chabanet, P., Floeter, S.R., Friedlander, A., McPherson, J., Myers, R.E., Vigliola, L., et al. (2013). Global biogeography of reef fishes: A hierarchical quantitative delineation of regions. *PLoS One* *8*, e81847.

Laplanche, C., Marques, T.A., and Thomas, L. (2015). Tracking marine mammals in 3D using electronic tag data. *Methods Ecol. Evol.* *6*, 987–996.

LaPoint, S., Gallery, P., Wikelski, M., and Kays, R. (2013). Animal behavior, cost-based corridor models, and real corridors. *Landsc. Ecol.* *28*, 1615–1630.

Last, P.R., and Stevens, J.D. (2009). *Sharks and rays of Australia*.

Lecointre, G. (2009). *Guide critique de l'évolution* (Belin).

Legendre, P., Fortin, M.J., and Borcard, D. (2015). Should the Mantel test be used in spatial analysis? *Methods Ecol. Evol.* *6*, 1239–1247.

Leigh, S.C., Papastamatiou, Y.P., and German, D.P. (2018). Seagrass digestion by a notorious “carnivore.” *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *285*.

Leonard, P.B., Duffy, E.B., Baldwin, R.F., McRae, B.H., Shah, V.B., and Mohapatra, T.K. (2017). Gflow: Software for Modelling Circuit Theory-Based Connectivity At Any Scale. *Methods Ecol. Evol.* *8*, 519–526.

Li, H. (2014). Toward better understanding of artifacts in variant calling from high-coverage samples. *Bioinformatics* *30*, 2843–2851.

Lichstein, J.W. (2007). Multiple Regression on Distance Matrices : A Multivariate Spatial Analysis Tool. *Plant Ecol.* *188*, 117–131.

Litvinov, F. (2007). Aggregations of large pelagic sharks above seamounts. In *Seamounts: Ecology, Fisheries & Conservation*, p.

Lowe, W.H., and Allendorf, F.W. (2010). What can genetics tell us about population connectivity? *Mol. Ecol.* *19*, 3038–3051.

Lowe, C.G., Wetherbee, B.M., Crow, G.L., and Tester, A.L. (1996). Ontogenetic dietary shifts and feeding behavior of the tiger shark, *Galeocerdo cuvier*, in Hawaiian waters. *Environ. Biol. Fishes* *47*, 203–211.

Lucifora, L.O., García, V.B., Menni, R.C., Escalante, A.H., and Hozbor, N.M. (2009). Effects of body size, age and maturity stage on diet in a large shark: Ecological and applied implications. *Ecol. Res.* *24*, 109–118.

MacArthur, R.H., and Wilson, E.O. (2001). *The theory of island biogeography* (Princeton university press).

- Maes, D., Vanreusel, W., Talloen, W., and Van Dyck, H. (2004). Functional conservation units for the endangered Alcon Blue butterfly *Maculinea alcon* in Belgium (Lepidoptera: Lycaenidae). *Biol. Conserv.* *120*, 233–245.
- Magris, R.A., Pressey, R.L., Weeks, R., and Ban, N.C. (2014). Integrating connectivity and climate change into marine conservation planning. *Biol. Conserv.* *170*, 207–221.
- Mahon, A.R., Jerde, C.L., Galaska, M., Bergner, J.L., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., Hunter, M.E., and Nico, L.G. (2013). Validation of eDNA Surveillance Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments. *PLoS One* *8*, 1–6.
- Maire, E., Cinner, J., Velez, L., Huchery, C., Mora, C., Dagata, S., Vigliola, L., Wantiez, L., Kulbicki, M., and Mouillot, D. (2016). How accessible are coral reefs to people? A global assessment based on travel time. *Ecol. Lett.* *19*, 351–360.
- Maisano Delser, P., Corrigan, S., Duckett, D., Suwalski, A., Veuille, M., Planes, S., Naylor, G.J.P., and Mona, S. (2018). Demographic inferences after a range expansion can be biased: the test case of the blacktip reef shark (*Carcharhinus melanopterus*). *Heredity (Edinb)*. 1.
- Manel, S., and Holderegger, R. (2013). Ten years of landscape genetics. *Trends Ecol. Evol.* *28*, 614–621.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G., and Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* *18*, 189–197.
- Manel, S., Perrier, C., Pratlong, M., Abi-Rached, L., Paganini, J., Pontarotti, P., and Aurelle, D. (2016). Genomic resources and their influence on the detection of the signal of positive selection in genome scans. *Mol. Ecol.* *25*, 170–184.
- Mantel, N. (1967). The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Res.* *27*, 209–220.
- Martin, T.G., and Watson, J.E.M. (2016). Intact ecosystems provide best defence against climate change. *Nat. Clim. Chang.* *6*, 122–124.
- Matérn, B. (1960). *Spatial Variation: Stochastic Models and Their Application to Some Problems in Forest Surveys and Other Sampling Investigations* (Statens skogsforskningsinstitut).
- Matich, P., and Heithaus, M.R. (2015). Individual variation in ontogenetic niche shifts in habitat use and movement patterns of a large estuarine predator (*Carcharhinus leucas*). *Oecologia* *178*, 347–359.
- Matich, P., Kiszka, J.J., Mourier, J., Planes, S., and Heithaus, M.R. (2017). Species co-occurrence affects the trophic interactions of two juvenile reef shark species in tropical lagoon nurseries in Moorea (French Polynesia). *Mar. Environ. Res.* *127*, 84–91.
- Matulik, A.G., Kerstetter, D.W., Hammerschlag, N., Divoll, T., Hammerschmidt, C.R., and Evers, D.C. (2017). Bioaccumulation and biomagnification of mercury and methylmercury in four sympatric coastal sharks in a subtropical lagoon. *Mar. Pollut. Bull.*

McCauley, D.J., Young, H.S., Dunbar, R.B., Estes, J.A., Semmens, B.X., and Micheli, F. (2012). Assessing the effects of large mobile predators on ecosystem connectivity. *Ecol. Appl.* *22*, 1711–1717.

McCauley, D.J., Pinsky, M.L., Palumbi, S.R., Estes, J. a., Joyce, F.H., and Warner, R.R. (2015). Marine defaunation: Animal loss in the global ocean. *Science* (80-.). *347*, 247–254.

McCauley, D.J., Woods, P., Sullivan, B., Bergman, B., Jablonicky, C., Roan, A., Hirshfield, M., Boerder, K., and Worm, B. (2016). Ending hide and seek at sea. *Science* (80-.). *351*, 1148–1150.

McCook, L.J., Almany, G.R., Berumen, M.L., Day, J.C., Green, A.L., Jones, G.P., Leis, J.M., Planes, S., Russ, G.R., Sale, P.F., et al. (2009). Management under uncertainty: Guide-lines for incorporating connectivity into the protection of coral reefs. *Coral Reefs* *28*, 353–366.

McCook, L.J., Ayling, T., Cappo, M., Choat, J.H., Evans, R.D., De Freitas, D.M., Heupel, M., Hughes, T.P., Jones, G.P., Mapstone, B., et al. (2010). Adaptive management of the Great Barrier Reef: a globally significant demonstration of the benefits of networks of marine reserves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18278–18285.

McMahon, K.W., Berumen, M.L., Mateo, I., Elsdon, T.S., and Thorrold, S.R. (2011). Carbon isotopes in otolith amino acids identify residency of juvenile snapper (Family: Lutjanidae) in coastal nurseries. *Coral Reefs* *30*, 1135–1145.

Mcrae, B.H., Dickson, B.G., Keitt, T.H., and Shah, V.B. (2008). Using Circuit Theory To Model Connectivity in Ecology, Evolution, and Conservation. *Ecology* *89*, 2712–2724.

McRae, B.H. (2006). ISOLATION BY RESISTANCE. *Evolution* (N. Y). *60*, 1551.

McRae, B.H., and Beier, P. (2007). Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 19885–19890.

McRae, B.H., Dickson, B.G., Keitt, T.H., and Shah, V.B. (2008). Using Circuit Theory To Model Connectivity in Ecology, Evolution, and Conservation. *Ecology* *89*, 2712–2724.

Meekan, M., Austin, C., Hua Tan, M., Miller, A., Pierce, S., Rowat, D., Stevens, G., Davies, T., Ponzo, A., and Ming Gan, H. (2017). iDNA at Sea: Recovery of whale shark (*Rhincodon typus*) mitochondrial DNA sequences from the whale shark copepod, *Pandarus rhincodonicus*. *Front. Mar. Sci.* *4*, 420.

Meyer, C.G., Papastamatiou, Y.P., and Holland, K.N. (2010). A multiple instrument approach to quantifying the movement patterns and habitat use of tiger (*Galeocerdo cuvier*) and Galapagos sharks (*Carcharhinus galapagensis*) at French Frigate Shoals, Hawaii. *Mar. Biol.* *157*, 1857–1868.

Meyer, L., Fox, A., and Huveneers, C. (2018). Simple biopsy modification to collect muscle samples from free-swimming sharks. *Biol. Conserv.* *228*, 142–147.

Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M.N., and Kawabata, Z. (2012). Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* *13*, 193–197.

Minamoto, T., Fukuda, M., Katsuhara, K.R., Fujiwara, A., Hidaka, S., Yamamoto, S.,

Takahashi, K., and Masuda, R. (2017). Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLoS One* 12, e0173073.

Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Brooks, T.M., Pilgrim, J.D., Konstant, W.R., da Fonseca, G.A.B., and Kormos, C. (2003). Wilderness and biodiversity conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10309–10313.

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., et al. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.* 2, 150088.

Moberg, F., and Folke, C. (1999). Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecol. Econ.* 29, 215–233.

Moll, R.J., Millspaugh, J.J., Beringer, J., Sartwell, J., and He, Z. (2007). A new “view” of ecology and conservation through animal-borne video systems. *Trends Ecol. Evol.* 22, 660–668.

Momigliano, P., Robbins, W.D., Gardner, M., and Stow, A. (2014). Characterisation of 15 novel microsatellite loci for the grey reef shark (*Carcharhinus amblyrhynchos*). *Conserv. Genet. Resour.* 6, 661–663.

Momigliano, P., Harcourt, R., and Stow, A. (2015a). Conserving coral reef organisms that lack larval dispersal: are networks of Marine Protected Areas good enough? *Front. Mar. Sci.* 2, 1–5.

Momigliano, P., Harcourt, R., Robbins, W.D., and Stow, A. (2015b). Connectivity in grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*) determined using empirical and simulated genetic data. *Sci. Rep.* 5, 13229.

Momigliano, P., Harcourt, R., Robbins, W.D., Jaiteh, V., Mahardika, G.N., Sembiring, A., and Stow, A. (2017a). Genetic structure and signatures of selection in grey reef sharks (*Carcharhinus amblyrhynchos*). *Heredity (Edinb)*. 1–12.

Momigliano, P., Jokinen, H., Fraimout, A., Florin, A., Norkko, A., and Merilä, J. (2017b). Extraordinarily rapid speciation in a marine fish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 6074–6079.

Morato, T., Hoyle, S.D., Allain, V., and Nicol, S.J. (2010). Seamounts are hotspots of pelagic biodiversity in the open ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9707–9711.

Mourier, J., Planes, S., and Buray, N. (2013a). Trophic interactions at the top of the coral reef food chain. *Coral Reefs* 32, 285.

Mourier, J., Buray, N., Schultz, J.K., Clua, E., and Planes, S. (2013b). Genetic Network and Breeding Patterns of a Sicklefins Lemon Shark (*Negaprion acutidens*) Population in the Society Islands, French Polynesia. *PLoS One* 8, e73899.

Myers, R.A., and Worm, B. (2003). Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature* 423, 280–283.

Myers, R.A., and Worm, B. (2005). Extinction, survival or recovery of large predatory fishes.

Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 360, 13–20.

Myers, N., Mittermeyer, R.A., Mittermeyer, C.G., Da Fonseca, G.A.B., and Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.

Myers, R.A., Baum, J.K., Shepherd, T.D., Powers, S.P., and Peterson, C.H. (2007). Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. *Science* 315, 1846–1850.

Nielsen, J., Hedeholm, R.B., Heinemeier, J., Bushnell, P.G., Christiansen, J.S., Olsen, J., Ramsey, C.B., Brill, R.W., Simon, M., Steffensen, K.F., et al. (2016). Eye lens radiocarbon reveals centuries of longevity in the Greenland shark (*Somniosus microcephalus*). *Science* (80-). 353, 702–704.

Nifong, J.C., Nifong, R.L., Silliman, B.R., Lowers, R.H., Guillette, L.J., Ferguson, J.M., Welsh, M., Abernathy, K., and Marshall, G. (2014). Animal-borne imaging reveals novel insights into the foraging behaviors and diel activity of a large-bodied apex predator, the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *PLoS One* 9, e83953.

Olin, J.A., Hussey, N.E., Grgicak-Mannion, A., Fritts, M.W., Wintner, S.P., and Fisk, A.T. (2013). Variable $\delta^{15}\text{N}$ Diet-Tissue Discrimination Factors among Sharks: Implications for Trophic Position, Diet and Food Web Models. *PLoS One* 8, e77567.

Ovenden, J.R. (2013). Crinkles in connectivity: Combining genetics and other types of biological data to estimate movement and interbreeding between populations. *Mar. Freshw. Res.* 64, 201–207.

Pala, C. (2013). Giant marine reserves pose vast challenges. *Science* (80-). 339, 640–641.

Palsbøll, P.J., Bérubé, M., and Allendorf, F.W. (2007). Identification of management units using population genetic data. *Trends Ecol. Evol.* 22, 11–16.

Pandolfi, J.M., Bradbury, R.H., Sala, E., Hughes, T.P., Karen, A., Cooke, R.G., Mcardle, D., Mcclenachan, L., Newman, M.J.H., Paredes, G., et al. (2003). Global Trajectories of the Long-Term Decline of Coral Reef Ecosystems. *Science* (80-). 301, 955–958.

Pante, E., and Simon-Bouhet, B. (2013). marmap: A Package for Importing, Plotting and Analyzing Bathymetric and Topographic Data in R. *PLoS One* 8, 6–9.

Papastamatiou, Y.P., Meyer, C.G., Carvalho, F., Dale, J.J., Hutchinson, M.R., and Holland, K.N. (2013). Telemetry and random-walk models reveal complex patterns of partial migration in a large marine predator. *Ecology* 94, 2595–2606.

Pardini, A.T., Jones, C.S., Noble, L.R., Kreiser, B., Malcolm, H., Bruce, B.D., Stevens, J.D., Cliff, G., Scholl, M.C., Francis, M., et al. (2001). Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature* 412, 139–140.

Pauly, D., and Palomares, M.L. (2005). Fishing down marine food web: It is far more pervasive than we thought. *Bull. Mar. Sci.* 76, 197–211.

Payne, N.L., Iosilevskii, G., Barnett, A., Fischer, C., Graham, R.T., Gleiss, A.C., and

Watanabe, Y.Y. (2016). Great hammerhead sharks swim on their side to reduce transport costs. *Nat. Commun.* *7*, 12289.

Payri, C., and Moatti, J.-P. (2018). Nouvelle-Calédonie: archipel de corail.

Pazmiño, D.A., Maes, G.E., Simpfendorfer, C.A., Salinas-de-León, P., and van Herwerden, L. (2017). Genome-wide SNPs reveal low effective population size within confined management units of the highly vagile Galapagos shark (*Carcharhinus galapagensis*). *Conserv. Genet.* *0*, 0.

Pazmiño, D.A., Maes, G.E., Green, M.E., Simpfendorfer, C.A., Hoyos-Padilla, E.M., Duffy, C.J.A., Meyer, C.G., Kerwath, S.E., Salinas-De-León, P., and Van Herwerden, L. (2018). Strong trans-Pacific break and local conservation units in the Galapagos shark (*Carcharhinus galapagensis*) revealed by genome-wide cytonuclear markers. *Heredity (Edinb.)*. *120*, 407–421.

Pedersen, M.W., Overballe-Petersen, S., Ermini, L., Sarkissian, C.D., Haile, J., Hellstrom, M., Spens, J., Thomsen, P.F., Bohmann, K., Cappellini, E., et al. (2015). Ancient and modern environmental DNA. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci* *370*, 20130383.

Peterman, W.E. (2014). ResistanceGA: An R package for the optimization of resistance. *BioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/007575>.

Peterson, S.H., Ackerman, J.T., and Eagles-Smith, C.A. (2017). Mercury contamination and stable isotopes reveal variability in foraging ecology of generalist California gulls. *Ecol. Indic.* *74*, 205–215.

Pianka, E.R. (1977). On r- and K-Selection. *Am. Nat.* *111*, 1169–1194.

Pikitch, E.K. (2018). A tool for finding rare marine species. *Sci. Mag.* *360*, 1180–1182.

Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., and Waits, L.P. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Mol. Ecol. Resour.* *14*, 109–116.

Pinsky, M.L., and Palumbi, S.R. (2014). Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. *Mol. Ecol.* *23*, 29–39.

Plaisance, L., Caley, M.J., Brainard, R.E., and Knowlton, N. (2011). The diversity of coral reefs: What are we missing? *PLoS One* *6*.

Porcher, I.F. (2005). On the gestation period of the blackfin reef shark, *Carcharhinus melanopterus*, in waters off Moorea, French Polynesia. *Mar. Biol.* *146*, 1207–1211.

Port, J.A., O'Donnell, J.L., Romero-Maraccini, O.C., Leary, P.R., Litvin, S.Y., Nickols, K.J., Yamahara, K.M., and Kelly, R.P. (2016a). Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Mol. Ecol.* *25*, 527–541.

Port, J.A., O'Donnell, J.L., Romero-Maraccini, O.C., Leary, P.R., Litvin, S.Y., Nickols, K.J., Yamahara, K.M., and Kelly, R.P. (2016b). Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Mol. Ecol.* *25*, 527–541.

Portnoy, D.S., Puritz, J.B., Hollenbeck, C.M., Gelsleichter, J., Chapman, D., and Gold, J.R.

(2015). Selection and sex-biased dispersal: the influence of philopatry on adaptive variation. *PeerJ* 1–20.

Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.

Qasem, L., Cardew, A., Wilson, A., Griffiths, I., Halsey, L.G., Shepard, E.L.C., Gleiss, A.C., and Wilson, R. (2012). Tri-axial dynamic acceleration as a proxy for animal energy expenditure; should we be summing values or calculating the vector? *PLoS One* 7.

Raitsos, D.E., Brewin, R.J.W., Zhan, P., Dreano, D., Pradhan, Y., Nanninga, G.B., and Hoteit, I. (2017). Sensing coral reef connectivity pathways from space. *Sci. Rep.* 7, 1–10.

Raj, A., Stephens, M., and Pritchard, J.K. (2014). FastSTRUCTURE: Variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics* 197, 573–589.

Ramachandran, S., Deshpande, O., Roseman, C.C., Rosenberg, N.A., Feldman, M.W., and Cavalli-Sforza, L.L. (2005). Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15942–15947.

Ramos, R., and González-Solís, J. (2012). Trace me if you can: The use of intrinsic biogeochemical markers in marine top predators. *Front. Ecol. Environ.* 10, 258–266.

Randall, J.E. (1992). Review of the biology of the tiger shark (*Galeocerdo cuvier*). *Mar. Freshw. Res.* 43, 21–31.

van Ravenzwaaij, D., Cassey, P., and Brown, S.D. (2016). A simple introduction to Markov Chain Monte–Carlo sampling. *Psychon. Bull. Rev.*

Read, T.C., Wantiez, L., Werry, J.M., Farman, R., Petro, G., and Limpus, C.J. (2014). Migrations of green turtles (*Chelonia mydas*) between nesting and foraging grounds across the Coral Sea. *PLoS One* 9, 1–10.

Read, T.C., Fitzsimmons, N.N., Wantiez, L., Jensen, M.P., Keller, F., Chateau, O., Farman, R., Werry, J., Mackay, K.T., Petro, G., et al. (2015). Mixed stock analysis of a resident green turtle, *Chelonia mydas*, population in New Caledonia links rookeries in the South Pacific. *Wildl. Res.* 42, 488–499.

