

Étude génétique des relations entre les populations méditerranéenne et atlantique d'une tortue marine (*Caretta caretta*) à l'aide d'un marqueur mitochondrial

LUC LAURENT ^{(1), (7)}, JEAN LESCURE ⁽¹⁾, LAURENT EXCOFFIER ⁽²⁾, BRIAN BOWEN ⁽³⁾, MARIANO DOMINGO ⁽⁴⁾, MYROULA HADJICHRISTOPHOPOULOU ⁽⁵⁾, LILY KORNARAKI ⁽⁶⁾, GUY TRABUCHET ⁽⁷⁾

⁽¹⁾ Laboratoire Reptiles et Amphibiens et UA 41137 du CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris 75005, France.

⁽²⁾ Département d'Anthropologie et d'Ecologie, Université de Genève, Carouge, Genève 1227, Suisse.

⁽³⁾ BEECS Genetic Analysis Core, University of Florida, Gainesville, Florida 32611, USA.

⁽⁴⁾ Histologia y Anatomia Patologica, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Espagne.

⁽⁵⁾ Ministry of Agriculture and Natural Resources, Department of Fisheries, Nicosia, Chypre.

⁽⁶⁾ Sea Turtle Protection Society of Greece, Athènes 10682, Grèce.

⁽⁷⁾ Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Université Claude-Bernard, Lyon-I, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

Reprints : L. Laurent

Genetic studies of relationships between Mediterranean and Atlantic populations of loggerhead turtle *Caretta caretta* with a mitochondrial marker

RÉSUMÉ

La conservation de la population de Tortue marine *Caretta caretta* de Méditerranée nécessite une meilleure connaissance de ses relations avec la population atlantique. Dans ce but, la séquence d'une partie du gène du cytochrome b (ADN mitochondrial) a été établie puis utilisée comme marqueur génétique. Les résultats montrent que du point de vue de la généalogie femelle la population méditerranéenne reproductrice est génétiquement bien isolée de la population atlantique reproductrice, mais que des Caouannes atlantiques entrent dans le bassin occidental de la Méditerranée. La pêche espagnole aux palangres flottantes qui capture accidentellement de très nombreuses Caouannes dans ce bassin a donc aussi un impact sur la population atlantique. Ces données démontrent la nature internationale de la conservation d'une population de Tortue marine. ▲

ABSTRACT

The loggerhead turtle *Caretta caretta* is an endangered species in the Mediterranean. Therefore, the definition of the Mediterranean population, and their relationships to the Atlantic population is of fundamental importance. For this purpose, we have sequenced a portion of the mitochondrial cytochrome b gene to generate genetic markers. Results indicate that the Mediterranean nesting female population is genetically isolated from the Atlantic nesting female population, but loggerhead turtles of Atlantic origin were found in the West Mediterranean basin. This entry of Atlantic loggerheads in the Mediterranean confirms earlier speculations and presents special conservation problems. The Spanish swordfish longline fishery which incidentally captures large numbers of loggerheads in the West Mediterranean basin has therefore an impact on the Atlantic population. These data demonstrate the international nature of marine turtle conservation. ▲

Mots clés : marqueur mitochondrial, cytochrome b, dispersion génétique, déplacement pélagique, *Caretta caretta*, Méditerranée, biologie de la conservation.

Key words : mitochondrial marker, cytochrome b, dispersal, pelagic movement, *Caretta caretta*, Mediterranean Sea, conservation biology.

Note présentée par Maurice Fontaine.

Note remise le 26 avril 1993, acceptée après révision le 9 septembre 1993.

ABRIDGED VERSION

The nesting zones of the Mediterranean loggerhead turtle *Caretta caretta* population are in the eastern basin and are far from nesting beaches of the Atlantic population (Fig. 1). In the West Mediterranean basin, the very numerous incidental captures of juvenile loggerhead [4-6] lead some authors (Argano [4] and Carr [3]) to suggest the entry of Atlantic loggerheads into this basin. Investigation of the beaches of Morocco and Algeria by Laurent [7] invalidated the hypothesis of a nesting population in this basin and favored a hypothesis of double origin: eastern Mediterranean and Atlantic [8]. The only proof of a crossing of the Atlantic towards European coasts was the recapture in the eastern Mediterranean of a juvenile head started loggerhead, marked in the United States [9]. These speculations about the entry of Atlantic loggerheads into the Mediterranean raise two major questions in conservation: the origin of the loggerheads captured in the western basin with the problem of studying the pelagic movement of juvenile sea turtles and the genetic isolation of the Mediterranean nesting population.

In this study, we present our first results of a research strategy which used a mitochondrial DNA marker, a portion of the cytochrome b gene, analyzed on individuals from a double sampling: on the nesting beaches and in the sea.

Samples were collected either from hatchling individuals and eggs, on the most important known nesting beaches (Zakynthos in Mediterranean and East Florida [10] in Atlantic) or from swimming turtles captured offshore (Fig. 1). A Kemp's Ridley Sea Turtle *Lepidochelys kempii* was also included in the analysis as an outgroup. Total DNA was prepared [11] from blood samples or from muscle tissues of animals found dead. A 462 bp DNA fragment encompassing the 3' end of tRNA^{glu} gene and the 5' part of cytochrome b gene was amplified *in vitro* as described by Kocher *et al.* [12] using universal primers H15149 [12] and L14724 [13]. Single-stranded DNA prepared by asymmetric amplification [14] was sequenced with a Sequenase 2.0 kit (USB). Sequences of individuals from the nesting beaches of the Mediterranean (n = 22), East Florida (n = 14) and from a fraction (n = 4) of each samples of West Florida, Georgia and South Carolina were obtained (Fig. 1). The sequence polymorphisms were further investigated on the individuals from the offshore sampling, by digesting amplified DNA by *HpaII* and separation of the resulting fragments on 3% Nusieve GTG agarose gel. Restriction haplotypes were determined for all individuals (Fig. 1). DNA sequence haplotype frequencies were compared using an analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.* [15]), which provide a coefficient of differentiation Φ_{st} (an F-statistic analogue) and level of significance. This coefficient is first calculated with the haplotype frequencies. The molecular information is used by introducing two molecular distances between the haplotypes. The phenetic distance 1 (Table I) is the number of nucleotide substitutions between two haplotypes, the phenetic distance 2 used a different weight for non-synonymous substitutions. Restriction haplotypes frequencies were compared among samples using Fisher's exact bilateral permutation test.

The nesting populations of the Mediterranean and the United States have been characterized by DNA sequence performed on individuals from nesting beach samples. We have found three DNA sequence haplotypes: A, B and C (Fig. 2). Haplotype A differs from haplotype B by one, non-silent substitution (0.24% observed divergence). Haplotype C differs from haplotype A by four synonymous and one non-synonymous substitution (0.95% observed divergence). There are five differences between haplotype B and haplotype C (1.19% observed divergence). Haplotype A is shared between Mediterranean and Atlantic nesting beaches. Haplotype C was not found in the Mediterranean; whereas haplotype B was observed only in Mediterranean nesting sites

(Fig. 1). Haplotype frequency analysis (Table II) demonstrates a genetic differentiation of the American female population from the Mediterranean female population.

Using *HpaII* digestions, we distinguished two restriction site haplotypes: *HpaII*- is obtained when digesting a type C sequence, and *HpaII*+ corresponds to a type A or B sequence (Fig. 2). Haplotype *HpaII*- was observed on American nesting sites only. However, it was found in 40% of the individuals sampled along the French Atlantic coasts and in 22% of the individuals sampled in the West Mediterranean basin.

The high values of the Φ_{st} show that the nesting female population of USA is genetically well differentiated from the Mediterranean one (Table I). This differentiation has also been observed recently by Bowen *et al.* [10] from mtDNA RFLP data. In their single Mediterranean sample from a nesting beach of the Peloponnese (Greece), they found a unique haplotype, observed also in the United States. Our Mediterranean sampling is more widespread. We found two DNA sequence haplotypes and one, the haplotype B, is not observed on nesting beaches of the United States. A spatial structure within the Mediterranean nesting female population is suspected.

The observation of the restriction haplotype *HpaII*- in the West Mediterranean basin with a frequency not significantly different from the French Atlantic coasts sample ($\chi^2 = 2.02$; $P > 0.10$), suggests a unique Atlantic origin of the loggerheads observed in this basin. But, can we really affirm the absence of this haplotype in the Mediterranean nesting beaches? If we assume that there is no entry of Atlantic loggerhead turtles into the Mediterranean and that all the individuals sampled in the Mediterranean belong to the same population (n = 59 + 22 + 10), we estimate *HpaII*- haplotype frequency to be 13/91 = 0.143 in this population. *HpaII*- haplotype number among the 22 individuals sampled on Mediterranean nesting sites follows a binomial law b(22; 0.143). The probability to observe no *HpaII*- haplotype on nesting sites is $P(x=0) = 0.857^{22}$, that is 0.033. We conclude that we would have observed turtles carrying the *HpaII*- haplotype, if its frequency was really 0.143 in Mediterranean population. Its frequency is certainly less, implying that individuals with this haplotype observed offshore originate in the Atlantic. Thus, the Spanish swordfish longline fisheries which captured and recaptured 22,000 to 24,000 juvenile loggerheads every year [6] in the West Mediterranean basin must have an impact on the Atlantic nesting population (probably the American population) as well as on the Mediterranean population.

Estimation of a matrilineal gene flow Nm from a genetic differentiation coefficient seems hazardous because of a small sample size and lack of demographic data for the populations. However, three elements allow us to believe that the number of Atlantic females which reproduce in the Mediterranean is very weak. The first is the degree of genetic differentiation between the Mediterranean nesting population and the sample from East Florida nesting beaches (Table I). Indeed, this rookery is numerically the most important in the Atlantic Ocean. Furthermore, it is the nearest, and its position relative to the currents (Gulf Stream) is the most favorable for dispersal to Mediterranean (Fig. 1). The second is the significance of restriction haplotype frequencies between the Mediterranean nesting population and the sample from the French Atlantic coasts (Table II), which is probably an area of pelagic dispersal for the individuals of the entire Atlantic nesting population. The third element is the fact that genes foreign to breeding Mediterranean population (*HpaII*- haplotype) are moving in the West Mediterranean basin without being observed on the nesting site. However, we do not know the sex of the individuals sampled in the western basin, so we cannot affirm that these mitochondrial genes are carried by females.

Finally, our study demonstrates that the Mediterranean female population is isolated from the Atlantic population. Two explanations could be given. The first is that the Atlantic juvenile females show during their pelagic movement a strong natal homing when they are confronted with the option of breeding at a non-natal rookery (this phenomenon has been demonstrated in the adult Green turtles by Meylan *et al.* [21]). The second is that the males could participate only the Atlantic juvenile pelagic movement. This underlines the necessity of an enhanced Mediterranean population preservation.

Les zones de nidification (sites de ponte) de la population méditerranéenne de Tortue marine *Caretta caretta* sont situées dans le bassin oriental de la Méditerranée et sont très éloignées de celles de la population atlantique (Fig. 1). Albert I^{er} de Monaco [1], Brongersma [2] et Carr [3] ont émis l'hypothèse que les Caouannes observées sur les côtes atlantiques européennes proviennent des côtes américaines. Les très nombreuses captures accidentelles de Caouannes juvéniles en Méditerranée occidentale [4-6] ont suggéré à certains auteurs (Argano [4] et Carr [3]) l'idée d'une entrée de tortues atlantiques dans ce bassin occidental. Par la suite, une prospection des plages au Maroc et en Algérie par Laurent [7] a invalidé l'hypothèse d'une population reproductrice propre à ce bassin, et consolidé l'hypothèse d'une double origine : méditerranéenne orientale et atlantique [8]. La seule preuve d'une traversée de l'Atlantique vers l'Europe est la capture en Méditerranée orientale d'une jeune Caouanne, élevée en bassin, marquée et relâchée aux États-Unis [9].

Ces spéculations sur l'entrée de Caouannes atlantiques dans la Méditerranée soulèvent deux questions qui ont des implications majeures en conservation. La première est l'origine des 22 000 à 24 000 Caouannes qui sont, selon Aguilar *et al.* [6], capturées et recapturées chaque année par les palangres flottantes espagnoles en Méditerranée occidentale. Elle relève de la méthode d'étude du déplacement pélagique des individus juvéniles d'une population de Caouannes à de très grandes distances de leur lieu de naissance (site de ponte). La deuxième question est liée aux capacités de dispersion génétique de ces individus en déplacement pélagique et concerne l'étude de la différenciation de la population reproductrice de Méditerranée et de son degré d'isolement génétique.

Dans ce travail, nous avons abordé ces deux points selon une stratégie de recherche fondée sur l'utilisation d'un marqueur mitochondrial, la séquence partielle du gène du cytochrome b, chez des individus provenant d'un double échantillonnage, sur les sites de ponte et en pleine mer. L'échantillonnage sur les sites de ponte en Méditerranée et aux États-Unis permet de définir ces populations reproductrices et de mesurer leur différenciation génétique, en sachant que l'utilisation de l'ADN mitochondrial limite l'analyse à la généalogie femelle. L'emploi d'un marqueur génétique chez des individus prélevés en pleine mer est une approche nouvelle dans l'étude d'une population de Tortues marines. Elle apporte des éléments déterminants sur l'origine des Caouannes capturées en Méditerranée occidentale.

The study of the loggerhead turtle's pelagic movement with a molecular marker constitutes a new approach to exploring the functioning of a marine tetrapod vertebrate population. This method opens perspectives complementary to physical tagging. This fraction of the cytochrome b gene has not provided a specific Mediterranean marker which would permit precise resolution of the demographic composition of the pelagic area, in the West basin, the Strait of Gibraltar and the East Atlantic. A better definition could be obtained using a more variable mitochondrial locus, like the D-Loop, with larger samples. ▲

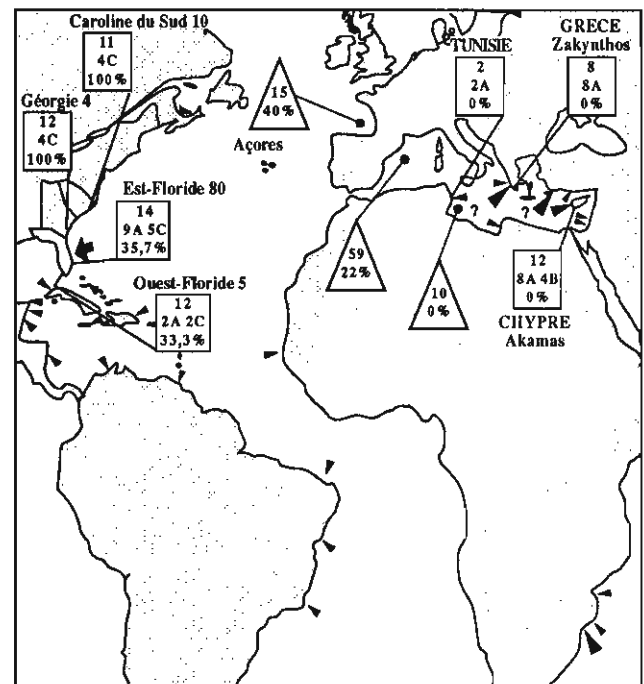


Figure 1. Lieux de collecte des échantillons, répartition des haplotypes et localisation des sites de ponte actuellement connus. □ : prélèvements sur les sites de ponte. △ : prélèvements en mer. A l'intérieur de chaque symbole sont indiqués de haut en bas : le nombre d'individus échantillonnés, les haplotypes de séquence obtenus et le pourcentage de l'haplotype de restriction HpaII- (les haplotypes de restriction ont été déterminés chez tous les individus). 5, 4, 10, 80 : estimations de l'importance de la nidification de la Caouanne, dans chaque État des États-Unis ou zone échantillonnée, exprimées en pourcentage de la nidification totale dans ce pays. Chaque flèche représente une zone de ponte dont l'importance est estimée par le nombre de femelles qui nidifient chaque année, ► : 0-250, ► : 250-1 000, ◆ : > 10 000.

Matériel et méthodes

Afin d'étudier les populations reproductrices, des échantillons ont été collectés sur les sites de ponte. Les sites les plus importants actuellement connus ont pu être échantillonnés : à Zakynthos en Méditerranée et sur la côte est de Floride en Atlantique (Fig. 1). Pour l'Atlantique, des échantillons d'ADN mitochondrial purifié provenant d'embryons ont été fournis [10]. L'ADN total des individus de Méditerranée a été extrait selon le protocole classique [11], à partir de tissus de nouveau-nés

trouvés morts dans des nids ou de sang de juvéniles en élevage prélevés sur les plages à l'état de nouveau-nés. Chaque individu provient d'un nid distinct et toutes les précautions ont été prises pour que ces nids soient issus de femelles différentes. Un fragment de 462 pb a été amplifié selon la méthode de Kocher *et al.* [12], à l'aide des amorces universelles H15149 [12] et L14724 [13] qui s'hybrident respectivement sur les gènes du cytochrome b et de l'ARNt Glu. La séquence de chacun des deux brins a été déterminée grâce à l'emploi du Kit Sequenase 2.0 (USB) à partir d'une matrice d'ADN simple brin obtenue par amplification asymétrique [14], et en utilisant les amorces externes d'amplification et deux amorces internes. La séquence complète a été établie chez tous les individus des échantillons de Méditerranée (n = 22) et d'Est-Floride (n = 14), et chez 4 individus de chacun des échantillons de Ouest-Floride, Géorgie et Caroline du Sud respectivement. Pour comparaison, la séquence d'une Tortue de Kemp *Lepidochelys kempii* a été aussi déterminée. Les fréquences des haplotypes de séquence entre les échantillons des sites de ponte de Méditerranée et des États-Unis ont été comparées à l'aide du logiciel AMOVA (Excoffier *et al.* [15]) qui fournit un coefficient de différenciation génétique Φ_{st} (un analogue de F_{st}) et sa significativité. Le degré de différenciation génétique est d'abord calculé sur la base des seules fréquences haplotypiques (équidistance des haplotypes). L'information moléculaire apportée par les différences entre les séquences est ensuite prise en compte en introduisant deux types de distances moléculaires entre les haplotypes. La distance phénétique 1 est le nombre de substitutions nucléotidiques entre deux haplotypes, la distance phénétique 2 introduit en plus un poids différent pour les substitutions non silencieuses (Tableau I).

Tableau I
Coefficients de différenciation génétique Φ_{st} entre les populations reproductrices de Méditerranée et des États-Unis

	Distances inter-haplotypiques	États-Unis n = 26	Est-Floride n = 14
Médi- terranée n = 22	Équidistance	0,368 P < 0,001	0,161 P < 0,027
	Distance phénétique 1	0,513 P < 0,001	0,340 P < 0,001
	Distance phénétique 2	0,505 P < 0,001	0,328 P < 0,001

Les coefficients sont d'abord calculés sur la base des seules fréquences des haplotypes de séquence (équidistance des haplotypes), puis en tenant compte des distances moléculaires entre les haplotypes. La distance phénétique 1 est le nombre de substitutions nucléotidiques entre deux haplotypes, la distance phénétique 2 introduit en plus un poids différent pour les substitutions non silencieuses. n : nombre d'haplotypes de séquence.

L'étude du déplacement pélagique des Caouannes a nécessité un large échantillonnage en pleine mer (Fig. 1). L'ADN total a été préparé à partir du sang d'individus vivants capturés accidentellement au cours de campagne de pêche ou à partir de muscle d'individus trouvés morts dans les filets de pêche. Une méthode plus rapide et moins onéreuse permettant de distinguer des haplotypes a été utilisée : l'ADN double brin, amplifié *in vitro* comme précédemment, est digéré par *Hpa*II, et les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose Nusieve GTG à 3 %. Ce procédé distingue des haplotypes de restriction. La détermination de ces haplotypes a été ensuite réalisée chez tous les individus échantillonnés sur les sites de ponte (Fig. 1). Les fréquences des haplotypes de restriction entre les échantillons ont été comparées à l'aide du test exact de Fisher.

Résultats

Les populations reproductrices de Méditerranée et des États-Unis ont été caractérisées par la séquence partielle du gène du cytochrome b, déterminée chez les individus prélevés sur les sites de ponte. Nous avons trouvé trois haplotypes de séquence : A, B et C (Fig. 2). A diffère de B par une substitution non silencieuse et la différence observée (proportion de nucléotides différents) est de 0,24 %. A diffère de C par quatre substitutions dont une non silencieuse et la différence est de 0,95 %. C diffère de B par 5 substitutions dont deux sont non silencieuses et la différence est de 1,19 %. L'haplotype A est partagé par les populations reproductrices de Méditerranée et des États-Unis. L'haplotype C n'a été trouvé qu'aux États-Unis et le B n'a été observé qu'en Méditerranée (Fig. 1). Les distributions de fréquence des haplotypes de séquence entre les populations reproductrices des États-Unis et de Méditerranée sont significativement différentes (Tableau I), ce qui indique une différenciation génétique entre les deux populations.

La digestion par *Hpa*II de l'ADN des tortues prélevées en mer ne distingue que deux haplotypes de restriction. L'haplotype *Hpa*II- est caractérisé par deux fragments (388 et 74 pb) qui correspondent à la digestion d'un ADN de séquence C. L'haplotype *Hpa*II+ est caractérisé par trois fragments (204, 184 et 74 pb) qui correspondent aux haplotypes de séquence A ou B (Fig. 2). L'haplotype *Hpa*II-, observé sur les seuls sites de ponte des États-Unis, est retrouvé chez 40 % des individus prélevés le long des côtes françaises atlantiques et chez 22% des Caouannes du bassin occidental de la Méditerranée (Fig. 1). Cela indique que des Caouannes étrangères à la population reproductrice de Méditerranée pénètrent dans cette mer.

Discussion

Les valeurs élevées des Φ_{st} (Tableau I) montrent que la population reproductrice des États-Unis est génétiquement bien différenciée (du point de vue de la généalogie femelle) de la population reproductrice de Méditerranée. La différenciation génétique entre ces deux populations a également été observée récemment par Bowen *et al.* [10] à partir de l'analyse du polymorphisme des sites de restriction (RFLP) de l'ensemble de l'ADN mitochondrial. Dans leur unique échantillon de Méditerranée qui provient

	ARNt Glu	Cytochrome b
		M A T N L R K T H P M M K
A	TATTCAACTACAAAAACCTA	.ATG.GCC.ACA.AAC.CTA.CGA.AAA.ACC.CAC.CCA.ATA.ATA.AAA
B
C
TK
	I I N N S L I D L P S P S N I S A W	
A	.ATC.ATC.AAC.AAT.TCA.CTC.ATC.GAC.TTA.CCA.AGC.CCC.TCC.AAC.ATC.TCT.GCA.TGA	
B	
C	
TKT.....T.....T.....
	W N F G S L L A T C L A L Q I I T G	
A	.TGA.AAC.TTC.GGA.TCA.CTA.CTA.GCC.ACC.TGT.CTA.GCA.CTA.CAA.ATC.ATT.ACC.GGA	
B	
CT.....C.....A.....
TKC.T.....T.....T.....
	I F L A M H Y S P D I S M A F S S I	
A	.ATC.TTC.CTA.GCA.ATA.CAT.TAC.TCA.CCA.GAC.ATC.TCC.ATA.GCC.TTT.TCA.TCA.ATT	
BA.....
C
TKG.....T.....C.....
	T H I T R D V Q Y G W L I R N M H A	
A	.ACC.CAC.ATC.ACC.CGA.GAT.GTA.CAA.TAC.GGA.TGA.CTC.ATC.CGC.AAC.ATG.CAC.GCC	
B	
C	
TKT.....T.....C.....T.....G.....A.....T.....
	N G A S L F F I C I Y L H I G R G I	
A	.AAC.GGA.GCC.TCC.CTA.TTT.TTC.ATC.TGC.ATC.TAC.CTC.CAC.ATC.GGA.CGA.GGA.ATC	
B	
C	
TKA.....C.....A.....T.....G.....
	Y Y G S Y L Y K E T W N T G I I L L	
A	.TAC.TAC.GGT.TCC.TAT.CTA.TAC.AAA.GAA.ACC.TGA.AAT.ACC.GGA.ATC.ATC.CTC.TTA	
B	
CC.....
TKC.....T.....C.....T.....C.....
	L L V M A T A F V G Y V	
A	.CTA.CTA.GTA.ATA.GCC.ACC.GCA.TTC.GTA.GGC.TAC.GTC.C	
B	
C	
TKT.....

Figure 2. *Séquence d'une partie des gènes de l'ARNt Glu et du cytochrome b chez la Caouanne (420 pb) et la Tortue de Kemp (TK) (370 pb). Cette séquence du brin léger correspond aux positions 14725 à 15143 de la séquence de l'ADN mitochondrial humain [22]. A, B, C : haplotypes ; N : substitution non silencieuse ; CTA est une région non codante ; CCGG : site de restriction HpaII polymorphe qui discrimine C de A ou de B ; CCGG : site de restriction HpaII non polymorphe.*

d'un site de ponte du Péloponnèse (Grèce), ils mettent en évidence un seul haplotype, présent aussi aux États-Unis. Notre échantillonnage en Méditerranée est plus étendu et, parmi les deux haplotypes de séquence que nous y observons, l'un d'eux, l'haplotype B, n'a pas été retrouvé aux États-Unis. Sa fréquence élevée sur le

site de ponte de Chypre pourrait suggérer, par ailleurs, l'existence d'une structuration spatiale de la population femelle méditerranéenne.

En ce qui concerne l'étude du déplacement pélagique, on notera tout d'abord que la fréquence de l'haplotype HpaII- dans l'échantillon de Caouannes des côtes atlantiques

Tableau II
Comparaisons des fréquences des haplotypes de restriction

Zones ou sites de ponte	Zones de prélèvement en mer		
	Côtes atlantiques françaises n=15	Bassin occidental de la Méditerranée n=59	Sud-tunisien n=10
Méditerranée n=22	P=0,002	P=0,01	NS
États-Unis n=49	NS	NS	P=0,0001
Est-Floride n=14	NS	NS	NS
Floride (Ouest et Est-Floride) n=26	NS	NS	NS
Géorgie/Caroline (Géorgie et Caroline du Sud) n=23	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001

Test exact de Fisher bilatéral. n : nombre d'haplotypes de restriction.

françaises n'est pas différent de celle de la population des États-Unis (*Tableau II*). On peut penser que la plus grande partie des individus de cette région proviennent des États-Unis, car ce pays abrite le site de ponte le plus important de l'océan Atlantique. Cependant, de nombreux sites de ponte sont situés plus au sud jusqu'au Brésil et une Caouanne marquée dans ce pays a été retrouvée aux Açores [16] (*Fig. 1*). Des individus nés sur le site de ponte peu important et irrégulier du Sénégal [17], seul site actuellement recensé sur les côtes est de l'Atlantique [18], pourraient emprunter aussi le même circuit anticyclonique de l'Atlantique Nord.

Des Caouannes d'haplotype *HpaII*- sont également observées dans le bassin occidental de la Méditerranée, avec une fréquence qui n'est pas significativement inférieure à celle de l'échantillon des côtes atlantiques françaises ($\chi^2=2,02$; $P>0,10$), ce qui suggère que les Tortues observées ce bassin sont originaires de l'Atlantique. Dans quelle mesure peut-on affirmer que l'haplotype *HpaII*- est absent des sites de ponte méditerranéens ? Si on émet l'hypothèse qu'il n'y a pas d'entrée de Caouannes atlantiques en Méditerranée et que

l'ensemble des 91 individus prélevés en Méditerranée ($n=59+22+10$) appartient à la même population, la fréquence de l'haplotype *HpaII*- au sein de la population méditerranéenne reproductrice peut être estimée à $13/91=0,143$. Dans ce cas, le nombre d'haplotypes *HpaII*- parmi les 22 individus échantillonnés sur les sites de ponte méditerranéens suit une loi binomiale $b(22; 0,143)$. La probabilité de ne pas observer d'haplotype *HpaII*- par simple effet du hasard sur les sites de ponte est donc approximativement égale à $P(x=0)=0,857^{22}$, soit 0,033. On peut en conclure que l'haplotype *HpaII*- aurait dû être trouvé sur les sites de ponte s'il avait vraiment une fréquence de 0,143 dans la population méditerranéenne. Sa fréquence est donc certainement moindre, impliquant que les tortues d'haplotypes *HpaII*- observées en pleine mer dans le bassin occidental ne sont pas toutes originaires de Méditerranée orientale. Une origine de Méditerranée occidentale peut être exclue car la nidification dans ce bassin est exceptionnelle [18] : une seule ponte a été jusqu'à présent signalée en 1990 [19]. La seule origine possible est donc l'Atlantique et notre étude démontre que des Caouannes atlantiques (venant probablement des États-Unis) pénètrent en très grand nombre dans le bassin occidental. Il est fort probable que ce bassin soit également une aire de répartition pélagique pour les Caouannes originaires de Méditerranée orientale. Ainsi, l'impact des palangres flottantes espagnoles qui capturent accidentellement de très nombreuses Caouannes dans ce bassin ([5-6]) serait supporté par les deux populations. Comme le précisent Limpus *et al.* [20], en donnant l'exemple du déplacement de femelles adultes baguées sur les plages de ponte, la conservation d'une population de Tortues marines doit être effectivement envisagée dans la totalité de son aire de répartition pélagique.

L'estimation d'un flux génique matriarcal atlantique Nm (nombre de migrants par génération) par la méthode indirecte, c'est-à-dire à partir des coefficients de différenciation génétique, nous paraît hasardeux compte tenu du faible échantillonnage et du manque de données sur la démographie des deux populations. Cependant, trois éléments nous permettent d'avancer que le nombre de femelles atlantiques venant se reproduire en Méditerranée est probablement très faible. Le premier est la différenciation génétique de la population reproductrice méditerranéenne avec l'échantillon récupéré sur le site de ponte d'Est-Floride (*Tableau I*) qui est numériquement le plus important d'Atlantique et le mieux situé dans cet océan par rapport aux courants (Gulf Stream) pour entraîner une dispersion atlantique en Méditerranée (*Fig. 1*). Le deuxième est la différence significative des fréquences des haplotypes de restriction entre la population méditerranéenne reproductrice et l'échantillon de Caouannes prélevé le long des côtes atlantiques françaises (*Tableau II*). Nous estimons la fréquence de l'haplotype *HpaII*- dans cette région comme représentative de celle de l'ensemble de la population atlantique dans le domaine pélagique. Le troisième élément est que les gènes d'haplotype *HpaII*-, que l'on peut actuellement considérer comme étrangers à la population méditerranéenne reproductrice, se déplacent en grand nombre dans le bassin occidental sans qu'ils soient observés sur les sites de ponte. Toutefois, l'ignorance

du sexe des individus échantillonnés dans ce bassin occidental ne nous permet pas d'affirmer que ces gènes mitochondriaux sont portés par des femelles.

Finalement, notre étude montre que la population méditerranéenne femelle est isolée de la population atlantique. Elle constitue donc une entité propre qu'il convient de protéger davantage. Deux raisons peuvent expliquer cet isolement. La première serait que les femelles atlantiques juvéniles en déplacement pélagique montrent une forte philopatrie lorsqu'elles sont confrontées à l'option de se reproduire sur un site de ponte différent de celui de leur naissance (ce phénomène a été décrit par Meylan *et al.* [21] chez les femelles adultes de Tortue verte *Chelonia mydas*). La deuxième serait que seuls les mâles participeraient au déplacement juvénile pélagique de la population atlantique.

Remerciements : cette étude a été financée par Greenpeace Mediterranean Sea Project, le Ministère de l'Environnement (SRETIE), la CEE (DGXI) et le WWF international. Nous remercions toutes les personnes qui nous ont permis de récupérer des échantillons. Tunisie : M. H. Ktari (Sfax), M. Moncef (Sfax) et les pêcheurs du chalutier Anoir ; France : Cl. Le Millinaire, B. Pouvreau, P. Camus, Mr Dirou, Cl. Cazaux, R. Duguay ; Espagne : X. Pastor, F. Costa, J. Xampeny, D. Rosell, J. P. Marti ; Etats-Unis : A. B. Meylan, J. C. Avise, J. I. Richardson et S. Hopkins-Murphy.

RÉFÉRENCES

- Albert I^{er} Prince de Monaco. 1898. Sur le développement des tortues (*T. caretta*). *C. R. Soc. Biol.*: 1-3.
- Brongersma L. D. 1972. European Atlantic Turtles. *Zool. Verhandl.* 121: 1-318.
- Carr A. 1987. New perspectives on the pelagic stage of sea turtle development. *Cons. Biol.* 1(2): 103-21.
- Argano R. 1979. Preliminary report on western Mediterranean sea turtles. W.W.F. Report Project n° 1474. Rapport non publié.
- Caminas J. A. 1988. Incidental captures of *Caretta caretta* with surface long-lines in the Western Mediterranean. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.* 31(2): 285.
- Aguilar R., Mas J., Pastor X. 1992. Impact of Spanish swordfish longline fisheries on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* population in the western Mediterranean. In : Richardson J. I., Richardson T. R., Nejat M., eds. Proceedings of the 12th annual workshop on sea turtle biology and conservation. Miami : NOAA, NMFS, SFSC, in press.
- Laurent L. 1990. Les Tortues marines en Algérie et au Maroc (Méditerranée). *Bull. Soc. Herp. Fr.* 55: 1-23.
- Laurent L. 1990. L'origine des tortues Caouannes *Caretta caretta* de Méditerranée occidentale. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.* 32: 240.
- Manzella S. A., Fontaine C. T., Schroeder B. A. 1988. Loggerhead sea turtle travels from Padre Islands, Texas, to the mouth of the Adriatic Sea. *Marine Turtle Newsletter* 42: 7.
- Bowen B. W., Richardson J. I., Meylan A. B., Margaritoulis D., Hopkins-Murphy S., Avise J. C. 1993. Population structure of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) in the northwest Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Cons. Biol.*, in press.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Paabo S., Villablanca F. X., Wilson A. C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals : amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6196-200.
- Meyer A., Wilson A. C. 1990. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *J. Mol. Evol.* 31: 359-64.
- Gyllensten U. B., Erlich H. A. 1988. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7652-6.
- Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-91.
- Bolten A. B., Martins H. R. 1990. Loggerhead released in Brazil recaptured in Azores. *Marine Turtle Newsletter* 48: 24-5.
- Dupuy A. R. 1986. The status of marine turtles in Senegal. *Marine Turtle Newsletter* 39: 4-7.
- Laurent L. 1993. Une approche de biologie de la conservation appliquée à la population de Tortue marine *Caretta caretta* de Méditerranée. Thèse de doctorat, Université Paris VI.
- Filella I., Subira E., Esteban Guinea I. 1992. Cria *Caretta caretta* en las costas Mediterraneo españolas. In : Il congreso luso español y VI congresos español de herpetologia. Granada, Espagne.
- Limpus C. J., Miller J. D., Parmentier C. J., Reimer D., McLachlan N., Webb R. 1992. Migration of Green (*Chelonia mydas*) and Loggerhead (*Caretta caretta*) turtles to and from eastern Australian rookeries. *Wildl. Res.* 19: 347-58.
- Meylan A. B., Bowen B. W., Avise J. C. 1990. A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for Green Turtle migration. *Science* 248: 724-7.
- Anderson S., Bankier A. T., Barrel B. B. G., De Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreir P. H., Smith A. J., Staden R., Young I. G. 1981. Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-65.

Conclusion

L'étude du déplacement pélagique de la Caouanne à l'aide d'un marqueur génétique moléculaire constitue une approche nouvelle dans les méthodes d'exploration du fonctionnement d'une population de vertébrés tétrapodes marins ; elle ouvre des perspectives complémentaires au marquage physique. La fraction du gène du cytochrome b nous a fourni des marqueurs montrant l'origine atlantique de certains individus présents en Méditerranée occidentale. Cependant, elle n'a pas procuré de marqueurs spécifiques, facilement exploitables, de la population reproductrice méditerranéenne. Cela est nécessaire pour étudier le déplacement pélagique de cette population dans le bassin occidental de la Méditerranée, le détroit de Gibraltar et l'Atlantique oriental. Une meilleure définition pourrait être atteinte par l'analyse d'un locus mitochondrial plus variable (D-loop) dans de très nombreux échantillons de plus grande taille. ▼