

UNIVERSITE DU CENTRE

INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LA
MER



MEMOIRE

Pour l'obtention du

Diplôme des Etudes Approfondies en Biologie et Santé

Spécialité : Génétique

Présenté par

CHAIEB Oifa

**ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE
DES TORTUES MARINES *Caretta caretta* ET DES
TORTUES DULÇAQUICOLES *Mauremys leprosa*
DANS LES EAUX TUNISIENNES**

Soutenu le 27/12/2003 devant le jury :

Mr. El ABED Amor : Président
Mr. SAID Khaled : Directeur
Mr. CHATTI Nouredine : Membre
Mr. EL OUAER Ali : Membre

REMERCIEMENT

*J'adresse mes remerciements les plus respectueux à Monsieur **Khaled SAID**, Professeur à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir d'avoir dirigé ce travail. Sous sa direction, j'ai eu la chance de pouvoir accéder à tous les moyens nécessaires pour développer ma problématique avec une rare autonomie. Il m'a fait profiter largement avec une entière disponibilité de son expérience, ses connaissances et de ses précieux conseils tout au long de mon travail. A ce titre, j'espère sincèrement que mes efforts auront été à la hauteur de ses espoirs. Il me fait aujourd'hui l'honneur de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Amor EL ABED**, Secrétaire d'Etat auprès du ministre de l'Agriculture, de l'Environnement et des Ressources Hydrauliques, Chargé de Ressources Hydrauliques et de la Pêche et Directeur du Laboratoire de Biodiversité et de Biotechnologie Marines à l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, pour l'intérêt et les encouragements qu'il a portés pour la réalisation de ce travail. Il me fait aujourd'hui l'honneur de présider le jury, je profite de cette occasion pour lui exprimer mes respects et ma haute estime.*

*J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur **Noureddine CHATTI**, Maître-Assistant à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir pour sa collaboration et pour le temps qu'il a consacré à critiquer le manuscrit. Il a toujours veillé au bon déroulement de mon travail. Honorée d'avoir suscité l'intérêt de tel Expert, je tiens à le remercier d'avoir accepté de faire partie du jury aujourd'hui et de juger ce travail. Qu'il trouve, ici, l'expression de mes respects et ma profonde reconnaissance.*

*Monsieur **Ali ELOUAER**, Ingénieur Chercheur et Responsable du Centre I.N.S.T.M. de Monastir, a toujours mis à ma disposition les moyens nécessaires pour la réalisation et le bon déroulement de ce travail. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon entier dévouement pour l'encadrement, pour tous les sacrifices qu'il m'a consentis, les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigués et la patience qu'il a montrée tout au long de ce travail. Il me fait aujourd'hui l'honneur de juger ce travail, Je tiens à lui exprimer ici mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude.*

J'exprime ma profonde gratitude à Mr le Professeur Ahmed Nouredine HELEL, Directeur de l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Je tiens à lui exprimer ici mes plus vifs remerciements et ma haute estime.

Je tiens à remercier Mr M. Nejmeddine Bradai, chargé de recherche à l'I.N.S.T.M. de Sfax ainsi que Mr Imed JRIBI, assistant à la faculté des Sciences de Sfax pour leur collaboration fructueuse.

J'adresse mes vifs remerciements à tous les personnels de l'I.N.S.T.M. de Monastir qui m'ont bien accueillie au centre et m'ont aidé à la réalisation de mon travail. Un remerciement tout particulier revient aux Mrs Mahmoud ROMDHANE et Khelifa MAHFOUDH, techniciens à l'INSTM qui m'ont beaucoup aidé au cours de l'échantillonnage. Qu'ils trouvent, ici, l'expression de ma profonde gratitude.

Les mots manquent pour remercier Rym ZITARI, Hichem BEN SLIMEN, Hager BLEL, assistants contractuels à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Abdelwaheb BEN OTHMEN, assistant à la faculté des Sciences de Gabès, Ikhyarhoum OULD BRAHIM, doctorant en biologie et Mme Sihem SKHIRI-SAFIA, technicienne supérieure en biologie de m'avoir aidé et encouragé au cours de ce travail et de leur collaboration technique très efficace.

J'adresse mes vifs remerciements à tous mes collègues de l'équipe de l'unité de recherche Génétique: Biodiversité et Environnement, pour leur collaboration et leur encouragement: Feryel, Samia, Dorsaf, Souad, Saloua, Aïcha, Sarra et Lamia.

Je ne peux pas terminer cette page sans avoir une pensée particulière à mes Amis de toujours, j'ai nommé : Rchid, Wissem, Mohsen, Ines, Chiraz, Imen, Leila, Meriem et Sawsen.

Etude de la variabilité génétique des tortues marines *Caretta caretta* et des tortues d'eau douce *Mauremys leprosa* dans les eaux tunisiennes

Résumé

La variabilité génétique des tortues marines de l'espèce *Caretta caretta* ainsi que des tortues d'eau douce de l'espèce *Mauremys leprosa* dans les eaux tunisiennes, a été appréhendée par une approche allozymique. Douze systèmes enzymatiques codés par 17 loci chez *Caretta caretta* et 15 loci chez *Mauremys leprosa* ont été analysés.

Chez *Caretta caretta*, sept loci se sont révélés polymorphes : *Es-3*, *Got-1*, *G6pd-1*, *Idh-1*, *Mdh-1*, *Pgd-1* et *Sdh-1*.

Chez *Mauremys leprosa*, huit loci se sont révélés polymorphes : *Es-3*, *Got-1*, *Gpi-1*, *G6pd-1*, *Idh-1*, *Mdh-1*, *Pgd-1* et *Sod-1*.

Ce travail a montré chez *Caretta caretta*, une variabilité génétique relativement élevée en comparaison avec d'autres études, ceci reflèterait la taille efficace de la population méditerranéenne de la caouanne. De plus, une identité génétique quasi-totale a été enregistrée entre les populations de nouveau-nés pondus au cours de la même saison. Ceci témoigne fort probablement du retour de la même femelle nidifiante au cours de la même saison de ponte. L'examen des génotypes à l'intérieur de chaque ponte montre une déviation significative des fréquences génotypiques observées par rapport aux proportions mendéliennes, ce qui confirme la paternité multiple (au minimum 2 mâles par nid) dans les quatre pontes.

Chez *Mauremys leprosa*, une variabilité génétique assez élevée a été enregistrée au cours de ce travail. Ceci témoignerait de l'importance de la taille des populations des tortues d'eau douce de l'espèce *Mauremys leprosa* en Tunisie. D'autre part, des différences peu significatives entre les six populations ont été remarquées, ce qui suggère que ces populations appartiennent à la même espèce d'eau douce. Enfin, cette étude nous a permis de conclure à une structuration géographique de la variabilité génétique chez les populations de *Mauremys leprosa*. En effet, la population de oued Abid, relativement, la plus éloignée génétiquement du reste des populations, provient d'un petit oued isolé des autres. Quant aux populations du Sud ainsi que celles du Centre, la faible divergence génétique entre les populations de la même région pourrait s'expliquer par un flux génétique continu facilité par des déplacements aquatiques et/ou terrestres des tortues.

Il est intéressant de continuer cette étude par l'analyse d'autres populations tunisiennes en comparaison avec des populations d'autres pays. Dans cette optique, un nombre plus élevé de systèmes enzymatiques ainsi que d'autres marqueurs génétiques seront étudiés.

Mots clés : *Caretta caretta*, *Mauremys leprosa*, allozymes, variabilité génétique, flux génétique, structuration géographique

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
DONNEES BIOLOGIQUES	
I. Tortues marines.....	5
I.1. Généralités sur les tortues marines	5
I.2. Etude de <i>Caretta caretta</i> en Tunisie.....	8
I.2.1. Systématique.....	8
I.2.2. Répartition géographique.....	8
I.2.3. Reproduction.....	8
I.2.3.1. L'accouplement et la fécondation.....	8
I.2.3.2. La ponte.....	9
I.2.3.3. L'incubation des oeufs.....	10
I.2.3.4. L'éclosion et l'émergence.....	10
I.2.4. Alimentation.....	11
I.2.5. Age et croissance.....	11
I.2.6. Dangers menaçant les tortues marines.....	11
II. Les tortues d'eau douce : <i>Mauremys leprosa</i> (Schweigger, 1812) et <i>Emys orbicularis</i> (Linnaeus, 1758)	12
II.1. Généralités sur les tortues d'eau douce.....	12
II.2. Systématique.....	14
II.2.1. <i>Mauremys leprosa</i>	14
II.2.2. <i>Emys orbicularis</i>	14
II.3. Distribution géographique.....	15
II.4. Cycle biologique.....	16
II.5. Déterminisme sexuel.....	17
II.6. Régime alimentaire.....	17
II.7. Age et croissance.....	18
II.8. Prédation.....	18
II.9. Dangers menaçant les tortues d'eau douce.....	18
MATERIELS ET METHODES	
MATERIELS.....	19
I. Matériel biologique.....	19
I.1. La tortue marine <i>Caretta caretta</i>	19
I.2. La tortue d'eau douce <i>Mauremys leprosa</i>	19
II. Matériel d'électrophorèse.....	24
METHODES.....	25
I. Préparation des échantillons.....	25
I.1. Préparation du sang.....	25
I.2. Préparation des organes.....	25
II. Etude allozymique.....	26

II.1. Principe de l'électrophorèse.....	26
II.2. Les facteurs affectant la mobilité électrophorétique.....	27
II.2.1. La structure des protéines.....	27
II.2.1.1. Influence de la structure primaire des protéines.....	27
II.2.1.2. Influence des évènements post-traductionnels.....	27
II.2.2. Conditions expérimentales.....	28
II.2.2.1. Influence des conditions électrochimiques.....	28
II.2.2.2. Influence du pH.....	28
II.2.2.3. Influence de la composition et de la concentration en sels de la solution.....	28
II.2.2.4. Influence de la nature du support électrophorétique.....	28
a- L'acétate de cellulose.....	29
b- L'agarose, l'amidon et la polyacrylamide.....	29
II.3. Réalisation des électrophorèses.....	29
II.3.1. Préparation des gels.....	29
II.3.2. Réalisation de l'électrophorèse.....	30
II.3.3. Révélation enzymatique.....	30
II.3.3.1. Révélation des protéines sans fonction enzymatique.....	31
a- Protéines générales.....	31
b- Coloration d'un corps chimique associé à la protéine.....	31
II.3.3.2. Révélation des protéines en utilisant leur fonction enzymatique.....	31
a- Oxydoréductase / déshydrogénase.....	32
b- Isomérase, hydrolase et ligase.....	33
c- Les hydrolases.....	33
II.4. Systèmes enzymatiques étudiés, composition des solutions standard d'électrophorèse et techniques de révélation des enzymes.....	34
II.4.1. Tableau des systèmes enzymatiques étudiés, des tissus et des tampons d'électrophorèse utilisés.....	34
II.4.2. Composition des solutions standards (électrophorèse et révélation)	
II.4.2.1. Description des systèmes de tampon d'électrophorèse.....	35
II.4.2.2. Description des solutions tampons pour les révélations enzymatiques.....	35
II.4.2.3. Description des solutions mères.....	35
II.4.3. Techniques de révélation des systèmes enzymatiques.....	36
II.4.3.1. Oxydoréductases / Déshydrogénases.....	38
II.4.3.2. Transférases/ Transaminases.....	38
II.4.3.3. Hydrolases.....	40
II.5. Interprétation génétique des zymogrammes.....	41
III. Analyse statistique.....	42
III.1. Calcul des fréquences géniques.....	43
III.1.1. Cas de deux ou plusieurs allèles codominants.....	43
III.1.2. Cas d'un allèle récessif (à un locus).....	43
III.2. Mesure de la variabilité génétique.....	44
III.2.1. Taux moyen d'hétérozygotie (H).....	44
III.2.2. Taux de polymorphisme (P).....	44
III.2.3. Nombre moyen d'allèles par locus (A).....	45
III.3. Equilibre de Hardy-Weinberg.....	46
III.4. Mesure de la divergence génétique.....	46
III.5. Méthodes de reconstitution	47

RESULTATS

I. Résultats électrophorétiques par système enzymatique.....	50
I.1. Estérases : (Es)	50
I.2. Glutamat-oxaloacétate-transaminases (Got).....	50
I.3. Glucose Phosphate Isomérase : (Gpi).....	50
I.4. Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase : (G6pd).....	50
I.5. Isocitrate Déshydrogénase : (Idh).....	54
I.6. Lactalate Déshydrogénase : (Ldh).....	54
I.7. Malate Déshydrogénase : (Mdh).....	54
I.8. Enzyme malique : (Mod).....	54
I.9. Phosphogluconate Déshydrogénase : (Pgd).....	59
I.10. Phosphoglucomutase : (Pgm).....	59
I.11. Sorbitol Déshydrogénase : (Sdh).....	59
I.12. Superoxyde dismutase : (Sod).....	59
II. Analyse de la variabilité génétique.....	64
II.1. Fréquences alléliques et équilibre de Hardy-Weinberg.....	65
II.1.1. <i>Mauremys leprosa</i>	65
II.1.2. <i>Caretta caretta</i>	65
II.2. Les paramètres de la variabilité génétique (H, P et A)	66
II.2.1. <i>Mauremys leprosa</i>	71
II.2.2. <i>Caretta caretta</i>	71
II.3. Variabilité génétique intrapopulationnelle.....	71
II.3.1. <i>Mauremys leprosa</i>	73
II.3.2. <i>Caretta caretta</i>	73
	75
III. Distances génétiques et arbre phylogénétique.....	
III.1. <i>Mauremys leprosa</i>	77
III.2. <i>Caretta caretta</i>	77
	77
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	
I. Variabilité génétique et structuration de <i>Mauremys leprosa</i>	
II. Variabilité génétique des populations de <i>Caretta caretta</i>	80
	83
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	

INTRODUCTION

La mesure des structures de parenté, l'identification des unités de reproduction et la mesure de leur interdépendance, l'analyse de la structuration spatiale des espèces et de l'efficacité des migrations à courte, moyenne et grande distances sont des questions qui revêtent une importance théorique fondamentale en biologie des populations et en génétique écologique. Ces mesures trouvent également des applications dans les domaines de l'évaluation des ressources génétiques, de la biologie de la conservation et de la gestion des stocks.

Une question qui est fréquemment posée est celle de la mesure de la biodiversité et de l'évaluation des ressources génétiques disponibles, question qui s'étend aussi à l'identification et à la gestion des stocks dans le domaine marin comme dans le domaine terrestre.

Ainsi la connaissance de l'organisation spatiale des pools géniques et de l'intensité des échanges qui prévalent entre eux, est-elle souvent un préalable pour nombre d'études en biologie des populations (Slatkin, 1985; 1987). Traditionnellement, deux types d'approches ont été entreprises: une approche directe qui consiste en l'observation des mouvements des individus ou de leurs propagules, et une approche indirecte qui vise à déduire a posteriori les mouvements efficaces des populations ou des individus en observant les traces génétiques qu'ils ont laissées.

La première approche, à la base des études de dynamique des populations, est fort utile quand on peut réaliser un marquage et une observation correcte des individus ou de leurs propagules au cours de leur cycle vital. Ceci est à l'évidence limité à un petit nombre de cas bien précis où les individus peuvent être identifiés ou marqués de manière durable et ne garantit pas que les déplacements observés soient génétiquement efficaces.

La deuxième, fait appel à l'analyse de marqueurs génétiques polymorphes. Ceci repose sur le fait que les macromolécules qui constituent le génome divergent sous l'effet des mutations, engendrant ainsi une variabilité (polymorphisme) triée au cours du temps par les trois grandes forces évolutives que sont la dérive, la sélection et la migration.

Dans le domaine de la génétique, plusieurs techniques se sont considérablement accrues ces dernières années. Il est possible dans un laps de temps raisonnable d'avoir accès aux marqueurs génétiques présentant des taux d'évolution et des degrés de polymorphisme compatibles avec la résolution des problèmes posés. Ainsi, après la découverte d'un fort polymorphisme dans les populations naturelles dans les années 60, le développement de l'électrophorèse a permis d'avoir accès à un grand nombre de gènes indépendants. En effet, cette technique, la plus largement employée à l'heure actuelle, est la seule qui soit pour le

moment applicable sur une grande échelle dans des conditions d'investissement (en temps et en argent) compatibles avec les objectifs de la génétique des populations.

La technique d'électrophorèse des protéines a joué un rôle considérable dans les problèmes de taxinomie et biostatistiques, les phylogénies, la différenciation génétique et la biologie des espèces. Grâce à cette technique, il est devenu aisé de distinguer les espèces quel que soit leur degré de ressemblance morphologique. Il suffit de trouver, en sympatrie, deux populations ayant au moins un locus présentant des allèles différemment fixés (diagnostiques) dans l'une ou l'autre population. De plus, l'électrophorèse permet de produire des données susceptibles d'apprécier la divergence entre taxons, et à partir du moment où plus de deux taxons sont étudiés, d'essayer d'en reconstituer la phylogénie. D'autre part, la possession de marqueurs génétiques polymorphes peut se révéler fort utile pour la connaissance des déplacements et migration des populations à l'intérieur d'une espèce.

Un des domaines de l'application de la génétique des populations est la biologie de la conservation des espèces. Il s'agit d'une science pluridisciplinaire qui se situe à l'interface des spécialités de la biologie des populations : écologie, éthologie, dynamique et génétique des populations. Grâce à l'outil génétique, une meilleure compréhension du fonctionnement global des populations naturelles et une connaissance de l'état d'échange entre elles et de leur dynamique permettront d'entreprendre des mesures et des actions adéquates pour une meilleure conservation de ces populations.

Dans ce contexte, nous avons entrepris l'analyse de la variabilité génétique des populations de deux espèces de tortues (la tortue marine *Caretta caretta* et la tortue d'eau douce *Mauremys leprosa*) dans les eaux tunisiennes.

Ces tortues jouent un rôle très important dans l'équilibre de l'écosystème et de la chaîne trophique. Malheureusement, elles sont exposées à plusieurs dangers et menacées d'extinction. En effet, elles entrent en interaction avec un nombre très important d'activités humaines. Ces activités qui constituent chacune une palette de menaces plus ou moins graves selon les espèces sont :

- la dégradation des sites de nidification suite à l'industrialisation et l'urbanisation du littoral
- la pollution
- les captures accidentelles par de nombreux engins de pêche (filets, chaluts, hameçons).
- le tourisme

Tous ces facteurs, ajoutés aux faibles taux de croissance et de survie des tortues, entravent la reconstitution de leurs populations et compromettent, par conséquent, des décennies d'efforts de conservation et d'investissement consentis par de nombreux pays, organismes et particuliers.

En Tunisie, les tortues marines sont déclarées menacées et les tortues d'eau douce sont des espèces protégées. Les tortues marines bénéficient actuellement d'un statut particulier à l'échelle de la Méditerranée. Leur étude et leur surveillance permettront d'établir des stratégies de protection et de conservation et par conséquent une meilleure gestion de ces populations.

Un programme national pour la protection des tortues marines a été élaboré en collaboration entre les différents organismes concernés (INSTM, APAL, ANPE, CARASP) et plusieurs actions ont été entreprises dans ce sens :

- Campagnes de sensibilisation auprès des populations maritimes.
- Protection et suivi des paramètres de reproduction de la tortue marine sur le site de nidification des îles Kuriat.
- Recensement des échouages de tortues avec détermination des épibiontes et éventuellement les causes de mortalité.
- Etude de l'impact de l'activité de pêche sur les populations des tortues marines.
- Création d'un Centre d'étude et de secours des tortues marines à l'INSTM Monastir.

Ce travail a pour objectif principal de contribuer à une meilleure conservation de l'espèce en étudiant les points suivants :

- Estimation du degré de la variabilité des gènes nucléaires de structure.
- Divergence et flux génique entre les différentes populations.
- Structuration géographique des populations des tortues d'eau douce *Mauremys leprosa*.
- S'agit-il d'une seule espèce de *Mauremys leprosa* qui ségrège dans les eaux continentales tunisiennes.
- Impact de la pêche et des changements environnementaux sur la variabilité génétique chez les deux espèces des tortues étudiées.

DONNEES BIOLOGIQUES

I. TORTUES MARINES

I.1. Généralités sur les tortues marines

Les tortues appartiennent à la classe des reptiles qui est apparue il y a 300 millions d'années. Les tortues marines sont apparues depuis le Trias, il y a 200 millions d'années. Les espèces actuelles remontent à une période plus récente d'environ 60 millions d'années. Dans le monde, on connaît sept espèces valides de tortues marines:

- La tortue de Kemp *Lepidochelys kemp* (Garman 1880)
- La tortue olivâtre *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz 1829)
- La tortue imbriquée *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus 1766)
- La caouanne *Caretta caretta* (Linnaeus 1758)
- La tortue verte *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758)
- La tortue à dossière plate d'Australie *Chelonia depressa* (Garman 1880)
- La tortue Luth *Dermochelys coriacea* (Linnaeus 1766)

Le statut de la tortue noire du Pacifique *Chelonia agassizi* pose encore problème. Certains la considèrent comme une espèce valide, d'autres la prennent comme une sous-espèce de *Chelonia mydas* et enfin elle est considérée selon certaines opinions comme une population de *Chelonia mydas* (Bowen et al., 2000).

En Méditerranée, on connaît principalement trois espèces: la caouanne, la tortue verte et la tortue Luth. En Tunisie, on retrouve ces trois espèces. La caouanne est commune et s'y reproduit (Mayet, 1903 ; Laurent, 1990). La tortue verte est rarement signalée (Laurent et al., 1990) et la tortue Luth est régulièrement observée en Tunisie (Bradai et al., 1998).

Plusieurs menaces pèsent sur les tortues marines à tous les stades de leur cycle de vie. Elles sont toutes inscrites dans la liste rouge de l'UICN (Union Internationale de Conservation de la Nature) des animaux menacés ; Elles sont protégées par des conventions internationales et régionales :

- 1- Convention de Bonn (1983) : sur la conservation des espèces migratrices appartenant à la faune sauvage : CMS
- 2- Convention de Washington (1973) : sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction : CITES
- 3- Convention de Berne (1979): sur la diversité biologique pour la conservation de la biodiversité
- 4- Convention de Barcelone : pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution.



Photo 1 : La caouanne
(*Caretta caretta*)

Photo 2 : La tortue verte
(*Chelonia mydas*)



Photo 3 : La tortue Luth
(*Dermochelys coriacea*)

Les espèces de tortues marines se trouvant en Tunisie

I.2. Etude de *Caretta caretta* en Tunisie

I.2.1. Systématique

La tortue marine *Caretta caretta* appartient à :

- Embranchement : Vertébrés
- Classe : Reptiles
 - Sous-classe : Anapsidae
 - Ordre : Testudinae
 - Sous-ordre : Cryptodira
 - Famille : Cheloniidae
 - Genre : *Caretta*
 - Espèce : *caretta*

I.2.2. Répartition géographique

Dans le monde, *Caretta caretta* est l'espèce qui atteint la distribution la plus large. Il y aurait des centaines de milliers d'individus. C'est une espèce tropicale et subtropicale qui est incluse dans le domaine méditerranéen.

En Tunisie, les îles Kuriat représentent le site le plus important de nidification de la caouanne (Bradai, 1996 ; Jribi et *al.*, 2001 ; Jribi et *al.*, 2002). En outre, le golf de Gabès constitue une zone importante d'hivernage et d'alimentation de la caouanne dans le domaine méditerranéen (Laurent et *al.*, 1994).

I.2.3. Reproduction

I.2.3.1. L'accouplement et la fécondation :

Les tortues marines sont des animaux solitaires et errants. Il semble que le but de leur migration trans-océanique est de revenir se regrouper près de leur lieu de naissance en vue de la reproduction. Au cours de ce regroupement, une femelle peut s'accoupler successivement avec plusieurs mâles, et un mâle dominant peut s'accoupler avec plusieurs femelles. Les spermatozoïdes sont stockés au niveau des oviductes qui peuvent atteindre 4 à 6 mètres de longueur.

Une à deux semaines après l'accouplement et pendant la période de chaleur de la femelle, un premier lot de follicules atteint la phase finale de maturation et l'ovulation survient. En effet, les ovaires contiennent plusieurs groupes de follicules successifs selon leurs stades de maturation. Les spermatozoïdes stockés sont alors mobilisés et fécondent les

ovules. A ce stade, toute tentative par les mâles de s'accoupler est catégoriquement rejetée par la femelle. Le reste des spermatozoïdes est stocké de nouveau pour une ovulation ultérieure. Les œufs fécondés se forment et migrent vers la partie inférieure des oviductes pour être pondus dans deux semaines. Un à deux jours après la première ponte, survient l'ovulation du deuxième lot des follicules matures et leur fécondation par le reste des spermatozoïdes. Les ovules fécondés correspondront aux œufs du deuxième nid. Tous ces mécanismes sont sous un contrôle endocrinien qui fait intervenir les hormones hypophysaires et utérines. Le cycle se répète jusqu'à ce que les ovaires ne contiennent plus de follicules matures (Owens, 1980).

I.2.3.2. La ponte :

La caouanne passe la plus grande partie de sa vie dans la mer bien qu'elle la commence sur la plage après son éclosion. Dès que la femelle est mature, elle retourne sur sa plage natale pour assurer son activité de ponte qui dure environ une heure et demie. La femelle revient à terre deux à cinq fois pendant la saison de ponte avec un intervalle de deux semaines entre deux pontes. Elle pond souvent presque au même endroit. Les femelles ne reviennent pas pondre chaque année. Selon les zones, elles nidifient tous les deux ou trois ans. En Méditerranée, la caouanne commence à nidifier dès la fin du mois de Mai jusqu'à fin Août. Quelques individus continuent à nidifier jusqu'au début Septembre (Demetropoulos et *al.*, 1995). En Tunisie, le suivi de la nidification de la caouanne sur les îles Kurait a permis de situer la période de ponte principalement aux mois de Juin et de Juillet de chaque année (Bradai et *al.*, 1997 ; Bradai et *al.*, 1999). Des pontes à la fin du mois de Mai sont très probables.

Durant quatre ans de suivi de la nidification de *Caretta caretta* aux îles Kurait de 1993 à 1996, Bradai (1996, 2000) constate que le nombre de nids est relativement important tous les deux ans. Le nombre des œufs est généralement plus important au début qu'à la fin de la saison (Demetropoulos et *al.*, 1995) .

Selon certains auteurs, les femelles nidifiantes en Méditerranée sont significativement plus petites de taille que les autres régions du monde (Margaritoulis, 1987,1988 ; Broderick et *al.*, 1996).

Actuellement, le mystère de savoir comment les tortues femelles retrouvent leur plage natale reste inexplicé. Il y a cependant une hypothèse selon laquelle il y aurait dans le cerveau des tortues une petite pièce de magnétite qu'elles utilisent comme un instrument de navigation et qu'elles se souviendraient de la forme physique de la plage où elles sont nées (Lohmann, 2001).

I.2.3.3. L'incubation des œufs :

Le nombre d'œufs déposés varie d'une région à l'autre. Il varie aussi selon l'âge et la taille des femelles nidifiantes (Dodd, 1988). En Tunisie, le nombre d'œufs par nid varie de 59 à 150 (Bradai et *al.*, 1997, 1998, 1999).

L'incubation des œufs dure de sept à huit semaines. En Tunisie, elle varie de 59 à 80 jours (Bradai et *al.*, 1997). Elle est variable en fonction des facteurs écologiques telles que la température, l'humidité et la granulométrie du sol. En effet, la température joue un rôle très important dans le déterminisme sexuel des nouveau-nés durant l'incubation. En effet, des embryons incubés à une température de 25°C donnent des mâles, ceux qui sont incubés à 30°C donnent des femelles (Jribi, 2003). Le mécanisme mis en jeu fait intervenir une enzyme appelée aromatase qui joue un rôle dans la différenciation sexuelle des vertébrés en transformant les hormones mâles en hormones femelles (Pieau, 1998). En effet, l'activité de cette enzyme est plus importante à 30°C qu'à 25°C.

I.2.3.4. L'éclosion et l'émergence :

L'éclosion des œufs a lieu 60 à 70 jours après la ponte. L'émergence des nouveau-nés survient 4 jours après l'éclosion, habituellement la nuit ou pendant les jours pluvieux car ils ne peuvent pas supporter une forte insolation (Jribi, 2003). L'émergence des nouveau-nés débute la deuxième semaine du mois d'Août et s'étend jusqu'au début Octobre (Bradai et *al.*, 1997). A l'émergence, les nouveau-nés sortent tout de suite du nid et rejoignent directement la mer, guidés par la ligne brillante de l'horizon marin.

I.2.4. Alimentation

Au stade juvénile, ces reptiles se nourrissent d'organismes planctoniques pélagiques. Une fois ayant atteint le stade adulte, ils commencent une alimentation benthique composée de crustacés, de cnidaires, de mollusques gastéropodes et d'holothuries (Laurent et *al.*, 1994).

I.2.5. Age et croissance

La croissance et l'âge de maturité de *Caretta caretta* ne sont pas exactement connus car il n'y a pas de caractères spéciaux sur leurs corps permettant d'estimer leur âge comme par exemple pour les tortues terrestres dont l'âge est estimé à partir de la lecture des anneaux de croissance sur les écailles (Mortimer, 1982). Une autre difficulté réside dans le

fait que les tortues marines ne sont pas toujours accessibles pour les chercheurs. Cependant, il y a des études selon lesquelles *Caretta caretta* atteint la maturité à l'âge de huit à quinze ans.

En ce qui concerne sa longévité, certains auteurs estiment qu'elle peut vivre jusqu'à l'âge de soixante quinze ans et peut même atteindre quatre vingt ans.

Des études de la croissance de *Caretta caretta* en captivité montrent qu'à l'âge de quatre ans, elle atteint un poids de 22,5 Kg, une longueur de carapace de 53,9 cm et une largeur de 47 cm (Maatouk et *al.*, 2002).

I.2.6. Dangers menaçant les tortues marines

Actuellement, bien que leur pêche industrielle n'est plus pratiquée, les populations de tortues marines sont exposées à plusieurs dangers menaçant les différentes étapes de leur cycle de vie. Parmi ces dangers, on cite à titre d'exemple :

- La pêche accidentelle par le chalut, les filets et les hameçons (Bradai et *al.* 1997).
- Les accidents avec les bateaux dans les zones de navigation.
- La pollution des eaux par les déchets solides, en particulier par les déchets plastiques.
- La raréfaction des sites de ponte des tortues à cause du développement de l'urbanisme et du tourisme.
- La prédation des œufs et des nouveau-nés des tortues par des carnivores terrestres et marins (Bradai, 1993 ; Laurent, 1990 ; Margaritoulis, 1987).

Pour toutes ces raisons, depuis cent ans, le nombre de populations de la caouanne est en déclin continu. Elle est déclarée menacée en Juin 1978 (Mathews et *al.*, 1990).

II. LES TORTUES D'EAU DOUCE : *Mauremys leprosa* (Schweigger, 1812) et *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758)

II.1. Généralités sur les tortues d'eau douce

D'après Nouria (1996), deux espèces de tortues dulçaquicoles sont rencontrées en Tunisie : *Mauremys leprosa* et *Emys orbicularis*. Les deux espèces se différencient par la forme postérieure des plaques anales : pointue chez *M. leprosa* et arrondie chez *E. orbicularis* (Bons et al., 1962). De plus, *Mauremys leprosa* se distingue de *Emys orbicularis* par la présence d'écailles axillaires et inguinales et surtout par l'ornementation linéaire du cou. En effet, son cou est typiquement marqué d'étroites bandes claires longitudinales, sur un fond sombre. Les membres et la queue sont ornés de façon similaires au cou, mais les lignes claires sont plus irrégulières et plus larges (Gray, 1870).

II.2. Systématique

II.2.1. *Mauremys leprosa*

Mauremys leprosa, appelée aussi la tortue méditerranéenne, appartient à :

- **Classe** : Reptiles
- **Ordre** : Testudinae
- **Sous ordre** : Cryptodira
- **Famille** : Bataguridae
- **Sous famille** : Bataguridinae
- **Genre** : *Mauremys*
- **Espèce** : *leprosa*

Les sous espèces de *Mauremys leprosa* :

- *Mauremys leprosa vanmerhaeghei* (Bour & Jérôme 1999)
- *Mauremys leprosa leprosa* (Schweigger, 1812)
- *Mauremys leprosa atlantica* (Schleich 1996)
- *Mauremys leprosa erhardi* (Schleich 1996)
- *Mauremys leprosa marokkensis* (Schleich 1996)
- *Mauremys leprosa saharica* (Schleich 1996)
- *Mauremys leprosa vanderhaeghei* (Schleich 1996)
- *Mauremys leprosa wernerkaestlei* (Schleich 1996)
- *Mauremys leprosa zizi* (Schleich 1996)

II.2.2. *Emys orbicularis*

Emys orbicularis, appelée aussi la cistude d'Europe, appartient à :

- **Classe** : Reptiles
- **Ordre** : Testudinae
- **Sous ordre** : Cryptodira
- **Famille** : Emydidae
- **Sous famille** : Emydinae
- **Genre** : *Emys*
- **Espèce** : *Orbicularis*

Les sous espèces d'*Emys orbicularis* :

Actuellement, il y a treize sous-espèces qui sont mondialement reconnues (Fritz et *al.*, 1998).

- *Emys orbicularis orbicularis* (Linnaeus 1758)
- *Emys orbicularis capolongoi* (Fritz 1995)
- *Emys orbicularis colchica* (Fritz 1994)
- *Emys orbicularis eiselti* (Fritz et al 1998)
- *Emys orbicularis fritzjuergenobsti* (Fritz 1993)
- *Emys orbicularis galloitalica* (Fritz 1995)
- *Emys orbicularis hellenica* (Valenciennes 1832)
- *Emys orbicularis hispanica* (Fritz, Keller et Budde 1996)
- *Emys orbicularis iberica* (Eichwald 1831)
- *Emys orbicularis Lanzai* (Fritz 1995)
- *Emys orbicularis luteofusca* (Fritz 1989)
- *Emys orbicularis occidentalis* (Fritz 1993)
- *Emys orbicularis persica* (Eichwald 1831)

Probablement, il y aurait d'autres sous-espèces qui seront décrites plus tard en utilisant des techniques moléculaires modernes (Lenk et *al.*, 1998). Selon Fritz (1993), la sous-espèce *Emys orbicularis occidentalis* ségrége au Nord de l'Afrique dans les pays du Magreb.



Photo 4 : la tortue méditerranéenne
(*Mauremys leprosa*)

Photo 5 : La cistude d'Europe
(*Emys orbicularis*)



Les espèces de tortues d'eau douce se trouvant en Tunisie

II.3. Distribution géographique

La cistude d'Europe occupe l'une des distributions géographiques les plus larges parmi les autres tortues du monde. On la trouve en Afrique du Nord, en Europe de l'Est, en Asie centrale et du Sud et en Amérique centrale. Toutes les péninsules du Sud de l'Europe, ainsi que la plupart des îles de l'Est de la Méditerranée sont habitées par *Emys orbicularis* (Fritz 1993, 1995)

Mauremys leprosa a une distribution plus restreinte que *Emys orbicularis*. En effet, on la trouve au Sud-Est de la France, en Afrique du Nord et au Niger.

Bien qu'*Emys orbicularis* puisse s'adapter aux variations du niveau d'eau et à l'assèchement du milieu (Naulleau, 1991), elle est plus exigeante vis-à-vis des facteurs écologiques que *M. leprosa*. Cette dernière colonise plusieurs milieux : eau douce ou saumâtre, pérenne ou temporaire (Bour, 1989). Ceci explique en partie la différence d'extension de leur distribution géographique en Tunisie. *E. orbicularis* est une espèce rare bien que sa répartition aille des régions côtières du Cap-Bon jusqu'à l'altitude de 800 m en Kroumirie (Blanc, 1978). La répartition de *Mauremys leprosa* s'étend de l'extrême Nord jusqu'à l'oued Tlalet, près de Tataouine (Nouira, 1996).

II.4. Cycle biologique

L'activité de ces deux espèces de tortues s'étend du mois d'Avril jusqu'au mois d'Octobre. Elles hibernent le reste de l'année dans la vase du fond des cours d'eau ou dans des trous qu'elles creusent dans les berges des rivières où la température est supérieure à 15°C (Servan, 1998 ; Naulleau, 1991 ; Bozhansky, 1998). Cependant, *M. leprosa* peut rester active pendant tout l'hiver.

La saison d'accouplement commence au début du printemps et s'étend jusqu'aux mois de Mai et de Juin, avec des variations selon les régions. Les tortues commencent à s'accoupler dans l'eau en profondeur et parfois sur la terre pour *M. leprosa* (Servan, 1998). La ponte survient un mois après. La femelle dépose ses œufs dans un trou qu'elle creuse dans un endroit bien exposé au soleil et à l'abri des inondations (Rollinat, 1934; Servan, 1998).

Les femelles sont fidèles à leurs sites de ponte et peuvent effectuer des déplacements de plusieurs dizaines de mètres jusqu'à quelques kilomètres pour les rejoindre (Jablonsky, 1998). Comme pour les tortues marines, les tortues dulçaquicoles possèdent elles aussi une petite pièce de magnétite qui leur permet de trouver la bonne direction de leur site de ponte (Jablonsky, 1998)

Selon sa taille, la femelle peut pondre deux ou trois fois par an avec quelques semaines d'intervalle entre deux pontes (Bozhansky, 1998).

Le nombre d'œufs déposés par nid, qui dépend aussi de la taille de la femelle, est variable. Il varie de 4 à 16 chez *E. orbicularis* (Arvy et al., 1998) et de 5 à 12 chez *M. leprosa*. La période d'incubation peut durer de 55 jours à 120 jours chez *E. orbicularis* (Arvy et al., 1998) et de 65 à 75 jours chez *M. leprosa*.

L'éclosion des œufs et l'émergence des nouveau-nés ont lieu au cours des mois d'Août et de Septembre (Rollinat, 1934). Si l'été n'est pas relativement chaud, l'éclosion chez *E. orbicularis* aura lieu au cours du printemps suivant.

II.5. Déterminisme sexuel

Chez toutes les tortues, qu'elles soient marines, dulçaquicoles ou terrestres, l'analyse de leurs caryotypes ne montre pas de chromosomes sexuels visibles (Kamezaky, 1989). En effet, le déterminisme sexuel chez les tortues dépend de la température (TSD). Selon Pieau (1998), à 25°C les nouveau-nés sont 100% des mâles, et à 30°C les nouveau-nés sont 100% des femelles. A 28,5°C, on obtient autant de mâles que de femelles chez *Emys orbicularis*. En effet, c'est durant la période thermosensible que le sexe de l'individu est déterminé sous l'effet d'un mécanisme qui fait intervenir l'aromatase. A 30°C, l'aromatase est massivement sécrétée, les androgènes sont transformés en oestrogènes et on obtient des femelles. A 25°C, l'aromatase est très peu sécrétée. Le taux élevé d'androgènes joue alors en faveur des mâles.

II.6. Régime alimentaire

Mauremys leprosa est un animal très vorace. C'est un omnivore à tendance nettement carnivore. Elle capture quasiment tout ce qui se trouve à sa portée : insectes, vers, mollusques, batraciens, reptiles aquatiques et poissons affaiblis.

Emys orbicularis est un animal prédateur qui se nourrit particulièrement en crépuscule (Cagle, 1950). Elle chasse ses proies dans une eau peu profonde allant de 20 à 80 cm de profondeur (Servan, 1986) où la végétation est abondante. Elle se nourrit de crustacés, d'insectes, de mollusques, d'amphibiens, de poissons et parfois d'algues (Arvy et al., 1998; Kireev, 1983).

II.7. Age et croissance

La détermination de l'âge chez les tortues d'eau douce en phase de croissance est possible grâce à la lecture des anneaux de croissance au niveau des plaques de la carapace ou du plastron (Cheylan et *al.*, 1998 ; Jablonsky et *al.*, 1998).

Ces tortues peuvent vivre jusqu'à 120 ans (Jablonsky et *al.*, 1998) et atteindre 182 mm de longueur de carapace chez la femelle et 168 mm chez le mâle (Arvy et *al.*, 1998).

II.8. Prédation

Les œufs cachés dans le nid ne sont pas épargnés de l'action des prédateurs surtout pendant les 3 premiers jours après la ponte (Minckley, 1966). Ces prédateurs sont des renards, des chiens et des corbeaux. Chez les nouveau-nés, on enregistre une mortalité élevée puisqu'un grand nombre de sujets sont infectés par des helminthes (Bozhansky, 1998). Les nouveau-nés, qui survivent et émergent à la surface, sont de nouveau affrontés à des prédateurs pas moins dangereux que les précédents (Bozhansky, 1998 ; Jablonsky et *al.*, 1998).

II.9. Dangers menaçant les tortues d'eau douce

Plusieurs dangers menacent la survie des tortues dulçaquicoles partout dans le monde. Des mesures de protection sont entreprises pour permettre la conservation de ces espèces. Parmi ces dangers, on note surtout :

- L'utilisation massive des pesticides.
- La transformation des cours d'eau et des marais pour des fins agricoles (Servan, 1986).
- L'assèchement des zones humides.
- L'aménagement et la pollution des cours d'eau et de leurs rives.
- La capture massive des tortues (Frisenda et *al.*, 1990).
- L'introduction de nouvelles espèces de tortues telle que *Trachemys scripta* qui entre en compétition avec *Emys orbicularis* (Ernest, 1990 ; Arvy et *al.*, 1998).

**MATERIELS
ET
METHODES**

MATERIELS

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

I.1. La tortue marine *Caretta caretta*

Dans le cadre de la mise en œuvre du plan d'action national pour la protection des tortues marines en Tunisie, un projet de suivi de la nidification de la tortue marine aux îles Kuriat a été lancé depuis 1997, en collaboration entre l'Agence de Protection et d'Aménagement du Littoral (APAL), le Secrétariat d'Etat à la Recherche Scientifique et à la Technologie, représenté par l'Institut National des Sciences et Technologie de la Mer (INSTM) et le Centre des Activités Régionales pour les Aires Spécialement Protégées (CAR/ASP).

Grâce à ce programme, quelques nouveau-nés de tortue marine *Caretta caretta*, juste après l'éclosion, ont pu être ramenés de leur site de nidification les îles Kuriat (figure 1, tableau 1) et maintenus en captivité dans les bacs d'élevage du Centre INSTM de Monastir.

Sur les quatre échantillons collectés, deux appartiennent à la saison de ponte 2002 et les deux autres à la saison 2003.

Ensuite, un prélèvement du sang et des organes internes (cœur, poumons, foie, reins et gonades) a été effectué sur chaque individu. Tout le matériel ainsi obtenu est stocké à une température de - 80°C.

I.2. La tortue d'eau douce *Mauremys leprosa*

Au cours de notre échantillonnage, nous avons collecté plus de *Mauremys leprosa* que d'*Emys orbicularis*. L'étude génétique a été donc réalisée uniquement sur les populations de *M. leprosa* dont l'effectif est plus représentatif. Les populations étudiées proviennent de 6 oueds différents répartis sur le Nord, le Centre et le Sud de la Tunisie (figure 2, tableau 1).



Photo 6 : Site de Oued Zerkine
(Mareth)



Photo 7 : Site de Oued Lakarit
(Gabès)

Photos de deux sites d'échantillonnage de la tortue
Mauremys leprosa

ESPECES	LOCALITES	EFFECTIFS
TORTUES MARINES <i>Caretta caretta</i> (ILES KURIAT)	Nid 1 (2002)	14
	Nid 2 (2002)	25
	Nid 1 (2003)	12
	Nid 2 (2003)	12
TORTUES D'EAU DOUCE <i>Mauremys leprosa</i>	Oued Abid (Haouaria)	15
	Oued Bouficha (Bouficha)	15
	Oued Siliana (Siliana)	09
	Oued Jlef (Oueslatia)	06
	Oued Lakarit (Gabès)	06
	Oued Zerkine (Mareth)	14

Tableau 1 : Effectifs et localités des tortues étudiées



Figure 1 : Localisation du site d'échantionnage des tortues marines *Caretta caretta* : La grande île Kuriat

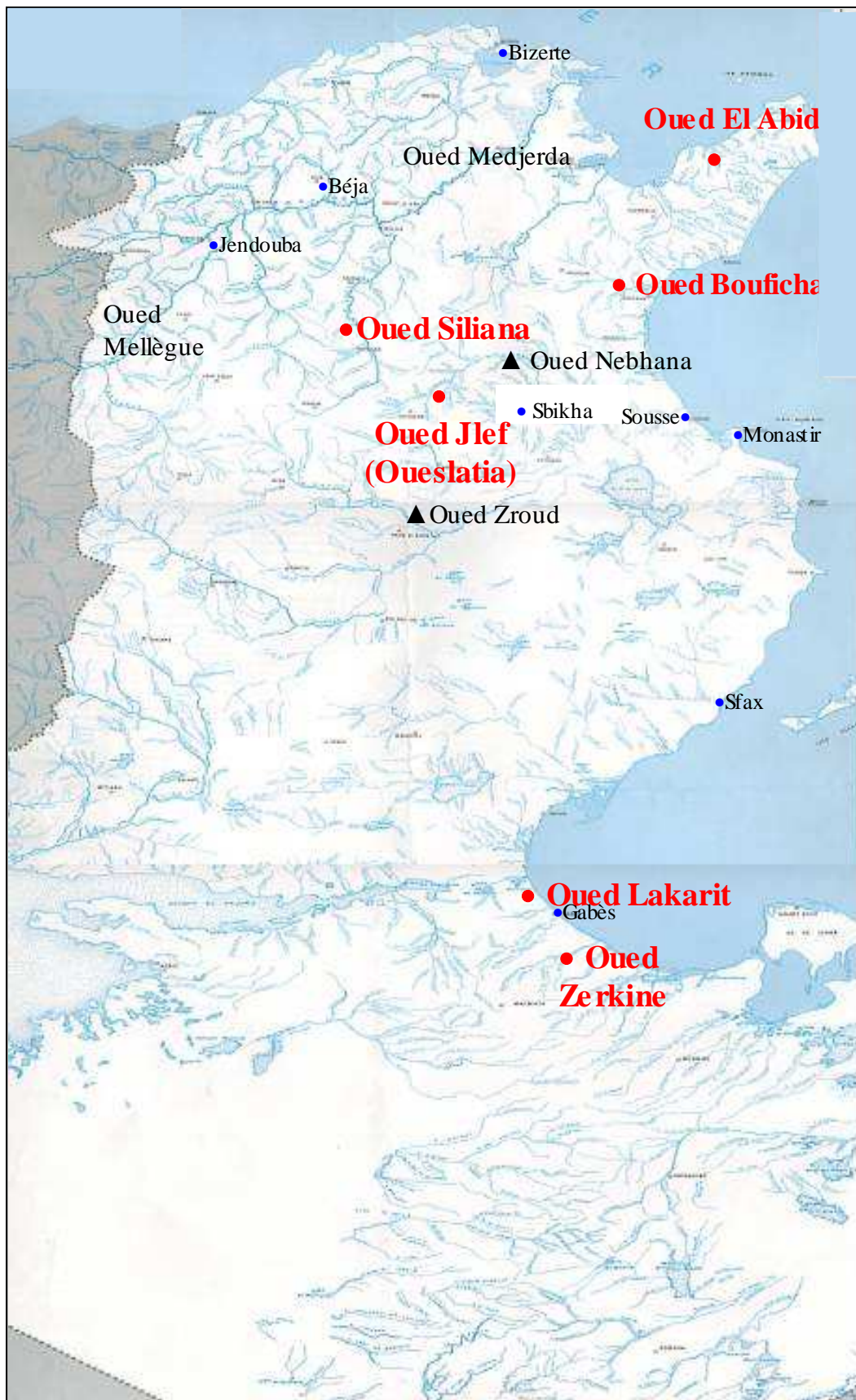


Figure 2 : Localisation des sites d'échantonnage des tortues d'eau douce *Mauremys leprosa* et *Emys orbicularis*

II. MATERIEL D'ELECTROPHORESE

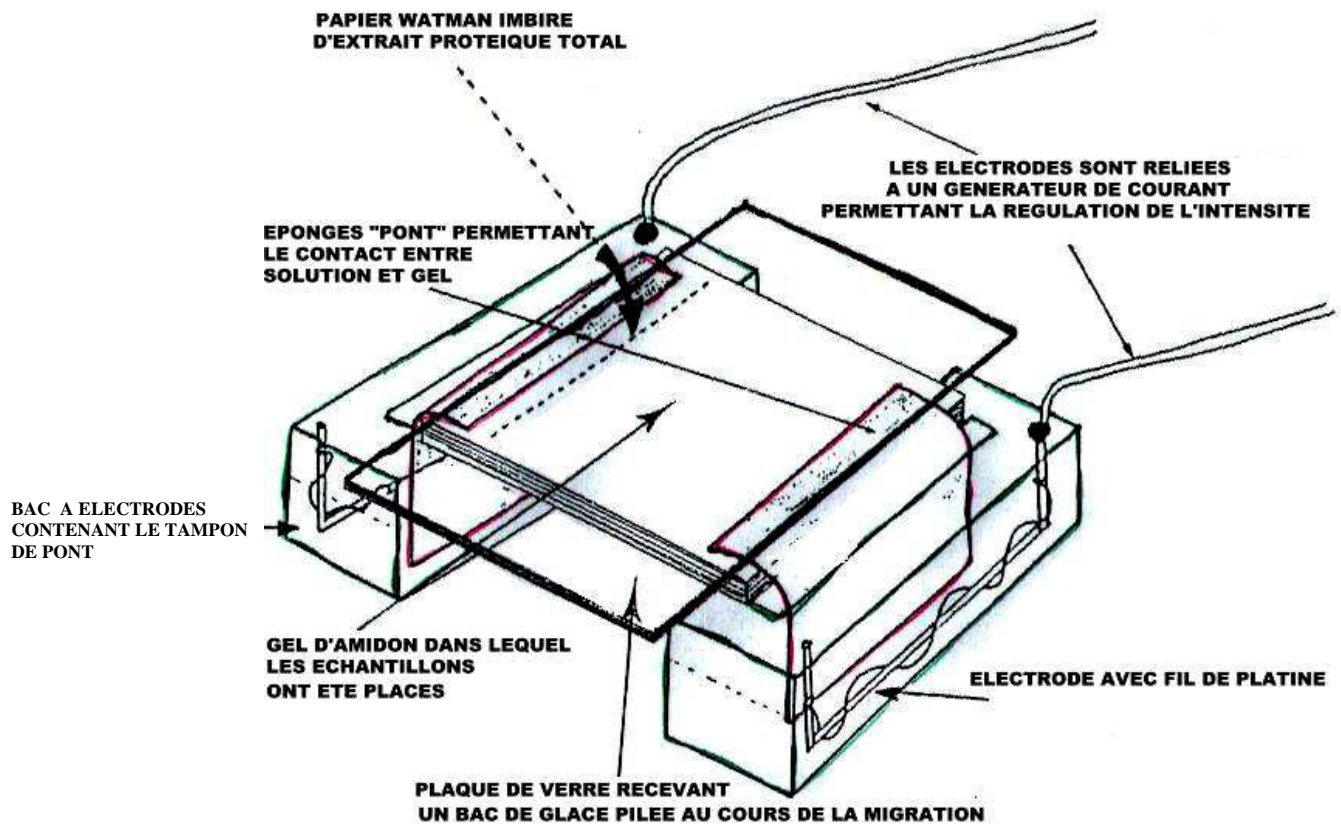


Figure 3 : Cuve à électrophorèse

METHODES

I. PREPARATION DES ECHANTILLONS

I.1. Préparation du sang:

Le sang est prélevé par une seringue héparinée au niveau du sinus cervical dorsal (Owen et *al.*, 1980). Après avoir ajouté un volume de sérum physiologique (0,85%) égal à celui du sang prélevé, une première centrifugation de 10 minutes à 3000 tr/mn permet de séparer le plasma (surnageant). On ajoute au culot une quantité d'eau désionisée égale à son volume. Une deuxième centrifugation de 30 minutes à 10000 tr/mn permet d'obtenir l'hémolysat.

Sérum physiologique :

- | | |
|-----------------|---------|
| - NaCl | 8,5 g |
| - Eau distillée | 1000 ml |

I.2. Préparation des organes:

Une fois l'animal disséqué, on prélève les organes suivants: foie, cœur, reins et poumons. Ces organes sont par la suite broyés dans une solution de broyage (pH 6,8), tel que le volume de la solution soit égal à celui de l'organe. Une centrifugation de l'homogénat est effectuée pendant 35 minutes à 14500 tr/mn à 4°C. Le surnageant est prélevé et placé dans des tubes Eppendorfs et stockés à -80°C.

Pour le foie, une deuxième centrifugation est réalisée en présence de toluène qui a la propriété de dissoudre les graisses quand elles sont importantes. Toutes ces opérations sont effectuées dans de la glace pilée afin d'éviter toute dénaturation des protéines.

Composition de la solution de broyage :

- | | |
|--------------------------------------|---------|
| - Tris | 1,2 g |
| - EDTA (disodique-2H ₂ O) | 0,37 g |
| - H ₂ O désionisée | 1000 ml |

Le pH est ajusté à 6,8 avec HCl concentré puis 4 ml de NADP 1% sont ajoutés.

II. ETUDE ALLOZYMIQUE

II.1. Principe de l'électrophorèse

L'électrophorèse des protéines repose sur les propriétés qu'ont les protéines solubles, contenues dans des extraits brutes et n'ayant subi aucune purification préalable, de s'ioniser et de migrer vers l'anode ou la cathode quand elles sont placées dans un champ électrique. La visualisation de l'emplacement des protéines sur le support électrophorétique est possible en les colorant in situ en faisant réagir différents produits et en impliquant les activités catalytiques de ces protéines. Des bandes colorées (isozymes) alors apparaissent ; chacune de ces bandes correspond à une protéine distincte dont la synthèse est codée par un, deux ou plusieurs gènes. Les phénotypes enzymatiques sur les zymogrammes peuvent ainsi être traduits en terme de génotypes, de gènes et d'allèles.

L'électrophorèse est une méthode d'analyse et de fractionnement des protéines basée sur leur migration différentielle. Elle s'effectue à une vitesse qui varie essentiellement selon la charge ionique des protéines et accessoirement selon leur taille et leur forme.

II.2. Les facteurs affectant la mobilité électrophorétique :

La vitesse de migration électrophorétique dépend de plusieurs facteurs susceptibles de modifier la charge de la protéine, sa taille et sa forme et qui, par conséquent, influencent sa mobilité électrophorétique. Ces facteurs sont relatifs essentiellement à la structure des protéines et aux conditions expérimentales.

II.2.1. La structure des protéines :

II.2.1.1. Influence de la structure primaire de la protéine :

La migration électrophorétique dépend de la charge nette des protéines. Cette dernière peut être modifiée par une mutation affectant l'ADN entraînant ainsi le remplacement d'un acide aminé par un autre de charge différente ou de même charge. Etant donné la redondance du code génétique, le remplacement d'une base par une autre ne signifie pas un remplacement de l'acide aminé. De plus, ce remplacement est susceptible de modifier l'arrangement spatial du polypeptide concerné du fait de l'encombrement différent de leurs radicaux et, par conséquent, l'électrophorèse ne peut détecter qu'environ un tiers des remplacements d'acides

aminés. C'est le plus important facteur de sous-estimation par cette technique du polymorphisme réellement existant.

II.2.1.2. Influence des événements post-traductionnels :

La conformation des protéines est sous la double dépendance du code génétique (mutation modifiant la structure primaire) et d'événements post-traductionnels tels que :

- L'association des sous-unités.
- La perte de fragments de polypeptides par processus enzymatiques.
- L'agrégation des molécules donnant lieu à des «séries polymériques» c'est à dire des molécules formées de deux, trois,...., n molécules protéiques.
- L'association avec les polypeptides de molécules de nature diverse (nucléotides, glucides, autres protéines, coenzymes, etc.).

Ces événements agissent sur la charge nette de la protéine et par conséquent sur la migration électrophorétique.

II.2.2. Conditions expérimentales :

II.2.2.1. Influence des conditions électrochimiques:

La charge nette des protéines dépend du degré d'ionisation des différentes chaînes latérales des acides aminés qui la composent. Elle est donc influencée par le pH ainsi que par la nature et la concentration en ions de la solution dans laquelle se trouve la protéine à étudier.

II.2.2.2. Influence de pH :

Les tampons d'électrophorèse utilisés présentent soit un excès d'anions soit un excès de cations. Ainsi le polypeptide aura des charges nettes différentes selon le pH de la solution solvante, donc il migrera vers la cathode ou vers l'anode ou restera à l'endroit où il a été déposé (point isoélectrique).

II.2.2.3. Influence de la composition et de la concentration en sels de la solution:

La présence des sels neutres en solution, à basse concentration, influent sur le degré d'ionisation des chaînes latérales des polypeptides. En effet, les sels neutres induisent l'augmentation de la solubilité de la plupart des protéines (phénomène de «salting-in») en modifiant les capacités d'ionisation des groupements dissociables de la molécule protéique.

Au contraire, à forte concentration, les sels neutres diminuent la solubilité des protéines qui peuvent même précipiter (phénomène de «salting-out»).

II.2.2.4. Influence de la nature du support d'électrophorèse:

La plupart des électrophorèses sont réalisées sur des supports inertes. Actuellement, quatre principaux types de substances sont utilisés sous forme de gels.

a- L'acétate de cellulose:

Lors de l'électrophorèse sur ce support, la migration des protéines s'effectue essentiellement dans la pellicule de tampon à la surface du gel ; le support n'a donc pas d'influence sur la migration électrophorétique.

b- L'agarose, l'amidon et la polyacrylamide:

Pour les deux premiers supports, les protéines migrent à l'intérieur d'un réseau de pores dont la taille est relativement constante et suffisamment grande pour que la plupart des protéines solubles puissent les traverser sans être freinées (frottement). Pour le troisième support, la taille des pores du gel dépend de la concentration de l'acrylamide. En effet, plus cette concentration est élevée, plus les pores sont petits et plus les protéines de grande taille auront du mal à les traverser.

II.3. Réalisation des électrophorèses :

II.3.1. Préparation des gels :

L'amidon utilisé est hydrolysé selon la technique décrite par Moretti *et al.* (1975).

Les gels sont préparés à une concentration de 13 % c'est-à-dire 52 g d'amidon hydrolysé pour 400 ml d'une solution de tampon de gel. La nature de la solution tampon varie selon les protéines analysées. En général, le terme de système de tampon d'électrophorèse désigne un couple de solutions tampons dont l'une sert à fabriquer le gel (tampon de gel) et l'autre à établir la jonction entre les électrodes et le gel lors de la migration électrophorétique (d'où son nom de tampon d'électrodes).

Le tampon avec lequel sera réalisé le gel dépendra donc du système de tampons d'électrophorèse qu'on aura choisi auparavant. Ce choix est essentiellement basé sur l'expérience. Pour chaque organisme ou chaque tissu d'un organisme, il correspond un système d'électrophorèse permettant à la fois

une meilleure séparation électrophorétique de l'enzyme considéré et une meilleure révélation (taches nettes, bien séparées et bien colorées).

La cuisson du gel est effectuée sur un bec bunsen dans un flacon d'Erlen Meyer. Quand le mélange change de consistance (épaississement), la cuisson est poursuivie pendant 1 minute et 30 secondes en agitant plus fortement le flacon au-dessus de la flamme. Le gel est dégazé et aussitôt coulé dans un moule en Plexiglas de dimensions: (21 x 1 x 19) cm. Après refroidissement, il est couvert d'un film plastique qui permet d'éviter le dessèchement de la surface du gel susceptible de provoquer une distorsion pendant la migration.

II.3.2. Réalisation de l'électrophorèse:

Une fente, à 3 cm du bord du moule, est pratiquée dans le gel. Des rectangles de papier Whatman N°3 (9 x 4 mm), préalablement préparés, sont imbibés dans l'extrait à analyser et sont insérés dans la fente du gel. On dépose quelques gouttes de Bleu de Bromophénol au niveau des échantillons. Ce produit a la propriété de migrer à la vitesse des protéines les plus rapides et permet par conséquent de visualiser le front de migration. Une seule plaque de gel permet l'analyse de 20 à 25 individus pour quatre systèmes protéiques.

Les gels sont placés sur les bacs à électrodes, avec les échantillons du côté de la cathode. Le contact entre le gel et le tampon électrode est réalisé par des éponges. Ensuite, on place le dispositif de l'électrophorèse dans le frigidaire afin de maintenir la température entre 0 et 5°C. Pour toutes les électrophorèses, nous avons utilisé un voltage tel que le produit : voltage x intensité (V x I) ne dépasse pas 10 Watts. L'électrophorèse est arrêtée quand le bleu de Bromophénol atteint l'anode.

II.3.3. Révélation enzymatique :

L'immense majorité des protéines solubles sont incolores. La visualisation de leur emplacement sur le gel, après électrophorèse, s'effectue par des procédés histochimiques qui permettent soit de colorer les produits de dénaturation de la protéine ou un corps chimique qui lui est associé, soit d'obtenir un précipité coloré à l'emplacement de cette protéine en utilisant ses propriétés catalytiques.

II.3.3.1. Révélation des protéines sans fonction enzymatique :

a- Protéines générales

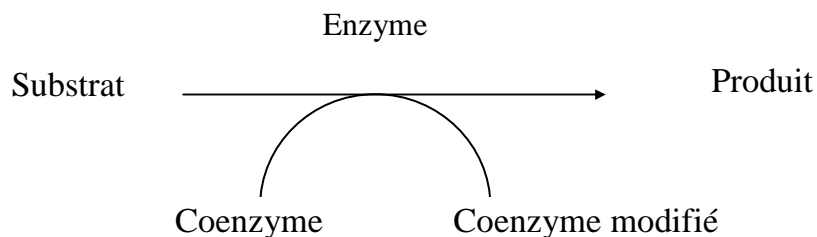
Les protéines contiennent de nombreux groupements azotés que l'on peut colorer par le Bleu d'Aniline (Amido Schwarz) ou le Bleu de Comassie, après les avoir rendues libres, c'est-à-dire après avoir dénaturé la protéine en présence d'une solution acide. Cette technique de révélation n'est pas spécifique, et dans la pratique, elle ne permet de révéler que des protéines existant en grande quantité dans les extraits étudiés (albumines et transferrines du plasma, par exemple).

b- Coloration d'un corps chimique associé à la protéine

Certaines protéines sont associées à des lipides (lipoprotéines), des glucides (glycoprotéines) ou d'autres corps chimiques que l'on peut colorer par des réactions appropriées: la réaction de Schiff pour les glycoprotéines ou la réaction au noir Soudan pour les lipoprotéines.

II.3.3.2. Révélation des protéines en utilisant leur fonction enzymatique :

En présence des divers composés nécessaires à son activité (coenzyme, ions), une enzyme transforme son substrat selon la réaction générale:



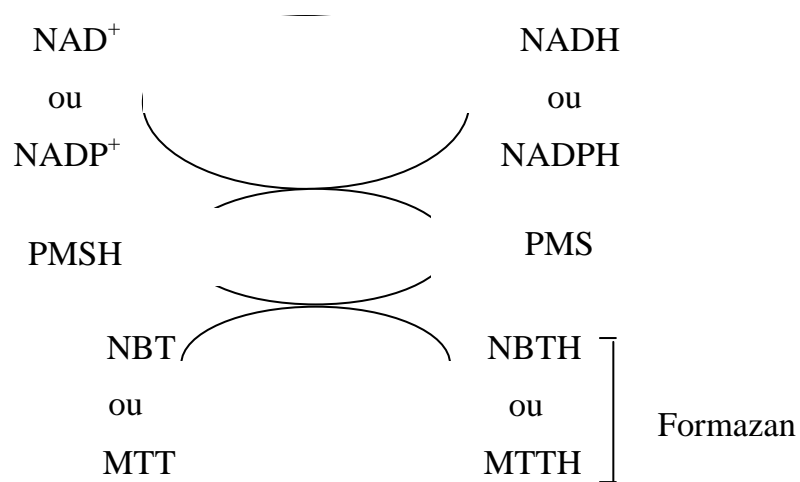
Sur les gels, cette réaction se produit à l'emplacement même où a migré l'enzyme. Par conséquent, il devient possible de visualiser la distance de migration de l'enzyme car il suffit que l'un des composés issu de la réaction soit coloré, ou colorable par une réaction chimique ou biochimique.

a- Oxydoréductase / Déshydrogénase :

Les déshydrogénases transfèrent un atome d'hydrogène de leur substrat à leur coenzyme NAD^+ ou NADP^+ .



En présence de PMS (Phénazine méthosulfate), cet atome d'hydrogène peut être transféré sur un sel de tétrazolium (NBT: nitrobleu tétrazolium ou MTT: Thiazoyl Bleu) qui donne alors un précipité bleu: le formazan.

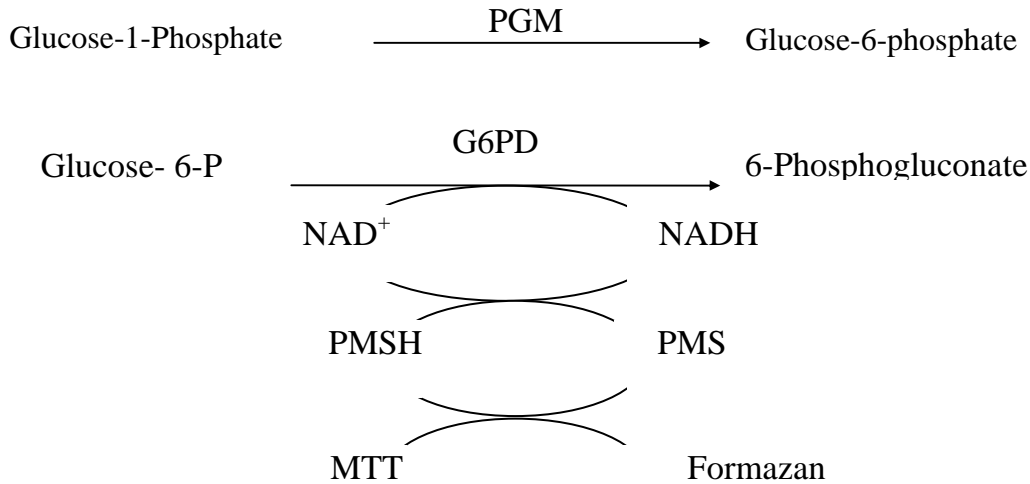


b- Isomérase, hydrolase et ligase:

Quand l'enzyme étudiée donne un produit qui peut être déshydrogéné par une autre enzyme utilisant des coenzymes, le système tétrazolium (NBT, MTT et PMS) peut être utilisé.

Exemple:

PGM (Phosphoglucomutase) et PGI (Phosphoglucoisomérase)



c- Les hydrolases:

La visualisation peut être:

Directe: L'enzyme en présence de son substrat peut donner un produit coloré. Certaines hydrolases dégradent des substances synthétiques tels que les esters de 4-méthyl-umbelliferyl (4-Mu) et libèrent du 4-méthyl-umbelliferyl qui est fluorescent sous la lumière ultraviolette. Exemple: certaines Estérases.

Indirecte: Le produit de la réaction enzymatique est colorable par une réaction chimique ou biochimique. La libération de l' α ou du β -naphtol par l'action de certaines hydrolases sur les dérivés de l' α ou du β -naphtyl-phosphate donne un précipité coloré résultant de la combinaison avec un «azodye» (fast Garnet GBC, Fast blue RR, etc.).



II.4. Systèmes enzymatiques étudiés, composition des solutions standard d'électrophorèse et techniques de révélation des enzymes:

II.4.1. Tableau des systèmes enzymatiques étudiés, des tissus et des tampons d'électrophorèse utilisés :

SYSTEMES ENZYMATIQUES	LOCUS	TISSU	TAMPON
ES: Estérases	Es-3	coeur	TC 6,7
GOT: Glutamate-oxaloacétate transaminases	Got-1	coeur	TC 6,7
	Got-2	coeur	TC 6,7
GPI: Glucose-phosphate isomérase	Gpi-1	Foie	TC 6,7
G6PD: Glucose-6-phosphate déshydrogénase	G6pd-1	Foie	TC 6,7
IDH: Isocitrate déshydrogénase	Idh-1	Foie	TC 6,7
	Idh-2	Foie	TC 6,7
LDH: Lactate déshydrogénase	Ldh-1	Cœur	TC 6,7
	Ldh-2	coeur	TC 6,7
MDH: Malate-déshydrogénase	Mdh-1	Foie	TC 6,7
	Mdh-2	Foie	TC 6,7
MOD: Enzyme malique	Mod-1	Foie	TC 6,7
PGD: Phosphogluconate déshydrogénase	Pgd-1	Foie	TC 6,7
	Pgd-2	Foie	TC 6,7
PGM: Phosphoglucomutase	Pgm-1	Foie	TC 6,7
SDH: Sorbitol déshydrogénase	Sdh-1	Foie	TC 6,7
SOD: Superoxyde dismutase	Sod-1	Foie	TC 6,7

II.4.2. Composition des solutions standard (électrophorèse et révélation)

II.4.2.1. Description des systèmes de tampon d'électrophorèse :

T.C (Tris citrate pH 6,7 - 6,3)

Electrodes :

- Tris	27,0 g
- Acide citrique monohydraté	18,0 g
- H ₂ O désionisée	1000 ml
Ajuster à pH 6,3	

Gel :

- Tris	0,97 g
- Acide citrique monohydraté	0,63 g
- H ₂ O déionisée	1000 ml
Ajuster à pH 6,7	

II.4.2.2. Description des solutions tampons pour les révélations enzymatiques :

Tampon Tris HCl 0,2M - pH 8,0

- EGTA	0,4 g
- Tris	24,2 g
- H ₂ O déminéralisée	1000 ml
Ajuster le pH avec environ 11ml de HCl (1M)	

Tampon phosphate 0,04M - pH 7,0

- NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O	3,12 g
- Na ₂ HPO ₄ anhydre	2,84 g
- H ₂ O déminéralisée	1000 ml

Tampon phosphate HCl 0,2M - pH 7,5

- NaH ₂ PO ₄	28,04 g
- H ₂ O déminéralisée	1000 ml
Ajuster à pH 7,5 avec HCl 1N	

II.4.2.3. Description des solutions mères :

Solution NADP 1%

- Nucléotide triphosphopyridine	1,0 g
- H ₂ O déminéralisée	100 ml

Solution NAD 1%

- β-Nucléotide diphosphopyridine	1,0 g
- H ₂ O déminéralisée	100 ml

Solution de MTT 1%

- MTT tétrazolium	1,0 g
- H ₂ O déminéralisée	100 ml

Solution de NBT 1%

- Nitro Blue Tetrazolium	1,0 g
- H ₂ O déminéralisée	100 ml

Solution de PMS 1%

- Phenazine méthosulfate	1,0 g
- H ₂ O déminéralisé	100 ml

Solution de MgCl₂ 0,5M

- MgCl ₂ -6H ₂ O	10,0 g
- H ₂ O déminéralisée	100 ml

Solution de MnCl₂ 0,25M

- MnCl ₂ ·4H ₂ O	4,9 g
- H ₂ O déminéralisée	100 ml

Solution de α-naphtyl-propionate 1% dans l'acétone

Solution de β-naphtyl-propionate 1% dans l'acétone

Solution de α-naphtyl-butyrate 1% dans l'acétone

- Chacun de ces substrats	1,0 g
- Acétone	100 ml

Solution de lactate de lithium 0,5M

- D, L-Lactate de lithium	9,6 g
- H ₂ O déminéralisée	200 ml

Solution d'acide isocitrique 0,1M

- Na ₃ D-L acide isocitrique H ₂ O	2,94 g
- H ₂ O déminéralisée	100 ml

Solution d'acide D-L malique 2M pH 7,0

- Acide malique	536,4 g
- NaOH	320 g

Attention : Réaction dangereuse. Opérer comme suit :

Mettre un grand bûcher en verre dans un cristalliseur plein de glace. Poser le tout sur un agitateur magnétique. Dissoudre 536,4g d'acide malique dans un litre de H₂O déminéralisée, puis ajouter très lentement 320g de NaOH. La solution ne doit pas se troubler, ni le bûcher s'échauffer. Quand les 320g de NaOH sont en solution, compléter avec H₂O jusqu'à un volume total de 2 litres. Ajuster ensuite à pH 7,0 avec de la soude en paillettes.

Fixateur

- Méthanol	4,0 l
- H ₂ O	5,0 l
- Acide acétique	1,0 l

II.4.3. Techniques de révélation des systèmes enzymatiques :

II.4.3.1. Oxydoréductases / Déshydrogénases :

Glucose-6- phosphate déshydrogénase : G6pd-1

- Phosphate HCl 0,2M (pH 7,5)	40 ml
- D-Glucose	9 g
- NAD 1 %	2 ml
Avant coloration nous avons ajouté:	
- PMS 1 %	0,5 ml
- MTT 1 %	0,5 ml
La coloration se fait à 37° C.	

Isocitrate déshydrogénase : Idh

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0)	35 ml
- Acide isocitrique (0,1M)	1 ml
- MgCl ₂ (0,5M)	1 ml
- NADP 1%	0,3 ml
Avant coloration nous avons ajouté :	
- NBT 1%	0,3 ml
- PMS 1%	0,3 ml
- MTT 1%	0,3 ml
La coloration se fait à 37°C	

Lactate déshydrogénase : Ldh

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0)	35 ml
- Lactate de lithium (0,5M)	6 ml
- NAD 1%	1 ml
- NBT 1%	0,3 ml
Ajouter juste avant la coloration :	
- PMS 1%	0,5 ml

Après avoir versé la solution de coloration, la tranche du gel est incubée à l'obscurité jusqu'à l'apparition des tâches.

Malate déshydrogénase : Mor ou Mdh

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0)	35 ml
- Acide DL-malique 2M (pH 7,0)	5 ml
- MgCl ₂ 0,5M	0,3 ml
- NAD 1%	2 ml
- NBT 1%	1 ml

Avant coloration nous avons ajouté :

- PMS 1%	0,5 ml
- MTT 1%	1 ml

La coloration se fait à 37°C

Enzyme malique : Mod

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0)	10 ml
- MgCl ₂ (0,5M)	3 ml
- Acide malique 2M (pH 8,0)	1 ml
- NADP 1%	0,2 ml

Avant coloration nous avons ajouté :

- PMS 1%	0,2 ml
- NBT 1%	0,4 ml
- MTT 1%	0,4 ml

La coloration se fait à 37°C

Phosphogluconate déshydrogénase : Pgd

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0)	10 ml
- MgCl ₂ (0,5M)	1,5 ml
- Acide-6-phosphogluconique	20 mg
- NADP 1%	0,5 ml

Avant coloration, nous avons ajouté :

- NBT 1%	0,2 ml
- PMS 1%	0,1 ml
- MTT 1%	0,2 ml

Incubation à l'obscurité jusqu'à l'apparition des taches

Sorbitol déshydrogénase : Sdh

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0)	40 ml
- MgCl ₂ 0,5M	0,2 ml
- Sorbitol	250 mg
- NAD 1 %	2 ml
- NBT 1 %	1 ml

Avant coloration nous avons ajouté:

- PMS 1 %	0,5 ml
- MTT 1 %	0,3 ml

La coloration se fait à 37° C.

Superoxyde dismutase : Sod

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0)	40 ml
- MgCl ₂ (0,5M)	0,2 ml
- NAD 1%	1 ml

Avant coloration nous avons ajouté :

- NBT 1%	1 ml
- PMS 1%	0,5 ml

La tranche du gel est incubée à la température ambiante sous un tube néon.

II.4.3.2. Transférases/ Transaminases :

Phosphoglucomutases : Pgm

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0)	30 ml
- MgCl ₂ (0,5M)	3 ml
- Glucose-1-phosphate	300 mg
- NAD 1%	1 ml
- NADP 1%	0,5 ml

Avant coloration nous avons ajouté :

- Glucose-1,6-diphosphate	1 mg
- Glucose-6-phosphate déshydrogénase	6 µl
- PMS 1%	1 ml

- MTT 1% 0,5 ml

Incubation à l'obscurité et fixation dès que possible

Glucose-phosphate-isomérase : Gpi

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0) 20 ml

- MgCl₂ (0,5M) 2 ml

- Fructose-6-phosphate 20 mg

- NAD 1% 2 ml

- NADP 1% 1 ml

Avant coloration, nous avons ajouté :

- Glucose-6-phosphate déshydrogénase 12 µl

- NBT 1% 2 ml

- PMS 1% 1 ml

- MTT 1% 1 ml

Incubation à l'obscurité. La réaction est souvent très rapide ; il est nécessaire de l'arrêter dès qu'elle est suffisante pour pouvoir interpréter les zymogrammes.

Glutamate-oxaloacétate-transaminase : Got

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0) 40 ml

- Acide céto-glutarique 80 mg

- Acide L-aspartique 40 mg

- Pyridoxal-5-phosphate 0,005 g

- Le pH est ajusté à 7,4

Incubation pendant 30 minutes à 37°C puis le mélange est remplacé par :

- Tris HCl 0,2M (pH 8,0) 10 ml

- Fast Blue BB 80 mg

II.4.3.3. Hydrolases :

Estérases : ES-3

- Tampon phosphate 0,1M (pH 6,0) 50 ml

- Solution de α -naphtyl-propionate 1% dans l'acétone 1,0 ml
- Solution de β -naphtyl-propionate 1% dans l'acétone 1,0 ml
- Fast Garnett 20 mg

La coloration se fait à température ambiante en bac émail.

II.5. Interprétation génétique des zymogrammes :

L'interprétation génétique d'un protéinogramme consiste à déterminer à partir du phénotype observé sur le gel (bandes), le génotype de chaque individu.

Ceci est d'autant plus difficile que le nombre de bandes (ou isozymes) révélées est grand. Dans la pratique, on peut distinguer quatre grandes catégories de gènes selon la structure des protéines qu'ils codent (Pasteur et *al.*, 1986 ; Solignac et *al.*, 1995) :

- **Gènes codant des enzymes monocaténaires :**

Dans ce type d'enzymes, les homozygotes possèdent une seule bande, les hétérozygotes deux bandes.

- **Gènes codant des enzymes bicaténaires :**

Dans ce cas, les hétérozygotes possèdent trois bandes.

- **Gènes codant des enzymes tricaténaires :**

Les hétérozygotes possèdent quatre bandes.

- **Zymogrammes d'enzymes codés par un gène ayant un allèle silencieux (allèle nul) :**

Quand un allèle d'un locus ne donne pas de produit ou que ce produit est inactif, on dit que l'allèle est «silencieux» ou «nul». Dans ce cas, aucune bande n'est présente sur le zymogramme chez les homozygotes pour l'allèle nul et une seule bande est détectée chez les hétérozygotes pour l'allèle nul et l'allèle actif ainsi que chez les homozygotes pour l'allèle actif.

III. ANALYSE STATISTIQUE

III.1. Calcul des fréquences géniques

L'analyse des zymogrammes, suivie de leur interprétation génétique, conduit à identifier, pour chaque système enzymatique et pour chaque locus, les génotypes et allèles présents dans chaque échantillon, puis à établir leur fréquences. Il suffira ici de noter que la fréquence d'un génotype est le rapport entre son occurrence et le nombre total de génotypes observés. Le calcul des fréquences alléliques est aussi très simple, puisque la codominance des allèles est la règle: c'est le nombre d'occurrence d'un allèle donné sur le nombre total de copies du gène observé (deux fois le nombre d'individus).

III.1.1. Cas de deux ou plusieurs allèles codominants

Les fréquences alléliques à un locus possédant deux allèles A et a codominants sont calculés selon les formules :

$$p = \frac{2 AA + Aa}{2 N}$$

fréquence de l'allèle A

$$q = \frac{2 aa + Aa}{2 N}$$

fréquence de l'allèle a

AA = nombre d'individus homozygotes pour l'allèle A.

Aa = nombre d'individus hétérozygotes pour les deux allèles.

aa = nombre d'individus homozygotes pour l'allèle a.

N = nombre d'individus étudiés.

q = fréquence de l'allèle récessif.

p = fréquence de l'allèle actif.

III.1.2. Cas d'un allèle récessif (à un locus)

Dans notre étude, les allèles récessifs sont des allèles nuls ou silencieux désignés par Q . Les fréquences de ces allèles sont calculées par la méthode des racines carrées lorsqu'il n'existe qu'un allèle actif:

$$q = \sqrt{\frac{aa}{N}}$$

q = fréquence de l'allèle récessif.

aa = nombre d'homozygotes pour l'allèle récessif.

N = nombre total d'individus

III.2. Mesure de la variabilité génétique

III.2.1. Taux moyen d'hétérozygotie (H) :

Le taux moyen d'hétérozygotie est l'indice le plus satisfaisant de la variabilité génétique. Sa valeur numérique dépend du nombre de loci polymorphes et de la structure génotypique de chacun d'eux. Pour un locus donné, la valeur de l'hétérozygotie est maximale lorsque la fréquence des allèles est identique et s'accroît avec le nombre d'allèles, ce maximum étant de $(n-1)/n$ pour n allèles. Il n'a de sens que pour les organismes diploïdes. Ce paramètre, appelé diversité génétique, est valable quelque soit le mode de reproduction et le degré de ploïdie.

Le taux moyen d'hétérozygotie (H) d'une population est la moyenne des hétérozygoties (h) enregistrées en chaque locus étudié. Il a été calculé selon la formule de Nei (1978) adaptée à l'analyse de petits échantillons :

$$h = \frac{2n \left(1 - \sum_{i=1} q_i^2 \right)}{2n - 1}$$

q_i = fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle au locus i

n = nombre d'individus dans l'échantillon

$$H = \sum_{i=1}^L \frac{h_i}{L}$$

L = nombre total de loci étudiés.

III.2.2. Taux de polymorphisme (P)

Certains loci ne présentent qu'un allèle dans l'échantillon étudié. Par contre, d'autres loci présentent plusieurs allèles avec des fréquences relativement élevées. Les premiers loci sont classés dans la catégorie monomorphe et les seconds dans la catégorie polymorphe. Toutefois, certains loci peuvent présenter un allèle très fréquent et un ou plusieurs allèles rares. Ceux-ci ne seront alors détectés que si la taille de l'échantillon est suffisamment grande. Aussi, une application trop stricte de ce critère peut conduire à les classer dans l'une ou l'autre catégorie selon la taille de l'échantillon ou le hasard de l'échantillonnage. Pour éviter cet inconvénient, un seuil de fréquence de 5% correspondant à la probabilité de détecter les allèles rares est fixe.

Le taux de polymorphisme (P) de la population a été calculé en divisant le nombre de loci polymorphes par le nombre total de loci étudiés. Un gène n'a été considéré comme polymorphe que lorsque la fréquence de son allèle majoritaire était inférieure ou égale à 0,95.

III.2.3. Nombre moyen d'allèles par locus (A)

Le nombre moyen d'allèles par locus (A) correspond au rapport entre le nombre d'allèles observés et le nombre total de locus examinés. Il dépend de la taille de l'échantillon ; plus celui-ci est grand, plus on a de chances d'observer des allèles peu communs.

III.3. Equilibre de Hardy-Weinberg

La loi de Hardy-Weinberg repose sur le principe suivant : Dans une population de taille infinie, où les croisements s'effectuent au hasard et en l'absence de facteurs perturbateurs (mutation, sélection, migration), les fréquences génotypiques restent inchangées d'une génération à une autre.

Dans le cas d'un couple d'allèles (A, a) de fréquences respectives p et q (où $p+q = 1$) à l'équilibre, la loi de Hardy-Weinberg se traduit par les fréquences génotypiques suivantes : p^2 (AA), $2pq$ (Aa) et q^2 (aa).

Test du χ^2

Ce test permet de vérifier si les distributions des génotypes à un locus sont en équilibre de Hardy-Weinberg. Ainsi, ces distributions ont été comparées à la répartition théorique selon la formule :

$$\chi^2 = \frac{\sum (o_i - e_i)^2}{e_i}$$

- o_i est le nombre observé du $i^{\text{ème}}$ génotype
- e_i est le nombre calculé.

Le nombre de degré de liberté est égal au nombre de génotypes auquel on retranche le nombre d'allèles.

Dans le cas où le nombre de degré de liberté est égal à un ou si l'effectif calculé le plus faible est compris entre 5 et 10, la sécurité du test a été augmentée en pratiquant la correction de Yates :

$$\chi^2 = \frac{\sum [(o_i - e_i) - 0.5]^2}{e_i}$$

III.4. Mesure de la divergence génétique

* Identité génétique de Nei :

L'identité génétique de Nei (I) est une estimation du degré de ressemblance entre deux populations X et Y :

$$I = \frac{J_{xy}}{J_x J_y}$$

Avec:

$$J_{xy} = \sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^n \frac{X_{ij} Y_{ij}}{L}$$

$$J_x = \sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^n \frac{X_{ij}^2}{L}$$

$$J_y = \sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^n \frac{Y_{ij}^2}{L}$$

x_{ij} et y_{ij} représentent les fréquences du $i^{\text{ème}}$ allèle au locus j dans les deux populations X et Y.

L représente le nombre de locus étudiés.

$I = 0$ dans le cas où il n'y a aucun allèle commun entre les deux populations.

$I = 1$ dans le cas où les allèles ont les mêmes fréquences à tous les loci dans les deux populations.

* Distance génétique :

La distance génétique D indique le degré de dissemblance génétique entre les deux populations étudiées.

$$D = - \text{Log} (I)$$

D varie de 0 (aucune divergence) à l'infini.

Les distances génétiques ont été calculées d'après les fréquences alléliques en utilisant le programme GENETIX v. 4.01 (Belkhir et *al.*, 2001).

III.5. Méthodes de reconstitution phylogénétique

Deux grands ensembles de méthodes peuvent être utilisés dans l'estimation d'une phylogénie : les méthodes phénétiques et les méthodes cladistiques. Ces derniers rassemblent des groupes d'organismes ayant en commun des caractères exclusifs dont on peut penser qu'ils sont hérités d'une espèce ancestrale propre. Pour les cladistes (Henning, 1966 ; Wiley, 1981) deux espèces sont étroitement apparentées si elles partagent un caractère dérivé d'un ancêtre commun. Dans ce travail, nous n'avons utilisé que les méthodes phénétiques qui sont basées sur l'étude de la quantité de divergence entre unités comparées, exprimées à l'aide de comparaison par paire. La systématique phénétique permet d'établir des classifications basées sur le degré de similitudes globales sans se préoccuper de la signification évolutive des caractères analysés. Les données brutes sont transformées en matrices d'association (ex. Distance génétique de Nei à partir des fréquences alléliques), qui sont ensuite transformées en dendrogramme par des algorithmes d'agglomération (Sneath et *al.* 1973; Legendre et *al.* 1981). Ces algorithmes d'agglomération sont basés sur l'existence d'une horloge moléculaire c'est à dire des taux d'évolution relativement homogènes entre les différentes unités taxinomiques (Farris, 1981; Ashlock, 1972).

L'**UPGMA** (Unweighted Pair-Group Method Analysis) est une méthode proposée par Sokal et *al.* (1963) qui agrège d'abord les deux unités entre lesquelles la distance est la plus faible. La distance, entre les deux unités agrégées et une troisième unité, est égale à la moitié de la somme des distances entre cette troisième unité et chacune des deux autres. Cette méthode d'agglomération hiérarchique suppose un taux d'évolution constant.

RESULTATS

I. RESULTATS ELECTROPHORETIQUES PAR SYSTEME ENZYMATIQUE

I.1. Estérases : (Es)

C'est un système enzymatique monomérique présentant plusieurs loci dont un seul a été analysé au cours de cette étude : *Es-3*. Cinq allèles différents ont été mis en évidence : *Es-3⁸⁰*, *Es-3⁹⁰*, *Es-3¹⁰⁰*, *Es-3¹¹⁰* et *Es-3¹²⁰*. *Es-3⁸⁰* et *Es-3⁹⁰* ne sont observés que chez *Mauremys leprosa* alors que *Es-3¹¹⁰* et *Es-3¹²⁰* n'apparaissent que chez *Caretta caretta*. L'allèle *Es-3¹⁰⁰* est présent chez les deux espèces (Planche 1).

I.2. Glutamate-oxaloacétate-transaminases

C'est un système enzymatique dimérique codé par deux loci *Got-1* et *Got-2*. Au locus *Got-1*, nous avons observé trois allèles différents : *Got-1⁸⁰*, *Got-1⁹⁰* et *Got-1¹⁰⁰*. Les tortues marines *Caretta caretta* ne possèdent pas le dernier allèle. Au niveau du deuxième locus qui est à migration cathodique, on a enregistré deux allèles différents : *Got-2¹⁰* observé chez *M. leprosa* et *Got-2²⁰* observé chez *C. caretta* (Planche 2).

I.3. Glucose Phosphate Isomérase : (Gpi)

C'est un système enzymatique dimérique présentant un seul locus qui montre trois allèles différents : *Gpi-1¹⁰⁰*, *Gpi-1¹¹⁰*, *Gpi-1¹²⁰*. On note que l'allèle *Gpi-1¹⁰⁰* n'est observé que chez les tortues marines *Caretta caretta*. Les allèles *Gpi-1¹¹⁰* et *Gpi-1¹²⁰* sont observés chez la tortue d'eau douce (Planche 3).

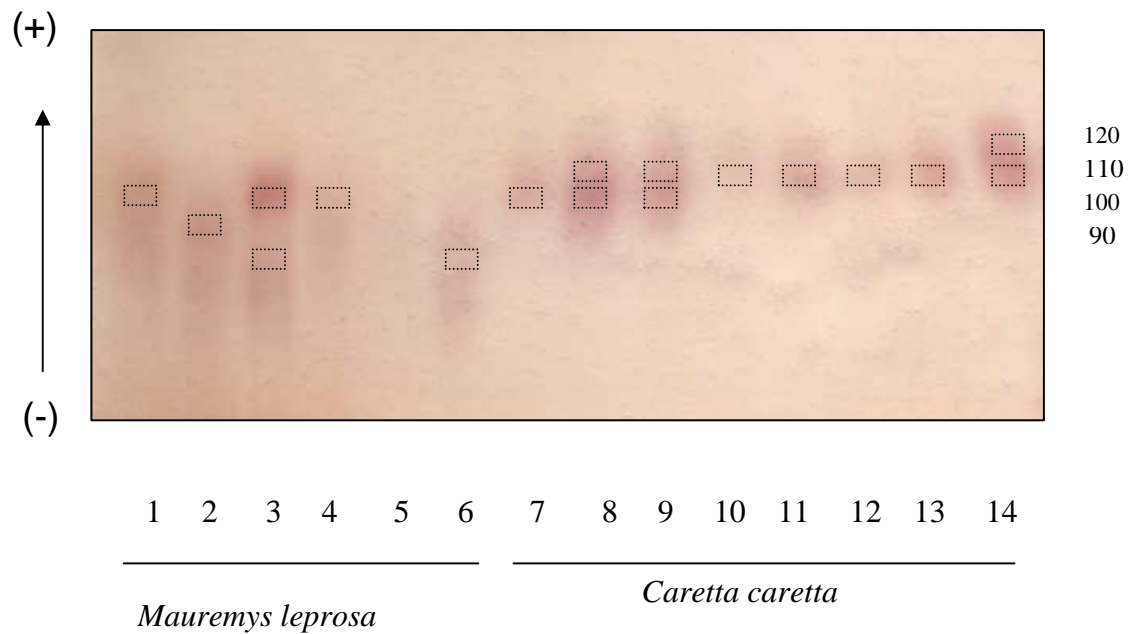


Planche 1 : Zymogramme des Estérases 3 (Es-3) chez quelques Individus de *Caretta caretta* et de *Mauremys leprosa*

- 1, 4 et 7 : Homozygotes $Es_3^{100/100}$
 2 : Homozygote $Es_3^{90/90}$
 3 : Hétérozygote $Es_3^{80/100}$
 6 : Homozygote $Es_3^{80/80}$
 8 et 9 : Hétérozygotes $Es_3^{100/110}$
 10 à 13 : Hétérozygotes $Es_3^{110/120}$

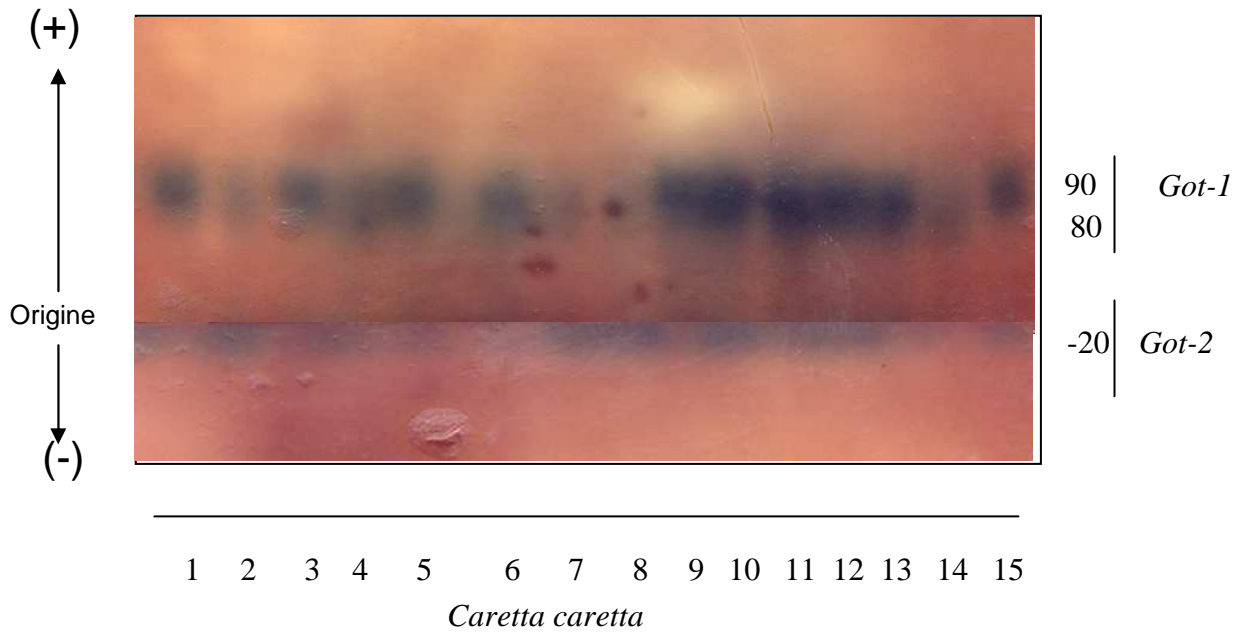


Planche 2: Zymogramme de Glutamate-oxaloacétate-transaminases (Got) chez quelques individus de *Caretta caretta*

1, 2, 3, 5, 9 et 15 : Homozygotes *Got-1*^{90/90}
 4, 6, 7, 8 et 14 : Homozygotes *Got-1*^{80/80}
 10 à 13 : Hétérozygotes *Got-1*^{80/90}
 1 à 15 : Homozygotes *Got-2*^{-20/-20}

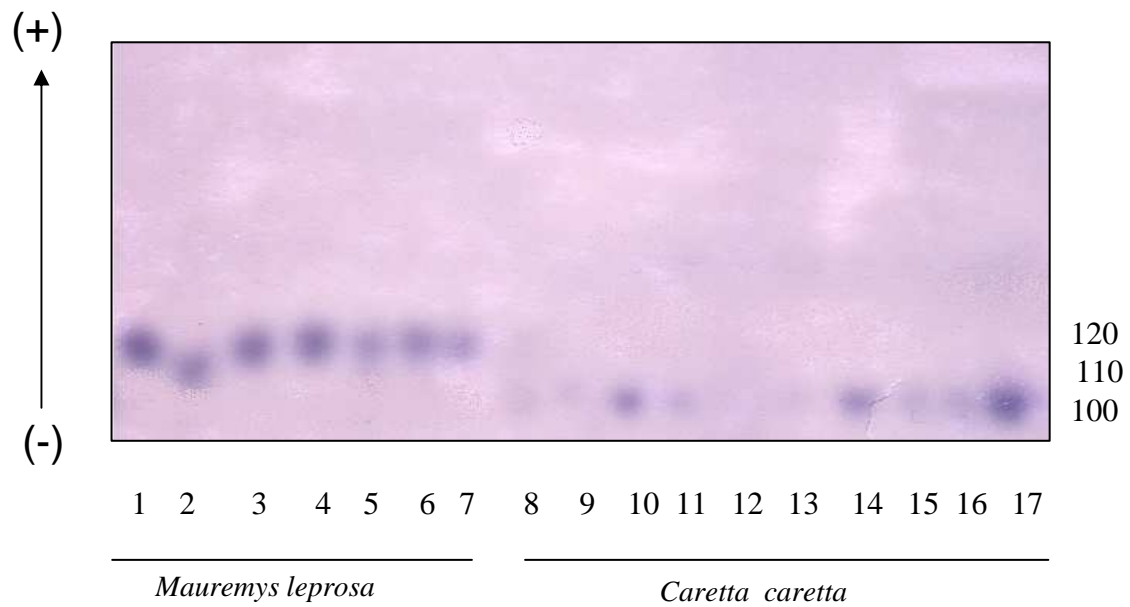


Planche 3: Zymogramme de Glucose Phosphate Isomérase (Gpi) chez quelques individus de *Caretta caretta* et de *Mauremys leprosa*

- 1, 3 à 7 : Homozygotes $Gpi-I^{120/120}$
 2 : Homozygote $Gpi-I^{110/110}$
 8 à 17 : Homozygotes $Gpi-I^{100/100}$

1.4. Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase : (G6pd)

C'est un système enzymatique dimérique présentant un seul locus. Trois allèles différents ont été observés au niveau de ce locus : $G6pd-1^{80}$, $G6pd-1^{90}$, $G6pd-1^{100}$. L'allèle $G6pd-1^{80}$ n'est observé que chez les tortues d'eau douce. Par contre, $G6pd-1^{90}$ n'est observé que chez les tortues marines; l'allèle $G6pd-1^{100}$ est commun pour les deux espèces. (Planche 4).

1.5. Isocitrate Déshydrogénase : (Idh)

C'est un système enzymatique dimérique présentant deux loci : $Idh-1$ et $Idh-2$. Au premier locus, quatre allèles ont été enregistrés : $Idh-1^{100}$, $Idh-1^{110}$, $Idh-1^{120}$, $Idh-1^{130}$. Les deux allèles $Idh-1^{100}$ et $Idh-1^{110}$ n'apparaissent que chez *Caretta caretta* alors que les deux autres allèles $Idh-1^{120}$ et $Idh-1^{130}$ n'apparaissent que chez *Mauremys leprosa*. Au niveau du deuxième locus, un seul allèle a été enregistré : $Idh-1^{100}$. Ce locus n'est observé que chez *Caretta caretta*, il est absent chez *Mauremys leprosa* (planches 5 et 6).

1.6. Lactate Déshydrogénase : (Ldh)

C'est un système enzymatique tétramérique présentant deux loci : $Ldh-1$ et $Ldh-2$. Un seul allèle est observé au niveau du premier locus qui est $Ldh-1^{100}$. Au niveau du deuxième locus $Ldh-2$, deux allèles ont été observés : $Ldh-2^{90}$ et $Ldh-2^{100}$. Le premier allèle n'est présent que chez *Caretta caretta* alors que le deuxième allèle n'est observé que chez *Mauremys leprosa*. (Planches 7 et 8).

1.7. Malate Déshydrogénase : (Mdh)

C'est un système enzymatique dimérique présentant deux loci : $Mdh-1$ et $Mdh-2$. Au niveau du premier locus, deux allèles ont été observés : $Mdh-1^{100}$ et $Mdh-1^{120}$. Au niveau de $Mdh-2$, les individus de *Caretta caretta* présentent l'allèle 100, alors que les individus de *Mauremys leprosa* présentent l'allèle 120 (Planche 9).

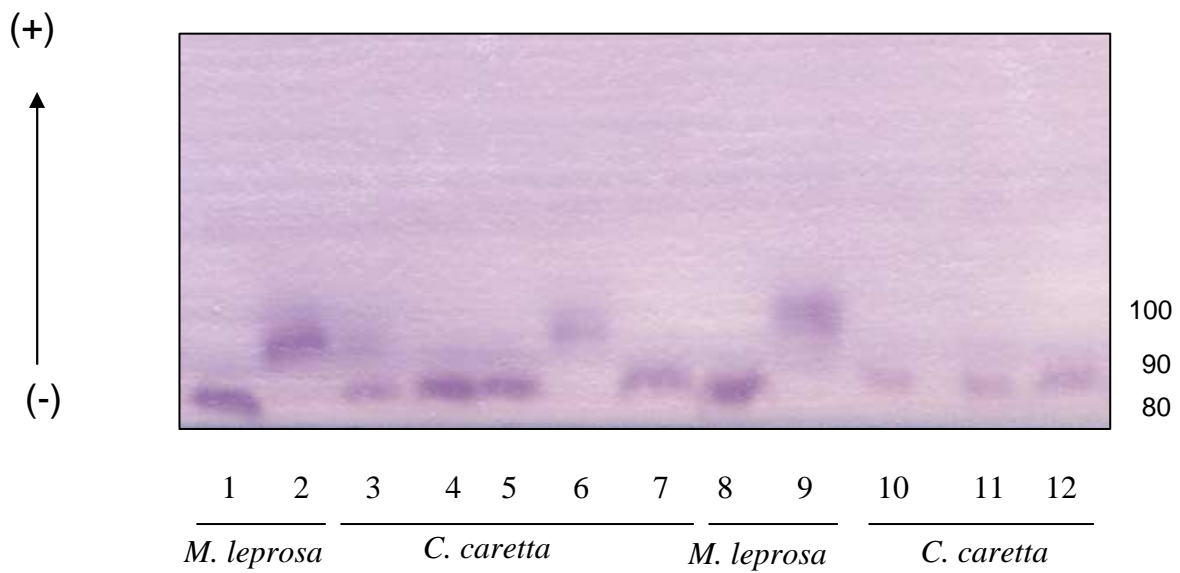


Planche 4: Zymogramme de Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6pd) chez quelques individus de *Caretta caretta* et de *Mauremys leprosa*

1 et 8 : Homozygotes $G6pd-1^{80/80}$
 3, 4, 5, 7, 10, 11 et 12 : Homozygotes $G6pd-1^{90/90}$
 2, 6 et 9 : Homozygotes $G6pd-1^{100/100}$

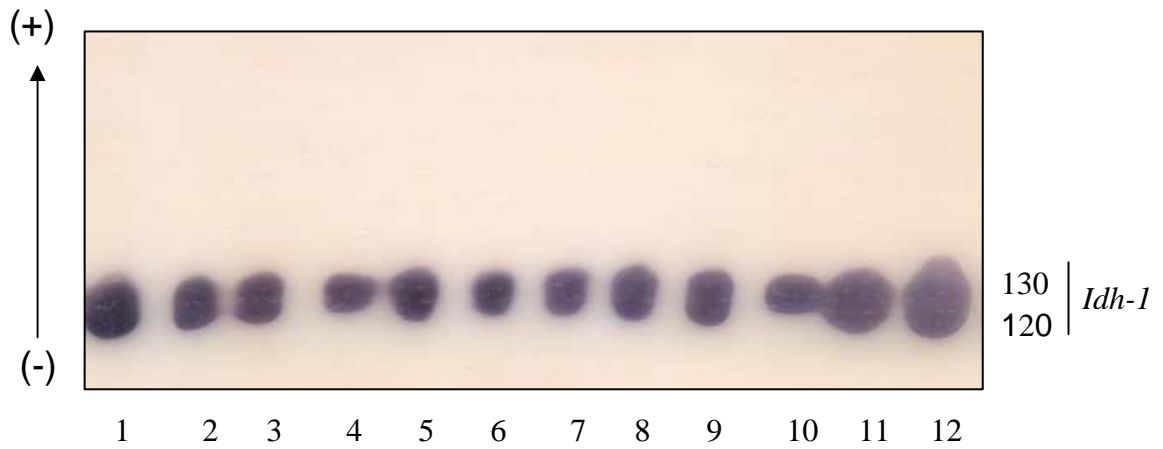


Planche 5: Zymogramme de Isocitrate Déshydrogénase (Idh) chez quelques individus de *Mauremys leprosa*

4, 6 et 10 : Homozygotes $Idh-1^{130/130}$
 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11 et 12 : Hétérozygotes $Idh-1^{120/130}$

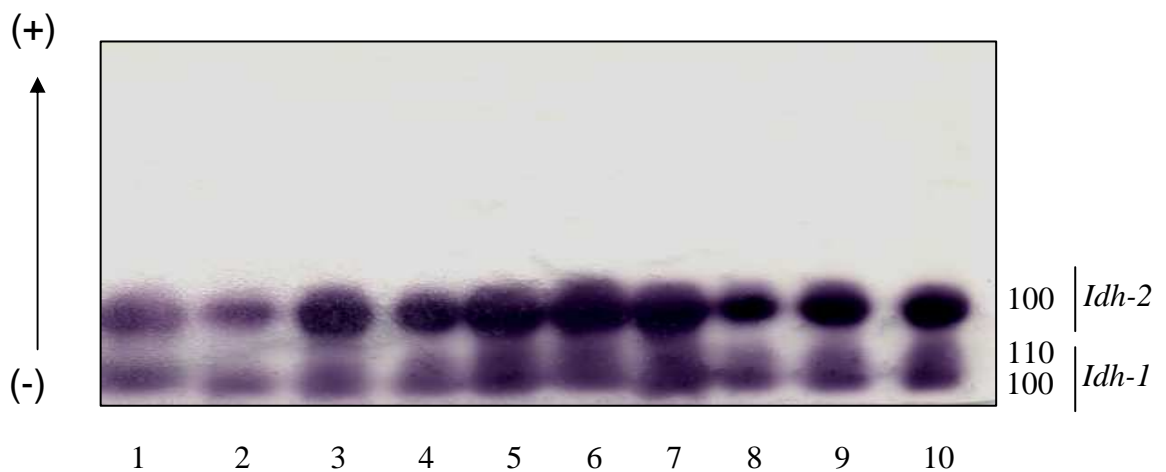


Planche 6: Zymogramme de Isocitrate Déshydrogénase (Idh) chez quelques individus de *Caretta caretta*

1 à 4 e 8 : Homozygotes $Idh-1^{100/100}$
 5 à 7, 9 et 10 : Hétérozygotes $Idh-1^{100/110}$
 1 à 10 : homozygotes $Idh-2^{100/100}$

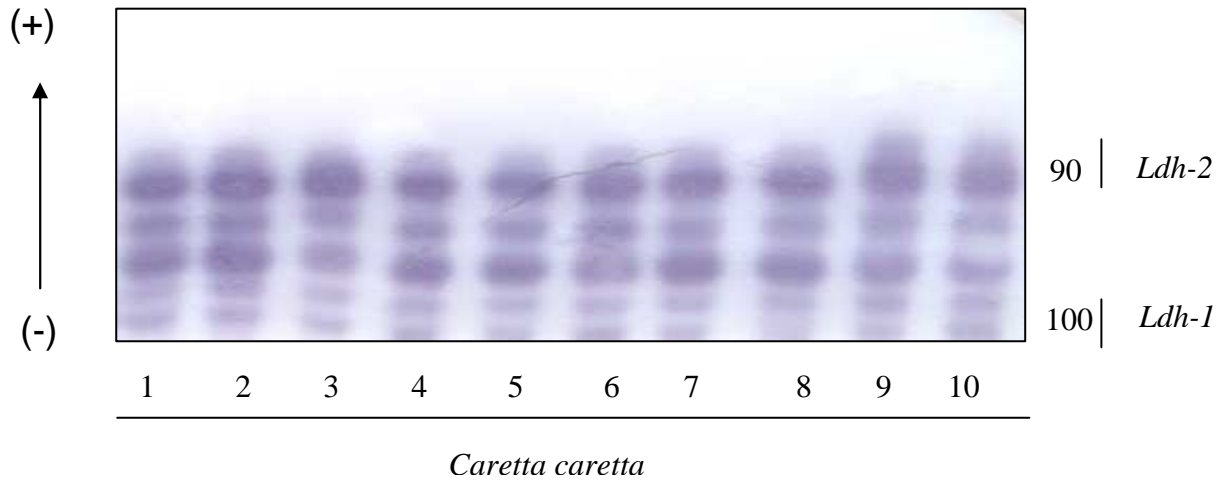


Planche 7: Zymogramme de Lactate Déshydrogénase (Ldh) chez quelques individus de *Caretta caretta*

1 à 10 : Homozygotes *Ldh-1*^{100/100} et *Ldh-2*^{90/90}

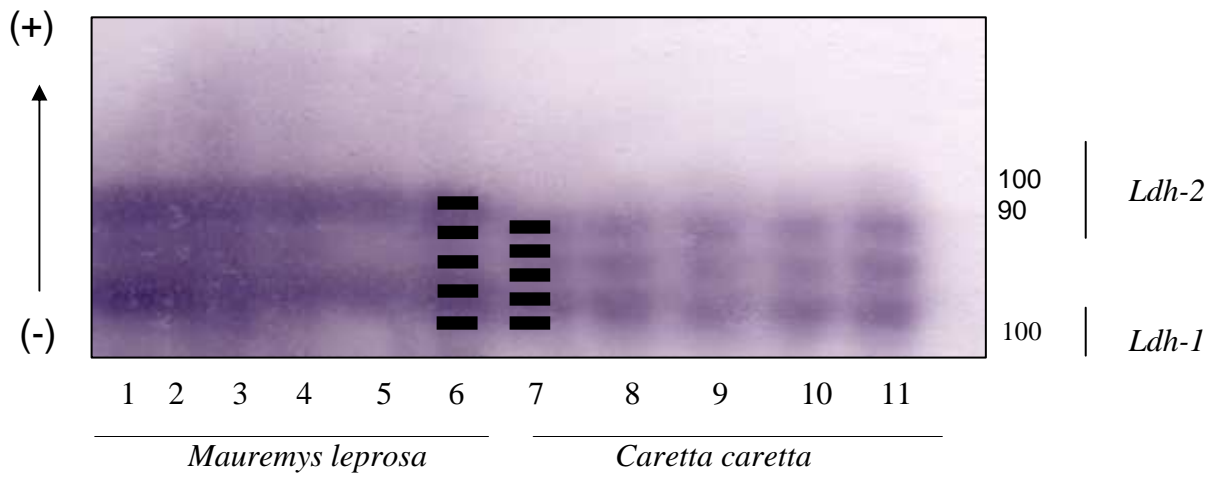


Planche 8: Zymogramme de Lactate Déshydrogénase (Ldh) chez quelques individus de *Caretta caretta* et de *Mauremys leprosa*

1 à 11 : Homozygotes *Ldh-1*^{100/100}
 1 à 6 : Homozygotes *Ldh-2*^{100/100}
 7 à 11 : Homozygotes *Ldh-2*^{90/90}

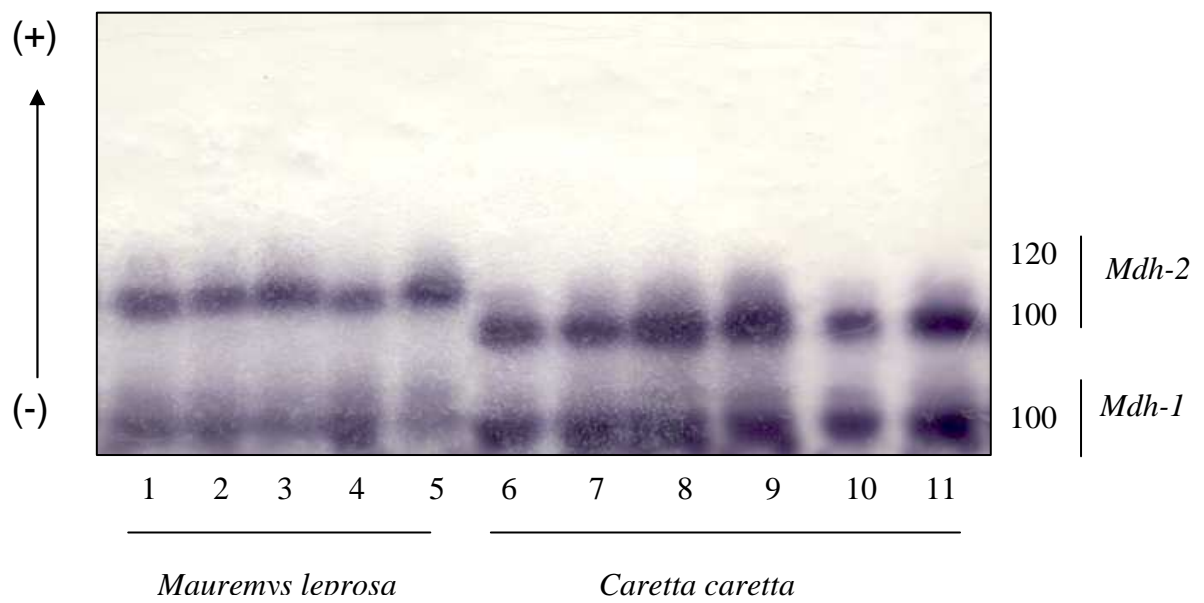


Planche 9: Zymogramme de Malate Déshydrogénase (Mdh)
chez quelques individus de *Caretta caretta*
et de *Mauremys leprosa*

1 à 11 : Homozygotes *Mdh-1*^{100/100}
1 à 5 : Homozygotes *Mdh-2*^{120/120}
6 à 11 : Homozygotes *Mdh-2*^{100/100}

I.8. Enzyme Malique : (Mod)

C'est un système enzymatique monomérique présentant un seul locus : *Mod-1*. Deux allèles différents ont été observés : *Mod-1*⁹⁰ et *Mod-1*¹⁰⁰. Le premier n'est présent que chez *Caretta caretta* alors que le deuxième n'est observé que chez *Mauremys leprosa* (Planche 10).

I.9. Phosphogluconate Déshydrogénase : (Pgd)

C'est un système enzymatique dimérique présentant deux loci : *Pgd-1* et *Pgd-2*. Au niveau du premier locus, trois allèles différents ont été observés : *Pgd1*⁹⁰, *Pgd1*¹⁰⁰ et *Pgd1*¹¹⁰. Ce dernier n'apparaît que chez *Mauremys leprosa*. Au niveau du deuxième locus, un seul allèle est observé : *Pgd-2*¹⁰⁰. Ce locus n'apparaît que chez *Caretta caretta*, il est absent chez *Mauremys leprosa* (Planches 11 et 12).

I.10. Phosphoglucomutase : (Pgm)

C'est un système enzymatique monomérique présentant un seul locus : *Pgm-1*. Deux allèles sont observés au niveau de ce locus : *Pgm-1*¹⁰⁰ et *Pgm-1*¹⁰⁵. Le premier est présent chez *Caretta caretta*, alors que le deuxième est présent chez *Mauremys leprosa* (Planche 13).

I.11. Sorbitol Déshydrogénase : (Sdh)

C'est un système enzymatique dimérique codé par un seul locus : *Sdh-1*. On note la présence de deux allèles différents : *Sdh-1*¹⁰⁰ et *Sdh-1*¹²⁰. Ce dernier n'apparaît que chez les populations de *Caretta caretta* (Planche 14).

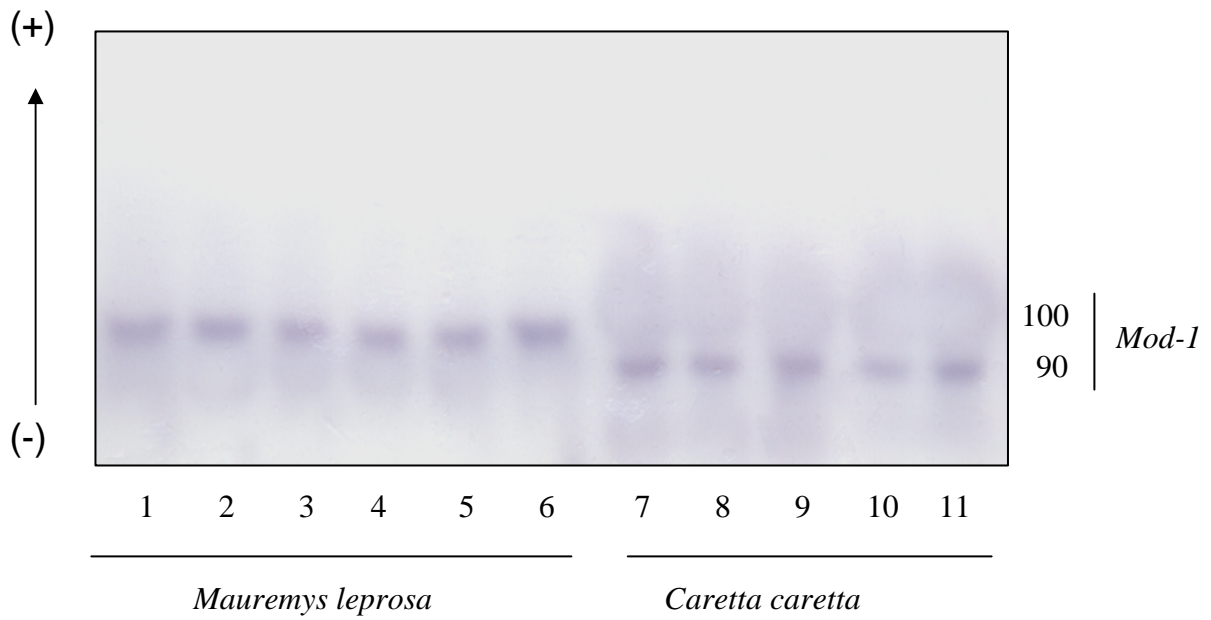


Planche 10: Zymogramme de l'Enzyme Malique (Mod) chez quelques individus de *Caretta caretta* et de *Mauremys leprosa*

1 à 6 : homozygotes *Mod*^{100/100}
7 à 11 : homozygotes *Mod*^{90/90}

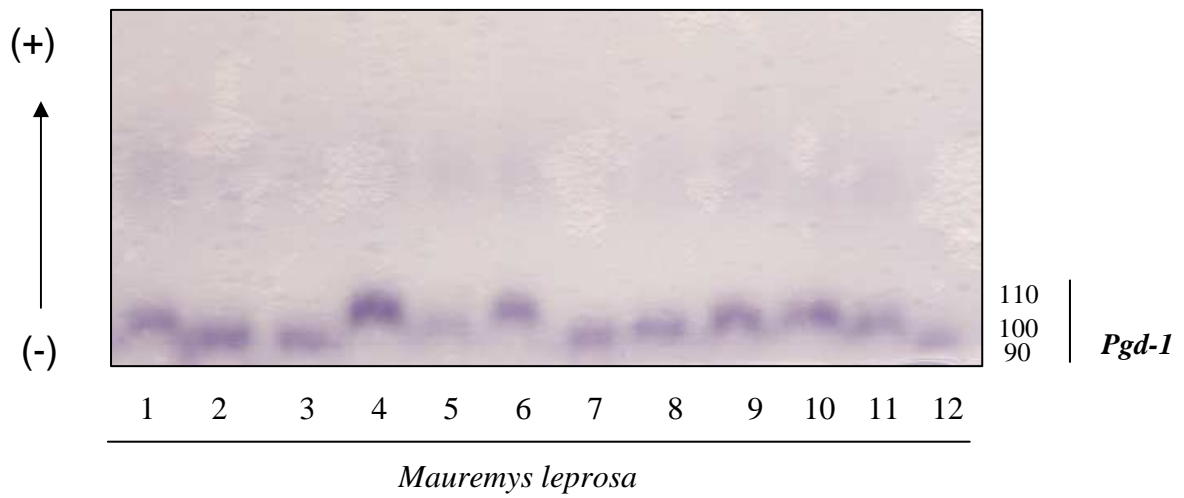


Planche 11: Zymogramme de Phosphoglucose Déshydrogénase (pgd) chez quelques individus de *Mauremys leprosa*

2, 3, 7 et 12 : Homozygotes $Pgd-1^{90/90}$
 1, 5, 8 et 11 : Homozygotes $Pgd-1^{100/100}$
 4, 6, 9 et 10 : Homozygotes $Pgd-1^{110/110}$

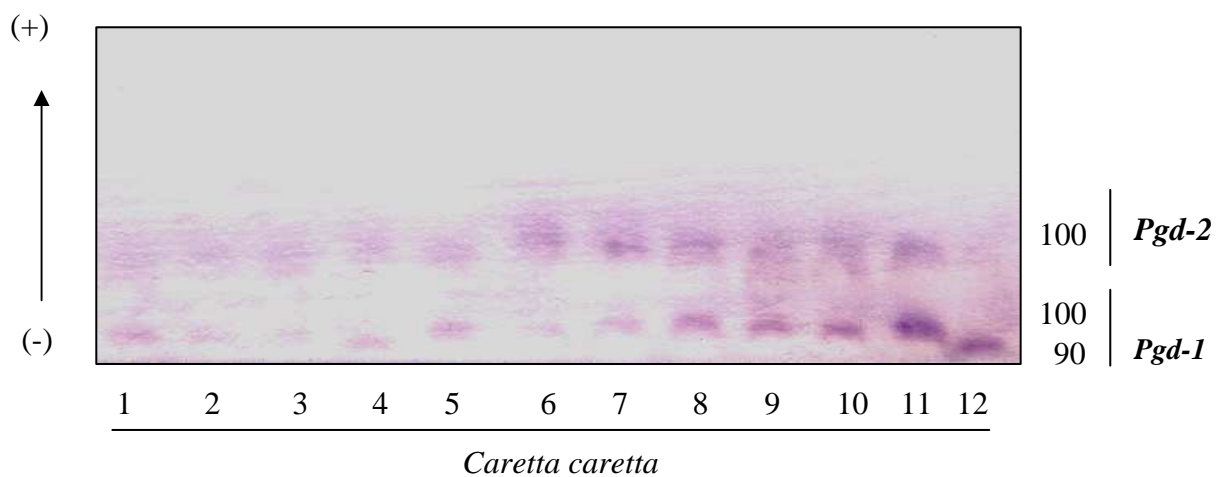


Planche 12: Zymogramme de Phosphoglucose Déshydrogénase (Pgd) chez quelques individus de *Caretta caretta*

1 à 11 : Homozygotes $Pgd-1^{100/100}$
 12 : Homozygote $Pgd-1^{90/90}$
 1 à 12 : Homozygotes $Pgd-2^{100/100}$

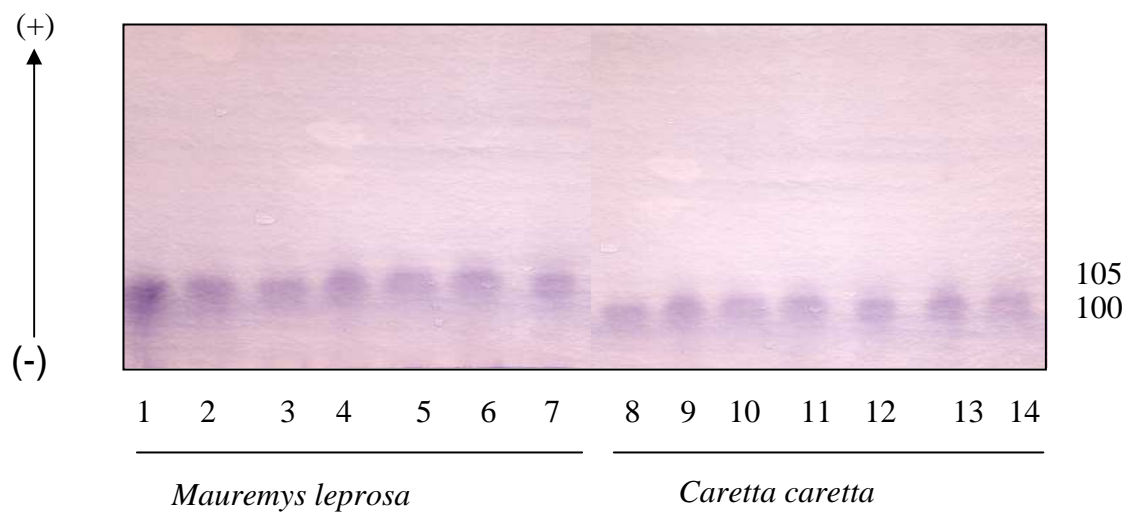


Planche 13 : Zymogramme de Phosphoglucomutase (Pgm) chez quelques individus de *Caretta caretta* et de *Mauremys leprosa*

1 à 7 : Homozygotes $Pgm-1^{105/105}$
 8 à 14 : Homozygotes $Pgm-1^{100/100}$

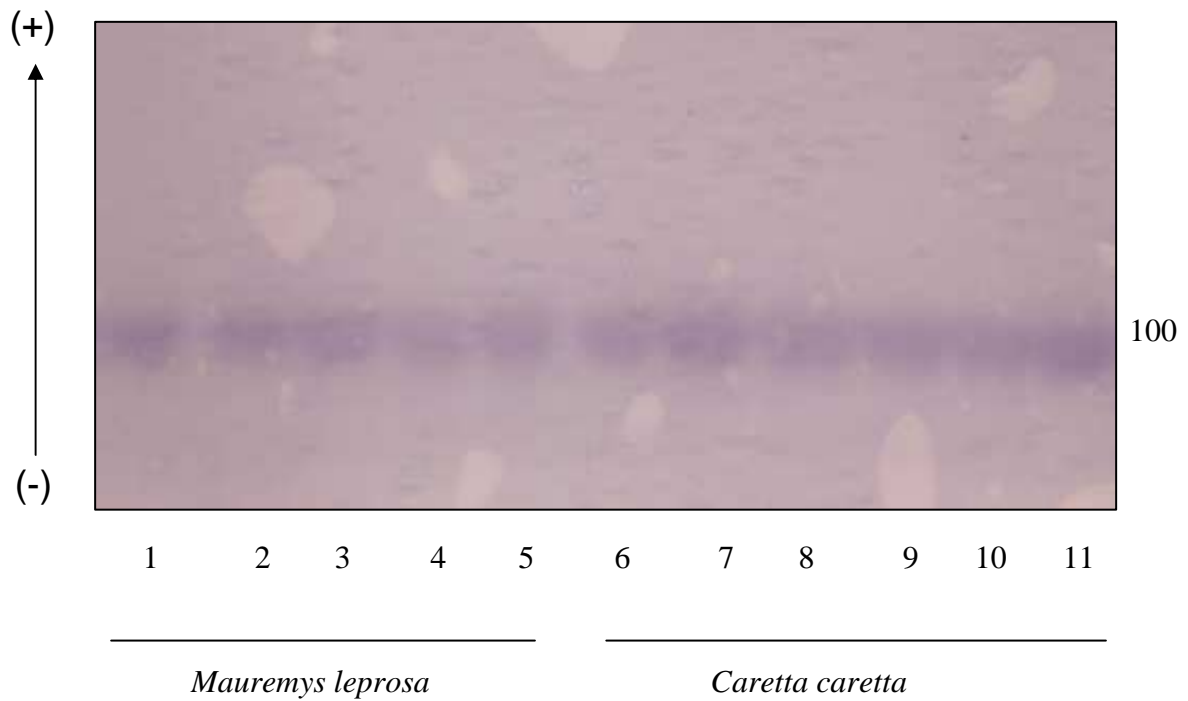


Planche 14 : Zymogramme de Sorbitol Déshydrogénase (Sdh) chez quelques individus de *Caretta caretta* et de *Mauremys leprosa*

1 à 11 : Homozygotes $Sdh-1^{100/100}$

I.12. Superoxyde dismutase : Sod

C'est un système enzymatique dimérique codé par un seul locus : *Sod-1*. Trois allèles différents sont observés au niveau de ce locus : *Sod-1*⁸⁰, *Sod-1*⁹⁰ et *Sod-1*¹⁰⁰. Les deux allèles *Sod-1*⁸⁰ et *Sod-1*¹⁰⁰ sont présents chez *Mauremys leprosa*, et l'allèle *Sod-1*⁹⁰ chez *Caretta caretta* (Planche 15).

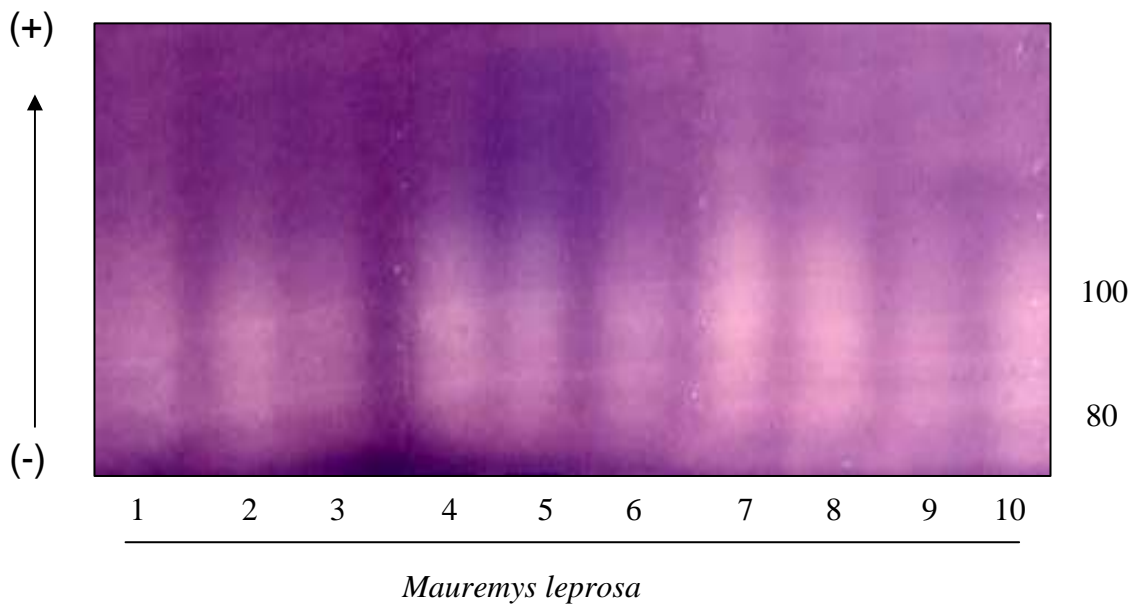


Planche 15: Zymogramme de Superoxyde Dismutase (Sod) chez quelques individus de *Mauremys leprosa*

1 à 10 : Hétérozygotes *Sod-1*^{80/100}

II. ANALYSE DE LA VARIABILITE GENETIQUE

II.1. Fréquences alléliques et équilibre de Hardy-Weinberg :

Suite à la détermination des génotypes de chaque individu pour tous les loci analysés, les fréquences alléliques ont été calculées et sont portées au tableau 2 pour les différentes populations de *Mauremys leprosa* et au tableau 3 pour les quatre nids de *Caretta caretta*.

II.1.1 *Mauremys leprosa*

Sur les 15 loci analysés, huit se sont révélés polymorphes : *Got-1*, *Es-3*, *Gpi-1*, *G6pd*, *Idh-1*, *Mdh-1*, *Pgd-1* et *Sod-1*. Les loci *Got-2*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Mdh-2*, *Mod-1*, *Pgm-1* et *Sdh-1* sont monomorphes.

Au locus *Got-1*, nous notons la présence de trois allèles chez toutes les populations à l'exception des populations de oued Abid, oued Bouficha et oued Siliana où seulement deux allèles sont présents.

Sur les trois allèles présents au locus *Es-3*, nous notons l'absence de l'allèle $Es-3^{80}$ chez les populations de oued Abid et oued Zerkine et de l'allèle $Es-3^{90}$ chez les populations de oued Lakarit.

Toutes les populations sont monomorphes pour l'allèle $Gpi-1^{110}$ au locus *Gpi-1* à l'exception de la population de oued Abid qui présente un deuxième allèle ($Gpi-1^{120}$).

Au locus *G6pd-1*, toutes les populations montrent deux allèles à l'exception de la population de oued Lakarit qui apparaît monomorphe pour l'allèle 80. De même pour le locus *Idh-1* où cette même dernière population se montre monomorphe pour l'allèle $Idh-1^{120}$.

Deux allèles équifréquents ont été mis en évidence chez toutes les populations au loci *Mdh-1* et *Sod-1*.

Enfin, sur les trois allèles présents au locus *Pgd-1*, nous notons l'absence de l'allèle $Pgd-1^{110}$ chez les populations de oued Abid et oued Zerkine et de l'allèle $Pgd-1^{90}$ chez les populations de oued Jlef et oued Siliana.

Pour l'ensemble des loci polymorphes, l'hypothèse de l'équilibre panmictique a été testée pour chaque locus et pour chaque population. La loi de Hardy-Weinberg est respectée pour quatre loci : *Mdh-1*, *Idh-1*, *G6pd-1* et *Sod-1*(tableau 4). Ce test effectué sur chaque population, se révèle significatif pour les populations de oued Abid, oued Bouficha, oued

Zerkine et oued Siliana et légèrement significatif pour oued Jlef. La population de oued Lakarit quant à elle, semble en équilibre panmictique (tableau 5).

III.1.2 *Caretta caretta*

Pour les 17 loci étudiés, sept sont polymorphes : *Got-1*, *Es-3*, *G6pd-1*, *Idh-1*, *Mdh-1*, *Pgd-1* et *Sdh-1*. Les loci *Got-2*, *Gpi-1*, *Idh-2*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Mdh-2*, *Mod-1*, *Pgd-2*, *Pgm-1* et *Sod-1* sont monomorphes (tableau 3).

Au locus *Got-1*, deux allèles sont présents chez les quatre nids. La seule différence entre les nids réside dans la variation des fréquences respectives de chacun de ces deux allèles.

Au locus *Es-3*, toutes les populations présentent trois allèles à l'exception du nid 2 de la saison 2003 où l'allèle $Es-3^{120}$ est absent.

Le locus *G6pd-1* se montre monomorphe pour l'allèle 100 chez les deux nids de la saison 2003 ; il présente deux allèles (100 et 110) chez les deux nids de 2002.

Au locus *Idh-1*, deux allèles sont présents à l'exception du nid 2 de 2003 où seul l'allèle 100 est présent. Notons que pour le nid 1 de 2003 ce même allèle est relativement plus fréquent que le deuxième (110).

Aux loci *Mdh-1* et *Sdh-1*, les deux nids de la saison 2002 sont monomorphes pour les allèles $Mdh-1^{100}$ et $Sdh-1^{100}$, alors que les deux nids de 2003 présentent deux allèles équifréquents à chacun de ces deux loci.

Enfin, deux allèles sont présents au locus *Pgd-1* chez les deux nids de 2002, les nids de 2003 sont monomorphes pour l'allèle $Pgd-1^{100}$.

Le test de l'équilibre de Hardy-Weinberg ne peut pas être effectué dans ce cas, dans la mesure où la descendance analysée ne peut pas être représentative de la population de *Caretta caretta*.

Un examen fin des génotypes des jeunes tortues révèle une information importante. Dans trois nids sur quatre, nous avons révélé trois allèles au locus *Es-3* ; et la composition en génotypes dans chaque nid ne correspond pas à une ségrégation Mendélienne. En effet, dans le nid de la saison 2002, deux génotypes homozygotes ont été observés : $Es-3^{100}$ et $Es-3^{110}$ et un génotype hétérozygote $Es-3^{110/120}$; dans le nid 2 de 2002 trois génotypes homozygotes différents ont été observés $Es-3^{100}$, $Es-3^{110}$ et $Es-3^{120}$; De même dans le nid 1 de 2003, deux génotypes homozygotes différents sont présents : $Es-3^{110}$ et $Es-3^{120}$ ainsi que deux génotypes hétérozygotes différents $Es-3^{100/110}$ et $Es-3^{110/120}$. Ceci nous amène à conclure qu'au moins deux mâles ont intervenu dans la fécondation de chaque femelle.

LOCUS	ALLELES	Abid	Bouficha	Siliana	Jlef	Lakarit	Zerkine
<i>Es-3</i>	80	0,0000	0,1333	0,1667	0,5000	0,1667	0,0000
	90	0,9000	0,1333	0,2222	0,0833	0,0000	0,1429
	100	0,1000	0,7333	0,6111	0,4167	0,8333	0,8571
<i>Got-1</i>	80	0,2667	0,3333	0,5556	0,5833	0,2500	0,3571
	90	0,0000	0,0000	0,0000	0,1667	0,0833	0,2500
	100	0,7333	0,6667	0,4444	0,2500	0,6667	0,3929
<i>Got-2</i>	-10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Gpi-1</i>	110	0,8333	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	120	0,1667	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>G6pd-1</i>	80	0,1000	0,1333	0,3333	0,5000	1,0000	0,1429
	100	0,9000	0,8667	0,6667	0,5000	0,0000	0,8571
<i>Idh-1</i>	120	0,8667	0,9000	0,9444	0,7500	1,0000	0,5714
	130	0,1333	0,1000	0,0556	0,2500	0,0000	0,4286
<i>Ldh-1</i>	100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Ldh-2</i>	100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Mdh-1</i>	100	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
	120	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Mdh-2</i>	120	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Mod-1</i>	100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Pgd-1</i>	90	0,7333	0,4000	0,0000	0,0000	0,4167	0,2143
	100	0,2667	0,5333	0,2222	0,5000	0,2500	0,7857
	110	0,0000	0,0667	0,7778	0,5000	0,3333	0,0000
<i>Pgm-1</i>	105	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Sdh-1</i>	100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Sod-1</i>	80	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
	100	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000

Tableau 2 : Tableau des fréquences alléliques chez *Mauremys Leprosa*

LOCUS	ALLELES	1_2002	2_2002	1_2003	2_2003
<i>Es-3</i>	100	0,0714	0,1200	0,0833	0,7500
	110	0,7857	0,6800	0,5000	0,2500
	120	0,1429	0,2000	0,4167	0,0000
<i>Got-1</i>	80	0,4643	0,2400	0,3333	0,7500
	90	0,5357	0,7600	0,6667	0,2500
<i>Got-2</i>	-20	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Gpi-1</i>	100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>G6pd-1</i>	90	0,1429	0,3200	0,0000	0,0000
	100	0,8571	0,6800	1,0000	1,0000
<i>Idh-1</i>	100	0,7143	0,4600	0,8333	1,0000
	110	0,2857	0,5400	0,1667	0,0000
<i>Idh-2</i>	100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Ldh-1</i>	100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Ldh-2</i>	90	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Mdh-1</i>	100	1,0000	1,0000	0,5000	0,5000
	120	0,0000	0,0000	0,5000	0,5000
<i>Mdh-2</i>	100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Mod-1</i>	90	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Pgd-1</i>	90	0,6429	0,7400	1,0000	1,0000
	100	0,3571	0,2600	0,0000	0,0000
<i>Pgd-2</i>	100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Pgm-1</i>	100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Sdh-1</i>	100	1,0000	1,0000	0,5000	0,5000
	120	0,0000	0,0000	0,5000	0,5000
<i>Sod-1</i>	90	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Tableau 3 : Tableau des fréquences alléliques des 4 nids de
Caretta caretta

	Chi2	ddl	P
<i>Mdh-1</i>	10,3	12	0,5855
<i>Idh-1</i>	9,3	8	0,3178
<i>G6pd</i>	15,3	10	0,1211
<i>Sod-1</i>	15,1	12	0,2336
<i>Pgd-1</i>	85,9	12	0,0000
<i>Got-1</i>	22,9	12	0,0283
<i>Es-3</i>	54,2	12	0,0000

Tableau 4 : Test de l'équilibre de Hardy-Weinberg par locus
chez *Mauremys leprosa*

	Chi2	ddl	P
ABID	42,7	16	0,0003
BOUFICHA	54,6	14	0,0000
SILIANA	31,9	12	0,0014
JLEF	23,5	14	0,0532
LAKARIT	14,8	10	0,1391
ZERKINE	50	14	0,0000
Total	217,5	56	High. sign.

Tableau 5 : Test de l'équilibre de Hardy-Weinberg par population
chez *Mauremys leprosa*

II.2. Les paramètres de la variabilité génétique (H, P et A)

Une estimation directe de la variabilité génétique est donnée par les taux de polymorphisme (P), d'hétérozygotie moyenne (H) et le nombre moyen d'allèles par locus (A) pour chaque population.

II.2.1 *Maremys leprosa*

Le nombre moyen d'allèles est similaire entre les six populations, il varie de 1,4 à 1,6 (tableau 6). Le nombre moyen le plus faible a été enregistré chez la population de oued Lakarit, et le plus élevé chez les deux populations de oued Bouficha et oued Jlef. De même, le taux de polymorphisme est assez élevé et avoisine les 50% chez toutes les populations, à l'exception de la population de oued Lakarit où le taux de polymorphisme est relativement faible (P=33%). Le taux d'hétérozygotie moyenne est variable entre les six populations, il atteint une valeur maximale de 0,21 chez la population de oued Jlef et il est réduit de presque de moitié chez la population de oued Lakarit (H=0,11). Les quatre autres populations montrent des valeurs similaires de 0,15 en moyenne (tableau 6).

II.2.2 *Caretta caretta*

Dans les quatre nids étudiés, les taux de polymorphisme ainsi que le nombre moyen d'allèles par locus sont presque identiques et sont respectivement, en moyenne de 0,21 et 1,3. Le taux d'hétérozygotie moyenne est cependant, assez faible et varie de 0,019 dans le nid 2 de la saison 2002 à 0,088 dans le nid 1 de la saison 2003 (tableau 7).

	Hexp.	Hobs.	P (0,95)	A
ABID	0,176	0,155	0,53	1,53
BOUFICHA	0,189	0,164	0,57	1,60
SILIANA	0,196	0,155	0,47	1,53
JLEF	0,234	0,211	0,47	1,60
LAKARIT	0,147	0,111	0,33	1,40
ZERKINE	0,209	0,142	0,47	1,53

Tableau 6 : Taux d'hétérozygotie moyenne (H, observée et attendue), de polymorphisme (P) et nombre moyen d'allèles par locus (A) chez les différentes populations de *Mauremys leprosa*

	H exp.	H	P (0,95)	A
1_2002	0,115	0,038	0,29	1,35
2_2002	0,127	0,019	0,29	1,35
1_2003	0,135	0,088	0,29	1,35
2_2003	0,103	0,069	0,23	1,23

Tableau 7 : Taux d'hétérozygotie moyenne (H, observée et attendue), de polymorphisme (P) et nombre moyen d'allèles par locus (A) chez les quatre nids de *Caretta caretta*

III.3. Variabilité génétique intrapopulationnelle

Dans ce paragraphe nous étudions la variabilité génétique à l'intérieur des populations de la même espèce. En d'autres termes, nous cherchons en premier lieu à savoir s'il existe une structuration génétique particulière des différentes populations de *Mauremys leprosa* en relation avec leur origine géographique. Ceci permettra aussi de savoir si les individus des différentes populations appartiennent à une même espèce ou à des espèces différentes. En deuxième lieu, cette étude intraspécifique permettra de comparer les populations de *Caretta caretta* de la saison 2002 entre elles et entre les populations de la saison 2003 et de savoir s'il s'agit de la même femelle nidifiante pendant les deux saisons puisqu'il est connu que la femelle est fidèle à son site de ponte.

III.3.1. *Mauremys leprosa*

Six populations de *Mauremys leprosa* d'origines différentes sont analysées au cours de cette étude. Elles proviennent des oueds du Nord de la Tunisie (Abid et Bouficha), du Centre (Jlef et Siliana) et du Sud (Lakarit et Zerkine).

Sur les 15 loci analysés, huit se sont révélés polymorphes au moins chez une population : *Idh-1*, *G6pd-1*, *Pgd-1*, *Gpi-1*, *Got-1*, *Es-3*, *Mdh-1* et *Sod-1*.

- **Population de Oued Abid**

Cette population est composée de 15 individus. Huit loci se sont révélés polymorphes : *Idh-1*, *G6pd-1*, *Pgd-1*, *Gpi-1*, *Got-1*, *Es-3*, *Mdh-1* et *Sod-1*.

Au niveau du locus *Pgd-1*, deux allèles seulement sont présents : $Pgd-1^{90}$ et $Pgd-1^{100}$. Le troisième allèle $Pgd-1^{110}$ est absent.

Deux allèles seulement au niveau du locus *Got-1* sont présents : $Got-1^{80}$ et $Got-1^{100}$. Le troisième allèle $Got-1^{90}$ est absent.

Au niveau du locus *Es-3*, deux allèles seulement sont présents : $ES-3^{90}$ et $ES-3^{100}$. Ce dernier est un allèle rare. Le troisième allèle $ES-3^{80}$ est absent.

Au niveau du locus *Gpi-1*, on note l'apparition d'un nouvel allèle $Gpi-1^{120}$ qui n'est présent que chez cette population. Sa fréquence est faible par rapport à l'autre allèle $Gpi-1^{110}$ (tableau 2).

- **Population de Oued Bouficha**

Cette population est représentée par 15 individus. Sept loci se sont révélés polymorphes : *Idh-1*, *G6pd-1*, *Pgd-1*, *Got-1*, *Es-3*, *Mdh-1* et *Sod-1*.

Au locus *Got-1*, on note la présence de deux allèles seulement : $Got-1^{80}$ et $Got-1^{100}$. Le troisième allèle $Got-1^{90}$ est absent.

- **Population de Oued Siliana**

Neuf individus constituent cette population. Sept loci se sont révélés polymorphes : *Idh-1*, *G6pd-1*, *Pgd-1*, *Got-1*, *Es-3*, *Mdh-1* et *Sod-1*.

Au niveau du locus *Pgd-1*, on note l'absence de l'allèle $Pgd-1^{90}$. Les deux autres allèles $Pgd-1^{100}$ et $Pgd-1^{110}$ sont présents avec une majorité du dernier allèle.

Au niveau du locus *Got-1*, l'allèle $Got-1^{90}$ est absent. Les deux autres allèles $Got-1^{80}$ et $Got-1^{100}$ sont présents avec des fréquences égales.

- **Population de Oued Jlef**

Six individus constituent cette population. Sept loci se sont révélés polymorphes : *Idh-1*, *G6pd-1*, *Pgd-1*, *Got-1*, *Es-3*, *Mdh-1* et *Sod-1*.

Au niveau du locus *Pgd-1*, l'allèle $Pgd-1^{90}$ est absent. Les deux autres allèles $Pgd-1^{100}$ et $Pgd-1^{110}$ sont présents à fréquences égales.

- **population de Oued Lakarit**

Six individus représentent cette population. Cinq loci se sont révélés polymorphes : *Pgd-1*, *Got-1*, *Es-3*, *Mdh-1* et *Sod-1*.

Au niveau du locus *Es-3*, on note la présence de deux allèles seulement : $Es-3^{80}$ et $Es-3^{100}$. Ce dernier est majoritaire par rapport au premier. Le troisième allèle $Es-3^{90}$ est absent.

- **Population de Oued Zerkine**

Cette population est constituée de 14 individus. Sept loci se sont révélés polymorphes : *Idh-1*, *G6pd-1*, *Pgd-1*, *Got-1*, *Es-3*, *Mdh-1* et *Sod-1*.

Au niveau du locus *Pgd-1*, l'allèle $Pgd-1^{110}$ est absent. Les deux autres allèles $Pgd-1^{90}$ et $Pgd-1^{100}$ sont présents avec le second allèle qui est majoritaire.

Pour le locus *Es-3*, deux allèles seulement sont présents : $Es-3^{90}$ et $Es-3^{100}$. Ce dernier est majoritaire par rapport au premier. Cependant, le troisième allèle $Es-3^{80}$ est absent.

III.3.2. *Caretta caretta*

Quatre nids de tortues marines de l'espèce *Caretta caretta* ont été étudiés. Les individus sont tous des nouveau-nés. Les deux premières populations proviennent de deux nids différents déposés en été 2002. Les deux autres populations qui proviennent de deux nids différents appartiennent à la saison 2003.

Sur les 17 loci étudiés, sept se sont révélés polymorphes au moins chez une population : *Idh-1*, *G6pd-1*, *Sdh-1*, *Pgd-1*, *Got-1*, *Es-3* et *Mdh-1*.

Les loci *Mod-1*, *Mdh-2*, *Idh-2*, *Pgd-2*, *Gpi-1*, *Pgm-1*, *Sod-1*, *Ldh-1*, *Ldh-2* et *Got-2* sont monomorphes chez toutes les populations.

Une légère différence de la structure génétique des populations est observée suite à la présence d'allèles de plus ou de moins au niveau des loci polymorphes.

- **Population 1-2002 :**

C'est une population de 14 nouveaux-nés appartenant au premier nid de la saison 2002. Six loci se sont révélés polymorphes : *Idh-1*, *G6pd-1*, *Pgd-1*, *Got-1*, *Es-3* et *Mdh-1*.

Au niveau des loci *Mdh-1* et *Sdh-1*, seulement les allèles 100 de ces loci sont présents.

- **Population 2-2002 :**

Cette population est composée de 25 nouveaux-nés appartenant au deuxième nid de la saison 2002. Six loci se sont révélés polymorphes : *Idh-1*, *G6pd-1*, *Pgd-1*, *Got-1*, *Es-3* et *Mdh-1*.

Comme pour la population précédente, au niveau des loci *Mdh-1* et *Sdh-1*, seulement les allèles 100 de ces loci sont présents.

- **Population 1-2003**

Douze individus composent cette population. Ce sont des nouveaux-nés appartenant à la saison 2003. Cinq loci se sont révélés polymorphes : *Idh-1*, *Sdh-1*, *Got-1*, *Es-3* et *Mdh-1*.

Au locus *G6pd-1*, l'allèle $G6pd-1^{90}$ est absent, seulement l'allèle $G6pd-1^{100}$ est présent.

Les loci *Mdh-1* et *Sdh-1* possèdent deux allèles 100 et 120 équifréquents.

- **Population 2-2003**

Cette population est constituée de 12 nouveaux-nés provenant du deuxième nid de la saison 2003. Quatre loci se sont révélés polymorphes : *Sdh-1*, *Got-1*, *Es-3*, et *Mdh-1*.

Les loci *Mdh-1* et *Sdh-1* possèdent deux allèles 100 et 120 équifréquents.

Et enfin au niveau du locus *Es-3*, l'allèle $Es-3^{120}$ est absent. Les deux autres allèles $Es-3^{100}$ et $Es-3^{110}$ sont présents avec le premier allèle qui est majoritaire.

III. DISTANCES GENETIQUES ET ARBRE PHYLOGENETIQUE

Les distances génétiques ont été calculées à partir des fréquences alléliques au loci étudiés selon l'indice de Nei (1978) qui prend en considération les effectifs faibles. Les matrices des distances génétiques pour les populations des tortues d'eau douce (*M. leprosa*) et les populations de tortues marines (*C. caretta*) sont présentées respectivement dans les tableaux 8 et 9.

III-1 *Mauremys leprosa*

Les distances génétiques sont relativement faibles et globalement homogènes entre les différentes populations. La distance génétique la plus élevée ($D=0,158$) a été enregistrée entre la population de oued Abid (Nord) et celle de oued Lakarit (Sud) et la distance la plus faible ($D=0,001$) entre les deux populations du Centre (oued Siliana et oued Jlef). De même, la distance génétique entre les deux populations du Sud (oued Lakarit et oued Zerkine) sont relativement faibles ($D=0,014$).

La structuration géographique de ces populations est bien illustrée dans le phénogramme UPGMA établi à partir de la matrice des distances génétiques. En effet, la population du Cap Bon de oued Abid ressort sur une branche à part et les cinq populations restantes sont regroupées sur une deuxième branche principale. Sur cette dernière branche, les deux populations du Sud (oued Lakarit et oued Zerkine) sont regroupées sur une même sous-branche, de même pour les deux populations du centre (oued Siliana et oued Jlef). La population de oued Bouficha ressort sur une troisième sous-branche et elle est plus proche des populations du centre que de celles du Sud (figure 4).

III.2. *Caretta caretta*

Les distances génétiques entre les quatre nids sont très faibles ($0,07 \leq D \leq 0,103$) indiquant une certaine homogénéité génétique des quatre nids. Les distances génétiques les plus faibles ont été enregistrées entre les nids de la même saison. En effet, D est égale à 0,007 entre les deux nids de la saison 2002 et elle est de l'ordre de 0,031 entre ceux de la saison 2003. Les distances entre les nids de saisons différentes sont relativement plus élevées.

	ABID	BOUFICHA	SILIANA	JLEF	LAKARIT	ZERKINE
ABID	*					
BOUFICHA	0,045	*				
SILIANA	0,085	0,030	*			
JLEF	0,098	0,032	0,001	*		
LAKARIT	0,158	0,061	0,094	0,065	*	
ZERKINE	0,096	0,022	0,018	0,018	0,014	*

Tableau 8 : Matrice des distances génétiques des populations de *Mauremys leprosa* (Nei 1978)

	1_2002	2_2002	1_2003	2_2003
1_2002	*			
2_2002	0,007	*		
1_2003	0,046	0,055	*	
2_2003	0,077	0,103	0,031	*

Tableau 9 : Matrice des distances génétiques des populations de *Caretta caretta* (Nei 1978)

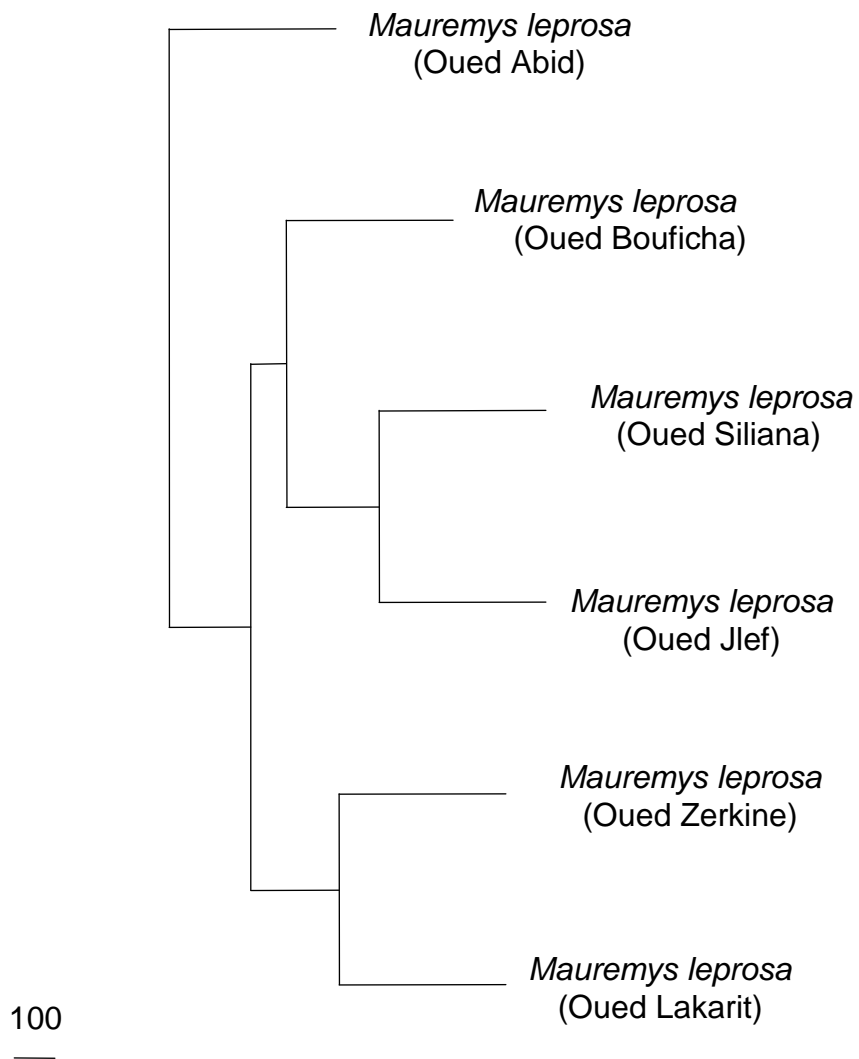


Figure 4 : Arbre phylogénétique UPGMA

**DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES**

Les résultats préliminaires de notre étude nous ont permis, dans un premier temps, de caractériser génétiquement et pour la première fois, les différentes populations de tortue d'eau douce de l'espèce *Mauremys leprosa* dans les eaux tunisiennes et de discuter d'une éventuelle structuration géographique de ces populations. Dans un deuxième temps, les données génétiques récoltées sur quatre nids de tortue marine de l'espèce *Caretta caretta* constitue une première dans les études de cette espèce en Tunisie et nous ont permis d'estimer la variabilité génétique au sein de la population naturelle et de comprendre certains aspects de la biologie de reproduction.

I. Variabilité génétique et structuration géographique de *Mauremys leprosa*

L'aire de répartition de l'espèce *Mauremys leprosa* en Tunisie est vaste. Elle s'étend en effet, de l'extrême Nord jusqu'au Sud (Tataouine) (Noiura, 1996). Dans ce travail préliminaire, six populations ont été étudiées et représentent les régions du Nord, du Centre et du Sud du pays. L'examen du tableau des fréquences alléliques aux 15 loci analysés révèle, globalement, un niveau de variabilité génétique assez élevé et des différences peu significatives entre les six populations. Fort probablement, ces populations appartiennent à la même espèce, dans la mesure où aucun locus diagnostique n'a été retrouvé et les différences, qui sont dues à l'absence de certains allèles à certains loci chez quelques populations par rapport aux autres, ou à des inversions de fréquences alléliques de certains loci entre certaines populations, suggèrent un niveau de divergence génétique relativement faible.

Par ailleurs, les taux d'hétérozygotie moyenne et de polymorphisme calculés ($0,11 \leq H \leq 0,21$; $0,33 \leq P \leq 0,57$) sont assez élevés et témoignent d'une importante variabilité génétique au sein de cette espèce en comparaison à d'autres de la même classe. En effet, dans une étude récente sur différentes populations de lézard (*Sceloporus undulatus*), Miles et al. (2002) relèvent des taux d'hétérozygotie et de polymorphisme qui varient, respectivement de 0,008 à 0,129 et de 0,04 à 0,33.

Il est documenté chez plusieurs organismes que le taux d'hétérozygotie est un bon indicateur de la taille des populations naturelles (Gyllensten, 1985). Par conséquent, les taux d'hétérozygotie élevés calculés au cours du présent travail témoigneraient de

l'importance de la taille des populations des tortues d'eau douce de l'espèce *Mauremys leprosa* en Tunisie.

L'arbre phylogénétique, établi à partir de la matrice des distances génétiques entre les six populations, révèle une certaine concordance entre la répartition géographique et le niveau de divergence génétique. Cet arbre montre deux branches principales, la première est caractérisée par la population la plus au Nord (oued Abid) et la deuxième regroupe le reste des populations. Dans cette deuxième branche, les deux populations du Sud (oued Lakarit et oued Zerkine) se groupent ensemble et constituent une première sous-branche. Les deux populations du Centre (oued Siliana et oued Jlef) définissent une deuxième sous-branche, alors que la population de oued Bouficha, plus au Nord par rapport aux deux dernières populations, ressort sur une troisième sous-branche et elle est génétiquement plus proche de celles-ci.

Les particularités géographiques et topographiques des différents sites de capture pourraient expliquer en partie cette structuration géographique de la variabilité génétique. En effet, la population de oued Abid, relativement, la plus éloignée génétiquement du reste des populations provient d'un petit oued isolé des autres, alimenté essentiellement par des sources montagneuses chaudes et déversants dans le golf de Tunis. Théoriquement, nous nous attendons à ce que cet isolement géographique aboutisse à une nette divergence génétique ce qui n'est pas le cas. Il est probable que ce petit oued soit colonisé récemment par quelques fondateurs à partir d'une même population ancestrale à toutes les populations étudiées, et que cette population (oued Abid) n'a pas eu suffisamment du temps pour diverger. Cependant, les observations directes des individus capturés à oued Abid révèlent des particularités morphologiques frappantes. Ces tortues présentent une carapace rugueuse et de couleur plus foncée que les autres populations.

Ces caractéristiques morphologiques semblent à première vue résulter d'une adaptation vis-à-vis des conditions de leur environnement direct (eau peu profonde dans une zone rocheuse) et suggèrent une différenciation génétique préalable à cette adaptation. Il est donc indispensable d'envisager une étude morphologique comparative et d'élargir le crible à d'autres loci et/ou à d'autres marqueurs génétiques (ADN mt, microsatellites) avant de nous prononcer.

Quant aux populations du Sud ainsi que celles du Centre, la faible divergence génétique entre les populations de la même région pourrait s'expliquer par un flux génétique continu facilité par des déplacements aquatiques et/ou terrestres (Servan, 1987 ; Jablonsky, 1998). Il est par ailleurs difficile d'admettre la migration active comme

processus permettant d'expliquer l'homogénéité génétique de l'ensemble des populations des différentes régions, vu les faibles mouvements migratoires de cette espèce (Jablonsky, 1998). Encore moins, la migration passive consécutive à une introduction par l'homme, ne pourrait pas expliquer cette homogénéité génétique, vu le très faible intérêt que porte les populations locales à cette espèce, contrairement à d'autres espèces de reptiles telles que le caméléon fort utilisé de nos jours dans des pratiques de sorcellerie et autres.

Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par Girondot et *al.* (1994) sur des tortues d'eau douce de l'espèce *Emys orbicularis* de la région de Brenne de France où différentes populations appartenant à des cours d'eau isolés constitue une seule et même population.

Il est donc probable que des mouvements de grande envergure, suite à des inondations importantes, auraient contribué à homogénéiser ces populations déjà installées sur place ou bien, éventuellement, on pourrait penser à des événements récents de fondations multiples à partir d'une même population. Cette deuxième éventualité est peu probable dans la mesure où un effet fondateur est généralement accompagné d'une baisse considérable de la variabilité génétique.

Il est à remarquer qu'à l'exception de la population de oued Lakarit, toutes les populations montrent une déviation significative par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Ceci serait probablement dû à un mélange d'unités panmictiques différentes. L'éventualité d'une sélection de ces tortues est peu probable dans la mesure où on ne connaît pas de prédateur spécifique de cette espèce et en raison de sa forte capacité à résister aux variations de l'environnement. En effet, ces tortues peuvent coloniser des eaux douces ou saumâtres pérennes ou temporaires et s'adapter aux variations du niveau de l'eau et à l'assèchement du milieu (Naulleau, 1991).

Notons par ailleurs que la seule population en équilibre panmictique est celle de oued Lakarit qui a été échantillonnée dans une superficie d'environ 400 m² contrairement aux autres capturées dans des zones de plus de 50000 m². Il est clair que ces dernières populations pourraient regrouper des unités panmictiques différentes. Toutefois, ceci soulève des questions quant au mode de reproduction et de l'organisation sociale de cette espèce qui mérite d'être élucidées dans les travaux à venir.

II. Variabilité génétique des populations de *Caretta caretta*

L'examen des génotypes des jeunes tortues des quatre nids aux loci polymorphes révèle une information de grande importance. En effet, au locus *Es-3*, trois allèles ont été révélés dans trois nids et la composition génotypique de la même descendance ne correspond pas à une ségrégation Mendélienne ce qui argumente fortement l'hypothèse d'une paternité multiple. Ce phénomène semble être très fréquent chez les tortues de cette espèce dans la mesure où trois parmi les quatre nids proviennent d'au moins deux pères génétiquement différents ; il n'est pas exclu qu'il soit réellement plus fréquent car cette technique ne nous permet pas de déceler une paternité multiple dans le cas où une femelle est fécondée par plus d'un mâle présentant les mêmes allèles. Il est donc indispensable dans les prochaines études d'élargir notre échantillon et de recourir à d'autres marqueurs plus performants tels que les microsatellites.

A priori, l'incidence de ce phénomène chez les tortues tunisiennes semble plus forte que chez celles des autres régions du monde. En effet, l'analyse allozymique de plusieurs nids de tortue *Caretta caretta* en Australie, montre une paternité multiple dans 33% des nids (Harry et Briscoe, 1988). De plus, une étude plus récente dans la même région montre une incidence similaire de ce phénomène (31%) en utilisant des microsatellites comme marqueurs (Moore, 2000). Par ailleurs, la paternité multiple semble ne pas être la règle chez d'autres espèces de tortues marines telles que *Chelonia mydas* ou *Dermochelys coriacea* où le phénomène a une très faible incidence (FitzSimmons, 1998 ; Dutton, 1998 ; Crim et al., 2000).

Le comportement lors de la reproduction est très peu étudié chez la caouanne par rapport à la tortue verte (*Chelonia mydas*) et les données disponibles sont très fragmentaires et pourraient ne pas être généralisées. Des chercheurs et quelques pêcheurs ont signalé des regroupements de plusieurs mâles et femelles de caouanne similaires à ceux décrits chez la tortue verte (Limpus et al., 1984). Limpus, (1985) a signalé des regroupements de caouanne en Australie et indique que ça ne serait pas la règle. De même, des observations récentes sur le terrain au Sud-est des Etats-Unis rapportent uniquement des regroupements par couple chez cette même espèce (Frick et al., 2000). Même si toutes ces observations se rejoignent pour supporter l'hypothèse d'une paternité simple, ceci ne serait pas généralisé dans la mesure où le comportement lors de la reproduction pourrait être influencé par les particularités environnementales de chaque région.

En effet, dans le cas des tortues d'Australie, l'agrégation des mâles et la compétition vis-à-vis des femelles seraient réduites à cause d'un très fort décalage du sex-ratio en faveur des femelles (93%) (Mrosovsky et Provancha, 1989).

Aucune donnée sur des observations directes des tortues marines de Tunisie n'est disponible, mais grâce à la présente étude nous apportons la preuve d'une paternité multiple.

Toutefois, des observations sur le terrain sont indispensables pour mieux comprendre le comportement de ces tortues. Les conséquences des accouplements répétés de la même femelle s'avèrent d'une grande importance pour la diversité et la pérennité de l'espèce. Etant donné l'investissement énergétique énorme des tortues marines dans la production des œufs, les accouplements multiples assurent un meilleur rendement en évitant la consanguinité (Madsen et al., 1992 ; Stockley et al., 1993) et une éventuelle incompatibilité génétique (Zeh et Zeh, 1996 ; Newcomer et Zeh, 1999 ; Vala et al., 2000) , en permettant la fertilisation des ovocytes par les spermatozoïdes les plus compétitifs et en augmentant la diversité génétique de la descendance (Smith, 1984 ; Watson, 1991 ; Madsen et al., 1992 ; Baer et Schmid-Hempel, 1999).

Au cours du présent travail, un total de 17 loci ont été analysés, dont 7 se sont révélés polymorphes avec deux allèles à chacun des six loci et trois au locus *Es-3*. Les taux d'hétérozygotie moyenne et de polymorphisme calculés montrent des valeurs assez élevées ($0,088 \leq H \leq 0,19$ et $P=0,2$) témoignant d'une variabilité génétique assez appréciable.

Contrairement à notre étude, Bonhomme et al. (1987) ont rapporté une variabilité génétique nettement plus faible ($0 \leq H \leq 0,04$ et $0 \leq P \leq 0,09$) chez des populations des tortues vertes (*Chelonia mydas*) provenant des océans Atlantiques, Indien et Pacifique.

Nos résultats ne seraient en fait qu'une sous-estimation de la diversité génétique au sein de la ou des population(s) naturelle(s) car même en considérant la paternité multiple, les échantillons analysés ne sont que des descendants d'un maximum de six ou sept adultes (voir discussion plus haut).

En théorie, une bonne mesure de la variabilité ne nécessite pas un effectif élevé d'individus mais plutôt un grand nombre de loci. Toutefois, il s'agit dans notre cas d'une analyse de jeunes individus qui seront soumis à la sélection et que personne ne peut prévoir ni leur devenir ni leur contribution à l'effort de reproduction au sein de la population lors des générations suivantes, donc dans ce cas, il faut être prudent quant à la variabilité génétique réelle et la taille efficace de la population naturelle.

Dans les prochains travaux, il serait intéressant d'accéder à la population naturelle pour mieux mesurer la diversité génétique de cette espèce et évaluer son niveau de structuration. En effet, en Atlantique sur les côtes Est de l'Amérique, une analyse de l'ADNmt des tortues de l'espèce *Caretta caretta* révèle une nette structuration géographique même chez des populations de régions rapprochées, comme dans le cas des tortues de la Floride, où quatre populations significativement différenciées ont été recensées (Encalada et al. 1998). Une étude similaire a montré également une structuration géographique de tortue verte *Chelonia mydas* en Atlantique et en Méditerranée (Encalada et al. 1996).

Il apparaît donc indispensable d'analyser des échantillons des tortues adultes de différentes localités de la Méditerranée et d'autres mers à fin de déterminer le niveau d'isolement des populations géographiquement séparées, ce qui contribue à définir un plan de protection adéquat de cette espèce.

A présent, nous ne pouvons trancher sur une éventuelle structuration de la population tunisienne, mais il est certain que celle-ci présente une bonne diversité génétique témoignant de l'importance de son effectif efficace.

Par ailleurs, nous avons comparé la variabilité génétique entre les quatre nids. Les distances génétiques, calculées à partir des fréquences alléliques, montrent une certaine homogénéité des pontes de la même saison et une identité génétique relativement élevée entre les quatre nids. En effet, les distances génétiques entre les nids de la même saison sont de 0,007 pour la saison 2002 et de 0,031 pour la saison 2003. Les distances, enregistrées entre les nids de saisons différentes, varient de 0,046 à 0,103. Ceci suggère que les nids de la même saison ont été déposés par la même femelle et qu'il ne s'agit probablement pas de la même femelle lors des deux saisons. Il est en effet documenté d'après les observations directes sur les îles Kuriat, qu'une seule femelle peut pondre plusieurs fois par saison avec un intervalle de deux semaines entre deux pontes (Bradai, 2000 ; Jribi, 2003). De plus, selon les mêmes auteurs, la même femelle reviendrait tous les deux ou trois ans pour pondre.

En conclusion, cette étude du polymorphisme génétique effectuée sur des populations de tortue marine *Caretta caretta* et de tortue d'eau douce *Mauremys leprosa*, a permis de fournir des résultats préliminaires quant à la variabilité génétique de ces espèces qui vivent et se reproduisent en Tunisie. Ainsi, grâce à l'outil génétique, cette étude a permis une meilleure connaissance du fonctionnement global des populations de ces deux espèces.

Dans le but d'une meilleure connaissance des différents facteurs menaçant la survie de ces espèces, et afin d'orienter les actions de conservation les plus rentables possibles, il serait intéressant de confirmer ces résultats et de continuer cette étude. Dans cette optique, un nombre plus élevé de systèmes enzymatiques ainsi que d'autres marqueurs génétiques (ADN mt et microsatellites) seront étudiés. D'autre part, une comparaison de tortues tunisiennes avec celles des autres pays permettra d'évaluer leur variabilité génétique et leur structuration spatiale qui sont toutes les deux des éléments de très grande valeur pour leur conservation (Lande, 1988 ; Templeton, 1991).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Arvy, C. & Servan J.** (1998). Imminent competition between *Trachemys scripta* and *Emys orbicularis* in France. . In *Fritz, U. et al. (Eds.). Proceedings of the EMYS Symposium, Dresden 96, Mertensiella, Rheinbach.* **10**: 33-40
- 2- **Ashlock, P. D.** (1972). Monophyly again. *Syst. Zool.* **21**: 430-438.
- 3- **Baer & Schmid-Hempel P** (1999). Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. *Nature.* **397**: 151-154.
- 4- **Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhli, L., Bonhomme, F.** (2001). GENETIX 4.02, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- 5- **Bickham, WJ.** (1981). Two-hundred-million-year-old- chromosomes : deceleration of the rate of karyotypic evolution in turtles. *Science.* **212** : 1291-1293.
- 6- **Bickham, WJ.** (1984). Patterns and modes of chromosomal evolution in reptiles. In : « *Chromosomes in evolution of eukaryotic groups* » 2, *Sharma et Sharma ed. Crc Press, Boca Raton, Florida.*
- 7- **Bickham, WJ., Bjorndal, KA., Haiduk, MW. & Rainey, WE.** (1980). The karyotype and chromosomal banding patterns of the green turtle (*Chelonia mydas*). *Copeia.* **3** : 540-543.
- 8- **Bickham, WJ. & Carr, J.** (1983). Taxonomy and phylogeny of higher categories of cryptodiran turtles based on cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia.* **4** : 918-932
- 9- **Blanc, Ch. P.,** (1978). Notes sur les reptiles de Tunisie : III. Distribution et perspectives de protection des tortues terrestres et dulçaquicoles. *Archs. Inst. Pasteur, Tunis.* **55 (1-2)** : 51-66.
- 10- **Bollmer, JL., Irwin, ME., Reider, JP., & Parker, PG.** (1999). Multiple paternity in Loggerhead turtle clutches. *Copeia.* 475-478.
- 11- **Bonhomme, F., Salvidio, S., Le Beau, A. , & Pasteur, G.** (1987). Comparaison génétique des tortues vertes (*Chelonia mydas*) des océans atlantique, Indien et Pacifique: Une illustration de la théorie mullerienne classique de la structure génétique des populations . *Genetica* **74** : 89-94.
- 12- **Bons, J. & Girot, B.** (1962). Clé illustrée des Reptiles du Maroc. *Trav. Inst. Sci. Chérifien, (Zool.).* **26** : 1-62
- 13- **Bour, R.** (1989). *Mauremys leprosa*. In J. CASTANET & R. GUYETANT (Eds.) : *Atlas de répartition des Amphibiens et Reptiles de France.* Société Herpétologique de France, Paris. P.109.
- 14- **Bowen, B., Avise, JC. , Richardson, JL. , Meylan, AB. , Margaritoulis, D. & Hopkins-Murphy, S.** (1993). Population structure of the loggerhead turtle *Caretta caretta* in the northwest Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Cons.Biol.* **37 (4)** : 834-844.

- 15- **Bozhansky, AT. & Orlova, VF.** (1998). Conservation status of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758), in European Russia. *Proceedings of EMYS Symposium, Dresden 96, Mertensiella, Rheinbach*, **10** : 41-46.
- 16- **Bradai, MN.** (1993). La nidification de la Tortue marine *Caretta caretta* dans le Sud-Est de la Tunisie. *Contrat RAC/SPA-Association de la Protection de la Nature et de l'Environnement à Sfax (APNES)* : 22 pp., 27 photos.
- 17- **Bradai, M.N.** (1996). La nidification de la tortue marine *Caretta caretta* aux îles Kuriat. Deuxièmes journées des sciences de la mer (Sousse, 16-18 Décembre 1996). *Bull. Inst.Natn. Scien. Tech. Mer*, NS **3** : 68 – 71.
- 18- **Bradai, M.N.** (2000). Les tortues marines en Tunisie. Etat de connaissances et recommandations de conservation. *Deuxième thèse. Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences Naturelles Univ. Sfax, Fac. Sci. Sfax* : 47 pp.
- 19- **Bradai, M.N. & Jribi, I.** (1997). Les îles Kuriat : nidification de la tortue marine *Caretta caretta* & faune et flore marines. *Convention ANPE - CAR/ASP – INSTM (1997)* : 69 pp.
- 20- **Bradai, M.N. & Jribi, I.** (1998). Suivi de la nidification de la tortue marine *Caretta caretta* aux îles Kuriat. *Convention APAL – CAR/ASP – INSTM (1998)* : 10 pp.
- 21- **Bradai, M.N. & El Abed, A.** (1998). Présence de la tortue luth *Dermochelys coriacea* dans dans les eaux tunisiennes. *Rapp. Comm. int. Mer Medit.* 35
- 22- **Bradai, M.N. & Jribi, I.** (1999). Suivi de la nidification de la tortue marine *Caretta caretta* aux îles Kuriat. *Convention APAL – CAR/ASP – INSTM (1999)* : 9 pp., 4 Pl.
- 23- **Broderick, A.C. & B.J. Goldey** (1996). Population and nesting ecology of the green turtle, *Chelonia mydas*, and the loggerhead turtle, *Caretta caretta*, in northern Cyprus. *Zoology in the Middle East*. **13** : 27-46
- 24- **Cagle, F.R.** (1950). The life history of the slider turtle, *Pseudemys scripta troostii* (Hoolbrook). *Ecol.monographs*. **20**: 31-54.
- 25- **Cheylan, M. & Poitevin, F.** (1998). Impact of fire on a population of European pond turtle (*Emys orbicularis*) in the south-eastern France. *In Fritz, U. et al. (Eds.). Proceedings of EMYS Symposium, Dresden 96, Mertensiella, Rheinbach*. **10**: 67-82.
- 26- **Crim JL., Spotila JR., Reina L., Williams C. & Paladino FV.** (2000). Use of single locus polymorphic markers to elucidate multiple paternity in the endangered leatherback sea turtle. *20th Annual Sea Turtle Symposium*

- 27- Dermetropoulos, A. & Hadjichristophorou, M.** (1995). Manuel on marine turtle conservation in the Mediteranean. UNEP (MAP) SPA/IUCN/CWS/ fisheries department, MANRE (Cyprus): 63p ,24 plates.
- 28- Dodd, CK.** (1988). Synopsis of the biological data on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758). *U.S. Fish wildl. Serv., Biol. Rep.*, **88 (14)** : 110 pp.
- 29- Dutton P.** (1998). Tendency toward single paternity in leatherbacks detected with microsatellites. *Proceedings of the 18th International Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*
- 30- Encalada SE, Lahans PN, Bjorndal KA, Bolten AB, Miyamoto MM, & Bowen BW.** (1996). Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Che/onia mydas*: A mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Mo/ecu/ar Ecology*. **5**: 473-483.
- 31- Encalada SE, Bjorndal KA., Bolten AB., Zurita JC., Schroeder B., Possardt E., Sears CJ. & Bowen BW.** (1998). Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Marine Biology*. **130**: 567-575
- 32- Ernest, C.H.** (1990). Systematics, taxonomy, variation and geographic distribution of the slider turtle. *In : Gibbons, J. W. (ed.), Life history and ecology of the slider turtle. Washington* (Smithsonian Institution Press). 57-67.
- 33- Farris, S. D.** (1981). Distance data in phylogenetic analysis. In advances in cladistics (ed. Funk, V. A. & Brooks, D. R.), *Proc. First meeting Willi Henning Soc. N. Y.*, 3-23.
- 34- FitzSimmons, NN.** (1996). Use of microsatellite loci to investigate multiple paternity in marine turtles, pp 69-78 in :Bowen, Bowen, BW. And WN. Witzell (Eds.) 1996 « Proceedings of the international symposium on sea turtle conservation genetics » *NOAA technical Memorandum NMFS-SEFSC-396*. 173pp.
- 35- FitzSimmons NN.** (1998). Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology*. **7**: 575-584.
- 36- Frick MG., Slay CK., Quinn CA., Windham-Reid A., Duley PA., Ryder CM. & Morse LJ.** (2000). Aerial observations of courtship behavior in loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) from southeastern Georgia and northeastern Florida. *Journal of Herpetology*. **34**: 153-158.
- 37- Frisenda, S. & Ballasina, D.** (1990) . Le statut des Cheloniens terrestres et d'eau douce en Italie. *Bull. Soc. Herpetol. FR., Paris*, **53** : 18-23.
- 38- Fritz, U.** (1993). Zur innerartlichen Variabilitat von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 3. Zwei neue Unterarten von der Iberischen Halbinsel und aus Nordafrika, *Emys orbicularis fritzuejuergerbnoisti* subsp. nov. und *E.o. occidentalis* subsp. nov. (Reptilia, Testudines: Emydidae). *Zool. Abhandlungen*, **47**: 131-155.

- 39- Fritz, U.** (1995). Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 5a. Taxonomie in Mittel-Westeuropa, auf Korsika, Sardinien, der Apenninen-Halbinsel und Sizilien und Unterartengruppen von *E. orbicularis* (Reptilia: Testudines: Emydidae). *Zool.Abh.Mus.Tierkd. Dresden*, **48 (13)** : 185-241.
- 40- Fritz, U.** (1998). Introduction to zoogeography and subspecific differentiation in *Emys orbicularis* : (Linnaeus, 1758). In : *Fritz, U. et al. (ed.) : Proceedings of the EMYS Symposium, Dresden 96, Mertensiella, Rheinbach*, **10** : 1-27.
- 41- Girondot, M., Zaborsky, P.J., Servan, J., & Pieau, C.** (1994). Genetic contribution to sex determination in turtles environmental sex determination. *Genet. RES. Cam.* **63** : 117-127.
- 42- Gray.**(1870). Description of *Mauremys laniara*, a new freshwater tortoise. *Proc. Zool. Soc.* **37** : 499-500.
- 43- Gyllensten U.** (1985). The genetic structure of fish: Differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous and freshwater species. *J. Fish Biol.* **26**: 691.
- 44- Harry, J.L. & Briscoe, D.A.** (1988). Multiple paternity in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Journal of Heredity.* **79** : 96-99.
- 45- Jablonsky, A. & Jablonska, S.** (1998). Egg-laying in the European pond turtle, *Emys orbicularis* (L.), in Leczynsko-Wlodawskie Lake District (East Poland). In: *Fritz, U. et al. (Eds.). Proceedings of the EMYS Symposium, Dresden 96, Mertensiella, Rheinbach* **10** : 141-146.
- 46- Jribi, I., Bradai, M.N. & Bouain, A.** (2001). Quatre ans de suivi de la nidification de la tortue marine *Caretta caretta* aux îles Kuriat (Tunisie). *Rapp. Comm. Int. Mer Medit.*, **36**.
- 47- Jribi, I., Bradai, M.N. & Bouain, A.** (2002). Marine turtle nesting in Kuriat Islands (Tunisia) in 2000. *Marine Turtle Newsletter.* **96** : 4-6.
- 48- Jribi, I.** (2003). Etude de l'écologie de la reproduction et de l'interaction avec la pêche de la tortue marine *Caretta caretta* pour un objectif de conservation. *Thèse de doctorat, Université de Sfax, Faculté des Sciences Sfax-Tunisie.* 167 pp.
- 49- Kamezaki N.** (1989). Karyotype of the loggerhead turtle, *Caretta caretta*, from Japan. *Zoological Science.* **6**: 421-422.
- 50- Kireev, V.A.** (1983). Zhivotnyi mir kalmykii. Zemnovodnye i presmykayushchiesya.- *Elista* (Kalmytskoe knizhnoe izd-vo), 112 pp.
- 51- Lande, R.** (1988). Genetics and demography in biological conservation. *Science.* **241**: 1455-1460.
- 52- Laurent, L.** (1990). Les tortues marines en Algérie et au Maroc (Méditerranée). *Bull. Soc. Herp. Fr.* **55** : 1-23.

- 53- Laurent, L., Nouira, S., Jeudy De Grissac, A. & M.N. Bradai** (1990). Les tortues marines de Tunisie : Premières données. *Bull. Soc. Herp. Fr.* **53** : 1-17.
- 54- Laurent, L. & J. Lescure**, (1994). L'hivernage des tortues caouannes *Caretta caretta* dans le Sud tunisien. *Revue d'Ecologie (Terre vie)* **49** : 63-86.
- 55- Legendre, L. & Legendre, P.** (1981). Ecologie numérique, II: La structure des données écologiques, 1-247, *Masson, Paris*.
- 56- Lenk, P. , Joger, U. , Fritz, U. , Heidrich, P. & Wink, M.** (1998). Phylogeographic patterns in the mitochondrial cytochrome b gene of the European pond turtle (*Emys orbicularis*): first results. In : *Fritz, U. et al. (Eds.). Proceedings of EMYS Symposium, Dresden 96, Mertensiella, Rheinbach*, **10** : 159-175.
- 57- Limpus CJ.** (1982). Estimation of tag loss in marine turtle research. *Wildlife Research.* **19**: 457-469.
- 58- Limpus CJ.** (1985). A study of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta* in eastern Australia, *PhD thesis, University of Queensland, QLD*.
- 59- Limpus CJ,, Fleay A. & Guinea M.** (1984). Sea turtles of the Capricornia section, great barrier reef, In: (eds Ward WT and Saenger P) The Capricornia section of the great barrier reef: Past, present, and future, pp. 61-78. The royal society of Queensland and Australian Coral Reef Society, Brisbane, Australia
- 60- Lohmann, K.J., Cain, S.K., Dodge, S.A. & Lohmann, C.M.F.** (2001). Regional magnetic fields as navigational markers for sea turtles. *Science.* **294**: 364-366.
- 61- Maatouk, K., El Ouaer, A., Chaieb, O., Bradai, MN. & El Abed, A.** (2002). Croissance et pathologie de la tortue *Caretta caretta* en captivité. *Cinquièmes journées tunisiennes des sciences de la mer. Ain Draham , Tunisie (2002)*.
- 62- Madsen T., Shine R., Loman. & Hakansson T.** (1992). Why do female adders copulate so frequently? *Nature.* **355**: 440-441.
- 63- Margaritoulis, D.** (1987). Nesting activity and factors affecting breeding of the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* in Greece . Ministry of the environment, Physical planning and public works, Athens. *Final report on contract N°ENV-790-GR*.
- 64- Margaritoulis, D.** (1988). Nesting of the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* on the shores of Kiparissia Bay, Greece, in 1987. *Mesogee.* **48** : 59-65.
- 65- Mathews, John R.** (1990). WWF Guide to endangered species of North American walton beacham, *Washington D.C.* **2** : 721-723.
- 66- Mayet, Y.** (1903). Catalogue raisonné des reptiles et batraciens de la Tunisie. *Exploration scientifique de la Tunisie, Paris* : 30 pp.

- 67- Miles, DB., Noecker, R., Roosenburg, WM. & White, MM.** (2002). Genetic relationships among populations of *Sceloporus undulatus* fail to support present subspecific designations. *Herpetologica*. **58** : 277-292.
- 68- Minckley, W. L.** (1966). Coyote predation on aquatic turtles. *J.Mammalog.* **47** : 137.
- 69- Moore, MK.** (2000). Determining paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne Beach, Florida using microsatellite markers. *Thesis master of science*.
- 70- Moretti, J., Broussier, G. & Jayle, M.F.** (1975). Réalisation technique et premières applications de l'électrophorèse sur gel d'amidon. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **39**: 593-605.
- 71- Mortimer, J.A.** (1982). Factors influencing beach selection by nesting sea turtles. pp.45-54 in *Bjorndal KA. Biology & Conservation of sea turtles 2nd edn. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.*
- 72- Mrosovsky N. & Provanca J.** (1989). Sex ratio of loggerhead sea turtles hatching on a Florida Beach. *Canadian Journal of Zoology*. **67**: 2533-2539.
- 73- Naulleau, G.** (1991). Adaptations écologiques d'une population de cistudes (*Emys orbicularis* L.) (Reptilia, Chelonii) aux grandes variations de niveau d'eau et à l'assèchement naturel du milieu aquatique fréquenté. *Bull. Soc. Herp. Fr.* **58**: 11-19.
- 74- Nei, M.** (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distances from a small number of individuals. *Genetics*. **89** : 583-590.
- 75- Newcomer SD. & Zeh DW.** (1999). Genetic benefits enhance the reproductive success of polyandrous females. *Proceeding of the National Academy of Science, USA*. **96**: 10236-10241.
- 76- Nouria, S.** (1996). Systématique, écologie et biogéographie évolutive des Lacertidae (Reptilia, Sauria). Importance dans l'herpétofaune tunisienne. *Thèse de doctorat sciences naturelles. Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie*.
- 77- Owens, D.** (1980). The comparative reproductive Physiology of sea turtles. *Amer. Zool.* **20** : 549-563.
- 78- Owen, D. & Ruiz, G.** (1980). New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica*. **36** : 17-20.
- 79- Pasteur, N., Bonhomme F., Catalan J., & Britton-Davidian J.** (1986). Manuel d'électrophorèse. *Série Biotechnologies*. Lavoisier ed.
- 80- Patton, JC. & Avise, JC.** (1986). Evolutionary genetics of birds IV. Rates of protein divergence in waterfowl (Anatidae). *Genetica*. **68** : 97-103.
- 81- Pieau, C.** (1998). Temperature-dependant sex determination in *Emys orbicularis* : laboratory and field studies. *Proceedings of EMYS Symposium, Dresden 96, Mertensiella, Rheinbach*. **10** : 199-207.

- 82- Rollinat, R.** (1934). La vie des reptiles dans la France Centrale. *Paris (Delagrave)*. 343 pp.
- 83- Schmid-Hempel P.** (1998). Parasites in social insects, *Princeton University Press*, Princeton, NJ.
- 84- Servan, J.** (1986). Répartition de la Cistude d'Europe *Emys orbicularis*, dans les marais de l'ouest de la France. *Actes Congr. Natl. Soc. Savantes, Sec. Sci., Poitiers*. **111(2)** : 195-202.
- 85- Servan, J.** (1987). Use of radiotelemetry in an ecological study of *Emys orbicularis* in France. First results, pp. 357-360, in: *van Gelder, Strijbosch H., Gerges P.J.M. edit., Proceedings of the 4th Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica*: pp. 473.
- 86- Servan, J.** (1998). Ecological studies of *Emys orbicularis* in Brenne (Central France). In: *Fritz, U. et al. (Eds.). Proceedings of EMYS Symposium, Dresden 96, Mertensiella, Rheinbach*, **10** : 245-252.
- 87- Servan, J.** (1988). La cistude d'Europe, *Emys orbicularis*, dans les étangs de Brenne, France. *Mésogée*. **48**: 91-95.
- 88- Slatkin, M.** (1985). Gene flow in natural populations, in *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **16** : 393-430.

- 89- Slatkin, M.** (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations, in *Science* **236** : 787-792.
- 90- Smith RL.** (1984). Sperm competition and the evolution of Animal mating systems. *Academic Press*, Orlando, FL.
- 91- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R.** (1973). Numerical taxonomy. *Freeman*, San Francisco.
- 92- Sokal, R. R. & Sneath P. H. A.** (1963). Principal of numerical taxonomy. *Freeman*, San Francisco.
- 93- Solignac, M. , Periquet, G. , Anxolabéhère, D. & Petit, C.** (1995). Génétique et évolution. Ed. *Hermann, Tome I* : pp 295.
- 94- Stockley P., Searle JB., Macdonald DW. & Jones CS.** (1993). Female multiple mating behaviour in the common shrew as a strategy to reduce inbreeding. *Proceedings of the royal Society of London Series B.* **254**: 173-179.
- 95- Templeton, A. R.** (1991). Genetics and conservation biology. In *Species conservation: a population-biological approach*: 15–29.
- 96-Vala f., Breeuwer JAJ. & Sabelis MW.** (2000). Wolbachia-induced 'hybrid breakdown' in the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Proceedings of the royal Society of London Series B.* **267**: 1931-1937.
- 97- Watson PJ.** (1991). Multiple paternity as genetic bet-hedging in female sierra dome spiders, (*Linyphia litigiosa*: Linyphiidae). *Animal Behavior.* **41**:343-360.
- 98- Zeh JA. & Zeh DW.** (1996). The evolution of polyandry I: Intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proceedings of the royal Society of London Series B.* **263**: 1711-1717.