Reid-Anderson, S., Bilgmann, K., and Stow, A. (2019). Effective population size of the critically endangered east Australian grey nurse shark *Carcharias taurus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 610, 137–148.

Richardson, J.L., Brady, S.P., Wang, I.J., and Spear, S.F. (2016). Navigating the pitfalls and promise of landscape genetics. *Mol. Ecol.* 25, 849–863.

Riginos, C., Crandall, E.D., Liggins, L., Bongaerts, P., and Treml, E.A. (2016). Navigating the currents of seascape genomics: how spatial analyses can augment population genomic studies. *Curr. Zool. in press*, doi: 10.1093/cz/zow067.

Ripple, W.J., Estes, J.A., Beschta, R.L., Wilmers, C.C., Ritchie, E.G., Hebblewhite, M., Berger, J., Elmhagen, B., Letnic, M., Nelson, M.P., et al. (2014). Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science* (80-.). 343.

Ritchie, E.G., and Johnson, C.N. (2009). Predator interactions, mesopredator release and biodiversity conservation. *Ecol. Lett.* 12, 982–998.

Robbins, W.D. (2006). Abundance, demography and population structure of the grey reef shark (*Carcharhinus amblyrhynchos*) and the whitetip reef shark (*Triaenodon obesus*) (Fam. Carcharhinidae).

Robbins, W.D., Hisano, M., Connolly, S.R., and Choat, J.H. (2006a). Ongoing Collapse of Coral-Reef Shark Populations. *Curr. Biol.* 16, 2314–2319.

Robbins, W.D., Hisano, M., Connolly, S.R., and Choat, J.H. (2006b). Ongoing collapse of coral-reef shark populations. *Curr. Biol.* 16, 2314–2319.

Rodríguez-Zárate, C.J., Sandoval-Castillo, J., van Sebille, E., Keane, R.G., Rocha-Olivares, A., Urteaga, J., and Beheregaray, L.B. (2018). Isolation by environment in the highly mobile olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*) in the eastern pacific. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285.

Roff, A.G., Brown, C.J., Priest, M.A., and Mumby, P.J. (2018). Decline of coastal apex shark populations over the past half century. *Commun. Biol.* 223, 1–11.

Roff, G., Doropoulos, C., Rogers, A., Bozec, Y.M., Krueck, N.C., Aurellado, E., Priest, M., Birrell, C., and Mumby, P.J. (2016). The Ecological Role of Sharks on Coral Reefs. *Trends Ecol. Evol.* 31, 395–407.

Rousset, F. (1997). Genetic Differentiation and Estimation of Gene Flow from FStatistics Under Isolation by Distance. *Genetics* 145, 1219–1228.

Ruppert, J.L.W., Travers, M.J., Smith, L.L., Fortin, M.J., and Meekan, M.G. (2013). Caught in the Middle: Combined Impacts of Shark Removal and Coral Loss on the Fish Communities of Coral Reefs. *PLoS One* 8, e74648.

Ruppert, J.L.W., Vigliola, L., Kulbicki, M., Labrosse, P., Fortin, M.-J., and Meekan, M.G. (2017). Human activities as a driver of spatial variation in the trophic structure of fish communities on Pacific coral reefs. *Glob. Chang. Biol.*

Sala, E., Mayorga, J., Costello, C., Kroodsma, D., Palomares, M.L.D., Pauly, D., Rashid Sumaila, U., and Zeller, D. (2018). The economics of fishing the high seas. *Sci. Adv.* 4, 1–14.

Sandin, S. a, Smith, J.E., Demartini, E.E., Dinsdale, E. a, Donner, S.D., Friedlander, A.M., Konotchick, T., Malay, M., Maragos, J.E., Obura, D., et al. (2008). Baselines and degradation of coral reefs in the Northern Line Islands. *PLoS One* 3, e1548.

Sansaloni, C., Petrolì, C., Jaccoud, D., Carling, J., Detering, F., Grattapaglia, D., and Kilian, A. (2011). Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of *Eucalyptus*. *BMC Proc.* 5, P54.

- Sawyer, S.C., Epps, C.W., and Brashares, J.S. (2011). Placing linkages among fragmented habitats: Do least-cost models reflect how animals use landscapes? *J. Appl. Ecol.* *48*, 668–678.
- Schadt, E.E., Linderman, M.D., Sorenson, J., Lee, L., and Nolan, G.P. (2010). Computational solutions to large-scale data management and analysis. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 647–657.
- Schubert, G., Stockhausen, M., Hoffmann, C., Merkel, K., Vigilant, L., Leendertz, F.H., and Calvignac-Spencer, S. (2015). Targeted detection of mammalian species using carrion fly-derived DNA. *Mol. Ecol. Resour.* *15*, 285–294.
- Schunter, C., Pascual, M., Garza, J.C., Raventos, N., and Macpherson, E. (2012). Kinship analyses identify fish dispersal events on a temperate coastline. *Proc. R. Soc. B* *27*, 489–496.
- Schwartz, F.J. (1984). Occurrence, abundance, and biology of the blacknose shark, *Carcharhinus acronotus* in North Carolina. *Northeast Gulf Sci.* *7*, 29–47.
- Selkoe, K. a, Henzler, C.M., and Gaines, S.D. (2008). Seascape genetics and the spatial ecology of marine populations. *Fish Fish.* *9*, 363–377.
- Selkoe, K.A., D'Aloia, C.C., Crandall, E.D., Iacchei, M., Liggins, L., Puritz, J.B., Von Der Heyden, S., and Toonen, R.J. (2016). A decade of seascape genetics: Contributions to basic and applied marine connectivity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *554*, 1–19.
- Séret, B. (1997). Poissons de profondeur de Nouvelle-Calédonie : apport des campagnes MUSORSTOM. Deep water fishes of New Caledonia : contributions of the MUSORSTOM cruises.
- Shah, V.B., and McRae, B.H. (2008). Circuitscape: a tool for landscape ecology. In *Proceedings of the 7th Python in Science Conference*, pp. 62–66.
- Shiffman, D.S., Gallagher, A.J., Boyle, M.D., Hammerschlag-Peyer, C.M., and Hammerschlag, N. (2012). Stable isotope analysis as a tool for elasmobranch conservation research: A primer for non-specialists. *Mar. Freshw. Res.* *63*, 635–643.
- Shirk, A.J., Wallin, D.O., Cushman, S.A., Rice, C.G., and Warheit, K.I. (2010). Inferring landscape effects on gene flow: A new model selection framework. *Mol. Ecol.* *19*, 3603–3619.
- Sigsgaard, E.E., Nielsen, I.B., Bach, S.S., Lorenzen, E.D., Robinson, D.P., Knudsen, S.W., Pedersen, M.W., Jaidah, M. Al, Orlando, L., Willerslev, E., et al. (2016). Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nat. Ecol. Evol.* *1*, 0004.
- Simoni, P., Colombani, N., Griffiths, R., Weimerskirch, H., Lallemand, J., Ugolini, D., Huruguen, C., Koninck, F. De, Tidjite, I., Vuki, N., et al. (2014). Walpole : Mission de suivi terrestre Septembre 2014.
- Simpfendorfer, C.A., Kyne, P.M., Noble, T.H., Goldsbury, J., Basiita, R.K., Lindsay, R., Shields, A., Perry, C., and Jerry, D.R. (2016). Environmental DNA detects Critically Endangered largetooth sawfish in the wild. *Endanger. Species Res.* *30*, 109–116.
- Sims, D.W., Southall, E.J., Humphries, N.E., Hays, G.C., Bradshaw, C.J.A., Pitchford, J.W., James, A., Ahmed, M.Z., Brierley, A.S., Hindell, M.A., et al. (2008). Scaling laws of marine predator

search behaviour. *Nature* 451, 1098–1102.

Slatkin, M. (1987). Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science* (80-). 236, 787–797.

Slon, V., Hopfe, C., Weiß, C.L., Mafessoni, F., De La Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., Rosas, A., Soressi, M., Knul, M. V., Miller, R., et al. (2017). Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science* (80-). 356, 605–608.

Sorenson, L., Santini, F., and Alfaro, M.E. (2014). The effect of habitat on modern shark diversification. *J. Evol. Biol.* 27, 1536–1548.

Spalding, M., Green, E., and Ravilious, C. (2001). *World atlas of coral reefs* (Univ of California Press).

Spear, S.F., Cushman, S.A., and McRae, B.H. (2016). Chapter 8: Resistance surface modeling in landscape genetics. *Landsc. Genet. Concepts, Methods Appl.* 129–148.

Speed, C.W., Meekan, M.G., Field, I.C., McMahon, C.R., Stevens, J.D., McGregor, F., Huveneers, C., Berger, Y., and Bradshaw, C.J.A. (2011). Spatial and temporal movement patterns of a multi-species coastal reef shark aggregation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 429, 261–275.

Speed, C.W., Meekan, M.G., Field, I.C., McMahon, C.R., Abrantes, K., and Bradshaw, C.J.A. (2012). Trophic ecology of reef sharks determined using stable isotopes and telemetry. *Coral Reefs* 31, 357–367.

Städele, V., and Vigilant, L. (2016). Strategies for determining kinship in wild populations using genetic data. *Ecol. Evol.* 6, 6107–6120.

Stat, M., John, J., DiBattista, J.D., Newman, S.J., Bunce, M., and Harvey, E.S. (2018). Combined use of eDNA metabarcoding and video surveillance for the assessment of fish biodiversity. *Conserv. Biol.* 0, 1–10.

Stein, R.W., Mull, C.G., Kuhn, T.S., Aschliman, N.C., Davidson, L.N.K., Joy, J.B., Smith, G.J., Dulvy, N.K., and Mooers, A.O. (2018). Global priorities for conserving the evolutionary history of sharks, rays and chimaeras. *Nat. Ecol. Evol.*

Stevens, J. (2000). The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES J. Mar. Sci.* 57, 476–494.

Strickler, K.M., Fremier, A.K., and Goldberg, C.S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biol. Conserv.* 183, 85–92.

Van Strien, M.J., Keller, D., and Holderegger, R. (2012). A new analytical approach to landscape genetic modelling: Least-cost transect analysis and linear mixed models. *Mol. Ecol.* 21, 4010–4023.

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., and Willerslev, E. (2012a). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 21, 2045–2050.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., and Rieseberg, L.H. (2012b). Environmental DNA. *Mol. Ecol.* *21*, 5.

Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation. *Genetics* *595*, 585–595.

Thomas, D.C., and Gray, D.R. (2002). COSEWIC assessment and update status report on the Woodland Caribou, *Rangifer tarandus caribou*. Canada. Comm. Status Endanger. Wildl. Canada, Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

Thomsen, P.F., and Willerslev, E. (2015). Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.* *183*, 4–18.

Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M., and Willerslev, E. (2012). Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS One* *7*, 1–9.

Thomsen, P.F., Møller, P.R., Sigsgaard, E.E., Knudsen, S.W., Jørgensen, O.A., and Willerslev, E. (2016). Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLoS One* *11*, 1–22.

Thomson, J.A., and Heithaus, M.R. (2014). Animal-borne video reveals seasonal activity patterns of green sea turtles and the importance of accounting for capture stress in short-term biologging. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* *450*, 15–20.

Tirard, P. (2011). *Requins du caillou*.

Toonen, H.M., and Bush, S.R. (2018). The digital frontiers of fisheries governance: fish attraction devices, drones and satellites. *J. Environ. Policy Plan.* *0*, 1–13.

Truelove, N.K., Kough, A.S., Behringer, D.C., Paris, C.B., Box, S.J., Preziosi, R.F., and Butler, M.J. (2017). Biophysical connectivity explains population genetic structure in a highly dispersive marine species. *Coral Reefs* *36*, 233–244.

Tucker, J.M., Allendorf, F.W., Truex, R.L., and Schwartz, M.K. (2017). Sex-biased dispersal and spatial heterogeneity affect landscape resistance to gene flow in fisher. *Ecosphere* *8*.

Tucker, M.A., Böhning-gaese, K., Fagan, W.F., Fryxell, J.M., Moorter, B. Van, Alberts, S.C., Ali, A.H., Allen, A.M., Attias, N., Avgar, T., et al. (2018). Moving in the Anthropocene: Global reductions in terrestrial mammalian movements. *Science* (80-.). *469*, 466–469.

Turner, C.R., Barnes, M.A., Xu, C.C.Y., Jones, S.E., Jerde, C.L., and Lodge, D.M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods Ecol. Evol.* *5*, 676–684.

Underwood, C.J. (2006). Diversification of the Neoselachii (Chondrichthyes) during the Jurassic and Cretaceous. *Paleobiology* *32*, 215–235.

Urban, D.L., and Keitt, T.H. (2001). Landscape Connectivity: A Graph-Theoretic Perspective. *Ecology* *82*, 1205–1218.

- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., et al. (2016a). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* *25*, 929–942.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., et al. (2016b). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* *25*, 929–942.
- Vélez-Zuazo, X., and Agnarsson, I. (2010). Shark tales: A molecular species-level phylogeny of sharks (Selachimorpha, Chondrichthyes). *Mol. Phylogenet. Evol.* *58*, 207–217.
- Venkatesh, B., Lee, A.P., Ravi, V., Maurya, A.K., Lian, M.M., Swann, J.B., Ohta, Y., Flajnik, M.F., Sutoh, Y., Kasahara, M., et al. (2014). Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature* *505*, 174–179.
- Vianna, G.M.S., Meekan, M.G., Ruppert, J.L.W., Bornovski, T.H., and Meeuwig, J.J. (2016). Indicators of fishing mortality on reef-shark populations in the world’s first shark sanctuary: the need for surveillance and enforcement. *Coral Reefs* *35*, 973–977.
- Villon, S., Mouillot, D., Chaumont, M., Darling, E.S., Subsol, G., Claverie, T., and Villéger, S. (2018). A Deep Learning algorithm for accurate and fast identification of coral reef fishes in underwater videos. *Ecol. Inform.* *6*, e26818v1.
- Virly, S. (2008). Atlas des mangroves de Nouvelle-Calédonie (Programme d’évaluation des ressources marines de la zone économique de Nouvelle-Calédonie (ZoNéCompany)).
- Wagner, H.H., and Fortin, M.-J. (2016). Chapter 5: Basics of spatial data analysis: Linking landscape and genetic data for landscape genetic studies. In *Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications*, pp. 77–98.
- Wallach, A.D., Ripple, W.J., and Carroll, S.P. (2015). Novel trophic cascades: Apex predators enable coexistence. *Trends Ecol. Evol.* *30*, 146–153.
- Wang, J. (2005). Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *360*, 1395–1409.
- Waples, R.S. (1991). Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of ‘species’ under the Endangered Species. *Mar. Fish. Rev.* *53*, 11–22.
- Waples, R.S., and Do, C. (2008). LDNE: A program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Resour.* *8*, 753–756.
- Waples, R.S., and Gaggiotti, O. (2006). What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol. Ecol.* *15*, 1419–1439.
- Waples, R.K., Larson, W.A., and Waples, R.S. (2016). Estimating contemporary effective population size in non-model species using linkage disequilibrium across thousands of loci. *Heredity (Edinb.)* *117*, 233–240.

- Watanabe, Y.Y., and Takahashi, A. (2013). Linking animal-borne video to accelerometers reveals prey capture variability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 2199–2204.
- Watson, R., and Pauly, D. (2001). Systematic distortions in world fisheries catch trends. *Nature* *414*, 534–536.
- Watson, J.E.M., Shanahan, D.F., Di Marco, M., Allan, J., Laurance, W.F., Sanderson, E.W., Mackey, B., and Venter, O. (2016). Catastrophic Declines in Wilderness Areas Undermine Global Environment Targets. *Curr. Biol.* *26*, 2929–2934.
- Watson, R.A., Nowara, G.B., Hartmann, K., Green, B.S., Tracey, S.R., and Carter, C.G. (2015). Marine foods sourced from farther as their use of global ocean primary production increases. *Nat. Commun.* *6*, 1–6.
- Weckworth, B. V., Hebblewhite, M., Mariani, S., and Musiani, M. (2018). Lines on a map: conservation units, meta-population dynamics, and recovery of woodland caribou in Canada. *Ecosphere* *9*, e02323.
- Weir, B.S., and Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* (N. Y). *38*, 1358.
- Weltz, K., Lyle, J.M., Ovenden, J., Morgan, J.A.T., Moreno, D.A., and Semmens, J.M. (2017). Application of environmental DNA to detect an endangered marine skate species in the wild. *PLoS One* *12*, 1–16.
- Werry, J.M., and Clua, E. (2013). Sex-based spatial segregation of adult bull sharks , *Carcharhinus leucas* , in the New Caledonian great lagoon. *Aquat. Living Resour.* *26*, 281–288.
- Werry, J.M., Planes, S., Berumen, M.L., Lee, K.A., Braun, C.D., and Clua, E. (2014). Reef-fidelity and migration of tiger sharks, *Galeocerdo cuvier*, across the coral sea. *PLoS One* *9*.
- Wetherbee, B.M., Crow, G.L., and Lowe, C.G. (1997). Distribution, reproduction and diet of the gray shark *Carcharhinus amblyrhynchus* in Hawaii. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *151*, 181–189.
- White, T.D., Carlisle, A.B., Kroodsma, D.A., Block, B.A., Casagrandi, R., De Leo, G.A., Gatto, M., Micheli, F., and McCauley, D.J. (2017a). Assessing the effectiveness of a large marine protected area for reef shark conservation. *Biol. Conserv.* *207*, 64–71.
- White, T.D., Carlisle, A.B., Kroodsma, D.A., Block, B.A., Casagrandi, R., De Leo, G.A., Gatto, M., Micheli, F., and McCauley, D.J. (2017b). Assessing the effectiveness of a large marine protected area for reef shark conservation. *Biol. Conserv.* *207*, 64–71.
- Whitlock, M.C., and Lotterhos, K.E. (2015). Reliable Detection of Loci Responsible for Local Adaptation: Inference of a Null Model through Trimming the Distribution of F_{ST} . *Am. Nat.* *186*, S24–S36.
- Wilcox, T.M., McKelvey, K.S., Young, M.K., Jane, S.F., Lowe, W.H., Whiteley, A.R., and Schwartz, M.K. (2013). Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLoS One* *8*.

Willerslev, E., Hansen, A.J., Binladen, J., Brand, T.B., Gilbert, M.T.P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D.A., and Cooper, A. (2003). Diverse Plant and Animal Genetic Records from Holocene and Pleistocene Sediments. *Science* (80-.). *300*, 791–795.

Wilmers, C.C., Nickel, B., Bryce, C.M., Smith, J.A., Wheat, R.E., Yovovich, V., and Hebblewhite, M. (2015). The golden age of bio-logging: How animal-borne sensors are advancing the frontiers of ecology. *Ecology* *96*, 1741–1753.

Wirsing, A.J., Heithaus, M.R., and Dill, L.M. (2007). Can measures of prey availability improve our ability to predict the abundance of large marine predators? *Oecologia* *153*, 563–568.

With, K.A., Gardner, R.H., Turner, M.G., and Landscape, M.G. (1997). Landscape Connectivity and Population Distributions in Heterogeneous Environments. *Oikos* *78*, 151–169.

Wootton, J.T., and Emmerson, M. (2005). Measurement of Interaction Strength in Nature. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* *36*, 419–444.

Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 114–138.

WWF (2018). Living Planet Report - 2018: Aiming Higher.

Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K., Takahashi, K., Sawada, H., Murakami, H., Tsuji, S., Hashizume, H., Kubonaga, S., Horiuchi, T., et al. (2016). Environmental DNA as a “snapshot” of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS One* *11*, 1–18.

Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki, H., Kondoh, M., Minamoto, T., and Miya, M. (2017). Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Sci. Rep.* *7*, 40368.

Yesson, C., Clark, M.R., Taylor, M.L., and Rogers, A.D. (2011). The global distribution of seamounts based on 30 arc seconds bathymetry data. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* *58*, 442–453.

Young, H.S., McCauley, D.J., Galetti, M., and Dirzo, R. (2016). Patterns, Causes, and Consequences of Anthropocene Defaunation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* *47*, 333–358.

Zeller, K.A., McGarigal, K., and Whiteley, A.R. (2012). Estimating landscape resistance to movement: A review. *Landsc. Ecol.* *27*, 777–797.

Zeller, K.A., Creech, T.G., Millette, K.L., Crowhurst, R.S., Long, R.A., Wagner, H.H., Balkenhol, N., and Landguth, E.L. (2016). Using simulations to evaluate Mantel-based methods for assessing landscape resistance to gene flow. *Ecol. Evol.* *6*, 4115–4128.

Zeller, K.A., Vickers, T.W., Ernest, H.B., and Boyce, W.M. (2017). Multi-level, multi-scale resource selection functions and resistance surfaces for conservation planning: Pumas as a case study. *PLoS One* *12*, 1–20.

Zeller, K.A., Jennings, M.K., Vickers, T.W., Ernest, H.B., Cushman, S.A., and Boyce, W.M. (2018). Are all data types and connectivity models created equal? Validating common connectivity approaches with dispersal data. *Divers. Distrib.*

ANNEXES

ANNEXE 1 – CHAPITRE 1

Wilderness reefs in New Caledonia and worldwide

Wilderness areas can be defined as natural systems isolated enough from human activities to remain ecologically quasi-intact (Mittermeier et al., 2003). However, how can ‘quasi-intactness’ be measured and how isolated should an area be to be considered wilderness are difficult questions whose answers are probably ecosystem-dependant.

For coral reefs in New Caledonia, fish community metrics display asymptotic S-shaped curves along a gradient of human impact (D’Agata et al., 2016). Inflections to asymptotic values are reached after 6.5 hours of travel time from market for biomass, 7.5 hours for herbivore biomass, 12 hours for apex predator biomass (excluding sharks), 14 hours for species richness, 16.5 hours for functional richness, 21.5 hours for functional diversity, and 25 hours for reef sharks (D’Agata et al., 2016; Juhel et al., 2017). Thus, any reef in New Caledonia at more than 10-20 hours travel time from market has reached asymptotic values for at least one fish community metrics and can thus be considered as ‘quasi-intact’ or in a ‘natural’ status for the considered metrics.

Several wilderness reefs are known in the world (*e.g.* Chagos, remote atolls of Polynesia and New Caledonia, Cocos island, Rowley Shoals, Kingman Reef, Palmyra) and these disparate remote areas tend to have similar characteristics (D’agata et al., 2016; Graham and McClanahan, 2013; Sandin et al., 2008). However, how many are left in the world is unknown, although the calculation of travel time to all reefs of the world suggests that they are very rare (Maire et al., 2016). Globally, 58% of coral reefs are located at more than 30 minutes from the nearest human settlement, 25% at less than 4 hours from nearest major markets and 31% at more than 12 hours from nearest markets (Maire et al., 2016).

Using the travel time database for the reefs of the world (Maire et al., 2016) and thresholds of 10-20h travel times for wilderness reefs (D’agata et al., 2016), we calculate here how many wilderness reefs remain in the world, and how many are in New Caledonia. We report that 5% of world reefs are > 10h travel time from the nearest human settlement (41% from major markets), 2.6% at > 15h (20% from markets), and only 1.5% at > 20h (9% from markets). These remaining wilderness coral reefs areas are over-represented in the New Caledonian archipelago, whose waters contain approximately 10% (10h threshold), 18% (15h) or 33% (20h) of remaining wilderness reefs

worldwide. Using the most conservative approach, considering functionally quasi-intact reefs at more than 20 hours of travel time from nearest human settlements, wilderness reefs represent only 1.5% of all coral reefs, and New Caledonia is a hotspot containing one-third of the remaining wilderness reefs.

ANNEXE 2 – CHAPITRE 5

Complément méthodologique à la théorie des circuits

LA THÉORIE DES CIRCUITS POUR MODÉLISER LA CONNECTIVITÉ

2. Principe général et utilisation

a. Terminologie

Les modèles de connectivité issus de la théorie des circuits électriques (*Circuit Theory*, **CT** par la suite) sont appliqués à des **graphes** (Harary, 1969). La terminologie associée est présentée dans la Figure S1.

Ces graphes sont des réseaux composés de **nœuds** connectés par des « liens ».

Il y a deux liens entre chaque paire de nœuds (*e.g.* entre *a* et *b* dans la Figure S1A), un dans chaque sens. L'importance écologique de l'asymétrie de ces liens peut être forte dans certains cas (Gustafson and Gardner, 1996), notamment en termes de probabilités de dispersion. En revanche, sa prise en compte dans les modèles de connectivité est très compliquée (Urban and Keitt, 2001). Si ces liens sont symétriques ($m_{ab} = m_{ba}$), et ce sera le cas dans cette étude et dans la CT en général, ces liens sont appelés des **arêtes** (*edges*) (Urban and Keitt, 2001). Ces arêtes reflètent les connexions fonctionnelles entre les nœuds, telles que la dispersion (McRae et al., 2008), qui est alors la même dans les deux sens.

Le **poids** de chaque arête correspond typiquement à la force de la connexion entre les deux nœuds qu'elle relie. Par analogie, ce poids peut correspondre par exemple à la facilité de mouvement des animaux et/ou au nombre d'individus qui ont effectivement dispersé entre ces nœuds. Le poids est appelé m_{ab} dans l'exemple de la Figure S1, avec un poids plus important de l'arête *a-b* dans la Figure S1C.

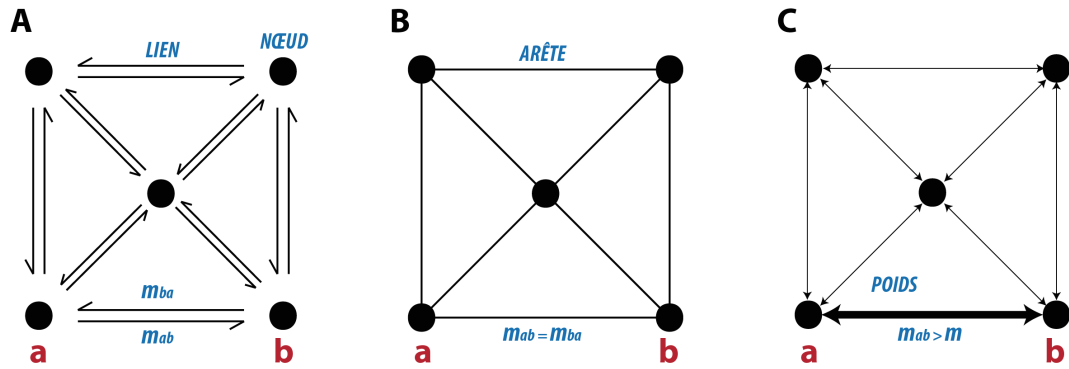


Figure S1. Exemples de graphes définis par un ensemble de nœuds, reliés entre eux par des liens. (A) m_{ba} correspond au lien du nœud b vers le nœud a . Si $m_{ab} = m_{ba}$, et donc les liens sont symétriques, ils sont alors appelés des arêtes (B). Le graphe (C) présente un exemple avec des poids différents des arêtes.

Les circuits électriques sont définis dans ce manuscrit de la même manière que présentés par Brad H. McRae dans la plupart de ses travaux (McRae, 2006; McRae et al., 2008), c'est-à-dire comme des réseaux de nœuds connectés entre eux par des résistances électriques. Le graphe de la Figure S1 devient alors par analogie celui présenté en Figure S2A. Ces circuits électriques sont utilisés par analogie pour représenter et analyser les graphes. Les concepts de base de résistance, conductance, courant et voltage s'appliquent alors.

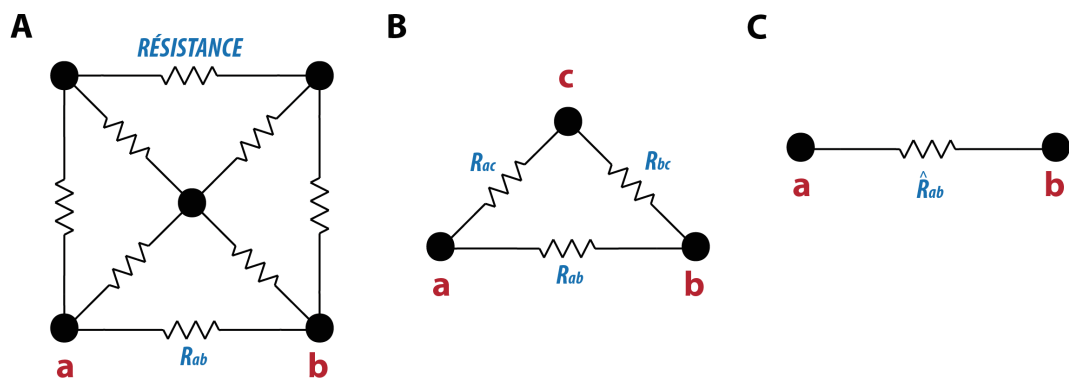


Figure S2. (A) Graphe pour lequel les arêtes ont été remplacées par des résistances afin de créer un circuit analogue. (B) Exemple simplifié. (C) Schéma équivalent au schéma (B), avec $\hat{R}_{ab} = R_{ab} \cdot (R_{ac} + R_{bc}) / (R_{ab} + R_{ac} + R_{bc})$

Prenons un exemple plus simple que la Figure S2A (Figure S2B-C) avec trois nœuds et des résistances entre ces nœuds de valeurs R_{ab} , R_{ac} , et R_{bc} . En appliquant la loi d'Ohm afin de calculer la résistance équivalente entre les nœuds a et b , nous obtenons une valeur donnée par la formule suivante :

$$\hat{R}_{ab} = \frac{R_{ab}(R_{ac} + R_{bc})}{R_{ab} + R_{ac} + R_{bc}}, \quad \hat{R}_{ab} \text{ étant la résistance équivalente entre } a \text{ et } b$$

La conductance électrique, G (l'inverse de la résistance), correspond à la capacité d'un corps à laisser passer une certaine quantité de courant électrique lorsque soumis à une différence de potentiel électrique. Par analogie, la conductance \hat{G}_{ab} ($= 1/\hat{R}_{ab}$) ainsi calculée correspond à un flux de gènes entre deux nœuds, connectés par migration. Ainsi lorsque l'on augmente le nombre de connections faites par addition d'autres connections possibles entre les nœuds a et b (directement en ajoutant des résistances en parallèle) et/ou en ajoutant des nœuds entre a et b (comme c'est le cas avec c), la conductance G augmente. Il est simple de vérifier que $\hat{G}_{ab} = 1/\hat{R}_{ab} = (R_{ab}+R_{ac}+R_{bc}) / [R_{ab}*(R_{ac}+R_{bc})]$, dans un cas à trois nœuds, est supérieur à G_{ab} (voir formule ci-dessus pour le calcul de \hat{G}_{ab}). Par analogie, le niveau de flux de gènes à l'équilibre entre deux nœuds connectés par migration augmentera si des mouvements parallèles sont autorisés, via une augmentation de la dispersion directe des gènes, ou à travers des flux de gènes passant par des nœuds intermédiaires.

La **distance de résistance** entre chaque paire de nœuds peut être définie comme la résistance équivalente entre ces nœuds, lorsque chaque arête du graphe est remplacée par une résistance, la résistance associée étant égale au poids de chaque arête (Klein and Randic, 1993).

b. Application de la théorie des circuits

Afin d'intégrer les analyses de la théorie des circuits électriques à des données spatiales, il faut convertir des données de type raster en graphes. Considérons ainsi un graphe composé de nœuds et d'arêtes (résistances). Pour représenter un raster comme un circuit électrique, il faut convertir les pixels de résistance de valeur finie en nœuds (Figure S3). Chaque nœud est placé au centre de pixels. Un raster sera souvent composé de zones qui ne seront pas accessibles, par exemple une terre émergée pour des organismes aquatiques. Ces zones bloquent tout chemin possible leur passant au travers, elles ont une résistance infinie et les pixels associés ne seront donc pas considérés comme des nœuds et seront absents sur le graphe.

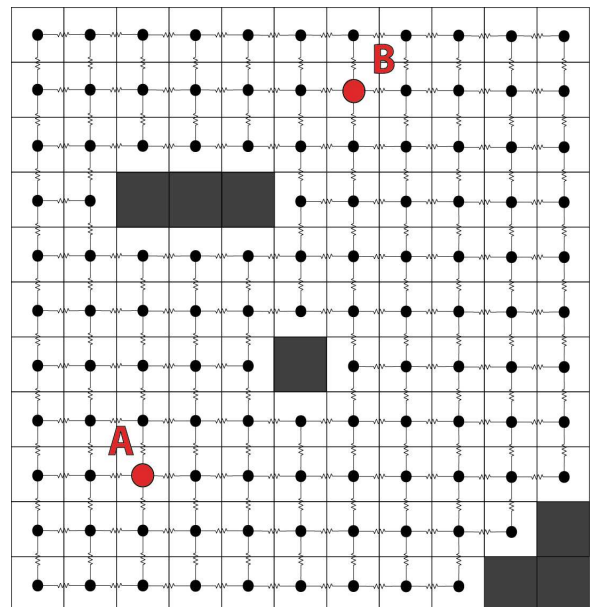


Figure S3. Graphe représentant un paysage simple pour lequel chaque pixel a la même valeur de résistance, sauf les pixels gris foncé qui sont des zones non accessibles et donc à résistance infinie.

Sur l'exemple de la Figure S3, les arêtes sont de poids tous égaux, cela correspond donc à une hypothèse où les animaux dispersent dans un environnement complètement homogène sauf lorsqu'ils rencontrent des barrières infranchissables (zones émergées). Prenons le cas où les pixels de ce raster ne seraient pas exactement homogènes. C'est une hypothèse probable, bien qu'elle reste à vérifier pour chaque espèce étudiée, car certaines valeurs de variables environnementales ou biogéographiques opposeront une résistance plus forte à la dispersion. Ainsi, de la même manière que les nœuds de résistance infinie, chaque nœud se voit attribuer une valeur de résistance dépendant de différents paramètres choisis au préalable. Des nœuds adjacents sont ainsi connectés par des résistances électriques, ayant pour valeur la moyenne de la résistance des deux nœuds qu'elle connecte.

Une distance de résistance peut donc être calculée entre chaque paire de nœuds, par exemple entre deux populations A et B (Figure S3). Cela peut être fait pour chaque paire de nœuds et donc chaque paire de pixels du raster que l'on souhaite étudier (hors pixels de résistance infinie). Cette distance de résistance entre deux nœuds a alors pour valeur la résistance équivalente entre ces nœuds, prenant en compte l'ensemble du circuit électrique que constitue le raster.

L'application de la théorie des circuits pour l'étude de la connectivité entre populations permet alors principalement deux choses. Premièrement, le calcul de cette distance de résistance entre deux populations est rendu possible au travers du paysage environnant, comme proxy de la connectivité entre ces populations. Deuxièmement, elle permet d'établir des cartes de densité de courant électrique.

c. Comparaison avec le chemin de moindre coût (LCP)

Après présentation des deux méthodes, il est maintenant possible de visualiser le fait que la CT soit très différente du LCP. En effet, même si les variables d'entrée sont communes (position du couple de points étudiés et carte – autrement appelée surface – de résistance), les calculs associés ainsi que les hypothèses écologiques sous-jacentes sont très différents. Le LCP suppose une direction de dispersion bien définie, c'est-à-dire une connaissance du chemin de moindre résistance par l'animal, tandis que la CT propose une variable prenant en compte un mouvement plus exploratoire, à travers l'ensemble du paysage environnant. Dans certains cas, le LCP peut être très corrélé à la distance de résistance obtenue par CT. Il peut s'avérer en revanche très biaisé dans certaines conditions de configuration du paysage, comme

par exemple sur la Figure S4 où deux populations présentes dans des configurations de paysage très différentes seront reliées par le même LCP. La distance de résistance calculée par CT serait en revanche très différente entre les populations des deux cas : très faible dans la première situation (Figure S4A), mais relativement forte dans la seconde situation

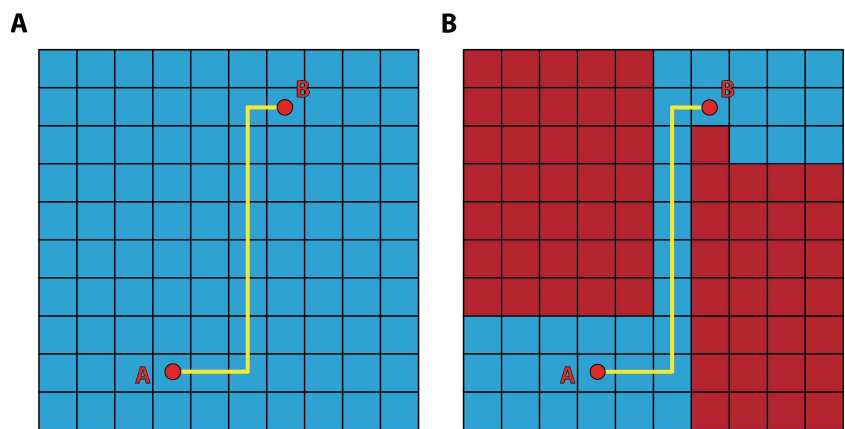


Figure S4. Deux exemples de configuration du paysage avec des cellules peu résistantes (en bleu) et à forte résistance (en rouge). Dans les deux configurations, qui pourtant sont très différentes d'un point de vue écologique, le chemin de moindre coût (LCP) entre les deux populations sera le même.

(Figure S4B). Dans cet exemple, la CT révèle la différence de connectivité entre les deux populations là où le LCP indique une connectivité égale.

Le LCP n'est donc pas très pertinent dans notre cadre d'étude comme variable de comparaison deux-à-deux. En revanche, comme nous le verrons dans le chapitre 5, les cartes basées sur des calculs de LCP (e.g. *accumulation cost surfaces*) peuvent révéler des informations intéressantes, notamment en permettant une visualisation de la connectivité et de l'isolement de certaines zones.

3. Création des cartes de résistance

Lorsque l'on veut calculer la distance de résistance entre deux sites, la CT prend comme variables d'entrée une carte de résistance ainsi que la position de ces deux sites. Cette dernière est connue. En revanche, savoir quelle carte de résistance utiliser afin de relier la distance de résistance obtenue par CT et la distance génétique observée est une question plus compliquée qu'elle ne le paraît. En effet, les cartes de résistance sont souvent créées *a priori*, basées sur des données de différents types dépendant des questions scientifiques sous-jacentes (Spear et al., 2016). Beaucoup d'études se basent sur des dires d'expert afin de générer des cartes de résistance et ainsi proposer un modèle de dispersion (Zeller et al., 2012). Cette approche est particulièrement pertinente pour certains organismes (*e.g.* Creech et al., 2017). En revanche, l'utilisation de cartes de résistance optimisées grâce à différentes données est désormais plus commune notamment avec une incorporation des données génétiques. Zeller *et al.* montre en 2018 que les approches de CT couplées à des données génétiques permettent la paramétrisation de cartes de résistance, qui s'avèrent plus explicatives de la dispersion chez les pumas lorsque comparées avec des cartes de résistance obtenues par d'autres méthodes (Zeller et al., 2017, 2018). D'autres études se basent sur l'utilisation de procédures d'optimisation, et des outils comme *ResistanceGA* sont proposés (Khimoun et al., 2017; Peterman, 2014), permettant de tester de nombreuses combinaisons de formes de relation et de valeurs pour des paramètres environnementaux et/ou biogéographiques afin de trouver le modèle le plus optimal. Le développement de ce genre de procédure est aujourd'hui accessible grâce à l'augmentation de la puissance de calcul et permet alors de prendre en compte des hypothèses non triviales. Une procédure d'optimisation personnalisée a été développée pour ce manuscrit, impliquant la création de manière automatisée d'un nombre important de cartes de résistance. Les principales caractéristiques de ces cartes sont présentées Figure S5.

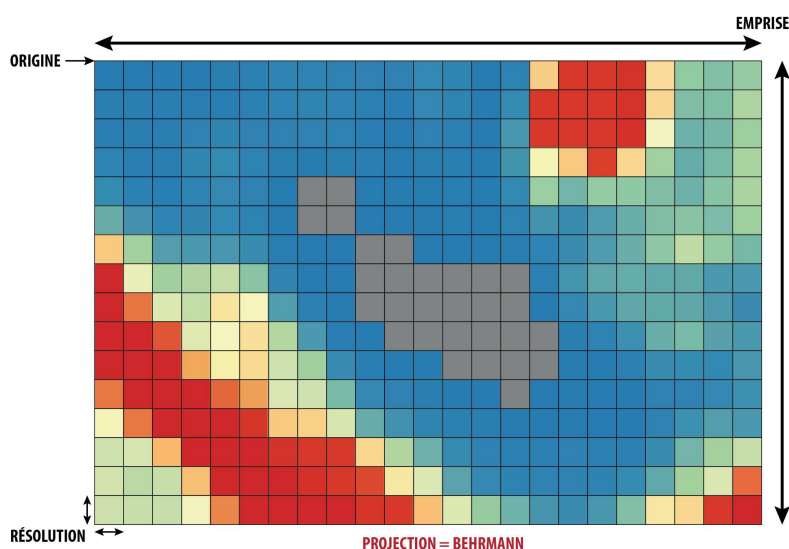


Figure S5. Principales caractéristiques des cartes de résistance telles qu'utilisées dans ce manuscrit. Elles sont dans un système de projection (exemple Behrmann) ont une origine donnée, ainsi qu'une étendue et une résolution. Enfin, chaque pixel se voit attribuer une valeur de résistance. Par exemple sur cette carte, gris = résistance infinie (terre émergée), bleu = résistance faible, rouge = résistance forte.

a. Référentiel, projection

Le système de projection cartographique utilisé dans cette étude est celui de Behrmann. Il s'agit d'une projection équivalente cylindrique dont les parallèles standards sont 30°N et 30°S. Cette projection produit des cartes ne présentant que très peu de distorsion dans les zones autres que les pôles, ce qui implique que la subdivision en pixels dans les zones de notre étude donnera des pixels de taille quasi-égale selon la latitude.

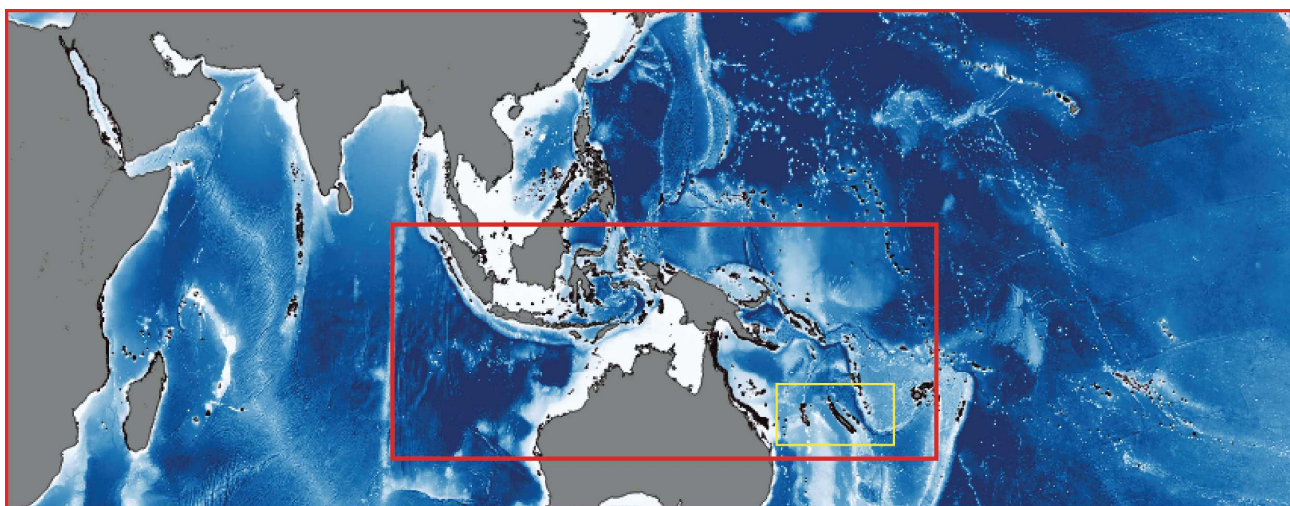
b. Carroyage

Le carroyage correspond au type de subdivision des cellules dans un raster. Bien qu'un carroyage de forme hexagonale soit le plus pertinent pour représenter une connectivité dans toutes les directions, les analyses réalisées à partir des cartes de résistance nécessitent de la donnée matricielle avec un carroyage carré.

c. Emprise géographique

L'emprise géographique d'un raster est déterminée par les coordonnées des quatre coins (x_{min} , x_{max} , y_{min} , y_{max}). L'origine d'un raster correspond aux coordonnées du coin supérieur gauche (x_{min} , y_{max}). Bien définir l'emprise de la carte de résistance est important pour la théorie des circuits (CT), notamment lorsque les points définissant les sites (ou populations) sont proches des frontières de la carte (Koen et al., 2010). La CT prend en compte le paysage environnant pour calculer une distance de résistance entre deux points. Lorsque ces points sont proches des frontières, c'est-à-dire lorsque l'emprise de la carte est trop restreinte, la distance de résistance s'en trouvera sous-estimée car les frontières correspondent à une zone de résistance infinie. Pour pallier cela, les emprises des cartes choisies ont été étendues. De plus, pour la partie impliquant une simulation des sites (voir plus loin dans ce chapitre), l'emprise des cartes de résistance a été étendue avec une zone tampon supplémentaire permettant un calcul de distance de résistance non biaisé.

Plusieurs emprises ont été utilisées dans ce manuscrit, chacune associée à une échelle d'étude différente (Figure S6). L'emprise la plus vaste s'étend au-delà de l'aire de répartition de l'espèce étudiée (*Carcharhinus amblyrhynchos*). Cette aire de répartition est centrée sur le Pacifique. La projection utilisée (Behrmann) étant centrée sur l'Atlantique, un décalage a été réalisé afin de faire correspondre la projection et l'aire de répartition, permettant ainsi un calcul des distances de résistance.



*Figure S6. Différentes emprises utilisées lors de cette étude. La plus grande correspond à l'aire de répartition étendue de *Carcharhinus amblyrhynchos*, l'emprise moyenne (rouge) correspond à la zone où ont été prélevés les échantillons, tandis que l'emprise en jaune correspond à une emprise plus locale dans laquelle sont inclus l'ensemble des récifs des eaux de Nouvelle-Calédonie.*

d. Résolution

La résolution de la carte de résistance correspond à la taille des pixels. Elle ne peut être choisie au hasard et ne pourra être changée facilement en cours d'étude. Lorsque seront testées différentes cartes de résistance afin de trouver le meilleur modèle explicatif de la différenciation génétique de notre espèce, la carte optimale sera choisie en fonction des calculs de distance de résistance par CT, calculs dépendant directement de la résolution. Les paramètres liés à cette carte optimale (relation entre paramètres biogéographiques et résistance) dépendent alors directement de la résolution. Si l'on change de résolution, ces paramètres changent également, et de manière non linéaire et non prévisible trivialement. Il est donc important de choisir la résolution des cartes dès le départ et de ne pas en changer.

Différentes valeurs de résolution ont ainsi été testées (1 km, 5 km et 10 km) grâce à une série d'essais préliminaires. Le passage d'une résolution de 10 km à une résolution de 1 km multiplie par 100 le nombre de pixels de la carte. Or, les calculs de distance de résistance se font en 120 minutes pour 16 sites (120 paires) lorsque la résolution est de 1 km, alors que les mêmes calculs passent à 20 secondes à une résolution de 10 km, soit 360 fois plus rapide (sur un MacBook Pro 16Go, 2,2 GHz Intel Core i7). Afin de vérifier l'influence de la résolution sur la robustesse des calculs, les distances de résistance entre tous les sites d'échantillonnage ont été estimées sur des cartes de résistance

différentes et correspondant à des résolutions variées (1 et 10 km). La corrélation entre ces distances de résistance s'est avérée très importante.

De plus, il a été montré une forte résidence pour l'espèce étudiée (*Carcharhinus amblyrhynchos*) ainsi qu'un domaine vital relativement faible, d'un ordre de grandeur autour de 10 km (Espinoza et al., 2014b; White et al., 2017b). Afin de réduire les temps de calcul et de se rapprocher de l'ordre de grandeur de ce domaine vital, une résolution de 10 km a été choisie par la suite.

Pour effectuer le changement de résolution des rasters de 1 km à 10 km, la valeur de chaque pixel de la carte à 10 km a été calculée en moyennant la valeur des 100 pixels de la carte à 1 km. Les rasters de distance à l'habitat ont été calculés à partir de rasters d'habitat à une résolution de 200 mètres, moyennés à 1 km puis à 10 km.

e. Code et travail par batch

Comme nous allons le voir dans la partie suivante d'optimisation des modèles, il a été important de travailler de manière automatisée car de nombreuses cartes de résistance ont été réalisées dans cette étude. Des scripts optimisés ont été développés sur Python, permettant de créer un grand nombre de rasters grâce à des formules personnalisables, à partir d'un ou de plusieurs rasters (contenant des couches biogéographiques), et ceci en un temps de calcul relativement court. Les codes sont disponibles à la demande (germain.boussarie@gmail.com).

4. Lancement des calculs de CT via GFLOW

Les calculs de distance de résistance grâce à la CT ont ainsi été réalisés pour chaque carte de résistance créée, avec comme variables d'entrée la position des 16 sites d'échantillonnage en génétique (sans les Chagos). Ils ont été effectués grâce au logiciel GFLOW, un logiciel open-source développé en langage C (Leonard et al., 2017). Ce logiciel permet la parallélisation des calculs de théorie des circuits et améliore grandement les capacités de Circuitscape (Shah and McRae, 2008), logiciel de référence en CT. Il existe principalement trois logiciels couramment utilisés dans la littérature calculant des métriques de CT : Circuitscape, graphHab (Foltête et al., 2012) et le package R *gdistance* (van Etten, 2012). Circuitscape est le logiciel le plus utilisé en biologie de la conservation. Il est également le plus optimisé en termes de temps de calcul comparé à d'autres. Cependant, il demande énormément de mémoire (30GB par processus) et effectue les calculs de manière séquentielle, limitant grandement les travaux en obligeant à réduire la résolution des cartes, leur emprise, ou encore le nombre de sites étudiés (Leonard et al., 2017). Leonard et al. ont ainsi estimé que GFLOW met 5 jours à effectuer un calcul qui prendrait 950 jours sur le même cluster en utilisant Circuitscape.

Des modifications dans le code source de GFLOW (en langage C) ont été apportées afin de régler des erreurs de convergence qui mettaient un terme aux calculs avant l'estimation de toutes les distances de résistance. Le lancement de GFLOW s'effectue par batch grâce à un script en langage Bash.

Enfin, GFLOW permet d'établir des cartes de densité de courant électrique (Figure S7), rendant possible la visualisation de la connectivité du paysage, des routes préférentielles, et des corridors de migration éventuels.

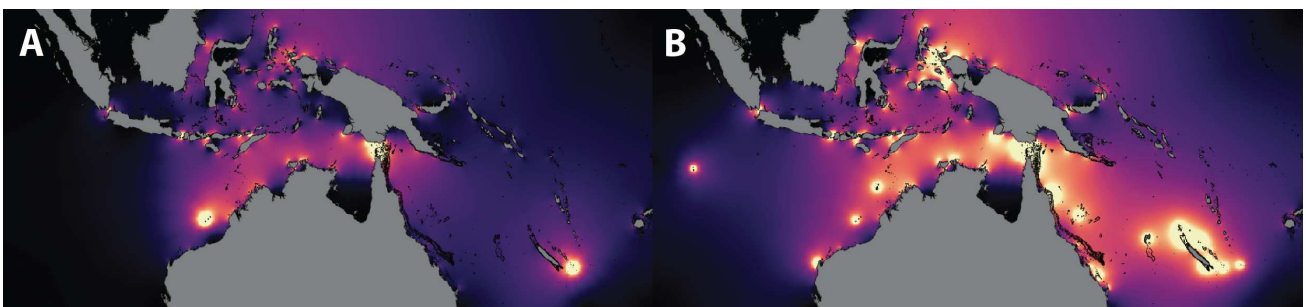


Figure S7. Cartes de densité de courant électrique issues de GFLOW, avec un modèle nul de résistance ($R = 1$ pour toutes les cellules, supposant un environnement homogène, et $R = \infty$ pour les terres émergées) : (A) carte issue d'une seule paire de points (e.g. Rowley Shoals et Walpole) et (B) carte cumulée de toutes les paires de points (120 paires pour les 16 sites de l'étude).

Résumé : Les requins forment un des groupes de prédateurs les plus diversifiés, jouant des rôles importants au sein des écosystèmes marins. Ils forment également l'un des groupes les plus menacés car vulnérables aux pressions anthropiques du fait de leurs traits de vie particuliers. Leurs populations s'effondrent, avec des chutes d'abondance drastiques dans tous les écosystèmes, et même des espèces relativement communes sont quasi-menacées. Malgré l'importance des ressources déployées pour le suivi des populations de requins, 41% des 482 espèces recensées dans la Liste Rouge de l'UICN n'ont pas de statut de conservation par manque de données. Il devient donc primordial d'améliorer les connaissances sur ces espèces afin de les protéger et enrayer leur déclin. Il s'agit notamment de mieux caractériser la présence, la structure et la connectivité des populations de requins pour mieux définir leur statut UICN, les zones prioritaires de gestion et optimiser les efforts de conservation mis en place. Cette thèse s'appuie sur l'émergence de nouvelles technologies pour combler les lacunes de connaissances sur les requins des récifs coralliens tropicaux et proposer des actions de gestion. D'une part, une méthode d'analyse des communautés de requins par collecte et séquençage d'ADN présent dans l'environnement (métabarcoding d'ADN environnemental ; ADNe) a été développée au cours de cette thèse, puis mise en parallèle avec des suivis exhaustifs par des méthodes traditionnelles d'étude des populations de requins. Cette approche rapide et non-invasive a permis d'identifier 21 espèces de requins dans les eaux de deux domaines biogéographiques distincts (Caraïbes et Nouvelle-Calédonie). De plus, les patrons de diversité et d'abondance des fragments d'ADNe détectés coïncident avec les gradients de pression anthropique et les niveaux de protection des zones échantillonnées. L'analyse de 22 échantillons d'ADNe dans l'archipel de la Nouvelle-Calédonie a permis de déceler la présence de plus d'espèces que par 2 758 plongées scientifiques réparties sur presque 30 ans et 385 caméras appâtées déployées pendant deux ans, et ce, à la fois proche de l'homme et dans les récifs éloignés. D'autre part, la structure et connectivité des populations d'une espèce plus commune, *Carcharhinus amblyrhynchos*, ont été caractérisées par une approche de génomique du paysage. Cette thèse s'appuie sur un échantillonnage génétique conséquent en Nouvelle-Calédonie et dans plusieurs autres sites de l'Indo-Pacifique (515 requins). Une approche d'isolement par la résistance via la théorie des circuits a été développée afin de caractériser les paramètres influençant la dispersion de cette espèce. Ainsi, il a été montré que les zones de forte bathymétrie constituent une forte barrière à la dispersion tandis que la proximité à l'habitat récifal en est un facilitateur. La modélisation de la différenciation génétique à haute résolution et à l'échelle de l'aire de répartition de cette espèce (Indo-Pacifique) a permis de définir des unités de conservation hiérarchiques et un nombre important de sites isolés. Enfin, une approche intégrant le déclin des abondances dans les zones anthropisées a montré une fragmentation des populations de *C. amblyrhynchos* et a permis d'identifier certains récifs éloignés de l'homme comme refuges mais aussi sources pour un repeuplement éventuel des récifs où les populations sont menacées. Cette thèse démontre ainsi le potentiel de l'analyse de l'ADNe pour dévoiler la présence d'espèces rares et furtives telles que les requins, donnant espoir pour combler les lacunes dans leurs statuts de conservation UICN. Elle révèle également la persistance des populations résiduelles en milieu anthropisé, qui pourraient éventuellement montrer des altérations comportementales comme l'utilisation d'habitats plus profonds ou une nocturnité plus importante. Elle décrit enfin non seulement la structure fine à grande échelle des populations d'une espèce quasi-menacée, mais identifie également des unités de conservation et des zones prioritaires à protéger pour une spatialisation des mesures de gestion à différentes échelles.

Mots-clés : requins, génomique du paysage, ADN environnemental, récifs coralliens, écologie, conservation.

Abstract: Sharks represent one of the most diverse groups of predators, playing important functional roles in coastal and oceanic ecosystems. They are also one of the most threatened groups because of their vulnerability to anthropogenic pressures due to their particular life history traits. Shark populations are therefore collapsing with drastic decrease in abundance in all marine ecosystems. Even relatively common species are near-threatened. Despite the deployment of important resources for shark population assessments, 41% of the 482 shark species on the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened Species lack a conservation status due to data deficiency. Improving our knowledge on such species is thus crucial for efficient protection to slow down their decline. More particularly, there is a necessity for a better characterization of presence, structure and connectivity of shark populations to define their conservation status, prioritize spatial management and optimize conservation efforts. This thesis relies on the emergence of new technologies to fill knowledge gaps on tropical coral reef sharks and to suggest conservation measures for better management. First, a method to survey shark communities has been developed during this thesis, based on the collection and sequencing of DNA present in the environment (environmental DNA metabarcoding; eDNA). Then, this method has been compared to exhaustive surveys of reef shark communities with traditional methods. This quick and non-invasive approach detected at least 21 shark species in waters of two distinct biogeographical areas (Caribbean and New Caledonia). Moreover, diversity and abundance patterns of DNA reads match with anthropogenic impact gradients and protected status of the sampled areas. The analysis of 22 eDNA samples detected more species in both remote reefs and impacted areas of the New Caledonian archipelago than 2758 scientific dives conducted during nearly 30 years and 385 baited remote underwater videos deployed over two years. Then, population structure and connectivity of a more common reef shark species, *Carcharhinus amblyrhynchos*, have been characterized using a seascape genomics approach. This thesis is based on a substantial genetic sampling in the archipelago of New Caledonia but also in several other sites in the Indo-Pacific (515 sharks in total). An isolation-by-resistance approach using circuit theory has been developed to explore what parameters are driving the genetic differentiation of *C. amblyrhynchos*. Here I show that deep oceanic areas act as strong barriers and proximity to habitat is a facilitator for dispersal. High-resolution modelling of genetic differentiation at the entire distribution range of the species (Indo-Pacific) led to the definition of hierarchical conservation units and a high number of isolated sites. Then, an approach taking into account the decline of abundance in impacted reefs showed an important fragmentation of shark populations and allowed the identification of remote reefs as refuges but also sources through dispersal towards impacted areas, insuring population persistence at a regional scale. This thesis demonstrates the potential of eDNA analysis for unveiling the presence of rare and elusive species such as sharks and for filling knowledge gaps in the conservation status of sharks. It also reveals the persistence of residual populations in impacted areas, that could show behavioral alterations like shifts in habitat use towards deeper waters or increased nocturnality. Finally, this thesis not only describes the population structure of a near-threatened species at high resolution and global scale, but also identifies conservation units and areas of high conservation priority that could help in the near future for the spatialization of marine management at multiple scales.

Keywords: sharks, seascape genomics, environmental DNA, coral reefs, ecology, conservation.