



Etude de la diversité génétique et de l'histoire démographique des tortues luths de Guyane

Association Kwata

Avril 2010



Etude financée par la Diren Guyane



Ce travail a été rendu possible grâce au soutien de l'Institut Pasteur de la Guyane, qui a gracieusement mis à disposition un laboratoire nécessaire aux analyses.



Photo de couverture: G. Feuillet

Association Kwata, 2010. "Etude de la diversité génétique et de l'histoire démographique des tortues luths de Guyane". Rapport Kwata / Diren, Cayenne, 2010.

Les tortues luths de la région des Guyanes constituent avec celles d'Afrique de l'ouest la population la plus importante du monde, marquant de surcroît une tendance à l'augmentation de l'activité de ponte (Fossette et al. 2008). Ces populations restent cependant fragiles, tant les menaces qu'elles rencontrent dans les différentes étapes de leur cycle de vie sont prégnantes. La tortue luth reste en danger critique d'extinction sur la Liste Rouge des espèces menacées (www.redlist.org), bénéficiant dans la plupart des pays de plans d'action nationaux, associés à de nombreuses initiatives internationales (voir par exemple www.wwfguianas.org, www.widecast.org, www.wcs.org, www.conservation.org). La biologie moléculaire et la génétique permettent alors d'éclairer plusieurs aspects liés à l'histoire et à l'écologie des espèces, complétant les approches plus classiques, contribuant de manière certaine à la conservation des espèces (Lande 1988, Moyle et al. 2003).

Ces outils ont cependant été peu utilisés chez la tortue luth. La phylogénie aborde les relations entre différentes populations; la dynamique des populations aborde l'évaluation de la taille d'une population bien identifiée, l'origine précise des individus, la dynamique actuelle de la population: échanges génétiques (flux de reproducteurs), ségrégations, expansions. Une étude de phylogénie et phylogéographie (étude des relations entre structure génétique et distribution géographique) avait montré pour les populations de l'Atlantique une différence génétique marquée ("structuration") entre les femelles pondant sur les îles de la Caraïbe et celles pondant sur le continent (Dutton et al. 1999). Plus récemment, une étude sur la population d'Awala Yalimapo avait suggéré que les femelles pondant en Guyane étaient principalement issues d'un stock global ("population"), constituant un groupe ("métapopulation") ayant pu profiter d'opportunités écologiques favorables, à savoir les cordons sableux de l'ouest de la Guyane (Rivalan et al. 2006). Enfin, l'étude de la structure des tortues prélevées au large du Brésil montre une structure complexe et diverse et suggère l'existence plusieurs "populations" (Vargas et al. 2008).

Les marqueurs d'ADN nucléaire et certains gènes de l'ADN mitochondrial sont très variables, et permettent de connaître avec précision la dynamique des populations à une échelle géographique restreinte. En utilisant ces deux types de marqueurs sur une population, ce qui n'a encore été fait sur aucune population de tortues luths, et en utilisant des procédures de calcul encore peu mises en place dans les études de dynamique de populations (Storz & Beaumont 2002), les informations génétiques peuvent donc apporter des éléments complémentaires aux données relevées sur le terrain:

- la diversité génétique et l'équilibre de la population sont indicateurs de son statut;
- l'histoire démographique donne une évolution quantitative des effectifs au cours de centaines/milliers de générations;
- la taille de la population efficace peut être estimée, donnant une idée précise de la taille de la population réelle.

Résultats

1. Diversité génétique

ADN mitochondrial

Quarante deux individus (25 de Cayenne, et 17 d'Awala-Yalimapo) ont été séquencés sur le *cytochrome b* (total: 1 118 paires de bases), et 27 individus ont été séquencés sur la région de contrôle (*D-loop*) (892 paires de bases). Les diversités sont présentées dans le Tableau 1, et comparées avec les résultats obtenus chez d'autres populations dans le Tableau 2. La diversité génétique de la région de contrôle de la population en Guyane est plutôt forte, comparée avec celle d'autres populations.

Tableau 1. Diversités génétiques de l'ADN mitochondrial chez la population guyanaise

	Nombre d'haplotypes	Diversité haplotypique	Diversité nucléotidique
Région de contrôle	5	0.681 +/-0.06	0.00352 +/- 0.00029
Cytochrome b	2	0.508 +/- 0.022	0.00045 +/- 0.00002

Tableau 2. Diversité génétiques comparées de la région de contrôle dans différentes populations de tortues luths (496 paires de bases)

	Diversité haplotypique	Diversité nucléotidique	références
Guyane	0.517	0.0042	Cette étude
Costa Rica (Pacifique)	0.663	0.0016	Dutton et al. 1999
Malaisie	0.806	0.0019	Dutton et al. 1999
Mexique	0.712	0.0017	Dutton et al. 1999
Iles Salomon	0.607	0.0021	Dutton et al. 1999
Ste Croix	0.589	0.0011	Dutton et al. 1999
Trinidad	0.501	0.0019	Dutton et al. 1999
Costa Rica (Atlantique)	0.138	0.0005	Dutton et al. 1999
Brésil	0.369	0.0014	Vargas et al. 2008

ADN nucléaire

La variabilité de l'ADN nucléaire a été très peu étudiée chez la tortue luth. Après un important travail de mise au point à partir des marqueurs nucléaires disponibles chez les autres espèces de tortues marines, 5 marqueurs d'intérêt ont pu être utilisés dans cette étude. La variabilité de ces 5 marqueurs a été évaluée chez 60 individus. Les comparaisons des diversités génétiques ne sont disponibles que pour 3 loci, sur une population précédemment étudiée de tortues luths de la côté pacifique du Costa Rica (Tableau 3).

Tableau 3. Diversités des 5 microsatellites testés chez les tortues de Guyane, et comparaisons avec une population du Pacifique.

	Guyane (cette étude)		Costa Rica (Crim et al. 2002)	
	nombre d'allèles	hétérozygotie	nombre d'allèles	hétérozygotie
CC117	12	0.804	9	0.730
Cm3	8	0.963	3	0.507
Cm84	11	0.868	7	0.749
OR8	7	1.000		
OR16	7	1.000		

Pour les 3 loci utilisés pour l'étude des populations de Guyane et du Pacifique, il apparaît une diversité plus forte en Guyane, à la fois sur la richesse allélique (allèles: formes différentes d'un même fragment d'intérêt) et sur l'hétérozygotie (fraction d'individus avec, pour le même fragment, deux allèles différents, l'un d'origine maternelle et l'autre d'origine paternelle. Plus la diversité est forte, plus la probabilité que les allèles maternel et paternel soient différents augmente).

2. Histoire démographique de la population guyanaise

L'histoire démographique (évolution de la taille de la population efficace) peut être explorée à deux échelles, selon les taux de mutation des gènes utilisés. L'ADN mitochondrial a un taux de mutation inférieur à 1% par million d'années: il permet de travailler à une échelle de milliers de générations. Le taux de mutation de l'ADN nucléaire est environ dix fois plus important, et permet de détecter une évolution de population à l'échelle de quelques centaines de générations. La Figure 1 montre l'évolution de la taille de la population efficace, calculée à partir de la variabilité des séquences d'ADN mitochondrial au cours des 100 000 dernières années (méthode: Bayesian Skyline Plot, horloge moléculaire stricte, taux de mutation fixé à 0.4% / millions d'années, d'après Bowen et al. 1993).

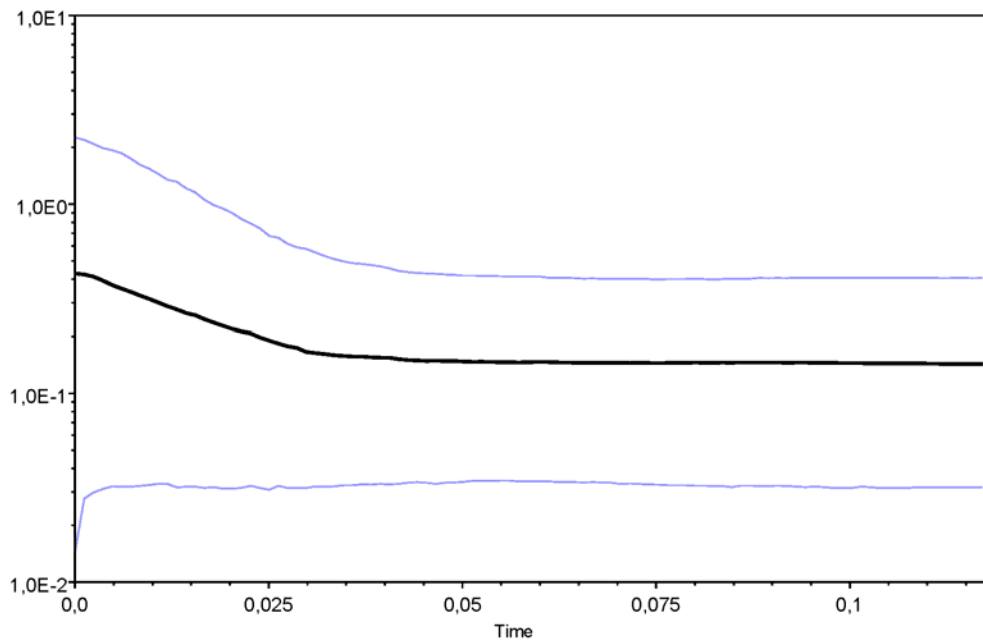


Figure 1. Histoire démographique de la population de tortues luths de Guyane. Abscisse en millions d'années

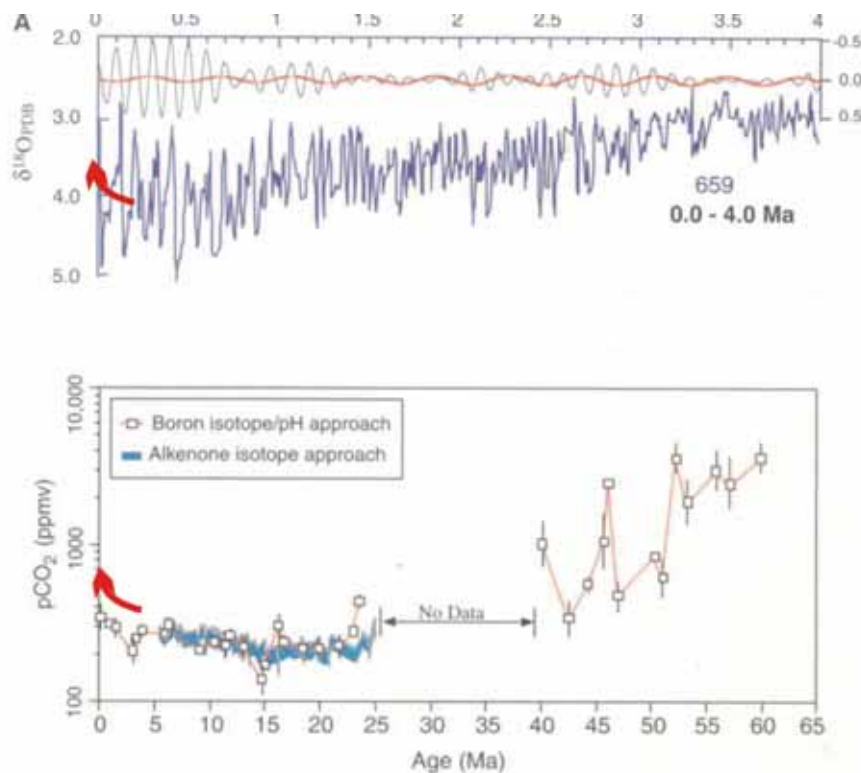


Figure 2. Evolution au cours des derniers millions d'années de la quantité d'isotope stable ^{18}O , indicateur de la température océanique moyenne (haut), et du CO_2 atmosphérique, corrélé à la production planctonique (bas). D'après Zachos et al. 2001. En rouge, évolution démographique des tortues luths (cette étude).

La courbe de la Figure 1 montre une expansion nette depuis 25 000 ans, suivie d'une stabilisation. Les tortues luths de Guyane ayant des haplotypes comparables à ceux observés dans le reste de l'Atlantique, il est possible de considérer que cette courbe reflète celle de la globalité de la population Atlantique. Cette augmentation peut être une réponse de l'espèce à la sortie de la dernière période froide, et à la réaugmentation associée des ressources planctoniques (Zachos et al. 2001) (Figure 2).

La variabilité des marqueurs nucléaires, indicateurs d'une démographie plus récente, montre que la population de tortues luths de Guyane n'est pas à l'équilibre de Hardy Weinberg ($F_{IS}=-0.248$): elle montre un excès marqué en hétérozygotes ($p<0.0001$), et une distribution très hétérogène des fréquences alléliques (Figure 3).

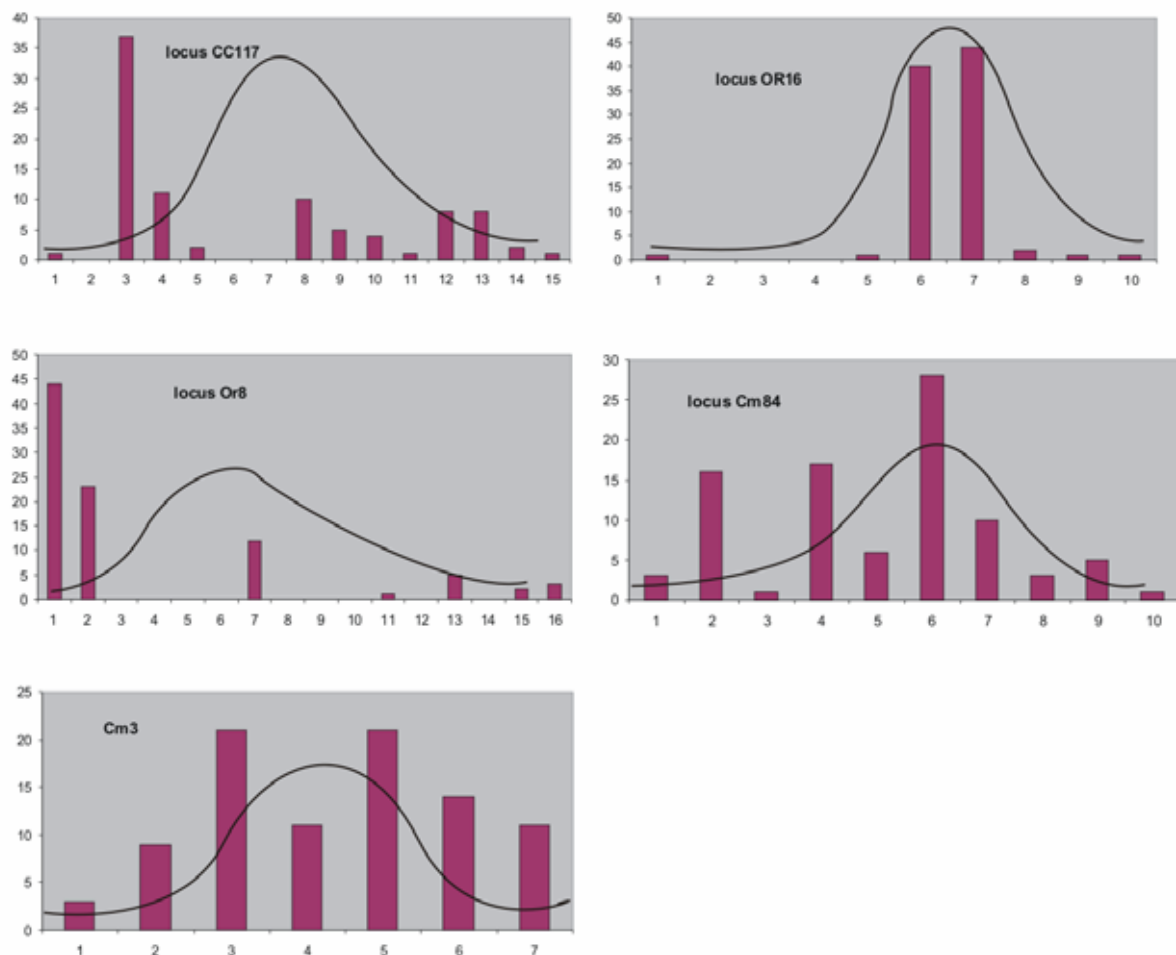


Figure 3. Distribution observée des fréquences alléliques (histogrammes), et distribution théorique (courbes noires) dans une population qui serait en expansion marquée.

Mis à part pour le locus OR16, la distribution des fréquences est en faveur d'une population qui a connu une décroissance importante. L'explication la plus plausible d'un tel excès en hétérozygotes et de cette distribution allélique est un goulot d'étranglement, c'est-à-dire une diminution brutale de la taille de population efficace actuelle. Les paramètres de ce goulot (amplitude et âge) sont résumés dans le Tableau 4. La variabilité des microsatellites permet aussi de calculer la taille de la population efficace. En considérant un ratio taille efficace / taille totale de population de 0.08 (Frankham 1995), la population réelle estimée des luths de Guyane est d'environ 4 500 femelles.

Tableau 4. Amplitude et âge du goulot d'étranglement identifié chez les tortues luths de Guyane

	Résultats MSVAR*	Applications à la population
Ratio populations actuelle / ancestrale	0.3 - 0.5	
Age du goulot d'étranglement	100 générations	1 000 ans
Taille population actuelle	350 femelles efficaces	4 500 femelles

* méthodes bayésiennes et MCMC, logiciels MSVAR 0.4 et 1.3 (Storz & Beaumont 2002).

3. Structures de populations

Dans cette étude, 3 groupes peuvent a priori être distingués: Awala-Yalimapo, Cayenne 2008, et Cayenne 2009. Les trois populations montrent une structuration faible mais statistiquement significative ($F_{ST}(\text{Weir\&Cochram}) = 0.0288$, $p(\text{Fisher}) = 0.004$). Les populations de Cayenne 2008 et Cayenne 2009 sont celles entre lesquelles la structuration est marquée ($F_{ST} = -0.03$, $p=0.004$). La Figure 4 montre la répartition de chacun des individus, en fonction de leurs caractères alléliques (position dans l'espace) et de leur groupe (couleur).

Cette structuration à une très petite échelle doit être confirmée avec d'autres microsatellites, et des échantillons plus importants. Mais ce résultat, bien qu'encore provisoire, rejoint cependant celui obtenu avec l'utilisation d'autres marqueurs génétiques, les RAPD (Perridy 2009).

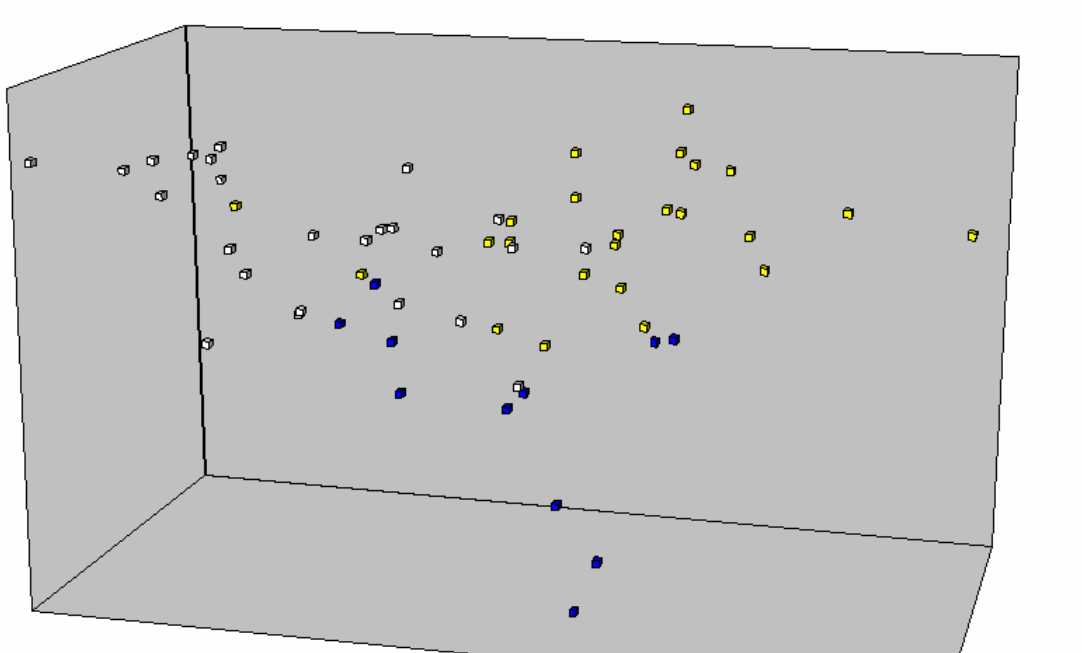


Figure 4. Analyse factorielle des correspondances sur les profils génétiques, montrant les 3 populations: Awala (individus en bleu), Cayenne 2008 (blanc) et Cayenne 2009 (jaune). Axe horizontal: F1, 53% de la variabilité; axe vertical: F2, 42% de la variabilité; axe en profondeur: F3: 5% de la variabilité

4. Relations phylogéniques

La Figure 5 montre les relations phylogénétiques entre les différents haplotypes décrits chez la tortue luth. En Guyane, deux haplotypes sont retrouvés, l'un étant des haplotypes majoritaire dans l'Atlantique (Figure 5, clade du haut) et l'autre dans le Pacifique (Figure 5, clade du bas) (Dutton et al. 1999). La population guyanaise n'a pas ainsi de profil génétique particulier, et peut être considérée comme provenant de ce stock très global qui constitue l'essentiel de la diversité de l'espèce.

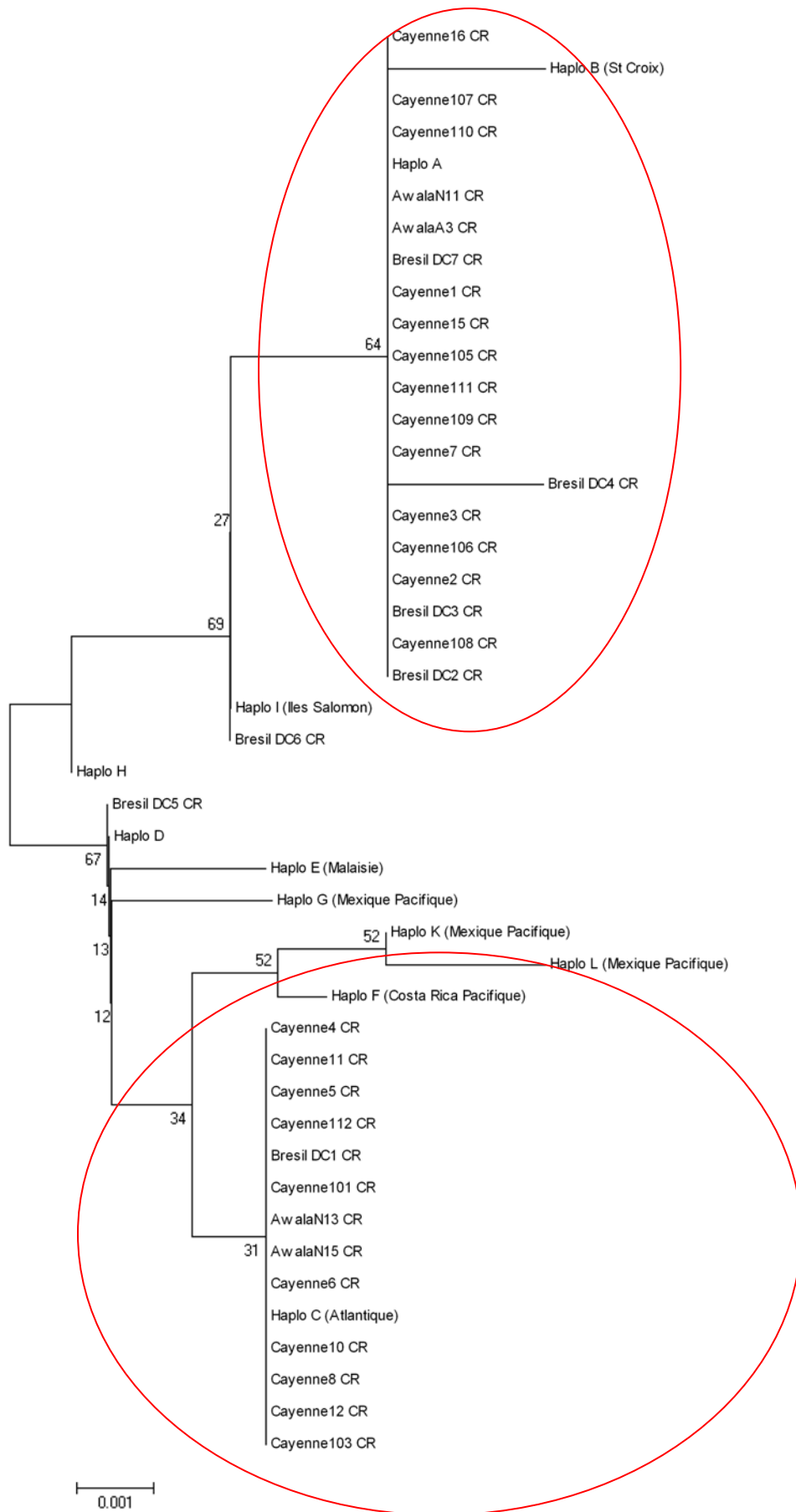


Figure 5. Distribution des haplotypes identifiés en Guyane.

Conclusions

Les points marquants issus de ce travail sont

- La présence en Guyane d'une population présentant une forte diversité génétique, et une taille importante.

Les estimations les plus récentes de la taille de la population de tortues luths du Nord Atlantique font état de 34 000 à 95 000 individus, dont 20 000 à 56 000 femelles adultes (NOAA 2007). Ce cheptel serait également réparti entre les côtes ouest-américaine et est-africaine. En Guyane, les estimations de taille de populations, sur la base du nombre de pontes annuelles et en considérant un nombre de ponte moyenne de 8,3 par femelle, sont de 1 500 à 3 000 femelles (Fossette et al. 2008). Un premier travail de génétique sur les tortues d'Awala-Yalimapo uniquement avait calculé une taille efficace de population de 90 à 220 individus (Rivalan et al. 2006), ce qui correspondrait à environ 1 100 à 2 700 femelles. Les chiffres trouvés ici, qui considèrent toute la population guyanaise, sont donc globalement en cohérence avec ces estimations, et confirment l'importance de la population guyanaise.

- La marque d'une population qui a connu un accroissement il y a quelques dizaines de milliers d'années, potentiellement expliqué par une modification des conditions océaniques, suivi d'une chute d'environ 30 à 50% des effectifs, il y a environ 1000 à 2000 ans. Cette chute est antérieure à celle pouvant résulter d'impacts d'origine humaine, et pourrait aussi être expliquée par des événements historiques récents de l'Océan atlantique, qui a connu une période de refroidissement dans le nord il y a 2000 à 3000 ans (Moros et al. 2006). La population actuelle est donc en deçà de ce qu'elle a pu être il y a plusieurs centaines de générations, et reste donc fragile, en dépit d'une tendance globale à l'augmentation de l'activité de ponte (Fossette et al. 2008) (Figure 6). Plusieurs hypothèses non exclusives peuvent expliquer cette tendance positive: le déplacement des femelles qui pondaient au Suriname ou/et au Guyana, soulignant l'importance d'un suivi global dans la région (Kelle et al. 2007), la reprise effective de l'activité d'une population relictuelle, avec les effets possibles des mesures de conservation en place dans la région (Seminoff 2007).

- A une petite échelle, il apparaît enfin un certain niveau de structuration des tortues: cette structuration doit être confirmée, mais pourrait par exemple être expliquée par des comportements post pontes différents (Fossette et al. 2010).

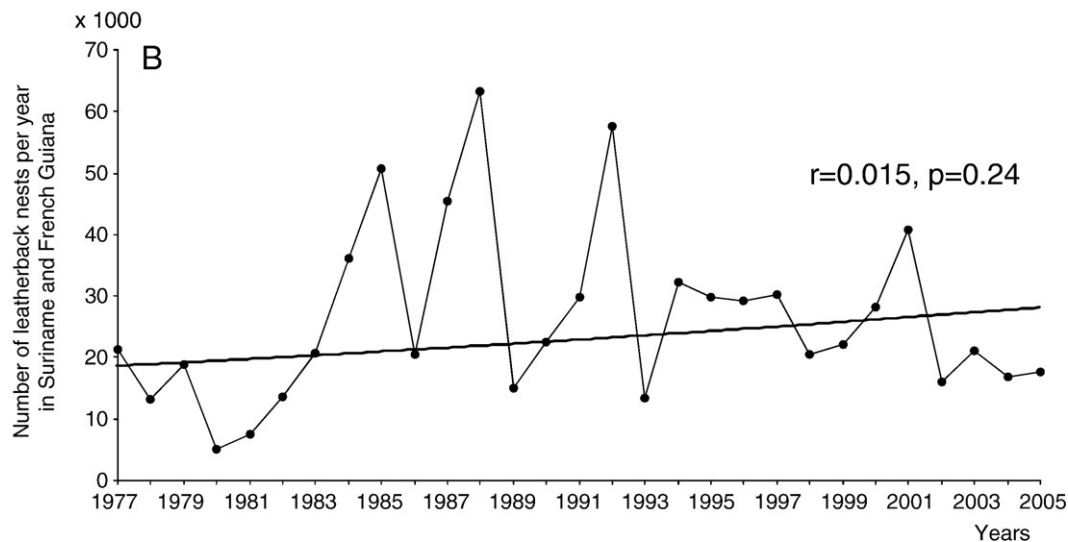


Figure 6. Evolution du nombre annuel de pontes de tortues luths au Suriname et en Guyane. D'après Fossette et al. 2008.

Ce travail présenté ici est novateur dans la région, et unique encore à l'heure actuelle pour les tortues luths. Il doit être complété et approfondi, mais peut d'ores et déjà apporter des informations majeures pour la stratégie de conservation de l'espèce, avec 2 points fondamentaux:

- (i) une population importante mais fragilisée par une susceptibilité marquée aux évolutions climatiques de moyen et court terme;
 - (ii) des structurations génétiques qui pourraient être liées à des stratégies de reproduction différentes.
- La conservation de l'espèce dans toute sa diversité ne peut donc se faire qu'avec celle des habitats océaniques associés à ces stratégies.

Méthodes utilisées

Extraction de l'ADN et amplification des fragments d'intérêt

Le matériel biologique était un fragment de peau, prélevé par biopsie sur la nageoire avant avant de l'animal, puis conservé dans l'alcool à 95°, ou un échantillon de sang. Les prélèvements ont été faits sur l'Ouest guyanais (responsable des prélèvements: JY Georges, CNRS Strasbourg) et sur l'Est guyanais (responsable: B. de Thoisy, association Kwata). L'ADN était ensuite extrait en laboratoire après lyse des tissus et traitement par le phénol / chloroforme, puis précipitation à l'isopropanol.

- ADN nucléaire: obtention des loci microsatellites

Aucune séquence d'amplification n'a été décrite spécifiquement chez la tortue luth. Le travail a donc commencé en testant toutes les séquences identifiées chez les autres tortues marines, afin de voir quels fragments d'intérêt seraient amplifiés et variables chez la tortue luth (Tableau 4).

Tableau 4. Origine et succès des microsatellites testés chez la tortue luth.

	Espèce	amplification	polymorphe	utilisé
CC117	<i>Caretta caretta</i>	ok	ok	ok
Cm3	<i>Chelonia midas</i>	ok	ok	ok
Cm84	<i>Chelonia midas</i>	ok	ok	ok
OR8	<i>Lepidochelys olivacea</i>	ok	ok	ok
OR16	<i>Lepidochelys olivacea</i>	ok	ok	ok
OR17	<i>Lepidochelys olivacea</i>	non		non
Ei8	<i>Eretmochelys olivacea</i>	non		non
OR14	<i>Lepidochelys olivacea</i>	non		non
OR9	<i>Lepidochelys olivacea</i>	non		non

- ADN mitochondrial

Deux gènes de l'ADN mitochondrial, la région de contrôle (*D-loop*) et le *cytochrome b*, avaient été séquencés dans les deux seules études précédentes (Dutton et al. 1999; Vargas et al. 2008). Afin de disposer d'éléments de comparaison, ces deux gènes ont également été utilisés ici.

- Analyses des résultats

ADN mitochondrial

Les logiciels MEGA et DNASP ont été utilisés pour l'analyse des séquences: diversité, arbres phylogénétiques. L'histoire démographique de la population a été étudiée par les méthodes bayésiennes telles que proposées par BEAST 1.4.8: le bayesian skyline plot (BSP) permet de montrer l'évolution de la taille de la population efficace.

ADN nucléaire

Les proportions de Hardy-Weinberg, relatives aux fréquences en hétérozygotes et homozygotes, renseignent sur le statut génétique de la population. Dans le cas de population présentant en effet une trop forte proportion d'individus homozygotes, le nombre de reproducteurs efficaces est faible, et il y a un risque de consanguinité. Dans le cas où plusieurs populations sont identifiées, le nombre de migrants représente, par génération, le nombre de reproducteurs efficaces passant d'une sous-population à une

autre. Enfin, il est possible d'identifier les goulots d'étranglement (perte brutale d'un nombre important d'individus). Les logiciels GENEPOP et FSTAT ont été utilisés pour calculer les diversités et les équilibres des populations, GENEPOP et GENETIX pour la structuration des populations, et MSVAR 0.4 et 1.3 pour caractériser le goulot d'étranglement.

Références citées

- Bowen BW, Nelson WS, Avise JC. 1993. A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 5574-5577.
- Crim JL, Spotila LD, Spotila JR, O'Connor M, Reina R, Williams CJ, Paladinos FV. 2002. The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. *Molecular Ecology* 11:2097-2106.
- Dutton PH, Bowen BW, Owens DW, Barragan A, Davis SK. 1999. Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Journal of Zoology*, 248: 397-409.
- Fossette S, Kelle L, Girondot M, Goverse E, Hilterman MJ, Verhage B, de Thoisy B, Georges JY. 2008. The world's largest leatherback rookeries: conservation-oriented research in French Guiana / Suriname and Gabon. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 356: 69–82.
- Frankham R. 1995. Effective population size / adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetic Research* 66: 95-107.
- Kelle L, Gratiot N, Nolibos I, Thérèse J, Wongsopawiro R, de Thoisy B. 2007. Monitoring of nesting Leatherback Turtles (*Dermochelys coriacea*): contribution of remote sensing for real-time assessment of beach coverage in French Guiana. *Chelonian Conservation and Biology* 6: 142-147.
- Lande R 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241: 1455-1460.
- Moros M, Andrews JT, Eberl DD, Jansen E. 2006. Holocene history of drift ice in the northern North Atlantic: Evidence for different spatial and temporal modes. *Paleoceanography*, 21, PA2017, doi:10.1029/2005PA001214.
- Moyle LC, Stinchcombe JR, Hudgens BR, Morris WF. 2003. Conservation genetics in the recovery of endangered animal species: a review of US endangered species recovery plans (1977–1998). *Animal Biodiversity and Conservation* 26: 85–95.
- NOAA. 2007. An assessment of the leatherback turtle population in the Atlantic ocean. NOAA Tech.Memo. NMFS-SEFSC-555, p. 116. www.sefsc.noaa.gov.
- Perridy V. 2009. Test de la philopatrie chez la tortue luth (*Dermochelys coriacea*) par une approche génétique. Mémoire de Master 2 "écophysiologie et éthologie", Université de Strasbourg.
- Rivalan P, Dutton PH, Baudrya E, Roden SE, Girondot A. 2006. Demographic scenario inferred from genetic

data in leatherback turtles nesting in French Guiana and Suriname. *Biological Conservation* 130: 1-9.

Seminoff JA, Paladino FV, Rhodin AGJ. 2007. Refocusing on leatherbacks: conservation challenges and signs of success. *Chelonian Conservation and Biology* 6: 1-6.

Storz JF, Beaumont MA. 2002. Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. *Evolution* 56: 154-166.

Vargas SM, Araujo FCF, Monteiro DS, Estima SCE, Almeida AP, Soares LS, Santos FR. 2008. Genetic diversity and origin of Leatherback Turtles (*Dermochelys coriacea*) from the Brazilian Coast. *Journal of Heredity* 99: 215–220.