



Mieux comprendre les populations de tortues vertes, *Chelonia mydas*, en Polynésie française par des approches génétiques.

Violaine Dolfo

► To cite this version:

Violaine Dolfo. Mieux comprendre les populations de tortues vertes, *Chelonia mydas*, en Polynésie française par des approches génétiques.. Biologie de la reproduction. Université Paris sciences et lettres, 2023. Français. NNT: 2023UPSLP007 . tel-04551780

HAL Id: tel-04551780

<https://theses.hal.science/tel-04551780>

Submitted on 18 Apr 2024

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

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



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'École Pratique des Hautes Études

**Mieux comprendre les populations de tortues
vertes, *Chelonia mydas*, de Polynésie française par des
approches génétiques**

Soutenue par

Violaine DOLFO

Le 16 juin 2023

École doctorale n° 472

**École doctorale de l'École
Pratique des Hautes Études**

Spécialité

**Biologie des populations,
génétique et éco-éthologie**

Composition du jury :

Marc GIRONDOT Professeur, Université Paris Saclay	<i>Rapporteur</i>
Cécile FAUVELOT Directrice de recherche, IRD	<i>Rapporteuse</i>
Claude MIAUD Directeur d'études, EPHE	<i>Président</i>
Pablo SAENZ-AGUDELO Assistant Professor, Universidad Austral de Chile	<i>Examineur</i>
Serge PLANES Directeur de recherche, CRIOBE	<i>Co-directeur de thèse</i>
Emilie BOISSIN Ingénieure de recherche, CRIOBE	<i>Co-directrice de thèse</i>



Remerciements

Ce travail de thèse s'achève après trois ans et demi, et je tiens à remercier en premier lieu mes co-encadrants, Serge Planes et Émilie Boissin. Serge je te remercie tout d'abord pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce projet, pour ton encadrement juste, et pour avoir toujours apporté, dans les méandres des résultats inattendus, la boussole de la rigueur scientifique. Émilie, merci pour ton encadrement à la fois technique, scientifique, quotidien, ton soutien émotionnel aussi, et pour ta disponibilité sans égale jusque dans les dernières minutes !

Je tiens ensuite à remercier la Direction de l'Environnement de Polynésie Française, et notamment sa Directrice Miri Tatarata, qui est à l'initiative de cette étude et qui en est le financeur. J'espère que ce travail est à la hauteur de leurs attentes.

Ce travail n'aurait pas pu exister sans l'énorme effort d'échantillonnage déployé, et pour cela je remercie toutes les personnes impliquées sur le terrain. En premier lieu Cécile Gaspar, Teiva, et Hanalei, qui coordonnent ces efforts sur Tetiaroa et Bora Bora. Ensuite, les volontaires qui m'ont accueillie sur le terrain avec bienveillance et envie de partage : Margaux, Simon, Basile, Nelly, Pierrick, Sophie, et Jeanne – avec qui j'ai échantillonné ma première tortue ! – pour ce qui est de Tetiaroa. À Mopelia : Hanalei, Sébastien, Jules notre skipper, et bien sûr Faimano et Karina, sentinelles qui aide « les scientifiques » par passion, et sans qui on n'aurait pas su voir la moitié des traces de ponte ! À Mopelia aussi, j'aimerais remercier les habitants qui nous ont accueillis chez eux et ont partagé des moments de convivialité très appréciés : Marcello, Adrienne, Norma, Mina, Teria, KhoLanta, et Mana. Enfin, à tous les volontaires que je n'aurai jamais croisés, et qui ont dû se demander plus d'une fois à quoi ça sert d'échantillonner une nième tortue sans jamais voir la finalité, merci d'avoir persévéré avec rigueur dans cet échantillonnage si précieux. Au final le résultat est là (10 ans après, certes...).

Je remercie aussi les membres de mon comité de thèse, Jérôme Bourjea, Sophie Arnaud-Haond, et Olivier Verneau, pour avoir alimenté la réflexion scientifique autour de ce projet et pour leur bienveillance.

Au CRIOBE, j'aimerais remercier tout d'abord Peter pour son aide précieuse sur la base de données et sur tous les autres tracas informatiques. Je remercie aussi le service de la compta, notamment Nathalie et Aurélie, pour leur gestion des commandes dans les

années post-covid ! Merci aussi à Edouard, ainsi qu'à Christel Berger du LGDP pour leur aide dans les extractions d'ADN. Merci enfin à Fabien pour la gestion quotidienne de cette machine (« Fabien, c'est quand déjà le déménagement ? », « Fabien, comment on fait pour poser des congés ? ») et pour les moments conviviaux organisés qui ont été importants.

Enfin merci à tous les étudiants du CRIOBE, de passage pour plus ou moins longtemps, pour l'ambiance que vous avez contribué à créer au quotidien dans ce labo : Clara (t'es pas étudiante mais ça compte quand même), Gaëlle (pareil), Claire, Céline, Jason, Titouan, Charles, Jérémy, Jérem, Nina Sénior, Nina Junior, Gonzalo, Mathieu R, Matthieu A., Kim, Chloé, Camille V., Lou, Thomas, Zoé, Emma, Irene, Laura Lee, Francesca, Julie. À Moorea : Camille L., Aurélie, Jules, Julien, Paul, Martin, Hugo, Camille G., Yan.

Je conclue ces remerciements avec une note plus personnelle, et je remercie en premier lieu mes colocataires de ces quatre années qui comptent parmi les plus belles rencontres que j'ai faites dans ma vie : tout d'abord Vassili pour absolument tout le quotidien de ces 4 ans, des randos aux petits plats en passant par les après-midis jeux, et les innombrables discussions de thésards. Sophia, pour la fraîcheur que tu as apporté durant ces dernières années, Noa, pour ta gentillesse inébranlable, et Alexis et Maëlys, pour tous les souvenirs délicieux. Enfin je remercie ma famille, sans qui jamais rien n'arrive. Celle des gènes, et celle du choix qui se concrétise la semaine prochaine...

Table des Matières

Chapitre I : Introduction générale	19
I. Érosion de la biodiversité et conservation	21
II. Extinction et conservation : l'intérêt de la génétique	22
a. Le rôle de la génétique dans le processus d'extinction	22
b. Les apports de la génétique de la conservation	23
c. Les marqueurs génétiques issus de l'ADN mitochondrial	24
d. Les marqueurs génétiques de l'ADN nucléaire	25
III. Le modèle de la tortue verte	26
a. Phylogénie, phylogéographie, et distribution actuelle	26
b. Cycle de vie	28
c. Structure génétique	32
d. Déclin et menaces	33
e. Protection et réglementation à différents niveaux	37
IV. Les populations de tortue verte en Polynésie	39
a. Préambule	39
b. État des connaissances sur les populations	40
c. Le rapport aux tortues	41
d. La protection et les moyens de protection	43
V. Problématique et introduction des chapitres	44
Chapitre II : Méthodes	49
I. Échantillonnage	51
a. Iles et méthodes d'échantillonnage	51
b. Construction de la base de données	52
c. Contenu de la base de données	55
II. Analyses de biologie moléculaire	57

a. Extraction.....	57
b. Séquençage du marqueur mitochondrial.....	58
c. Développement de 25 nouveaux marqueurs microsatellites polymorphiques.....	60
Chapitre III : Structure des populations et connectivité avec les populations du Pacifique	81
I. Introduction de l'article	83
II. Article.....	84
a. Abstract.....	85
b. Introduction	86
c. Material and Methods	88
d. Results	92
e. Discussion.....	98
Chapitre IV : Structure génétique locale au sein de la Polynésie française	
106	
I. Introduction.....	108
II. Article.....	109
a. Abstract.....	110
b. Introduction	111
c. Materials and methods.....	113
d. Results	116
e. Discussion.....	118
Chapitre V : Comportements reproducteurs des tortues vertes sur Tetiaroa	
126	
I. Introduction.....	128
II. Article.....	129
a. Abstract.....	130
b. Introduction	131
c. Materials and Methods	134

d. Results	139
e. Discussion	145
Chapitre VI : Discussion générale	154
I. Synthèse des résultats	155
a. Quelle est la structure des populations de <i>C. mydas</i> en Polynésie française, en lien avec les autres populations du Pacifique ?	155
b. Quel est l'état de vulnérabilité génétique de ces populations ?	157
c. Comment la vulnérabilité génétique est influencée par les dynamiques de reproduction ?	158
II. Limites des analyses	160
III. Perspectives de recherche	162
a. Études des éco-morphotypes et des comportements d'accouplement	162
b. Autres marqueurs génétiques	163
c. Application des résultats et méthodes à d'autres populations	164
d. Histoire évolutive des lignées géographiquement restreintes	165
IV. Implications pour la conservation des tortues vertes en Polynésie française et dans le Pacifique	166
a. Conservation et enjeux régionaux	166
b. Conservation et enjeux locaux	166
Références bibliographiques	169
Annexes	191
ANNEXE I : CARTOGRAPHIE DES SITES DE PONTE DES TORTUES VERTES DANS LE MONDE (SWOT, 2011)	192
ANNEXE II : CARTE DES DEUX SITES DE TERRAIN VISITÉS : TETIAROA ET MOPELIA	193
ANNEXE III : CAHIER DES CHARGES POUR LA CRÉATION DE LA BASE DE DONNÉES	194

ANNEXE IV : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE II (Characterization of 25 new microsatellite markers for the green turtle, <i>Chelonia mydas</i> , and cross-species amplification in other marine turtle species).....	208
ANNEXE V : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE III (Population genetic structure and mixed stock analysis of the green sea turtle, <i>Chelonia mydas</i> , reveals reproductive isolation in French Polynesia).....	212
ANNEXE VI : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE IV (Local genetic structure in green sea turtles, <i>Chelonia mydas</i> , within French Polynesia discovered with microsatellite markers)	227
ANNEXE VII: MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE V (Investigating the reproductive behavior of the green sea turtle, <i>Chelonia mydas</i> , using parentage analysis).....	233

Liste des figures

Figure I.1 ADN mitochondrial avec les différents gènes codés. Les gènes surlignés en rouge sont les principaux marqueurs mitochondriaux utilisés en génétique des populations. Adapté de Amorim et al. (2019).....24

Figure I.2 Arbre phylogénétique des sept espèces de tortues marines. Adapté de Naro-Maciel et al. (2008).....26

Figure I.3 Arbre phylogénétique de la tortue verte, *Chelonia mydas*, construit à partir de la région contrôle de l'ADN mitochondrial. Les nombres au-dessus des branches correspondent à la probabilité (bayésienne) de la branche, les barres bleues montrent l'intervalle de confiance 95% sur la temporalité des nœuds de divergence de l'arbre par rapport à l'échelle en million d'années. La carte montre la répartition de ces lignées dans le monde. Les principales régions évolutivement distinctes sont regroupées par les lignées en pointillés. Les noms associés aux abréviations sont disponibles dans la liste des abréviations. Jensen et al. (2019)28

Figure I.4 Cycle de vie des tortues vertes, *Chelonia mydas*.....31

Figure I.5 Unités de gestion régionales (RMUs) dans le monde pour la tortue verte.....38

Figure I.6 Schéma des différentes échelles de gestion pour les populations de tortues vertes dans le monde.39

Figure I.7 Carte de la Polynésie française représentant les différents archipels. Les îles notées d'une étoile sont celles où des tortues vertes ont été échantillonnées, les îles en gras accueillent des campagnes d'échantillonnage régulières (voir chapitre II). * : Zone Économique exclusive.42

Figure I.8 Schéma récapitulatif de la problématique, des axes de recherche, et des chapitres.46

Figure II.1 Schéma récapitulatif des relations entre les différentes tables de la base de données. Les couleurs correspondent aux champs qui font les liens entre les différentes tables. La description des différents champs est donnée dans l'Annexe III. ...53

Figure II.2 Extrait de la base de données en ligne sur les échantillons de *C. mydas* en Polynésie54

Figure II.3 Répartition du nombre d'échantillons par île et par origine dans les archipels des Tuamotu et de la Société.56

Figure II.4 Évolution du nombre d'échantillons par année, et contribution de Tetiaroa dans cet échantillonnage.57

Figure II.5 Principal coordinates analysis on 3 marine turtle species analyzed with 24 newly developed microsatellite markers. Variance explained by each axis is shown in brackets.....69

Figure III.1. Sampling locations of green turtles in French Polynesia. Numbers indicate the number of samples from each island. Dashed lines separate the three main island groups. The shaded area represents the extent of the stock sampling locations and the arrow represents the direction of the main current, the Southern Equatorial Current.89

Figure III.2. Regional map of the green turtle management units in the Pacific Ocean. Grey areas represent the management units used for the baseline of the mixed-stock analysis. The main current flows are represented with grey arrows. Dashed lines represent the regional management units (RMU) (Wallace et al., 2010). INE: Indian Northeast, ISE: Indian Southeast, WPSA: West Pacific South Asia, PNW: Pacific Northwest, PWC: Pacific West Central, PSW: Pacific Southwest, PNC: Pacific North Central, PSC: Pacific South Central, PE: Pacific East.91

Figure III.3. Simulations from the MSA baseline accuracy assessment with the size and distance combined prior for the French Polynesian MUs, representing known versus calculated contribution on 40 simulations. A: scenario 1 with three MUs in French Polynesia, B: scenario 2 with two MUs in French Polynesia. All the simulations are available in Supplementary Material S2.99

Figure III.4. Contribution of the 5 most contributing MUs in the Pacific Ocean to the stock of green turtles of French Polynesia (according to size prior) calculated with the mixed-stock analysis and different priors. A: scenario 1 with three MUs in French Polynesia (Windward Islands, Leeward Island, Tuamotu) on the total stock. B: scenario 2 with two MUs in French Polynesia (Tetiaroa, FP other islands) on juveniles only. C: scenario 2 on the total stock. 102

Figure IV.1 (A) DAPC clustering of 839 individuals of *C. mydas* including adults, juveniles, and one hatchling per nest (dataset 1) sampled in French Polynesia. (B) PCoA

including the same individuals, with colors and shapes representing the DAPC groups. Percentage of variance explained by each axis is shown in brackets. 117

Figure IV.2. Percentage of clade (A), maturity stage (B), sampling island (C), and sampling season (D) in each of the DAPC groups. ADU: adults, HAT: hatchlings, JUV: juveniles, UNK: maturity stage unknown, p: Fishers' exact test p_values..... 124

Figure V.1 Sampling locations on Tetiaroa Atoll, French Polynesia. Sampled nests are represented with black dots around the islets..... 134

Figure V.2 Conceptual workflow for all the analyses performed for this study.136

Figure V.3 Density and boxplot of the relatedness of all the potential (full line) and reconstructed (dash line) parent pairs. 140

Figure V.4 Inter-nesting interval between successive nesting events for the clutches retrieved in all nesting from 2014/15 to the 2020/21 seasons in Tetiaroa atoll. 142

Figure V.5 Relative fathers' contribution in the five clutches where multipaternity was found. Each vertical bar represents one clutch and each shade of grey represents one male. The number of hatchlings in the clutches is displayed above each bar. 143

Figure V.6 Relatedness of couples involved in different reproduction behaviors compared with relatedness of all reconstructed couples. Black line: all reconstructed parent pairs, grey line: multiple mating of males, dash line: annual nesting of females, dot line: dominant father in multipaternity clutches..... 145

Liste des tableaux

Table II.1 Répartition du nombre d'échantillons de tortue verte sur chaque île, classés par stage de maturité. ADU : adultes, EME : émergentes, IND : indéterminé, JUV : juvénile.55

Table II.2 Nombre d'individus retenus après séquençage pour chaque catégorie de classe d'âge (ADU : adultes, EME : émergentes, JUV : juvéniles, IND : indéterminé). ..59

Table II.3 Characterization of the 24 microsatellites developed for *Chelonia mydas* in this study. Microsatellite markers were included in five multiplexes corresponding to the annealing temperature Ta. N, number of samples; Na, number of alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; HWE, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (p_values shown); Fis, fixation index; LD, linkage disequilibrium; PA, private alleles, Null alleles: Yes/No.73

Table II.4 Fullsib and Halfsib dyads of *C. mydas* samples from Tetiaroa. FS: full-siblings; HS: half-siblings. The probability is calculated as the mean probability of the three runs with Colony software.75

Table II.5 Cross-species amplification of the 25 developed loci for two species of marine turtles (*Caretta caretta* and *Eretmochelys imbricata*). N/Ntot: number of individuals successfully amplified/number of individuals tested; Na: number of alleles, PA: number of private alleles.76

Table II.6 Nei unbiased genetic distance between the three species *C. mydas*, *C. caretta*, and *E. imbricata*.76

Table II.7 Individus recapturés dans l'échantillonnage79

Table III.1. Genetic diversity parameters and haplotype frequencies for green turtle rookeries and stock of French Polynesia (FP). Nf: Estimated number of nesting females, n: number of sequences, H: number of haplotypes, π : nucleotide diversity, h: haplotype diversity, SD: corresponding standard deviation. * These data include those of Boissin et al (2019). Data from Moorea in Boissin et al (2019) are included in the stock as they correspond to juvenile green turtles. a orphan haplotypes previously found in foraging aggregations, b orphan haplotype never described before.93

Table III.2 Fst and ϕ st among the three most sampled islands Tetiaroa, Mopelia, Moorea, and among the three main island groups Leeward Islands, Windward Islands,

and Tuamotu. P_values are shown in brackets, significant values in bold. n: number of samples.....95

Table III.3. Fst values between the French Polynesian management units and the other MUs in the Pacific Ocean. P_values > 0.0001 are indicated in brackets. All the other p_values were lower than 0.0001, indicating strong significance. Non-significant values are indicated in bold.....97

Table IV.1 G'st (Hedrick) and Dest (Jost) between DAPC groups of the 839 individuals of dataset 1, and on hatchlings only from different nests (n=581, dataset 3). Group numbers correspond to DAPC group numbers. G'st and Dest values are below the diagonal, p_values are above the diagonal..... 117

Table IV.2 Mean number of alleles per locus (Na), number of rare alleles (Nar), observed and expected heterozygosity (Ho and He), Fis values, mean relatedness index (r), and percentage of pairs of individuals with different values of relatedness within each DAPC group and among all individuals. All Fis p_values were < 0.001. 120

Table IV.3 Values of effective population size (Ne) for each DAPC group and depending on the threshold used to filter allele frequencies (Pcrit). 122

Table V.1 Individual females (Ind) nesting in multiple seasons found with Rclone analysis (marked with °) and parentage analysis (marked with +). 138

Table V.2 Number of females and males deduced from parentage analysis for each season, and operational sex ratio (OSR, number of males for one female). 139

Table V.3 Mean relatedness between potential and reconstructed couples, and couples involved in different mating behaviors, and Student's t.test p_values. Significant p_values are indicated in bold. r0.25 (r0.5): percentage of pairs with a relatedness greater than 0.25 (0.5). 141

Table V.4 Father ID and number of offspring in all clutches of the 4 females involved in polyandry. Clutches with multipaternity are indicated in bold. 144

Liste des Abréviations

ADNmt :	ADN mitochondrial
ADNnu :	ADN nucléaire
ADU :	Adulte
C&EP :	Central and East Pacific (Pacifique Centre et Est)
CCL :	Curved Carapace Length (Longuer courbée de la carapace)
CITES :	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
CMM :	Conservation and Managment Measures
CMS :	Convention on Migratory Species
CSP :	Central South Pacific (Pacifique Centre-Sud)
CWP :	Central West Pacific (Pacifique Centre-Ouest)
DIREN :	Direction de l'Environnement de Polynésie française
ECARIB :	East Caribbean (Caraïbes Est)
EME :	Émergente
FFA :	Forum Fisheries Agency (Agence des pêches du Forun des îles du Pacifique)
IND :	Indéterminé (stade de maturité)
IP :	Indopacific (Indopacifique)
JP :	Japan (Japon)
JUV :	Juvénile
MED :	Mediterranean Sea (Méditerranée)
MU :	Management Unit (Unité de gestion)
NWATL :	North West Atlantic (Atlantique Nord-Ouest)
NWIO :	North West Indian Ocean (océan Indien Nord-Ouest)
RMU :	Regional Managment Unité (Unité de gestion régionale)
SATL :	South Atlantic (Atlantique Sud)
SPREP :	Secrétariat du Programme Environnemental Régional du Pacifique
SWIO :	South West Indian Ocean (océan Indien Sud-Ouest)
SWOT :	State of the World Sea Turtles
SWP :	South West Pacific (Pacifique Sud-Est)
TSD :	Temperature-dependant Sex Determination
UICN :	Union Internationale pour la Conservation de la Nature
WCPFC :	Western & Central Pacific Fisheries Commission (Commission des pêches du Pacifique occidental et central)

Glossaire

Colonie : Ensemble des individus qui mettent bas et naissent sur une même plage ou île.

Dépression de consanguinité : Réduction de la capacité à se reproduire d'une population liée à la reproduction entre individus apparentés.

Écotype : Individu ou population qui présente des caractéristiques adaptées à des habitats différents.

Fitness : Capacité d'un individu d'un certain génotype à se reproduire.

Génotype : Composition allélique des gènes d'un individu. Le génotype peut être considéré sur l'ensemble des gènes ou sur un nombre restreint des gènes d'intérêt.

Haplotype : Groupe d'allèles de différents loci sur un même chromosome habituellement transmis ensemble.

Heiva : Manifestation traditionnelle en Polynésie française.

Hétérozygote : Individu ayant deux allèles différents à un locus donné.

Homozygote : Individu ayant deux allèles identiques à un locus donné.

Lignées mitochondriales : Haplotypes mitochondriaux descendant d'un haplotype donné

Locus, loci : Position d'un gène ou d'un marqueur génétique sur l'ADN.

Marqueur génétique : Gène ou séquence polymorphe aisément détectable grâce à un emplacement connu sur le chromosome.

Natal homing : Tendance des individus à revenir sur leur zone de naissance pour s'accoupler ou mettre bas.

Phénotype : Expression physique d'un génotype.

Philopatrie : Tendance des individus à rester ou revenir sur certaines zones d'intérêt (ex. zone de reproduction).

Pléistocène : Première époque géologique du Quaternaire s'étendant de - 2,58 millions d'années à - 11 700 ans et marquée par des cycles glaciaires.

Polymorphisme : Coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou un locus donné dans une population.

Population : Ensemble d'individus d'une même espèce se perpétuant dans un territoire donné.

Taille census : Nombre réel d'individus dans une population.

Taille efficace : Nombre d'individus dans une population idéale ayant un taux de dérive génétique égal au taux observé dans la population réelle.

Unité de gestion : Groupe de colonies génétiquement indifférenciées.

Unité de gestion régionale : Unité de gestion formée de plusieurs populations de tortues vertes regroupés sur la base de similarité génétiques, géographiques, migratoires, et démographiques.



Chapitre I : Introduction générale

I. Érosion de la biodiversité et conservation

Nous vivons la sixième extinction de masse : le taux d'extinction des espèces sauvages est aujourd'hui 100 à 1 000 fois plus élevé que le taux d'extinction résiduel (i.e., taux d'extinction hors événement exceptionnel), et continue d'augmenter (Groom et al., 2006; Myers, 1979). On estime qu'entre 3 000 et 30 000 espèces s'éteignent chaque année (Woodruff, 2001). Selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Naturel (UICN), qui dresse la liste des espèces menacées, 6.2% des espèces décrites sont en danger critique d'extinction, et 27% des mammifères, 13% des oiseaux, 21% des reptiles, et 47% des amphibiens sont menacés d'extinction dans les prochaines décennies ("The IUCN Red List of Threatened Species," 2023). Tous ces chiffres ont augmenté de 1 à 9% depuis le début du siècle (Baillie et al., 2004). Par ailleurs, on estime que moins de 20% des espèces ont été décrites, et l'UICN n'a évalué le risque d'extinction que pour 5% d'entre elles (Mora et al., 2011). Cette extinction de masse est majoritairement liée à l'activité humaine, qui provoque une fragmentation voire une destruction des habitats (ex. agriculture, axes routiers), une surexploitation de certains stocks (notamment de poissons), l'introduction d'espèces invasives, voire la destruction ciblée des espèces (ex. pesticides) (Hoffmann et al., 2010). Devant ce constat, dès le XXème siècle des actions pour préserver certaines espèces de l'extinction ont été mises en place. L'attention était alors centrée sur les espèces les plus charismatiques (grands mammifères, oiseaux, arbres majestueux et belles fleurs, etc.) et a mené à la création de parcs et réserves nationales afin de préserver ces espèces et leur habitat « sauvage » (Franco, 2013). C'est aussi la vision à l'œuvre dans les zoos, dont certains participent à des programmes de conservation pour les espèces qu'ils détiennent (Tribe and Booth, 2003).

L'idée est alors de conserver la diversité des espèces (diversité spécifique), mais sans approche globale de la diversité. Par exemple, dans le cas d'espèces migratrices, différents habitats sont utilisés tout au long du parcours de migration. Conserver ces espèces demande donc une combinaison de mesures axées sur les écosystèmes et sur l'espèce en prenant en compte son cycle de vie complexe (Runge et al., 2015). De plus l'extinction ne touche pas que les espèces charismatiques, mais tous les taxons, et la conservation des habitats et des écosystèmes permet de protéger un plus grand nombre d'espèces. Enfin, même au sein d'une espèce, différentes **populations** peuvent exister avec des trajectoires démographiques distinctes. L'approche qui consiste à déployer des efforts de conservation à l'échelle d'une espèce apparaît alors insuffisante pour préserver la biodiversité dans son ensemble.

II. Extinction et conservation : l'intérêt de la génétique

a. Le rôle de la génétique dans le processus d'extinction

L'extinction est un processus démographique, où la génération suivante échoue à remplacer la précédente, et qui se passe d'abord à l'échelle d'une population. Plusieurs facteurs peuvent conduire à l'extinction, qui peuvent être classés en deux catégories : les facteurs extrinsèques et les facteurs intrinsèques à la population. Les facteurs extrinsèques incluent l'influence d'autres espèces comme les prédateurs et pathogènes, et les variations environnementales (sécheresses, inondations, etc.). Les facteurs intrinsèques incluent des variations aléatoires, démographiques (ex. variations dans le sex-ratio), ou génétiques (dérive génétique) (Hedrick and Miller, 1992). Pour les populations naturelles dont la taille est grande, les facteurs extrinsèques sont plus susceptibles de causer une extinction, alors que les populations de petite taille sont plus vulnérables aux variations intrinsèques aléatoires (Hedrick and Miller, 1992). Les facteurs génétiques peuvent en effet affecter la croissance des petites populations, notamment par une **dépression de consanguinité** (inbreeding, i.e. l'augmentation du nombre d'individus apparentés qui s'accouplent entre eux) (Soulé, 1987). Celle-ci peut mener à une perte de la variabilité génétique et une augmentation de la fréquence des allèles délétères, qui peut à son tour entraîner une réduction de la fécondité et de la viabilité des individus (Charlesworth and Charlesworth, 1987). Par exemple, Frankel et Soulé (1981) ont suggéré qu'une diminution de 10% dans la variation génétique causée par la consanguinité est susceptible de causer une réduction de 10-25% dans les performances reproductrices d'une petite population, diminuant encore la taille de celle-ci et donc sa capacité à persister. L'effet des facteurs génétiques sur une population peut être mesuré par la **taille efficace** (N_e), qui se définit comme le nombre d'individus dans une population idéale ayant un taux de dérive génétique égal au taux observé dans la population réelle (Crow and Kimura, 1970; Leberg, 2005). Une population idéale est une population où tous les individus ont la même probabilité d'être parent de la prochaine génération, stable temporellement, où ne s'opère ni mutation, ni sélection naturelle, ni migration (Crow and Kimura, 1970). Comme ces hypothèses sont rarement vérifiées dans les populations naturelles où tous les individus ne participent pas à la reproduction, la taille efficace est généralement inférieure à la **taille census** (N_c), qui correspond au nombre réel d'individus dans une population (Leberg, 2005). Une réduction de la taille efficace traduit une réduction de la diversité génétique, et on estime généralement qu'une taille efficace minimale de 50 individus est nécessaire pour

maintenir la diversité génétique à court terme, et de 500 individus pour la maintenir à long terme (Franklin, 1980). La majorité des populations menacées d'extinction ont vu leur taille census diminuer fortement et rapidement en raison de facteurs extrinsèques, et leur vulnérabilité est potentiellement accrue aujourd'hui par les facteurs génétiques intrinsèques, notamment la dépression de consanguinité (Hedrick and Miller, 1992). C'est pourquoi un aspect important de la conservation est de conserver la variabilité génétique au sein des populations, c'est à dire la diversité génétique.

b. Les apports de la génétique de la conservation

La diversité génétique peut être étudiée à tous les niveaux taxonomiques : du gène au règne en passant par l'individu, la population, et l'espèce, et l'une des questions cruciales est de savoir quel niveau de conservation définir (Kardos, 2021). Il a été suggéré que les efforts de conservation devraient se focaliser sur les populations génétiquement distinctes plutôt que sur les espèces (Hughes et al., 1997). En effet, la conservation de nombreuses populations génétiquement distinctes est nécessaire pour maximiser le potentiel évolutif d'une espèce, et minimiser son risque d'extinction à long terme (Allendorf et al., 2012). Hughes et al. (1997) ont été les premiers à estimer le taux d'extinction des populations dans le monde, qui s'élèverait à des dizaines de millions chaque année. Cette idée a amené la naissance d'une nouvelle discipline dans les années 1980 : la génétique de la conservation. La génétique de la conservation applique les principes et méthodes de la génétique aux problématiques de conservation (Hedrick and Miller, 1992).

La génétique apporte de précieux outils pour mieux définir ces niveaux de conservation. Par exemple, alors qu'une seule espèce de girafe était admise, Fennessy et al. (2016) ont montré en utilisant plusieurs types de **marqueurs génétiques** qu'il existe quatre **lignées** divergentes qui correspondent à quatre espèces cryptiques. Cette meilleure définition taxonomique permettra de mieux répartir les efforts de conservations sur chacune des quatre espèces, et de les accentuer pour celles qui présentent un plus gros risque d'extinction. La génétique des populations permet aussi d'identifier les barrières à la dispersion qui peuvent créer des populations isolées, ou les caractéristiques environnementales qui la facilitent et favorisent la connectivité génétique. Conserver des habitats identifiés via des approches génétiques comme des couloirs de migration pour certaines populations peut permettre de maintenir la diversité génétique et la stabilité démographique de populations qui seraient dans le cas contraire isolées (Kardos, 2021). C'est le cas par exemple pour le tigre (*Panthera tigris*)

dont l'habitat est très fragmenté dans le centre de l'Inde où huit populations comprenant entre 12 et 60 individus existent encore (Yumnam et al., 2014). En plus de la délimitation des niveaux de conservation et de leurs connectivité ou isolation, la génétique de la conservation peut informer les gestionnaires notamment sur la taille des populations et l'origine des individus (Holderegger et al., 2019; Kardos, 2021). Pour étudier ces différentes questions, plusieurs types de marqueurs génétiques peuvent être utilisés, issus de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et/ou de l'ADN nucléaire (ADNnu).

c. Les marqueurs génétiques issus de l'ADN mitochondrial

L'ADNmt se présente sous forme circulaire fermée dans les mitochondries des cellules eucaryotes. Il est hérité uniquement de la mère, ce qui le rend intéressant pour étudier les lignées maternelles au sein d'une population (Giles et al., 1980). Chez les animaux, il contient entre 11 000 et 50 000 paires de bases. Il est majoritairement codant, bien qu'il ne code que pour 37 gènes (Zardoya, 2020). Les principaux gènes utilisés comme marqueurs sur l'ADNmt sont les gènes COI, COIII, 12S, 16S, et cytochrome B, ainsi que la région de la Dloop, non codante, aussi appelée région contrôle (Figure I.1). L'utilisation d'un de ces marqueurs dépend de l'espèce et de l'échelle temporelle étudiée, ainsi que des données déjà disponibles dans les bases de données publiques. Le taux de mutation de l'ADNmt est assez élevé (0.02 substitution par paire de bases par million d'années) (Brown et al., 1979), ce qui en fait un bon candidat pour étudier la phylogéographie, la structure génétique, et l'histoire évolutive des populations.

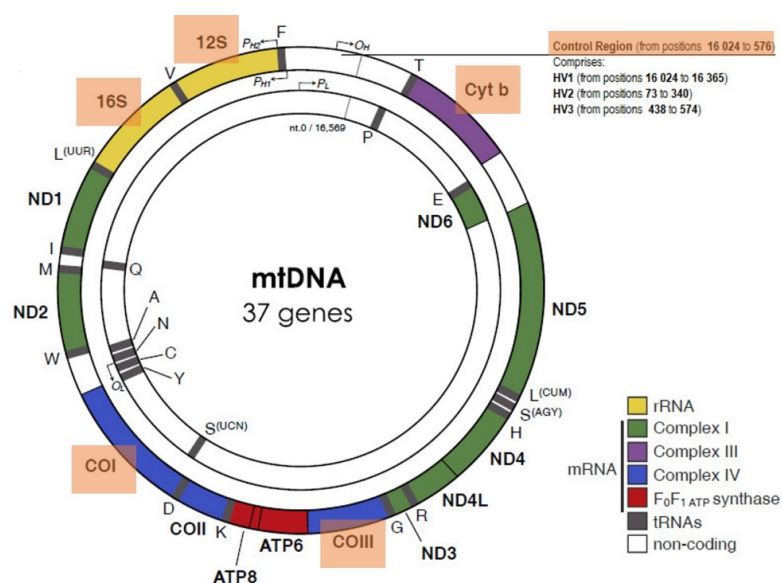


Figure I.1 ADN mitochondrial avec les différents gènes codés. Les gènes surlignés en rouge sont les principaux marqueurs mitochondriaux utilisés en génétique des populations. Adapté de Amorim et al. (2019).

d. Les marqueurs génétiques de l'ADN nucléaire

L'ADN nucléaire (ADNnu) est le principal support de l'information génétique chez les cellules eucaryotes. Il est hérité des deux parents. Les marqueurs issus de l'ADNnu ont évolué avec la démocratisation de l'amplification de fragments d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction). Avant cette technique, l'utilisation d'enzymes de restriction était privilégiée. Celles-ci digèrent l'ADN, les fragments obtenus sont séparés en fonction de leur longueur par électrophorèse, puis hybridés à une sonde dont la séquence est complémentaire d'un fragment polymorphe. Ceci permet de détecter des insertions, délétions, ou substitutions dans l'ADN qui induisent un **polymorphisme** dans la taille des fragments révélés (Botstein et al., 1980). Avec la démocratisation de la PCR dans les années 1990, les marqueurs microsatellites sont venus remplacer ceux issus des enzymes de restriction. Les microsatellites sont des répétitions de paires de bases selon un motif comprenant entre 1 et 6 paires de bases. Les plus utilisés comme marqueurs génétiques sont ceux avec un motif comportant 2, 3, ou 4 paires (appelés di-, tri-, ou tétranucléotides). Ils se situent dans des régions non codantes de l'ADNnu donc ne sont pas soumis à la sélection en théorie (Guichoux et al., 2011). Leur polymorphisme se traduit par un nombre variable de répétitions du motif (donc par une taille variable), et leur taux de mutation est assez élevé (10^{-3} à 10^{-2} mutations par génération) ; ce qui apporte suffisamment de polymorphismes pour caractériser deux individus d'une même population – on parle de « finger printing » génétique (Jones et al., 2010; Li et al., 2002). Les différentes tailles de fragments d'ADNnu formés par ces répétitions sont appelées les allèles. Ainsi, l'utilisation combinée de plusieurs marqueurs microsatellites (en général > 20) permet d'attribuer à chaque individu une combinaison unique d'allèles, appelée **génotype**, qui forme en quelques sortes une carte d'identité génétique et permet de différencier les individus entre eux. Aujourd'hui, les techniques de séquençage haut débit et de traitement des données bio-informatiques permettent l'utilisation d'autres marqueurs, notamment les Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Les SNPs sont constitués d'une mutation sur une paire de base spécifique dans le génome. Ils sont stables, très abondants, et distribués uniformément dans l'ADNnu, mais plusieurs milliers sont nécessaires pour discriminer des individus entre eux (Brookes, 1999; Gray et al., 2000). Les propriétés des marqueurs nucléaires sont particulièrement utiles pour étudier les parentés entre individus, mais aussi pour travailler à une échelle de temps courte en termes d'évolution, à des échelles démographiques et écologiques. Par exemple, ils sont utilisés pour déterminer la taille efficace et la structure des populations (Selkoe and Toonen, 2006).

III. Le modèle de la tortue verte

La tortue verte, *Chelonia mydas*, est une des nombreuses espèces en danger d'extinction et bénéficie d'un effort de conservation relativement important à travers le monde. De par sa distribution globale et ses comportements de reproduction, c'est une espèce qui peut bénéficier des apports de la génétique pour une gestion adaptée des populations. Cependant plusieurs zones dans l'aire de répartition de l'espèce restent mal caractérisées, comme la zone du Pacifique Centre Sud.

a. Phylogénie, phylogéographie, et distribution actuelle

La tortue verte (*Chelonia mydas*) est une des sept espèces de tortue marine. Les tortues marines se répartissent en deux familles : la famille des Dermochelidae qui ne compte que la tortue luth (*Dermochelys coriacea*), et la famille des Cheloniidae, divisée en deux sous-familles, les Cheloninae et les Carettinae (Figure I.2). La tortue verte et la tortue à dos plat (*Natator depressus*) font partie des Cheloninae, tandis que la tortue imbriquée (*Eretmochelys imbricata*), la tortue caouanne (*Caretta caretta*), la tortue de Kemp's (*Lepidochelys kempii*), et la tortue olivâtre (*Lepidochelys olivacea*) font partie des Carettinae, sous-famille la plus récente (Naro-Maciel et al., 2008).

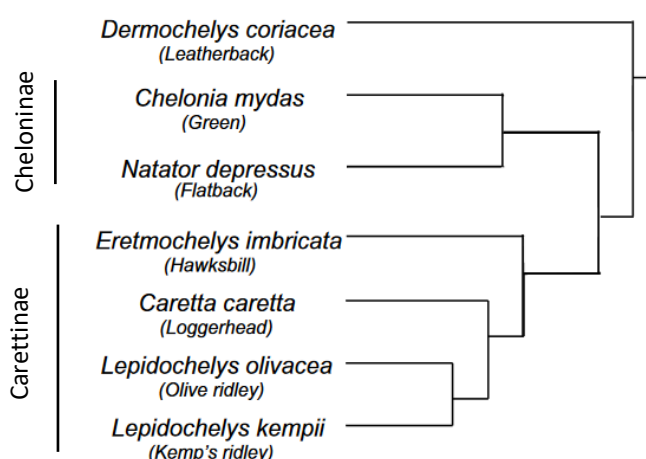


Figure I.2 Arbre phylogénétique des sept espèces de tortues marines. Adapté de Naro-Maciel et al. (2008)

La tortue verte est apparue il y a environ 35 millions d'années, l'espèce a donc vécu plusieurs changements climatiques important, alternant des périodes glaciaires qui ont conduit à la restriction de son habitat, et des périodes interglaciaires qui ont donné

l'opportunité de coloniser de nouveaux territoires (Bowen and Karl, 2007; Reece et al., 2005). Dans l'océan Atlantique, les populations présentes ont montré une expansion synchronisée avec la fin du Dernier Maximum Glaciaire (DMG) (il y a env. 26500 – 19000 ans) qui indique une colonisation de cet océan par de nouvelles voies ouvertes avec le réchauffement des eaux et l'augmentation des niveaux marins (Reid et al., 2019). Les populations de l'Indopacifique ont connu une histoire démographique plus stable, facilitée par des températures moins variables tout au long du **Pléistocène** (-2.5M à -11500 ans).

Onze **lignées mitochondriales** sont reconnues chez la tortue verte (Jensen et al., 2019). Certaines sont endémiques à une région : les lignées V et VI dans l'océan Pacifique Sud-Ouest (Boissin et al., 2019), la lignée VII dans l'océan Pacifique Nord-Ouest, et les lignées X et XI dans le Nord-Ouest de l'océan Indien (Figure I.3). Ces lignées endémiques témoignent de refuges climatiques passés lors du DMG, tandis que les autres lignées, communes à plusieurs océans, sont le fruit de colonisations récentes (Hamabata et al., 2014). La région de l'Indopacifique a ainsi servi de refuge climatique à l'espèce pendant les périodes glaciaires, et d'origine ensuite pour la colonisation des autres océans (Jensen et al., 2019). La diversité génétique des tortues marines y est aussi plus importante, qualifiant la région de « hotspot » de diversité génétique (Boissin et al., 2019; Reid et al., 2019).

Aujourd'hui la tortue verte est présente dans toutes les eaux tropicales et tempérées du globe. Le Rapport VI du State of the World's Sea Turtles (SWOT) a cartographié en 2011 tous les sites de ponte connus de l'espèce dans le monde (Annexe I) (SWOT Scientific Advisory Board, 2011). Plus de 1100 sites ont été cartographiés, et s'étendent de la Turquie pour les plus septentrionaux, au Sud de Madagascar pour les plus méridionaux. Leur taille est extrêmement variable, d'une dizaine à plus de 50 000 nids par site.

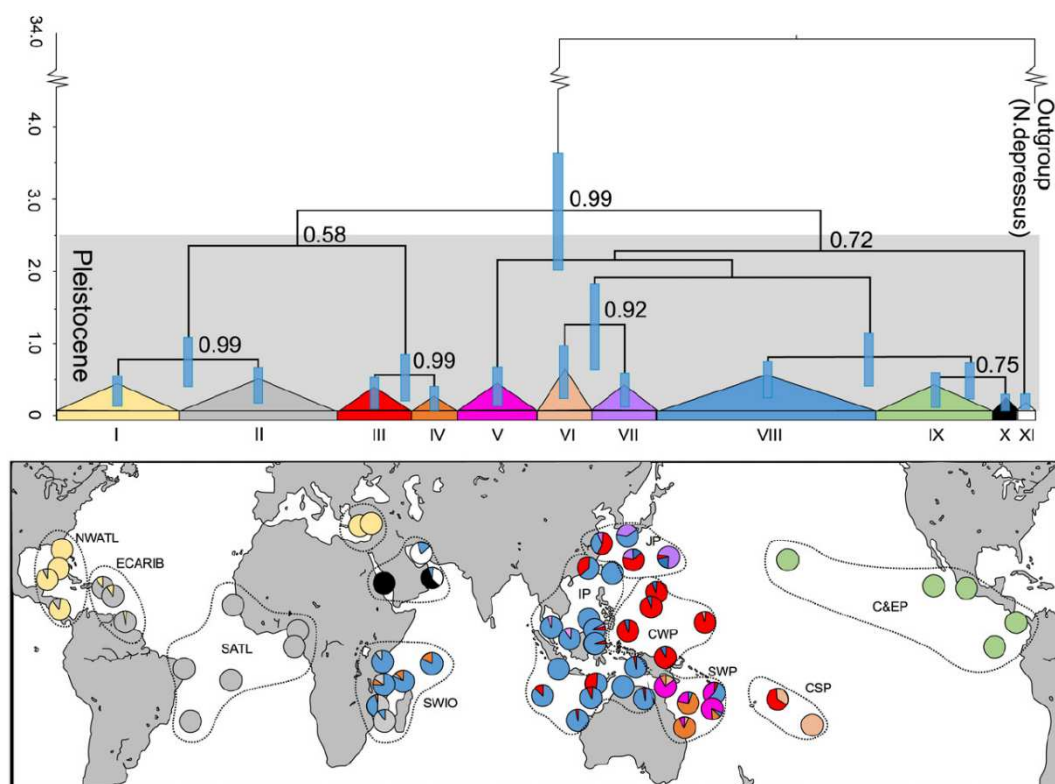


Figure 1.3 Arbre phylogénétique de la tortue verte, *Chelonia mydas*, construit à partir de la région contrôle de l'ADN mitochondrial. Les nombres au-dessus des branches correspondent à la probabilité (bayésienne) de la branche, les barres bleues montrent l'intervalle de confiance 95% sur la temporalité des nœuds de divergence de l'arbre par rapport à l'échelle en million d'années. La carte montre la répartition de ces lignées dans le monde. Les principales régions évolutivement distinctes sont regroupées par les lignes en pointillés. Les noms associés aux abréviations sont disponibles dans la liste des abréviations. Jensen et al. (2019)

b. Cycle de vie

Les tortues vertes commencent leur vie dans des nids pondus sur les plages. En moyenne, un nid contient entre 60 et 120 œufs (voir Pilcher, 2021, pour une revue détaillée pour l'océan Pacifique). La période d'incubation varie entre 5 et 8 semaines en fonction de la température dans le nid (Spotila, 2004). En effet, toutes les tortues marines sont des espèces dont le sexe à la naissance est déterminé par la température d'incubation de l'œuf (espèces TSD, temperature-dependant sex determination). Chez les tortues vertes, une température élevée amène à la production d'une majorité de femelles, alors que les températures plus faibles entraînent un déterminisme mâle du développement embryonnaire (Standora and Spotila, 1985). La température pivot, à laquelle autant de mâles et de femelles sont produits, varie en fonction des sites de ponte et se situe autour de 28-29°C (Candan and Kolankaya, 2016; Godfrey and Mrosovsky, 2006; Godley et al., 2002; Limpus, 2008). A la naissance, les émergentes

mesurent environ 8 cm, et cherchent à rejoindre la haute mer dès l'éclosion (Figure I.4). Le succès d'éclosion est variable et dépend à la fois de facteurs environnementaux (température, prédation, aléas climatiques, etc.) et individuel (malformations, embryons non viables, etc.) (Pilcher, 2021). Dans l'océan Pacifique, il varie d'environ 45% aux Galapagos (Zarate, 2013) à plus de 90% en Nouvelle Calédonie et en Polynésie française (Read et al., 2014; Touron et al., 2018). Le taux de survie des émergentes est difficilement estimable une fois la plage quittée, et des études en Australie ont mesuré un taux de survie de 40 à 80% (Gyuris, 1994; Limpus, 2008), mais cette valeur n'est pas généralisable tant les facteurs influençant la survie peuvent être variables.

Les émergentes passent ensuite les premières années de leur vie dans l'habitat pélagique, où les courants ainsi que leur capacité de nage définissent leur trajectoire (Bolten, 2003; Mansfield et al., 2017). A ce stade, elles ont un régime omnivore (Arthur et al., 2008). Ces premières années de vie sont souvent appelées les 'années inconnues' ('lost years' dans la littérature), car très peu d'informations sur leurs migrations et leur écologie sont disponibles pendant ces années-là (Hughes, 1970). Cela est notamment dû au fait qu'il est difficile de les suivre par marquage satellite à cause de leur petite taille, à l'immensité de l'habitat qu'elles occupent, et à la durée de cette phase pélagique – entre 5 et 10 ans (Bolten, 2003). On sait cependant que la dispersion des juvéniles en milieu pélagique peut s'étendre sur plusieurs milliers de kilomètres, mais elle peut aussi être beaucoup plus limitée. Hamabata et al. (2016) ont retrouvé, par des approches génétiques, l'origine de juvéniles (n=13) échantillonnés dans les eaux côtières japonaises, et ont conclu qu'ils provenaient de populations du Japon. La dispersion de ces juvéniles a donc été limitée aux eaux territoriales. A l'inverse, des tortues caouannes émergentes équipées de balises satellites au Brésil ont été retrouvées à plus de 4000km plus au Nord après un mois, montrant une grande capacité de dispersion (Mansfield et al., 2017).

Après cette phase pélagique, les juvéniles s'installent sur des aires d'alimentation côtières (Figure I.4). À ce stade, ils mesurent entre 35 et 40 cm (curved carapace length, CCL) pour les populations du Pacifique (Limpus et al., 2005), mais uniquement entre 20 et 25 cm en Atlantique (Bjorndal and Bolten, 1988). C'est aussi pour eux un moment de changement de régime alimentaire, passant d'un régime omnivore à un régime herbivore (Arthur et al., 2008). La tortue verte est la seule espèce de tortue marine herbivore à l'âge adulte (Lutz and Musick, 1997). Les juvéniles peuvent être fidèles à leur site d'alimentation (López-Castro et al., 2010), ou changer de sites au cours de leur vie (Hayashi and Nishizawa, 2015).

Au moment de la reproduction, lorsque les tortues deviennent sexuellement matures entre 20 et 50 ans, mâles et femelles migrent vers des aires de reproduction (Figure I.4) (Chaloupka et al., 2004). Ces aires peuvent être proches des plages de naissance (Broderick et al., 2003), ou des sites d'alimentation (Limpus, 1993). Pour beaucoup de populations, les aires de reproduction ne sont pas bien connues (Ye et al., 2020). Lorsqu'elles sont connues, il a été observé que les mâles arrivent en premier sur les sites, et restent sexuellement actif pendant environ un mois (Limpus, 1993). Pendant cette période, ils recherchent activement l'accouplement et peuvent avoir un comportement agressif envers les femelles et les autres mâles (Booth and Peters, 1972). Ils peuvent s'accoupler avec plusieurs femelles (polygynie), et ils quittent l'aire de reproduction en général avant la fin de la saison de ponte pour repartir sur leur site d'alimentation (Broderick et al., 2003). Leur comportement reproducteur est variable, ainsi ils peuvent visiter plusieurs aires de reproduction et ainsi s'accoupler avec des femelles de populations différentes dans la même saison (Wright et al., 2012b), ou être fidèles à leurs aires de reproduction (FitzSimmons et al., 1997a). Quant aux femelles, elles s'accouplent en général avant les premières pontes, avec un ou plusieurs mâles, et sont sexuellement actives pendant environ une semaine (Broderick et al., 2003). L'accouplement avec plusieurs mâles (polyandrie) ne semble pas apporter de bénéfice en termes de **fitness** de la progéniture (nombre d'œufs dans les nids, d'émergentes, d'embryons non viables, taille des émergentes, etc.), et les études les plus récentes admettent que ce comportement semble plutôt être le fruit d'un compromis entre deux actions coûteuses en énergie : se reproduire ou refuser les sollicitations répétées des mâles. Ainsi, le taux de polyandrie semble plus élevé dans les populations où la densité de population sur les aires de reproduction est grande et où l'on retrouve une plus grande concentration de mâles (Lee et al., 2018).

Après l'accouplement, les femelles viennent pondre sur leur plage de naissance (**natal homing**). La distance entre les sites d'alimentation et les plages de ponte peuvent être de plusieurs milliers de kilomètres. Par exemple, les tortues vertes qui pondent sur l'Île de l'Ascension au milieu de l'Atlantique ont leur site d'alimentation sur les côtes du Brésil à plus de 2000km (Hays et al., 2002). Les femelles pondent plusieurs nids pendant une même saison qui s'étend sur plusieurs mois et sont capables de stocker le sperme de sorte que les accouplements précédant les pontes sont suffisants pour féconder tous les œufs d'une même saison (Pearse and Avise, 2001) (Figure I.4). En moyenne, les femelles pondent environ 3 nids par saison, mais cela varie selon les populations (Pilcher, 2021). Sur la population de French Frigate Shoals (Hawaï, Pacifique Centre Nord), Balazs (1980) a rapporté une fréquence de ponte de 1.8 nid par femelle par

saison, alors que sur les îles Mariannes Nord (Pacifique Centre Ouest) cette fréquence est de 7 ± 1.3 nids par femelle par saison (Summers et al., 2018), et de 4.1 aux Îles Ogasawara du Japon (Seminoff et al., 2015). De la même façon, l'intervalle entre les pontes est en moyenne de 12 jours, mais varie d'une population à l'autre, ainsi qu'en fonction de la température de l'eau (Robinson et al., 2022). Dans les populations évoluant à des températures chaudes (27-29°C), l'intervalle de ponte est le plus court (9-15 jours) et il augmente pour les populations évoluant dans les eaux plus froides, notamment au Japon (17-23 jours pour une eau à 22°C). Shimada et al. (2021) ont aussi noté une augmentation de l'intervalle de ponte corrélé à un refroidissement des eaux au cours de la saison de pontes chez une population de la mer Rouge.

Après la période de reproduction et de ponte, qui est donc plus longue chez les femelles que les mâles, les tortues vertes reviennent vers leur site d'alimentation (Figure I.4). La fréquence de reproduction est réputée plus grande chez les mâles que les femelles (Hays et al., 2014), du fait de l'énergie moindre qu'ils déploient dans cette phase (Balazs, 1983). Ainsi, les mâles peuvent s'accoupler annuellement alors que ça n'a pas été observé chez les femelles, dont la fréquence de reproduction se situe entre 2 et 6 ans (Limpus, 2008; Summers et al., 2018).

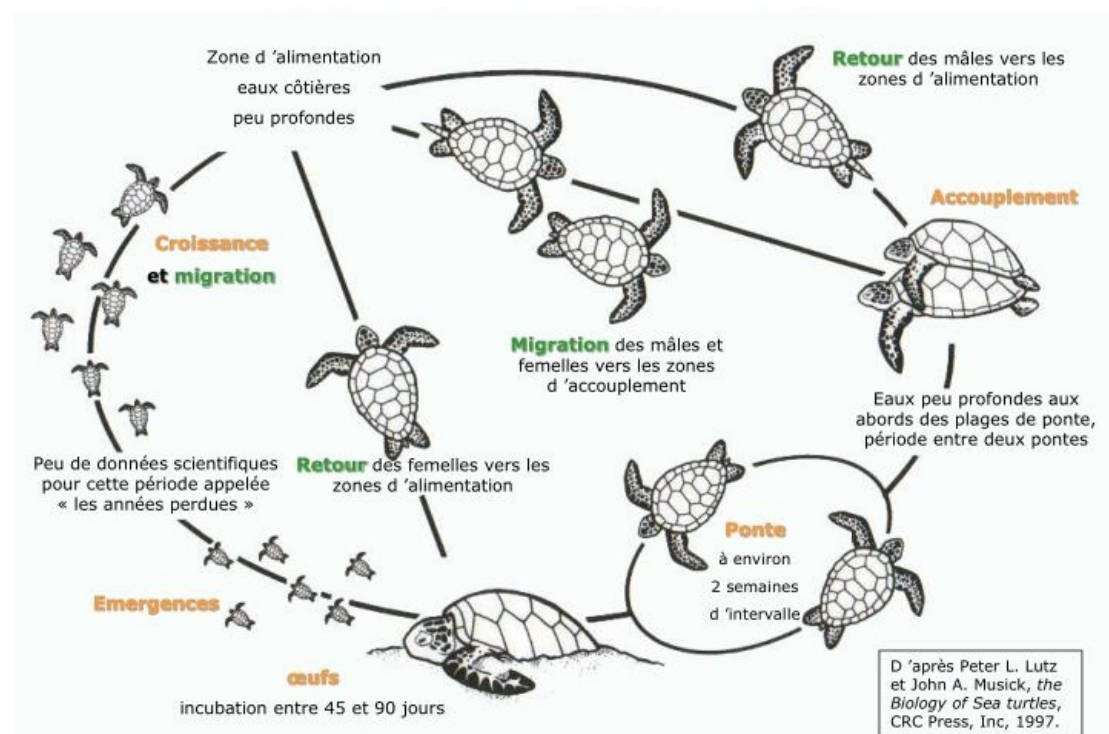


Figure I.4 Cycle de vie des tortues vertes, *Chelonia mydas*

c. Structure génétique

Ce cycle de vie particulier, et notamment la fidélité aux sites de reproduction et de ponte (**philopatrie**), entraîne une structure génétique complexe au niveau mondial. En effet, si la structure génétique des lignées mitochondriales reflète l'histoire des colonisations, des expansions et des rétractations dans les refuges climatiques passées, elle est aussi fortement modelée par les comportements reproducteurs de l'espèce. Le natal homing chez les femelles favorise un isolement démographique et une structure génétique entre les différentes **colonies** de tortues vertes à travers le monde (Dutton et al., 2014 ; Jensen, FitzSimmons, et Dutton, 2013 ; Nishizawa et al., 2011). Cette structure génétique est révélée par le marqueur génétique de la région contrôle de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Il est utilisé pour délimiter des groupes de colonies génétiquement isolés, correspondant à une population. Par exemple dans l'Atlantique, deux populations ont été détectées sur la côte de Floride avec ce marqueur (Shamblin et al., 2015a). Dans le Pacifique, Dethmers et al. (2006) ont identifié 17 populations dans la région australasienne située entre la Malaisie, la Micronésie, la Nouvelle Calédonie et l'Australie. La distance géographique à partir de laquelle des colonies sont assez différentes génétiquement pour appartenir à des populations distinctes est variable. Dutton et al. (2014b) ont montré que des populations distinctes émergeaient à partir de 500 km d'éloignement entre les colonies dans les îles du Pacifique. Bourjea et al. (2007) a trouvé une échelle similaire dans les îles du canal du Mozambique dans l'Océan Indien. Cependant, Nishisawa et al. (2011) ont trouvé une différence génétique significative entre des colonies éloignées d'uniquement 60km au Japon, et Shamblin et al. (2015a) ont différencié des sites de ponte éloignés de moins de 40km avec ce marqueur en Floride.

Si le marqueur mitochondrial permet de différencier des populations en fonction du comportement philopatrick des femelles, il n'est pas informatif en ce qui concerne le comportement des mâles. Il a été suggéré que ceux-ci seraient les principaux vecteurs des flux génétiques entre les populations (Karl et al., 1992). En effet, plusieurs populations distinctes se retrouvent généralement sur les sites d'alimentation (Jensen et al., 2016 ; Jordão et al., 2015 ; Joseph et al., 2016 ; Read et al., 2015). Un brassage génétique est alors possible si des accouplements inter-populations ont lieu près de ces zones d'alimentation, ou le long des corridors migratoires (Bowen et al., 2005 ; FitzSimmons et al., 1997b). Roberts et al. (2004), en étudiant avec 4 marqueurs microsatellites les flux de gènes véhiculés par les mâles, concluent en effet que les populations intra-océaniques présentent un certain degré de connectivité. En accord

avec Karl et al. (1992), et Bowen et al. (1992), cette étude se base cependant sur uniquement 4 **loci** et laisse certains doutes sur le pouvoir discriminant de l'analyse. À l'inverse, avec 8 marqueurs microsatellites et 29 SNPs, Roden et al. (2013), mettent en avant une différenciation significative entre les colonies dans le Pacifique, et argumentent en faveur d'un comportement également philopatrick des mâles limitant également les flux de gènes entre colonies. Bradshaw et al. (2018) trouvent aussi des différences significatives entre certaines populations en Méditerranée avec 13 microsatellites, et suggèrent un comportement philopatrick des mâles, mais plus faible que celui des femelles. Ces études sont également en accord avec les conclusions de FitzSimmons (1997b) sur la grande barrière de corail en Australie. Cependant, en Afrique de l'Ouest, des mâles ont été observés par suivi satellite visitant plusieurs aires de reproduction, argumentant en faveur d'un brassage génétique entre populations (Beal et al., 2022). Il est vraisemblable que les deux comportements coexistent à des degrés différents selon les populations. La structure des populations de tortue verte au niveau mondial apparaît donc complexe, et comprendre le degré de connectivité entre les populations est important pour implémenter des mesures de conservation.

d. Déclin et menaces

i. *Déclin des populations des siècles passés*

La tortue verte est classée comme 'En Danger' sur la liste rouge des espèces menacées de l'UICN (Seminoff, 2004). Cet état est dû principalement à l'exploitation commerciale qui en a été fait jusqu'au siècle dernier, et qui a conduit à une diminution importante du nombre annuel de femelles en ponte, de 48% à 67% globalement (Seminoff, 2004). Certaines populations ont été exploitées jusqu'à la quasi extinction, comme celle d'Hawaii, mais cette tendance a été renversée par une protection stricte (Balazs and Chaloupka, 2004). Aujourd'hui, la population d'Hawaii n'est plus considérée comme menacée (classée 'Préoccupation Mineure' par l'UICN) (Chaloupka and Pilcher, 2019), tout comme les populations de l'Atlantique Sud (Broderick and Patricio, 2019). Cependant, alors que l'espèce est composée de nombreuses populations aux dynamiques différentes et avec des niveaux de menaces variés, les évaluations de l'UICN ne reflètent pas cette variabilité puisque les seules évaluations régionales ont été réalisés pour les populations d'Hawaii, de l'Atlantique Sud, et du Nord de l'océan Indien (classé 'Vulnérable') (Mancini et al., 2019).

ii. Menacées par les captures accidentelles et l'exploitation directe

Dans le Pacifique, il n'y a plus aujourd'hui d'exploitation à des fins commerciales autorisée (Pilcher, 2021), bien qu'un certain nombre de menaces soient encore présentes. En plus des mortalités naturelles liées aux prédateurs et aux pathogènes, les tortues marines sont menacées par des facteurs anthropiques tels que les prises accidentelles et l'exploitation directe.

Les captures accidentelles des pêcheries sont considérées comme la menace la plus importante pour les tortues marines aujourd'hui (Wallace et al., 2011), même si le taux de mortalité des tortues liées aux prises accidentelles est difficile à quantifier du fait du manque de données rapportées (Pilcher, 2021). La pêche industrielle à large échelle, plutôt océanique, et la pêche artisanale plus côtière, menacent ces espèces à des niveaux quasiment égaux dans certains cas (Lewison and Crowder, 2007; Peckham et al., 2007). La pêche à la palangre et la pêche à la seine sont les techniques les plus meurtrières (Pilcher, 2021). Dans le Pacifique Ouest, toutes pêcheries confondues, plusieurs centaines de captures accidentelles de tortues vertes ont été rapportées chaque année entre 2003 et 2016 (review dans Pilcher, 2021). Dans le Pacifique Est, les niveaux estimés sont beaucoup plus haut, autour de 2 400 prises annuelles (Alfaro-Shigueto et al., 2011).

Par ailleurs, bien que le commerce de tortues vertes soit interdit dans le Pacifique, la consommation est encore d'actualité. Dans de nombreuses régions la consommation de tortues fait partie des traditions et des coutumes (Allen, 2007; Rudrud, 2010), et certains pays autorisent leur consommation dans ce contexte (Maison et al., 2010). Quantifier le nombre de tortues capturées pour la consommation locale est difficile car i) les prises, qu'elles soient légales ou illégales, sont rarement documentées, et ii) un relativement petit nombre de tortues occupent un vaste territoire composé de multitudes d'atolls et d'îles isolées, ce qui empêche un comptage systématique (Pilcher, 2021). Cependant dans les Îles Mariannes du Nord, Summers et al. (2018) ont estimé une réduction de la croissance de la population annuelle de 7.4% à 11.4% due à la capture d'environ 32% des femelles pondeuses. Senko et al. (2022) ont estimé à 560 000 le nombre de tortues vertes capturées illégalement entre 1990 et 2020 dans le monde, avec cependant une réduction de ce nombre sur la période 2010-2020. Ce chiffre considère la capture à des fins à la fois de consommation locale et de commerce international.

iii. Menacées par le développement côtier

La perte d'habitat est une menace pour de nombreuses espèces (Cushman, 2006). Pour les tortues marines, cette menace est surtout présente au niveau des plages, et impacte les femelles en ponte, les nids, et les émergentes. L'érosion des plages est souvent la conséquence du développement des infrastructures côtières (Lutcavage, 1996). Cela peut être des infrastructures privées avec la construction d'habitations sur le bord de mer, ou des infrastructures publiques telles que des digues, jetées, ou routes (Kim et al., 2011; Komar, 1983). Cette érosion diminue la capacité des plages à abriter les pontes et a pu conduire à la diminution du nombre de nids pondus. De plus, elle augmente le risque de destruction des nids (Mazaris et al., 2009), d'autant plus lorsqu'elle est couplée à une présence humaine soutenue (véhicules, nettoyage des plages, etc.) (Lutcavage, 1996). Mosier et al. (2002) ont montré que les femelles de tortues caouannes en Floride pondent moins de nids sur une plage située devant une digue que sur une plage sans cette infrastructure. De plus, certaines installations visant à protéger les littoraux de la montée du niveau marin contribuent à l'enrochement des plages, et donc limitent l'accès aux sites de ponte (Komar, 1983).

Par ailleurs, l'artificialisation des espaces côtiers entraîne une pollution lumineuse qui peut désorienter les émergentes au moment de l'éclosion (Verheijen and Wildschut, 1973). Ceci peut avoir un impact sur la survie des émergentes en les exposant plus longtemps aux prédateurs terrestres (Pankaew and Milton, 2018), cependant il semblerait que cet impact ne se traduise pas systématiquement en une diminution de la population dans la mesure où les stades émergents sont naturellement exposés à des mortalités très importantes. Par exemple, au Brésil le nombre de tortues marines a augmenté depuis 1992 malgré une augmentation de l'exposition des plages aux lumières artificielles, impliquant que les efforts de conservations ont été efficaces malgré l'augmentation de cette menace (Colman et al., 2020).

iv. Menacées par le réchauffement climatique

Les conséquences du réchauffement climatique peuvent avoir de multiples impacts sur les populations de tortues. La fréquence plus élevée des tempêtes peut en effet contribuer à la destruction des nids sur le court terme, et à l'érosion des plages sur le long terme, tandis que l'augmentation du niveau de la mer peut amener à la réduction, voire à la disparition des plages, notamment dans les petits atolls et îles où l'altitude maximale n'est que de quelques mètres. De plus, les tortues marines étant des espèces TSD (le sexe est déterminé par la température du nid), il y a un risque réel que

l'élévation des températures amène à la féminisation des populations. Par exemple, Jensen et al. (2018) a estimé que 97% des tortues verte originaires du Nord de la Grande Barrière de Corail étaient des femelles, avec une augmentation de ce pourcentage chez les juvéniles comparé aux subadultes et adultes. Ce niveau de féminisation sur les 20 dernières années est préoccupant, d'autant qu'il s'agit d'une des plus grandes populations de tortues vertes dans le monde. Une tendance similaire est attendue dans d'autres populations en mesurant la température du sable à laquelle les œufs sont potentiellement exposés (par ex. Tanabe et al., 2020). Par ailleurs, l'augmentation des températures dans le nid au-dessus de 34°C peut aussi entraîner un taux de mortalité plus élevé des embryons (Summers et al., 2018). Cependant, l'espèce, qui a survécu à plusieurs changements climatiques majeurs au cours des derniers 150 000 ans, a démontré des capacités d'adaptation à des régimes plus chauds. Notamment, en Polynésie Française sur Tetiaroa, un allongement de la période de ponte vers les mois plus froids a été observé sur les 10 dernières années (Touren et al., 2018), ce qui pourrait compenser le réchauffement global. Le sex-ratio à la naissance de cette population est estimé égal entre les mâles et les femelles, à partir des relevés de température effectués dans les nids (Laloë et al., 2020). Des événements extrêmes de pluies, prédits plus fréquents à l'avenir, pourraient aussi compenser cette hausse de température et conduire à la production de mâles (Laloë et al., 2021). Cependant, la vitesse du changement climatique est environ quatre fois plus importante aujourd'hui que par le passé, et à cela s'ajoutent les autres pressions anthropiques, ce qui conduit à un scénario de changement inédit où l'adaptation des espèces est difficilement prédictible (Pilcher, 2021).

v. Menacées par la pollution

La pollution est aussi une menace pour les tortues marines à différents niveaux. La pollution liée aux macro-déchets (plastiques, filets fantômes, etc.) peut causer des problèmes, soit par ingestion de matière non digérable, soit par enchevêtrement. L'enchevêtrement dans les filets fantômes touche particulièrement les juvéniles en phase pélagique. Cette mortalité est considérée comme plus impactante que le réchauffement climatique et l'exploitation directe, mais moins que les captures accidentelles et l'ingestion de plastiques (Duncan et al., 2017). L'ingestion de plastique toucherait 52% des tortues dans le monde, dans tous les océans mais avec des variations considérables entre les régions (Schuyler et al., 2016). Par exemple, 90% des tortues vertes au Brésil présentent des preuves d'ingestion de plastique (González

Carman et al., 2014). Toutes les classes d'âge sont concernées par l'ingestion de plastiques, mais les juvéniles en phase pélagique sont particulièrement exposés (Schuyler et al., 2012),.

Les pollutions chimiques (ex. métaux lourds, polluants organiques) sont également des facteurs diminuant la survie des individus à long terme. Les tortues marines ayant une longue espérance de vie, elles accumulent les polluants chimiques dans leurs organes tout au long de leur vie, principalement à travers leur alimentation (Arienzo, 2023). Cette accumulation augmente leur niveau de stress physiologique et dégrade leur système immunitaire, augmentant le risque de maladies (Komoroske et al., 2012), même s'il reste difficile d'établir avec certitude un lien de causalité avec la mortalité des individus (Kaska et al., 2004). Les études sur les effets de l'exposition prolongée des tortues marines aux polluants chimiques sont encore peu nombreuses, et il est encore difficile d'avoir une bonne compréhension de l'impact de cette pollution sur ces espèces (Arienzo, 2023; Wallace et al., 2011).

e. Protection et réglementation à différents niveaux

i. *Les différents niveaux de gestion*

Les différentes dynamiques et l'isolation génétique des populations au niveau mondial a conduit à la construction d'**unités de gestion régionales** pour les tortues marines (RMUs), à une échelle cohérente avec leurs migrations et connections génétiques (Wallace et al., 2010). Cette échelle distingue des unités régionales formées de plusieurs populations sur la base de différences génétiques, géographiques, migratoires, et démographiques. Elle permet d'évaluer les risques et les menaces à un niveau plus global que celui d'une population, mais plus précis que celui de l'espèce. Dans le monde, 17 RMUs ont été définies, dont 7 dans le Pacifique : Nord-Ouest, Est, Centre Nord, Centre Sud, Sud-Ouest, Centre Ouest, Ouest et Asie du Sud-Est (Figure I.5). Ce système de division s'inspire du système de « segments de populations » (distinct population segment, DPS) implémenté dans le Endangered Species Act (ESA) des USA pour l'évaluation du statut des populations (Seminoff et al., 2015). Les DPS et RMUs se correspondent pour la majorité d'entre eux (Wallace et al., 2010).

A plus fine échelle, on retrouve le concept d'**unité de gestion** (MU, différent de RMU) et qui définit une MU comme étant une population génétiquement isolée des autres (Moritz, 1994). Les MUs ont été distinguées en fonction des divergences génétiques au niveau de l'ADNmt. Elles correspondent à une ou plusieurs **colonies**

(femelles pondant sur une même plage) génétiquement indifférenciées. Généralement, la gestion d'une MU se fait à l'échelle d'un pays. La Figure I.6 résume les différents niveaux de distinctions appliqués à la gestion des populations de tortue verte.

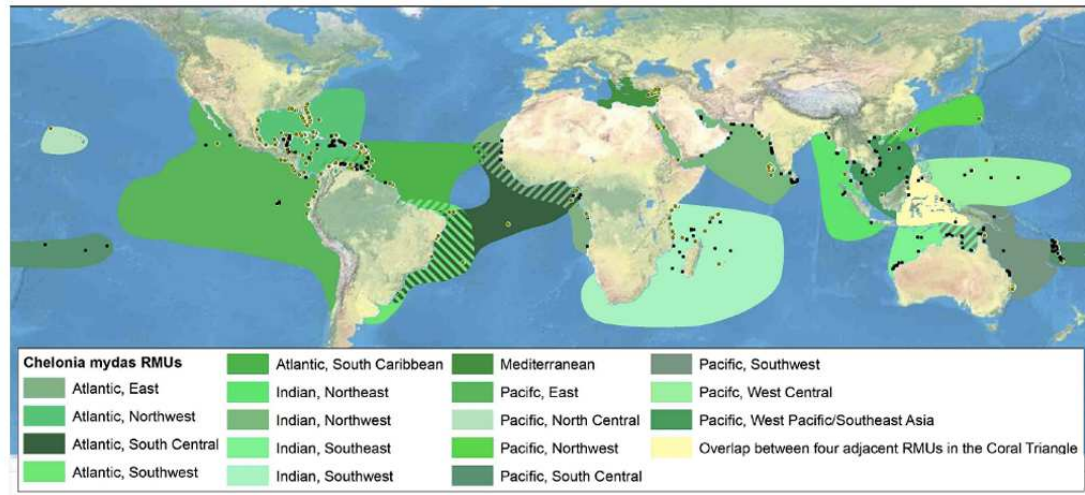


Figure I.5 Unités de gestion régionales (RMUs) dans le monde pour la tortue verte.

ii. Les organes de protection

Les RMUs et MUs sont aujourd'hui les unités de gestion globalement utilisées pour définir les dynamiques des populations. Cependant dans les faits, les tortues vertes sont protégées par des législations au niveau international, régional, et local dans la majeure partie de leurs habitats. Le commerce, la détention, et la consommation sont interdits dans le Pacifique, à l'exception de quelques pays qui autorisent encore la consommation locale traditionnelle (Maison et al., 2010).

Au niveau international, plusieurs conventions protègent l'espèce et les habitats essentiels de l'espèce. Les principales sont la Convention sur le Commerce International des Espèces Menacées (CITES, 1973) et la Convention sur les Espèces Migratrices (CMS, 1979). La tortue verte est listée en Annexe I de la CITES, qui en interdit le commerce international depuis 1981, et en Annexe I de la CMS depuis 1971, qui définit les obligations des pays signataires envers les espèces listées. Pour les espèces de l'Annexe I, les pays doivent en interdire le prélèvement, conserver et restaurer leur habitat, et diminuer les obstacles à leur migration. La Convention sur la Diversité Biologique de l'ONU (CBD, 1992) et la Convention du Patrimoine Mondial de l'UNESCO (1972) s'appliquent aussi à la tortue verte. Dans le Monde 184 pays sont signataires de la CITES (dont 25/30 dans le Pacifique), et 133 de la CMS (13/30 dans le Pacifique).

Au niveau régional dans le Pacifique, il existe 8 programmes de conservation et de gestion applicables aux tortues marines et à leurs habitats. Les trois plus importants sont la Commission des pêches du Pacifique occidental et central (WCPFC, 2004) qui s'est engagée à réduire les captures accidentelles de tortues (CMM 2018-04), l'Agence des Pêches du Forum des Îles du Pacifique (FFA, 1979) qui coordonne la coopération régionale en matière de pêche durable, et le Secrétariat du Programme environnemental régional du Pacifique (SPREP, 1993) qui a développé un Plan d'action tortues marines depuis 2008 pour identifier et favoriser les actions de conservation et la recherche (SPREP 2022). Trente pays sont parties-prenantes d'une de ces organisations régionales, et agissent pour la réduction des menaces sur les tortues vertes et le maintien des populations.

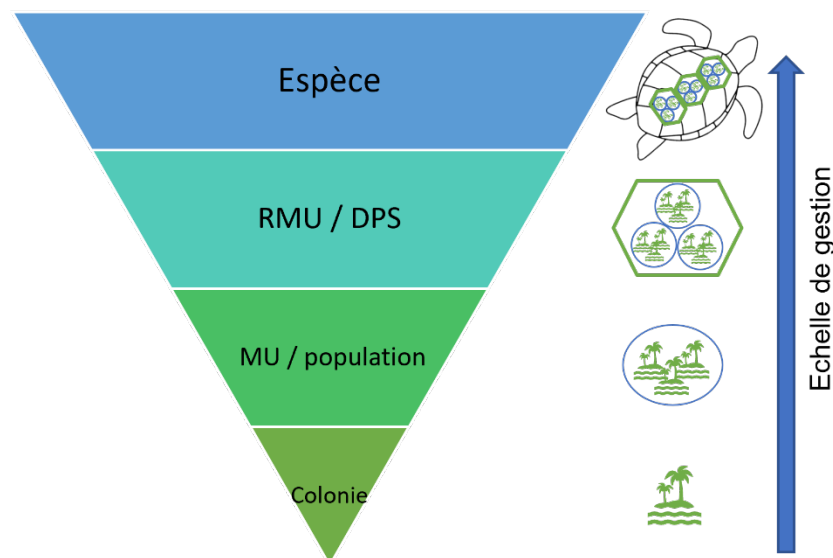


Figure I.6 Schéma des différentes échelles de gestion pour les populations de tortues vertes dans le monde.

IV. Les populations de tortue verte en Polynésie

a. Préambule

La Polynésie française est un territoire composé de 118 îles, dont 76 habitées, réparties sur 5 archipels au centre du Pacifique dans l'hémisphère Sud : la Société, les Tuamotu, les Marquises, les Australes, et les Gambier (Figure I.7). L'archipel de la Société est divisé en deux groupes d'îles : les Îles du Vent à l'Est, et les Îles sous le Vent à l'Ouest. L'île principale, Tahiti, fait partie des Îles du Vent. La Polynésie française s'étend sur une superficie de plus de 5 millions de kilomètres carrés – comparable à la superficie de l'Europe – et comporte 280 000 habitants. Sur cette surface, la part de

terres émergées ne représente que 3500 km², c'est à dire environ la taille de la moitié de la Corse.

b. État des connaissances sur les populations

Cinq espèces de tortues marines sont présentes, et la tortue verte est de loin la plus abondante. C'est aussi la seule qui pond régulièrement avec des pontes déjà observées sur plusieurs îles : Tupai, Maupiti, Motu One, Bora Bora, Mopelia, Scilly, et Motu One dans les Îles sous le Vent, et Tetiaroa dans les Îles du Vent (Maison et al., 2010). En l'état actuel des connaissances, les sites majeurs de ponte sont Tetiaroa (Touron et al., 2018), Scilly, Motu One, et Mopelia (Balazs et al., 1995). Dans les années 1990, il avait été estimé qu'environ 1 000 femelles venaient pondre annuellement en Polynésie, et ceci constitue l'évaluation globale la plus récente (Groombridge and Luxmoore, 1989; Seminoff et al., 2015). A Scilly jusqu'au début des années 1990 environ 300 à 400 femelles étaient estimées (Balazs et al., 1995). A Tetiaroa, on évalue à environ 120 le nombre de femelles qui viennent pondre par saison, avec toutefois une forte variabilité annuelle et une augmentation au fil des ans (Touron et al., 2018). D'autres sites moins importants en abondance à ce jour ont été rapportés, notamment à Tikehau et Fakarava dans les Tuamotu, et à Maupiti dans les îles sous le Vent (Tayalé, 2007). Des mâles et des femelles en reproduction ont aussi été observés près des plages de Scilly et de Tetiaroa (Balazs et al., 1995; Gaspar, pers. comm.), tandis que l'observation de juvéniles est commune dans le lagon de Moorea (Petit et al., 2012).

Si la Polynésie est un site de ponte pour cette espèce, certaines de ces tortues s'alimentent aux Fiji et migrent en Polynésie pour se reproduire. En effet des migrations vers l'ouest (Samoa Américaines, Vanuatu, et Fiji) ont été observées par marquage et recapture sur 11 femelles et 1 mâle depuis Scilly après la saison des pontes (Balazs et al., 1995), ainsi que par suivi satellite sur plusieurs femelles de Tetiaroa (SPREP ; DIREN, pers. comm.), et des juvéniles originaires de Polynésie sont présents sur les sites d'alimentation aux Fiji (Piovano et al., 2019). D'autres adultes en revanche semblent résidents du territoire (DIREN, pers. comm.).

c. Le rapport aux tortues

Les Polynésiens comme beaucoup d'autres populations insulaires du Pacifique ont un rapport ancestral aux tortues marines (Pilcher, 2021). Dans la mythologie Polynésienne, la tortue est un animal sacré, symbole de longévité, force, paix, fécondité et féminité (Brikke, 2010). Les premiers navigateurs Polynésiens suivaient ces animaux lors des traversées transpacifique pour augmenter leurs chances de trouver une terre, ce qui les conduisit à les vénérer comme l'incarnation des dieux de l'océan (Vucher-Visin et al., 2010). Elles symbolisaient aussi le passage entre le monde des vivants et le monde des morts et pour cela, les tortues vertes étaient consommées selon des rites particuliers. Aux Tuamotu, seuls les aînés étaient autorisés à en manger, tandis que dans les autres archipels, elles étaient réservées aux familles royales. Les autres personnes n'étaient pas autorisées à consommer de la viande de tortue sous peine de mort. Ce tabou religieux a été aboli par le roi Pomaré V dans les années 1890 sous la pression des missionnaires français qui ont cherché à interdire toute forme de culte non catholique (Vucher-Visin et al., 2010). La levée de cette interdiction a conduit à un accroissement de la demande en viande de tortue dans le pays, concomitant à la modernisation des techniques de pêches, qui a entraîné un déclin des populations de tortues de Polynésie (Vucher-Visin et al., 2010). La consommation de viande de tortue est devenue plus populaire, notamment lors des fêtes (mariages, **Heiva**, courses sportives, etc.) et beaucoup de Polynésiens aujourd'hui continuent de la consommer lors de ces événements pour perpétuer ces traditions (Brikke, 2010; Vucher-Visin et al., 2010). Malgré l'interdiction aujourd'hui en place, la viande de tortue reste très prisée (Brikke, 2010) et il existe des réseaux de braconnage qui sont recherchés et poursuivis par les autorités locales.

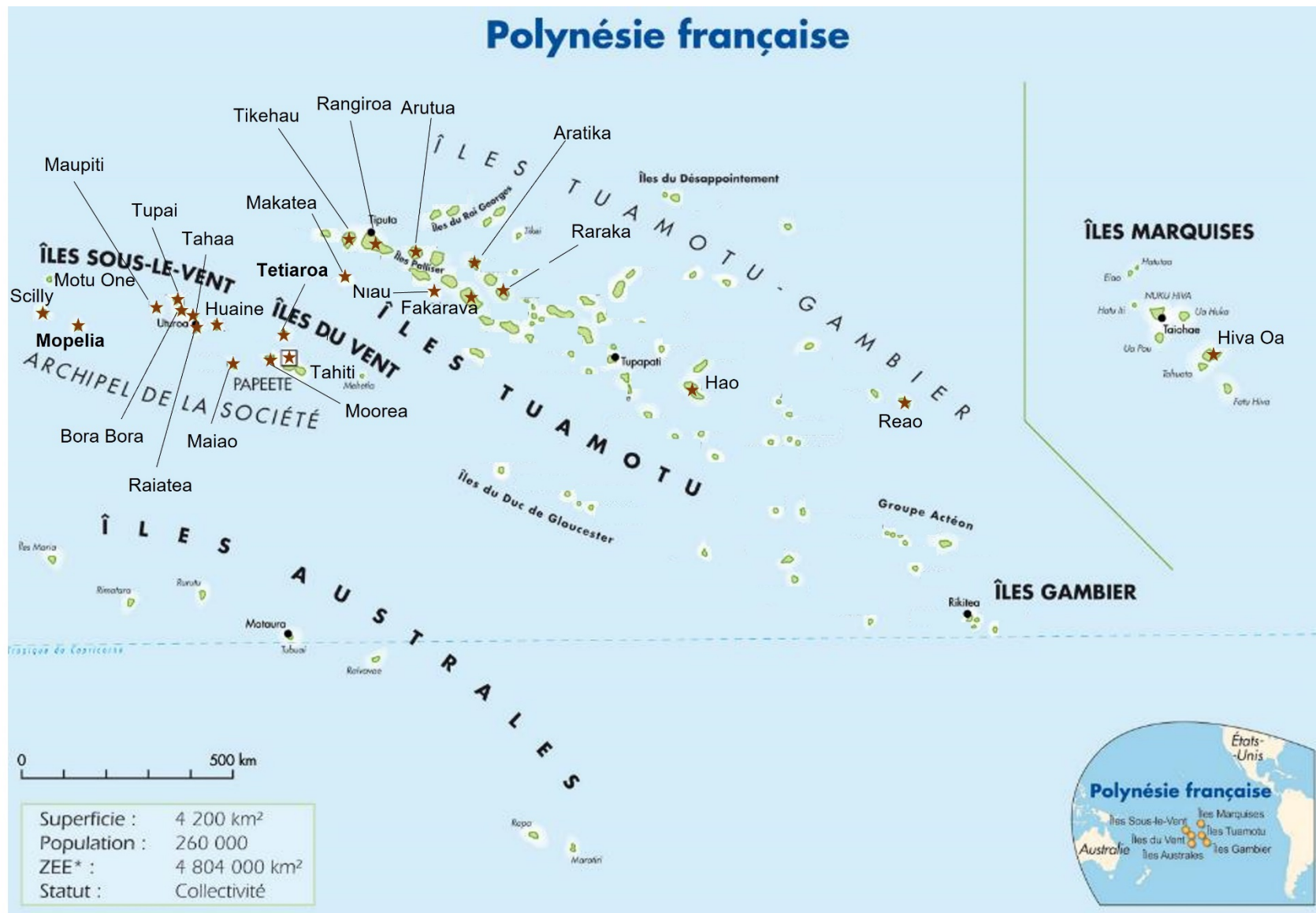


Figure I.7 Carte de la Polynésie française représentant les différents archipels. Les îles notées d'une étoile sont celles où des tortues vertes ont été échantillonnées, les îles en gras accueillent des campagnes d'échantillonnage régulières (voir chapitre II). * : Zone Économique exclusive.

d. La protection et les moyens de protection

Cette exploitation incontrôlée a entraîné un déclin du nombre de tortues observées dès les années 1930, jusqu'en 1970 (Maison et al., 2010). De ce fait, et en suivant les recommandations des conventions internationales mises en place dans les années 1970, le gouvernement de Polynésie française a instauré en 1990 une interdiction de capture, transport, détention, et commerce des tortues, des parties de tortues, et des œufs dans tout le territoire (délibération No. 90-83 AT du 13 Juillet 1990). De plus, l'atoll de Scilly est devenu une réserve marine pour les tortues dès 1971 (arrêté No. 2559 DOM). La Polynésie française est signataire du SPREP et fait partie du WCPFC (voir partie III.e.ii. *les organes de protection*), et applique les règles de la CITES. Cependant, le braconnage et la consommation de viande continuent d'exister. En 2010, 132kg de viande de tortue ont été saisis par les douaniers de Polynésie (Vucher-Visin et al., 2010), et on estime qu'entre 20 et 50 juvéniles étaient pêchés annuellement dans les Îles sous-le-Vent (Maison et al., 2010). Ce chiffre est vraisemblablement très sous-estimé étant donné les nombreuses saisies illégales relayées dans les journaux. À Maupiti et Tupai (Îles sous-le-Vent) des captures de tortues adultes étaient régulièrement observées entre 2000 et 2010 (Maison et al., 2010).

Les sanctions pour le braconnage de tortues marine peuvent aller jusqu'à 17,8 millions de Francs Pacifique (env. 150 000 euros), 2 ans d'emprisonnement, et la saisie du matériel ayant servi à l'infraction. Cependant, les populations ont le sentiment que les contrôles sont rares, laxistes, et un sentiment d'impunité couplé à une forte demande en viande de tortue favorisent la pratique (Brikke, 2010). De plus, le territoire très morcelé et peu densément peuplé ajoute une difficulté aux contrôles. On note cependant une pression plus importante sur les contrôles et les inspections ces dernières années qui semblent se montrer efficace avec une augmentation des observations de tortues.

De plus, une certaine partie de la population en Polynésie serait favorable à l'autorisation d'une pêche de subsistance, avec un quota de capture par île (Brikke, 2010; Vucher-Visin et al., 2010), mais les données scientifiques pour implémenter de telles mesures de gestion qui soient compatibles avec une préservation des populations de tortues manquent à ce jour. Notamment, le nombre de populations présentes sur le territoire, la connectivité entre les différentes îles, la taille de ces populations, leurs migrations, et leur vulnérabilité intrinsèque liée aux comportements reproducteurs et à leur diversité génétique sont encore largement inconnus. Dans un tel contexte, la législation axée sur l'interdiction totale de capture n'a pas changé, et continue de créer

des tensions avec certaines parties de la population qui revendiquent un droit à perpétuer leurs coutumes et traditions (Vucher-Visin et al., 2010).

V. Problématique et introduction des chapitres

Même si quelques travaux existent sur les tortues en Polynésie française (Boissin et al., 2019; Dutton et al., 2014b; Laloë et al., 2021; Touron et al., 2018), les populations de tortues vertes restent encore mal caractérisées. Ceci est dû en partie à la topologie du territoire, qui compte plus d'une centaine d'îles pour la plupart très peu habitées, rendant difficile les campagnes d'observation. D'autre part, aucune agrégation d'alimentation côtière n'a été identifiée au sein du territoire (bien que des juvéniles soient observés dans les lagons de certaines îles), rendant les observations possibles majoritairement pendant les périodes de ponte et d'éclosion, et donnant un accès direct à une partie de la population seulement. Au final, la structure des populations reste en grande partie inconnue et il est difficile de bien comprendre la dynamique des populations de tortues vertes en Polynésie dans ce contexte. Des analyses génétiques à partir d'échantillons sur les femelles et les nouveau-nés vont donc permettre de combler en partie ce manque d'information. L'approche génétique permet d'une part d'avoir accès à la composante mâle de la population sans avoir besoin de l'échantillonner, et d'autre part d'avoir une vision à long terme de la dynamique des populations, ce qui est d'une importance particulière pour la conservation de cette espèce, par ailleurs déjà protégée en Polynésie. De plus, cette approche n'a été utilisée que par Boissin et al. (2019) pour décrire les populations en Polynésie, mais avec un échantillonnage très partiel.

L'objectif de cette thèse est de fournir les informations relatives à la structure génétique, la diversité génétique, et le comportement reproducteur des populations de tortues vertes en Polynésie française. Ces informations contribueront à promouvoir et asseoir une base scientifique pour une bonne gestion des populations. Ainsi, ce projet de recherche s'inscrit dans la question centrale suivante : **Comment garantir une protection efficace des populations de tortues vertes *C. mydas* de Polynésie française ?** Cette question se décline en plusieurs sous-questions de nature à appréhender différents angles de recherche (Figure I.8):

1 - Quelle est la structure des populations de *C. mydas* en Polynésie française, en lien avec les autres populations du Pacifique ? Cet axe porte sur la structure au sein de la

Polynésie apportée par les femelles d'une part, et par les mâles d'autre part, et explore la connectivité génétique entre les populations de Polynésie et celles du Pacifique.

2 - Quel est l'état de vulnérabilité génétique de ces populations ? La vulnérabilité génétique est caractérisée à travers la diversité génétique et la taille efficace.

3 - Comment est-il influencé par les dynamiques de reproduction ? Cet axe décrit les stratégies de reproduction des mâles et des femelles et leur influence sur le niveau de consanguinité dans les populations.

Ces trois premières questions représentent le cœur du travail de ce projet, et permettent d'apporter des éléments de réponse à la question centrale, pour venir en appui aux mesures de gestion sur le territoire. Ces différentes questions sont appréhendées au travers d'une succession de chapitres (Figure I.8).

Le Chapitre II présente les méthodes utilisées pour répondre à ces questions. Dans un premier temps, il décrit l'effort d'échantillonnage déployé en Polynésie, et le résultat en termes d'échantillons disponibles pour les analyses. Il décrit également la base de données qui a été construite pour répertorier tout l'échantillonnage et qui va servir pour classer les échantillons dans le futur. Ensuite, il présente les différents marqueurs utilisés, et le développement de nouveaux marqueurs microsatellites utilisés dans les chapitres suivants.

Les Chapitres III et IV se focalisent sur la structure et la diversité génétique des populations en Polynésie. Le Chapitre III se concentre sur la structure génétique apportée par le comportement philopatrique des femelles, avec un marqueur mitochondrial. Il décrit la structure au sein de la Polynésie, et dans le contexte plus global du Pacifique. Il explicite la diversité génétique des tortues vertes en Polynésie, et détermine les populations d'origine des tortues juvéniles retrouvés en Polynésie. Le Chapitre IV étudie la structure génétique au sein de la Polynésie, avec les marqueurs microsatellites, qui tiennent compte de la structure apportée par les mâles, et de divergences plus récentes que le marqueur mitochondrial. Le Chapitre IV se focalise sur la taille efficace des populations.

Le Chapitre V étudie les comportements reproducteurs sur l'île la plus échantillonnée, Tetiaroa, grâce à des analyses de parenté et la reconstruction des génotypes des mâles. Notamment, il se concentre sur l'état de consanguinité de la population, son effet sur la viabilité de la progéniture, et sur les comportements

reproducteurs à l'œuvre qui peuvent influencer ce niveau de consanguinité. La fréquence de reproduction des mâles et des femelles, et les paramètres de reproduction au sein d'une saison et sur plusieurs saisons consécutives sont déterminés et discutés au regard des données connues à travers les observations de terrain.

Enfin, le Chapitre VI discute de l'ensemble de ces résultats et propose des perspectives en termes de recherche future et de conservation.

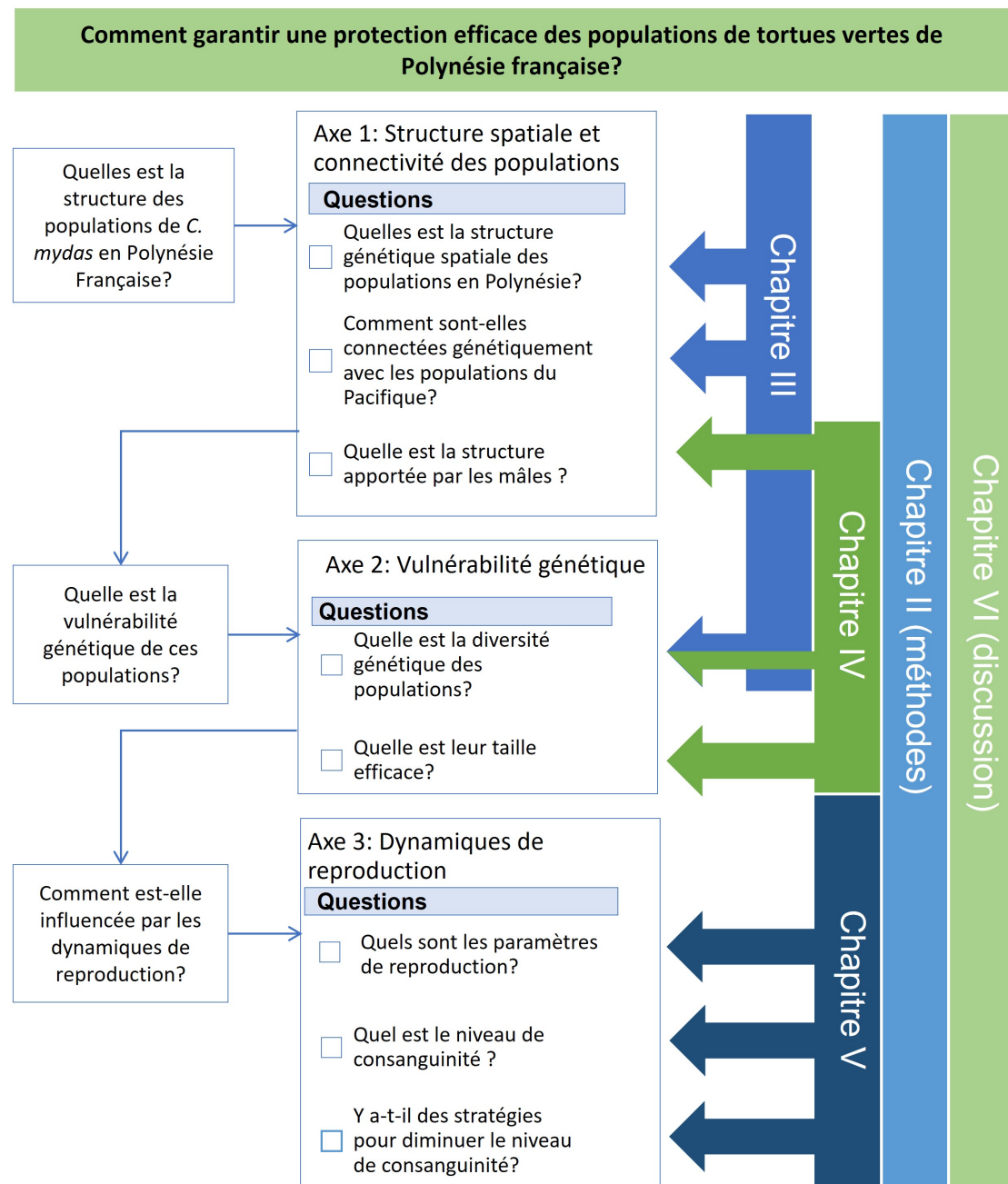


Figure 1.8 Schéma récapitulatif de la problématique, des axes de recherche, et des chapitres.



Chapitre II : Méthodes

VI. Échantillonnage

a. Iles et méthodes d'échantillonnage

L'échantillonnage de cette thèse a été coordonné par la Direction de l'Environnement de Polynésie française (DIREN) sur le territoire entre 2005 et 2021. Les échantillons proviennent de plusieurs sources, avec des stratégies d'échantillonnage et des qualités de tissus disparates. Les échantillons ont été conservés dans de l'éthanol à 90%, au réfrigérateur lorsque c'était possible, avant d'être transmis au CRILOBE pour analyse. La taille et la qualité de conservation des tissus reflètent la variété des situations d'échantillonnage et des conditions d'accès au stockage des différents partenaires impliqués.

Une grande majorité des échantillons provient de l'atoll de Tetiaroa, dans l'archipel de la Société à 53km de Tahiti (voir Figure I.7, page 41). L'atoll est constitué de 12 motu. Sa barrière de récif est longue de 25 km, le lagon intérieur s'étend sur 27 km², et la surface d'espace terrestre sur 6km² (Annexe II). Avec les accords de la DIREN, l'association *Te mana o te moana* amis en place un suivi des pontes de tortues sur le long terme. La petite taille de cet atoll et les infrastructures disponibles sur place rendent possible un suivi régulier des pontes. Ainsi, l'ensemble des plages est inspecté toutes les nuits par une équipe de 5 ou 6 bénévoles en saison (d'octobre à avril) afin de repérer les femelles en ponte ou en tentative de ponte. Les femelles observées sont baguées, mesurées et échantillonnées par une biopsie sur une nageoire postérieure. Les nids sont aussi répertoriés et suivis jusqu'à l'éclosion, où les paramètres de ponte et les coordonnées GPS sont relevés (nombre de petits vivants et morts, d'œuf non fécondés) et les éventuels émergentes ou embryons morts sont échantillonnés. Pour certains nids, la totalité des émergentes a été échantillonnée par une biopsie sur une nageoire. Pour ces individus, l'échantillon prélevé peut mesurer moins de 0.05 cm². Un protocole de prospection systématique s'est mis en place progressivement à Tetiaroa à partir de 2014 (Touron et al., 2018), et l'échantillonnage effectué après cette date apporte un jeu de données très complet et qui sera très utile, notamment pour mieux comprendre et les comportements et les contributions individuelles au renouvellement des populations.

Sur l'atoll de Mopelia, le Bora Bora Turtle Centre effectue des missions de terrain d'une durée de 10 jours par mois d'octobre à janvier, tous les ans depuis 2016. L'atoll, situé à l'extrême Ouest de la Polynésie, se constitue de 3 motu dont le principal s'étend sur près de 8 km de long, et comporte une vingtaine d'habitants (Figure I.7 et Annexe II). Quatre à cinq personnes sont présentes pour chaque mission, ce qui limite la possibilité d'une prospection exhaustive. La mission s'effectue en deux temps chaque jour. Dans un

premier temps en journée, elle consiste à repérer les traces de passage d'une tortue sur la plage et les nids potentiels. Les coordonnées GPS sont relevées, ainsi que les mesures du sillon laissé dans le sable, qui donne un proxy de la taille de l'individu. Une deuxième prospection est effectuée la nuit pour repérer les femelles en ponte. Lorsqu'une tortue ou une éclosion est observée, des biopsies sont réalisées et les mesures habituelles sont relevées (taille, bague, etc.). La stratégie de prospection et la taille de l'atoll permettent d'inspecter chaque motu deux fois sur une période de 10 jours. Ainsi, l'échantillonnage des femelles et émergentes est moins exhaustif sur cet atoll que sur Tetiaroa.

Les autres échantillons correspondent d'une part aux individus hébergés dans les centres de soin de Moorea et de Bora Bora. Il s'agit pour la plupart d'individus blessés, juvéniles, et dont l'île de naissance n'est pas connue. Les individus sont considérés juvéniles lorsque la longueur de leur carapace (CCL) est inférieure à 85cm (Bjorndal et al., 2013). D'autre part, des observations sporadiques d'éclosions ont eu lieu sur les îles de Moorea, Tahiti, Scilly, Fakarava, Bora Bora, Maupiti, Raiatea, Tikehau, et Tupai et les biopsies ont été récoltées. Ces observations sont relayées par les observateurs locaux du réseau d'observateurs volontaires mis en place par la DIREN sur les différentes îles du territoire, afin de suivre l'évolution des tortues vertes dans les îles peu accessibles. Enfin, un certain nombre d'échantillons provient des saisies légales transmises à la DIREN, qui correspondent à des individus braconnés, le plus souvent morts, et dont l'île d'origine est inconnue (Figure I.7, page 41).

Dans le cadre de cette thèse, j'ai participé à une mission d'échantillonnage de 10 jours sur l'atoll de Mopelia avec le Bora Bora Turtle Center, et 2 missions de 5 jours sur l'atoll de Tetiaroa avec l'association Te mana o te moana. La totalité des échantillons récoltés sur une période de 16 ans a été transmise au CRILOBE par la DIREN pour analyses. Ces échantillons demeurent la propriété de la DIREN et des services du pays et le CRILOBE assure la maintenance de cette collection d'échantillons.

b. Construction de la base de données

Au total, 3548 échantillons de tortue verte ont été inventoriés dans la base de données. Ceci représente un effort d'échantillonnage unique et inégalé dans cette région du monde pour la tortue verte. Dans le cadre de la valorisation de ces échantillons par les analyses génétiques, il était important de les référencer et stocker de manière systématique afin de permettre une utilisation organisée et pérenne. Pour cela, j'ai construit une base de données répertoriant les échantillons de *C. mydas* récoltés en

Polynésie Française par la DIREN, ainsi que l'état d'avancement de leurs analyses génétiques.

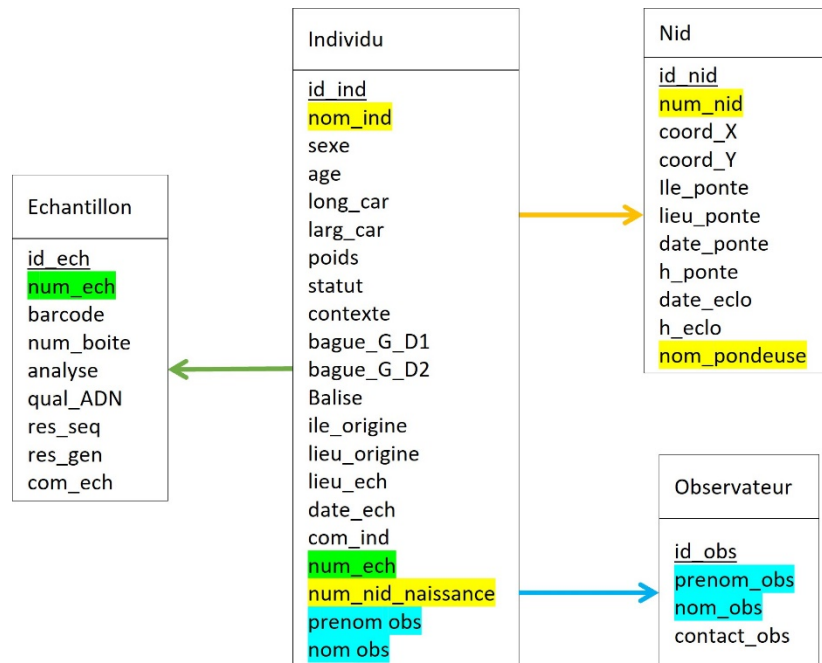


Figure II.1 Schéma récapitulatif des relations entre les différentes tables de la base de données. Les couleurs correspondent aux champs qui font les liens entre les différentes tables. La description des différents champs est donnée dans l'Annexe III.

La base de données se compose de 4 tables : *Echantillon*, *Individu*, *Nid*, et *Observateur*. Elles contiennent en tout 38 champs qui correspondent aux données récoltées sur le terrain concernant les individus échantillonnés et les nids, ainsi qu'aux résultats des analyses génétiques (Annexe III). Toutes les tables sont liées à la table *Individu* qui rassemble les données terrain de l'individu échantillonné (Figure II.1). La table *Nid* contient les données relatives aux nids (point GPS, date et lieu de ponte, etc.), la table *Echantillon* rassemble les données issues des analyses génétiques, et la table *Observateur* comporte le nom et prénom de la personne ayant échantillonné.

L'avantage de ce type de construction est qu'il permet de stocker les données en ligne pour une utilisation pérenne tout en évitant de la redondance, donc en limitant l'espace de stockage nécessaire. Par exemple lorsque plusieurs émergentes d'un même nid sont échantillonnées, les données associées au nid ne sont stockées qu'une fois dans la table *Nid*, et le numéro de nid correspondant est reporté dans la table *Individu* devant chaque émergente concernée. Par ailleurs, cela permet aussi d'extraire une partie des informations contenues dans les tables, au moyen de requêtes, sans changer les données déjà inscrites dans la table. Il est ainsi possible de créer facilement un jeu de données pour un analyse en fonction d'un critère particulier (ex. les femelles adultes de Tetiaroa

de la saison 2018-2019). Le système de gestion de cette base de données s'appuie sur les logiciels libres MySQL v5.7.28 et phpMyAdmin v4.7.5.

Afin de faciliter la consultation des données par la DIREN, une interface web a été créée avec l'aide de Peter Estève (technicien EPHE), chargé du service informatique du CRILOBE. Elle est accessible à l'adresse suivante sous connexion privée : <http://cmydas.criobe.pf>. Un extrait de l'interface est présenté sur la Figure II.2. Pour les trois premiers échantillons, la table *Echantillon* indique le barcode donné pour le référencement, le numéro d'échantillon donné sur le terrain, et le numéro de la boîte dans laquelle ils sont rangés. On voit que ces trois individus ont été séquencés, et le résultat du séquençage donne le numéro d'**haplotype** correspondant. En regardant la table *Individu*, on voit que ces 3 individus correspondent à des femelles adultes, vivantes au moment de l'échantillonnage. La table renseigne sur leur taille et le poids de l'une d'entre elle. Aucune n'a de nid associé, et l'utilisateur doit déplacer le curseur de ce tableau pour voir les autres informations. Dans la table *Nid*, le nom de nid est composé de 4 chiffres indiquant la saison d'échantillonnage (ex. 1415 pour la saison 2014/15), 3 lettres indiquant le lieu de ponte, puis 2 chiffres indiquant le numéro du nid.

Base de données des échantillons de tortue verte *Chelonia mydas*

Tableau de bord
Echantillon
TRI DONNÉES
Echantillon
Individu
Nid

Table Echantillon

Id échantillon	Barcode échantillon	Numero terrain	Numero boîte	Qualité ADN	Etat d'avancement analyses ADN	Ras Sequence
1	CMY0001	353	A001	bonne	séquencé	CmP65.1
2	CMY0002	343	A002	bonne	séquencé	CmP21.1
3	CMY0003	349	A003	bonne	séquencé	CmP20.1

Table Individu

Id individu	Numero échantillon	Numero du nid	Nom individu	Sexe	Age	Longueur Carapace	Largeur Carapace	Poids	Statut	Com
1	353		VAINERI MYSSY	F	ADU	106.0	99.0	140.000	vivante	
2	343			F	ADU	99.0	89.0		vivante	
3	349			F	ADU	103.0	96.7		vivante	
4	350			F	ADU	106.5	98.0		vivante	

Table Nid

Id nid	Numero nid	Nom pondéuse	GPS Coord X	GPS Coord Y	Ile Ponte	Lieu Ponte	Date Ponte	Date Ecllosion	Nbr petits vivants	Commentaires
1	1011_TIA45	MARUJA	-17.00181	-149.58469	Tetiaroa	Tiaraunu	2010-12-17			
2	1011_TIA46	MARUJA	-16.99553	-149.58592	Tetiaroa	Tiaraunu	2010-12-20			
3	1011_TIA75	377	-16.99217	-149.58472	Tetiaroa	Tiaraunu	2011-01-06	2011-03-29	22	
4	1011_TIA52	VAINITI	-16.99372	-149.58528	Tetiaroa	Tiaraunu	2010-12-29	2011-03-04	84	
5	1314_ORO15		-16.99298	-149.53671	Tetiaroa	Horoatera	2013-09-05		86	

Figure II.2 Extrait de la base de données en ligne sur les échantillons de *C. mydas* en Polynésie

c. Contenu de la base de données

Sur ces 3548 échantillons présents dans la base de données, la majorité (2889) a été prélevée lors d'excavation des nids, soit sur des émergentes au moment de l'éclosion, soit sur des embryons ou émergentes morts dans le nid. Dans la suite de la thèse, la distinction n'est pas faite pour ces 3 catégories d'échantillons qui sont regroupées sous le terme « émergentes ». On compte par ailleurs 237 adultes dont 228 femelles en ponte ou tentative de ponte observées sur des plages, 2 males, et 7 de sexe indéterminé (donnée non communiquée). Les 424 échantillons restants proviennent soit d'individus dont le stade de maturité n'a pas été communiqué (n=278), soit de juvéniles (CCL<85cm) observés et échantillonnés proches d'une île qui peut être différente de leur île de naissance qui n'est pas connue (n=146).

Parmi ces individus, 2970 (84%) ont été échantillonnés sur l'île de Tetiaroa. Les autres échantillons ont été récoltés sur 22 îles, et pour 37 d'entre eux l'île d'échantillonnage n'a pas été répertoriée. Tetiaroa compte 92% des émergentes, 84% des adultes, 2% des juvéniles, et 39% des individus dont le stade de maturité est inconnu de notre échantillonnage. Moorea est la deuxième île qui compte le plus d'échantillons, avec 141 échantillons qui constituent uniquement 3% de l'échantillonnage total. Viennent ensuite Scilly (98 échantillons), Bora Bora (81 échantillons), et Tahiti (51 échantillons). Les autres îles comprennent chacune moins de 30 échantillons (< 0.82%) (Table II.1, Figure II.3).

Table II.1 Répartition du nombre d'échantillons de tortue verte sur chaque île, classés par stage de maturité. ADU : adultes, EME : émergentes, IND : indéterminé, JUV : juvénile.

	Tetiaroa	Moorea	Scilly	Bora Bora	Tahiti	Inconnu	Mopelia	Hao	Tahaa	Aratika	Tupai	Fakarava	Raiatea	Maupiti	Reao	Raraka	Tikehau	Maiao	Arutua	Makatea	Hiva oa	Huaina	Niau	Rangiroa	TOTAL
ADU	201	2	2	-	-	-	28	-	-	-	-	-	1	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	237
EME	2660	96	82	4	10	-	-	-	-	-	15	6	5	7	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	2889
IND	104	4	1	48	20	37	-	20	9	12	-	3	4	1	3	6	-	5	-	-	-	-	1	-	278
JUV	5	39	13	29	21	-	1	4	11	5	-	2	1	-	1	-	3	-	4	4	1	1	-	1	146
TOTAL	2970	141	98	81	51	37	29	24	20	17	15	11	11	8	7	6	7	5	4	4	1	1	1	1	3548

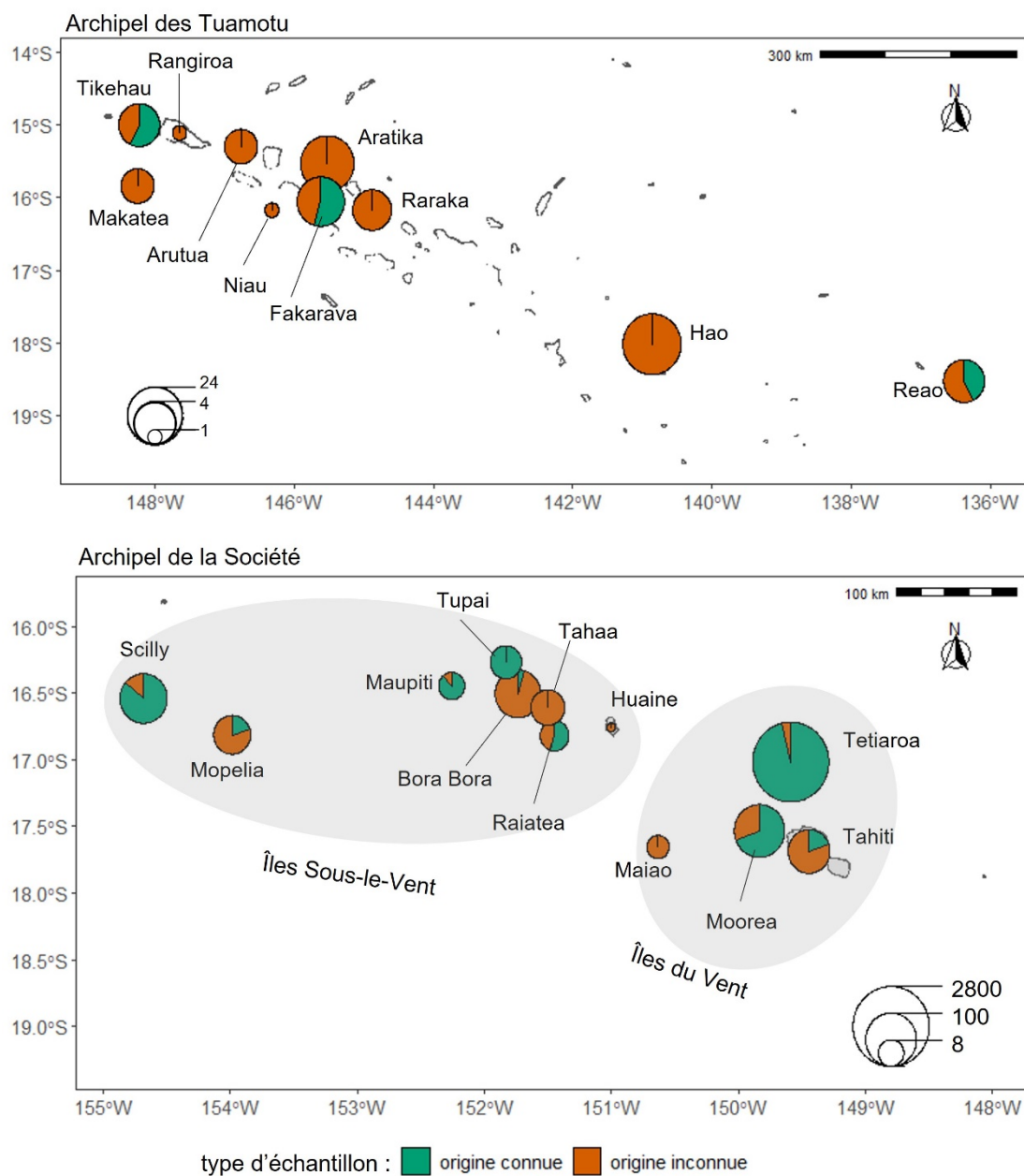


Figure II.3 Répartition du nombre d'échantillons par île et par origine dans les archipels des Tuamotu et de la Société.

L'effort d'échantillonnage s'est intensifié au fil des ans, passant de quelques échantillons par saison de 2004-2005 à 2009-2010 à plusieurs centaines à partir de la saison 2010-2011 (Figure II.4). Ceci s'explique d'une part par la mise en place progressive de l'échantillonnage sur le territoire, et d'autre part par la systématisation du monitoring et de l'échantillonnage des nids sur Tetiaroa, progressivement à partir de 2014-2015. La proportion d'échantillons de Tetiaroa dans le jeu de données augmente à partir de 2007-2008, et varie de 70% à 99% entre les saisons, de 2008-2009 à 2020-2021 (Figure II.4).

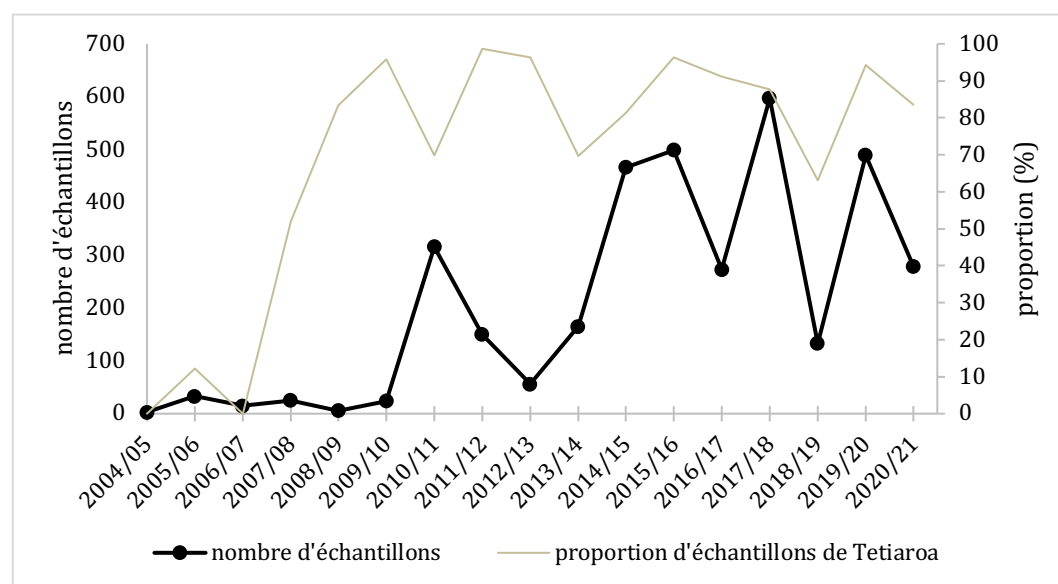


Figure II.4 Évolution du nombre d'échantillons par année, et contribution de Tetiaroa dans cet échantillonnage.

VII. Analyses de biologie moléculaire

a. Extraction

L'ADN de l'ensemble des 3548 échantillons de peau et de muscle récoltés a été extrait. Une partie de ce travail a été effectué préalablement à cette thèse, lors de deux stages réalisés par deux étudiantes de Master : Faimano Boulet Colomb d'Hauteserre en 2012-2013 et Maëva Goulais en 2017-2018 (1070 échantillons). Un certain nombre de ces échantillons ont été réextraits pendant cette thèse, ainsi que tous les échantillons non traités jusqu'alors, pour un total de 2688 extractions effectuées. Le protocole d'extraction est expliqué brièvement dans la partie Matériel et Méthodes des prochains chapitres. De façon générale, le rendement d'extraction était inférieur à 10µM, variant entre 2µM et 60µM, ce qui est faible mais reste suffisant pour le séquençage de marqueurs mitochondriaux et l'amplification de marqueurs microsatellites.

b. Séquençage du marqueur mitochondrial

i. *Choix du marqueur mitochondrial*

Le fragment long (800 paires de bases) de la région contrôle de l'ADNmt a été utilisé comme marqueur génétique en adéquation avec les standards utilisés pour les tortues vertes dans le monde (Abreu-Grobois et al., 2006; Chaves et al., 2017). C'est en effet sur la base de ce fragment variable d'ADNmt que les distinctions génétiques entre populations de tortues vertes sont définies au niveau mondial (Seminoff et al., 2015; Wallace et al., 2010). Ce fragment de 800pb a remplacé à partir de 2006 l'utilisation de fragments plus courts de la région contrôle de l'ADNmt (350pb et 500pb) (Allard et al., 1994; Encalada et al., 1996), et a permis la résolution de population à plus fine échelle (e.g. Dutton et al., 2014b). Par ailleurs, c'est aussi ce marqueur qui est utilisé pour retrouver l'origine des individus échantillonnés sur les aires d'alimentation (Jensen et al., 2019; Piovano et al., 2019). Ces dernières sont présentes sur plusieurs sites dans le Pacifique. Il était donc important d'utiliser ce fragment afin d'analyser la connectivité entre la Polynésie française et les autres sites du Pacifique étant donné l'importante capacité de migration de l'espèce.

ii. *Choix des échantillons et rendement de séquençage*

Le séquençage de l'ADNmt a été réalisé afin de répondre aux questions relatives à la structure et à la diversité des populations au sein de la Polynésie française. Pour cela, les échantillons séquencés ont été choisis parmi l'ensemble des îles d'échantillonnage. L'ADNmt est hérité de la mère et la région contrôle amplifiée n'est pas assez variable pour être significativement différente entre une mère et ses petits. Par conséquent, les émergentes d'un même nid portent toutes la séquence de leur mère. Si elles sont toutes prises en compte, cela entraîne une redondance de la séquence qui modifie *in fine* la fréquence de celle-ci dans le jeu de données complet. La même logique s'applique à des émergentes de nids différents pondus par la même mère. Pour éviter ce biais, le séquençage des adultes a été privilégié, notamment sur Tetiaroa où un nombre important d'émergentes et d'adultes a été échantillonné. Sur les autres îles, le nombre d'adultes étant moindre, les émergentes ont aussi été séquencées dès lors qu'elles pouvaient être associées à des nids différents (dates d'échantillonnage différentes). Les juvéniles et individus de classe d'âge indéterminée ont aussi été séquencés, afin notamment de pouvoir retrouver leur population d'origine.

Le protocole de séquençage est donné dans la partie Matériel et Méthodes des chapitres III et IV. Au total, 926 échantillons ont été amplifiés pendant cette thèse. Parmi eux 466 ont donné une séquence ADN lisible.

iii. Nettoyage du jeu de données « ADNmt »

Une fois les individus sélectionnés séquencés sur la région contrôle de l'ADNmt, le jeu de données a été revérifié afin d'enlever les potentielles séquences en doublon (émergentes qui pourraient provenir d'un même nid). De plus, certains individus échantillonnés entre 2010 et 2011 (n=97) avaient déjà été séquencés au sein du CRIIBE et les séquences utilisées dans le travail de Boissin et al. (2019). Ces individus ont été ajoutés à ceux séquencés ici, et les deux jeux de données ont été croisés afin encore une fois d'enlever les doublons. Finalement, 443 individus ont été retenus pour les analyses portant sur le marqueur mitochondrial (Table II.2).

Table II.2 Nombre d'individus retenus après séquençage pour chaque catégorie de classe d'âge (ADU : adultes, EME : émergentes, JUV : juvéniles, IND : indéterminé).

Stade de maturité	ADU	EME	JUV	IND
Nombre d'échantillons	136	103	85	119

c. Développement de 25 nouveaux marqueurs microsatellites polymorphiques

i. Introduction de l'article

Dans cette partie, une nouvelle banque de microsatellite a été réalisée afin de développer un set de 25 nouveaux marqueurs microsatellites polymorphiques et spécifiques à *Chelonya midas* ont été développés. En effet pour les analyses de structure de population comme de parenté, il est important d'avoir un set de marqueurs conséquent et varié en termes de motifs et de tailles, afin d'augmenter le pouvoir de discrimination entre les individus (Harrison et al., 2013; Wang, 2016). C'est d'autant plus crucial lorsqu'il s'agit de reconstruire les génotypes de certains individus (ici les mâles) à partir d'individus génotypés (ici les femelles en ponte et les émergentes). Pour la tortue verte, 36 marqueurs sont disponibles, la plupart avec un motif de répétition tétranucléotide. L'objectif de cette partie est de développer un set de 25 autres marqueurs afin d'augmenter la diversité de marqueurs disponibles, et de le tester sur deux autres espèces de tortues marines : la tortue imbriquée (*E. imbricata*) et la tortue caouanne (*C. caretta*), afin de les rendre disponibles pour d'autres études.

L'ensemble des échantillons de tortue verte présentés dans cette thèse a été génotypé avec les 25 marqueurs microsatellites développés dans cette partie. Ceux pour lesquels un des marqueurs présentait un problème de lecture de taille ont été génotypés une deuxième fois, ce qui correspond à 1812 échantillons. Après ce deuxième génotypage, toutes les tailles de marqueurs illisibles ou ambiguës ont été considérées comme des données manquantes. Les échantillons qui présentaient plus de 13% de données manquantes sur l'ensemble des 23 **loci** sélectionnés (i.e. plus de 3 loci illisibles) ont été retirés des analyses. Les loci CMY07 et CMY12 ont été retirés comme décrit dans l'article. A ce stade, 1948 échantillons ont été retenus. Ensuite, un nettoyage des données a été effectué afin de détecter les génotypes en doublon dans ce jeu de données.

Ce chapitre est rédigé en anglais et a fait l'objet d'une publication dans *Molecular Biology Report* :

Dolfo, V., Boissin, E., Tatarata, M., Planes, S., 2023. Characterization of 25 new microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*) and cross-species amplification in other marine turtle species. Mol. Biol. Rep.
<https://doi.org/10.1007/s11033-023-08341-4>

Characterization of 25 new microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*) and cross-species amplification in other marine turtle species

Violaine Dolfo ^{1,*}, Emilie Boissin ^{1,2}, Miri Tatarata ³, Serge Planes ^{1,2}

¹ PSL Research University: EPHE - UPVD - CNRS, UAR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

² Laboratoire d'Excellence « CORAIL », 66860 Perpignan, France

³ Direction de l'Environnement de la Polynésie Française, Papeete, Tahiti, French Polynesia

* Corresponding author: violaine.dolfo@univ-perp.fr

Acknowledgments

This research was funded by the Direction of Environment of French Polynesia. We would like to thank the volunteers of the NGO Te mana o te moana, coordinated by Cecile Gaspar, for providing *Chelonia mydas* and *Eretmochelys imbricata* samples for this study. We also thank the volunteers of the French Mediterranean Stranding Network for Sea Turtles (Réseau Tortues Marines de Méditerranée Française, coordinated by Claude Miaud) for turtle surveillance and collection of the *Caretta caretta* samples. Thank you to Jeanine Almany for the english corrections.

Keywords: Microsatellite · Green turtle · Cross-species transfer · Parentage analysis · French Polynesia · *Chelonia mydas*

Abstract

Background

The green sea turtle, *Chelonia mydas*, is a migratory species with a strong natal homing behavior leading to a complex population structure worldwide. The species has suffered severe declines in local populations; it is therefore crucial to understand its population dynamics and genetic structure to adopt appropriate management policies. Here, we describe the development of 25 new microsatellite markers specific to *C. mydas* and suitable for these analyses.

Methods and Results

They were tested on 107 specimens from French Polynesia. An average allelic diversity of 8 alleles per locus was reported and observed heterozygosity ranged from 0.187 to 0.860. Ten loci were significantly deviant from the Hardy-Weinberg equilibrium, and 16 loci showed a moderate to high level of linkage disequilibrium (4% to 22%). The overall F_{is} was positive (0.034, p -value < 0.001), and sibship analysis revealed 12 half- or full-sibling dyads, suggesting possible inbreeding in this population. Cross-amplification tests were performed on two other marine turtle species, *Caretta caretta* and *Eretmochelys imbricata*. All loci successfully amplified on these two species, though 1 to 5 loci were monomorphic.

Conclusions

These new markers will not only be relevant for further analyses on the population structure of the green turtle and the two other species, but they will also be invaluable for parentage studies, for which a high number of polymorphic loci are necessary. This can provide important insight into male reproductive behavior and migration, an aspect of sea turtle biology that is of critical importance for the conservation of the species.

Introduction

The green turtle, *Chelonia mydas*, is a marine reptile present in all tropical and subtropical waters across the globe. The species exhibits strong philopatry and natal homing: individuals return to the same reproductive ground over years and females tend to nest on the beach from which they originate (FitzSimmons et al., 1997b). This leads to a complex network of migrations between feeding, reproductive, and nesting grounds, and to a complex genetic structure worldwide with populations breeding separately but occurring at the same feeding grounds (Jensen et al., 2013).

Due to unregulated harvest over the past centuries, green turtle populations are now threatened with extinction according to the IUCN Red List assessment (International Union for Conservation of Nature), with the exception of the Hawaiian and South Atlantic populations which have benefited from conservation actions (Broderick and Patricio, 2019; Chaloupka and Pilcher, 2019; Seminoff, 2004). Despite international and local regulations, the species is still exposed to numerous threats including unsustainable harvest, poaching, coastal degradations, and bycatch (Seminoff, 2004).

It is therefore important to understand and fully characterize the population structure as well as the reproduction dynamics of the species, to facilitate adequate management policies. Mitochondrial DNA has been used to reveal a female-based genetic structure, from oceanic to regional scales (Dutton et al., 2014b; Ruiz-Urquiola et al., 2010). However, this female-inherited marker is unable to provide any insights concerning the gene flow and connectivity driven by the male component of populations or about contemporaneous genetic exchanges. As such, nuclear markers, such as microsatellites, have been used to understand the population structure as a whole. Microsatellites are short repeated DNA motifs of typically 1 to 6 nucleotides that are widely distributed throughout the genome of eukaryotes, whose number of repeats can vary from one individual to another (Li et al., 2002). They are highly polymorphic and exhibit a high mutation rate (10^{-4} to 10^{-3} mutations per locus per generation). They are co-dominant markers, making them suitable for a wide number of genetic analyses (Jones et al., 2010).

Discrepancies between the degrees of connectivity inferred from mtDNA and microsatellite markers in green sea turtles suggested male mediated connectivity (Hancock et al., 2019; Nishizawa et al., 2011; Roberts et al., 2004), or male philopatry (Bradshaw et al., 2018; FitzSimmons et al., 1997a; Roden et al., 2013). In addition to

determining population structure, microsatellite markers are useful for parentage analysis (Jones et al., 2010). In the case of sea turtles, while individual behaviors are still largely unknown, parentage analyses conducted on samples collected from females and hatchlings can reveal information concerning male reproductive behavior and migration. This provides access to important conservation metrics such as the operational sex ratio (OSR). However, more than 15 loci are needed for accurate parentage inference or population assignments (Harrison et al., 2013; Wang, 2016). It is therefore important to have a variety of markers available, with different sizes, repeat motives, and annealing temperatures to facilitate PCR multiplexing and allele scoring in order to conduct such analyses. While the development of a species-specific bank of microsatellites is essential for parentage analysis, creating such a bank is extremely costly and time-consuming (Jones et al., 2010). This is why testing the transferability of microsatellites to related species is vitally important. The cross-species transferability of microsatellite markers is variable among taxa, but is usually successful among sea turtles (Lin et al., 2008; Monzón-Argüello et al., 2008; Shamblin et al., 2009).

To date, 36 microsatellite markers have been developed specifically for *C. mydas* (Dutton and Frey, 2009; FitzSimmons et al., 1995; Shamblin et al., 2012a), and another 13 which were developed for the loggerhead, the hawksbill, the olive ridley and the Kemp's ridley turtles, have been used on *C. mydas* in population structure and multiple paternity analyses (Alfaro-Núñez et al., 2015; Bagda et al., 2012; Bradshaw et al., 2018; Hancock et al., 2019; Lara et al., 2010; Nishizawa et al., 2011; Wright et al., 2012b). These studies typically used between 2 and 13 markers. For the loggerhead turtle, *Caretta caretta*, 42 markers are available (FitzSimmons et al., 1995; Monzón-Argüello et al., 2008; Shamblin et al., 2009); and 39 have been developed for the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata* (FitzSimmons et al., 1995; Lin et al., 2008; Miro-Herrans et al., 2008; Shamblin et al., 2013). The aim of the present study was to develop a new set of polymorphic microsatellite markers specific for *C. mydas*, and to test their amplification on two additional species: the hawksbill turtle, *E. imbricata*, and the loggerhead turtle, *C. caretta*.

Material and Methods

Sample Collection

Biopsies were performed on 107 adult specimens of *Chelonia mydas*. Approximately 0.5 cm³ of skin and muscle tissues were collected from the posterior fin

of nesting females on Tetiaroa Atoll, French Polynesia, between 2010 and 2021. Samples were stored in 90% ethanol and kept at 4°C or -20°C until processing. All the samples were collected by the local NGO *Te mana o te moana* based in Moorea, French Polynesia with authorizations from the Direction of Environment of French Polynesia (DIREN). For cross species amplification, hawksbill and loggerhead turtle were tested for transferability of microsatellite markers. Seventeen individual hawksbill turtles (*E. imbricata*) from French Polynesia corresponding to stranding and seized poaching were provided by DIREN, and 16 individual loggerhead turtles (*C. caretta*) were provided by the Réseau Tortues Marines de Méditerranée Française (RTMMF) stranding network. Loggerhead samples correspond to injured individuals rescued by the RTMMF and strandings from the Mediterranean Sea.

DNA extraction and microsatellite marker design

Total genomic DNA was extracted using the QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit and the QIAcube HT DNA extraction robot (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. The first step was modified as follows: 1 mm² of tissue was digested in 200 µL of digestion buffer with 20 % Proteinase K (QIAGEN), and left at 56°C overnight. Total genomic DNA was quantified using an Epoch BioTek spectrophotometer (Agilent, Santa Clara, US) and an equimolar pool of 8 samples of *C. mydas* (total quantity 3 µg) was sent to GenoScreen (Lille, France) for microsatellite library preparation and sequencing. Samples were sequenced on an Illumina MiSeq platform using a Nano v2 2x250 cycles chip. A total of 3361 primer pairs were designed. Among these, 50 pairs were selected and tested based on their repeat number (≥ 6), motif, and PCR product size (>100 bp). The selected pairs included 23 dinucleotide (DRM), 15 trinucleotide (TRM), and 12 tetranucleotide (TeRM) repeat motifs. For each motif, various ranges of product size were selected in order to minimize overlapping size ranges and facilitate fragment analysis while multiplexing.

Molecular analyses

The 50 selected primer pairs were tested on 107 *C. mydas* individuals at four annealing temperatures (53°C, 57°C, 60°C, and 63°C). PCR amplifications were performed on 4 DNA samples of *C. mydas* for each primer pair and temperature. PCR amplifications were performed using Type-it Microsatellite PCR kit (Qiagen) in 11 µL

total volume reactions containing 4 μ L Type-it Multiplex PCR Master Mix 2X (contains HotStarTaq® *Plus* DNA Polymerase, Type-it Microsatellite PCR Buffer with 6 mM MgCl₂ and dNTPs), 5 μ L RNase-free water, 1 μ L primers (2 μ M forward and reverse primers diluted in 1xTE pH 8 buffer) and 1 μ L of DNA template at 10-20 ng/ μ L. PCR cycles consisted of: 5 min at 95°C, followed by 45 cycles of 30 s at 95°C, 1 min 30 s at the annealing temperature, 30 s at 72°C, and a final extension step of 30 min at 60°C. Amplification success was detected on 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide. Out of these 50 loci, 39 were successfully amplified for at least one temperature including 21 DRM, 12 TRM, and 6 TeRM, and 25 were multiplexed for further characterization on all samples from each of the three species. For multiplexing, forward primers were labeled with a fluorescent dye on the 5' end (ATTO565, ATTO550, FAM, YAKYE; Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) (Table II.3). PCR products were sent to GenoScreen and allele sizes were assessed using an Applied Biosystems 3730 Sequencer. For accurate sizing, an internal size ladder (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystems) was used. The 25 selected markers were then tested at optimal annealing temperature on 17 *E. imbricata* individuals and 16 *C. caretta* individuals for cross-species amplification.

Data analysis

Allele sizes were visually assessed using GENEMAPPER software v.5 (Applied Biosystems) on the 107 *C. mydas* individuals. Allele size call consistency over all samples was checked twice, and approximately 5% of the total dataset was read by a second person to compare size calls. All ambiguous peak profiles were considered missing data. MICROCHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) was used to identify null alleles, stuttering errors, and large allele dropout. For each locus, allele frequencies, total number of alleles (N_a), private allele number (P_A), observed and expected heterozygosities (H_o and H_e), and divergence from Hardy-Weinberg equilibrium were calculated with GenAlEX v.6.503 (Peakall and Smouse, 2006). The inbreeding coefficient (F_{IS}) and linkage disequilibrium (LD) were calculated using GENETIX v.4.05.2 (Belkhir et al., 2004). LD was calculated between pairs of loci, and the percentage of LD per locus was defined as the percentage of combinations showing significant LD for each locus. To detect potential siblings in the 107 *C. mydas* individuals from Tetiroa, French Polynesia, the software COLONY v.2.0.6.6 (Jones and Wang, 2010) was run 3 times with different starting seeds with a model that allowed for inbreeding and polygamy for both sexes. A full-likelihood analysis method was used with high precision on long runs and no

sibship prior. Dyads were considered full-siblings or half-siblings if their probability was greater than 0.95 for the 3 runs.

For *E. imbricata* and *C. caretta* samples, allele sizes were assessed with GENEMAPPER software v.5, and the total number of alleles (N_a) and number of private alleles (PA) were calculated with GenAlEx v.6.503. In order to explore whether this set of markers was able to detect genetic variance among species, a Principal Coordinates Analysis (PCoA) was computed in GenAlEx and the Nei unbiased genetic distance was calculated between the three species with GenAlEx v.6.503. Samples that had more than 16% missing data were removed from the PCoA analysis and Nei distance calculation.

Results

Genetic diversity

A panel of 25 polymorphic microsatellite loci was successfully developed and showed clear amplification profiles. However, one locus (CMY12) presented stuttering errors and 19% null alleles and was therefore removed for further analysis. The 24 remaining loci were all polymorphic with a number of alleles per locus ranging from 2 to 17, an average of 8 alleles per locus and a total of 191 alleles (Table II.3). 16 loci exhibited a dinucleotide repeat motif (DRM), 7 showed a trinucleotide repeat motif (TRM), and 1 contained a tetranucleotide repeat motif (TeRM). DRM loci showed 4 to 17 alleles (mean: 9, total: 146), while TRM loci displayed 2 to 10 alleles (mean: 4, total: 31), and the TeRM locus had 14 alleles.

MICROCHECKER analyses only revealed the likely occurrence of null alleles for locus CMY07 (6.57%), and no evidence of stuttering errors or large allele dropout were detected on any of the 24 loci. Expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.174 to 0.886 (mean: 0.649 ± 0.039), while observed heterozygosity (H_o) was overall slightly lower, ranging from 0.187 to 0.860 (mean: 0.631 ± 0.037) (Table II.3). The inbreeding coefficient F_{is} ranged from -0.088 to 0.196 and was significantly divergent from zero for 6 loci (CMY07, CMY08, CMY16, CMY19, CMY25) (Table II.3). Total F_{is} was also significant ($F_{is} = 0.034$, $p\text{-value} < 0.001$). 10 loci (CMY07, CMY09, CMY10, CMY11, CMY14, CMY15, CMY18, CMY19, CMY26, CMY33) deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium ($p\text{-value} < 0.05$). $P\text{-value}$ was the lowest (< 0.001) for CMY07, CMY18, CMY26, and CMY33. Significant linkage disequilibrium was also identified as 8.3% of the pairwise loci combinations showed significant disequilibrium after sequential

Bonferroni correction (Online Resource 1). 8 loci (CMY15, CMY18, CMY20, CMY22, CMY25, CMY27, CMY29, CMY32) were not linked with any of the others. The rest of the loci showed a percentage of linkage disequilibrium ranging from 4% (CMY21) to 22% (CMY17). Using all of the loci, Colony revealed 10 pairs of full-siblings and 2 pairs of half-siblings with a probability greater than 0.95 in the *C. mydas* samples from Tetiaroa (Table II.4), corresponding to 20 different individuals out of the 107.

Cross-species amplification

The 25 loci were tested for amplification on *E. imbricata* and *C. caretta* samples (Table II.5). CMY12 was included as it showed a clear peak profile despite the detection of null alleles and stuttering errors on *C. mydas*. All loci were successfully amplified on both species, but rate of success was dependent on both locus and species. For *C. caretta*, amplification success ranged from 50% (CMY09) to 100% of samples (CMY04, CMY15, CMY17, CMY19, CMY25, CMY35), with an average of 87%. For *E. imbricata*, amplification success was lower (72%) on average, and ranged from 35% (CMY18) to 100% (CMY26). Allele polymorphism was variable across species and locus, ranging from 1 to 10 alleles per locus (Table II.5). It was higher in *E. imbricata* with 110 alleles in total, compared to 92 for *C. caretta*. *Chelonia mydas* presented a large number of private alleles (89) with an average of 3.71 per locus. *Eretmochelys imbricata* and *C. caretta* revealed 23 and 25 private alleles, respectively, with an average of 0.92 and 1 private alleles per locus. Five loci were monomorphic for *C. caretta*, one of which was also monomorphic for *E. imbricata* (CMY11) (Table II.5).

For the PCoA analysis and Nei distance calculation, 107 samples of *C. mydas*, 11 samples of *C. caretta*, and 9 samples of *E. imbricata* were conserved as they showed less than 16% missing data. The discarded samples had between 20% and 88% missing data. The PCoA clearly discriminated between the three species, and *C. mydas* appeared distant from the two others on the first axis, which covered the majority of the variance (Figure II.5). Nei unbiased genetic distance was the greatest for *C. mydas* and *C. caretta* (1.575), followed by *C. mydas* and *E. imbricata* (1.221). The distance between *C. caretta* and *E. imbricata* was only 0.646 (Table II.6).

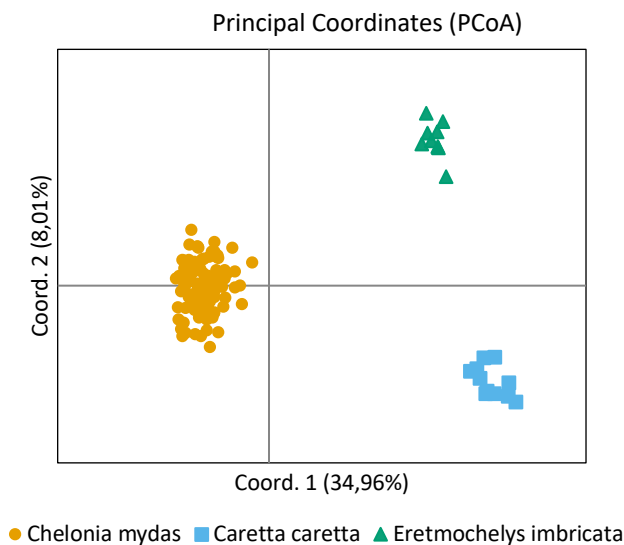


Figure 11.5 Principal coordinates analysis on 3 marine turtle species analyzed with 24 newly developed microsatellite markers. Variance explained by each axis is shown in brackets.

Discussion

This study successfully developed 24 microsatellite markers specific to the green sea turtle, *Chelonia mydas*. A total of 191 alleles were retrieved in the dataset. This set is composed of 16 di- (DRM), 7 tri- (TRM), and 1 tetranucleotide repeat motives (TeRM). These markers add to the 36 markers previously developed for *C. mydas* that included 5 DRM, 4 TRM, and 27 TeRM (Dutton and Frey, 2009; FitzSimmons et al., 1995; Shamblin et al., 2012a). TRM and TeRM are usually sought after due to the larger number of base pair differences between alleles, which decreases the risk of stuttering errors (Jones et al., 2010). TeRM are usually less polymorphic than TRM and DRM (Jones et al., 2010). However, in this study and in accordance with Dutton & Frey (2009), TeRM showed the highest level of polymorphism (14 alleles per locus), followed by DRM (9 alleles per locus) and TRM (4 alleles per locus). With an average of 8 alleles per locus, the level of polymorphism of these loci is robust enough for structure and parentage analyses of *C. mydas* populations (Bernatchez and Duchesne, 2000; Wang, 2016). It is comparable with the one found by Dutton & Frey (2009) (8.33 alleles per locus), and lower than those found by FitzSimmons et al. (1995) with 4 DRM (18.5 alleles per locus) and Shamblin et al. (2012a) with 20 TeRM (12.5 alleles per locus). For other sea turtle species, the level of polymorphism ranges from 5.25 in hawksbill turtles (Lin et al., 2008) to 11.18 alleles per locus in loggerhead turtles (Shamblin et al., 2009).

Levels of observed and expected heterozygosity (H_o and H_e) fall in the lower range of heterozygosity levels published for *C. mydas* populations from other regions (Bagda et al., 2012; Bradshaw et al., 2018; Dutton and Frey, 2009; Hancock et al., 2019; Nishizawa et al., 2011). They were closer to those found in the Mediterranean populations (H_o : 0.652-0.671 / H_e : 0.645-0.671) (Bradshaw et al., 2018). They were also lower than levels reported in populations of other sea turtle species, such as the loggerhead turtle (Loisier et al., 2021; Shamblin et al., 2009).

Ten out of 24 loci showed a significant departure from the Hardy-Weinberg equilibrium, although the pattern of departure was variable across loci, with 6 loci showing a deficit in heterozygosity and 4 loci exhibiting an excess of heterozygosity (Table II.3). Heterozygosity deficiency can be due to selection, population substructure leading to a Wahlund effect, null alleles, or inbreeding (Nei, 1987). A spatial Wahlund effect is unlikely because all of the samples were collected on females nesting on the same island of French Polynesia, Tetiaroa. As green turtles exhibit strong natal homing, we can reasonably assume that all of these females are from the same population. Samples were pooled across several nesting seasons between 2010 and 2021, and thus a temporal Wahlund effect is plausible. However, a Wahlund effect would affect all loci (Sharma et al., 2016). Null alleles were detected with MICROCHECKER at only one locus (CMY07). As this locus also showed a departure from the Hardy-Weinberg equilibrium and a significant F_{is} , it was removed from further analyses on *C. mydas* populations. Null alleles were not detected on any other locus, however CMY19 also presented significant F_{is} and departure from the Hardy-Weinberg equilibrium. This can be a sign of a genotyping artefact, such as null alleles (Peyran et al., 2020), which is why we recommend using this locus with caution and performing the analyses with and without it to rule out any bias. Finally, inbreeding is a possible cause of heterozygosity deficiency in this population, as the total F_{is} is significantly deviant from zero (0.034, p -value<0.001). The population size is estimated at around 1000 breeding females annually in French Polynesia (Seminoff et al., 2015). Although more recent assessments are needed, the present estimation is coherent with the estimation from annual surveys of Tetiaroa Atoll's nesting population where 20 to 940 nests were recorded annually between 2008 and 2019 (Laloë et al., 2020; Touron et al., 2018). This small estimated population size, coupled with the philopatric behavior of green turtles on reproductive and nesting sites, can lead to inbreeding (Shields, 1982). The sibship analysis among our samples revealed that 18% of the samples (20 specimens) are engaged in a relationship with at least one full- or half-sibling, thus confirming that significant F_{is} values may, in

part, be explained by inbreeding and family structure of this French Polynesian population.

On the other hand, heterozygosity excess is generally associated with missing data or genotyping errors (Chen et al., 2017). It can also be due to associative overdominance, if the neutral microsatellite locus is linked with a locus under selection favoring heterozygosity (Stoeckel et al., 2006). Missing data were present in CMY11 (6%) and CMY18 (14%). CMY33 and CMY26 might present genotyping errors, and similar to CMY19, we recommend using these loci with caution.

Levels of linkage disequilibrium (LD) are variable across species and populations, and are the result of many forces such as selection, genetic drift, mutation, gene conversion, epistasis, and recombination (Schaeffer et al., 2001). This population of *C. mydas* had 8.3% of the pairwise loci combinations showing significant LD, which is moderate compared to other species (Schaeffer et al., 2001; Tardy et al., 2020). Other species of sea turtles however, showed no LD with microsatellite markers in many of their populations (Monzón-Argüello et al., 2008; Shamblin et al., 2009).

Sibship analysis revealed that most adult female full-siblings were sampled either with a 4-year gap or in the same year, and one dyad was sampled 8 years apart (Table II.4). This provides a first indication of the reproduction frequency of green turtle females on Tetiaroa, which seems to be around 4 years. This is consistent with general knowledge on the green sea turtle that defines the reproductive frequency between 2 and 4 years (Broderick et al., 2003). Although this conclusion is preliminary, a more in-depth parentage analysis on a larger sample size that includes hatchlings will help reveal the reproductive behavior in both males and females. This demonstrates that this set of markers is promising for parentage analysis, which, coupled with field data, will give precious insights into individual behavior.

Cross-species amplification was successful on the two species that were tested, *C. caretta* and *E. imbricata*, with 87% and 72% amplification success, respectively. Cross-species amplification is commonly used for microsatellite analysis in all the sea turtle species with a high rate of success (Dutton and Frey, 2009; FitzSimmons et al., 1995; Lin et al., 2008; Monzón-Argüello et al., 2008; Shamblin et al., 2009). Other reptilian taxa are also known to show a high rate of cross-species amplification success (Miles et al., 2009), while other marine taxa such as fishes and bivalves show a low rate of cross-species amplification success (Peyran et al., 2020). The success of cross-species amplification indicates that the flanking regions of microsatellite loci are conserved

across sea turtle species, in line with the findings of FitzSimmons *et al* (1995). This new set of loci could thus be useful for further studies on other sea turtle species, such as *C. caretta* and *E. imbricata*, but is also likely to amplify successfully on the closely related olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) and Kemp's ridley (*L. kempii*) turtles.

Furthermore, all loci revealed one or several private alleles for at least one of the species. The largest number of private alleles was found for *C. mydas*, due to the specific development of this microsatellite marker set for this species. The occurrence of private alleles, although it can be artificially increased by a low sample size, shows that this set of markers can be used to distinguish between the three sea turtle species.

Additionally, the PCoA showed a clear genetic differentiation between the three species. The green turtle appears to be more distant from the two other species, which is confirmed with the Nei unbiased genetic distance. This is in accordance with the phylogenetic distance between the species (Naro-Maciel *et al.*, 2008). The hawksbill and the loggerhead turtles are more closely related and belong to the Carettini tribe, with a split between the species about 29 million years ago. In contrast, their common ancestor with *C. mydas*, which belongs to the Chelonini tribe, is distant from 63 million years.

In conclusion, 23 of the microsatellite loci developed here can be used to assess the genetic variability of *Chelonia mydas* populations and two other species of sea turtle. Most importantly, this marker set can help to unravel the behavior of both males and females by providing a high number of loci and alleles which are required for robust parentage analyses (Bernatchez and Duchesne, 2000; Harrison *et al.*, 2013). This aspect of sea turtle biology, which to date is largely unknown, is critical for the conservation of populations, as increasing global temperatures are already driving a massive feminization within the world's largest green turtle rookery (Jensen *et al.*, 2018).

Table II.3 Characterization of the 24 microsatellites developed for *Chelonia mydas* in this study. Microsatellite markers were included in five multiplexes corresponding to the annealing temperature Ta. N, number of samples; Na, number of alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; HWE, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (p-values shown); Fis, fixation index; LD, linkage disequilibrium; PA, private alleles, Null alleles: Yes/No.

Locus	Primer Sequence	Repeat motif	Ta (°C)	Multiplex number	Dye	Size range (bp)	N	Na	Ho	He	HWE	Fis	% LD	Null alleles	PA	GenBank Accession #
CMY 03	F: GCTTCTCCTACCGCCTCTTG R: TAGTCCACTCCAGCCTCACA	(AC) ₁₇	60	4	FAM	217-255	104	17	0.856	0.886	0.563	0.039	9%	N	4	OQ162049
CMY 04	F: TGCAAATCAGCGTGGGTGTA R: ACCAAGTCAAGTGCCTTACAGA	(AC) ₁₆	60	4	ATTO 550	153-171	95	9	0.726	0.757	0.881	0.046	13%	N	5	OQ162050
CMY 07	F: ACTATGCTTTGTGCGTTGCC R: GCTCATCACCAGTCTCCAT	(AC) ₁₄	53	2	YAKYE	109-225	107	12	0.383	0.474	0.000***	0.196***	17%	Y	7	OQ162051
CMY 08	F: CCTCTGTGGTCTCAACTGGAC R: GGATCACTTTCCCTGCCACT	(AC) ₁₃	60	4	FAM	117-145	106	7	0.66	0.726	0.221	0.095*	13%	N	3	OQ162052
CMY 09	F: AACTTGGCATGTGCACTCAC R: TGTACCTGTGTTACAAGACGGT	(AC) ₁₃	57	5	ATTO 550	126-182	104	15	0.731	0.75	0.01**	0.030	13%	N	13	OQ162053
CMY 10	F: TGTCTGAATCAGTACTTCCGTC R: TCCTTCTGTGGTAAACGCCA	(AC) ₁₃	60	3	FAM	145-177	107	11	0.86	0.869	0.004**	0.016	9%	N	4	OQ162054
CMY 11	F: TCTGTTGCTATTTCTGACATTTGT R: ATCATGGCAGTGCACCTGAA	(AC) ₁₃	53	1	YAKYE	231-251	100	8	0.85	0.796	0.026*	-0.062	13%	N	7	OQ162055
CMY 14	F: TGCATCCAGTAGATCAGCAGTT R: TCAGCCCAGTCAGCATACAG	(AC) ₁₁	60	3	ATTO 550	135-169	106	14	0.83	0.881	0.045*	0.062	17%	N	9	OQ162057
CMY 15	F: CTTCCAGGGACAAGTGCAGT R: GGAACCAACTGCAGAGGAAT	(AG) ₁₁	53	1	FAM	152-164	107	4	0.477	0.491	0.024*	0.034	0%	N	1	OQ162058
CMY 16	F: TGGACACAAGGCTTCCAATT R: TACCCTGAACAAGCCGTGAG	(AC) ₁₁	53	2	ATTO 565	169-213	106	10	0.717	0.81	0.421	0.120**	13%	N	3	OQ162059

Locus	Primer Sequence	Repeat motif	Ta (°C)	Multiplex number	Dye	Size range (bp)	N	Na	H _o	H _e	HWE	F _{is}	% LD	Null alleles	PA	GenBank Accession #
CMY 17	F: TGGCTATCTTGACAGCACA R: GGCAAATGCTCAGAATAAGTGCA	(AC) ₁₁	60	4	FAM	167-203	106	11	0.717	0.759	0.990	0.060	22%	N	4	OQ162060
CMY 18	F: TCCTTCGTTTCATAGAATGCCCA R: TGAGATACTCACTGCTCACCC	(AC) ₁₁	60	4	ATTO 565	176-194	92	5	0.641	0.635	0.000***	-0.005	0%	N	3	OQ162061
CMY 19	F: GGGCGTGGATGCATATAAGC R: CTGATTGGCTCAGAATGTTTGT	(AC) ₁₁	53	1	FAM	193-209	105	7	0.667	0.757	0.001**	0.124*	9%	N	4	OQ162062
CMY 20	F: TGTGGTCTAGCTCAAAGGGC R: GGAATTGACTTCACAGCAGGG	(AC) ₁₁	60	3	FAM	233-249	106	7	0.642	0.671	0.753	0.048	0%	N	4	OQ162063
CMY 21	F: ACTTGAATGCATATTTGACCTGTAT R: GCACATACATCATGCCTGAGC	(AG) ₁₁	53	2	ATTO 565	256-274	106	5	0.689	0.633	0.779	-0.083	4%	N	2	OQ162064
CMY 22	F: AACTGGGAGATCTCTGACGT R: TGCACTGCAATCCAAGAACAA	(AC) ₁₁	57	5	ATTO 565	266-278	101	4	0.584	0.558	0.988	-0.042	0%	N	2	OQ162065
CMY 25	F: ACTGCCATTCAGAGACCATCA R: ATACTGCAACTTGCTGACCT	(AAT) ₁₁	53	1	ATTO 565	173-200	101	5	0.644	0.738	0.123	0.133***	0%	N	1	OQ162066
CMY 26	F: ACGGCCTCAGGTAGATGGAT R: AACCATACAACATGCAGCCA	(ATC) ₉	60	3	ATTO 565	198-243	104	10	0.75	0.706	0.000***	-0.057	17%	N	5	OQ162067
CMY 27	F: TCCAAGGGCAGAATTTGGGT R: ACGGGTTATACAGATATGTGGGA	(AAT) ₈	53	1	ATTO 550	118-136	103	2	0.398	0.4	0.955	0.010	0%	N	0	OQ162068
CMY 29	F: TGCTTATCAATGATGGTGCCC R: TGGATCAAACCCTCAGTCAGG	(ATC) ₇	57	5	FAM	120-132	107	4	0.607	0.63	0.704	0.040	0%	N	2	OQ162069
CMY 32	F: GCGGCATGACTAGGTGTAGG R: GCATTCCTCTTCACATGTCCA	(AAC) ₇	57	5	YAKYE	243-255	106	3	0.274	0.258	0.381	-0.056	0%	N	1	OQ162070
CMY 33	F: AAGCTGCTTGATCCTGAGCA R: TGAAAGCCTCCAAGGAGCAG	(AAC) ₆	53	2	ATTO 550	114-153	107	4	0.477	0.436	0.000***	-0.088	9%	N	0	OQ162071

Locus	Primer Sequence	Repeat motif	T _a (°C)	Multiplex number	Dye	Size range (bp)	N	Na	H _o	H _e	HWE	F _{is}	% LD	Null alleles	PA	GenBank Accession #
CMY 35	F: TCTCCCTGGTGCTTTGCATT R: AGTAGGCACCGACAAACCAC	(AAC) ₆	60	3	YAKYE	181-190	107	3	0.187	0.174	0.768	-0.072	4%	N	1	OQ162072
CMY 45	F: TCCTTACCGGCACTTTCTGC R: TGCTCCAAGGTGAAATCTCCA	(AGAT) ₉	53	2	FAM	133-289	104	14	0.769	0.79	0.624	0.031	17%	N	4	OQ162073
CMY 12	F: CCAGCTTTGCCACTGAGGTA R: CCCAAACGGAGATCAGGTCC	(AG) ₁₂	57	5	YAKYE	180-190	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	OQ162056

indicates significant p_values (: p < 0.05; ***: p < 0.01; ****: p < 0.001).

Table II.4 Fullsib and Halfsib dyads of *C. mydas* samples from Tetiaroa. FS: full-siblings; HS: half-siblings. The probability is calculated as the mean probability of the three runs with Colony software.

Offspring 1	Sampling date 1	Offspring 2	Sampling date 2	Relationship	Probability
CMY0309	06/01/2015	CMY2742	19/11/2019	FS	1
CMY1100	07/10/2016	CMY3467	30/09/2020	FS	1
CMY2740	17/11/2019	CMY2744	19/11/2019	FS	1
CMY3466	29/09/2020	CMY3468	07/10/2020	FS	1
CMY3472	12/10/2020	CMY3495	11/12/2020	FS	1
CMY0010	01/12/2011	CMY2735	02/11/2019	FS	0.999
CMY1100	07/10/2016	CMY3466	29/09/2020	FS	0.990
CMY2745	28/11/2019	CMY3465	24/09/2020	FS	0.986
CMY1100	07/10/2016	CMY3468	07/10/2020	FS	0.971
CMY1114	03/11/2016	CMY2736	07/11/2019	FS	0.969
CMY2416	12/12/2018	CMY2421	03/01/2019	HS	0.964
CMY3470	11/10/2020	CMY3489	05/12/2020	HS	0.960

Table II.5 Cross-species amplification of the 25 developed loci for two species of marine turtles (*Caretta caretta* and *Eretmochelys imbricata*). N/N_{tot}: number of individuals successfully amplified/number of individuals tested; Na: number of alleles, PA: number of private alleles.

Locus	<i>C. caretta</i>				<i>E. imbricata</i>			
	Size	N/N _{tot}	Na	PA	Size	N/N _{tot}	Na	PA
CMY03	225-239	13/16	7	1	235-257	11/17	9	1
CMY04	145-163	16/16	3	1	147-159	13/17	5	2
CMY07	149-181	13/16	6	4	103-203	13/17	6	1
CMY08	123-171	10/16	7	3	123-165	13/17	8	4
CMY09	132-142	8/16	2	0	132-144	9/17	4	1
CMY10	141-155	15/16	5	2	145-165	13/17	10	2
CMY11	235	13/16	1	0	235	11/17	1	0
CMY12	180	15/16	1	0	178-188	16/17	4	3
CMY14	143-163	14/16	5	1	145-153	13/17	2	0
CMY15	158-160	16/16	2	0	158-162	11/17	3	0
CMY16	151-203	11/16	9	4	165-185	13/17	5	2
CMY17	173-185	16/16	4	1	175-191	14/17	7	0
CMY18	180-192	13/16	3	0	180-192	6/17	2	0
CMY19	193-199	16/16	3	1	197-199	11/17	2	0
CMY20	237-239	14/16	2	0	231-241	13/17	4	1
CMY21	256-268	15/16	3	0	256-268	14/17	5	1
CMY22	272	13/16	1	0	272-278	13/17	3	1
CMY25	179-185	16/16	3	0	167-179	12/17	4	2
CMY26	204-225	15/16	4	2	207-228	17/17	4	0
CMY27	133-145	13/16	4	2	127-136	13/17	4	0
CMY29	123	15/16	1	0	123-129	9/17	3	0
CMY32	243	14	1	0	240-249	14/17	3	2
CMY33	132-150	12/16	3	1	126-138	9/17	3	0
CMY35	190-193	16/16	2	1	184-190	11/17	2	0
CMY45	209-265	14/16	10	1	217-245	13/17	7	0

Table II.6 Nei unbiased genetic distance between the three species *C. mydas*, *C. caretta*, and *E. imbricata*.

	<i>C. mydas</i>	<i>C. caretta</i>
<i>C. caretta</i>	1.575	-
<i>E. imbricata</i>	1.221	0.646

Supplementary Materials are available in ANNEXE IV.

Statements & Declarations

Funding

This work was supported by the Direction of the Environment of French Polynesia.

Competing Interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Author Contributions

Sample collection of *Chelonia mydas* was coordinated by Miri Tatarata. Sample processing and analysis was performed by Violaine Dolfo, reviewed by Emilie Boissin, and supervised by Emilie Boissin and Serge Planes. The first draft of the manuscript was written by Violaine Dolfo, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval

Chelonia mydas and *Eretmochelys imbricata* sample collection was authorized and coordinated by the Direction of the Environment of French Polynesia. Samples were exported to France for processing with CITES permits n° FR1298700118-E and n° FR2098700187-E. *Caretta caretta* sample collection was allowed by the decree of December 31, 2012 on the renewal of the environmental protection approval of the Société Herpétologique de France (SHF), and the decree of October 24, 2016 on the collection of biological data in the event of sea turtle stranding or bycatch on French metropolitan coasts (NOR: DEVL1500415N) for the mainland sea turtle observatory program of the National Museum of Natural History (MNHN).

Data availability

The microsatellite sequences generated during the current study are available in the GenBank repository under accession numbers OQ162049-OQ162073. All the other data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

iii. Nettoyage des jeux de données « génotypes »

Le package R *RClone* (Bailleul et al., 2016) a été utilisé pour vérifier les clones dans la matrice finale de 1948 génotypes. Le package a été conçu pour analyser les génotypes d'organismes partiellement clonaux comme les coraux, mais a été utilisé dans cette matrice pour i) détecter et corriger d'éventuelles erreurs de génotypage et, ii) détecter les recaptures. Les recaptures sont définies comme des individus échantillonnés à deux dates différentes et ayant le même génotype. Les données de terrain ont été utilisées pour vérifier la cohérence de ces résultats, et les incohérences ont été enlevées de la matrice (ex. une recapture marquée comme adulte en 2017 et juvénile en 2020).

A partir des fréquences alléliques du jeu de données, le package *RClone* simule un événement de reproduction et compare les distances génétiques de la population génotypée et de la population simulée. Cela permet de déterminer un seuil de distance génétique en dessous duquel les individus peuvent être considérés comme des clones. Comme les tortues ne sont pas des organismes clonaux, ce seuil a permis de détecter toutes les paires d'échantillons ayant peu de différence génétique et de vérifier les éventuelles erreurs de génotypage sur ces individus. En pratique, tous les individus ayant jusqu'à 5 allèles différents ont été vérifiés.

Ainsi 34 échantillons correspondant soit à des incohérences soit à des doublons (plusieurs échantillons pris sur le même individu au même moment) ont été retirés du jeu de données. Neuf individus correspondent à des recaptures (Table II.7).

Parmi ces individus, on compte deux femelles adultes (individu 2 et 6) revenues pondre sur Tetiaroa après 4 ans. Les autres sont des juvéniles échantillonnés de quelques mois à 6 ans d'intervalle. Ces résultats seront exploités dans les prochains chapitres. Pour la suite, les incohérences et les recaptures ont été retirées du jeu de données, pour un total final de 1905 génotypes utilisés.

Table II.7 Individus recapturés dans l'échantillonnage

Individu	Barcode	Stade maturité (nom)	Sexe	Île d'origine	Date d'échantillonnage
1	Cmy2078	Ind	I	Maiao	01/10/2017
	Cmy2151	Juv	I	Moorea	22/10/2019
2	Cmy1113	Adu (Arueroa)	F	Tetiaroa	27/10/2016
	Cmy3480	Adu (Arueroa2)	F	Tetiaroa	14/11/2020
3	Cmy1928	Juv	I	Bora Bora	19/03/2015
	Cmy1973	Juv	I	Bora Bora	22/10/2016
4	Cmy2011	Ind	I	Tahiti	18/11/2014
	Cmy2022	Ind	I	Bora Bora	13/09/2017
5	Cmy1103	Adu (Lola)	F	Tetiaroa	22/10/2016
	Cmy2981	Juv	I	Aratika	29/11/2010
6	Cmy1139	Adu (Kaveka)	F	Tetiaroa	27/11/2016
	Cmy3484	Adu (Karin)	F	Tetiaroa	20/11/2020
7	Cmy1878	Juv	I	Tahiti	15/04/2019
	Cmy2756	Juv	I	Tahiti	20/10/2020
8	Cmy2049	Ind	I	Inconnue	01/11/2018
	Cmy2775	Ind	I	Bora Bora	03/03/2018
9	Cmy2075	Ind	I	Inconnue	01/03/2019
	Cmy2757	Juv	I	Tahiti	20/10/2020



Chapitre III : Structure des populations et connectivité avec les populations du Pacifique

I. Introduction de l'article

Dans ce chapitre, nous cherchons tout d'abord à déterminer le nombre de populations présentes en Polynésie française, et la différenciation génétique entre ces populations. Cet aspect est important pour replacer la Polynésie française dans le contexte global des unités de management (MUs, voir chapitre Introduction), qui constituent des unités de conservation. Ces analyses sont réalisées à partir du marqueur mitochondrial, en calculant les indices de différenciation génétique F_{st} and ϕ_{st} . L'hypothèse est que la Polynésie abrite plusieurs populations différenciées, étant donné le caractère philopatrick des femelles et l'éloignement des archipels entre eux (> 200 km).

La diversité génétique de l'espèce sur le territoire est aussi caractérisée pour la première fois avec un échantillonnage couvrant plusieurs archipels et plus de 400 échantillons, ce qui permet de mieux comprendre l'importance de la Polynésie dans le maintien de la diversité génétique de l'espèce au niveau mondial.

Dans un deuxième temps, la connectivité avec les autres MUs du Pacifique est étudiée. D'une part, la différenciation génétique entre les MUs de Polynésie et les autres MUs du Pacifique est calculée (F_{st} and ϕ_{st}) afin de déterminer si elles sont connectées génétiquement, autrement dit si des femelles peuvent pondre dans plusieurs îles du Pacifique. L'hypothèse ici est que les populations de Polynésie sont isolées des autres populations du Pacifique, étant donné l'éloignement des autres archipels (> 1000 km), et l'isolation génétique des populations observée globalement dans le Pacifique. D'autre part, la connectivité au stade juvénile est explorée en retrouvant les populations d'origine des juvéniles échantillonnés sur le territoire, afin de mieux comprendre les dispersions à ce stade de maturité. Cet aspect est étudié avec une analyse mixed-stock (MSA), qui calcule la contribution de chaque population au stock étudié. La dispersion des juvéniles est présumée être fonction des courants durant les premières années de vie, suivi d'un recrutement sur des aires d'alimentation côtières. Le courant équatorial sud parcourt la Polynésie d'Est en Ouest, donc l'hypothèse est que les populations du Pacifique Ouest ne contribuent pas ou peu au stock de juvéniles sur le territoire.

Ce chapitre fait l'objet d'une publication en révisions mineures dans le Special Research Topic de Frontier in Marine Science sur la structure et connectivité des populations de tortues marines dans les océans Indiens et Pacifique. Il est rédigé en anglais.

II. Article

Population genetic structure and mixed stock analysis of the green sea turtle, *Chelonia mydas*, reveals reproductive isolation in French Polynesia

Violaine Dolfo^{1*}, Cécile Gaspar², Jérôme Bourjea³, Miri Tatarata⁴, Serge Planes^{1,5 †}, Emilie Boissin^{1,5 †}

¹CRIOBE UAR3278, PSL Research University: EPHE – UPVD – CNRS, Perpignan, France

²Te Mana O Te Moana Foundation, Papetoai, Moorea, French Polynesia

³MARBEC, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Sète, France

⁴Direction de l'Environnement de la Polynésie Française, Papeete, Tahiti, French Polynesia

⁵Laboratoire d'Excellence « CORAIL », Perpignan, France

† These authors contributed equally to this work and share last authorship

***Correspondence:**

Corresponding Author : violaine.dolfo@univ-perp.fr

Acknowledgment

This research was funded by the Direction of Environment of French Polynesia. We would like to thank the volunteers of the NGO Te mana o te moana for providing *Chelonia mydas* samples from Tetiaroa and Moorea for this study. We also thank the volunteers of the Bora Bora Turtle Center for samples from the Leeward Islands, as well as the Direction of Environment for coordinating the sampling across French Polynesia and providing them to the CRIOBE for the analyses. Thank you to Jeanine Almany for the English corrections.

a. Abstract

The green turtle, *Chelonia mydas*, is a migratory marine species with a circumglobal distribution in tropical and temperate waters. Its natal homing behavior leads to a complex genetic structure with genetically differentiated populations that breed separately and mix within the same foraging grounds. Delineating the boundaries of these populations and their connectivity to feeding grounds is important for the management of this species, classified as endangered on the IUCN red list. Here, we examined the genetic structure and the origin of the green turtle in French Polynesia with 443 samples collected across 21 islands during nesting events and outside of nesting events. Amplification of the 770pb mtDNA control region fragment, the standard base used to characterize haplotype diversity in this species, revealed 23 haplotypes belonging to 6 different lineages, 3 of which are described here for the first time. Haplotype diversity was 0.685, and nucleotide diversity was 0.023, values similar to those in the South West Pacific and Western Indian Oceans, two regions recognized as genetic diversity hotspots for *C. mydas*. The genetic structure between the Leeward and Windward Islands of the Society archipelago was found to be significantly different with pairwise F_{st} index and ϕ_{st} distance. A weak genetic structure was also significant between the islands of Tetiaroa and Mopelia. Island groups (Windward Islands, Leeward Islands, Tuamotu) were genetically different from all other identified Pacific MUs, with a weak differentiation between American Samoa and Leeward Islands. A mixed-stock analysis for the French Polynesian stock revealed an exclusive contribution from the French Polynesian rookeries, with negligible input from the other Pacific populations. This study provides the first assessment of the genetic structure of green turtle populations within French Polynesia and fills an essential data gap regarding the genetic diversity of the species and its connectivity to other feeding grounds in the Pacific Ocean. The French Polynesian populations appear to be important contributors to the overall genetic diversity of the species, isolated from other Pacific populations, thus making them essential within the Pacific region. These results have important implications for the conservation of the species at both local and regional scales.

Keywords: *Chelonia mydas*, population structure, genetic diversity, MSA, conservation

b. Introduction

The green turtle, *Chelonia mydas*, is a migratory marine reptile with a global distribution in both tropical and temperate waters. The species arose about 34 million years ago, and its populations have declined over the past century. The green turtle is now listed as globally Endangered (EN) by the International Union for the Conservation of Nature (Seminoff, 2004). Consumption of meat and eggs and commercial use of its shell are the principal threats to its populations worldwide. Indirect threats such as incidental takes in fisheries, habitat degradation, and pollution also contribute to population decline (Seminoff et al., 2015).

Green turtle post-hatchlings spend the first years of their life in the epipelagic habitat where they are thought to disperse with the currents (Bolten, 2003). After 5 to 10 years (known as the “lost years”, Hughes (1970)) as they become larger, they recruit into neritic habitats that serve as foraging grounds (Bolten, 2003). When juveniles first recruit to foraging grounds in the Pacific Ocean, their curved carapace length (CCL) is between 35-40 cm (Limpus et al., 2005). Next, they may shift through a succession of developmental habitats (Hamabata et al., 2016; Musick and Limpus, 1997) or stay in the same foraging ground upon reaching sexual maturity (Limpus, 2008). Once chosen based on drivers that are currently unknown, they exhibit strong fidelity to foraging grounds (Read et al., 2014). Sexual maturity is reached after about 20 years, at a size of approximately 85 cm CCL (Bjorndal et al., 2013; Phillips et al., 2021). Reproduction may occur near foraging grounds or close to natal beaches, and females then periodically migrate back to their natal rookeries to nest (FitzSimmons et al., 1997a; López-Castro et al., 2010; Wyneken et al., 2013). The natal homing behavior of females leads to a complex genetic structure worldwide and has been used to determine a population’s boundaries (i.e. genetic units) based on the differences in the mitochondrial DNA (mtDNA) control region fragment (Bowen and Karl, 2007; Jensen et al., 2013). Associated with other biological and ecological characteristics, populations are grouped for conservation purposes into Regional Management Units (RMUs) at a global scale, which contain populations that are phylogeographically related to each other (Wallace et al., 2010). These RMUs are composed of several distinct Management Units (MUs), which are groups of rookeries that are demographically and genetically independent with little immigration, at least by reproductive females from other rookeries (Dutton et al., 2014a). Delineating the boundaries of MUs and identifying those in need of protection is thus important to adapt management scales to preserve the genetic diversity of the species. It also serves as a reference dataset to determine the natal origin of turtles sampled outside nesting events (Jensen et al., 2013). Several populations usually mix on the foraging grounds where they are exposed to high threats (Bjorndal and Bolten, 2008; Bowen et al., 1992). Identifying the connectivity between MUs and foraging grounds is thus important to better

assess the threats to green turtle populations in their different habitats and to improve the conservation and management of the species.

In the Pacific Ocean, efforts to describe MUs and their relative contribution to mixed stocks on foraging grounds have intensified in recent years. For green turtles, 35 distinct MUs have been identified including 29 in the Indo-Pacific (Jensen et al., 2016; Nishizawa et al., 2018), 5 in the Central North and Eastern Pacific (Chaves et al., 2017; Dutton et al., 2014a), and 1 in Japan (Hamabata et al., 2014). The contribution of these MUs to several foraging grounds was studied, including in Australia (Jensen et al., 2016), Malaysia (Nishizawa et al., 2018), New Caledonia (Read et al., 2015), Fiji (Piovano et al., 2019), North and South America (Álvarez-Varas et al., 2022; Chaves et al., 2017; Dutton et al., 2014b), Palmyra Atoll (Naro-Maciel et al., 2014), and Japan (Nishizawa et al., 2013). However, some regions remain largely under studied. To date, genetic structure and mixed stock analyses between French Polynesia, a large complex of islands isolated in the middle of the Pacific Ocean, and other Pacific islands were conducted for only 9 individuals sampled from one island, Mopelia, and accounted for 2 haplotypes (e.g. Dutton et al., 2014b; Jensen et al., 2016; Piovano et al., 2019). Nonetheless, this limited sampling allowed French Polynesia and the neighboring islands of American Samoa to be considered as distinct MUs (Dutton et al., 2014b). French Polynesia is composed of 118 islands distributed over an exclusive economic zone of 5 million sq. km, a surface as wide as Europe. The green turtle population was first estimated at 1000 annually breeding females, although an updated assessment is needed (Groombridge and Luxmoore, 1989; Seminoff et al., 2015). Nesting is known to occur on several islands, mainly Tetiaroa, Mopelia, and Scilly (Balazs et al., 1995; Touron et al., 2018), which are hundreds of kilometers apart, and there have been more recent reports of nesting in other Polynesian islands. A population decline was documented between the 1950s and the 1970s (Maison et al., 2010), and although the species is now protected under the Environment Code of French Polynesia, it still suffers from poaching. The genetic structure and the origin of individuals encountered in water have yet to be assessed for the territory. Boissin et al. (2019) started filling this huge data gap by analyzing the mtDNA control region of 97 individuals from 4 islands, but their sampling was too limited for an accurate description of genetic structure.

In this study, we describe the genetic structure and diversity of green turtles in French Polynesia based on 443 samples collected throughout the Polynesian stock. We investigate the structure between French Polynesia and the other MUs in the Pacific Ocean and analyze their contribution to the French Polynesian stock of in-water sampled individuals. This constitutes the most complete genetic assessment of green turtles in French Polynesia to date and provides an important contribution to our understanding of its genetic structure and its connection at the scale of the Pacific Ocean.

c. Material and Methods

i. Study area and data collection

Skin and muscle tissues were collected from *Chelonia mydas* specimens across 21 islands and atolls of French Polynesia between 2005 and 2021 (Figure III.1). Tissues were sampled from nesting females and hatchlings (known maternal origin), as well as free-swimming turtles, and from individuals seized from poaching (origin to be determined). In total, 443 specimens including 136 adults, 85 juveniles, 103 hatchlings, and 119 of unknown maturity stage were used for this study. Animals were classified as “adults” when their curved carapace length was superior to 85cm (Bjorndal et al., 2013; Phillips et al., 2021), “hatchlings” when sampled from nests, “juveniles” otherwise, and “unknown” when no information about the size was available. Samples collected and processed by Boissin et al. (2019) are included in this study (n=97). For structure and mixed stock analyses, the samples were divided into two datasets. The first included only individuals from known origin, i.e. nesting females and hatchlings (n=239). Nesting females were assumed to have originated from the island where they were sampled (Bowen and Karl, 2007). This dataset is referred to as the baseline population. As offspring share the same mitochondrial DNA as their mother, and to avoid double counting, the DNA from only one hatchling per identified nest was considered and sequenced, unless the mother was identified (in which case only her DNA was sequenced). When two hatchlings were sampled on the same date and no nest information was reported, they were considered as potential siblings and only one was kept in the dataset. The second dataset included juveniles and individuals of unknown maturity stages (n=204). These individuals were occasionally found in the lagoons and barrier reefs around 21 islands across the Society and Tuamotu archipelagos and were sometimes injured or poached. This dataset is referred to as the stock.

i. Molecular analyses

Total genomic DNA was extracted using the QIAamp 96 DNA QIAcube HT kit and the QIAcube HT DNA extraction robot (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer’s protocol. The first step was modified as follows: 1 mm² of tissue was digested in 200 µL of digestion buffer with 20 % Proteinase K (QIAGEN) and left at 56°C overnight. DNA samples were amplified by PCR on an 800bp fragment of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region using the primer pair LCM15382 (5'-GCTTAACCCCTAAAGCATTGG-3') and H950 (5'-GTCTCGGATTTAGGGGTTT-3') (Abreu-Grobois et al., 2006). The PCR reaction was performed in a final volume of 29µL containing 2.5µL of Buffer 10X, 1.25µL of MgCl₂ (25mM), and 0.5µL of Taq polymerase (5U/µL) from the Taq PCR Core Kit (QIAGEN), 3µL of dNTP mix (100mM), 0.4µL of each primer (10µM), 17.3µL of ultrapure water (SIGMA), and 4µL of template DNA (10-30µM).

The PCR parameters included an initial denaturing step at 94 °C for 5 min and then 35 cycles at 94 °C for 45 s, 52 °C for 45 s, 72 °C for 45 s and then a final extension step at 72 °C for 5 min. PCR amplicons were sequenced using the external service provider GenoScreen (Lille, France). Sequences were aligned using the ClusterW algorithm implemented in MEGA v7.0 (Kumar et al., 2016). Haplotypes were identified using BLAST against the GenBank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Haplotype frequency, haplotype and nucleotide diversities were calculated using Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier and Lischer, 2010).

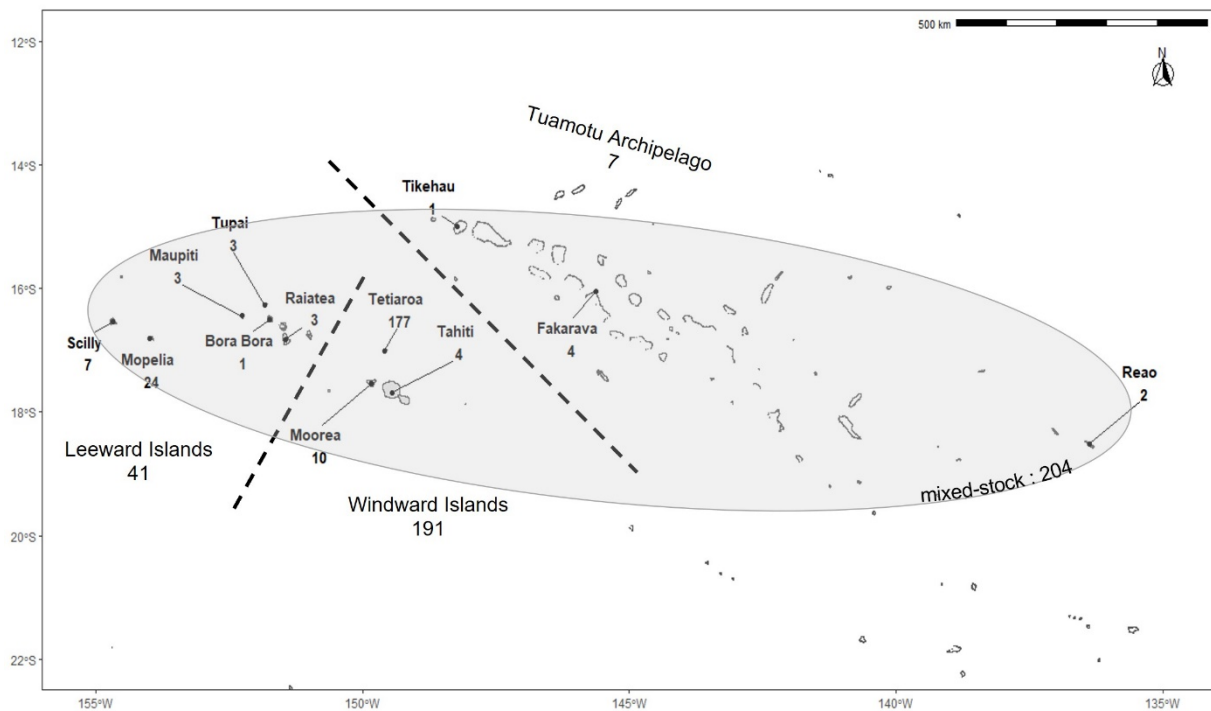


Figure III.1. Sampling locations of green turtles in French Polynesia. Numbers indicate the number of samples from each island. Dashed lines separate the three main island groups. The shaded area represents the extent of the stock sampling locations and the arrow represents the direction of the main current, the Southern Equatorial Current.

ii. Spatial genetic structure within French Polynesia

To investigate spatial genetic structure in French Polynesia, the fixation index F_{st} and pairwise ϕ_{st} distances were calculated between the three most sampled islands (Tetiaroa, $n=177$; Mopelia, $n=24$; Moorea, $n=13$). To extend the analytical power, the sequences from the other islands were then included in F_{st} and ϕ_{st} calculations. The sequences were grouped into the three main island groups belonging to 2 different archipelagos separated by more than 200km (Windward Islands, $n= 191$; Leeward Islands, $n=41$, in the Society Archipelago; Tuamotu Archipelago, $n=7$). The calculations were performed on the baseline dataset using Arlequin v3.5.2.2 with 1000 permutations. To decrease the genetic variance due to the difference in

sampling size between Tetiaroa and the other islands, 3 random sub-samplings of Tetiaroa were created and F_{st} and ϕ_{st} were also calculated between these, Mopelia, and Moorea.

iii. *Mixed stock analysis (MSA)*

To determine the origin of the FP stock, all of the management units (MUs) from the Pacific Ocean were considered, and their haplotype frequencies were retrieved from Chaves et al. (2017), Dutton et al. (2014, 2018), Hamabata et al. (2014), Jensen et al. (2016), Nishizawa et al. (2018) (Figure III.2, Supplementary Material S1). In French Polynesia, two scenarios were explored. First, based on the genetic structure, 3 MUs with one in each main island group were considered (Leeward Islands, Windward Islands, and Tuamotu). Next, 2 MUs, one in Tetiaroa and one which included the rest of the islands, were investigated to explore the relative contribution of Tetiaroa and the other islands to the stock. F_{st} was calculated between the MUs of French Polynesia and the rest of the Pacific Ocean to ensure that the genetic structure is significant and to avoid any bias in the MSA. The R package *rubias* (Moran and Anderson, 2019) was used to perform the MSA. First, simulations were run to evaluate the accuracy of mixing proportion estimates for the stock. For each baseline scenario, several sets of 40 simulations with 200 individuals in the stock were performed with the leave-one-out cross-validation method, which improves accuracy estimates (Anderson et al., 2008). Each set was run with a different prior parameter that assigned different weights to the MUs from which the 200 individuals were sampled according to i) MU size (i.e. estimated number of nesters), ii) MU distance from the stock, and iii) both the size and the distance. The size prior was defined to be $p_s = s/s_{max}$, with s being the size of the MU and s_{max} the size of the largest MU of the dataset. Population sizes were those defined in Balazs et al. (2015) (Hawaii), Seminoff et al. (2015) (East Pacific MUs), and Hamabata et al. (2014) (Japan), and those used in Jensen et al. (2016) and Nishizawa et al. (2018) for the other rookeries. In French Polynesia, a population size of 1350 breeding females over the sampling period was adopted based on estimates provided in the available literature, and distributed as follows: 850 individuals in the Windward Islands including 800 in Tetiaroa, 400 in the Leeward Islands, and 100 in the Tuamotu archipelago. The Windward Islands are thought to host the majority of French Polynesia's nesters (Craig et al., 2004; Laloë et al., 2020; Seminoff et al., 2015; Touron et al., 2018). The distance prior was set as $p_d = d_{max}/d$, with d as the MU distance to the stock and d_{max} as the distance of the furthest MU to the stock. The southernmost tip of Fakarava atoll was arbitrarily considered as the center of the stock and distances were calculated from that point. The last prior was a combination of these two, $p_{sd} = p_s \times p_d$, and one set was run without prior (i.e. equal weight was assigned to all MUs). Conditional Bayesian MSA was then performed on the real stock with these different priors.

First, it was performed on juveniles only ($n=85$), then on the total stock ($n=204$). For each prior, several Markov chain Monte Carlo (MCMC) chains of 150'000 iterations and burn-in of 50'000 were run starting at different values of stock proportions such that 90% of the stock came from either a Polynesian or the American Samoan MU, and the remaining 10% was equally distributed among the other MUs. Chain convergence was tested with the Gelman-Rubin diagnostic implemented in the *diag* function of the R package *coda* (Plummer et al., 2006). All of the values were below 1.2, which indicates convergence to a single posterior distribution (Gelman and Rubin, 1992).

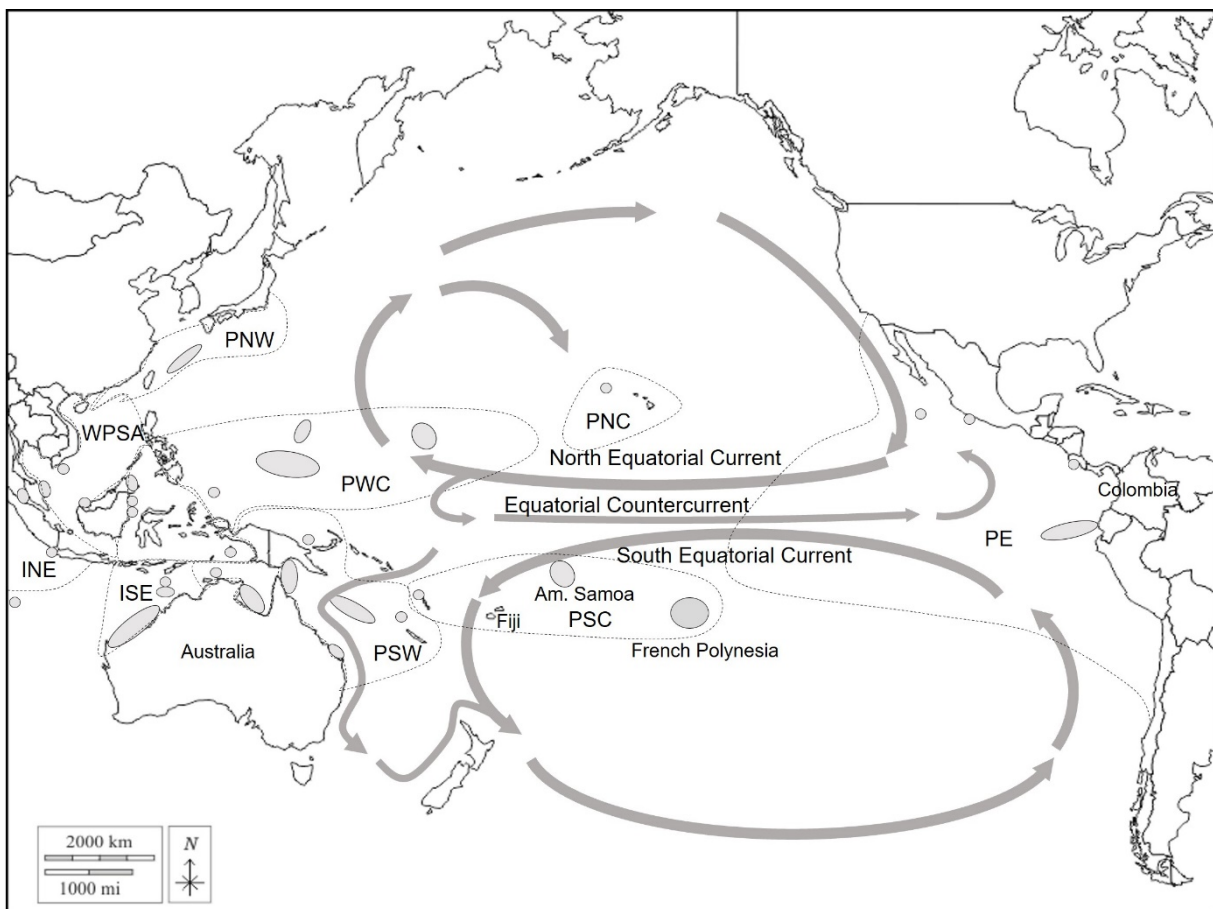


Figure III.2. Regional map of the green turtle management units in the Pacific Ocean. Grey areas represent the management units used for the baseline of the mixed-stock analysis. The main current flows are represented with grey arrows. Dashed lines represent the regional management units (RMU) (Wallace et al., 2010). INE: Indian Northeast, ISE: Indian Southeast, WPSA: West Pacific South Asia, PNW: Pacific Northwest, PWC: Pacific West Central, PSW: Pacific Southwest, PNC: Pacific North Central, PSC: Pacific South Central, PE: Pacific East.

d. Results

i. *Haplotype diversity in French Polynesia*

A total of 23 haplotypes were identified with the 770pb mtDNA control region fragment from 443 green turtle individuals (Table III.1). CmP65.1 was the most abundant (50.8% of all sequences), followed by CmP22.1 (22.3% of all sequences). CmP65.1 was previously found at low frequency in the Marshall Islands and American Samoa rookeries, and CmP22.1 was dominant in American Samoa, moderate in the Marshall Islands, and found at low frequency in Micronesia (Jensen et al., 2016). The other 21 haplotypes each accounted for less than 5% of the sequences. Three haplotypes, CmP65.3, CmP271.1, and CmP272.1 are described here for the first time (GenBank accession numbers: OQ683229-OQ683231). All of the haplotypes were closely related to CmP65.1 (Supplementary Figure 1). CmP271.1 is characterized by a 4bp indel and was found on 9 individuals, and CmP65.3 and CmP272.1 are characterized by one transition and were found on one individual.

Haplotype diversity was moderate ($h = 0.685$) and nucleotide diversity was high ($\pi = 0.0226$) indicating the abundance of genetically distinct haplotypes (Table III.1). Haplotype and nucleotide diversity were lower in the Windward Islands than in the two other groups, and the stock had a higher haplotype and nucleotide diversity than the rookeries ($h = 0.7383$, $\pi = 0.0248$). The stock also had a higher number of haplotypes, 9 of which were not found in the rookeries. Eight were found on a single individual, and one was found on 3 individuals, indicating the presence of rare haplotypes in French Polynesia. Among these, CmP44.1, CmP44.4, and CmP85.1 are abundant in the northern Great Barrier Reef and western New Caledonia rookeries (Jensen et al., 2016), CmP32.1 and CmP67.1 have so far been found exclusively in the Marshall Islands and Micronesia rookeries (Jensen et al., 2016), and CmP4.6 is from the Central and Eastern Pacific lineage and found in Eastern Pacific rookeries (Chaves et al., 2017; Dutton et al., 2014a). Three haplotypes were orphan (i.e. never found in any rookery): CmP65.3 is described here for the first time, CmP186.1 was previously found in low frequency in Australian foraging grounds (Jensen et al., 2016), and CmP109.1 was found on 1 individual in Palmyra Atoll (Naro-Maciel et al., 2014) and 1 individual in the Easter Island foraging aggregation (Álvarez-Varas et al., 2022).

Table III.1. Genetic diversity parameters and haplotype frequencies for green turtle rookeries and stock of French Polynesia (FP). Nf: Estimated number of nesting females, n: number of sequences, H: number of haplotypes, π : nucleotide diversity, h: haplotype diversity, SD: corresponding standard deviation. * These data include those of Boissin et al (2019). Data from Moorea in Boissin et al (2019) are included in the stock as they correspond to juvenile green turtles. a orphan haplotypes previously found in foraging aggregations, b orphan haplotype never described before.

Location	Nf	n	H	π	SD	h	SD	CmP44.1	CmP47.1	CmP44.4	CmP85.1	CmP20.1	CmP65.1	CmP32.1	CmP22.1	CmP67.1	CmP65.2	CmP56.1	CmP57.2	CmP192.1	CmP186.1 ^a	CmP4.6	CmP97.1	CmP33.1	CmP21.1	CmP109.1 ^a	CmP65.3 ^b	CmP272.1	CmP271.1	CmP249.1
Windward Islands	850	19 1	1 2	0.017 5	0.008 8	0.580 8	0.039	-	2	-	-	12	0	-	24	-	12	7	1	1	-	-	1	-	9	-	-	1	-	1
Tetiaroa*	800	17 7	1 1	-	-	-	-	-	2	-	-	11	0	-	22	-	12	7	1	-	-	-	1	-	9	-	-	1	-	1
Moorea		10	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tahiti		4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leeward Islands	400	41	8	0.023 1	0.011 6	0.684 1	0.047 2	-	1	-	-	3	16	-	17	-	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-
Bora Bora		1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Maupiti		3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mopelia		24	6	-	-	-	-	-	1	-	-	2	12	-	7	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Raiatea		3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Scilly*		7	4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tupai		3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tuamotu	100	7	3	0.021 4	0.012 5	0.523 8	0.208 6	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-
Reao		2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Fakarava		4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tikehau		1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Total	135 0	23 9	1 4	0.019 3	0.009 6	0.615 9	0.031 9	-	3	-	-	15	14 1	-	41	-	13	8	1	1	-	-	2	1	10	-	-	1	1	1
Stock FP*	-	20 4	2 0	0.024 8	0.012 2	0.738 3	0.021 7	1	5	1	1	7	84	1	58	1	-	4	1	2	1	1	21	1	2	3	1	-	8	-
Grand total	135	44	2	0.022	0.011	0.685	0.019	1	8	1	1	22	22	1	99	1	13	12	2	3	1	1	23	2	12	3	1	1	9	1

0 3 3 6 1 2 6

5

ii. Spatial genetic structure within French Polynesia

Genetic differentiation indices F_{st} and ϕ_{st} were first calculated between the islands of Tetiaroa, Moorea, and Mopelia, as these sites included enough samples to conduct the analysis ($n > 10$). F_{st} and ϕ_{st} were low (Table III.2), and only ϕ_{st} was significant between Mopelia and Tetiaroa ($\phi_{st} = 0.065$). F_{st} between Mopelia and Tetiaroa was 0.018 ($p_value = 0.127$). No significant genetic differentiation was found between Moorea and the two other islands. When using random sub-sampling on Tetiaroa, both F_{st} and ϕ_{st} were significant in one out of three comparisons between Mopelia and Tetiaroa (Table III.2). This reveals a weak genetic difference between the two main sampled islands, Tetiaroa and Mopelia. The other islands were then included ($n < 10$ for each island), and pooled together according to the main island groups. Both F_{st} and ϕ_{st} were significant ($p_value < 0.001$) between the Leeward Islands and Windward islands indicating a genetic differentiation between the two island groups of the Society archipelago, while no significant differentiation was found with the Tuamotu archipelago, which had a low number of samples ($n=7$) (Table III.2).

Table III.2 F_{st} and ϕ_{st} among the three most sampled islands Tetiaroa, Mopelia, Moorea, and among the three main island groups Leeward Islands, Windward Islands, and Tuamotu. P_values are shown in brackets, significant values in bold. n : number of samples.

Islands [n]	F_{st}		ϕ_{st}	
	Moorea [10]	Mopelia [24]	Moorea [10]	Mopelia [24]
Mopelia [24]	-0.015 (0.451)	-	-0.022 (0.368)	-
Tetiaroa [177]	-0.024 (0.729)	0.018 (0.127)	-0.048 (0.818)	0.065 (0.039)
sub-sampling 1 [59]	-0.024 (0.651)	-0.004 (0.471)	-0.058 (0.791)	0.032 (0.163)
sub-sampling 2 [59]	-0.015 (0.535)	0.049 (0.040)	-0.042 (0.494)	0.095 (0.038)
sub-sampling 3 [59]	-0.031 (0.731)	0.010 (0.235)	-0.057 (0.911)	0.048 (0.082)
Island groups [n]	Tuamotu [9]	Leeward Islands [41]	Tuamotu [9]	Leeward Islands [191]
Leeward Islands [41]	0.077 (0.101)	-	0.0264 (0.140)	-
Windward Islands [191]	-0.0367 (0.847)	0.0965 (0.000)	-0.0430 (0.529)	0.1413 (0.000)

iii. Mixed-stock analysis

As significant genetic differentiation was observed between island groups in French Polynesia, MSA was first run considering 3 MUs for the following areas: Leeward Islands, Windward Islands, and Tuamotu. Although Tuamotu was not significantly different from the other French Polynesian MUs, it was kept as a separate MU considering its geographical and geological differences. The Leeward Islands and American Samoa had a low genetic difference at the significance threshold limit ($F_{st} = 0.063$, $p_value = 0.064$, Table III.3), and were also kept as

different MUs. The Leeward Islands, the Windward Islands, and the Tuamotu archipelago were genetically different from all of the other Pacific MUs (Table III.3).

Furthermore, the simulations showed that regardless of which prior was used, the contributions of the Tuamotu and Leeward Islands to the French Polynesian stock were underestimated, likely due to limited sampling (Figure III.3 (A) and Supplementary Material S2). The contribution from the Windward Islands was more accurately estimated with the population size prior and the combined prior (size x distance), and overestimated with the distance and flat priors. The results of the MSA showed that only French Polynesian MUs contributed significantly to the stock in French Polynesia. Overall, the contribution of the Windward Islands ranged from 90.8% to 93.5% (confidence interval from 82.0% to 99.1%) with flat, population size, and combined priors (Figure III.4 (A)). All of the other contributions were negligible, with a confidence interval including 0% (See Supplementary Material S3 for details). The distance prior was the only prior to detect a significant contribution of the Tuamotu (15.5%, conf. int. 11.0% to 20.7%) and the Leeward Islands (13.5%, conf. int. 8.2% to 19.7%), in addition to the Windward Islands (39.6%, conf. int. 32.0% to 47.2%). Stock that included juveniles only (data not shown) or juveniles and individuals from an unknown maturity stage (Figure III.4 (A)) showed similar results.

The role of Tetiaroa in this dominance by the Windward Islands was further explored. Tetiaroa was found to be genetically different from all other Pacific MUs, as was the group formed by the other Polynesian islands (Table III.3). Although simulations indicated an overestimation for Tetiaroa with respect to the distance and flat priors, and an underestimation of other Polynesian islands for all priors (Figure III.3 (B) and Supplementary Material S2), a contribution from these islands was detected. Their contribution was smaller on the stock with juveniles only (Figure III.4 (B)) than on juveniles and unknown individuals (Figure III.4 (C)). It ranged from 33.1% to 55.5% (C.I. 0% to 62.8%) depending on the prior, with the distance prior providing the greatest contribution from these islands, and the size prior providing the least. The contribution of Tetiaroa ranged from 21.3% to 64.1% (C.I. 15.2% to 98.3%), with the distance prior providing the lowest contribution, and the size prior the highest. The percentages from all of the other MUs from the Pacific Ocean were once again negligible, confirming the exclusive contribution of Polynesian Islands to the French Polynesian stock (See Supplementary Material S3 for details).

Table III.3. *Fst* values between the French Polynesian management units and the other MUs in the Pacific Ocean. *P*-values > 0.0001 are indicated in brackets. All the other *p*-values were lower than 0.0001, indicating strong significance. Non-significant values are indicated in bold.

	Tuamotu	Leeward Is.	Winward Is.	Fr. Polynesia (w/o Tetiaroa)	Tetiaroa
n GBR	0.364	0.339	0.385	0.355	0.380
Coral Sea Chesterfield	0.482	0.427	0.452	0.438	0.448
s GBR	0.769	0.637	0.586	0.624	0.585
w New Caledonia	0.258	0.249	0.313	0.270	0.307
n New Guinea	0.647	0.478	0.493	0.487	0.490
Aru	0.786	0.582	0.562	0.574	0.559
GoC	0.343	0.321	0.375	0.340	0.369
Vanuatu	0.458	0.398	0.436	0.413	0.431
Marshall Is.	0.497	0.395	0.434	0.413	0.431
Micronesia	0.351	0.308	0.342	0.322	0.338
Palau	0.594	0.465	0.475	0.471	0.471
CNM /GUAM	0.853	0.620	0.567	0.604	0.566
American Samoa	0.225 (0.015)	0.063 (0.064)	0.228	0.119 (0.010)	0.223
e Borneo	0.306	0.293	0.353	0.314	0.347
TIP	0.496	0.455	0.469	0.462	0.466
SIPA	0.342	0.320	0.368	0.336	0.363
Penang Perak	0.648	0.525	0.521	0.524	0.518
Vietnam	0.499	0.420	0.459	0.435	0.454
Malesian Pen.	0.305	0.288	0.337	0.304	0.332
Pahang	0.442	0.390	0.431	0.405	0.426
Mersing	0.551 (0.002)	0.448	0.489	0.464	0.484
Sarawak	0.504	0.459	0.473	0.466	0.470
Ashmore Reef	0.384	0.336	0.383	0.355	0.378
Scott Browse	0.440	0.397	0.430	0.409	0.426
w Java	0.331	0.311	0.369	0.332	0.364
Coboug Pen.	0.381	0.350	0.399	0.367	0.393
North West Shelf	0.495	0.441	0.461	0.449	0.458
Cocos "Keeling" Is.	0.662	0.511	0.523	0.515	0.519
Michoacan	0.379	0.353	0.394	0.367	0.389
Costa Rica	0.279	0.271	0.336	0.295	0.330
Equador	0.321	0.303	0.351	0.318	0.345
nw Hawaii	0.513	0.471	0.482	0.477	0.479
Revillagigedo	0.342	0.321	0.372	0.339	0.366
Japan	0.355	0.332	0.380	0.348	0.375

e. Discussion

From the 443 specimens analyzed, a total of 23 haplotypes were recovered in French Polynesia. This constitutes the first comprehensive structural assessment of green turtle populations on this vast Central and isolated South Pacific Ocean territory and broadens our understanding of population connectivity at the Pacific scale. We found that nesting turtles are structured in at least two genetically different populations, which are i) isolated from the other Pacific MUs, and ii) the only contributors to the stock of juveniles sampled on the territory.

i. *Haplotype diversity in French Polynesia*

With 23 haplotypes found in the territory, this study fills an important gap in the knowledge about green turtle genetic diversity in the Pacific Ocean. Previously, only 2 haplotypes retrieved from 9 individuals in Mopelia atoll were described (Dutton et al., 2014a) and used (ex. Jensen et al., 2016; Piovano et al., 2019; Read et al., 2015) in genetic structure and mixed stock analysis studies at the Pacific Ocean scale. Boissin et al. (2019) found a total of 9 haplotypes on 97 sequences (included here), and the present study builds on previous efforts with 346 new sequences, and 14 additional haplotypes. Thanks to coordinated efforts on several islands spread across a vast area, many of which are remote and not easily accessible, this constitutes the largest sampling effort in French Polynesia so far, making it one of the most comprehensively sampled locations in the Pacific Ocean. Unsurprisingly, and because of a significant increase in the number of samples analyzed, the haplotype and nucleotide diversity are also higher than previously reported in Dutton et al. (2014a) ($\pi=0.0003$). With a haplotype diversity of 0.6852 and a nucleotide diversity of 0.0226, French Polynesia demonstrates similar levels of diversity to that of the South West Pacific and Western Indian Ocean MUs, two areas identified as nucleotide diversity hotspots (Jensen et al., 2019). This work also confirms the dominance of haplotypes CmP65.1 and CmP22.1 on the territory. CmP65.1 belongs to clade VI (Supplementary Figure 1), which is mostly restricted to the Central South Pacific (Jensen et al., 2019). Dominant in French Polynesia, CmP65.1 is found at low frequencies in American Samoa and the Marshall Islands (Jensen et al., 2016). Haplotypes CmP56.1, CmP85.1, and CmP65.2 also belong to clade VI, which represents 59% of our total sample. This aligns with the conclusion made by Boissin et al. (2019) that considered French Polynesia as the center of the range for this lineage and one of the genetic diversity hotspots for *C. mydas*, suggesting a potential past glacial refuge for the green turtle in French Polynesia. The second most abundant haplotype, CmP22.1, belongs to clade III, which represents an additional 31% of our total sample. This haplotype is also found in the Marshall Islands, Micronesia, and American Samoa where it is dominant (Jensen et al., 2016). The three new haplotypes were all closely related to the dominant

haplotype Cmp65.1 and belong to clade VI (Supplementary Figure 1). As they were found at low frequency and are derivatives of the dominant haplotype, they may either indicate under sampled populations dominated by Cmp65.1, the presence of new lineages in the population, or that they belong to ancient and declining lineages.

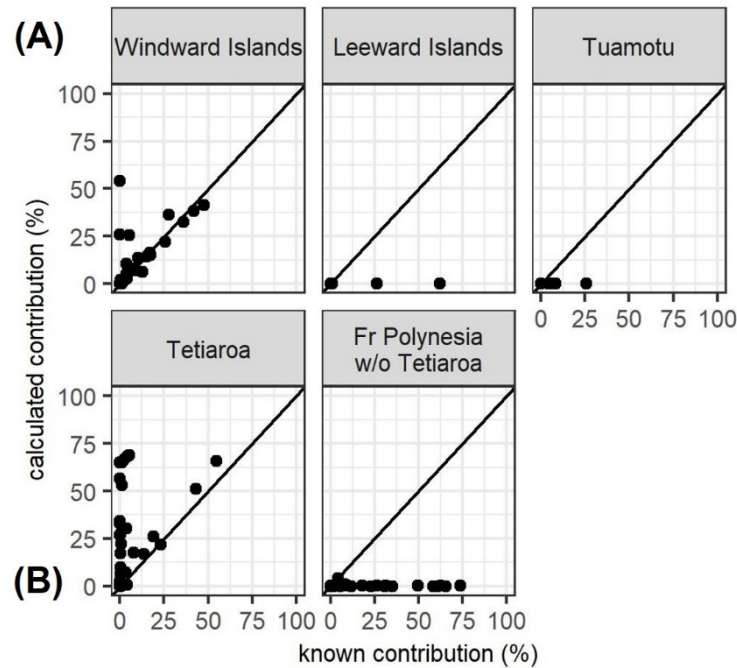


Figure III.3. Simulations from the MSA baseline accuracy assessment with the size and distance combined prior for the French Polynesian MUs, representing known versus calculated contribution on 40 simulations. A: scenario 1 with three MUs in French Polynesia, B: scenario 2 with two MUs in French Polynesia. All the simulations are available in Supplementary Material S2.

ii. Spatial genetic structure in French Polynesia and the Pacific Ocean

Within French Polynesia, a weak genetic structure between the most sampled islands, Tetiaroa and Mopelia, was revealed (Table III.2). This is consistent with the known philopatric behavior of female green turtles that drives genetic structuring between rookeries (Bowen and Karl, 2007). These two islands are 460km apart, and genetic differentiation among sites 500km apart was previously detected in the Pacific (Dutton et al., 2014a) and Indian Oceans (Bourjea et al., 2007). However, while the genetic differentiation between these sites remains weak, some degree of connectivity between these rookeries cannot be excluded. When nearby islands are included in the analysis, the genetic difference between the two island groups, Leeward Islands and Winward Islands, is stronger. This indicates the presence of at least two genetic groups in French Polynesia and constitutes the first description of spatial genetic structure within French Polynesia. Additionally, French Polynesian MUs were genetically different from the other Pacific MUs which indicates some degree of reproductive isolation. This emphasizes the uniqueness of French Polynesian MUs in terms of genetic diversity. While the genetic difference between the

Leeward Islands and American Samoa was very weak and at the limit of significance (p -value = 0.064), Dutton et al. (2014b) found a significant difference between rookeries in American Samoa and Mopelia. This structure should be investigated with additional samples from American Samoa (currently 17 sequences).

Despite this unprecedented sampling effort in French Polynesia, the present genetic assessment suffers from bias. First, the majority of the samples (74%) comes from one island, Tetiaroa, while the other 26% are distributed among 11 islands. This sampling bias may hinder the detection of the complete genetic structure on the territory. The natal homing spatial scale is variable among locations, and islands as close as 60km from one another have shown genetic structuring such as in the Yaeyama Islands of Japan (Nishizawa et al., 2011). French Polynesia is characterized by more than one hundred islands distributed across 2000km, and a more even sampling effort would allow for the detection of a finer genetic structure. In particular, all of the islands in the Tuamotu, grouped into one MU, accounted for only 7 sequences and thus could not reveal any structure, neither within the archipelago nor with the other island groups, Leeward Islands and Windward Islands. With respect to the size of the archipelago (approx. 1300km) and its distance from the other island groups, we cannot exclude the possibility that a structure exists and would be detected with more samples from the Tuamotu islands. However, fewer females are expected to nest in this archipelago, which could make sampling even more challenging (Seminoff et al., 2015).

iii. MSA and connectivity with other foraging grounds

The results of the MSA showed an exclusive contribution of French Polynesian MUs to the French Polynesian stock. This suggests that all juveniles in French Polynesia may come from local rookeries. The Windward islands are the principal contributors, and Tetiaroa, which is by far the most sampled rookery, contributes significantly but not exclusively to the stock. This result provides critical information with respect to early life history traits of the green turtle in French Polynesia. Post-hatchlings are usually thought to recruit in neritic habitats at a CCL of 35-40 cm in the Pacific (Limpus et al., 2005) after an epipelagic phase of several years. During this phase, they are thought to disperse widely depending on the currents (Bolten, 2003). The Southern Equatorial Current which flows westward to Fiji and the Australian coast facilitates long-distance dispersion of post-hatchlings from French Polynesia to foraging grounds in the Western Pacific Ocean, as was reported by Jones et al. (2018) on the Great Barrier Reef, and by Piovano (2019) in Fiji (Figure III.2). However, the presence of several individuals smaller than 35cm CCL in the French Polynesian stock (Supplementary Material S4) suggests that post-hatchling dispersion may be limited for some individuals. Information about green turtles' "lost

years” is very scarce, but Hamabata et al. (2016) also observed unexpectedly limited migrations of post-hatchlings restricted to Japanese waters. Most importantly, dispersion seems to occur unidirectionally from French Polynesian rookeries, and the territory does not seem to host juveniles originating from other Pacific rookeries. Such isolation in terms of recruitment from the other regional MU makes the French Polynesia green turtle population highly vulnerable to local threats.

Additionally, migrations of nesting females from French Polynesia to American Samoa, Tonga, New Caledonia, and Fiji have been documented with satellite tracking (Craig et al., 2004; DIREN, personal com.). Fijian foraging grounds offer seagrass beds for adult green turtle alimentation, which are absent in French Polynesia (Craig et al., 2004). Juveniles have also been found to forage in Fiji, and MSA on Fijian foraging grounds indicates that French Polynesian rookeries contribute 7% to this stock (Piovano et al., 2019). However, this contribution was considered underestimated because it was based on only 9 individuals (accounting for 2 haplotypes) from Mopelia’s rookery, which does not reflect the diversity of the French Polynesian population (Piovano et al., 2019). Therefore, the contribution to Fijian foraging aggregations can likely be revised with the more complete baseline presented here. Similarly, this baseline resolves several haplotypes previously considered orphan haplotypes that can now be linked to French Polynesian rookeries. Haplotype CmP33.1 was found on one juvenile in foraging aggregations in Fiji (Piovano et al., 2019), haplotype CmP192.1 was found both in Fiji (n=5) and on the Gear Barrier Reef (n=1) (Jensen et al., 2016), and haplotype CmP97.1 was found in Ecuador (n=10) (Chaves et al., 2017), Easter Island (n=10) (Álvarez-Varas et al., 2022), and Palmyra atoll foraging aggregations (n=6) (Naro-Maciel et al., 2014). However, these three haplotypes were found at very low frequencies in French Polynesian rookeries (1 individual for CmP33.1 and CmP97.1, 2 for CmP97.1), and might as well be present in other source populations that have yet to be sampled. Also, the presence of three orphan haplotypes in our stock, even though they were found at low frequencies, is a sign of incomplete sampling of existent rookeries, or unsampled rookeries. The baseline used here includes an incomplete sampling of Samoan and Fijian rookeries, in addition to French Polynesia. Extending sampling efforts in these areas could improve our understanding of the connection between these three territories that are used by French Polynesian green turtles during their lifetime. Additionally, the presence of French Polynesian haplotypes in Eastern and Central North Pacific foraging grounds may indicate rare Northward and Eastward migration events. French Polynesian rookeries were also found to contribute 7% to Gorgona Island foraging ground in Colombia (Correa-Cárdenas et al., 2012). This low contribution seems realistic as post-hatchlings may swim northward through the South Equatorial Current and reach the Pacific Equatorial Countercurrent that follows the

Equator line and flows eastward towards South America (Figure III.2). These migrations and the connectivity between Central South and East Pacific Oceans are still poorly understood, and further investigations should be considered.

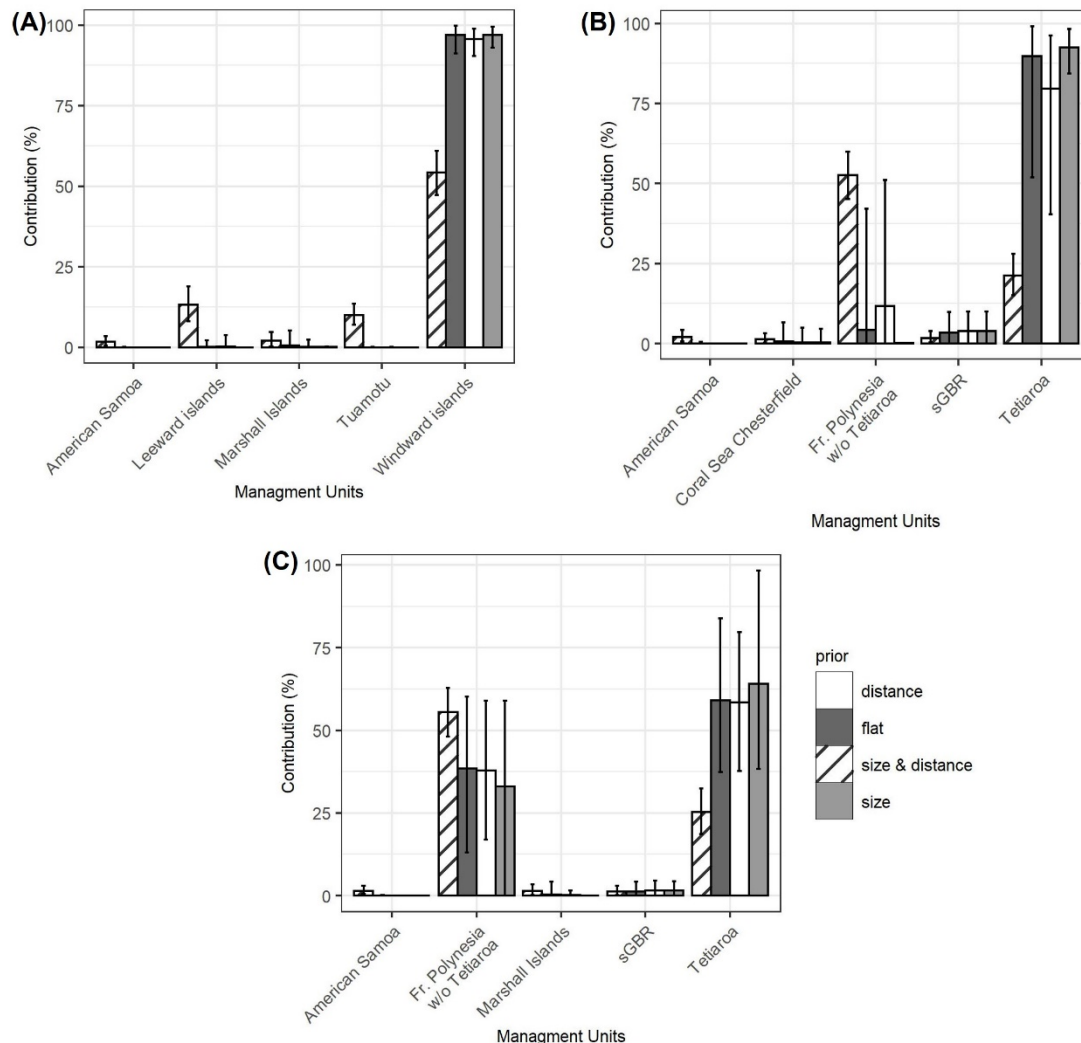


Figure III.4. Contribution of the 5 most contributing MUs in the Pacific Ocean to the stock of green turtles of French Polynesia (according to size prior) calculated with the mixed-stock analysis and different priors. A: scenario 1 with three MUs in French Polynesia (Windward Islands, Leeward Island, Tuamotu) on the total stock. B: scenario 2 with two MUs in French Polynesia (Tetiaroa, FP other islands) on juveniles only. C: scenario 2 on the total stock.

iv. Conclusion and implication for conservation

This work is the most comprehensive assessment of genetic diversity, structure and connectivity of green turtle populations in French Polynesia to date. Here, French Polynesia's green turtle populations are shown to be genetically isolated from other populations and can thus be considered as a separate management unit from nearby islands, and highlights the population's vulnerability to local threats. This finding is in accordance with the regional MUs defined for green turtles in the South Pacific region (Seminoff et al., 2015). It confirms the role of

French Polynesia as a genetic diversity hotspot, emphasizing the importance of preserving this endemic diversity at the species scale. Given the genetic structure within the territory, further division into two genetic groups is needed, one in the Leeward Islands and one in the Windward Islands. Interestingly, the Leeward Islands hosted a greater genetic diversity than the Windward islands despite a smaller sampling effort. Conservation efforts should thus not be overlooked in this island group that plays an important role in the overall genetic diversity of the species. Despite genetic isolation, French Polynesian rookeries are source populations for several feeding grounds, both in the Eastern and Western Pacific and are thus connected with several islands through adult and juvenile migrations. This highlights the need for coordinated regional conservation efforts at the Pacific scale to preserve the green turtles throughout their entire lifetime

Supplementary Materials are available in ANNEXE V.



Chapitre IV : Structure génétique locale au sein de la Polynésie française

I. Introduction

Ce chapitre se focalise sur la structure génétique au sein de la Polynésie française, et avec les marqueurs microsatellites (marqueurs nucléaires). Ces marqueurs sont plus variables que le marqueur mitochondrial, donc peuvent détecter des structures de populations à échelle plus fine. Ils tiennent aussi compte de la structure apportée par les mâles, puisqu'hérités des deux parents. L'intérêt de cette analyse est donc d'étudier la connectivité potentiellement apportée par les mâles entre les différentes populations de Polynésie française. Le comportement philopatric des mâles sur les aires de reproduction est débattu dans la littérature. Certaines études montrent une capacité à connecter les populations (Bradshaw et al., 2018; Roberts et al., 2004), alors que d'autres montrent une structure génétique qui met en lumière une fidélité aux sites de reproduction (FitzSimmons et al., 1997b). Afin de détecter une telle structure, il est en général nécessaire d'avoir un nombre important de marqueurs microsatellites (Wang, 2016).

Ainsi, ce chapitre utilise les marqueurs développés au Chapitre II, afin de tester l'hypothèse du comportement philopatric des mâles sur des aires de reproduction proche des plages de naissance. La structure des populations est étudiée avec plusieurs types d'analyses (bayésiennes, multivariées, et indices de différenciation).

Ce chapitre fait l'objet d'une publication prête pour soumission au journal *Endangered Species Research*.

II. Article

Local genetic structure in green sea turtles (*Chelonia mydas*) within French Polynesia discovered with microsatellite markers

Violaine Dolfo ^{1,*}, Cécile Gaspar², Miri Tatarata ³, Emilie Boissin ^{1,4,†}, Serge Planes ^{1,4,†}

¹ PSL Research University: EPHE - UPVD - CNRS, UAR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

²Te Mana O Te Moana Foundation, Papetoai, Moorea, French Polynesia

³ Direction de l'Environnement de la Polynésie Française, Papeete, Tahiti, French Polynesia

⁴ Laboratoire d'Excellence « CORAIL », 66860 Perpignan, France

† These authors contributed equally to this work and share last authorship

* Corresponding author: violaine.dolfo@univ-perp.fr

Acknowledgments

This research was funded by the Direction of the Environment of French Polynesia. We would like to thank the volunteer network coordinated by the Direction of the Environment in French Polynesia for providing all the samples used in this work, including the NGO Te mana o te moana for the samples from Tetiaroa and Moorea and the Bora Bora Turtle Center for the samples from the Leeward Islands. Thank you to Jeanine Almany for the English corrections.

Keywords: Microsatellite markers · Green turtle · Genetic structure · Reproductive behavior · French Polynesia

a. Abstract

Determining the genetic population structure of wild species is often necessary to the development of efficient management and conservation strategies. The endangered green sea turtle *Chelonia mydas* is a circumglobal species that already demonstrates complex population structures both regionally and worldwide. Mitochondrial DNA (mtDNA) markers have been extensively used to delineate population boundaries for green sea turtles, based primarily on female behavior. Here, we investigate the population structure of green sea turtles in French Polynesia using 23 microsatellite markers that integrate male-drive structure. Multivariate analyses, Bayesian clustering, and differentiation indexes all revealed 3 distinct genetic groups, one of which showed higher levels of inbreeding than the others. This structure was not related to any spatial, temporal, or life history factors, nor to mtDNA lineages. While the factors which determine this structure are not yet clear, we hypothesize two processes which may be responsible for this segregation: i) nonrandom mating preferences associated with partner's **ecotype** or morphotype not yet described, or ii) philopatry to distinct reproduction areas with little connectivity. This study is the first to demonstrate such a regional pattern in sea turtle population structure and emphasizes the need to better describe morphotypes from photo-identifications in future studies. Our results highlight the complex behavior observed in this species which leads to strong genetic patterns at a local scale and emphasizes the importance of using a robust nuclear marker set in population structure analyses to gain a better understanding of sea turtle reproductive behavior.

b. Introduction

Identifying the boundaries of wild populations and the mechanisms that determine gene flow is crucial to ensure the efficient management of species (Kelly and Palumbi, 2010; Seminoff, 2004). This is particularly true for endangered species, which over recent decades, have suffered sharp population declines (Bradshaw et al., 2018). In response, determining the population genetic structure of wild species has recently received an increasing level of attention (Holderegger et al., 2019). Genetic structuring is influenced by the interaction between individuals and their environment, according to their life history traits, reproductive behavior, and demographic features, and is thus species-specific (Selkoe et al., 2014).

In highly migratory species, the genetic structure of populations is affected by their ability to disperse (Hancock et al., 2019). Green sea turtles, *Chelonia mydas*, potentially exemplify this phenomenon as they endure long migrations at different stages of their complex life cycle (Bolten, 2003). Hatchlings immediately disperse from natal beaches to the pelagic ocean where both passive drift and oriented swimming guide their routes (Boyle and Limpus, 2008; Hamabata et al., 2016). Before recruiting to foraging grounds, they endure an epipelagic phase ranging from five to ten years commonly referred to as the “lost years” because very little information is available for this period during which they experience a high mortality (Bolten, 2003). Foraging grounds usually host individuals originating from different rookeries, some of which may be located thousands of kilometers away (Bjorndal and Bolten, 2008; Dutton et al., 2018; Jensen et al., 2013). On the other hand, individuals from the same rookery may migrate to different foraging grounds (Patrício et al., 2017). At sexual maturity, females periodically migrate back to their natal beach to nest, a phenomenon known as natal homing (Bowen and Karl, 2007). Both adult males and females are thought to show some extent of fidelity to their reproductive ground (philopatry), which may occur next to the nesting beaches or closer to the feeding grounds (FitzSimmons et al., 1997a; López-Castro et al., 2010).

Because of this philopatric behavior, green sea turtles exhibit a complex population structure worldwide. Maternally inherited mitochondrial DNA (mtDNA) markers have been used to identify this structure, together with reproductive population boundaries drawn by the natal homing behavior of females, with rookeries several kilometers apart that appear to be genetically different (Bowen et al., 1992). This has led to implementing the concept of Management Units (MUs), groups of genetically isolated rookeries which are not likely to be recolonized in the case of

population decline (Moritz, 1994). However, the spatial scale of this differentiation may be variable across the globe. For example, Bourjea et al. (2007), using a 396 bp fragment of the mtDNA control region, and Dutton et al. (2014b), with a 770 bp fragment of the same marker, did not find any significant genetic differentiation between rookeries closer than 500km apart, in the Mozambique Channel and in the Western and Central Pacific Ocean, respectively. However, Nishizawa et al. (2011) found significant genetic variations in rookeries 60km apart in the Yaeyama islands of Japan with 396 bp mtDNA control region sequences. While this maternally inherited mtDNA marker has been useful to determine rookery structure, its informative potential is limited to female gene flow. Additionally, its relatively low variability makes it suitable to unravel historic population changes (Boissin et al. 2019), but relatively uninformative about more recent population changes (Bradshaw et al., 2018; Formia et al., 2006).

To decipher recent population changes and male mediated gene flow, recent studies have used highly variable nuclear markers such as microsatellites and SNPs (Bagda et al., 2012; Bradshaw et al., 2018; FitzSimmons et al., 1997b; Nishizawa et al., 2011; Roberts et al., 2004; Roden et al., 2013). Roberts et al. (2004) and Nishizawa et al. (2011) used microsatellites and did not find any differentiation between rookeries that were found to be significantly different using mtDNA, but they based their conclusions on only 4 microsatellite markers, which limits the discrimination potential. Fitzsimmons et al. (1997b), Roden et al. (2013) and Bradshaw (2018) used 4, 10, and 13 microsatellite markers, respectively, suggesting a somewhat limited male-mediated gene flow, and concluded a male philopatry to reproduction areas located near nesting beaches, a pattern similar to that found for females. This highlights the importance of having sufficient discrimination power, provided in microsatellite analyses, by high polymorphism and an increasing number of markers (Selkoe and Toonen, 2006).

Although a growing number of studies have focused on the population structure of *C. mydas* in the Pacific Ocean, some areas still suffer from data gaps. French Polynesia is a territory composed of 118 islands and atolls, some of them uninhabited, spread across a surface area of 5.5 million km². Green sea turtle nesting sites are already known on Tetiaroa, Mopelia, and Scilly atolls, and to a lesser extent in Tikehau, Maupiti, and Fakarava (Balazs et al., 1995; Laloë et al., 2020; Touron et al., 2018), while others may exist in very remote and inhabited atolls that have not yet been surveyed. Although no feeding sites are known, juveniles are commonly observed in the lagoons and on reef slopes and there is satellite track evidence of long-time residency for some females (DIREN, pers. comm.). Despite the presence of *C. mydas* on the territory, very little

information on the population structure within French Polynesia exists. Only Boissin et al. (2019), while investigating the evolutionary history of green turtle populations in French Polynesia, looked into population structure using nuclear markers, but only used 12 microsatellite markers and on very few samples (97 individuals) with a sampling biased towards Tetiaroa (82 individuals out of 97).

The aim of the present study is to investigate the population structure of *C. mydas* in French Polynesia using a robust set of 23 polymorphic recently developed microsatellite markers (Dolfo et al., 2023) and a large unique set of 1109 samples to ensure sufficient detection power. The ultimate goal is to better understand population structure to inform management measures on the territory, and to potentially identify critical areas which may require enhanced management efforts.

c. Materials and methods

i. Sample collection

Skin and muscle tissues were collected from *Chelonia mydas* specimens across 21 islands and atolls of French Polynesia between 2006 and 2021. Tissues were sampled on nesting females, hatchlings, free swimming turtles, and specimens seized from poaching (in agreement with the Direction of the Environment of French Polynesia, DIREN). All samples were collected and processed with authorizations from the DIREN; with samples remaining the property of DIREN and only used for specific scientific analyses. In total, 1109 specimens including 115 adults, 83 juveniles, 834 hatchlings, and 77 of unknown maturity stage were used for this study. Animals were classified as “adults” when their curved carapace length was superior to 85cm (Bjorndal et al., 2013; Phillips et al., 2021), “hatchlings” when sampled from the nests (either hatching or dead in the nest), “juveniles” otherwise, and “unknown” when no information about the size was available. Samples were split into two datasets. One dataset contained all of the adult and juvenile turtles plus one hatchling per identified nest to remove potential family structure signals (dataset 1, n=839), and the second was composed of the same adults and juveniles and a different hatchling for each nest to test the robustness of the results (dataset 2, n=839). When several “unknown” samples were recorded with the same sampling date and location, they were considered as potential hatchlings from the same nest, and only one was included in each dataset. Samples were also grouped by maturity stage to investigate structuring across life stages, with one hatchling per nest on one hand (dataset 3, n=581, included in dataset 1), and adults and juveniles on the other (dataset 4, n=198, included in datasets 1&2).

ii. Molecular analyses

Nuclear DNA (nDNA)

Total genomic DNA was extracted using the QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit and the QIAcube DNA extraction robot (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. The first step was modified as follows: 1 mm² of tissues was digested in 200 µL of digestion buffer containing 20 % of Proteinase K (QIAGEN), at 56°C overnight. All samples (n=1109) were genotyped at 23 microsatellite loci using five multiplex reactions as per Dolfo *et al.* (2023). Allele sizes were visually assessed using GENEMAPPER software v.5 (Applied Biosystems). All ambiguous peak profiles were considered as missing data. MICROCHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) was used to identify null alleles, stuttering errors, and large allele dropout.

Mitochondrial DNA (mtDNA)

To compare the genetic structure determined by microsatellites with known maternal lineages, the individuals were also sequenced with the mtDNA marker. To do this, only the samples corresponding to adults, juveniles, individuals from unknown maturity stage, and hatchlings with unknown mother (n=466) were amplified by PCR on an 800bp fragment of the mtDNA control region using the primer pair LCM15382 (5'-GCTTAACCCTAAAGCATTGG-3') and H950 (5'-GTCTCGGATTTAGGGGTTT-3') (Abreu-Grobois *et al.*, 2006). Hatchlings with known mother were not included, as they share the mtDNA of their mother which was amplified. The PCR reaction was performed in a final volume of 29µL containing 2.5µL of Buffer 10X, 1.25µL of MgCl₂ (25mM), and 0.5µL of Taq polymerase (5U/µL) from the Taq PCR Core Kit (QIAGEN), 3µL of dNTP mix (100mM), 0.4µL of each primer (10µM), 17.3µL of ultrapure water (SIGMA), and 4µL of template DNA (10-30µM). The PCR parameters included an initial denaturing step at 94°C for 5 min and then 35 cycles at 94°C for 45 s, 52°C for 45 s, 72°C for 45 s and then a final extension step at 72°C for 5 min. PCR amplicons were sequenced using the external service provider GenoScreen (Lille, France). Sequences were aligned using the ClusterW algorithm implemented in MEGA v.7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Haplotypes were identified using BLAST against the GenBank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and grouped into clades as defined by Jensen *et al.* (2019).

iii. Data analysis

Genetic diversity

Genetic diversity of the French Polynesian populations was assessed with the 839 individuals from dataset 1. Mean number of alleles per locus (N_a), number of rare alleles (N_{ar}), and observed and expected heterozygosities (H_o and H_e) were calculated with GenAlEx v6.503 (Peakall and Smouse, 2006), for each population identified and globally across populations.

Genetic structure

Population structure was explored through several approaches. First, a discriminant analysis of principal components (DAPC) was performed using the R package *adegenet* (Jombart, 2008; R Core Team, 2022) to detect clusters of genetically related individuals. Then, as DAPC is designed to maximize the separation between groups (Jombart et al., 2010), G'_{st} (Hedrick, 2005) and D_{est} (Jost, 2008) indexes were calculated using GenAlEx to test for significance of the clusters revealed by DAPC. G'_{st} and D_{est} are the most accurate indexes of genetic differentiation for highly polymorphic loci such as microsatellites (Heller and Siegismund, 2009; Jost, 2008). Pairwise global and per locus G'_{st} and D_{est} were calculated between DAPC groups. To further confirm the grouping, two additional analyses were performed. First, a principal coordinate analysis (PCoA), which summarizes the overall variability among individuals, was run using the R package *bios2mds* (Pelé et al., 2012). All of the hatchlings from nests 1920_ONE33 ($n=70$) and 1415_OR084 ($n=14$), as they are the two nests for which we have the highest sampling, were projected on the PCoA to see if all siblings would cluster into the same group. Second, a Bayesian approach implemented in STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard et al., 2000) was performed with and without DAPC groups as population priors using the LOCPRIOR algorithm (Hubisz et al., 2009). This algorithm helps distinguish weakly differentiated populations (Hubisz et al., 2009). Ten independent series were run under the admixture ancestry model with correlated allelic frequencies for each assumed number of populations ($K=1-6$). Each run was performed with an initial burn-in of 50,000 steps, followed by 400,000 recorded MCMC (Marko chain Monte Carlo) repetitions. STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 online (Earl and vonHoldt, 2012) was used to assess K , the number of genetic populations that best fit the data, based on Evanno's ΔK method (Evanno et al., 2005). All of these analyses were performed on datasets 1, 2, 3, and 4 described above in the sampling section.

The distribution of mitochondrial haplotypes, maturity stages, sampling locations, and sampling seasons within DAPC groups was investigated and Fisher's exact tests were performed to test the homogeneity of the distribution of these variables between the groups.

Finally, the relatedness index (r) was calculated for each pair of individuals with the R package *related* (Pew et al., 2015), and the percentage of $r > 0.25$ and > 0.5 was calculated within each group and globally across the dataset. This allows for the degree of relatedness of individuals within each group to be compared with the global relatedness that encompasses all individuals. To further compare the groups with respect to their number of effective breeders, the contemporary effective population size (N_e) and the inbreeding coefficient of each group (F_{is}) were calculated. N_e was calculated using the linkage disequilibrium method implemented in NeEstimator v2.1 (Do et al., 2014) assuming random mating and with filtering rare alleles at various levels of frequencies (1, 2, and 5%). F_{is} was calculated with GENETIX v4.05.2 (Belkhir et al., 2004) for each group and for the global population.

d. Results

The DAPC analysis on the 839 individuals from dataset 1 that were sampled across French Polynesia showed a clear segregation of three clusters (Figure IV.1A). Group 1 accounted for 371 individuals, Group 2 for 251 individuals, and Group 3 for 217 individuals. To a lesser extent, the genetic samples on PCoA also clustered into the three same groups, with 3.5% and 3.4% of variance explained by the two axes (Figure IV.1B). Additionally, the Bayesian analysis of the software STRUCTURE supported this clustering with $K=3$ being the most likely partition when using the DAPC groups as priors with the LOCPRIOR model classically used to distinguish weakly differentiated populations. Without priors, the analysis did not reveal any clear signal that could be associated with a genetic structure (Supplementary Material S1). As a further confirmation, we observed that all siblings from the two nests with the largest number of samples (i.e. 70 and 14 hatchlings respectively) did cluster in the same group, confirming a stable genetic clustering (Supplementary Material S2). Additionally, both G'_{st} and D_{est} were significant ($p\text{-value} < 0.001$) for all the pairwise comparisons between groups, ranging from 0.067 to 0.076 for G'_{st} and 0.052 to 0.061 for D_{est} (Table IV.1). Overall, all but 1 loci (CMY20) contributed to the genetic differences between groups. The G'_{st} and D_{est} per locus showed that 14 loci contributed significantly to the difference

between Group 1 and Group 2, 17 loci to the difference between Group 1 and Group 3, and 19 loci for Group 2 and Group 3 (Supplementary Material S3).

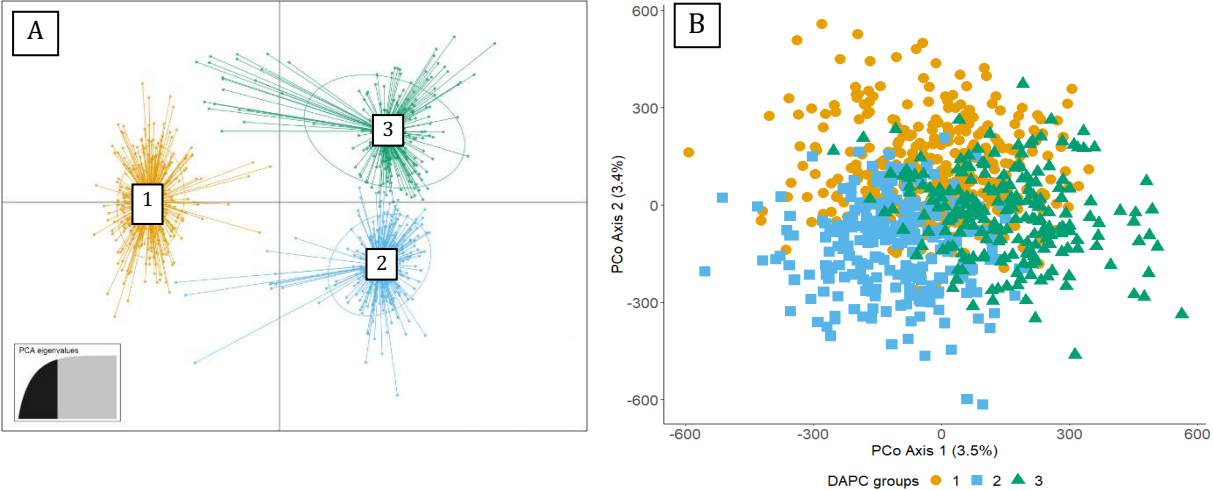


Figure IV.1 (A) DAPC clustering of 839 individuals of *C. mydas* including adults, juveniles, and one hatchling per nest (dataset 1) sampled in French Polynesia. (B) PCoA including the same individuals, with colors and shapes representing the DAPC groups. Percentage of variance explained by each axis is shown in brackets.

When looking at the hatchlings only (dataset 3, $n=581$ individuals), the same clustering was found on DAPC and PCoA (Supplementary Material S4), with significant G'_{st} ranging from 0.069 to 0.079, and D_{est} ranging from 0.54 to 0.63 (Table IV.1). However, no clustering was detected when focusing only on the adult and juvenile component of the population that accounted for only 198 individuals (dataset 4) (Supplementary Material S4).

Table IV.1 G'_{st} (Hedrick) and D_{est} (Jost) between DAPC groups of the 839 individuals of dataset 1, and on hatchlings only from different nests ($n=581$, dataset 3). Group numbers correspond to DAPC group numbers. G'_{st} and D_{est} values are below the diagonal, p -values are above the diagonal.

	G'_{st} (Hed)			D_{est}		
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 1	Group 2	Group 3
Dataset 1 ($n=839$)						
Group1	*	0.002	0.002	*	0.001	0.001
Group 2	0.071	*	0.002	0.057	*	0.001
Group 3	0.076	0.067	*	0.061	0.052	*
Dataset 3 ($n=581$)						
Group1	*	0.002	0.002	*	0.001	0.001
Group 2	0.073	*	0.002	0.058	*	0.001
Group 3	0.079	0.069	*	0.063	0.054	*

This significant nuclear genetic structure was not consistent with mitochondrial lineages or haplotypes, with 21 haplotypes corresponding to 6 lineages distributed evenly across the groups (Fisher's test $p\text{-value} > 0.7$; Figure IV.2A). Clades III and IV were slightly underrepresented in Group 2, although this value was not significant and would require more samples for confirmation. Moreover, the clustering was not explained by a spatial segregation of individuals across the islands, nor by a temporal distribution of sampling events, nor by a distribution of maturity stages (Figure IV.2B-D), as all the variables for these parameters were shared across the groups without any noticeable pattern. Fisher's exact test was only significant between the groups when looking at the temporal distribution of sampling events ($p\text{-value} = 0.003$), however no clear pattern was observed (Figure IV.2D). The proportion of samples from Tetiaroa was also slightly lower in Group 3 (Figure IV.2C) although this alone does not explain the clear clustering, since Tetiaroa samples were distributed in each of the 3 groups.

Lastly, the percentage of relatedness indexes (r) within each cluster was similar in Groups 1 and 2, and was also similar to the percentage found in the global population when focusing on values superior to 0.25 and 0.5 for pairs of genetically related individuals (ranging from 2.5% to 3.4% for $r > 0.25$ and from 0.1% to 0.2% for $r > 0.5$, Table IV.2). Notably, Group 3 showed a higher relatedness (7% for $r > 0.25$, 0.6% for $r > 0.5$), and a lower effective population size ($N_e = 174.9, \pm 28.2$) than the two other groups (Group 1, $N_e = 290.6 \pm 5.0$; Group #2, $N_e = 299.8 \pm 12.6$) (Table IV.3). The estimates of N_e were stable regardless of the threshold used to screen out rare alleles ($P_{\text{CRIT}} = 0.05, 0.02, \text{ or } 0.01$, Table IV.3). Group 3 also had a lower genetic diversity compared to the two other groups and the global population when looking at the number of alleles ($N_a = 8.6 \pm 1.0$), rare alleles ($N_{ar} = 4.52 \pm 0.65$), and observed and expected heterozygosities ($H_o = 0.595 \pm 0.048$, $H_e = 0.617 \pm 0.050$) (Table IV.2). F_{is} values were significant in all groups, and higher in Group 2 ($F_{is} = 0.067$) than in the other groups (Group 1, $F_{is} = 0.028$; Group 3, $F_{is} = 0.038$) (Table IV.2). F_{is} value for the global population was also significant ($F_{is} = 0.061$). Finally, all of the above results were consistent across datasets 1 and 2, which were used to test the robustness of the results (dataset 2 not shown).

e. Discussion

Microsatellite analysis of *Chelonia mydas* in French Polynesia revealed a genetic structure which is reported here for the first time. As the differentiation indexes were significantly different on almost all loci, it suggests a process which occurs at the

population level rather than selection or scoring errors on a single locus. This structure, composed of three distinct groups, is not related to the mitochondrial lineages or haplotypes of the individuals. Nuclear genetic structure has been reported in *C. mydas* on many occasions (Bagda et al., 2012; Bradshaw et al., 2018; N. N. FitzSimmons et al., 1997b; Roden et al., 2013) with F_{ST} values ranking from 0.0015 (Bagda et al., 2012) to 0.12 (Roden et al., 2013). Nuclear genetic structure was also reported in other marine turtle species such as the hawksbill (Zolgharnein et al., 2011), leatherback (Carreras et al., 2011; Dutton et al., 2013; Molfetti et al., 2013; Vargas et al., 2022), loggerhead (Carreras et al., 2007; Loisier et al., 2021), and olive ridley turtles (Silver-Gorges et al., 2020). In French Polynesia, recent work by Boissin et al. (2019) did not detect any structure in green turtles analyzed with 12 microsatellite markers and a limited sampling, emphasizing the need for large sample size and sufficient set of discriminant markers. Although it has been proposed that male-enhanced gene flow connects rookeries and leads to an apparent lack of structure at a nuclear marker level (Hancock et al., 2019; Nishizawa et al., 2011; Roberts et al., 2004), the use of more microsatellite markers have offered a greater detection power able to reveal previously undetected population structure (Roden et al., 2013). Accordingly, the present study, which used a larger sample size and the largest set of nuclear markers used thus far, aligns with these recent findings and reveals a subtle regional structure. This structure is present among the hatchlings but not when looking only at the adults and juveniles (198 individuals). As adults and juveniles cluster into the 3 groups, irrespective of their maturity stage when they are taken together with the hatchlings, our sampling of adults and juveniles may not be complete enough, with only 198 individuals, to reveal a structure at this maturity stage, highlighting again the need for robust sample sizes. Notably, adult males are absent from the dataset.

Genetic structure in sea turtles is usually associated with spatial structure determined by the philopatric behaviors (Bowen and Karl, 2007). Four categories of population genetic structure are generally recognized: the panmixia (no genetic structure), the island model (discrete genetically homogenous patches with limited gene flow between them), the stepping stone model (increasing differentiation along spatial gradients), and the “chaotic” genetic patchiness, where temporally inconsistent genetic structure appears at a scale where dispersion range should favor panmixia (Eldon et al., 2016; Grosberg and Cunningham, 2000; Selkoe et al., 2014). In the Pacific, a stepping stone model of colonization from the Western to the Eastern Pacific and with the Hawaiian archipelago serving as stepping stone has been proposed for *C. mydas* (Dutton et al., 2014a). At a regional scale, i.e., French Polynesia, all of these spatial models fail to

explain the genetic structure observed. Here, the genetic clustering does not exhibit any spatial pattern. Genotypes of Tetiaroa atoll represent about 80% of the dataset and correspond to nesting females and hatchlings. It is important to note that this represents the only near-complete rookery in our data, and genotypes from other islands (especially Mopelia, Scilly, and atolls of the Tuamotu Archipelago) may be missing and thus may not allow for a complete picture of the spatial structure. However, the genotypes from Tetiaroa are shared evenly between the three genetic clusters, showing no evidence of a link between spatial and genetic structure. Overall, this emphasizes a behavior that drives and maintains the genetic differentiation.

Table IV.2 Mean number of alleles per locus (N_a), number of rare alleles (N_{ar}), observed and expected heterozygosity (H_o and H_e), F_{is} values, mean relatedness index (r), and percentage of pairs of individuals with different values of relatedness within each DAPC group and among all individuals. All F_{is} p-values were < 0.001 .

	Group 1	Group 2	Group 3	Global
N_a	9.4 ± 1.1	9.9 ± 0.9	8.6 ± 1.0	9.3 ± 0.6
N_{ar}	5.3 ± 0.8	5.8 ± 0.6	4.5 ± 0.7	5.2 ± 0.6
H_o	0.651 ± 0.034	0.603 ± 0.040	0.595 ± 0.048	0.616 ± 0.024
H_e	0.668 ± 0.037	0.645 ± 0.045	0.617 ± 0.050	0.644 ± 0.025
Mean r	-0.0284	-0.0264	0.0190	-0.0358
$r > 0.25$	2.8%	3.4%	7.0%	2.5%
$r > 0.5$	0.1%	0.2%	0.6%	0.1%
F_{is}	0.028	0.067	0.038	0.061

Sliver-Gorges et al. (2020) found a similar non-spatial clustering pattern with DAPC in Eastern Pacific olive ridley turtles, but this was associated with higher within-group relatedness and suggested the detection of family lineages widespread across nesting grounds. Here, only one hatchling per nest was kept in the analyses to purposely avoid the detection of family structure, but the observed structure could still be linked with paternal lineages in the case where only few fathers sired hatchlings in each group. However, in this case, within-group relatedness would be higher than global relatedness, which is not what is observed, at least between Group 1 and Group 2. Only Group 3 has more genetically related individuals than the global sample, although levels of inbreeding were higher in Group 2, and in the global population. The lower effective population size and genetic diversity in Group 3 further confirms a smaller number of breeders for this group, which makes it possibly more vulnerable to genetic diversity

loss. Thus, determining what led to the segregation of such genetically distinct groups would help to direct conservation efforts toward those that need it the most. At this stage we can only say that protecting one site will protect all three groups.

A first hypothesis to explain this structure is that mating choices driven by phenotypical criteria determine gene flow and shape the genetic pattern observed (Álvarez-Varas et al., 2021). Genetic structure may be concordant with variations in ecotype (i.e. prey specialization, social system, or even vocal behavior as in whales) or in morphotype (Van Cise et al., 2019; Viaud-Martinez et al., 2008). Such concordance has been observed in all branches in the animal kingdom (Coltman et al., 2003; Eusebi et al., 2017; Lee et al., 2007; Trontti et al., 2005), including marine migratory species such as dolphins (Ansmann et al., 2012; Viricel and Rosel, 2014) and Atlantic cod (Svedäng et al., 2010). Morphotype variations have previously been documented in *C. mydas*, as the eastern Pacific populations exhibit darker shell color and are referred to as black turtles (*Chelonia mydas agassizii*). Álvarez-Varas et al. (2019) found significant differences in carapace shape of green turtles originating from the Atlantic, Eastern, and Western Pacific Oceans. However, these differences occurred at a large scale and were always associated with different genetic lineages (Álvarez-Varas et al., 2019). In French Polynesia, morphotype variations have never been investigated along with genetic structure, but several morphotypes are observed locally, with lighter or darker shades of carapace and scale colors (Bonfanti, personal comm.). This information could not be included in the present study and recording morphotypes along with genetic samples should be the focus of further investigations. Very little is known about marine turtle courtship behavior besides that males actively pursue females for mating and that the latter can refuse copulation (Booth and Peters, 1972). The possibility of mating choices driven by morphological criteria should be deeply investigated as it may lead to the genetic structuring observed here.

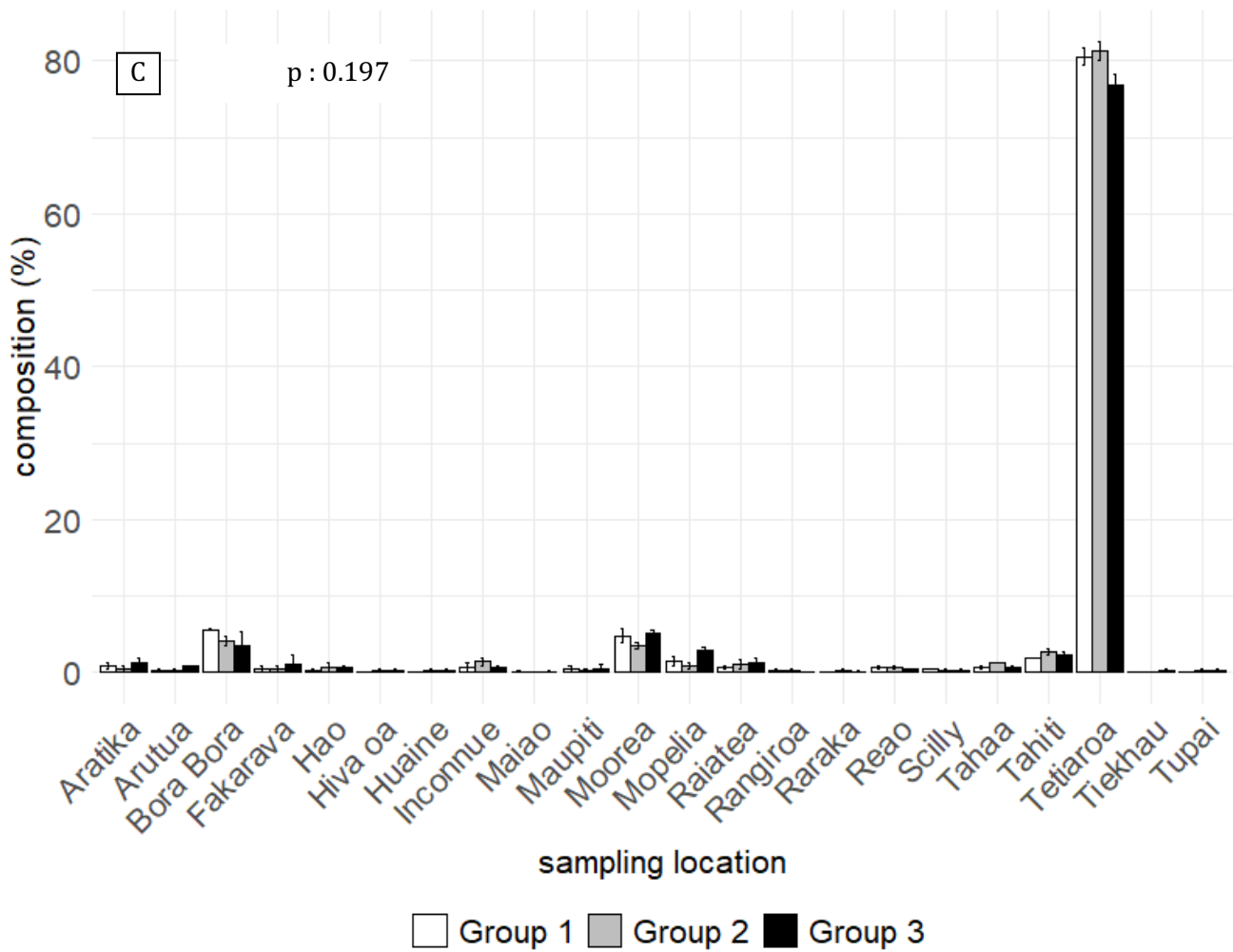
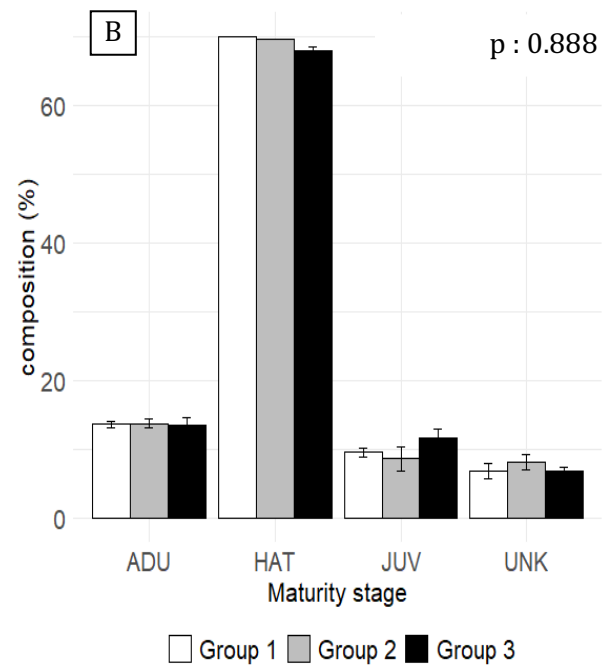
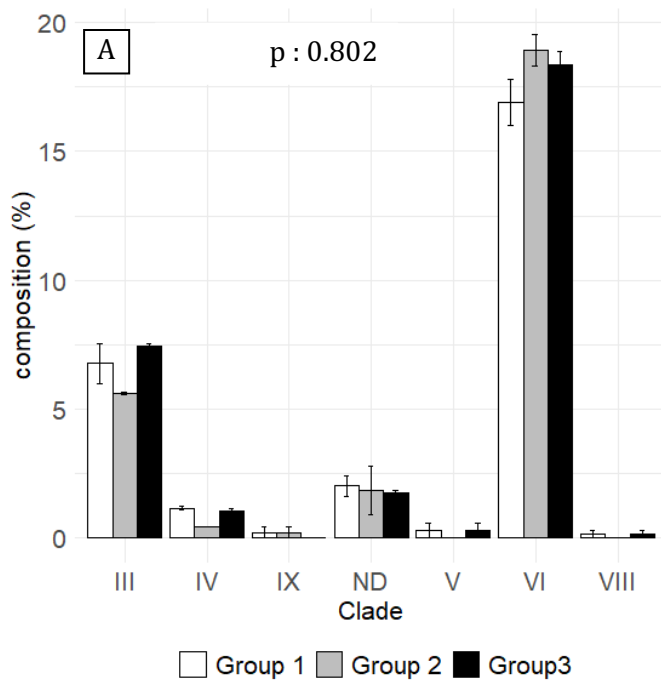
Alternatively, green turtle nesting in French Polynesia might come from three distinct reproduction areas with little genetic connectivity, irrespective of their nesting island. It has been suggested that reproduction in *C. mydas* occurs near nesting beaches (FitzSimmons et al., 1997a), or close to feeding grounds (FitzSimmons et al., 1997b), and philopatry to these sites is suspected for both males and females. Satellite data suggest that some Polynesian green turtles use feeding grounds primarily located in Fiji (Craig et al., 2004), while others stay within the territory (DIREN, unpublished data). If reproduction occurs near foraging areas, this could explain some genetic structuring. On the other hand, reproduction was observed in French Polynesia in Scilly lagoon (Balazs

et al., 1995) and near Tetiaroa (Gaspar, personal comm.), suggesting that it also occurs near nesting beaches. Extensive satellite tracking should be coupled with genetic sampling in future research to determine if the individuals from the different groups migrate to distinct feeding grounds or breeding areas. This information will then indicate if the observed genetic structure is driven by any spatial segregation.

This study reveals, for the first time, a genetic structure in French Polynesia, that cannot be explained in a spatial frame related to nesting beaches. This highlights the need for a deeper understanding of the ecology and social behavior of this species, especially at key life stages like the reproduction period. One of the genetic groups has a lower estimate of effective population size, and thus might require specific management measures within the territory. Finally, and to the best of our knowledge, this study is the first to use a large set of polymorphic markers (> 20) to investigate the population structure of *C. mydas*. The use of more discriminant marker sets further help to refine our understanding of population structure (Bradshaw et al., 2018; Dutton et al., 2014b; Shamblin et al., 2012b), and one could benefit from using these markers in near-completely sampled *C. mydas* populations to detect finer population structure.

Table IV.3 Values of effective population size (Ne) for each DAPC group and depending on the threshold used to filter allele frequencies (Pcrit).

	P_{crit} 0.05	P_{crit} 0.02	P_{crit} 0.01	Mean ± SD
Group 1	293.2	293.8	284.8	290.6 ± 5.0
Group 2	289.1	296.5	313.7	299.8 ± 12.6
Group 3	143.0	185.6	196.2	174.9 ± 28.2



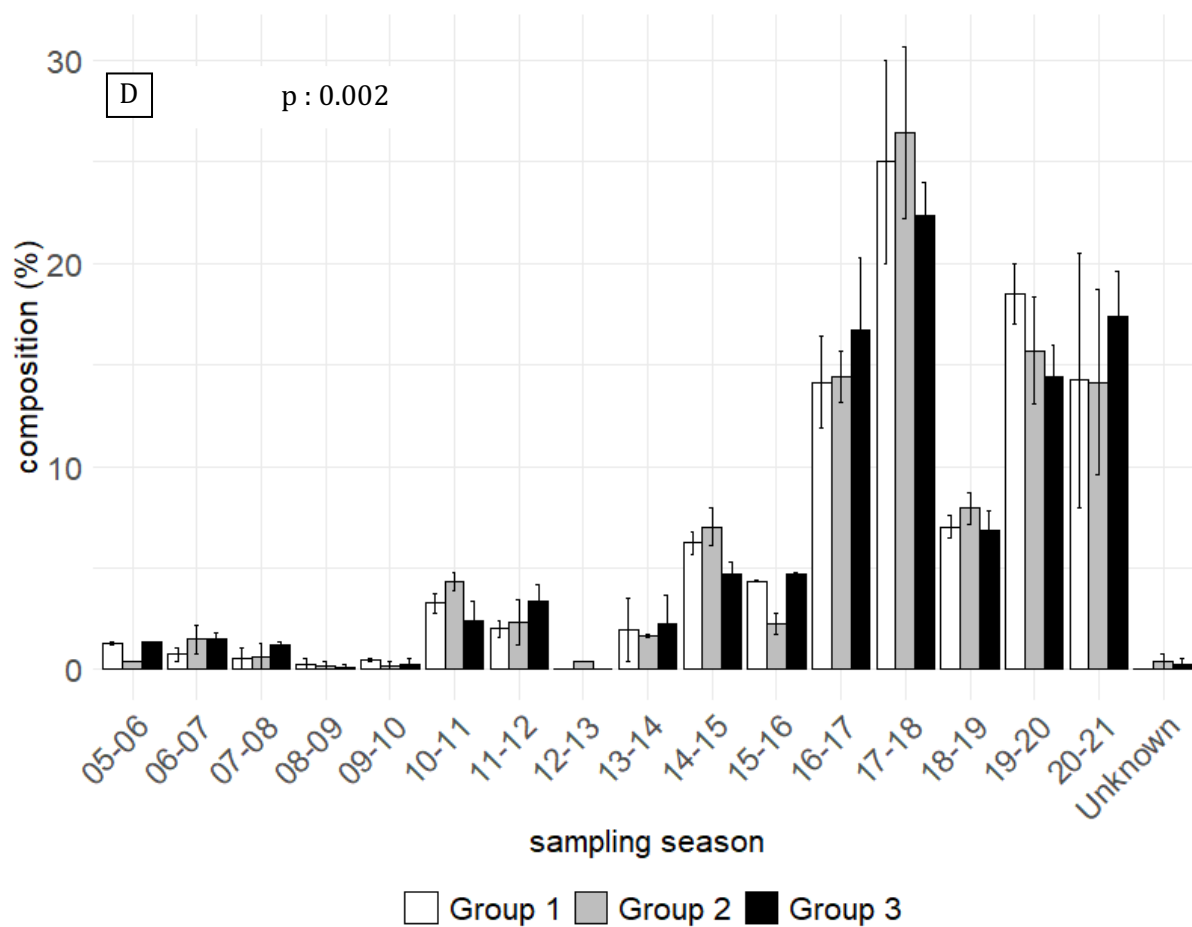


Figure IV.2. Percentage of clade (A), maturity stage (B), sampling island (C), and sampling season (D) in each of the DAPC groups. ADU: adults, HAT: hatchlings, JUV: juveniles, UNK: maturity stage unknown, p : Fishers' exact test p -values.

Supplementary Materials are available in ANNEXE VI.



Chapitre V : Comportements reproducteurs des tortues vertes sur Tetiaroa

I. Introduction

Dans ce dernier chapitre d'analyses, nous étudions les comportements reproducteurs des tortues verte en Polynésie, en se concentrant sur l'île principale en termes d'échantillons, Tetiaroa. Les comportements reproducteurs sont déterminants dans la dynamique des populations et leur capacité de survie, notamment par des stratégies visant à diminuer le taux de consanguinité et maintenir la diversité génétique.

Ainsi, le but de ce chapitre est en premier lieu d'étudier le niveau de consanguinité de la population de Tetiaroa, et son effet potentiel sur la fitness de la progéniture. Ensuite, il s'intéresse aux comportements reproducteurs, et notamment à ceux des mâles, grâce à des analyses de parenté sur les émergentes des nids et les mères associées et la reconstruction des génotypes des pères. Les comportements des mâles sont décrits, ainsi que ceux des femelles, qui sont comparés aux données connues en fonction des observations de terrain. Enfin, il étudie l'effet de certains de ces comportements sur les niveaux de consanguinité et sur la fitness des émergentes.

Ce chapitre est actuellement en révision de l'anglais, et sera ensuite soumis pour publication.

II. Article

Investigating the reproductive behavior of the green sea turtle, *Chelonia mydas*, using parentage analysis

Violaine Dolfo ^{1,*}, Cécile Gaspar², Miri Tatarata ³, Emilie Boissin ^{1,4,†}, Serge Planes ^{1,4,†}

¹ PSL Research University: EPHE - UPVD - CNRS, UAR 3278 CRIOBE, 66860 Perpignan, France

² Te Mana O Te Moana Foundation, Papetoai, Moorea, French Polynesia

³ Direction de l'Environnement de la Polynésie Française, Papeete, Tahiti, French Polynesia

⁴ Laboratoire d'Excellence « CORAIL », 66860 Perpignan, France

† These authors contributed equally to this work and share last authorship

* Corresponding author: violaine.dolfo@univ-perp.fr

Acknowledgments

This research was funded by the Direction of the Environment of French Polynesia. We would like to thank the volunteer network coordinated by the Direction of the Environment in French Polynesia for providing all the samples used in this work, including the NGO Te mana o te moana for the samples from Tetiaroa and Moorea and the Bora Bora Turtle Center for the samples from the Leeward Islands. Thank you to Jeanine Almany for the English corrections.

Keywords: genotype reconstruction, mating behavior, fitness, relatedness, multipaternity

a. Abstract

Reproductive system strongly influences genetic diversity in natural populations through strategies that either mitigate or favor inbreeding. A good understanding of the mating system is essential to assess the intrinsic capacity of natural populations to maintain themselves through generations and maintain their genetic diversity. Here we describe the components of the mating system of a population of the endangered green sea turtle in Tetiaroa, French Polynesia. We genotyped 107 nesting females and 1483 hatchlings from 549 nests, and reconstructed the genotypes of the fathers, using 23 microsatellite markers. Then, we determined the level of inbreeding, and the level of relatedness of the parent pairs, and explored the correlation between the relatedness and fitness parameters in the clutches. We deduced the mating behaviors of both males and females from parentage analyses and tested whether distinct behaviors were associated with different relatedness levels of the parent pairs. We found that 27 fathers and 31 mothers explained the genotypes of 445 hatchlings from 105 nests. Global F_{IS} was significant and levels of relatedness were higher than expected by random mating, indicating inbreeding and non-random partner choice. However, high relatedness between the parent pairs was not associated with a loss of fitness. Regarding mating behaviors, both females and males could mate on consecutive years, and females could nest several times within intervals as short as 0-3 days. No mating behavior was associated with a lower relatedness than the overall relatedness, suggesting that they are not part of an inbreeding avoidance strategy. In conclusion, these findings highlight that this population of green turtle does not exhibit any clear inbreeding avoidance strategy, and that the reproductive system of green turtles makes them intrinsically vulnerable to inbreeding and its potential negative consequences on the capacity of a population to maintain itself through generations. This work improves our general understanding of the drivers of mating strategies in sea turtles.

b. Introduction

Reproductive system strongly influences genetic diversity in natural populations (Clegg et al., 1992). Genetic diversity loss may lead to inbreeding depression, loss of adaptive potential, and accumulation of deleterious alleles, and ultimately to extinction (Charlesworth, 2009). The number of breeders, their reproductive success, and the mating strategies they use are key components of the mating system of a population (Sugg and Chesser, 1994). A good understanding of these factors is essential to assess the intrinsic capacity of natural populations to maintain themselves through generations and maintain their genetic diversity (Anthony and Blumstein, 2000). Several components of the mating system may either mitigate or favor inbreeding. They may be precopulatory such as the operational sex-ratio (OSR, i.e. relative number of breeders of both sexes, (Emlen and Oring, 1977)), reproduction frequency, and partner choice and number (Blouin and Blouin, 1988; Taylor et al., 2014). Postcopulatory factors include sperm storage and sperm competition (Michalczyk et al., 2011).

OSR is a key feature of the mating system, especially for species with a temperature-dependent sex determination (TSD) like the marine turtles (Standora and Spotila, 1985). Primary sex-ratio of TSD species are solely dependent on environmental conditions and can be heavily biased under climate warming situations (Janzen, 1994). Primary sex-ratio of several marine turtle populations are female-biased (Casale et al., 2000; Jensen et al., 2018; Santidrián Tomillo et al., 2014; Zbinden et al., 2007), but the OSR is usually much more balanced (Hays et al., 2022), mitigating concerns about populations' vulnerability. However, as highlighted by Wright et al. (2012a), if the OSR reflects a small number of males breeding more frequently than the females, it will nevertheless lead to a loss of genetic diversity and inbreeding. Due to high energetic cost of reproduction sometimes following long migrations between foraging and nesting grounds, female marine turtles typically reproduce at intervals of several years (Hays et al., 2014). For the green turtle, *Chelonia mydas*, females' reproduction frequency is estimated between 2 and 5 years (Seminoff et al., 2015). Males in the contrary can mate more frequently, and annual migration to breeding ground have been observed in loggerhead (*Caretta caretta*), leatherback (*Dermochelys coriacea*) and green turtles (James et al., 2005; Limpus, 1993; Wibbels et al., 1990). Knowing the reproduction frequency of both sexes is thus important to correctly interpret the OSR in terms of inbreeding risk.

Both male and female marine turtles can reproduce with several partners (i.e. polygynandry), which tends to equilibrate the OSR (Jensen et al., 2013). Polyandry is observed through multiple paternity in clutches, which has been found at various degrees in all marine turtle species. For green turtles, it ranges from 15% to 92% of the clutches depending on the populations (reviewed in Lee et al., 2018). Multiple paternity is a direct consequence of seasonal sperm storage in females, a capacity well established in testudines (Pearse and Avise, 2001) and observed in leatherback (Crim et al., 2002), loggerhead (Sakaoka et al., 2011), hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) (Phillips et al., 2013), green (Fitzsimmons, 1998), Kemp's ridley (*Lepidochelys kempi*) (Kichler et al., 1999), and flatback turtles (*Natator depressus*) (Theissinger et al., 2009). Satellite tracking and direct observations showed that breeding usually occurs before the beginning of the nesting season and all the clutches laid within a season are usually sired by the same fathers (Hays et al., 2022). On the other hand, sperm storage across several seasons is not formally demonstrated in marine turtles, as opposed to terrestrial and freshwater turtles (Owens, 1980; Whitaker, 2006), but several studies tend to show that it is likely (Howe et al., 2017; Theissinger et al., 2009; Wright et al., 2013).

It has been proposed that females would gain benefit from polyandry and sperm storage. The 'good genes' hypothesis relies on the assumption that by mating with different partners, sperm from better quality would compete over sperm from lesser quality, which would lead to an increased fitness of embryos sired by the dominant father (Kokko et al., 2002). However, many studies attempting to prove this hypothesis did not find any correlation between multipaternity and fitness parameters in clutches (Jensen et al., 2006; Lee et al., 2018; Lee and Hays, 2004; Wright et al., 2013, but see Howe et al., 2017). On the other hand, the 'genetic compatibility' hypothesis predicts that paternity would be biased towards genetic dissimilar males to avoid inbreeding (Bretman et al., 2009; Zeh and Zeh, 1997). As an attempt to test this latter hypothesis in an hawksbill turtle population in Republic of Seychelles, Philips et al. (2013) did not find any correlation between relatedness and paternity contribution in the clutches. Ultimately, all these studies tend to conclude that polyandry is likely to occur as an energy cost tradeoff between mating several times and avoiding mating harassment (i.e., convenience polyandry, Lee and Hays, 2004). Male sea turtles are known to actively and aggressively attempt mating, and females may try to avoid it (Booth and Peters, 1972). Thus, levels of multipaternity may simply reflect the density of breeders on reproductive grounds and the number of encounters between the two sexes (Lee et al., 2018).

Understanding the mating system of sea turtles is challenging, notably due to the lack of observations of males and detection of breeding grounds. For such elusive species, an important insight can be gained with molecular analyses. The use of microsatellite markers allowed to reconstruct the genotypes of unsampled fathers and thus assess the mating system parameters in a number of marine turtle populations (e.g. Bernatchez and Duchesne, 2000; Figgner et al., 2016; Horne et al., 2022; Phillips et al., 2013; Wright et al., 2012). Taken all together, these studies reveal that regional variations in these parameters are the rule rather than the exception, and many regions are still lacking this key information on their populations.

In particular, French Polynesia is an archipelago composed of 118 islands distributed over an exclusive economic zone of 5 million km², a surface as wide as Europe. The country is thought to host approximately 1000 female green turtle breeders, although a recent assessment is lacking (Groombridge and Luxmoore, 1989; Seminoff et al., 2015). In the center of French Polynesia, Tetiaroa Atoll (Society archipelago) is one of the major nesting grounds. It is estimated that around 100 females nest annually on the atoll (Seminoff et al., 2015; Tournon et al., 2018), and mating behaviors are observed around the island (Gaspar, pers. comm.). This location provides a unique opportunity to closely investigate the mating system of green turtles with molecular marker analyses. Here, we genotyped nesting females and hatchlings from Tetiaroa with 23 microsatellite markers, reconstructed male genotypes, and conducted parentage analysis in order to study the mating behaviors of both sexes.

The aim of this study is threefold. First, we characterize the level of inbreeding and relatedness in the population of green turtles nesting in Tetiaroa and explore their effect on fitness, by measuring three fitness parameters in the clutches: the number of eggs, successful hatchlings, and dead embryos. Second, we deduce from reconstructed pedigrees the components of the mating system and nesting parameters of this population. These parameters, which are key to inbreeding depression dynamics, are: the OSR, the reproductive frequency, the level of multipaternity, the female's nesting intervals, and the male's number of partners. Third, we test whether the mating strategies deployed reduce the overall relatedness and contribute in avoiding inbreeding by comparing the relatedness of couples involved in these strategies with the overall relatedness of the population. To our knowledge, this work is the first to explore the relatedness bias of mating behaviors in green turtles. It improves our general understanding of the drivers of mating strategies in sea turtles.

c. Materials and Methods

i. Study site & Sample collection

Sampling was conducted on Tetiaroa atoll (16°59' S, 149°34' E), French Polynesia, in eleven nesting seasons from 2010/11 to 2020/21. The atoll has a total surface of 6 sq. km, about 585 hectares of sand, and is divided into 12 islets (Figure V.1). Between 2010/11 and 2017/18, 53 to 1316 nesting events per season (July - April) were recorded by the local NGO *Te mana o te moana* (Touron et al., 2018). Biopsies of approximately 0.5cm³ of skin and muscle tissues were collected from the posterior fin of all the observed females, and on all dead hatchlings and embryos found. For a total of 6 nests, more than 10 hatchlings were sampled. Laying date was either recorded when laying was directly observed, or estimated when the nest was discovered. In this case a confidence interval of ± 3 days was applied on the estimation. As the monitoring gradually intensified since 2010/11, it is considered that virtually all the nests were sampled in each season from 2016/17 although nesting females could not always be observed (Touron et al., 2018). Nest parameters such as clutch size, number of hatchlings (estimated from empty eggshells), and number of dead embryos were recorded for each nest. Samples were stored in 90% ethanol and kept at 4°C or -20°C until processing.

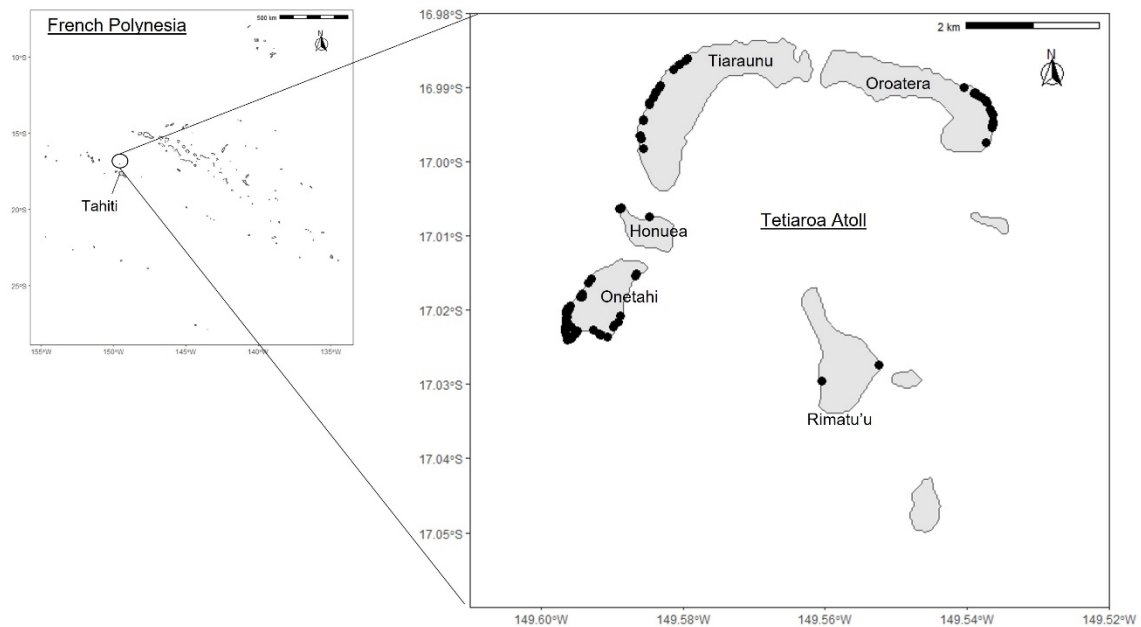


Figure V.1 Sampling locations on Tetiaroa Atoll, French Polynesia. Sampled nests are represented with black dots around the islets.

ii. Molecular analyses

Total genomic DNA was extracted using the QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit and the QIAcube DNA extraction robot (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. The first step was modified as follows: 1 mm² of tissues was digested in 200 µL of digestion buffer containing 20 % of Proteinase K (QIAGEN), at 56°C overnight. Samples were genotyped at 23 microsatellite loci using five multiplex reactions as per Dolfo et al. (2023). Allele sizes were visually assessed using GENEMAPPER software v.5 (Applied Biosystems). All ambiguous peak profiles were considered as missing data and only individuals with missing data occurring at 3 loci or less were kept for the analyses. MICROCHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) was used to identify null alleles, stuttering errors, and large allele dropout. In total 1592 genotypes of hatchlings and females were kept in further analyses.

iii. Conceptual workflow

To answer the three goals defined above, analyses were carried out with the following conceptual workflow (Figure V.2). First the population state was described through the number of breeders, the OSR, and the level of inbreeding and relatedness between reconstructed couples. The effect of the relatedness on the fitness parameters in the clutches was investigated. Then, the reproductive behaviors of the population were described for both sexes, i.e. the reproduction frequency, nesting and/or reproductive parameters within a season, and levels of multipaternity. Finally, we tested whether these behaviors mitigate or favor inbreeding by comparing the relatedness of couples involved with the relatedness of all reconstructed couples.

iv. Identification of recaptured individuals

The R package *RClone* (Bailleul et al., 2016) was used to identify duplicate genotypes in the dataset and detect recaptured individuals. Using the allelic frequencies of the dataset, *RClone* simulates a reproduction event and compares the genetic distances between genotypes in the simulated and in the observed populations. This allows to determine a threshold below which genotypes in the observed population may be too similar to occur as a result of reproduction. Thus, the genotypes of all individual pairs that had less than 5 differences at any locus were double checked with GENEMAPPER, and the data were crosschecked with field information to identify recaptured individuals.

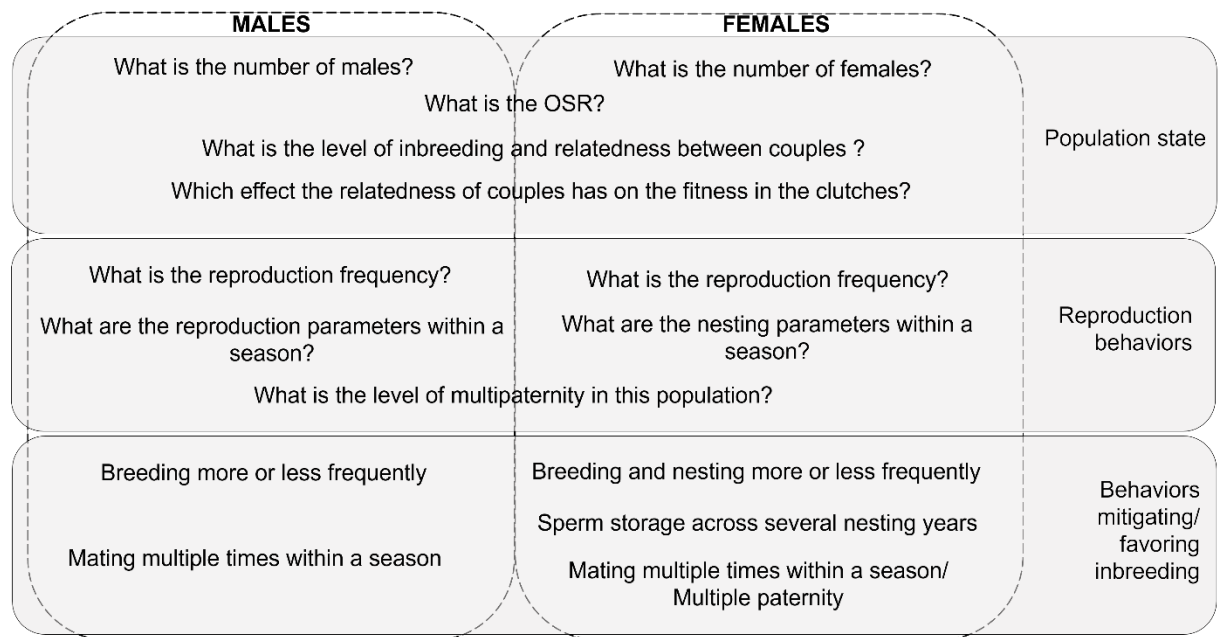


Figure V.2 Conceptual workflow for all the analyses performed for this study.

v. Calibration of the set of loci

To test the accuracy of motherhood assignment given by the software COLONY v.2.0.6.6 (Jones and Wang, 2010), we calibrated the assignment probability based on known mother-offspring relationships. The probability of assignment of a mother was plotted against its true motherhood, based on the known mother-offspring relationships from the field, which involved 58 mothers and 275 hatchlings from 105 nests. COLONY uses a full likelihood model to assign sibship and parentage relationships using multilocus genotype data. Its algorithm allows for missing data and genotyping errors. Three long runs were performed with high likelihood precision, allowing polygamy for both sexes under inbreeding model, and assuming an error rate of 0.01 for both allelic dropout and genotyping error. It is assumed that hatchlings sampled in 2010/11 did not reach sexual maturity by 2020/21 based on a mean age at maturity of 25 years (Chaloupka et al., 2004), therefore, we did not consider the occurrence of overlapping generations. All the hatchlings were considered as potential offspring and all the females were candidate mothers.

To determine the effect of genotyping errors on the accuracy of motherhood assignment, the above calibration was run with three different subsets of markers in order to determine which one would best perform in assigning true mother-offspring relationships: i) subset 1 comprised all 23 loci described in Dolfo et al. (2023); in subset 2 the loci deviant from Hardy-Weinberg equilibrium as emphasized by the authors were removed, leaving 14 loci (list in Supplementary data 1); in subset 3 the loci which were

given the highest error rate by COLONY were removed (CMY19, CMY22, and CMY35), leaving 20 loci. Based on this calibration (Supplementary data 1). Based on these calibrations all 23 loci were retained for the analyses.

vi. Parentage analyses

COLONY was run with 23 loci in the same configuration as for marker set calibration to assign candidate mother-offspring relationships and to infer the genotype of unknown parents. For genotyped mothers ($n=107$), an offspring assignment probability threshold of 0.9 was used based on the results of the above calibration. For genotypes that were reconstructed, COLONY only provides a probability per locus. A probability threshold of 0.9 is usually a good choice for conservative results, however in our case this threshold would discard 93% of the genotypes. Thus, probability thresholds from 0.4 to 0.9 were examined to determine the best tradeoff between conservative and robust results (i.e. number of samples retained) (Supplementary data 2). Finally, only reconstructed loci with a probability superior to 0.8 were retained for the analyses, the others were considered as missing data. Similar to genotyped individuals, individuals with missing data occurring at more than 3 loci were discarded.

Finally, the dataset was checked for inconsistencies (for example when more than one mother was found for a single nest) and the least likely relationship (i.e. with lower probability) was removed. In the end, a parent-offspring relationship was retained only when both parents (assigned or reconstructed) passed the different thresholds: 0.9 for assigned mothers, 0.8 for reconstructed loci, and less than 3 missing loci in a genotype.

From parentage assignments, OSR and female and male reproduction frequency were retrieved. Additionally, within season parameters such as multipaternity, female nesting interval, and male's number of partners were reported. Effect of multipaternity on fitness parameters (clutch size, number of hatchlings, number of dead embryos) was investigated with a two-tailed Student's *t*-test on the average.

vii. Relatedness and inbreeding

Inbreeding coefficient (*Fis*) was calculated with GENETIX v4.05.2 (Belkhir et al., 2004) on all genotyped females and one offspring per nest ($n=665$). Pairwise relatedness coefficients (*r*) were calculated for all parent pairs found with COLONY with the R package *related* v1.0. (Pew et al., 2015) using sample allele frequency. Simulations were

performed based on the observed allele frequency to determine which of the four relatedness estimators implemented in the package performs better on our data (i.e. is the closest to expected relatedness values). Hundred simulated genotypes for each of the four relationships were generated and their r coefficient was calculated (parent-offspring, expected $r = 0.5$; full-sibling, expected $r = 0.5$, half-sibling, expected $r = 0.25$, unrelated, expected $r = 0$). Wang estimator, which gave the best fit to expected relatedness values was then used for relatedness calculation of reconstructed parent pairs. Relatedness of reconstructed vs potential parent pairs was calculated, and two-tailed Student's t-test on the mean was performed to test for significative differences between the two relatedness distributions. To explore the effect of relatedness on fitness, the clutch size, total number of hatchlings, and number of dead embryos was plot against the relatedness of parent pairs. Additionally, relatedness of pairs involving i) a male that mated with multiple partners (within a season or across seasons), ii) a female that mated with multiple partners (within a season or across seasons), iii) the female and dominant male of clutches with multipaternity, and iv) a female that that nested in several years was compared with the relatedness of the reconstructed parent pairs to determine whether any of these behaviors lead to a deviation of the observed relatedness, and significant differences on the mean relatedness was tested with two-tailed Student's t-test.

Table V.1 Individual females (Ind) nesting in multiple seasons found with Rclone analysis (marked with °) and parentage analysis (marked with +).

Ind #	Ind. ID	1 st sampling season	2 nd encounter	1 st genotype reassignment	2 nd genotype reassignment
1	CMY1113 ^{°,+}	2016/17	2020/21	2017/18	-
2	CMY1139 [°]	2016/17	2020/21*	-	-
3	CMY1104 ⁺	2016/17	-	2017/18	-
4	CMY1105 ⁺	2016/17	-	2017/18	-
5	CMY1101 ⁺	2016/17	-	2015/16	2017/18
6	#75 ⁺ (reconstructed)	NA	-	2016/17	2017/18

* Different ID given on the second encounter

d. Results

i. Recapture identification

Genotypes were obtained from 1483 hatchlings representing 549 nests and 107 females. Sample size per nest ranged from 1 to 83, with 15 nests having more than 10 samples. The 23 loci had a mean H_e of 0.66 ± 0.04 , mean H_o of 0.62 ± 0.04 . The comparison of genotype clones with the R package *RClone* identified two genotype clones (Table V.1). They correspond to two females, both of them were sampled for the first time in season 2016-2017 and resampled after 4 years in 2020-2021. One of them was correctly identified with its flipper tag on the field, while the other was thought to be an unknown female and was given a different name at the second encounter.

ii. Parentage analysis

After COLONY's parentage reassignment, genotype reconstruction, and filtering with the different thresholds, 105 nests were assigned to 27 genotyped mothers, and 13 were assigned to 4 reconstructed females between the seasons 2014/15 and 2020/21. The overall 118 nets accounted for a total of 448 offspring. One hatchling that was not assigned to any nest could be linked with a genotyped mother. Out of these 118 nests, 70 counted more than one genotyped hatchling. Once rebuilding father's genotypes, a total of 27 fathers could explain the genotypes of the 448 hatchlings. Overall, the operational sex ratio (OSR) was equal to 0.87 male for 1 female, ranging from 0.8 to 1.3 depending on the season, although few males and females were retrieved per season (< 10) (Table V.2). Thus, temporal variation between the nesting seasons were not investigated.

Table V.2 Number of females and males deduced from parentage analysis for each season, and operational sex ratio (OSR, number of males for one female).

Season	Nb. females	Nb. males	OSR
2014/15	3	4	1.33
2015/16	2	2	1.00
2016/17	9	8	0.90
2017/18	8	8	1.00
2018/19	3	3	1.00
2019/20	6	5	0.83
2020/21	6	7	1.17
total	31	27	0.87

iii. *Inbreeding and relatedness in the population*

Global F_{is} was significant ($F_{is} = 0.06$, $p_value < 0.001$) attesting for some inbreeding in the population. Pairwise relatedness was calculated for all possible male-female dyads and for reconstructed couples. Mean relatedness among reconstructed coupled (mean $\pm$ sd = 0.097 ± 0.21) was higher than mean relatedness of all possible dyads (mean $\pm$ sd = -0.003 ± 0.15) (Figure V.3). This difference was found significant with t.test on the mean ($p = 0.008$). The percentage of pairs with a relatedness greater than 0.25 and 0.5 was also higher for the reconstructed couples than for the potential pairs ($r_{0.25}$: 17% vs 4%, $r_{0.5}$: 3% vs 0.17%, Table V.3). When looking at the effect of parents' relatedness on the fitness parameters in the clutches, a slightly positive correlation was found with the number of successful hatchlings, and no correlation with the clutch size and number of dead embryos was observed. (Supplementary data 3).

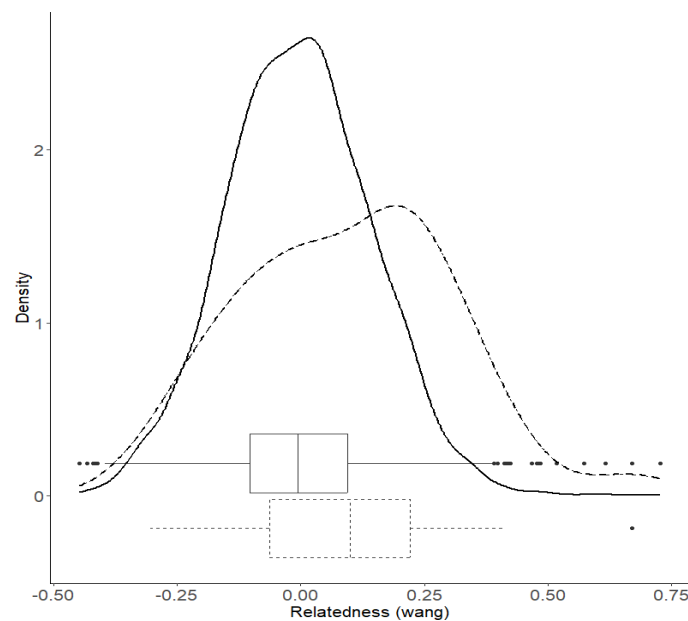


Figure V.3 Density and boxplot of the relatedness of all the potential (full line) and reconstructed (dash line) parent pairs.

Table V.3 Mean relatedness between potential and reconstructed couples, and couples involved in different mating behaviors, and Student's *t*-test *p*-values. Significant *p*-values are indicated in bold. *r*_{0.25} (*r*_{0.5}): percentage of pairs with a relatedness greater than 0.25 (0.5).

	mean <i>r</i>	<i>t</i> -test <i>p</i>	# pairs	<i>r</i> _{0.25}	<i>r</i> _{0.5}
All potential couples	-0.003	-	2880	4%	0.17%
All reconstructed couples	0.097	0.008 (vs potential)	36	17%	3%
Couples with female nesting in consecutive seasons	0.294	0.16 (vs reconstructed)	5	-	-
Couples with multipaternity	0.162	0.39 (vs reconstructed)	8	-	-
Dominant male in clutches	0.252	0.13 (vs reconstructed)	4	-	-
Non dominant male in clutches	0.130	0.18 (vs dominant)	4	-	-
Males mating multiple times	0.143	0.50 (vs reconstructed)	16	-	-

iv. Frequency of reproduction and within-season nesting parameters

Twenty-six of the 31 females were found nesting in only one season, 4 were assigned offspring in 2 seasons, and 1 in 3 seasons. All of these 5 females were found nesting in consecutive seasons, indicating an annual reproduction for these females (Table V.1). Their clutches involved 4 different males and they laid between 3 and 9 clutches sired by the same male over the time period, with an interval between the first and last clutch ranging from 359 to 673 days. For these females, we did not retrieve any other clutch sired by a different male within this time period.

In a single season, females laid between 1 and 10 nests (Supplementary data 4), with an average of 3.2 nests per female. Nesting interval varied between 0 and 94 days and was the most common between 11 and 14 days (Figure V.4). Six nests followed a first egg-laying event by only 0 to 3 days (± 3 days), indicating that a single female can lay several clutches in a very short time interval, possibly on the same day. The size of these clutches varied between 39 and 103 eggs (mean 79 eggs), which was not different from the mean clutch size of the total sample (84 eggs, *t*-test *p*-value= 0.43) (Supplementary data 5).

On the 27 males retrieved, 18 were assigned offspring in only one of the 7 seasons. Eight males were assigned to offspring in 2 seasons, 7 of which were in 2 consecutive seasons, and one was with a gap period of 3 years. One male was assigned offspring in three consecutive seasons. Among these 9 males, 6 sired different females in the consecutive seasons. Within one season, 24 of the 27 males sired a single female. Two males sired 2 different females, and 1 male sired 3 females in the same season.

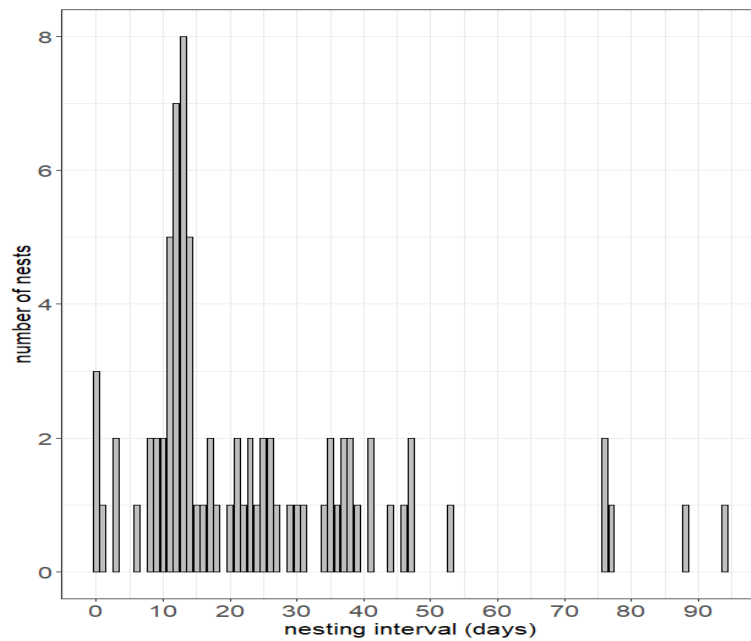


Figure V.4 Inter-nesting interval between successive nesting events for the clutches retrieved in all nesting from 2014/15 to the 2020/21 seasons in Tetiaroa atoll.

v. Multiple paternity

Multipaternity was confirmed from genotype analysis in 5 of the 70 clutches (7%) in which we identified more than one genotyped hatchling, with two fathers per female explaining all the offspring sampled in each nest. The occurrence of multipaternity was not correlated with the number of genotyped hatchlings per nest, as it was found in nests counting 2 to 20 genotyped hatchlings (Supplementary data 6). One male was dominant in each nest and sired between 60% and 66% of the genotyped hatchlings (Figure V.5) (except in the clutch with only 2 genotyped hatchlings).

Out of these five clutches, two were laid by the same female, CMY0188 (1415_ONE8 and 1415_ONE9) (Figure V.5). She laid these two clutches within 13 days of interval in season 2014/15. They were sired by the same fathers *129 and *133, with the contribution of father *133 slightly decreasing in the second clutch (66% to 60%). In this season, 8 other nests from CMY0188 were found and were all sired by the father *133 only, showing no multipaternity (Table V.4). Three of them were laid before the nests with multipaternity, 1415_ONE8 and 1415_ONE9, and counted 3, 17, and 6 genotyped hatchlings, respectively. The remaining 5 were laid after 1415_ONE9 and counted 8, 9, 7, 1, and 6 hatchlings (Table V.4). Hatchlings from father *129 thus occurred only after several egg-laying events, possibly indicating mating in the inter-nesting interval.

Two other clutches laid one year apart were also sired by the same fathers (*62, *53) but these were from two different females, CMY1384 and CMY2419 respectively (Figure V.5). For the female CMY1384, we found three nests in 2017/18 counting 1, 3, and 2 genotyped hatchlings, and multipaternity was found only in the second nest, with father *53 being absent from the other nests. For CMY2419, 4 nests were retrieved in season 2018/19 (2, 2, 1, and 2 genotyped hatchlings) and father *62 was found in the second nest only, the only one to show multipaternity (Table V.4). Finally, the last clutch with multipaternity, 2021_ONE17, was laid by female CMY3468 in season 2020/21 and sired by fathers *97 and *337. This female laid another clutch after 36 days where only father *97 was retrieved with the genotype of only 2 hatchlings (Table V.4). Thus, multipaternity was never found in all the clutches laid by a female within a season.

We then investigated the effect of multipaternity on fitness. When comparing the fitness parameters in clutches with and without multipaternity, no correlation was found between the number of fathers and any of the three parameters (t.test p_values: 0.91, 0.95, and 0.83 for the clutch size, the total number of hatchlings, and the number of dead embryos respectively. Figures in supplementary data 3).

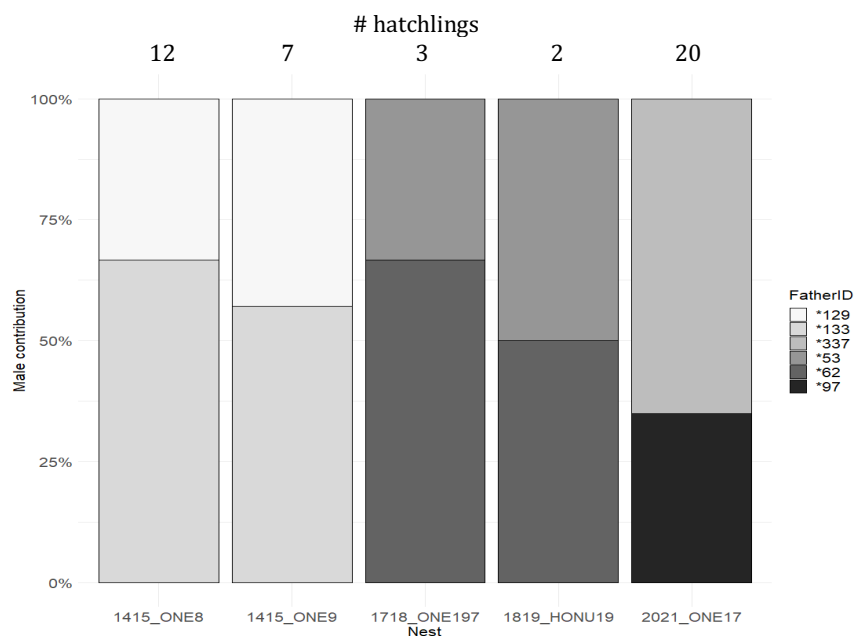


Figure V.5 Relative fathers' contribution in the five clutches where multipaternity was found. Each vertical bar represents one clutch and each shade of grey represents one male. The number of hatchlings in the clutches is displayed above each bar.

Table V.4 Father ID and number of offspring in all clutches of the 4 females involved in polyandry. Clutches with multipaternity are indicated in bold.

Female ID Season	CMY0188 2014/15		CMY1384 2017/18		CMY2419 2018/19		CMY3468 2020/21	
Nest number	Father ID	Offspring nb	Father ID	Offspring nb	Father ID	Offspring nb	Father ID	Offspring nb
#1	*133	3	*62	1	*53	2	*97/*337	20
#2	*133	17	*62/*53	3	*53/*62	2	*97	2
#3	*133	6	*62	2	*53	1		
#4	*133/*129	12			*53	2		
#5	*133/*129	7						
#6	*133	8						
#7	*133	9						
#8	*133	7						
#9	*133	1						
#10	*133	6						

vi. Mating behavior and relatedness

Finally, none of the deduced mating behavior, i.e mating with multiple partners, breeding more frequently, or having a higher share of paternity in multipaternity clutches was correlated with a change in the relatedness compared to the relatedness of all reconstructed couples (Figure V.6). T.test p_values on the mean relatedness ranged from 0.16 to 0.5 (Table V.3). However, fathers that were dominant in multipaternity clutches were consistently more related to the female than the other father, although that comparison involved only 8 pairs and the difference was not significant with t.test (p_value: 0.180, Table V.3). Relatedness of couples with the dominant father ranged between 0.044 and 0.391 (mean $r = 0.252$), while relatedness with the non-dominant father ranged between -0.180 and 0.212 (mean $r = 0.130$).

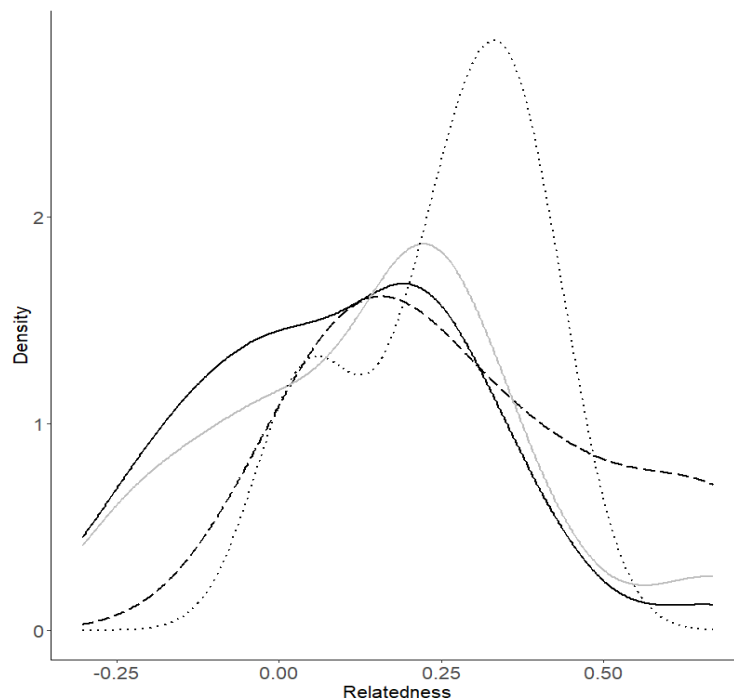


Figure V.6 Relatedness of couples involved in different reproduction behaviors compared with relatedness of all reconstructed couples. Black line: all reconstructed parent pairs, grey line: multiple mating of males, dash line: annual nesting of females, dot line: dominant father in multipaternity clutches.

e. Discussion

This parentage analysis on the green turtle nesting population of Tetiaroa allowed to rebuild the genotype of 31 females and 27 males explaining the genotype of 443 hatchlings from 105 nests, leading to an OSR of 0.87. The highly conservative thresholds we adopted in the analysis process explain the small number of males and females retrieved, which should be interpreted as a minimal number of breeders rather than the real number. In principle, we favor type II error, assuming that reconstructed males and females are real and provide certainty in the following analysis. Nonetheless, patterns related to the mating system of this green turtle population emerged. First, the relatedness of couples was higher than expected by random mating, coupled with significant F_{IS} , regardless of the mating behavior considered. Neither the multipaternity nor the global relatedness was correlated with the fitness parameters in the clutches. Secondly, a low level of multipaternity was observed, and individuals showed some plasticity in their mating behaviors. Noticeably, both males and females appeared able to reproduce annually. Within a single season, we confirm that females are able to lay several nests in a short time interval, and males could sire several females, both before

and during the nesting season. All of these outcomes are quite new in depicting green turtle reproductive behavior and features.

i. Level of inbreeding and strategies to avoid relatedness in the population

Inbreeding was significant in this population ($F_{is}=0.06$, $p_value < 0.001$) and coupled with a higher relatedness than expected by random. This indicates that these turtles breed non-randomly and overall do not avoid inbreeding. Similar situation was found by Horne et al. (2022) in an Hawaiian hawksbill turtle population, and was correlated with strong philopatry to nesting complexes less than 100 km apart. Here, the atoll of Tetiaroa has a total area of only 6 sq. km, but each female was found nesting on only one or two of the 11 islets surveyed (supplementary data 5). Such level of male philopatry (< 1-2km) would be surprising given the scale, the absence of swimming barrier around the island, and the capacity of males to connect rookeries (Bradshaw et al., 2018; Roberts et al., 2004).

The levels of relatedness observed could not be correlated with a loss of fitness when measuring clutch parameters. Philips et al. (2017) suggested that relatedness levels and parental multilocus heterozygosity can interact in both negative and positive ways in turtle populations and that relatedness alone does not explain levels of fitness, but investigating these interactions is beyond the scope of this study. None of the mating behavior deduced from the parentage analysis (mating with multiple partners, breeding more frequently, or having a higher share of paternity in multipaternity clutches) seemed to efficiently mitigate inbreeding, as the relatedness of pairs involved in these behaviors was similar to the overall relatedness. This is in discordance with the inbreeding avoidance theory that predicts that population would tend to avoid inbreeding with pre and postcopulatory mechanisms (Blouin and Blouin, 1988; Cornell and Tregenza, 2007; but see Szulkin et al., 2013). Inbreeding avoidance is suspected in a small population of leatherback turtle in the South West Atlantic (Vargas et al., 2022). On the contrary, mating choices in this population seems to be driven by other factors. Indeed, at the scale of French Polynesia, three populations are found regardless of their nesting islands and mitochondrial lineage (Dolfo et al., in prep). When including males of Tetiaroa in this analysis, they mostly belong to the same “genetic population” as the female they mate with (Supplementary data 7) while three distinct genetic populations are living together within the small area around Tetiaroa, emphasizing a non-random

partner choice. As proposed by the authors, these populations may be linked with phenotypical or ecotypical preferences in partner choice (e.g. carapace color and shape), or conditioned to breeding grounds occurring irrespectively of nesting islands. However, in Tetiaroa, breeding behaviors are observed in the vicinity of the island (Gaspar, pers. comm.), suggesting that breeders then nest on this island. Courtship is usually observed as a result of males' repetitive attempts, while females can also refuse mating (Booth and Peters, 1972). Green turtle courting behavior should thus be investigated further to determine what may drive such a non-random mating choice.

Additionally, our results on multipaternity clutches contradict the 'gene compatibility' theory, as the dominant father in multipaternity clutches was more related to the female than was the other male. Dominance in shares of multipaternity is thought to be linked with first male sperm precedence (Fitzsimmons, 1998). This is confirmed for example in nests 1415_ONE8 and 1415_ONE9. In these nests, the dominant male was found in all the other nests earlier in the season (Table V.4), while the non-dominant male was found in none. Although the latter might have been missed in the early nests, this pattern may also reflect a second mating occurring later in the nesting season. In this case, multipaternity might mitigate inbreeding by mating with other partners when the first one has a high level of relatedness. This mechanism is observed in the Whites' skink (*Egernia whitii*), where females sometimes seek a second and less related partner outside their social group, which increases offspring heterozygosity (While et al., 2014). In Chinese alligators (*Alligator sinensis*), polyandry females mate with males that are less related to them than monogamy females, mitigating inbreeding in the population (Wang et al., 2017). To date, very few studies explored relatedness in multiple paternity clutches of marine turtles (Phillips et al., 2013), and this hypothesis needs to be confirmed with observation on a higher number of multipaternity clutches and deserves further investigations in other populations.

ii. Number of breeders and population density

The operational sex ratio (OSR) was slightly biased toward females (0.87:1 male:female), indicating that more females than males breed in this population. OSR in sea turtles has most often been reported skewed towards males or even between both sexes (Hays et al., 2022). For example, Prakash et al. (2022) found an OSR of 1:1 in a population of hawksbill turtles in Fiji, and Wright et al. (2012b) found an OSR of 1.4:1 in a green turtle population in Cyprus. However, the primary sex-ratio of this population in Tetiaroa does not seem to suffer heavy female biased as observed elsewhere (Laloë et al.,

2020), and so the discrepancy between the number of male and female breeders seems to be small. However, a low level of multipaternity was observed (7% of the clutches, 16% of the females) and green turtles have been found showing multipaternity in as much as 92% of their clutches (Alfaro-Núñez et al., 2015). Our finding constitutes the lower estimation of multipaternity level in this population, considering that 70 nets were analyzed over a total of 549 observed and the number of hatchlings genetically sampled was uneven in the clutches (most often < 10). We cannot eliminate that the contribution of some father may have been missed in the 10 or + hatchlings sampled. With no apparent fitness benefits, levels of multipaternity have been correlated with density and number of breeders. Thus, a low level of multipaternity may indicate low chances of encountering multiple males, directly linked with the density and number of male breeders (Lee et al., 2018). A high density of breeders is observed near the island (Gaspar, pers. comm.), and 11% of the males mated with multiple females within a season, indicating that males may encounter several available females. Coupled with the low level of multipaternity, it suggests that not all males are equally capable of mating with multiple females. In contrast, Phillips et al. (2013) found no male hawksbill mating multiple times within a season and concluded that a low density and high turnover of males prevented this from occurring.

Another interesting deduced behavior arose from the two reconstructed males *53 and *62. They both sired female CMY1384 in 2018/19 and a different female CMY2419 in the next season. Such finding is surprising given the low number of breeders retrieved and low level of multipaternity observed but the probability of such occurrence increases when the number of male breeders is low and the density on mating area is high. This may indicate that some males are dominant on the breeding ground. Dominance hierarchies in males have been described in other species of fresh water turtles like the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) and the wood turtle (*Clemmys insculpta*), and in the gopher tortoises (*Gopherus agassizii*) (Pearse and Avise, 2001). Such dominance could occur regularly on the breeding ground, or be year specific in the case where CMY2419 was sired in 2018/19 and able to store sperm until the next season. Alternatively, non-random mating choices driven by a restrictive criterium may limit the number of suitable partners for a given female, increasing the probability of mating with the same pair of males. Nonetheless, these contrasting results are the first to look into the number of male breeders in French Polynesia, and show that differences between the two sexes are likely to be small and that this number seems sufficient to maintain the fitness in the population despite high levels of relatedness.

iii. Plasticity in mating behaviors

Reproduction frequency and long-term sperm storage

Parentage assignment revealed that at least 5 females (16%) returned to lay once or twice during the study interval of 11 years. These returning events were not observed in field surveys, as recapture identification found that only 2 females were resampled during a returning event. One of them was among the 5 females identified from their genotype, matching the genetic approach (CMY1113, Table V.1). Interestingly, these females were found nesting in consecutive seasons. According to data available so far, annual reproduction frequency was never observed in female marine turtles. For example, Hays et al. (2014) revealed with satellite tracking that 0% of female loggerhead turtles migrated annually to breeding grounds in the Mediterranean Sea, when 76% of the males did so. Studies focusing on female reproduction frequency are based on field observation, and thus it is possible that in some cases, annual reproduction has been overlooked due to the absence of direct observation on the field.

Satellite tracking on adult females in French Polynesia revealed that several individuals stay within the territory, while others migrate to Fijian neritic feeding grounds between the nesting seasons (Craig et al., 2004; Piovano et al., 2019; DIREN personal comm.). Whether those breeding annually are those staying in French Polynesia yearlong needs to be determined, but it is difficult to imagine long migrations to Fiji (> 2000km) occurring yearly, given the time and energy that it requires, adding to the energy needed for the reproduction itself. Interestingly, the same fathers consistently sired the clutches of annually breeding females over the period (from 359 to 673 days). This may indicate that females are able to store sperm across seasons, or are capable of narrow male choice for reproduction, which would suggest some degree of fidelity to unclear mating criteria. Alternatively, cross-seasonal sperm storage has neither been demonstrated nor quantified in marine turtles, although it is suspected to occur. For example, Wright (2013) found that multipaternity was more common in returning females than in primary nesters, and proposed cross-seasonal sperm storage as one of the possible causes. Cross-seasonal sperm storage over several years has been observed in other taxa, including birds (Feldschuh et al., 2005), insects (Baer et al., 2003), and reptiles (Ewing, 1943; Levine et al., 2021). Although the possibility of multiple mating among the same individuals cannot be ruled out (Sakaoka et al., 2013), cross-seasonal sperm storage coupled with relative sedentary life traits may help females to minimize energy costs linked with migration and mating. To date however, adult green turtles are

rarely observed outside the nesting season in French Polynesia, and no feeding ground has been identified throughout French Polynesia or nearby. Hatase et al. (2006) showed, using satellite tracking and stable isotope analysis, that 31% (n=89) of the females nesting on Ogasawara Islands, Japan, were oceanic planktivores rather than neritic herbivores. Further investigation using these complementary techniques should reveal whether females in French Polynesia also feed in oceanic habitats close from nesting grounds.

Focusing on the males, 6 of them (22%) sired different females in consecutive seasons, indicating a possible annual reproduction frequency. However, caution should be taken as this might also reflect long term sperm storage in the case when the female could not be retrieved in one of the consecutive seasons. Male reproduction interval is thought to be shorter than the female's one due to a smaller energy cost of reproduction that allows them to reproduce more often (Hays et al., 2022). For example, male green turtle remigration interval was 2.1 years in the southern Great Barrier Reef (Limpus, 1993), and 1 year in Hawaii (Balazs, 1983), based on tagged recapture. Wright et al. (2012a) determined the reproduction frequency of male green turtles in northern Cyprus with parentage analysis and found that 3% bred more than once within the 3-year period. Overall, annual male reproduction frequency linked to a residential strategy must be considered as a strong possibility in French Polynesia, and in this population, discrepancy between male and female reproduction frequency is not observed.

Within season nesting parameters

Within a single season, females laid in average 3.2 clutches. Field estimations based on the length of the nesting season and the observed inter-nesting interval proposed that each female laid on average 6 nests in 2017/18 (Touren et al., 2018). The true number is likely to lie between these two estimations and is coherent with clutch frequencies for other green turtle populations in the Pacific Ocean (reviewed in Pilcher 2021). They vary from 1.8 in French Frigate Shoal to 7 ± 1.3 clutches per female per season in the Northern Mariana Islands (Balazs, 1980; Summers et al., 2018). Additionally, this analysis allowed to retrieve the female of 74 nests, thus completing field observation.

Inter-nesting interval was very variable (between 0 and 94 days) and interval of 11 to 14 days was the most common in this population. This is coherent with field observations (Touren et al., 2018), and aligns with findings in other populations

(reviewed in Robinson et al., 2022). As not all nests could be analyzed, it is not possible to determine the longest inter-nesting interval. However, and more surprisingly, our study reveals the ability of females to lay regular size clutches within a very short interval (0 to 3 days). This consists in a new finding in the reproductive strategy of green turtles. This shows a capacity for plasticity in nesting behavior, that can be an advantage to adapt to changing environmental and weather conditions on nesting beaches, if one supposes that female might search for optimal nesting conditions. Plasticity in nesting behavior have been observed in Tetiaroa, with an increase in the nesting season length over years (Touron et al., 2018), possibly indicating that females may look for nesting during cooler months to produce more male offspring in the ongoing warmer conditions (Laloë et al., 2020).

For almost all the females, nests were sired by the same father within a season, coherent with the fact that breeding occur prior nesting (Hays et al., 2022). However, one male (*129) sired 2 nests in the middle of the nesting season, which induced multipaternity in theses clutches. The genes of this male were not found in the first three nests and the last five nests laid by the same female (CMY0188) during the season, although the number of sampled hatchling (1 to 17) was sufficient to detect multipaternity in some of these nests. The first nest sired by this male was lay 40 days after the first nest recorded for this female. Females marine turtles are thought to be available for reproduction only for a short interval of approximately one week, prior nesting (Comuzzie and Owens, 1990). This is the first suggestion of mating occurring during the inter-nesting interval in a natural sea turtle population (but see Sakaoka et al., 2011, on a captive population of loggerhead turtles), and gives another indication that green turtles are capable of unexpected plasticity in their mating behavior.

Implication for the conservation

The green turtle population of Tetiaroa shows a significant level of relatedness and inbreeding, with no clear inbreeding avoidance strategy and an apparent preference for related partners that rather favors it. This indicates that the reproductive system of green turtles makes them intrinsically vulnerable to inbreeding and its potential negative consequences on the capacity of a population to maintain itself through generations. Although it does not seem to affect the fitness of Tetiaroa's population at this stage, it could have negative effects if the number of breeders is not maintained, which highlights the importance of turtle conservation programs. On Tetiaroa, a conservation and monitoring program has been in place since 2007, and increasing number of breeders has been recorded on the island, indicating that it is likely efficient

and can preserve the genetic diversity of this population (Touren et al., 2018). Finally, unexpected plasticity in green turtle mating behaviors and nesting parameters shows some adapting capacity which may help maintain the population's resilience under changing environmental conditions.

Supplementary Materials are available in ANNEXE VII.



Chapitre VI : Discussion générale

La première partie de ce dernier chapitre reprend les principaux résultats et les discute en fonction des trois axes de recherche définis dans l'introduction : 1, Quelle est la structure des populations de *C. mydas* en Polynésie française, en lien avec les autres populations du Pacifique ? 2, Quelle est la vulnérabilité génétique de ces populations ? 3, Comment est-elle influencée par les dynamiques de reproduction ? Ensuite, les limites sont discutées, ainsi que les perspectives de recherche. Enfin, des éléments de réponse sont apportés à la question centrale : Comment garantir une protection efficace des populations en Polynésie française ?

I. Synthèse des résultats

Le travail réalisé pendant cette thèse a permis de combler d'importantes lacunes dans les connaissances des populations de tortue verte, en caractérisant les populations de Polynésie française. Ce territoire, qui constitue tout d'abord une zone de ponte significative pour l'espèce avec une estimation d'environ 1 000 femelles reproductrices annuellement (Seminoff et al., 2015), est au centre de sa répartition dans le Pacifique, et s'étend sur une zone presque aussi grande que l'Australie (5 millions de km² incluant la ZEE). L'effort d'échantillonnage réalisé sur la période traitée ici (2008-2021) et les analyses qui ont pu en découler en font aujourd'hui un des territoires les plus échantillonnés du Pacifique. Les résultats obtenus permettent d'une part d'avoir une meilleure vision de la connectivité globale entre les populations du Pacifique, et d'autre part de mieux connaître la structure et la diversité génétique des populations locales, ainsi que leur dynamique de population à travers leurs comportements reproducteurs.

a. Quelle est la structure des populations de *C. mydas* en Polynésie française, en lien avec les autres populations du Pacifique ?

i. *Structure régionale dans le Pacifique*

Dans le **Chapitre III**, nous montrons que les populations de tortues vertes de Polynésie française sont génétiquement différentes des autres populations du Pacifique au niveau de l'ADN mitochondrial. Ceci est attendu compte tenu du comportement philopatrique et de natal homing des femelles qui structure les populations au niveau mondial et crée une certaine isolation génétique des populations (Bowen and Karl, 2007). De plus, nous montrons dans ce chapitre que des haplotypes de Polynésie française (auparavant considérés comme orphelins) se retrouvent chez les juvéniles de plusieurs aires d'alimentation, que ce soit à l'Ouest (Fiji, Australie), au Nord (Palmyra

Atoll), ou à l'Est (Colombie, Equateur, Iles de Pâques) de la Polynésie. Des migrations vers l'Ouest du Pacifique ont aussi été observées par marquage et recapture (CMR) sur 12 adultes, depuis Scilly vers les îles Tonga, Fiji, Wallis, Nouvelle Calédonie, et Vanuatu (Balazs et al., 1995). La dispersion vers l'Ouest des juvéniles est vraisemblablement facilitée par le courant équatorial Sud qui traverse la Polynésie d'Est en Ouest jusqu'aux côtes australiennes (voir Figure III.2 Chapitre III). Les routes de dispersion vers le Nord et vers l'Ouest, au contraire, ne sont pas connues et n'ont jamais été confirmées par suivi satellite ou CMR. Il est possible que certains individus traversent le courant équatorial Sud et rejoignent le contre-courant équatorial vers l'Amérique centrale. Ces événements mériteraient d'être confirmés afin de mieux comprendre le rôle central des populations de Polynésie dans le Pacifique, qui apparaissent comme des populations « sources » pour plusieurs aires d'alimentation. Ils permettraient aussi de mieux appréhender l'importance de la barrière de dispersion entre le Pacifique Est et le Pacifique Ouest, qui est une barrière génétique importante avec une lignée isolée à l'Est qui présente un phénotype différent (parfois appelée tortue « noire ») (Jensen et al., 2019).

ii. Structure locale en Polynésie

Le **Chapitre III** a montré que plusieurs populations génétiquement distinctes se dégagent au sein de la Polynésie, notamment entre les Iles du Vent et les Iles Sous-le-Vent dans l'archipel de la Société, et se distinguent également par des niveaux de diversité génétique différents. De plus, les tortues juvéniles retrouvées sur le territoire en dehors des zones de ponte proviennent exclusivement de la Polynésie française, ce qui indique une contribution significative de l'autorecrutement sur des aires d'alimentation locales, possiblement couplé à une dispersion limitée lors des premières années de vie.

Dans le **Chapitre IV**, nous utilisons les marqueurs microsatellites développés dans le **Chapitre II** pour déterminer la structure génétique au sein de la Polynésie en tenant aussi compte de la structure apportée par les pères. Ici, nous montrons une structure génétique inédite chez les tortues vertes, car elle n'est pas en lien avec les îles de ponte, ni avec les lignées mitochondriales, comme ce qui est généralement observé pour ces animaux philopatriques. Cette structure est composée de 3 populations qui nidifient sur toutes les îles échantillonnées sans distinction. Autrement dit, la structure génétique des populations de tortue verte en Polynésie s'effectue à deux niveaux. Le premier est lié au comportement philopatrique des femelles et conduit à (au moins) deux populations, décrites dans le Chapitre III. Le deuxième n'est pas lié à un comportement spatial et est

déecté avec les microsatellites dans le Chapitre IV. Les hypothèses pour expliquer cette différence génétique sont un choix de reproduction lié au phénotype des individus et/ou une préférence des mâles et des femelles vers 3 aires de reproduction distinctes, indépendamment de la philopatrie vers les îles de ponte. En plus d'une dispersion et de migrations vers différentes régions du Pacifique, une relative sédentarité de certains individus autour des îles de Polynésie a été observée par suivi satellite (DIREN, pers. comm.). Le Chapitre III a aussi montré que certains juvéniles ne quittent pas les eaux territoriales, ou y reviennent durant les premières années de vie. Migration et sédentarité semblent donc coexister sur le territoire, et il serait intéressant de comprendre si ces différents comportements sont en lien avec les populations identifiées dans le Chapitre IV. Est-ce que les tortues qui migrent et celles qui restent en Polynésie font partie de différentes populations ? Si oui, y a-t-il de la reproduction près des aires d'alimentation ou sur les routes de migration qui pourrait expliquer une différenciation génétique entre ces groupes ? Ou des aires de reproduction distinctes sont-elles rejointes indépendamment des sites de ponte et d'alimentation ? Cette dernière hypothèse semble moins probable étant donné que des événements de reproduction ont été observés à Scilly (Balazs et al., 1995) et Tetiaroa (Gaspar, pers. com.), près des plages de ponte. Quoiqu'il en soit, déployer un suivi satellite important couplé à l'échantillonnage génétique permettrait de connaître les routes de migration de ces différentes populations et peut-être de mieux comprendre ce qui les différencie.

b. Quel est l'état de vulnérabilité génétique de ces populations ?

Dans le **Chapitre III**, sur le territoire de la Polynésie française, la forte diversité génétique de l'espèce est confirmée, avec 23 haplotypes décrits (sur 433 échantillons) et des indices de diversité génétique à des niveaux comparables à ceux des hotspots de biodiversité reconnus dans le Pacifique Sud Est et l'Ouest de l'océan Indien (Boissin et al., 2019; Jensen et al., 2019). Par comparaison, la population du nord de la Barrière de Corail en Australie, qui est la plus grande population de tortues vertes dans le Pacifique avec environ 24300 individus, compte 14 haplotypes (sur 81 individus échantillonnés) (Jensen et al., 2019). De plus, la dominance de la lignée mitochondriale VI (voir Chapitre I, *Introduction*), géographiquement restreinte à la Polynésie, est confirmée (Boissin et al., 2019). Cette diversité génétique importante par rapport aux autres régions et la présence d'une lignée endémique suggère que la Polynésie a servi de refuge climatique pour la tortue verte pendant les aires glaciaires passées, comme indiqué dans le travail de Boissin et al. (2019). De façon intéressante, la zone est aussi prédite comme potentiel

refuge climatique futur dans des conditions de réchauffement climatique pour les récifs de coraux (Freeman, 2015; Hooi donk et al., 2013). En ce qui concerne les tortues vertes, la féminisation massive due à l'augmentation des températures observées dans certaines colonies, notamment en Australie (Jensen et al., 2018), ne semble pas à ce jour avoir lieu en Polynésie. En effet, Laloë et al. (2020) prédisent un sex-ratio à la naissance à l'équilibre entre les mâles et les femelles à partir de la température des nids sur Tetiaroa. Si ceci est confirmé, la Polynésie française pourrait être une zone de refuge pour l'espèce, préservant la forte diversité génétique nécessaire au maintien des populations.

Ceci étant, le Chapitre IV a montré que les trois populations détectées avec les marqueurs microsatellites ont une taille efficace faible, comprise entre 174 et 299 individus, ce qui les rend vulnérables aux variations génétiques aléatoires possiblement délétères pour les petites populations (voir Chapitre I, *Introduction*). En théorie, une taille efficace de cet ordre (<500) n'est pas suffisante pour maintenir la diversité génétique sur le long terme (Franklin, 1980). Ces trois populations ont aussi un taux de consanguinité (F_{is}) significatif qui confirme leur vulnérabilité. Par ailleurs, une des populations a une taille efficace plus petites, et un taux de consanguinité plus élevé que les deux autres, indiquant de possibles différences de trajectoires de population au sein de la Polynésie française. Afin de mieux déterminer ces différences de trajectoires et leurs causes, les mécanismes à l'origine de la formation de ces trois populations doivent être identifiés.

c. Comment la vulnérabilité génétique est influencée par les dynamiques de reproduction ?

Dans le **Chapitre V**, nous étudions plus en détail le comportement reproducteur des tortues vertes de Polynésie, et particulièrement de la population de Tetiaroa, afin de caractériser la dynamique de reproduction intrinsèque des populations. Cette étude se base sur des analyses de parenté avec les marqueurs microsatellites développés dans le Chapitre II. Ce chapitre montre tout d'abord un taux de consanguinité significatif dans la population. Cependant, aucun impact de cette consanguinité n'est visible sur la fitness de la progéniture (excepté un léger effet positif sur le nombre d'émergentes), indiquant qu'il ne serait pas délétère pour la population à ce stade. De plus, le degré de similarité entre les couples de parents reconstruits est plus élevé que si les choix de partenaires étaient dus au hasard. Ainsi, les tortues vertes de cette population semblent avoir une

préférence pour des partenaires génétiquement similaires. Les observations sur les aires d'accouplement dans d'autres populations suggèrent que les mâles ne sont pas sélectifs dans le choix des partenaires qu'ils approchent, alors que les femelles ont plusieurs techniques pour refuser l'accouplement (Booth and Peters, 1972). Il est donc possible que la sélection du partenaire soit opérée par la femelle. Cet élément est nouveau dans la connaissance du système de reproduction des tortues vertes, et déterminer les critères de choix des partenaires est une étape importante dans le futur (voir partie III *Perspectives*). Néanmoins ce comportement d'accouplement avec des partenaires apparentés tend à favoriser la consanguinité, et ce chapitre a aussi montré qu'aucune des stratégies de reproduction étudiées (i.e. polygynie, polyandrie, fréquence de reproduction élevée, dominance du père dans les nids avec multipaternité) ne semble la diminuer significativement dans la population.

Cependant, lorsqu'on regarde les partenaires des femelles polyandres dans les nids avec multipaternité, les mâles dominants sont systématiquement plus proche génétiquement de la femelle que les mâles non dominants. La dominance du mâle dans le nombre d'œufs fécondés est supposée être liée à l'ordre dans lequel les mâles se sont accouplés (Fitzsimmons, 1998). Ainsi nous formulons l'hypothèse que les femelles pourraient chercher un autre partenaire dans le cas où le premier est génétiquement trop similaire, étant entendu que des niveaux de consanguinité trop élevés sont délétères pour la survie de la progéniture (Blouin and Blouin, 1988). Cette possibilité mériterait d'être étudiée dans un nombre plus important de nids (ici $n=5$) et dans d'autres populations pour être confirmée. Jusqu'à présent, une seule étude sur les tortues imbriquées a regardé avec 33 microsatellites le degré de similarité génétique des parents dans les nids avec multipaternité, mais sans comparer la similarité génétique des différents pères avec la femelle (Phillips et al., 2013).

Ce chapitre a par ailleurs montré une certaine possibilité de plasticité par rapport à ce qui est attendu dans le comportement reproducteur des tortues vertes. Notamment, certaines femelles peuvent pondre plusieurs nids avec un très faible intervalle de ponte dans une même saison, et peuvent s'accoupler aussi durant la période de ponte et pas uniquement avant celle-ci. Ces comportements, bien qu'à la marge, montrent une flexibilité qui est un atout pour faire face aux aléas environnementaux. Enfin, ce chapitre a montré une capacité pour un nombre significatif de femelles de pondre sur plusieurs saisons consécutives, possiblement couplé à du stockage de sperme inter-saison, et là aussi les différences observées entre individus

pourraient être complétées avec des données migratoires, pour déterminer quel territoire ces femelles utilisent durant les quelques mois entre deux pontes.

II. Limites des analyses

La force de ce travail de recherche réside dans son échantillonnage important, inégalés dans la zone jusqu'à présent, qui a notamment permis de mettre en lumière des comportements inédits. Cependant, cet échantillonnage était fortement disparate entre les différentes îles de Polynésie, avec plus de 84% provenant de l'atoll de Tetiaroa. Ce biais géographique s'explique d'une part par l'effort d'échantillonnage qui est constant et relativement exhaustif sur cette île depuis 2014. Ceci est facilité par des infrastructures sur place et une organisation adaptée pour le suivi des pontes, ainsi que par la relative accessibilité de l'atoll, situé à environ 50 km de l'île principale de Tahiti. D'autre part, la population de tortues vertes de Tetiaroa est une des plus grosses parmi celles identifiées en Polynésie française. En effet, entre 100 et 200 femelles sont estimées annuellement sur l'île (Touren et al., 2018), et environ 300-400 étaient estimées sur l'atoll de Scilly dans les années 1990 (Balazs et al., 1995), ce qui était considéré comme la plus grosse population de Polynésie française. La population de Scilly n'est pas représentée dans notre échantillonnage (peu d'individus échantillonnés, et peu de succès d'amplification sur les marqueurs pour ces individus), mais le nombre d'échantillons de Tetiaroa est nécessairement plus élevé qu'ailleurs, sans que ce biais soit automatiquement observé sur le pourcentage de la population échantillonnée sur chaque île. Malgré tout, ceci a limité la résolution de certaines questions de ce travail de recherche.

Tout d'abord, dans le Chapitre III, l'échantillonnage disponible dans les Tuamotu ne contenait que 7 tortues en ponte ou émergentes qui caractérisent la population (à l'opposé des juvéniles dont on cherche à déterminer l'origine, et dont 52 ont été échantillonnés dans les Tuamotu). Cette taille d'échantillon est généralement trop petite pour détecter une différenciation génétique avec les autres îles avec les techniques utilisées (F_{st} sur ADNmt) et donc ne permet pas de conclure sur l'existence d'une troisième population dans les Tuamotu (Hoban et al., 2013). Cependant, étant donné la taille de l'archipel (2000 km), l'éloignement aux autres archipels (400-500 km), et le caractère philopatrique des femelles généralement observé à l'échelle de 500 km (Bourjea et al., 2007; Dutton et al., 2014b), l'hypothèse aujourd'hui est que les Tuamotu abritent une ou des populations distinctes des populations de l'archipel de la Société.

Cette/ces populations sont vraisemblablement plus petites, étant donné que les sites de ponte majeurs se trouvent dans l'archipel de la Société. La concentration des sites de ponte dans cet archipel pourrait être due à une protection plus efficace ou à des conditions géographiques ou climatiques plus favorables aux pontes. Cependant, les Tuamotu sont composés de 76 atolls peu peuplés ou inhabités et peu accessibles ; il est ainsi possible qu'un ou plusieurs sites de ponte n'aient pas été formellement identifiés par la Direction de l'Environnement en Polynésie. Sur Tetiaroa, avec une prospection quotidienne sur au moins deux motus, entre 1 et 4 pontes par nuit sont observées en saison. Cette fréquence de ponte sur des atolls plus vastes peut être très difficile à détecter, surtout si les moyens humains sont limités. Cependant les traces laissées sur la plage par les femelles lors de la montée restent visibles plusieurs semaines et peuvent donner une indication de la fréquentation de la plage. Enfin, outre les Tuamotu, l'archipel des Marquises n'a pas été réellement investigué en ce qui concerne les pontes de tortues vertes, et il n'est pas impossible qu'une population y soit présente.

Ensuite, un certain nombre d'échantillons n'a pas pu être inclus dans la population de base (baseline) du Chapitre III, ni dans les jeux de données du Chapitre IV, car les métadonnées associées, notamment la taille de l'individu et le contexte de capture, n'ont pas été rapportées lors de l'échantillonnage. Ces stades de maturité « indéterminés » concernaient principalement des individus échantillonnés hors de Tetiaroa, et la majorité provenaient de saisies légales de la DIREN. Ainsi dans le Chapitre III, il n'a pas été possible de classer ces individus comme faisant partie d'une population car le stade de maturité au moment de l'échantillonnage était inconnu (émergente d'un nid, femelle en ponte, ou juvénile en alimentation), ce qui a contribué à limiter les analyses de structure. Dans le Chapitre IV, ces individus ont été considérés comme potentiels frères et sœurs d'un même nid lorsqu'ils ont été échantillonnés à la même date, donc un seul a été gardé pour éviter la détection de structure familiale. Les métadonnées associées aux échantillons, et notamment la taille, le contexte d'échantillonnage, et le stade de maturité, ainsi que la date et le lieu d'échantillonnage, sont nécessaires à toute exploitation des échantillons.

Enfin sur Tetiaroa, même si la quasi-totalité des nids ont pu être suivis et échantillonnés de 2014 à 2020, cet échantillonnage concernait peu d'émergentes dans chaque nid ($n < 3$). Cela s'explique d'une part parce que l'éclosion n'est pas toujours

observée, donc uniquement les embryons ou émergentes morts sont retrouvés et accessibles. D'autre part, cela a aussi été un choix de la part des organismes de terrain de ne pas prélever d'échantillons sur les émergentes vivantes pour ne pas interférer dans leur capacité de survie. Cette configuration (beaucoup de nids mais avec peu d'émergentes par nid) a limité les analyses de parenté dans le Chapitre V dans le sens où la reconstruction des génotypes des pères à partir de ceux des mères et des petits est sensible au nombre de petits dont le génotype est connu. Par exemple, dans le cas où un seul petit est échantillonné avec la mère, on ne peut reconstruire qu'un seul allèle par locus dans le génotype du père puisque l'autre allèle du petit vient de la mère. Ainsi, ayant en majorité peu de frères et sœurs par fratrie, la robustesse des génotypes des pères étaient généralement faibles, et pour que les résultats soient les plus conservateurs possible, la plupart des génotypes reconstruits n'ont pas été gardés pour les conclusions en termes de comportement de reproduction. Notamment, les variations temporelles entre les saisons de ponte n'ont pas pu être explorées malgré un échantillonnage qui s'étend sur 13 saisons. De façon générale, les études de multipaternité utilisent au moins 10 petits par nid pour déterminer le nombre de pères (e.g., Phillips et al., 2013; Stewart and Dutton, 2014; Wright et al., 2012). Ainsi, la vision de ce chapitre n'est que partielle, mais elle a cependant permis de déduire des comportements inédits. Des techniques d'échantillonnage non invasives pourraient être testées afin de récupérer l'ADN de plus de petits. Notamment, les écouillons buccaux (swabs) ont déjà été utilisés sur le terrain avec des juvéniles de tortue caouanne et pourraient être appliqués à la tortue verte (Torres-Rodriguez et al., 2017).

III. Perspectives de recherche

a. Études des éco-morphotypes et des comportements d'accouplement

Une perspective importante soulevée par ce travail de recherche réside dans les éléments qui pourraient influencer un choix de partenaires non aléatoire. En effet, les Chapitres IV et V ouvrent cette perspective qui pourrait expliquer d'une part la présence des trois populations différenciées indépendamment des facteurs géographiques (Chapitre IV), et d'autre part le niveau de similarité génétique important entre les couples reconstruits sur Tetiaroa (Chapitre V). Un quelconque choix de partenaires sexuels n'est pas connu chez les tortues marines, et il est plutôt supposé que la reproduction se fait de façon aléatoire au sein des populations sur les aires de reproduction (Lee and Hays, 2004). Cependant, peu d'études de similarité génétique (relatedness) ont été effectuées à ce jour entre les individus reproducteurs, et incluant

les génotypes des mâles (Phillips et al., 2013), et aucune ne couple similarité génétique et morphotype. Il serait très intéressant dans un premier temps de mener ces études avec les photos disponibles des individus répartis dans les 3 populations observées, afin de déterminer si des différences existent. Notamment, la couleur de la carapace et la forme des écailles sont des paramètres variables d'un individu à l'autre chez la tortue verte (Álvarez-Varas et al., 2019). Des photos des individus échantillonnés en Polynésie sont généralement prises, mais à ce jour très peu exploitées. C'est une première piste d'étude. Dans un deuxième temps, les comportements d'accouplement, que ce soit les choix d'accouplement des mâles ou des femelles, pourraient être étudiés, même si cet aspect est particulièrement difficile à mettre en place du fait de la difficulté-même de l'observation. Déployer des caméras embarquées sur les individus pourrait être une première piste, qui a déjà été utilisée pour comprendre les comportements chez plusieurs espèces de tortues marines (Fukuoka et al., 2016; Heaslip et al., 2012; Thomson and Heithaus, 2014) ainsi que de nombreuses autres espèces marines (review dans Chung et al., 2021).

b. Autres marqueurs génétiques

Le Chapitre III a mis en évidence deux populations de tortues vertes dans l'archipel de la Société grâce à l'amplification du fragment de 800pb de la région contrôle de l'ADNmt. Cependant, la délimitation de ces populations n'est toujours pas établie. En effet, l'archipel de la Société se compose de plusieurs îles espacées de quelques dizaines à quelques centaines de km. La partie Ouest et la partie Est, qui semblent abriter les deux populations distinctes, sont espacées de 150 km. Historiquement, ces deux parties sont séparées en deux groupes d'îles, les îles du Vent et les îles Sous-le-Vent. Une différenciation génétique au niveau de l'ADNmt a aussi été détectée entre ces deux groupes d'îles chez le dauphin à bec étroit (*Steno bredanensis*) (Albertson et al., 2017). Cependant, le marqueur utilisé ici n'a détecté qu'une faible différenciation entre ces îles. De par sa variabilité chez les tortues marines, ce marqueur permet en général de différencier des populations philopatriques séparées de quelques centaines de kilomètres, mais en dessous de cette échelle, il peut être limité, notamment lorsque les populations partagent certains haplotypes (Bjorndal et al., 2006; Bourjea et al., 2007). Pour ce type de cas, d'autres marqueurs mitochondriaux avec une plus forte résolution ont été développés, et l'analyse du mitogénome complet peut aussi être envisagée (Komoroske et al., 2017). Tikochinski et al. (2012) ont notamment détecté un marqueur microsatellite mitochondrial dans la région contrôle de l'ADNmt qui a permis

de différencier des populations en Atlantique et en Méditerranée jusqu'alors indifférenciées avec le fragment utilisé ici et distantes de moins de 150km (Atol das Rocas et Fernando de Noronha, Brésil, ~150 km, Shamblin et al., 2015b ; Dry Tortugas et Marquesas Keys, Floride, ~70 km, Shamblin et al., 2020 ; Chypre et Turquie, ~200 km Bradshaw et al., 2018; Tikochinski et al., 2012). L'amplification sur ce marqueur pourrait permettre une différenciation plus fine à l'échelle de la Polynésie, notamment entre les îles relativement proches de l'archipel de la Société, et ainsi mieux délimiter les différentes populations présentes.

Les Chapitres IV et V utilisent des marqueurs microsatellites qui ont prouvé leur utilité dans les analyses de structure et de parenté. Cependant, un des inconvénients majeurs de ces marqueurs est que générer des données comparables entre les laboratoires est difficile, ce qui limite les études à grande échelle (Komoroske et al., 2017). Les SNPs en revanche sont moins polymorphes sur un seul locus, mais peuvent être générés par milliers de façon reproductible (Campbell et al., 2015). Les SNPs ont été utilisés chez la tortue verte pour résoudre des structures génétiques incertaines (Bradshaw et al., 2018; Roden et al., 2013), ainsi que chez la tortue imbriquée pour étudier le système de reproduction par des analyses de parenté (Prakash et al., 2022)

c. Application des résultats et méthodes à d'autres populations

Dans le Chapitre III, la présence et répartition des haplotypes en Polynésie est décrite de façon beaucoup plus complète que dans les précédentes analyses sur les aires d'alimentation de la tortue verte dans le Pacifique (i.e. avec la population décrite par Dutton et al., 2014). Cette base pourra servir dans les prochaines études sur ces sites d'alimentation, afin de réévaluer la proportion d'individus venant de Polynésie sur ces aires. Notamment, il serait intéressant de réétudier les sites où une faible participation des populations de Polynésie a été détectée : les îles Fiji (Piovano et al., 2019), et l'île Gorgona en Colombie (Correa-Cárdenas et al., 2012). De façon surprenante, les contributions actuellement détectées des populations de Polynésie française aux aires d'alimentation de Fiji et de Colombie sont du même ordre (autour de 7%), alors que la courantologie suggère une dispersion bien plus facile vers les Fiji, qui sont aussi moins éloignées (3000 km vs 8000 km). Ces études se basaient sur un échantillonnage très limité en Polynésie française, et la population de base beaucoup plus exhaustive du Chapitre III devrait permettre de mieux quantifier ces contributions à l'avenir, et donc de mieux comprendre les routes de migration et les territoires occupés par ces tortues.

Enfin, les microsatellites développés dans le Chapitre II et utilisés dans les Chapitres IV et V ont prouvé leur utilité dans la détection d'une structure génétique inédite, et ce set a été validé avec les analyses de parenté. En effet, dans le Chapitre V, la calibration a montré que le set de 23 marqueurs était plus efficace qu'un set réduit contenant uniquement ceux avec un faible taux d'erreur (20 marqueurs), ou conforme à l'équilibre d'Hardy-Weinberg (14 marqueurs) pour détecter des relations parent-enfant avec une forte probabilité. Ces marqueurs peuvent donc être utilisés dans d'autres populations de tortues vertes pour traiter des questions similaires. Notamment, la structure au niveau des microsatellites a rarement été étudiée avec autant de marqueurs, et il serait intéressant de les appliquer à des grandes populations très échantillonnées comme celles de la barrière de corail en Australie afin de déterminer si une structure similaire à celle observée en Polynésie peut être détectée, indépendante des lignées mitochondriales et de la philopatrie des femelles, ce qui témoignerait d'un comportement potentiellement commun à l'espèce.

d. Histoire évolutive des lignées géographiquement restreintes

Parmi les aspects qui n'ont pas pu être traités au cours de cette thèse, la caractérisation des lignées évolutives est particulièrement intéressante. En effet, la lignée VI est restreinte à la Polynésie, aux Samoa Américaines et aux Îles Marshall, mais c'est en Polynésie qu'elle est la plus abondante. C'est la lignée dominante dans notre échantillonnage. Jusqu'alors, c'est la seule lignée de Polynésie qui ne présentait pas d'expansion de la taille de sa population concomitante au dernier maximum glaciaire, mais peu d'échantillons étaient disponibles du fait de sa restriction géographique (Boissin et al., 2019). Avec l'échantillonnage d'aujourd'hui il est possible d'étudier la dynamique temporelle de cette lignée, et donc de la replacer dans l'histoire évolutive de l'espèce. Cet aspect devra faire l'objet d'études complémentaires.

IV. Implications pour la conservation des tortues vertes en Polynésie française et dans le Pacifique

a. Conservation et enjeux régionaux

Les tortues vertes de Polynésie migrent et se dispersent pour certaines sur d'autres territoires, notamment sur des sites d'alimentation situés dans d'autres pays. La population de base du Chapitre III qui caractérise la diversité génétique des populations de la Polynésie pourra permettre de mieux quantifier la contribution de ces populations aux stocks de ces aires d'alimentation. Ceci a des implications en termes de conservation, car les tortues sur les aires d'alimentation côtières peuvent être victime de pêche dans les pays où elle n'est pas interdite, ou de braconnage. Il est donc important de quantifier quelles populations sont visées et dans quelles proportions. Piovano et al. (2019) indiquait par exemple que les tortues vertes de Polynésie représentaient 37% des tortues échantillonnées au marché de Suva (Fiji) en 1996-1997, ce qui montre une menace pour ces tortues hors territoire de la Polynésie. Aux Fiji, la consommation et la détention de tortue verte est interdite depuis 1995, mais la consommation locale est une tradition qui perdure (Kitolelei et al., 2022). En Colombie, environ 129 tortues marines (toutes espèces confondues) étaient pêchées annuellement entre 1998 et 2003. Wallace et al. (2011) ont identifié la RMU du Pacifique Sud-Ouest comme présentant un niveau de menace élevé pour les tortues vertes, principalement dû à la capture ciblée (légale ou illégale) et aux effets du changement climatique. Cette RMU englobe l'Australie où des haplotypes de Polynésie ont été retrouvés (voir Chapitre III), et la Nouvelle Calédonie et où des migrations ont été observées (Balazs et al., 1995). Cependant, Senko et al. (2022) ont noté une diminution des captures illégales de tortues vertes dans cette RMU en se basant sur les données publiées et sur des interviews d'experts locaux, passant de plus de 1000 à moins de 500 entre les années 2000 et 2010.

b. Conservation et enjeux locaux

i. Pêche illégale

En Polynésie, les tortues vertes sont protégées par la législation locale depuis 1990, mais malgré tout victimes de braconnage (Brikke, 2010), et la DIREN reconnaît les limites de la mise en œuvre de cette protection sur le territoire (Vucher-Visin et al., 2010). Cependant le manque de données scientifiques sur les populations de tortues présentes ne permettait pas jusqu'à présent d'implémenter des mesures de gestion optimale des populations, ce à quoi cette thèse répond en partie.

Le Chapitre III a montré que les individus retrouvés sur le territoire sont originaires de Polynésie, qui est donc le premier territoire concerné par le maintien de ses populations. Il est important de noter que deux populations sont présentes dans l'archipel de la Société, et que celle des Iles Sous-le-Vent présente une plus grande diversité génétique. Les frontières et la connectivité entre ces deux populations doivent encore être précisées, ainsi que leur dynamique, mais il pourrait être envisagé une gestion spécifique pour chacune d'entre elles si nécessaire, qui tiendrait aussi compte du contexte socio-culturel propre à chaque île. En effet, la population des Îles du Vent profite du fort effort de conservation, de suivi, et de sensibilisation mis en place à Tetiaroa depuis 2007, et à Moorea avec l'implantation de l'association Te mana o te moana. Une augmentation du nombre de pontes est observé sur Tetiaroa depuis le début des suivis, signe positif quant au maintien de cette population (Touren et al., 2018). Cependant, la population de Tetiaroa présente un fort taux de consanguinité (Chapitre V), et une diversité génétique modérée (Chapitre III), donc la protection doit aussi être à l'œuvre sur les autres îles. Aux Iles Sous-le-Vent, le centre de protection de l'hôtel Méridien Bora Bora œuvre pour le soin et la protection des tortues, mais la consommation de viande de tortue est très ancrée dans les coutumes, notamment lors de festivals (ex. la course de pirogues Hawaiiki nui à Bora Bora), et est revendiquée par les populations locales (Brikke, 2010; Vucher-Visin et al., 2010). Les efforts de conservation et de protection ne doivent cependant pas être négligés dans cette partie du territoire qui s'avère être d'une grande importance pour la diversité génétique de l'espèce. Des exemples de gestion vertueuse existent dans d'autres parties du monde, avec souvent une action conjointe des autorités et des populations locales, un respect des traditions, et un fort effort de sensibilisation (Campbell et al., 2007; Groom et al., 2017; Kitolelei et al., 2022).

Dans les archipels plus éloignés de Polynésie, comme les Tuamotu et les Marquises, le principal challenge réside dans l'éloignement et l'accessibilité, tant pour des suivis scientifiques que pour des contrôles de braconnage. La mise en place d'un réseau de partenaires locaux, déjà initié par la DIREN, semble être une bonne piste pour former un maillage efficace sur le territoire, et serait d'une grande utilité pour améliorer les connaissances sur les populations de tortues vertes dans ces archipels. Enfin, il est important de garder à l'esprit qu'une autre division entre populations existe, indépendante des facteurs géographiques (Chapitre IV), et donc que la gestion par unité géographique n'est pas nécessairement la plus adaptée aux populations de tortues vertes de Polynésie. Des études complémentaires, développées dans la partie *Perspectives*, sont nécessaires à ce stade.

ii. Dégradation de l'habitat

Par ailleurs, outre la capture directe des individus, les tortues vertes en Polynésie sont aussi menacées par la dégradation de leur habitat, et notamment l'artificialisation des plages. Sur plusieurs îles hautes volcaniques, la proportion de côtes naturelles est passée de plus de 90% en 1955 à moins de 40% en 2017, notamment à cause de l'augmentation des terrassements privés (Gairin et al., 2022). Sur Moorea, cette augmentation est significative jusqu'en 2009, et suivie d'une augmentation de la proportion de plages dominées par de la boue et des substrats détritiques provenant d'activités humaines jusqu'en 2018 (Moussa et al., 2019). Au contraire à Tetiaroa, la conception de l'hôtel de luxe *le Brando* a été faite de sorte à laisser le littoral intact pour les pontes de tortues, et les villas ont été construites en retrait de la plage. Enrayer le phénomène d'érosion par l'artificialisation des littoraux constitue donc un important levier pour la préservation de l'habitat des tortues marines sur le territoire.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre en lumière la structure des populations de tortues vertes au sein de la Polynésie française, et une isolation génétique avec les autres populations du Pacifique. Une structure inédite chez les tortues vertes, et des comportements de reproductions variables appellent à des études complémentaires, liées notamment aux migrations, à la morphologie, et aux choix de partenaires pour la reproduction. Les résultats de ce travail montrent des disparités sur le territoire qu'il pourrait être intéressant de prendre en compte dans les mesures de conservation, et pointent les lacunes qu'il reste à explorer. Il apparaît évident que les populations de tortues de Polynésie française sont d'une grande importance pour la diversité génétique de l'espèce, et doivent être préservées le plus efficacement possible, avec tous les leviers socio-économiques et législatifs pertinents.

Références bibliographiques

- Abreu-Grobois, F.A., Horrocks, J.A., Krueger, B., Formia, A., Beggs, J., 2006. New mtDNA dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution of mixed stock analyses., in: Book of Abstracts from the 26th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. International Sea Turtle Society, Crete, Greece, p. 179.
- Albertson, G.R., Baird, R.W., Oremus, M., Poole, M.M., Martien, K.K., Baker, C.S., 2017. Staying close to home? Genetic differentiation of rough-toothed dolphins near oceanic islands in the central Pacific Ocean. *Conserv. Genet.* 18, 33–51. <https://doi.org/10.1007/s10592-016-0880-z>
- Alfaro-Núñez, A., Jensen, M.P., Abreu-Grobois, F.A., 2015. Does polyandry really pay off? The effects of multiple mating and number of fathers on morphological traits and survival in clutches of nesting green turtles at Tortuguero. *PeerJ* 3, e880. <https://doi.org/10.7717/peerj.880>
- Alfaro-Shigueto, J., Mangel, J.C., Bernedo, F., Dutton, P.H., Seminoff, J.A., Godley, B.J., 2011. Small-scale fisheries of Peru: a major sink for marine turtles in the Pacific. *J. Appl. Ecol.* 48, 1432–1440. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2011.02040.x>
- Allard, M.W., Miyamoto, M.M., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Bowen, B.W., 1994. Support for Natal Homing in Green Turtles from Mitochondrial DNA Sequences. *Copeia* 1994, 34–41. <https://doi.org/10.2307/1446668>
- Allen, M.S., 2007. Three millennia of human and sea turtle interactions in Remote Oceania. *Coral Reefs* 26, 959–970. <https://doi.org/10.1007/s00338-007-0234-x>
- Allendorf, F.W., Luikart, G.H., Aitken, S.N., 2012. Conservation and the Genetics of Populations, 2nd ed. Wiley-Blackwell.
- Álvarez-Varas, R., Heidemeyer, M., Riginos, C., Benítez, H.A., Reséndiz, E., Lara-Uc, M., Godoy, D.A., Muñoz-Pérez, J.P., Alarcón-Ruales, D.E., Vélez-Rubio, G.M., Fallabrino, A., Piovano, S., Alfaro-Shigueto, J., Ortiz-Alvarez, C., Mangel, J.C., Esquerré, D., Zárate, P., Medrano, C., León Miranda, F., Guerrero, F., Vianna, J.A., Véliz, D., 2021. Integrating morphological and genetic data at different spatial scales in a cosmopolitan marine turtle species: challenges for management and conservation. *Zool. J. Linn. Soc.* 191, 434–453. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa066>
- Álvarez-Varas, R., Medrano, C., Benítez, H.A., Guerrero, F., León Miranda, F., Vianna, J.A., González, C., Véliz, D., 2022. Genetics, Morphometrics and Health Characterization of Green Turtle Foraging Grounds in Mainland and Insular Chile. *Anim. Open Access J. MDPI* 12, 1473. <https://doi.org/10.3390/ani12121473>
- Álvarez-Varas, R., Véliz, D., Vélez-Rubio, G.M., Fallabrino, A., Zárate, P., Heidemeyer, M., Godoy, D.A., Benítez, H.A., 2019. Identifying genetic lineages through shape: An example in a cosmopolitan marine turtle species using geometric morphometrics. *PloS One* 14, e0223587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223587>
- Anderson, E.C., Waples, R.S., Kalinowski, S.T., 2008. An improved method for predicting the accuracy of genetic stock identification. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65, 1475–1486. <https://doi.org/10.1139/F08-049>

- Ansmann, I.C., Parra, G.J., Lanyon, J.M., Seddon, J.M., 2012. Fine-scale genetic population structure in a mobile marine mammal: inshore bottlenose dolphins in Moreton Bay, Australia. *Mol. Ecol.* 21, 4472–4485. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05722.x>
- Anthony, L.L., Blumstein, D.T., 2000. Integrating behaviour into wildlife conservation: the multiple ways that behaviour can reduce Ne. *Biol. Conserv.* 95, 303–315. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(00\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00037-9)
- Arienzo, M., 2023. Progress on the Impact of Persistent Pollutants on Marine Turtles: A Review. *J. Mar. Sci. Eng.* 11, 266. <https://doi.org/10.3390/jmse11020266>
- Arthur, K.E., Boyle, M.C., Limpus, C.J., 2008. Ontogenetic changes in diet and habitat use in green sea turtle (*Chelonia mydas*) life history. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 362, 303–311. <https://doi.org/10.3354/meps07440>
- Baer, B., Schmid-Hempel, P., Høeg, J.T., Boomsma, J.J., 2003. Sperm length, sperm storage and mating system characteristics in bumblebees. *Insectes Sociaux* 50, 101–108. <https://doi.org/10.1007/s00040-003-0641-0>
- Bagda, E., Bardakci, F., Turkozan, O., 2012. Lower genetic structuring in mitochondrial DNA than nuclear DNA among the nesting colonies of green turtles (*Chelonia mydas*) in the Mediterranean. *Biochem. Syst. Ecol.* 43, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.03.015>
- Bailleul, D., Stoeckel, S., Arnaud-Haond, S., 2016. RClone: a package to identify MultiLocus Clonal Lineages and handle clonal data sets in R. *Methods Ecol. Evol.* 7, 966–970. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12550>
- Baillie, J.E., Bennun, T.M., Brooks, S.H., Butchart, J.S., Chanson, J.S., Cokeliss, Z., Hilton-Taylor, C., Hoffmann, M., Mace, G.M., Mainka, S.A., Pollock, C.M., 2004. IUCN Red List of Threatened Species: A Global Species Assessment., IUCN. The World Conservation Union, Switzerland and Cambridge, UK.
- Balazs, G.H., 1983. Recovery records of adult green turtles observed or originally tagged at French Frigate Shoals, northwestern Hawaiian Islands (Technical Memorandum No. Sea grant cooperative report UNIH-SEAGRANT-CR-83-03;NOAA-TM-NMFS-SWFC ; 36). NOAA, U.S.
- Balazs, G.H., 1980. Synopsis of biological data on the green turtle in the Hawaiian Islands (Technical Memorandum). NOAA.
- Balazs, G.H., Chaloupka, M., 2004. Thirty-year recovery trend in the once depleted Hawaiian green sea turtle stock. *Biol. Conserv.* 117, 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2003.08.008>
- Balazs, G.H., Siu, P., Landret, J.P., 1995. Ecological aspects of green turtles nesting at Scilly Atoll in French Polynesia, in: Proceedings of the 12th Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA Tech. Memo., pp. 7–10.
- Balazs, G.H., Van Houtan, K.S., Hargrove, S.A., Brunson, S.M., Murakawa, S.K.K., 2015. A Review of the Demographic Features of Hawaiian Green Turtles (*Chelonia mydas*). *Chelonian Conserv. Biol.* 14, 119–129. <https://doi.org/10.2744/CCB-1172.1>
- Beal, M., Catry, P., Regalla, A., Barbosa, C., Pires, A.J., Mestre, J., Senhoury, C., Sidina, E., Patrício, A.R., 2022. Satellite tracking reveals sex-specific migration distance in green turtles (*Chelonia mydas*). *Biol. Lett.* 18, 20220325. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0325>

- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX4. 05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Lab. Génome Popul. Interact. CNRS UMR 5000, 1996–2004.
- Bernatchez, L., Duchesne, P., 2000. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: How many loci, how many alleles? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* - CAN J Fish. AQUAT SCI 57, 1–12. <https://doi.org/10.1139/cjfas-57-1-1>
- Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., 2008. Annual variation in source contributions to a mixed stock: implications for quantifying connectivity. *Mol. Ecol.* 17, 2185–2193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03752.x>
- Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., 1988. Growth Rates of Immature Green Turtles, *Chelonia mydas*, on Feeding Grounds in the Southern Bahamas. *Copeia* 1988, 555–564. <https://doi.org/10.2307/1445373>
- Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Moreira, L., Bellini, C., Marcovaldi, M.Â., 2006. Population Structure and Diversity of Brazilian Green Turtle Rookeries Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Chelonian Conserv. Biol.* 5, 262–268. [https://doi.org/10.2744/1071-8443\(2006\)5\[262:PSADOB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2744/1071-8443(2006)5[262:PSADOB]2.0.CO;2)
- Bjorndal, K.A., Parsons, J., Mustin, W., Bolten, A.B., 2013. Threshold to maturity in a long-lived reptile: interactions of age, size, and growth. *Mar. Biol.* 160, 607–616. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2116-1>
- Blouin, S.F., Blouin, M., 1988. Inbreeding avoidance behaviors. *Trends Ecol. Evol.* 3, 230–233. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(88\)90164-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(88)90164-4)
- Boissin, E., Neglia, V., Boulet Colomb D'hauteserre, F., Tatarata, M., Planes, S., 2019. Evolutionary history of green turtle populations, *Chelonia mydas*, from French Polynesia highlights the putative existence of a glacial refugium. *Mar. Biodivers.* 49, 2725–2733. <https://doi.org/10.1007/s12526-019-01001-6>
- Bolten, A.B., 2003. Variation in sea turtle life history patterns: Neritic vs. oceanic developmental stages., in: *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 455.
- Booth, J., Peters, J.A., 1972. Behavioural studies on the green turtle (*Chelonia mydas*) in the sea. *Anim. Behav.* 20, 808–812. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(72\)80155-6](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(72)80155-6)
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314–331.
- Bourjea, J., Lapègue, S., Gagnevin, L., Broderick, D., Mortimer, J.A., Ciccione, S., Roos, D., Taquet, C., Grizel, H., 2007. Phylogeography of the green turtle, *Chelonia mydas*, in the Southwest Indian Ocean. *Mol. Ecol.* 16, 175–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03122.x>
- Bowen, B.W., Bass, A.L., Soares, L., Toonen, R.J., 2005. Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Mol. Ecol.* 14, 2389–2402. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02598.x>
- Bowen, B.W., Karl, S.A., 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Mol. Ecol.* 16, 4886–4907. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03542.x>
- Bowen, B.W., Meylan, A.B., Ross, J.P., Limpus, C.J., Balazs, G.H., Avise, J.C., 1992. GLOBAL POPULATION STRUCTURE AND NATURAL HISTORY OF THE GREEN TURTLE

- (CHELONIA MYDAS) IN TERMS OF MATRIARCHAL PHYLOGENY. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 46, 865–881. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1992.tb00605.x>
- Boyle, M.C., Limpus, C.J., 2008. The stomach contents of post-hatchling green and loggerhead sea turtles in the southwest Pacific: an insight into habitat association. *Mar. Biol.* 155, 233–241. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-1022-z>
- Bradshaw, P.J., Broderick, A.C., Carreras, C., Fuller, W., Snape, R.T.E., Wright, L.I., Godley, B.J., 2018. Defining conservation units with enhanced molecular tools to reveal fine scale structuring among Mediterranean green turtle rookeries. *Biol. Conserv.* 222, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.12.014>
- Bretman, A., Newcombe, D., Tregenza, T., 2009. Promiscuous females avoid inbreeding by controlling sperm storage. *Mol. Ecol.* 18, 3340–3345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04301.x>
- Brikke, S., 2010. La perception des populations locales sur les tortues marines, sur les îles de Bora Bora et de Maupiti, Polynésie Française. *Ressour. Mar. Tradit. Bulletin d'information de la CSP.*
- Broderick, A., Patricio, A., 2019. *Chelonia mydas* (South Atlantic subpopulation). The IUCN Red List of Threatened Species. [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species. URL <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T142121866A142086337.en> (accessed 1.17.20).
- Broderick, A.C., Glen, F., Godley, B.J., Hays, G.C., 2003. Variation in reproductive output of marine turtles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 288, 95–109. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00003-0)
- Brookes, A.J., 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234, 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
- Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 1967–1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967>
- Campbell, L.M., Haalboom, B.J., Trow, J., 2007. Sustainability of community-based conservation: sea turtle egg harvesting in Ostional (Costa Rica) ten years later. *Environ. Conserv.* 34, 122–131.
- Campbell, N.R., Harmon, S.A., Narum, S.R., 2015. Genotyping-in-Thousands by sequencing (GT-seq): A cost effective SNP genotyping method based on custom amplicon sequencing. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 855–867. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12357>
- Candan, O., Kolankaya, D., 2016. Sex Ratio of Green Turtle (*Chelonia mydas*) Hatchlings at Sugözü, Turkey: Higher Accuracy with Pivotal Incubation Duration. *Chelonian Conserv. Biol.* 15, 102–108. <https://doi.org/10.2744/CCB-1132.1>
- Carreras, C., Pascual, M., Cardona, L., Aguilar, A., Margaritoulis, D., Rees, A., Turkozan, O., Levy, Y., Gasith, A., Aureggi, M., Khalil, M., 2007. The genetic structure of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in the Mediterranean as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications. *Conserv. Genet.* 8, 761–775. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9224-8>
- Carreras, C., Pascual, M., Cardona, L., Marco, A., Bellido, J.J., Castillo, J.J., Tomás, J., Raga, J.A., Sanfélix, M., Fernández, G., Aguilar, A., 2011. Living Together but Remaining Apart: Atlantic and Mediterranean Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) in Shared Feeding Grounds. *J. Hered.* 102, 666–677. <https://doi.org/10.1093/jhered/esr089>

- Casale, P., Gerosa, G., Yerli, S.V., 2000. Female-biased primary sex ratio of the Green Turtle, *Chelonia mydas*, estimated through sand temperatures at Akyatan, Turkey. *Zool. Middle East* 20, 37–46. <https://doi.org/10.1080/09397140.2000.10637810>
- Chaloupka, M., Limpus, C., Miller, J., 2004. Green turtle somatic growth dynamics in a spatially disjunct Great Barrier Reef metapopulation. *Coral Reefs* 23, 325–335. <https://doi.org/10.1007/s00338-004-0387-9>
- Chaloupka, M.Y., Pilcher, N.J., 2019. *Chelonia mydas* (Hawaiian subpopulation). The IUCN Red List of Threatened Species. [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species. URL <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T16285718A142098300.en> (accessed 1.17.20).
- Charlesworth, B., 2009. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nat. Rev. Genet.* 10, 195–205. <https://doi.org/10.1038/nrg2526>
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 237–268.
- Chaves, J., Peña, M., Valdés-Urbe, J., Muñoz-Pérez, J., Vallejo, F., Heidemeyer, M., Torres-Carvajal, O., 2017. Connectivity, population structure, and conservation of Ecuadorian green sea turtles. *Endanger. Species Res.* 32, 251–264. <https://doi.org/10.3354/esr00809>
- Chen, B., Cole, J.W., Grond-Ginsbach, C., 2017. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. *Front. Genet.* 8.
- Chung, H., Lee, J., Lee, W.Y., 2021. A Review: Marine Bio-logging of Animal Behaviour and Ocean Environments. *Ocean Sci. J.* 56, 117–131. <https://doi.org/10.1007/s12601-021-00015-1>
- Clegg, M.T., Epperson, B.K., Brown, A.H.D., 1992. Genetic Diversity and Reproductive System, in: Dattée, Y., Dumas, C., Gallais, A. (Eds.), *Reproductive Biology and Plant Breeding*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 311–323. https://doi.org/10.1007/978-3-642-76998-6_30
- Colman, L.P., Lara, P.H., Bennie, J., Broderick, A.C., de Freitas, J.R., Marcondes, A., Witt, M.J., Godley, B.J., 2020. Assessing coastal artificial light and potential exposure of wildlife at a national scale: the case of marine turtles in Brazil. *Biodivers. Conserv.* 29, 1135–1152. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01928-z>
- Coltman, D.W., Pilkington, J.G., Pemberton, J.M., 2003. Fine-scale genetic structure in a free-living ungulate population. *Mol. Ecol.* 12, 733–742. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01762.x>
- Comuzzie, D.K.C., Owens, D.Wm., 1990. A Quantitative Analysis of Courtship Behavior in Captive Green Sea Turtles (*Chelonia Mydas*). *Herpetologica* 46, 195–202.
- Cornell, S.J., Tregenza, T., 2007. A new theory for the evolution of polyandry as a means of inbreeding avoidance. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 2873–2879. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0926>
- Correa-Cárdenas, C., Amoroch, D., Caballero, S., 2012. Spatial-temporal analyses of Eastern Pacific green turtles (*Cheloniemydas/Chelonia agassizzii*) foraging as mixed stock in Gorgona NNP, Colombian Pacific Ocean.
- Craig, P., Parker, D., Brainard, R., Rice, M., Balazs, G., 2004. Migrations of green turtles in the central South Pacific. *Biol. Conserv.* 116, 433–438. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00217-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00217-9)

- Crim, J.L., Spotila, L.D., Spotila, J.R., O'Connor, M., Reina, R., Williams, C.J., Paladino, F.V., 2002. The leatherback turtle, *Dermochelys coriacea*, exhibits both polyandry and polygyny. *Mol. Ecol.* 11, 2097–2106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01591.x>
- Crow, J.F., Kimura, M., 1970. An introduction to population genetic theory, Harper and Row. ed. New York.
- Cushman, S.A., 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biol. Conserv.* 128, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.031>
- Dethmers, K.E.M., Broderick, D., Moritz, C., Fitzsimmons, N.N., Limpus, C.J., Lavery, S., Whiting, S., Guinea, M., Prince, R.I.T., Kennett, R., 2006. The genetic structure of Australasian green turtles (*Chelonia mydas*): exploring the geographical scale of genetic exchange. *Mol. Ecol.* 15, 3931–3946. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03070.x>
- Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillett, B.J., Ovenden, J.R., 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 209–214. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12157>
- Dolfo, V., Boissin, E., Tatarata, M., Planes, S., 2023. Characterization of 25 new microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*) and cross-species amplification in other marine turtle species. *Mol. Biol. Rep.* <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08341-4>
- Duncan, E.M., Botterell, Z.L.R., Broderick, A.C., Galloway, T.S., Lindeque, P.K., Nuno, A., Godley, B.J., 2017. A global review of marine turtle entanglement in anthropogenic debris: a baseline for further action. *Endanger. Species Res.* 34, 431–448. <https://doi.org/10.3354/esr00865>
- Dutton, P.H., Frey, A., 2009. Characterization of polymorphic microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*). *Mol. Ecol. Resour.* 9, 354–356. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02443.x>
- Dutton, P.H., Jensen, M.P., Frey, A., LaCasella, E., Balazs, G.H., Zárate, P., Chassin-Noria, O., Sarti-Martinez, A.L., Velez, E., 2014a. Population structure and phylogeography reveal pathways of colonization by a migratory marine reptile (*Chelonia mydas*) in the central and eastern Pacific. *Ecol. Evol.* 4, 4317–4331. <https://doi.org/10.1002/ece3.1269>
- Dutton, P.H., Jensen, M.P., Frutchey, K., Frey, A., LaCasella, E., Balazs, G.H., Cruce, J., Tagarino, A., Farman, R., Tatarata, M., 2014b. Genetic Stock Structure of Green Turtle (*Chelonia mydas*) Nesting Populations Across the Pacific Islands. *Pac. Sci.* 68, 451–464. <https://doi.org/10.2984/68.4.1>
- Dutton, P.H., LeRoux, R.A., LaCasella, E.L., Seminoff, J.A., Eguchi, T., Dutton, D.L., 2018. Genetic analysis and satellite tracking reveal origin of the green turtles in San Diego Bay. *Mar. Biol.* 166, 3. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3446-4>
- Dutton, P.H., Roden, S.E., Stewart, K.R., LaCasella, E., Tiwari, M., Formia, A., Thomé, J.C., Livingstone, S.R., Eckert, S., Chacon-Chaverri, D., Rivalan, P., Allman, P., 2013. Population stock structure of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in the Atlantic revealed using mtDNA and microsatellite markers. *Conserv. Genet.* 14, 625–636. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0456-0>

- Earl, D.A., vonHoldt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Eldon, B., Riquet, F., Yearsley, J., Jollivet, D., Broquet, T., 2016. Current hypotheses to explain genetic chaos under the sea. *Curr. Zool.* 62, 551–566. <https://doi.org/10.1093/cz/zow094>
- Emlen, S.T., Oring, L.W., 1977. Ecology, Sexual Selection, and the Evolution of Mating Systems. *Science* 197, 215–223.
- Encalada, S.E., Lahanas, P.N., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Miyamoto, M.M., Bowen, B.W., 1996. Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Mol. Ecol.* 5, 473–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1996.tb00340.x>
- Eusebi, P.G., Cortés, O., Dunner, S., Cañón, J., 2017. Genomic diversity and population structure of Mexican and Spanish bovine Lidia breed. *Anim. Genet.* 48, 682–685. <https://doi.org/10.1111/age.12618>
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Ewing, H.E., 1943. Continued Fertility in Female Box Turtles Following Mating. *Copeia* 1943, 112–114. <https://doi.org/10.2307/1437776>
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Feldschuh, J., Brassel, J., Durso, N., Levine, A., 2005. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil. Steril.* 84, 1017.e3–1017.e4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.05.015>
- Fennessy, J., Bidon, T., Reuss, F., Kumar, V., Elkan, P., Nilsson, M.A., Vamberger, M., Fritz, U., Janke, A., 2016. Multi-locus Analyses Reveal Four Giraffe Species Instead of One. *Curr. Biol.* 26, 2543–2549. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.036>
- Figgenger, C., Chacón-Chaverri, D., Jensen, M.P., Feldhaar, H., 2016. Paternity re-visited in a recovering population of Caribbean leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 475, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.11.014>
- Fitzsimmons, N.N., 1998. Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). *Mol. Ecol.* 7, 575–584. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00355.x>
- FitzSimmons, N.N., Limpus, C.J., Norman, J.A., Goldizen, A.R., Miller, J.D., Moritz, C., 1997a. Philopatry of male marine turtles inferred from mitochondrial DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 8912–8917. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8912>
- FitzSimmons, N.N., Moritz, C., Limpus, C.J., Pope, L., Prince, R., 1997b. Geographic Structure of Mitochondrial and Nuclear Gene Polymorphisms in Australian Green Turtle Populations and Male-Biased Gene Flow. *Genetics* 147, 1843–1854.
- FitzSimmons, N.N., Moritz, C., Moore, S.S., 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol. Biol. Evol.* 12, 432–440.

- Formia, A., Godley, B.J., Dontaine, J.-F., Bruford, M.W., 2006. Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtle (*Chelonia mydas*) populations in Africa. *Conserv. Genet.* 7, 353–369. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9047-z>
- Franco, J.L. de A., 2013. The concept of biodiversity and the history of conservation biology: from wilderness preservation to biodiversity conservation. *História São Paulo* 32, 21–48. <https://doi.org/10.1590/S0101-90742013000200003>
- Frankel, O.H., Frankel, O., Soulé, M.E., 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Franklin, I.R., 1980. *Evolutionary change in small populations*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, U.S.A.
- Freeman, L.A., 2015. Robust Performance of Marginal Pacific Coral Reef Habitats in Future Climate Scenarios. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128875>
- Fukuoka, T., Yamane, M., Kinoshita, C., Narazaki, T., Marshall, G.J., Abernathy, K.J., Miyazaki, N., Sato, K., 2016. The feeding habit of sea turtles influences their reaction to artificial marine debris. *Sci. Rep.* 6, 28015. <https://doi.org/10.1038/srep28015>
- Gairin, E., Collin, A., James, D., Dolique, F., Jeanson, M., Lecchini, D., 2022. Multi-decadal coastal evolution of remote Pacific islands: armouring of Taha'a, Raiatea, Maupiti, and Rangiroa (French Polynesia). *Reg. Environ. Change* 22, 119. <https://doi.org/10.1007/s10113-022-01977-1>
- Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. *Stat. Sci.* 7, 457–472.
- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., Wallace, D.C., 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 6715–6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6715>
- Godfrey, M.H., Mrosovsky, N., 2006. Pivotal temperature for green sea turtles, *Chelonia mydas*, nesting in Suriname. *Herpetol. J.* 16, 55–61.
- Godley, B.J., Broderick, A.C., Glen, F., Hays, G.C., 2002. Temperature-dependent sex determination of Ascension Island green turtles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 226, 115–124. <https://doi.org/10.3354/meps226115>
- González Carman, V., Acha, E.M., Maxwell, S.M., Albareda, D., Campagna, C., Mianzan, H., 2014. Young green turtles, *Chelonia mydas*, exposed to plastic in a frontal area of the SW Atlantic. *Mar. Pollut. Bull.* 78, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.11.012>
- Gray, I.C., Campbell, D.A., Spurr, N.K., 2000. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2403–2408. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2403>
- Groom, M.J., Meffe, M.J., Carroll, C.R., 2006. *Principles of Conservation Biology*, Sinauer Associates. ed, *Ecological economics of nature conservation*.
- Groom, R.A., Griffiths, A.D., Chaloupka, M., 2017. Estimating long-term trends in abundance and survival for nesting flatback turtles in Kakadu National Park, Australia. *Endanger. Species Res.* 32, 203–211. <https://doi.org/10.3354/esr00795>
- Groombridge, B., Luxmoore, R.A., 1989. The green turtle and hawksbill (Reptilia: Cheloniidae) : world status, exploitation and trade. CITES, Lausanne.

- Grosberg, R., Cunningham, C., 2000. Genetic Structure in the Sea: From Populations to Communities, in: Marine Community Ecology. pp. 61–84.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R.J., 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 591–611. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>
- Gyuris, E., 1994. The rate of predation by fishes on hatchlings of the green turtle (*Chelonia mydas*). *Coral Reefs* 13, 137–144. <https://doi.org/10.1007/BF00301189>
- Hamabata, T., Hikida, T., Ishihara, T., Kawazu, I., Nashiki, Y., Oki, K., Tanaka, T., Ui, K., Kamezaki, N., 2016. MtDNA Analysis Suggests Local Origin of Pelagic-Stage Juvenile Green Turtles Collected in Japanese Coastal Waters 1. *Pac. Sci.* 70, 45–54. <https://doi.org/10.2984/70.1.4>
- Hamabata, T., Kamezaki, N., Hikida, T., 2014. Genetic structure of green turtle (*Chelonia mydas*) peripheral populations nesting in the northwestern Pacific rookeries: evidence for northern refugia and postglacial colonization. *Mar. Biol.* 161, 495–507. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2352-z>
- Hancock, J.M., Vieira, S., Taraveira, L., Santos, A., Schmitt, V., Semedo, A., Patrício, A.R., Ferrand, N., Gonçalves, H., Sequeira, F., 2019. Genetic characterization of green turtles (*Chelonia mydas*) from São Tomé and Príncipe: Insights on species recruitment and dispersal in the Gulf of Guinea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 518, 151181. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151181>
- Harrison, H.B., Saenz-Agudelo, P., Planes, S., Jones, G.P., Berumen, M.L., 2013. Relative accuracy of three common methods of parentage analysis in natural populations. *Mol. Ecol.* 22, 1158–1170. <https://doi.org/10.1111/mec.12138>
- Hatase, H., Sato, K., Yamaguchi, M., Takahashi, K., Tsukamoto, K., 2006. Individual variation in feeding habitat use by adult female green sea turtles (*Chelonia mydas*): are they obligately neritic herbivores? *Oecologia* 149, 52–64. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0431-2>
- Hayashi, R., Nishizawa, H., 2015. Body size distribution demonstrates flexible habitat shift of green turtle (*Chelonia mydas*). *Glob. Ecol. Conserv.* 3, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2014.11.008>
- Hays, G.C., Broderick, A.C., Godley, B.J., Lovell, P., Martin, C., McConnell, B.J., Richardson, S., 2002. Biphasal long-distance migration in green turtles. *Anim. Behav.* 64, 895–898. <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.1975>
- Hays, G.C., Mazaris, A.D., Schofield, G., 2014. Different male vs. female breeding periodicity helps mitigate offspring sex ratio skews in sea turtles. *Front. Mar. Sci.* 1.
- Hays, G.C., Shimada, T., Schofield, G., 2022. A review of how the biology of male sea turtles may help mitigate female-biased hatchling sex ratio skews in a warming climate. *Mar. Biol.* 169, 89. <https://doi.org/10.1007/s00227-022-04074-3>
- Heaslip, S.G., Iverson, S.J., Bowen, W.D., James, M.C., 2012. Jellyfish Support High Energy Intake of Leatherback Sea Turtles (*Dermochelys coriacea*): Video Evidence from Animal-Borne Cameras. *PLOS ONE* 7, e33259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033259>
- Hedrick, P.W., 2005. A Standardized Genetic Differentiation Measure. *Evolution* 59, 1633–1638. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01814.x>

- Hedrick, P.W., Miller, P.S., 1992. Conservation Genetics: Techniques and Fundamentals. *Ecol. Appl.* 2, 30–46. <https://doi.org/10.2307/1941887>
- Heller, R., Siegmund, H.R., 2009. Relationship between three measures of genetic differentiation GST, DEST and G'ST: how wrong have we been? *Mol. Ecol.* 18, 2080–2083. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04185.x>
- Hoban, S., Gaggiotti, O., Consortium, C., Bertorelle, G., 2013. Sample Planning Optimization Tool for conservation and population Genetics (SPOTG): a software for choosing the appropriate number of markers and samples. *Methods Ecol. Evol.* 4, 299–303. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12025>
- Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, et al, 2010. The Impact of Conservation on the Status of the World's Vertebrates. *Science* 330, 1503–1509. <https://doi.org/10.1126/science.1194442>
- Holderegger, R., Balkenhol, N., Bolliger, J., Engler, J.O., Gugerli, F., Hochkirch, A., Nowak, C., Segelbacher, G., Widmer, A., Zachos, F.E., 2019. Conservation genetics: Linking science with practice. *Mol. Ecol.* 28, 3848–3856. <https://doi.org/10.1111/mec.15202>
- Hooidek, R. van, Maynard, J.A., Planes, S., 2013. Temporary refugia for coral reefs in a warming world. *Nat. Clim. Change* 3, 508–511. <https://doi.org/10.1038/nclimate1829>
- Horne, J.B., Frey, A., Gaos, A.R., Martin, S., Dutton, P.H., 2022. Non-random mating between nesting sites of Hawaiian hawksbill turtles: demographic discontinuity within a small isolated population. <https://doi.org/10.1101/2022.10.30.514389>
- Howe, M., FitzSimmons, N.N., Limpus, C.J., Clegg, S.M., 2017. Multiple paternity in a Pacific marine turtle population: maternal attributes, offspring outcomes and demographic inferences. *Mar. Biol.* 165, 2. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3258-y>
- Hubisz, M.J., Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 1322–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>
- Hughes, G., 1970. MARINE TURTLES: An introduction to the sea turtles of South East Africa. *South Afr. J. Sci.* 239–246. https://doi.org/10.10520/AJA00382353_3951
- Hughes, J.B., Daily, G.C., Ehrlich, P.R., 1997. Population Diversity: Its Extent and Extinction. *Science* 278, 689–692. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.689>
- James, M.C., Eckert, S.A., Myers, R.A., 2005. Migratory and reproductive movements of male leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*). *Mar. Biol.* 147, 845–853. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-1581-1>
- Janzen, F.J., 1994. Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7487–7490. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7487>
- Jensen, M.P., Abreu-Grobois, F.A., Frydenberg, J., Loeschcke, V., 2006. Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. *Mol. Ecol.* 15, 2567–2575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02951.x>
- Jensen, M.P., Allen, C.D., Eguchi, T., Bell, I.P., LaCasella, E.L., Hilton, W.A., Hof, C.A.M., Dutton, P.H., 2018. Environmental Warming and Feminization of One of the

- Largest Sea Turtle Populations in the World. *Curr. Biol.* 28, 154-159.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.057>
- Jensen, M.P., Bell, I., Limpus, C.J., Hamann, M., Ambar, S., Whap, T., David, C., FitzSimmons, N.N., 2016. Spatial and temporal genetic variation among size classes of green turtles (*Chelonia mydas*) provides information on oceanic dispersal and population dynamics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 543, 241–256. <http://dx.doi.org/10.3354/meps11521>
- Jensen, M.P., FitzSimmons, N.N., Bourjea, J., Hamabata, T., Reece, J., Dutton, P.H., 2019. The evolutionary history and global phylogeography of the green turtle (*Chelonia mydas*). *J. Biogeogr.* 46, 860–870. <https://doi.org/10.1111/jbi.13483>
- Jensen, M.P., FitzSimmons, N.N., Dutton, P.H., 2013. Molecular genetics of sea turtles, in: *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 135–162.
- Jombart, T., 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24, 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 11, 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- Jones, A.G., Small, C.M., Paczolt, K.A., Ratterman, N.L., 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 6–30. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02778.x>
- Jones, K., Jensen, M., Burgess, G., Leonhardt, J., Herwerden, L. van, Hazel, J., Hamann, M., Bell, I., Ariel, E., 2018. Closing the gap: mixed stock analysis of three foraging populations of green turtles (*Chelonia mydas*) on the Great Barrier Reef. *PeerJ* 6, e5651. <https://doi.org/10.7717/peerj.5651>
- Jones, O.R., Wang, J., 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 551–555. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x>
- Jost, L., 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol. Ecol.* 17, 4015–4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>
- Kardos, M., 2021. Conservation genetics. *Curr. Biol.* 31, R1185–R1190. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.047>
- Karl, S.A., Bowen, B.W., Avise, J.C., 1992. Global Population Genetic Structure and Male-Mediated Gene Flow in the Green Turtle (*Chelonia Mydas*): RFLP Analyses of Anonymous Nuclear Loci. *Genetics* 131, 163–173.
- Kaska, Y., Çelik, A., Bag, H., Aureggi, M., Özel, K., Elçi, A., Kaska, A., 2004. Heavy metal monitoring in stranded sea turtles along the Mediterranean coast of Turkey.
- Kelly, R.P., Palumbi, S.R., 2010. Genetic Structure Among 50 Species of the Northeastern Pacific Rocky Intertidal Community. *PLOS ONE* 5, e8594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008594>
- Kichler, Holder, Davis, Márquez-M, Owens, 1999. Detection of multiple paternity in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling. *Mol. Ecol.* 8, 819–830. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00635.x>
- Kim, K.-H., Yoo, H.-S., Kobayashi, N., 2011. Mitigation of Beach Erosion after Coastal Road Construction. *J. Coast. Res.* 27, 645–651. <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-10-00114.1>

- Kitolelei, S., Soderberg, A., Qaqara, N., Prakash, S.S., Tuiono, M., Veitayaki, J., Piovano, S., 2022. Conservation status and cultural values of sea turtles leading to (un)written parallel management systems in Fiji. *Ambio* 51, 2431–2444. <https://doi.org/10.1007/s13280-022-01766-4>
- Kokko, H., Brooks, R., McNamara, J.M., Houston, A.I., 2002. The sexual selection continuum. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 269, 1331–1340. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2020>
- Komar, P.D., 1983. Coastal Erosion in Response to the Construction of Jetties and Breakwaters, in: *Handbook of Coastal Processes and Erosion*. CRC Press.
- Komoroske, L.M., Jensen, M.P., Stewart, K.R., Shamblin, B.M., Dutton, P.H., 2017. Advances in the Application of Genetics in Marine Turtle Biology and Conservation. *Front. Mar. Sci.* 4.
- Komoroske, L.M., Lewison, R.L., Seminoff, J.A., Deustchman, D.D., Deheyn, D.D., 2012. Trace metals in an urbanized estuarine sea turtle food web in San Diego Bay, CA. *Sci. Total Environ.* 417–418, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.12.018>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Laloë, J.-O., Monsinjon, J., Gaspar, C., Tournon, M., Genet, Q., Stubbs, J., Girondot, M., Hays, G.C., 2020. Production of male hatchlings at a remote South Pacific green sea turtle rookery: conservation implications in a female-dominated world. *Mar. Biol.* 167, 70. <https://doi.org/10.1007/s00227-020-03686-x>
- Laloë, J.-O., Tedeschi, J.N., Booth, D.T., Bell, I., Dunstan, A., Reina, R.D., Hays, G.C., 2021. Extreme rainfall events and cooling of sea turtle clutches: Implications in the face of climate warming. *Ecol. Evol.* 11, 560–565. <https://doi.org/10.1002/ece3.7076>
- Lara, I., Oyama, K., Cano-Camacho, H., Zavala Paramo, M., Vázquez- Marrufo, G., Chassin-Noria, O., 2010. Detecting patterns of fertilization and frequency of multiple paternity in *Chelonia mydas* of Colola (Michoacán, México). *Hidrobiol. Rev. Dep. Hidrobiol.* 20, 85–89.
- Leberg, P., 2005. Genetic Approaches for Estimating the Effective Size of Populations. *J. Wildl. Manag.* 69, 1385–1399. [https://doi.org/10.2193/0022-541X\(2005\)69\[1385:GAFETE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2193/0022-541X(2005)69[1385:GAFETE]2.0.CO;2)
- Lee, P.L.M., Hays, G.C., 2004. Polyandry in a marine turtle: Females make the best of a bad job. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 6530–6535. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307982101>
- Lee, P.L.M., Luschi, P., Hays, G.C., 2007. Detecting female precise natal philopatry in green turtles using assignment methods. *Mol. Ecol.* 16, 61–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03115.x>
- Lee, P.L.M., Schofield, G., Haughey, R.I., Mazaris, A.D., Hays, G.C., 2018. Chapter One - A Review of Patterns of Multiple Paternity Across Sea Turtle Rookeries, in: Sheppard, C. (Ed.), *Advances in Marine Biology*. Academic Press, pp. 1–31. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2017.09.004>
- Levine, B.A., Schuett, G.W., Booth, W., 2021. Exceptional long-term sperm storage by a female vertebrate. *PLOS ONE* 16, e0252049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252049>

- Lewison, R.L., Crowder, L.B., 2007. Putting Longline Bycatch of Sea Turtles into Perspective. *Conserv. Biol.* 21, 79–86.
- Li, Y.-C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453–2465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01643.x>
- Limpus, C., 2008. A biological review of Australian marine turtles. 2. Green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus). Rep. Qld. Environ. Prot. Agency.
- Limpus, C.J., 1993. The green turtle, *Chelonia mydas*, in Queensland: breeding males in the southern Great Barrier Reef. *Wildl. Res.* 20, 513–523. <https://doi.org/10.1071/wr9930513>
- Limpus, C.J., Limpus, D.J., Arthur, K.E., Parmenter, C.J., 2005. Monitoring green turtle population dynamics in Shoalwater Bay 2000–2004 (Report). Great Barrier Reef Marine Park Authority.
- Lin, G., Chang, A., Yap, H.W., Yue, G.H., 2008. Characterization and cross-species amplification of microsatellites from the endangered Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricate*). *Conserv. Genet.* 9, 1071–1073. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9459-z>
- Loisier, A., Savelli, M.-P., Arnal, V., Claro, F., Gambaiani, D., Sénégas, J.B., Cesarini, C., Sacchi, J., Miaud, C., Montgelard, C., 2021. Genetic composition, origin and conservation of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) frequenting the French Mediterranean coasts. *Mar. Biol.* 168, 52. <https://doi.org/10.1007/s00227-021-03855-6>
- López-Castro, M., Koch, V., Mariscal-Loza, A., Nichols, W., 2010. Long-term monitoring of black turtles *Chelonia mydas* at coastal foraging areas off the Baja California Peninsula. *Endanger. Species Res.* 11, 35–45. <https://doi.org/10.3354/esr00264>
- Lutcavage, M.E., 1996. Human Impacts on Sea Turtle Survival, in: *The Biology of Sea Turtles*, Volume I. CRC Press.
- Lutz, P.L., Musick, J.A., 1997. *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Maison, K., Kinan-Kelly, I., Frutchey, K., 2010. Green Turtle Nesting Sites and Sea Turtle Legislation throughout Oceania (Technical Memorandum No. NMFS-S/SPO-110). NOAA, Honolulu, Hawaii 96822, USA.
- Mancini, A., Phillott, A.D., Rees, A.F., 2019. *Chelonia mydas* (North Indian Ocean subpopulation). The IUCN Red List of Threatened Species. [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species. URL <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T142121108A154845002.en> (accessed 1.17.20).
- Mansfield, K.L., Mendilaharsu, M.L., Putman, N.F., dei Marcovaldi, M.A.G., Sacco, A.E., Lopez, G., Pires, T., Swimmer, Y., 2017. First satellite tracks of South Atlantic sea turtle ‘lost years’: seasonal variation in trans-equatorial movement. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284, 20171730. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1730>
- Mazaris, A.D., Matsinos, G., Pantis, J.D., 2009. Evaluating the impacts of coastal squeeze on sea turtle nesting. *Ocean Coast. Manag.* 52, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2008.10.005>
- Michalczyk, Ł., Millard, A.L., Martin, O.Y., Lumley, A.J., Emerson, B.C., Chapman, T., Gage, M.J.G., 2011. Inbreeding Promotes Female Promiscuity. *Science* 333, 1739–1742. <https://doi.org/10.1126/science.1207314>
- Miles, L.G., Lance, S.L., Isberg, S.R., Moran, C., Glenn, T.C., 2009. Cross-species amplification of microsatellites in crocodilians: assessment and applications for

- the future. *Conserv. Genet.* 10, 935–954. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9601-6>
- Miro-Herrans, A.T., Velez-Zuazo, X., Acevedo, J.P., Mcmillan, W.O., 2008. Isolation and characterization of novel microsatellites from the critically endangered hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Mol. Ecol. Resour.* 8, 1098–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02143.x>
- Molfetti, É., Vilaça, S.T., Georges, J.-Y., Plot, V., Delcroix, E., Scao, R.L., Lavergne, A., Barrioz, S., Santos, F.R. dos, Thoisy, B. de, 2013. Recent Demographic History and Present Fine-Scale Structure in the Northwest Atlantic Leatherback (*Dermochelys coriacea*) Turtle Population. *PLOS ONE* 8, e58061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058061>
- Monzón-Argüello, C., Muñoz, J., Marco, A., López-Jurado, L.F., Rico, C., 2008. Twelve new polymorphic microsatellite markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and cross-species amplification on other marine turtle species. *Conserv. Genet.* 9, 1045–1049. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9446-4>
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B., 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLOS Biol.* 9, e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>
- Moran, B.M., Anderson, E.C., 2019. Bayesian inference from the conditional genetic stock identification model. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 76, 551–560. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2018-0016>
- Moritz, C., 1994. Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9, 373–375. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90057-4)
- Mosier, A., Foley, A.M., Brost, B., 2002. Proceedings of the Twentieth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, 29 February Through 4 March 2000, Orlando, Florida, U.S.A. U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Southeast Fisheries Science Center.
- Moussa, R.M., Fogg, L., Bertucci, F., Calandra, M., Collin, A., Aubanel, A., Polti, S., Benet, A., Salvat, B., Galzin, R., Planes, S., Lecchini, D., 2019. Long-term coastline monitoring on a coral reef island (Moorea, French Polynesia). *Ocean Coast. Manag.* 180, 104928. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2019.104928>
- Musick, J.A., Limpus, C.J., 1997. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles, in: *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 137–163.
- Myers, N., 1979. The sinking ark. A new look at the problem of disappearing species. *Sink. Ark New Look Probl. Disappearing Species*.
- Naro-Maciel, E., Gaughran, S.J., Putman, N.F., Amato, G., Arengo, F., Dutton, P.H., McFadden, K.W., Vintinner, E.C., Sterling, E.J., 2014. Predicting connectivity of green turtles at Palmyra Atoll, central Pacific: a focus on mtDNA and dispersal modelling. *J. R. Soc. Interface* 11. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0888>
- Naro-Maciel, E., Le, M., FitzSimmons, N.N., Amato, G., 2008. Evolutionary relationships of marine turtles: A molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 659–662. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.08.004>
- Nei, M., 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press.
- Nishizawa, H., Abe, O., Okuyama, J., Kobayashi, M., Arai, N., 2011. Population genetic structure and implications for natal philopatry of nesting green turtles *Chelonia*

- mydas in the Yaeyama Islands, Japan. *Endanger. Species Res.* 14, 141–148. <https://doi.org/10.3354/esr00355>
- Nishizawa, H., Joseph, J., Chong, Y.K., Syed Kadir, S.A., Isnain, I., Ganyai, T.A., Jaaman, S., Zhang, X., 2018. Comparison of the rookery connectivity and migratory connectivity: insight into movement and colonization of the green turtle (*Chelonia mydas*) in Pacific–Southeast Asia. *Mar. Biol.* 165, 77. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3328-9>
- Nishizawa, H., Naito, Y., Suganuma, H., Abe, O., Okuyama, J., Hirate, K., Tanaka, S., Inoguchi, E., Narushima, K., Kobayashi, K., Ishii, H., Tanizaki, S., Kobayashi, M., Goto, A., Arai, N., 2013. Composition of green turtle feeding aggregations along the Japanese archipelago: Implications for changes in composition with current flow. *Mar. Biol.* 160. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2261-1>
- Owens, D.Wm., 1980. The Comparative Reproductive Physiology of Sea Turtles. *Am. Zool.* 20, 549–563.
- Pankaew, K., Milton, S.L., 2018. The effects of extended crawling on the physiology and swim performance of loggerhead and green sea turtle hatchlings. *J. Exp. Biol.* 221, jeb165225. <https://doi.org/10.1242/jeb.165225>
- Patrício, A.R., Formia, A., Barbosa, C., Broderick, A.C., Bruford, M., Carreras, C., Catry, P., Ciofi, C., Regalla, A., Godley, B.J., 2017. Dispersal of green turtles from Africa's largest rookery assessed through genetic markers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 569, 215–225. <https://doi.org/10.3354/meps12078>
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6, 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Pearse, D.E., Avise, J.C., 2001. Turtle Mating Systems: Behavior, Sperm Storage, and Genetic Paternity. *J. Hered.* 92, 206–211. <https://doi.org/10.1093/jhered/92.2.206>
- Peckham, S.H., Diaz, D.M., Walli, A., Ruiz, G., Crowder, L.B., Nichols, W.J., 2007. Small-Scale Fisheries Bycatch Jeopardizes Endangered Pacific Loggerhead Turtles. *PLOS ONE* 2, e1041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001041>
- Pelé, J., Bécu, J.-M., Abdi, H., Chabbert, M., 2012. Bios2mds: an R package for comparing orthologous protein families by metric multidimensional scaling. *BMC Bioinformatics* 13, 133. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-133>
- Petit, M., Gaspar, C., Besson, M., Bignon, F., 2012. Suivi des pontes de tortues vertes sur l'atoll de Tetiaroa (saison 2011-2012) et évaluation des populations de tortues marines sur la pente externe de Moorea. *Te mana o te moana*.
- Pew, J., Muir, P.H., Wang, J., Frasier, T.R., 2015. related: an R package for analysing pairwise relatedness from codominant molecular markers. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 557–561. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12323>
- Peyran, C., Planes, S., Tolou, N., Iwankow, G., Boissin, E., 2020. Development of 26 highly polymorphic microsatellite markers for the highly endangered fan mussel *Pinna nobilis* and cross-species amplification. *Mol. Biol. Rep.* 47, 2551–2559. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05338-1>
- Phillips, K.F., Stahelin, G.D., Chabot, R.M., Mansfield, K.L., 2021. Long-term trends in marine turtle size at maturity at an important Atlantic rookery. *Ecosphere* 12, e03631. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3631>

- Phillips, K.P., Jorgensen, T.H., Jolliffe, K.G., Jolliffe, S.-M., Henwood, J., Richardson, D.S., 2013. Reconstructing paternal genotypes to infer patterns of sperm storage and sexual selection in the hawksbill turtle. *Mol. Ecol.* 22, 2301–2312. <https://doi.org/10.1111/mec.12235>
- Phillips, K.P., Jorgensen, T.H., Jolliffe, K.G., Richardson, D.S., 2017. Evidence of opposing fitness effects of parental heterozygosity and relatedness in a critically endangered marine turtle? *J. Evol. Biol.* 30, 1953–1965. <https://doi.org/10.1111/jeb.13152>
- Pilcher, N.J., 2021. A Review of the Status of Sea Turtles in the Pacific Ocean 2021. Secretariat of the Pacific Region Environment Programme (SPREP), Samoa.
- Piovano, S., Batibasaga, A., Ciriya, A., LaCasella, E.L., Dutton, P.H., 2019. Mixed stock analysis of juvenile green turtles aggregating at two foraging grounds in Fiji reveals major contribution from the American Samoa Management Unit. *Sci. Rep.* 9, 3150. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39475-w>
- Plummer, M., Best, N., Cowles, K., Vines, K., 2006. CODA: convergence diagnosis and output analysis for MCMC. *R News* 6, 7–11.
- Prakash, S.S., Lal, M.M., Dutton, P.H., Rico, C., Piovano, S., 2022. Kinship genomics approach to study mating systems in a depleted sea turtle rookery. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 51, 102174. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2022.102174>
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- R Core Team, 2022. R: A language and Environment for Statistical Computing.
- Read, T.C., FitzSimmons, N.N., Wantiez, L., Jensen, M.P., Keller, F., Chateau, O., Farman, R., Werry, J., MacKay, K.T., Petro, G., Limpus, C.J., 2015. Mixed stock analysis of a resident green turtle, *Chelonia mydas*, population in New Caledonia links rookeries in the South Pacific. *Wildl. Res.* 42, 488–499. <https://doi.org/10.1071/WR15064>
- Read, T.C., Wantiez, L., Werry, J.M., Farman, R., Petro, G., Limpus, C.J., 2014. Migrations of Green Turtles (*Chelonia mydas*) between Nesting and Foraging Grounds across the Coral Sea. *PLOS ONE* 9, e100083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100083>
- Reece, J.S., Castoe, T.A., Parkinson, C.L., 2005. Historical perspectives on population genetics and conservation of three marine turtle species. *Conserv. Genet.* 6, 235–251. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-7821-y>
- Reid, B.N., Naro-Maciel, E., Hahn, A.T., FitzSimmons, N.N., