Projet « Génétique Tortue »

Evaluation de la variabilité génétique des différentes colonies de tortues vertes (*Chelonia mydas*) du Sud Ouest de l'océan Indien

Jérôme BOURJEA[1] – Ingénieur en halieutique

[1] Station IFREMER de La Réunion

Laboratoire « Ressources Halieutiques » (RH)

février 2005

Financement - MOM N° 03D09
Du 19 juillet 2004

Rapport Final

Réf. IFREMER/DR/05/R/02/JB

SOMMAIRE

SOMMAIRE 1
Introduction 2
Première Partie : La problématique du projet 3
1. L'ESPECE CIBLE *CHELONIA MYDAS* : QUELQUES ELEMENTS DE BIOLOGIE 3
2. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES GENETIQUES DE *CHELONIA MYDAS* 4
3. PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE 4
Deuxième Partie : mise en place des protocoles 6
1. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS 6
1.1. Caractéristiques des individus échantillonnés 6
1.2. Le prélèvement des échantillons 6
1.3. Conservation des échantillons 7
1.4. Le nombre d'échantillon par site et les zones échantillonnées 7
2. ANALYSE DES ECHANTILLONS EN LABORATOIRE 9
2.1. Choix du matériel génétique : La Région de Contrôle de l'ADNmt 9
2.2. Les protocoles utilisés 9
2.2.1. Extraction de l'ADN 9
2.2.2. Mesure de la quantité d'ADN extraite 10
2.2.3. Amplification spécifique de la région de contrôle de l'ADNmt 10
2.2.4. Le séquençage de la région de contrôle 10
3. METHODE D'ANALYSE DES SEQUENCES 10
Troisième Partie : Résultats de l'analyse génétique des échantillons 11
1. BILAN DES PRELEVEMENTS GENETIQUES 11
2. BILAN DES EXTRACTION/AMPLIFICATION EN LABORATOIRE 11
3. BILAN DU SEQUENÇAGE 11
3.1. Caractérisation des séquences obtenues 12
3.2. Distance génétique entre les différents haplotypes 14
3.2.1. Les haplotypes du sud ouest de l'océan Indien 14
3.2.2. Les haplotypes de Chelonia mydas connues 15
3.3. Structuration des populations échantillonnées 17
3.4. Relation entre distance génétique et distance géographique 17
3.4.1. Test de Mantel 17
3.4.2. Régression linéaire entre distance génétique et distance géographique 18
Quatrième Partie : discussion 19
1. LES HAPLOTYPES DE *CHELONIA MYDAS* DANS LE SUD OUEST DE L'OCEAN INDIEN 19
2. LE CANAL DU MOZAMBIQUE, UNE PHYLOGEOGRAPHIE PARTICULIERE 19
3. DES UNITES DE GESTION POSSIBLES DANS LE CANAL DU MOZAMBIQUE 21
CONCLUSION 22
BIBLIOGRAPHIE 23
ANNEXES 26

INTRODUCTION

La tortue verte, ou tortue franche (*Chelonia mydas*) est la tortue marine la mieux représentée dans le sud ouest de l'océan Indien. Bien que protégée, elle est toujours exploitée pour sa viande à Madagascar, aux Comores et en Afrique de l'Est. La croissance démographique dans cette région du monde et le développement des activités humaines sur ses habitats accroissent la pression sur cette espèce, alors que des projets de valorisation écotouristiques se mettent en place (Ciccione et al., 2002).

Les îles et îlots du sud ouest de l'océan Indien, et notamment Mayotte et les îles Eparses Françaises (Tromelin, Glorieuses, Juan de nova et Europa), sont des sites majeurs de reproduction encore préservés pour cette espèce. Ils représentent également des zones de prédilection pour l'étude et la compréhension de sa biologie. Eparpillées dans le canal du Mozambique, ces îles ont pour caractéristiques de former des zones de reproduction isolées les unes des autres. Les tortues femelles revenant toujours pondre sur leur lieu de naissance, étudier la phylogénie matriarcale entre les îles et les flux géniques entre elles peuvent apporter des informations importantes sur la biologie de cette espèce. En effet, la génétique, couplée à d'autres études scientifiques sur l'écophysiologie, le tracking ou encore le comportement, peut s'avérer être un outil efficace pour mieux comprendre son comportement encore peu connu.

Ce projet est un volet du programme d'étude des tortues vertes du sud ouest de l' océan Indien menée conjointement depuis plus de 10 ans par l'Ifremer de La Réunion et le **C**entre d'**E**tude et de **D**écouverte des **T**ortues **M**arines (CEDTM). L'objectif de ce volet génétique est la caractérisation génétique des populations de femelles nidifiant sur différents sites, afin de compléter les connaissances sur la biologie de cette espèce dans le sud ouest de l'océan Indien. Pour cela l'étude prévoit la validation d'un marqueur génétique unique pour différencier les différentes colonies entre elles, et l'intégration des résultats dans une base de données génétique basée à La Réunion. Un étroit partenariat a été mis en place entre l'Ifremer Réunion/CEDTM, le laboratoire Génétique de l'Ifremer La Tremblade et le laboratoire de biologie moléculaire du Cirad de La Réunion (Saint Pierre) pour mener à bien ce projet.

Une meilleure connaissance de la variabilité génétique des différentes colonies et la répartition de stocks génétiquement différents sont des outils importants pour la définition d'une stratégie cohérente de gestion durable de cette espèce.

PREMIERE PARTIE : LA PROBLEMATIQUE DU PROJET

1. L'ESPECE CIBLE *CHELONIA MYDAS* : QUELQUES ELEMENTS DE BIOLOGIE

Les tortues marines, dont l'apparition remonte à plus de 100 millions d'années, représentent une composante ancienne et importante de la biodiversité mondiale. Sur les huit espèces de tortues marines, cinq sont présentes dans l'océan Indien : la tortue verte (*Chelonia mydas*,), la caouanne (*Caretta caretta*), la tortue à écaille (*Eretmochelys imbricata*), la tortue luth (*Dermochelys coriacea*) et la tortue olivâtre (*Lepidochelys olivacea*). Seules les tortues vertes et à écailles se reproduisent dans les îles françaises de la zone ouest de l'océan Indien,

La tortue verte (Figure 1) est une espèce à vie longue et à maturité sexuelle tardive. C'est une excellente navigatrice qui effectue des migrations pouvant atteindre plusieurs milliers de kilomètres entre les aires d'alimentation et de reproduction. Bien que parfaitement adaptée à la vie en mer, c'est dans le sable des plages tropicales qu'elle enterre ses œufs. Par ailleurs, il semblerait que les femelles soient fidèles à leur site de ponte en revenant toujours sur les même~~s~~ plages pour pondre. Ces femelles adultes pondent suivant un cycle pluriannuel, venant pondre plusieurs fois au cours d'une saison de ponte. Après 50 à 60 jours d'incubation, les jeunes tortues éclosent, sortent de leur nid et se dirigent vers la mer pour commencer leur cycle de vie en pleine mer. Chez la tortue verte, cette première phase dite pélagique dure environ 5 ans. Au terme de ces quelques années pélagiques, les juvéniles rejoignent la côte pour entamer une phase de croissance qui durera plusieurs années jusqu'à la maturité sexuelle. Durant cette période, ils se déplaceront entre zones coralliennes et herbiers côtiers. Une fois matures, les tortues entament une migration vers leur plage d'origine pour se reproduire.

Ce cycle de vie complexe limite souvent nos efforts pour les étudier et les protéger. La phase de migration reste à ce jour la moins bien connue. Les relectures de bagues posées sur les femelles après la ponte, ainsi que le suivi satellitaire ont fournit des premières informations sur le comportement migratoire des tortues marines entre aire de nourrissage et de reproduction. Une étude génétique des populations de tortues vertes de l'ouest de l'océan Indien doit permettre de progresser dans la compréhension de ces déplacements océaniques.

*Figure 1 : Une tortue verte (*chelonia mydas*) sur son herbier (gauche), et après sa ponte (droite)*

2. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES GENETIQUES DE *CHELONIA MYDAS*

La tortue verte (*Chelonia mydas*) présente un très faible polymorphisme génétique, bien plus faible que la majorité des animaux évolués. Une étude du polymorphisme biochimique des protéines solubles (Bonhomme, 1986) a pu mettre en évidence la présence de deux grands stocks de tortues vertes dans le monde, un Atlantique, l'autre Indo-Pacifique. Ce très faible taux de polymorphisme est à mettre en rapport avec une très grande stabilité génômique attestée par des vitesses d'évolution chromosomique extrêmement faibles chez les Chélonidés tel que la tortue verte, où le caryotype semble ne pas avoir évolué depuis 200 millions d'années (Bickman, 1981). Cette stabilité globale du matériel génétique implique un très probable flux génique entre les différentes populations.

Cette faible variabilité de l'ADN nucléaire a rapidement conduit à analyser l'ADN mitochondrial (ADNmt), plus mutagène. L'étude des sites de restriction de l'ADNmt circulaire a permis de confirmer qu'il existait bien deux grands stocks dans les eaux du globe, avec une importante variabilité entre les deux, mais qu'il existait également une variabilité intra-stock, bien que beaucoup plus faible (Bowen, 1992). Ces études ont permis, dans le Pacifique (Fitzsimmons, 1997) et dans l'Atlantique (Lahanas et al, 1998), de mettre en évidence cette variabilité intra-stock et de déterminer un certain nombre de colonies génétiquement différentes. Dans les deux cas, un dendrogramme des distances génétiques entre les différentes colonies a pu être mis en place.

Dans l'ouest de l'océan Indien, des analyses génétiques sur les îles de Tromelin et Europa ont permis de mettre en évidence que les populations de tortues vertes de cette région appartenaient aux deux stocks précédemment cités (Broderick et al, 2005, NS). Suivant l'origine de la tortue échantillonnée, celle-ci s'apparente plus au stock Atlantique (échantillons prélevés à Europa) ou Indo-Pacifique (échantillons prélevés à Tromelin).

Actuellement, la majorité des analyses génétiques portent sur le séquençage de la région de contrôle de l'ADN circulaire des mitochondries, région d'environ 500 paires de bases. Les amorces de ces régions sont disponibles et publiées. Quelques travaux récents ont été réalisés sur de l'ADN nucléaire et mettent en évidence une importante variabilité au niveau des microsatellites et minisatellites (Fitzsimmons, 1999 Fitzsimmons et al, 1995).

3. PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE

La tortue verte est la tortue marine la mieux représentée dans le sud ouest de l'océan Indien. Très peu d'études en génétique ont été réalisées sur cette espèce dans cette région du monde. Depuis les années 80, des travaux concernant la biologie, l'écologie et la dynamique de stocks ont été menées, mais aucune hypothèse concernant le comportement migratoire n'a pu réellement être vérifiée. Une étude de leur variabilité génétique apparaît donc aujourd'hui un élément indispensable d'une part pour confirmer les hypothèses relatives au comportement migratoire de l'espèce, et d'autre part pour mettre en évidence et quantifier de nouvelles voies de migration entre les aires de ponte et de reproduction.

L'objectif de cette première étude régionale sur la génétique des tortues vertes est donc double :

- Confirmer que la population de tortues vertes de l'ouest de l'océan Indien présente deux origines différentes, une partie issue du stock Atlantique, l'autre du stock Indo-Pacifique. Ces deux stocks seraient séparés dans l'océan Indien par une barrière environnementale non encore identifiée, mais qui serait de part et d'autre de Madagascar.

- Identifier s'il existe une variabilité inter-population pouvant caractériser les individus d'une même colonie.

Cette étude aura donc pour but de valider pour le sud ouest de l'océan Indien, un marqueur génétique unique susceptible de caractériser chacun des deux stocks présents dans l'ouest de l'océan

Indien. Ce marqueur doit permettre de déterminer si la colonie d'une île de l'océan Indien est issue du stock Atlantique ou du stock Indo-Pacifique.

Au delà de cet objectif, il sera intéressant d'observer si ce marqueur génétique permet de caractériser chaque colonie d'un même stock dans l'optique de pouvoir les discriminer entre elles.

L'identification des caractéristiques de chaque colonie est un élément fondamental dans l'étude et la compréhension des phénomènes migratoires, car elle permettra d'établir la répartition des tortues vertes entre leurs aires d'alimentation et leur site de reproduction. Les implications en terme de gestion et de protection des tortues marines sont très importantes.

DEUXIEME PARTIE : MISE EN PLACE DES PROTOCOLES

1. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

1.1. Caractéristiques des individus échantillonnés

Le matériel génétique ciblé est l'ADN mitochondrial, matériel génétique qui, chez tout individu, provient lors de la reproduction exclusivement de la mère. Les tortues femelles revenant en général pondre sur leur plage d'origine, travailler sur l'AND mitochondrial de femelle en ponte revient à travailler sur du matériel génétique propre à une zone de ponte. Les individus ciblés pour l'échantillonnage sont donc exclusivement les femelles en ponte sur une zone donnée.

Afin de ne pas échantillonner deux fois la même tortue, celle ci est marquée à l'aide d'une bague métallique numérotée. Une mesure curviligne de la carapace est réalisée et les caractéristiques particulières de la tortue sont notées.

L'ADN mitochondrial étant transmis par la mère à sa descendance, l'ensemble des bébés tortues d'une même ponte possède un ADN mitochondrial identique à celui de leur mère. Analyser les caractéristiques génétiques de l'ADN mitochondrial d'un unique bébé tortue par ponte revient donc à déterminer les caractéristiques de la mère. Afin de compléter si nécessaire les échantillonnages de femelles en ponte, des prélèvements de tissus ont été réalisés sur un bébé tortue mort-né d'une ponte donnée.

Afin de ne pas échantillonner 2 pontes d'une même tortue, les prélèvements de bébés tortues sur un même site de ponte n'ont pas été mené sur une période excédant 1 semaine. En effet, l'intervalle de temps pour une femelle entre 2 montées successives pour pondre est supérieur à 15 jours. Limiter l'échantillonnage des nids sur une semaine limite donc fortement les probabilités de double échantillonnage.

1.2. Le prélèvement des échantillons

Afin de réaliser les analyses génétiques sur *Chelonia mydas*, il est nécessaire de prélever un échantillon biologique de tortue. Les protocoles classiques d'analyse génétique se basent généralement, pour des animaux évolués, sur du matériel biologique de type sang. Le prélèvement de tissus a été privilégié à celui du sang en raison de la difficulté de réalisation de ce dernier. Des tests de prélèvement de sang ont été menés sur des tortues élevées en captivités au Centre d'Etude et de Découverte des Tortues Marines (CEDTM) de La Réunion. Le prélèvement de sang au niveau des sinus veineux du cou ou de la queue nécessite une immobilisation de la tortue difficile à réaliser sur le terrain et perturbant le processus de ponte.

Ce prélèvement est réalisé pendant la phase de post-ponte, phase durant laquelle la tortue rebouche sa cavité corporelle et où la présence humaine ne perturbe plus le processus de ponte. Un bout de tissu de 2-3 mm² est prélevé à l'aide d'un scalpel stérile sur le bord de la nageoire postérieure (Figure 2). Pour éviter la contamination du matériel biologique prélevé, la lame du scalpel est méticuleusement changée entre 2 prélèvements.

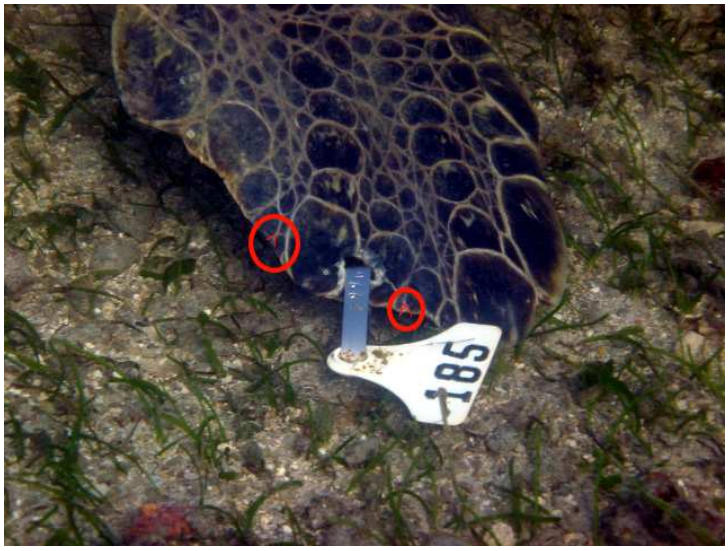


Figure 2 : Zone retenue pour la réalisation des prélèvements de tissus : l'extrémité de la nageoire postérieure, entre deux écailles

1.3. Conservation des échantillons

Une fois le prélèvement réalisé, le bout de tissu est déposé dans un Ependorf contenant une solution saturée en sel et 2% de DMSO (Diméthyl Sulfoxide ; Dutton, 1996). Les échantillons peuvent ensuite être conservés à température ambiante durant toute la durée des prélèvements sans que l'ADN présent dans le tissu ne soit dégradé. Cette technique de conservation d'échantillon biologique est particulièrement intéressante sur des sites de ponte isolés comme les îles Eparses où la logistique ne permet que difficilement d'avoir de la glace ou un congélateur à disposition.

Afin d'optimiser la qualité de l'ADN présent dans les tissus, les échantillons sont tout de même congelés à – 20°C dès le retour de la mission sur le terrain.

1.4. Le nombre d'échantillon par site et les zones échantillonnées

Afin de pouvoir réaliser une analyse statistique de qualité, 20 échantillons au minimum par site de ponte devront être prélevés. Dans la mesure du possible et par mesure de sécurité car les sites de pontes sont généralement très isolés, 30 tortues devront être échantillonnées par site.

Sept sites ont été ciblés dans le sud ouest de l'océan Indien en fonction de leurs caractéristiques géographiques et de l'abondance des tortues qui y pondent (Figure 3) :

- **Europa (22°21'S ;40°21'E)** : C'est la plus méridionale des îles Eparses. Elle se situe à 300 km du Cap Saint Vincent (Madagascar) et à 550 km des Côtes du Mozambique.

- **Juan de Nova (17°03'S ; 42°43'E)** : C'est également une des îles Eparses du Canal du Mozambique. Elle se situe au niveau de la partie la plus étroite du canal, à 280 km des côtes africaine et à 175 de celles de Madagascar.

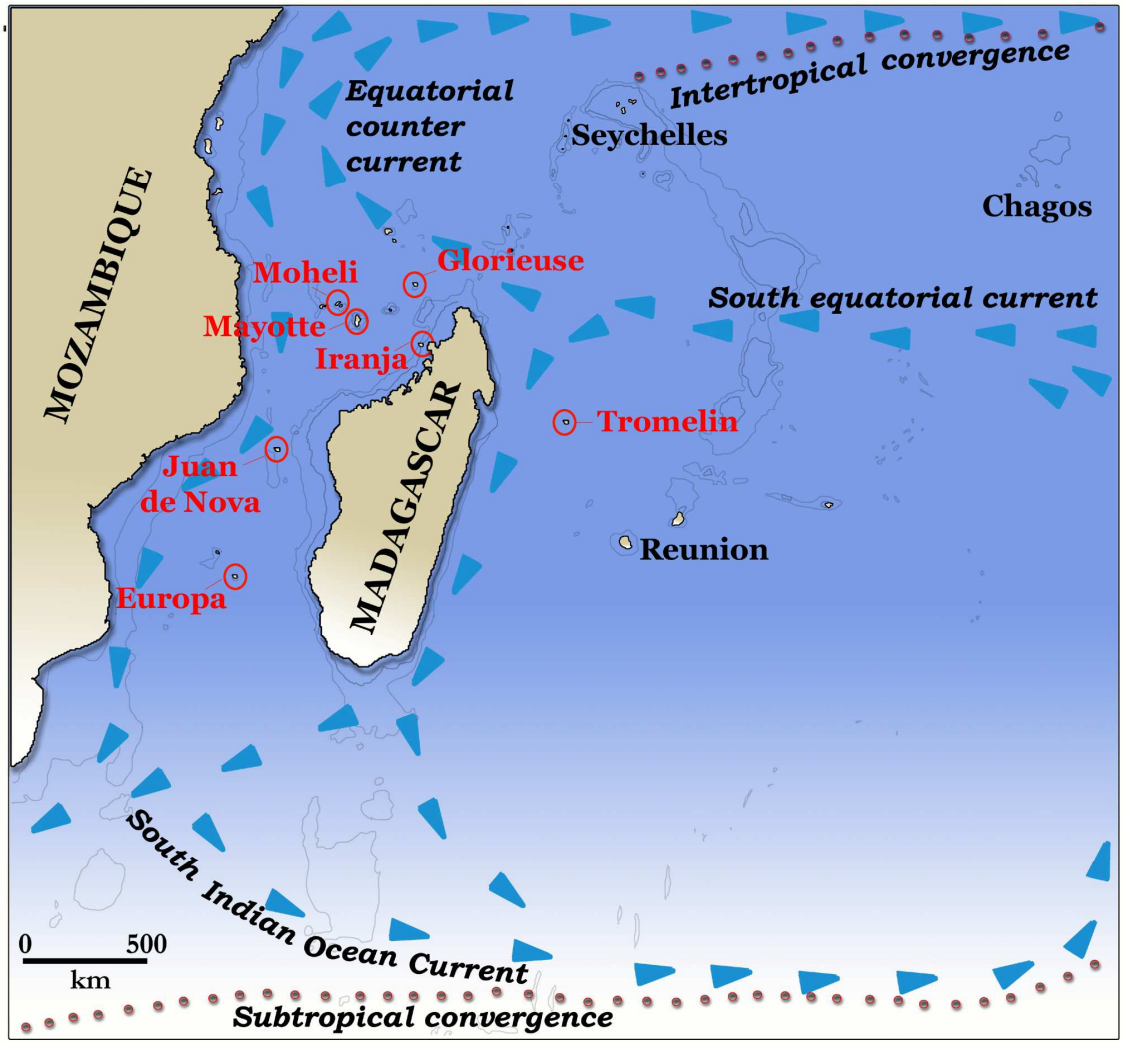
- **Îles Glorieuses (11°35'S ; 47°18'E)** : Cette troisième île Eparse est postée à l'entrée du canal du Mozambique, à 220 km du Cap D'ambre (Madagascar).

- **<u>Île de Nosy Iranja (13°36'640''S ; 47°49'551''E)</u>** : cette petite île malgache de 13 hectares se situe au niveau de la côte nord ouest malgache, à quelques kilomètres de Nosy Bé.

- **<u>Mayotte (12°9'S ; 45°30'E)</u>** : Collectivité Territoriale Française au nord du Canal du Mozambique, cette île présente de nombreuses plages de ponte. Les échantillons ont été tous prélevés au niveau de la plage de Saziley, au sud-est de Mayotte.

- **<u>Mohéli (12°3'S ; 44°45'E)</u>**: C'est l'une des îles des Comores située à quelques dizaines de kilomètres de Mayotte. Les échantillons ont tous été prélevés au niveau des la plage d'Itsamia.

- **<u>Tromelin (15°53'S ; 54°31'E)</u>** : c'est la quatrième et dernière des îles Eparses. C'est la seule à ne pas être située dans le canal du Mozambique, mais à 470 km à l'Est de Madagascar.



<u>Figure 3 : Les 7 sites d'échantillonnages retenus pour le projet</u>

C'est dans le cadre de la Mission de prélèvement des échantillons aux îles Glorieuses qu'un film sur le projet a été réalisé. Ce film (« Glorieuses…Génétique », 13 mn), réalisé par le centre multimédia de l'Université de La Réunion est fourni avec ce rapport.

2. ANALYSE DES ECHANTILLONS EN LABORATOIRE

L'analyse des échantillons génétiques a pu être réalisée à La Réunion grâce au laboratoire de biologie moléculaire du Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad) au Pôle de Protection des Plantes (Pôle 2P) de Saint Pierre. Les techniques d'analyses moléculaires de l'ADN sont complexes, une première phase de test a du être menée en collaboration avec le Cirad. Cette phase de test qui s'est déroulée en 2 missions dans le laboratoire de biologie moléculaire du Cirad a eu pour but de développer et valider les protocoles d'analyse moléculaires qui seront utilisés pour réaliser la caractérisation génétique des tortues en fonction de leur site de nidification, à savoir :

i. Extraction de l'ADN des tissus

ii. Amplification de la portion d'ADN à étudier par PCR

iii. Migration sur gel

iv. Séquençage de l'ADN amplifié

Les rapports de ces missions sont en annexe 1 et 2.

2.1. Choix du matériel génétique : La Région de Contrôle de l'ADNmt

L'analyse génétique sera réalisée au niveau de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial de tortues femelles, séquence de 428 paires de bases.

L'ADN mitochondrial (ADNmt) se transmet à la descendance par la mère lors de la fécondation, par les mitochondries présentes dans l'ovule. Ainsi, l'étude des caractéristiques génétiques de cette portion d'ADN revient à étudier les caractéristiques génétiques d'un site de ponte défini puisque les femelles nées sur un site, reviennent pondre en général sur ce même site.

Cette région de contrôle de l'ADNmt est la séquence nucléotidique permettant la duplication de l'ADN mitochondrial lors de la division de la mitochondrie. Le couple d'amorces de cette région nécessaire à l'amplification de cette portion d'ADN ont été identifiée (Fitzsimmons, 1998 ; Lahanas, 1998 ; Norman et al, 1994) :

TCR-5 : TTGTACATCTACTTATTTACCAC (Fitzsimmons, 1998)
TCR-6 : CAAGTAAAACTACCGTATGCC (Norman et al, 1994)

⇨ Couple **MIT**

2.2. Les protocoles utilisés

2.2.1. Extraction de l'ADN

Les techniques classiques d'extraction de l'ADN au Phénol Chloroforme et à l'aide de Kit d'extraction (de type « Kit Quigen ») ont été testées avec succès. Cependant, l'utilisation d'un Chelatant protéique (le CHELEX BioRad®) s'est avérée à la fois moins coûteuse et plus rapide pour une efficacité similaire aux autres techniques d'extraction.

Les quantités d'ADN extraites par le Chelex sont faibles comparativement aux deux autres techniques d'extraction, mais ces quantités restent suffisantes pour réaliser l'amplification spécifique de la région de contrôle de l'ADNmt. Le détail du protocole d'extraction de l'ADN à partir de tissu de tortue est en annexe 3.

2.2.2. Mesure de la quantité d'ADN extraite

Afin d'optimiser la phase d'amplification par PCR, la quantité d'ADN extraite de chaque échantillon est mesurée au fluorimètre et ramenée à une concentration de 5 nanogrammes par microlitre pour la réaction PCR. Le protocole utilisé pour cette mesure est en annexe 4.

2.2.3. Amplification spécifique de la région de contrôle de l'ADNmt

Différentes Taq polymérases et températures d'hybridation des amorces ont été testées. Les meilleurs résultats ont été obtenus grâce à une double polymérase à haute fidélité (« Advantage 2 PCR Enzyme Systems ») qui permet de limiter au maximum les erreurs d'élongation du fragment amplifié. La température optimale d'hybridation des amorces a été déterminée à 55°C. Le détail du protocole d'amplification est en annexe 5.

Une électrophorèse de vérification de l'amplifia est réalisée après la phase d'amplification. Cette électrophorèse permet d'une part de vérifier que la phase d'amplification a réussi, et d'autre part d'évaluer la quantité d'ADN amplifiée. Il est indispensable d'avoir une quantité d'ADN minimum de l'ordre de 200 ng pour pouvoir passer à la phase de séquençage. Le détail du protocole de vérification de l'amplifia est en annexe 6.

Les ADN amplifiés sont purifiés à l'aide d'un Kit de purification Quiagen. Ce Kit permet d'obtenir des amplifias dit « propres » et prêts à être séquencés.

2.2.4. Le séquençage de la région de contrôle

Le séquençage est sous traité à la société allemande MWG. Afin de limiter les risques d'erreurs dus à la phase de séquençage, les amplifias seront séquencés en sens (5'-3') et anti-sens (3'-5').

3. METHODE D'ANALYSE DES SEQUENCES

L'analyse statistique des séquences a été menée au Laboratoire de Génétique de l'Ifremer de La Tremblade.

L'alignement des séquences nucléotidiques a été réalisé sous le logiciel Clustalw (Thompson et al. 1994). La distance nucléotidique de Nei (1982) entre les différents haplotypes a été calculée par le logiciel Phylip 3.57 (Felsenstein 1993) à l'aide du programme NEIGHBOR. L'analyse des bootstraps a pu être effectuée à l'aide des programmes SEQBOOT (1000 replicats) et CONSENSUS du logiciel Phylip. La représentation graphique des distances génétiques a été réalisée sous le logiciel Tree View 1.5.

L'indice Fst (Wright 1951) a été utilisé pour caractériser la différenciation entre les différentes populations. Cet indice a été estimé par le paramètre thêta (Weir et Cockerham, 1984) grâce au logiciel Genetix 4.02 (Belkhir et al. 1996-2000).

La corrélation entre la distance génétique (donnée par la valeur Fst/(1-Fst) selon Rousset, 1997) et la distance géographique a été testée par un test de permutation non paramétrique de Mantel (Mantel 1967) sous le logiciel Genetix 4.02.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS DE L'ANALYSE GENETIQUE DES ECHANTILLONS

1. BILAN DES PRELEVEMENTS GENETIQUES

Des missions sur le terrain ont été nécessaires à la réalisation des prélèvements génétiques sur les tortues vertes. L'annexe 7 présente les caractéristiques de chaque échantillon prélevé. Le tableau 1 présente le bilan des échantillons par site obtenus suite à ces missions.

SITE DE PONTE ECHANTILLONNE	NOMBRE D'ECHANTILLON TOTAL
Europa	33
Îles Glorieuses	39
Tromelin	44
Mayotte	35
Nossy Iranja	9
Juan de Nova	25
Mohéli	34
TOTAL	**219**

Tableau 1 : Bilan des prélèvements génétiques sur les sites de ponte prospectés dans le sud ouest de l'océan Indien

2. BILAN DES EXTRACTION/AMPLIFICATION EN LABORATOIRE

L'extraction et l'amplification de l'ensemble des 219 échantillons ont été réalisées au Laboratoire de biologie moléculaire du CIRAD au 3P à Saint Pierre (île de La Réunion). Une électrophorèse de vérification a été réalisée sur l'ensemble des échantillons amplifiés afin d'optimiser leur séquençage (Figure 4). Cette électrophorèse permet de mettre en évidence d'éventuelles anomalies et de vérifier la qualité de l'amplifiat.

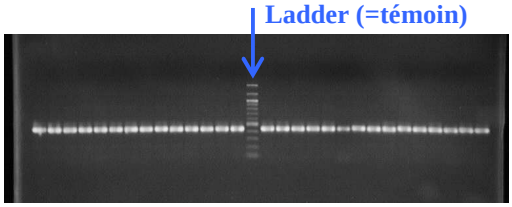


Figure 4 : électrophorèse de vérification de 56 échantillons amplifiés.

3. BILAN DU SEQUENÇAGE

Les résultats des séquençages réalisés par la société MWG sont envoyés par e-mail. Un traitement des fichiers reçus est nécessaire afin de corriger les erreurs de séquençage. Ces corrections sont possibles en alignant les séquences sens et anti-sens d'un même échantillon sous le logiciel DNAMAN 5.2.2, puis en les comparant.

3.1. Caractérisation des séquences obtenues

Le résultat final du séquençage est une séquence de 429 paires de bases débutant avec la première amorce et se terminant avec la seconde amorce (Figure 5).

```
1      TTGTACATCT ACTTATTTAC CACTAGCATA TGACCAGTAA TGTTAACAGT TGATTTGGCC
61     CTAAACATGA AAATTATTGA ATCCACATAA ATATTTTAAT AACATGAATA TTAAGCAGAG
121    AATTAAAAGT GAAATGATAT AGGACATAAA ATTAAACCAT TATACTCAAC CATGAATATC
181    GTCACAGTAA TTGGTTATTT CTTAAGTAGC TATTCACGAG AAATAAGCAA CCCTTGTTAG
241    TAAGATACAA CATTACCAGT TTCAGGCCCA TTTAGTTTAT AGCGTACATA ACCTGATCTA
301    TTCTGGCCTC TGGTTGTCTT TTCAGGCACA TACAAATAGT AACGTCCATT CGTTCCTCTT
361    TAAAAGGCCT TTGGTTGAAT GAGTTCTATA CATTAAATTT ATAACCTGGC ATACGGTAGT
421    TTTACTTG
```

*Figure 5 : Exemple de séquence obtenue, la séquence de la région de contrôle de l'ADNmt de la tortue « Glo10 », la 10ème tortue échantillonnée aux îles Glorieuses (les amorces sont **en bleu**).*

Sur les 219 échantillons amplifiés, seul 209 ont permis d'obtenir une séquence complète et valide (Tableau 2).

SITE DE PONTE ECHANTILLONNE	NOMBRE D'ECHANTILLON TOTAL AYANT ETE SEQUENCE
Europa	33
Îles Glorieuses	37
Tromelin	44
Mayotte	34
Nossy Iranja	9
Juan de Nova	18
Mohéli	34
TOTAL	**209**

Tableau 2 : Bilan des séquençages des échantillons prélevés sur les sites de ponte prospectés dans le sud ouest de l'océan Indien

Suite à la comparaison des séquences obtenues avec la base de données Internet Genbank (http//www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbankindex.html), 7 haplotypes différents ont pu être mis en évidence. Les séquences de ces haplotypes sont présentées en Annexe 8. La fréquence de répartition des séquences obtenues par haplotype et par zone d'échantillonnage est présentée sur le tableau 3 et sur la figure 6.

	CM8	C3	may23	D2	Type glo33	A1	A2	total
Europa	31	2						**33**
Juan de Nova	10	7					1	**18**
Iranja		9						**9**
Mayotte	4	25	2			1	2	**34**
Mohéli	1	27	2	1		1	2	**34**
Glorieuse		30			1		6	**37**
Tromelin		38					6	**44**
Total	**48**	**135**	**4**	**1**	**1**	**2**	**17**	**209**

Tableau 3 : Répartition des fréquences des haplotypes obtenus en fonction du lieu d'échantillonnage

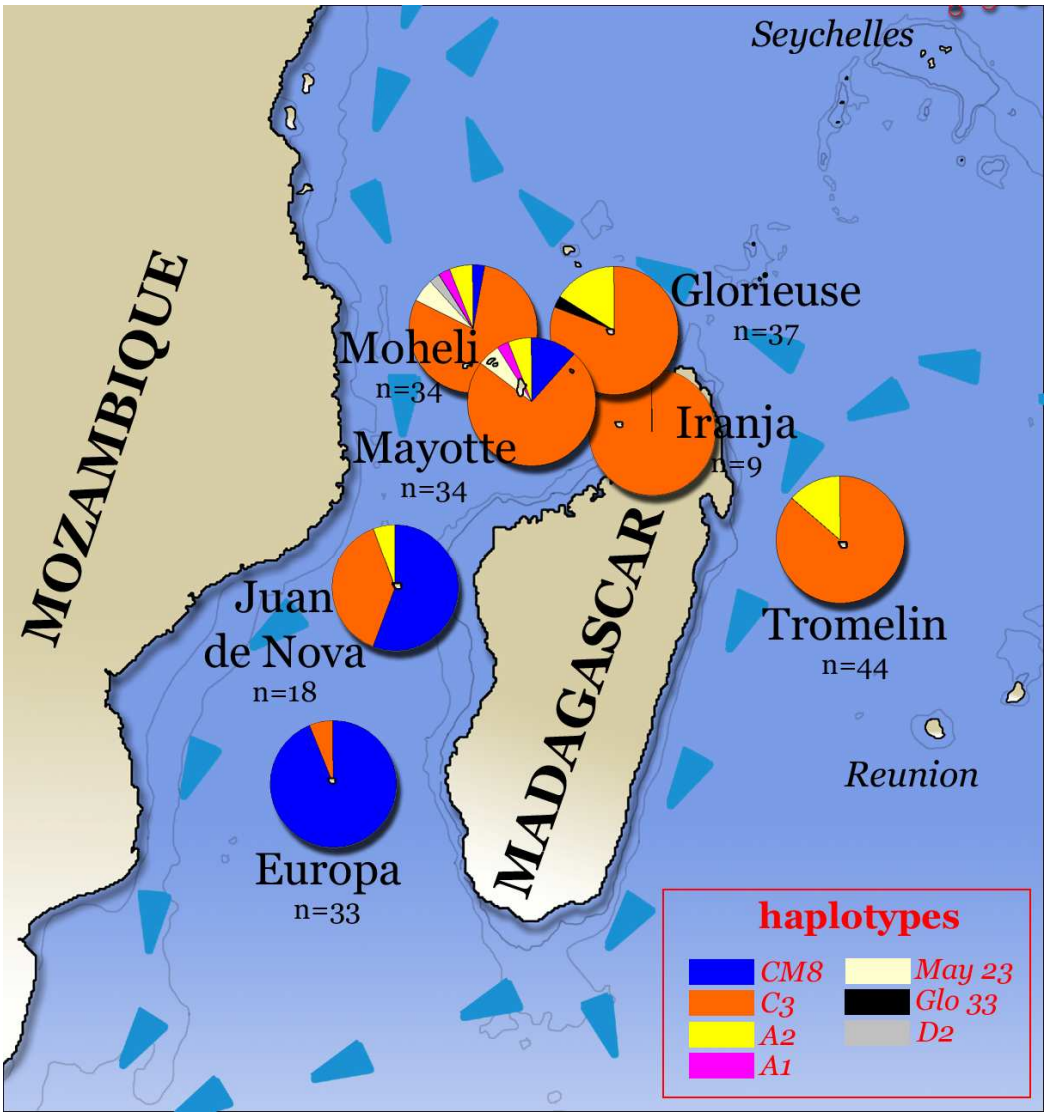


Figure 6 : Répartition géographique des fréquences des haplotypes obtenus en fonction du lieu d'échantillonnage

Ces 7 haplotypes sont différenciés par un certain nombre de nucléotides différents et caractéristiques de délétions/additions et/ou de substitutions de bases. Le tableau 4 récapitule ces différences nucléotidiques entre les 7 haplotypes.

	CM8	A1	A2	C3	MAY23	D2	GLO33
CM8	-	-	-	-	-	-	-
A1	22 substitutions 2 deletions	-	-	-	-	-	-
A2	23 substitutions 1 délétion	5 substitutions 1 délétion	-	-	-	-	-
C3	24 substitutions 1 délétion	21 substitutions 1 délétion	21 substitutions 0 délétion	-	-	-	-
MAY23	23 substitutions 1 délétion	21 substitutions 1 délétion	20 substitutions 0 délétion	1 substitution 0 délétion	-	-	-
MOH7	24 substitutions 1 délétion	23 substitutions 1 délétion	22 substitutions 0 délétion	1 substitution 0 délétion	2 substitutions 0 délétion	-	-
GLO33	26 substitutions 1 délétion	23 substitutions 1 délétion	22 substitutions 0 délétion	2 substitutions 0 délétion	3 substitutions 0 délétion	2 substitutions 0 délétion	-

Tableau 4: différences nucléotidiques entre les différents haplotypes (différences mises en évidence sous le logiciel DNAMAN©.

3.2. Distance génétique entre les différents haplotypes

3.2.1. Les haplotypes du sud ouest de l'océan Indien

Sur les 7 haplotypes mis en évidence lors du séquençage des 209 échantillons, 6 avaient déjà été mis en évidence lors d'analyses menées par d'autres équipes de chercheurs : CM8, C3, A1, A2, D2 et may 23. Ces 6 haplotypes sont caractéristiques de certaines régions du monde :

- **L'haplotype CM8** a été mis en évidence dans le sud Atlantique, de l'île d'Ascension à la Guinée Bissau.

- **L'haplotype C3** a été mis en évidence dans une grande partie du pacifique, du nord de l'Australie aux Seychelles en passant par les Philippines, la Malaisie et l'Indonésie.

- **L'haplotype A1** est moins fréquent, mais reste spécifique à l'océan Pacifique. Il a été mis en évidence en Micronésie et aux Seychelles.

- **L'haplotype A2** est également moins fréquent, mais reste spécifique lui aussi de l'océan Pacifique. Il a été mis en évidence en Australie et aux Seychelles.

- **L'haplotype D2** est également peu fréquent. Il a été mis en évidence dans le Pacifique est.

- **L'haplotype may 23** a été enregistré par A. Formia and M.W. Bruford in GenBank sous le numéro AF529030. Aucune autre information n'est disponible concernant cet haplotype.

Un dernier haplotype proche de C3 et non encore répertorié a également été mis en évidence aux Glorieuses : glo 33. Les distances génétiques entre les différents haplotypes sont présentées ci-dessous dans le tableau 5.

Dist. génétiques	**c3**	**cm8**	**A1**	**glo33**	**D2**	**may23**	**A2**
c3	0	0.0653	0.0600	0.0053	0.0026	0.0026	0.0568
cm8	-	0	0.0599	0.0710	0.0679	0.0624	0.0624
A1	-	-	0	0.0628	0.0626	0.0571	0.0132
glo33	-	-	-	0	0.0070	0.0070	0.0596
Moh7	-	-	-	-	0	0.0047	0.0594
may23	-	-	-	-	-	0	0.0539
A2	-	-	-	-	-	-	0

Tableau 5: Distances génétiques entre les différents haplotypes (calculs réalisés sous Clustalw 3.57)

La représentation graphique de ces distances génétiques est représentée sur la figure 7 ci-dessous. Un bootstrap a été réalisé sur ces distances génétiques.

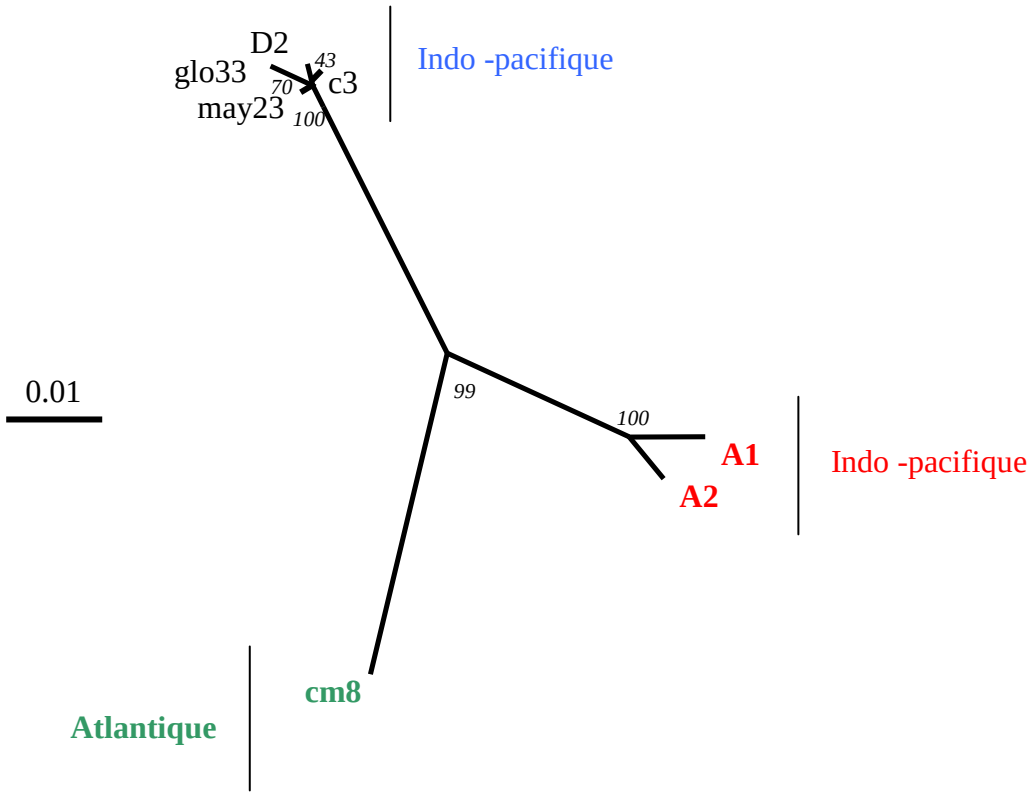


Figure 7 : arbre Neighbor-joining entre les 7 haplotypes déterminés (les chiffre en italique indiquent la valeur du Bootstrap)

3.2.2. Les haplotypes de *Chelonia mydas* connues

Afin de situer les haplotypes découverts dans le sud ouest de l'océan Indien dans un contexte global, un arbre des distances génétiques a été réalisé avec l'ensemble des haplotypes connus dans le monde (Figure 8).

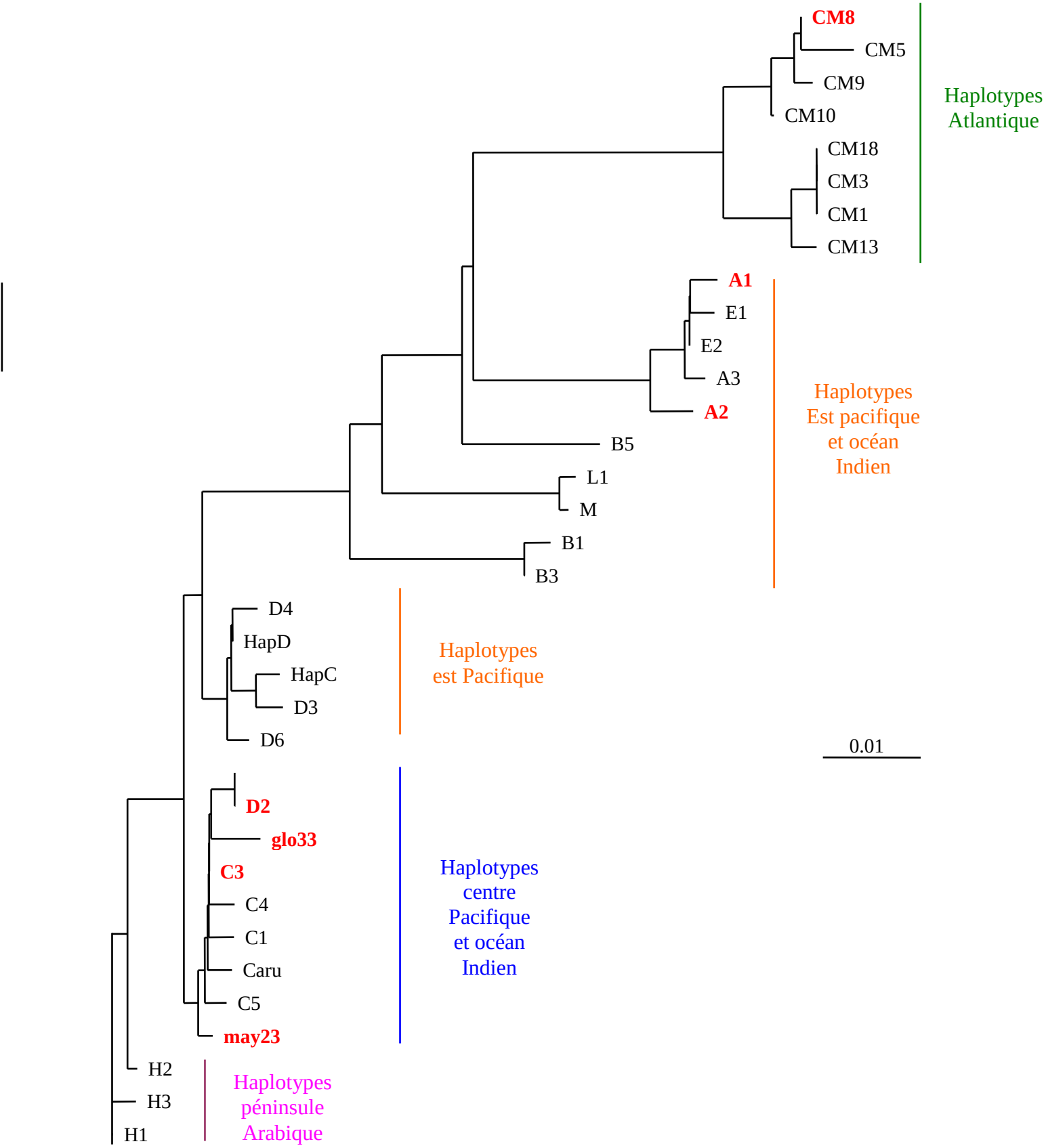


Figure 8 : arbre Neighbor-joining entre l'ensembles des haplotypes connus dans le monde

3.3. Structuration des populations échantillonnées

Afin d'évaluer la variabilité existant entre les différents sites échantillonnés, il est possible de calculer un paramètre de différenciation entre populations appelé Fst (Wright 1981) selon l'estimateur Thêta de Weir et Cockerham (1984), qui est un estimateur sans biais de cette valeur dans un modèle en îles infini. Cet estimateur a été choisi au lieu du Gst de Nei (1987) car nous ne disposons pas d'un échantillonnage homogène, le Gst étant très influencé par la variation du nombre d'individus par population (Cockerham et Weir, 1987). Pour estimer le Fst, Weir et Cockerham analysent les composantes intra et interpopulationelles de la variance haplotypique.

Le tableau 6 donne les Fst par paire de sites échantillonnés. La significativité du Fst obtenu est testée à l'aide du logiciel Genetix 4.02 (Beltkhir et al, 1996) qui effectue un test non paramétrique de permutations. Pour tester l'Hypothèse nulle (Fst = 0, c'est à dire qu'il n'existe pas de différence entre la structure haplotypique des 2 populations comparées), le logiciel effectue des permutations aléatoires des individus sur l'ensemble des échantillons. Un nouveau Fst est calculé à chaque permutation. Après un grand nombre de ces opérations (1000 dans notre cas), une distribution statistique du Fst est obtenue. Il est possible alors d'estimer une probabilité d'obtenir une valeur de Fst sous l'hypothèse nulle plus grande ou égale à la valeur obtenue avec la matrice des données initiales.

Fst	Mayotte	Glorieuses	Iranja	Mohéli	Juan de Nova	Europa	Tromelin
Mayotte	0	0,0173	0,05307	-0,01489	0,3364 ***	0,6616 ***	0,03393
Glorieuses	-	0	0,04698	-0,00263	0,4816 ***	0,7627 ***	-0,01768
Iranja	-	-	0	0,01643	0,5713 ***	0,9031 ***	0,024
Mohéli	-	-	-	0	0,4359 ***	0,7343 ***	0,00234
Juan de Nova	-	-	-	-	0	0,1702 *	0,5496 ***
Europa	-	-	-	-	-	0	0,8031 ***
Tromelin	-	-	-	-	-	-	0

*Tableau 6: variabilité inter-population (Fst par paires calculé par Genetix 4.02). La significativité de la différence par paire est indiquée par * =peu significatif (p<0,05), ** = significatif (p<0,005), ***= très significatif (p<0,001))*

3.4. Relation entre distance génétique et distance géographique

3.4.1. Test de Mantel

Ce test permet de déterminer s'il y a une corrélation entre deux matrices de distance triangulaire, l'une génétique (Fst/(1-Fst)), l'autre géographique. La valeur d'un paramètre d'association des 2 matrices, Z (Coefficient de Mantel) est calculé à partir des données réelles, puis comparée à la série de pseudo valeurs obtenues par permutation aléatoires de l'ordre des populations dans les deux matrices de distance. S'il n'y a pas de relation entre les deux matrices de distance, la valeur Z obtenue sur les données réelles ne s'écartera pas de la distribution des pseudo valeurs obtenues après permutation. Il n'y aura donc pas de corrélation entre la distance génétique entre les haplotypes et leur distribution géographique.

Afin de se positionner dans une configuration réaliste, les distances géographiques entre les sites échantillonnés ont été mesurées (Karto®, Cadiou, 1978) en distance réelle, c'est à dire la plus courte distance reliant les deux sites par la mer.

En tenant compte de l'ensemble des sept sites d'échantillonnage, le test non paramétrique de Mantel met en évidence qu'il existe une corrélation significative entre la distance génétique et la distance géographique (P<0,05) de l'échantillonnage. En excluant l'île de Tromelin qui est la seule île en dehors du canal du Mozambique, le test de Mantel indique qu'il existe une corrélation très significative entre les distances génétique et les distances géographiques (P<0,001).

3.4.2. Régression linéaire entre distance génétique et distance géographique

Afin de confirmer le résultat mis en évidence par le test de Mantel, une régression linéaire a été réalisée entre la distance génétique des échantillons et la distance géographique réelle entre les différents sites échantillonnés. Deux courbes de régression ont été réalisées, l'une avec l'ensemble des données, l'autre excluant les données obtenues de l'île de Tromelin (Figure 9).

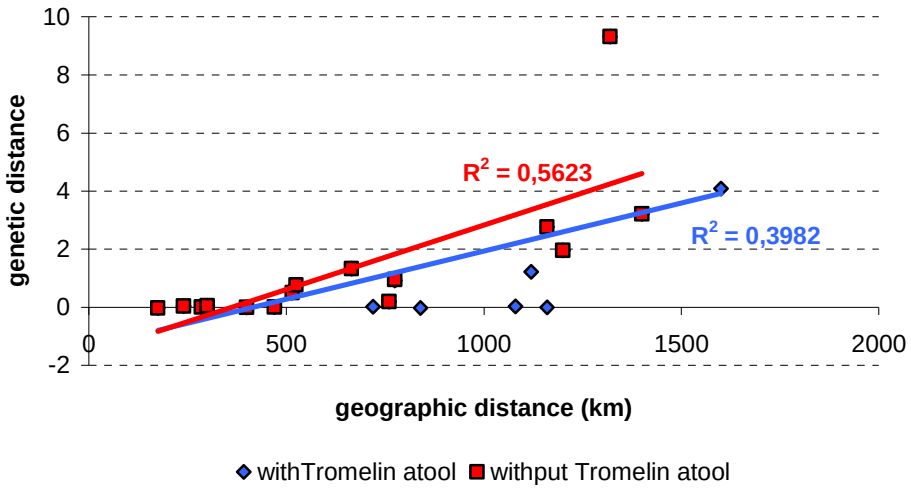


Figure 9 : Régression linéaire entre les distances génétiques (Fst/(1-Fst)) et les distances géographiques des sites d'échantillonnage (incluant et excluant, le site de Tromelin)

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

1. LES HAPLOTYPES DE *CHELONIA MYDAS* DANS LE SUD OUEST DE L'OCEAN INDIEN

Le séquençage de 209 échantillons de tortues femelles dans 7 sites du sud ouest de l'océan Indien a révélé la présence de 7 haplotypes différents (tableau 3). Six des 7 haplotypes (C3, CM8, A1, A2, D2 et may 23) ont déjà été mis en évidence par d'autres études (Dethmers et al, 2005, MS ; Broderick et al., 2005, MS;), le dernier faisant l'objet d'une première identification (Glo33). Quatre des 7 haplotypes sont abondants (C3, CM8, A1 et A2), les trois autres étant rares (D2, glo 33 et may 23). L'analyse des distances génétiques entre ces 7 haplotypes (tableau 5) a permis de déterminer que les 3 haplotypes rares sont très proches de l'haplotype C3 : seule 1 à 3 substitutions séparent les séquences de 429 paires de bases de ces 4 haplotypes. En revanche, plus de 20 substitutions ou délétions séparent les 4 principaux haplotypes identifiés (tableau 4). Cette constatation a été confirmée par l'arbre Neighbor-joining des 7 haplotypes (Figure 7) qui a permis d'établir la présence de trois groupes génétiquement différents, dont l'un regroupant C3, D2, may 23 et glo33. L'arbre Neighbor-joining incluant l'ensemble des haplotypes de *Chelonia mydas* connus (Broderick et al, 2005, MS ; Figure 8) révèle que ces 3 groupes appartiennent à des populations déjà identifiées précédemment dans l'indo-pacifique, le nord ouest Pacifique et l'Atlantique. La présence ponctuelle d'haplotype typique du sud du canal (CM8) dans le nord et celle d'haplotype typique du nord du canal (C3) dans le sud (tableau 3) conforte les constatations faites par Le Gall et Hugues (1987) qu'il existait de très faibles échanges de sites de ponte pour la tortue verte dans l'océan Indien, véritable entorse au paradigme de la fidélité absolue à un site de ponte (Meylan, 1982; Mortimer et Portier, 1989 ; Carr et al, 1978) qui serait le site natal de la tortue verte (Meylan et al, 1990).

Cette étude met donc en évidence pour la première fois la présence d'un haplotype de *Chelonia mydas* typique de l'Atlantique dans l'Indo-pacifique (CM8). Jusqu'à présent, les études ont identifiées la présence de 2 grandes populations de tortues vertes dans le monde génétiquement différente au niveau de la région de contrôle de l'ADNmt : une Atlantique et une Indo-pacifique (Bowen et al, 1992). Bowen suggère que le lien entre la population Atlantique et la population Indo-pacifique a pu être établi par l'est Pacifique qui représente la zone d'échange la plus récente entre les deux grandes zones océaniques (Bowen et al, 1992). Or la présence d'un haplotype typique de l'Atlantique dans le sud du canal du Mozambique conforte plutôt l'hypothèse selon laquelle le Cap de Bonne Espérance serait une barrière perméable pour les espèces tropicales des 2 océans (Briggs, 1974) et que des échanges entre les populations de tortues Atlantique et Indo-Pacifique interviendraient dans le sud ouest de l'océan Indien.

2. LE CANAL DU MOZAMBIQUE, UNE PHYLOGEOGRAPHIE PARTICULIERE

L'analyse de la variabilité génétique des populations de tortues échantillonnées sur les 7 sites de l'étude (Figure 6, tableau 6) a permis de mettre en évidence une importante hétérogénéité de la composition haplotypique entre les sites du nord et du sud du canal du Mozambique. Ainsi, sur une distance de moins de 1200 km séparant l'atoll d'Europa de Mayotte, la distance génétique obtenue (Fst = 0.76, tableau 6) différencie de manière très significative la structure haplotypique des populations des deux sites de ponte. De plus, en excluant l'atoll de Tromelin qui est le seul site en dehors du canal du Mozambique, on constate qu'il existe une corrélation importante entre la distance génétique et la distance géographique des populations échantillonnées (R^2 = 0.56, Figure 9). Sachant que la tortue verte peut effectuer des migrations allant jusqu'à 2500 km dans cette région du monde (Le Gall et Hugues, 1987), cet important gradient sud/nord de la structure génétique des populations de tortues dans le canal conforte l'hypothèse selon laquelle il existerait une barrière environnementale non pas au niveau du Cap de Bonne Espérance, mais au milieu du canal du Mozambique.

Cette forte différence de composition génétique des populations de tortues est à mettre en parallèle entres autres avec un décalage de saison de reproduction entre ces populations. En effet, il a été

constaté que le pic de reproduction des tortues vertes dans les îles du nord du canal était étalé sur l'hiver austral, tandis que le pic de reproduction à Europa a lieu durant l'été Austral (Roos, comm. Pers.). Un tel décalage de la période de reproduction pourrait être induit par une variation importante de paramètres environnementaux (courantologie, température, composition de l'eau…) entre le nord et le sud.

La question fondamentale qui se pose alors est la suivante : comment expliquer cette importante distance génétique entre deux populations géographiquement proches et par ailleurs représentées sur une large portion du globe ? L'analyse portant sur la biologie des premiers stades après éclosion durant la phase de dérive /dissémination, quelles que soient les facultés d'orientation - navigation et de nage des très jeunes tortues, elle laisse à penser que leur déplacement-dissémination est passif et déterminé par leur rencontre avec les grands courants géostrophiques (Carr, A. 1987) du canal du Mozambique (figure 10). La zone nord du canal est sous la dominance d'un grand tourbillon au niveau du bassin des Comores, tandis que la zone du sud du canal est une zone fortement perturbée et sous l'influence d'un grand nombre de mini-gires (100 à 300 km de diamètre) expulsant l'eau du canal du Mozambique vers le sud ouest (majoritairement) ou vers le sud est (Ludjerhams, 2005, MS). On peut émettre l'hypothèse que dès leur éclosion et leur pénétration dans l'océan les jeunes tortues du groupe « nord canal du Mozambique » (haplotype Indo-pacifique) pourraient être entraînées vers le Nord-Est ou bloquées dans le gyre du bassin de Comores, celles du groupe « Europa » (haplotype Atlantique) vers le sud est ou l'ouest. Il reste à appuyer cette hypothèse par une étude plus approfondie des courants de ces deux grandes zones pour vérifier l'opposition des courants dominants, et ce, relativement aux périodes d'éclosion maximale des tortues dans les différents sites.

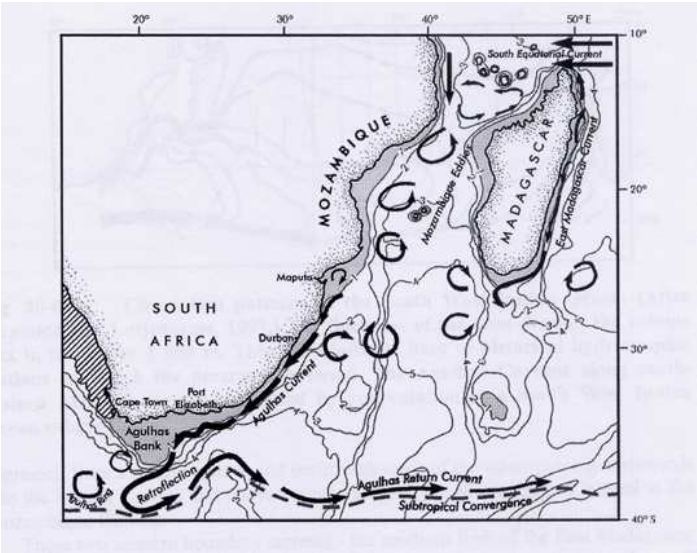


Figure 10 : Principales circulations océaniques dans la zone du sud ouest de l'océan Indien (Ludjerhams, 2005, MS)

L'étalement dans le temps des périodes d'éclosion du nord au sud, de Glorieuse à Europa (Roos, com. Pers.) couplé à la dynamique océanique opposée du sud et du nord du canal du Mozambique (Figure 10) pourrait être un facteur écologique déterminant de la différenciation des populations de tortues actuelles, renforçant le maintien de l'hétérogénéité génétique observée actuellement.

Cependant, on peut se demander si cette structuration de la population mise en évidence par cette étude est une conséquence d'un comportement biologique (homing, migration zone de reproduction-alimentation) de la tortue verte étroitement lié à des paramètres environnementaux, ou simplement une image à un temps t de la structure globale de la population de tortue verte dans cette région du monde. Il serait alors intéressant de refaire un échantillonnage dans 5 ans, temps nécessaire pour qu'une même tortue revienne sur son site de ponte pour une seconde période de reproduction. La structure de la population à ce temps t+5 serait alors un élément important pour interpréter la dynamique spatio-temporelle des populations de tortue de la zone sud ouest de l'océan Indien.

3. DES UNITES DE GESTION POSSIBLES DANS LE CANAL DU MOZAMBIQUE

Les îles du sud ouest de l'océan Indien et principalement les îles du canal du Mozambique représentent des sites majeurs de ponte pour la tortue verte (Van Buskirk et al., 1994 ; Le Gall, 1988 ; Mortimer, 1988 ; Le Gall et Hughes, 1987 ; Le Gall et al, 1985 ; Frazier, 1944 ; Lebeau et al, 1979). Cette espèce étant inscrite en annexe I de la convention de Washington et sur la liste rouge de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature), l'identification de chaque colonie est un élément fondamental dans l'étude et la compréhension des phénomènes migratoires, mais c'est également un outil important pour la définition de stratégies de gestion et de protection des tortues marines, mesures fondamentales pour la préservation de l'espèce dans cette région du monde.

Des travaux précédents (Norman et al., 1994, Fitzimmons et al., 1999) ont mis en évidence l'intérêt des marqueurs moléculaires dans l'identification d'Unités de Gestion pour la tortue verte, notamment en Australie (Dethmers et al., 2005, MS). L'analyse génétique de 209 femelles en pontes dans 7 sites majeurs de ponte du sud ouest de l'océan Indien a permis de mettre en évidence une structuration particulière et inédite de la population de tortue verte dans cette région du monde. Deux populations génétiquement distinctes se mélangent au niveau du canal du Mozambique. La forte hétérogénéité génétique entre ces deux populations implique une gestion des stocks de tortue verte indépendante entre le nord et le sud du canal.

Cependant, la définition des unités de gestions ne doit pas se faire uniquement en fonction de la structuration des populations nidifiantes. Deux facteurs seraient importants à analyser également :

- Le premier est d'établir une carte de la répartition des tortues sur leurs aires d'alimentations. Le marquage/recapture (Le Gall et Hugues, 1987) ainsi que le suivi par satellite de tortues après la ponte (Roos et al., 1999, non publié) ont permis de montrer que les femelles nidifiant dans les îles du canal du Mozambique rejoignent les côtes est africaines et ouest malgaches Les femelles en ponte à Tromelin rejoignent les côtes est malgaches et africaines. Un échantillonnage sur les principaux sites d'alimentation des côtes est africaines et malgaches ainsi qu'une analyse de la fréquence des haplotypes Atlantique et Indo-pacifique devraient permettre d'avoir une idée de l'organisation des principales voies migratoires entre aires de pontes et sites d'alimentation (Sear et al., 1995 ; Lahanas et al., 1998 ; Luke et al., 2004).
- Le second est de connaître l'origine des mâles. L'étude sur l'ADN mitochondriale permet d'avoir une structuration fiable des populations de tortue verte femelle, mais non une structuration de l'ensemble de la population de tortues vertes. Alors que les mâles représentent une composante importante de la variabilité génétique de *Chelonia mydas*, leur comportement migratoire est encore mal connu : reviennent-ils sur leur site de naissance pour se reproduire ? Leur comportement migratoire entre site de ponte et aire d'alimentation s'apparente-t-il à celui des femelles ?

Cette meilleure connaissance de l'origine des mâles ainsi que des trajets migratoires de l'espèce entre sites de ponte et aires d'alimentation permettrait d'établir des Unités de Gestions cohérentes dans le canal du Mozambique. La mise en œuvre d'une stratégie efficace de conservation s'en trouverait facilité.

CONCLUSION

Ce projet d'évaluation de la variabilité génétique des tortues vertes dans différentes colonies du sud ouest de l'océan Indien a permis de mettre en évidence pour la première fois la présence au niveau du canal du Mozambique, d'une zone de mélange entre les deux grandes populations de tortue verte du monde. Cette découverte est majeure pour améliorer les connaissances aussi bien au niveau de la biologie/écologie de cette espèce, qu'au niveau de son comportement, et ce, en vue de l'établissement d'une gestion cohérente et efficace de l'espèce.

Cette étude a mis en évidence le potentiel de l'outil génétique pour une approche moléculaire complémentaire aux autres études (tracking, baguage, suivi des nids…) menées dans la zone. Il est impératif de poursuivre, voire d'intensifier ces autres études, et en parallèle compléter ces premiers résultats de génétique grâce à un projet à plus grande échelle. L'objectif est l'étude de la structuration génétique de l'ensemble des populations de tortues dans la zone. Ce projet devra inclure plusieurs points complémentaires :

- L'analyses de l'ADN mitochondrial sur l'ensemble des sites de ponte de la zone, notamment ceux présents sur la côte est Africaine (Mozambique, Kenya) et ouest malgache afin d'augmenter la banque de données initiée par le projet MOM et ainsi affiner la structure génétique des populations nidifiantes.
- Réaliser une étude de la structure des populations de tortues vertes (ADN mitochondrial) sur des sites d'alimentation ciblés dans le canal du Mozambique. Cette étude permettra d'établir l'aire de répartition des différentes colonies de femelles nidifiant dans le canal et de déterminer pour chaque colonie les aires d'alimentation préférentielle. Cette connaissance est primordiale en terme de gestion des populations.
- Etendre l'étude aux mâles. L'analyse des microsatellites peut permettre de mettre en évidence les flux génétiques entre mâles et femelles. Cette analyse pourra permettre de mieux comprendre l'origine des mâles présents sur les zones de reproduction : reviennent-ils eux aussi sur leur site de naissances ? Proviennent-ils tous de la même zone géographique ?

C'est dans l'optique de répondre à ces interrogations qu'un nouveau programme sur la génétique des tortues marines dans le sud ouest de l'océan Indien a été mis en place à l'Ifremer en 2005, en partenariat avec le CEDTM, le CIRAD de La Réunion et le laboratoire de génétique de La Tremblade. Dans le cadre de ce programme, une bourse de thèse a été attribuée par la Région Réunion sur « la diversité et la différenciation génétique des populations de tortues vertes (*Chelonia mydas*) dans le sud ouest de l'océan Indien » avec comme laboratoire d'accueil l'Ifremer de La Réunion. Une demande de financement FEDER (DOCUP C8/02) a été déposé en s'appuyant sur les premiers résultats obtenus grâce aux financements du MOM.

BIBLIOGRAPHIE

- Bickham WI J., 1981. Two-hundred-million year old chromosomes: deceleration of the rate of karyotipic evolution in turtles. Science 212, pp. 1291-1293.

- Belkhir K., P. Borsa, J. Goudet, L. Chikhi, and F. Bonhomme, 1996-2001. Genetix, version 4.01. A Windows Program for Population Genetic Analysis. Laboratoire Genome, Population, Interactions, CNRS UPR 9060, Université de Montpelleier II, Montpellier, France.

- Bonhomme F., A. Lebeau, and G. Pasteur, 1987. Comparaison génétique des tortues vertes (Chelonia mydas) des océans Atlantique, Indien et Pacifique : Une illustration apparente de la théorie mullerienne classique de la structure génétique des populations? Genetica 74:89-94.

- Bowen B. W., A. B. Meylan, J. P. Ross, C. J. Limpus, G. H. Balazs, and J. C. Avise, 1992. Global population structure and natural history of the green turtle (Chelonia mydas) in terms of matriarchal phylogeny. Evolution 46:865-881

- Briggs, J. C. 1974. Marine zoogeography. McGraw-Hill, Inc., New York, NY, USA.

- Broderick D., P. Dutton, C. Moritz, C.J. Limpus, J.A. Mortimer, 2005. Global Phylogeography of Green Turtles as Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. MS

- Cadiou. 1978. Karto. IFREMER, Brest.

- Carr, A. F., and A. B. Meylan. 1978. The ecology and migration of sea turtles. Bulletin of the American Museum of Natural History: 1-46.

- Ciccione S., M. Taquet, D. Roos, and J. Barde, 2002. Assistance à la DAF de Mayotte pour la mise en place d'une étude sur les tortues marines. Pp. 34. CEDTM/IFREMER, Saint Leu.

- Dethmers K., D. Broderick, C. Moritz, C. Limpus and N. FitzSimmons, 2005. The genetic structure of Australasian green turtles (Chelonia mydas): geographic scale of genetic exchange. MS.

- Dutton P. H., 1996. Method for collection and preservation of samples for sea turtle genetic studies. Proceedings of the International Symposium on Sea Turtle Conservation Genetics NOAA Techn. Memor : 17-24.

- Felsenstein J., 1993. PHYLIP (PHYlogeny Inference Package), University of Washington, Seattle.

- Fitzsimmons N. N., C. J. Limpus, J. A. Norman, A. R. Goldizen, J. D. Miller, and C. Moritz, 1997. Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. National Academy of Science USA 94:8912-8917.

- Fitzsimmons N. N., C. Moritz, and B. W. Bowen, 1999. Population identification. Pp. 72-79 in K.L.Eckert, K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois and M. Donnelly, eds. Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles.

- Fitzsimmons N. N., C. Moritz, and S. S. Moore, 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 Million years of marine turtle evolution. Molecular Biology Evolution 12(3):432-440.

- Frazier J., 1984. Marine turtles in the Seychelles and adjacent territories. Pp. 417-468 in D. R. Stoddart, ed. Biogeography and Ecology of the Seychelles islands. Natl. Zool. Park, Washington.

- Lahanas P. N., K. A. Bjorndal, A. B. Bolten, S. E. Encalada, M. N. Miyamoto, R. A. Valverde, and B. W. Bowen, 1998. Genetic composition of a green turtle (Chelonia mydas) feeding ground population: evidence for multiple origins. Marine Biology 130:345-352.

- Le Gall J. Y., 1988. Biologie et évaluation des populations de tortue verte Chelonia mydas des atolls de Tromelin et d'Europa (Océan Indien S.O.). MESOGEE 48:33-42.

- Le Gall J. Y. and G. R. Hugues, 1987. "Migrations de la tortue verte Chelonia mydas dans l'Océan Indien Sud-Ouest observées à partir des marquages sur les sites de ponte Europa et Tromelin (1970-1985)." Amphibia-Reptilia 8: 277-282.

- Le Gall J. Y., A. Lebeau, and J. Kopp, 1985. Estimation of green turtle Chelonia mydas hatching on breeding places of Europa and Tromelin (Indian Ocean). OCEANOGR.-TROP. 20:117-133.

- Lebeau A., G. Biais, J. L. Durand, and B. Gobert, 1979. La tortue verte Chelonia mydas des îles Tromelin et Europa (océan Indien): peuplement et reproduction. Rapport interne; I.S.T.P.M.:90.

- Luke K., J. A. Horrocks, R. A. Leroux, and P. H. Dutton, 2004. Origins of green turtle (Chelonia mydas) feeding aggregations around Barbados, West Indies. Marine Biology 144:799-805.

- Lutjeharms, J. R. E. 2005. The costal oceans of south-eastern Africa. Pp. 52. The Sea, vol. 14. Manuscript submitted.

- Mantel N., 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. Cancer Res 27:209-220.

- Meylan, A. B. (1982). Sea turtle migration - evidence from tag returns. Washington DC, Bjorndal KA: 91-100.

- Meylan A. B., B. W. Bowen, and J. C. Avise, 1990. A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. SCIENCE 248:724-727.

- Mortimer J. A., 1988. Green turtle nesting at Aldabra atoll - Population estimates and trends. BIOL. SOC. WASH.:116-128.

- Mortimer J. A., and K. M. Portier, 1989. Reproductive homing and internesting behavior of the green turtle (Chelonia mydas) at Ascension Island, South Atlantic Ocean. COPEIA:962-977

- Nei M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

- Norman J. A., C. Moritz, and C. J. Limpus, 1994. Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. Molecular Ecology 3:363-373.

- Roos D., S. Ciccione, A. Mai, 1999. Etude des déplacements génésiques et trophiques des tortues vertes femelles adultes dans le sud-ouest de l'océan indien. In Ciccione, Roos et Legall

(Eds). Connaissance et conservation des tortues marines du sud-ouest de l'océan Indien - dec 99 (1). 58-59.

- Roos D., S. Ciccione, D. Pelletier, and F. Rene, 1999. Etude scientifique et mesure d'accompagnement à la création du Centre d'Etude et de Découverte des tortues Marines. Pp. 71. Rapport IFREMER, Le port, La Réunion.

- Sears C. J., 1995. Demographic composition of the feeding population of juvenile loggerhead sea turtles (Caretta caretta) off Charleston South Carolina evidence from mitochondrial DNA markers. MARINE BIOLOGY 123:869-874.

- Thompson J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gipson., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673-4680.

- Van Buskirk J., and L. B. Crowder., 1994. Life-history variation in marine turtles. COPEIA: 66-81.

- Weir B. S., and Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38:1358-1370.

- Wright S., 1951. The genetical structure of population. Ann Eugen 15:323-354.

ANNEXES

ANNEXE 1 : RAPPORT DE MISSION AU CIRAD DU MERCREDI 10 AU MERCREDI 17 DECEMBRE 2003

ANNEXE 2 : RAPPORT DE MISSION II AU CIRAD DU LUNDI 26 AU MERCREDI 28 AVRIL 2004

ANNEXE 3 : PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN DE TORTUE POUR PCR PAR LE CHELEX **(BIO-RAD) (***D'APRES N. FITZSIMMONS ET AL, 1997, ADAPTE PAR J. BOURJEA LE 05/01/04***)**

ANNEXE 4 : PROTOCOLE DE MESURE DE LA CONCENTRATION DE D'AND AU FLUORIMETRE HOEFER

ANNEXE 5 : PROTOCOLE D'AMPLIFICATION DE LA REGION DE CONTROLE DE L'ADN MITOCHONDRIAL DE TORTUE VERTE *(UTILISATION DU KIT « ADVANTAGE 2 PCR ENSYME SYSTEMS »)*

ANNEXE 6 : PROTOCOLE D'ELECTROPHORESE

ANNEXE 7 : PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS SUR LE SUD-OUEST DE L'OCEAN INDIEN

ANNEXE 8 : SEQUENCES DES HAPLOTYPES MISES EN EVIDENCE DANS L'ETUDE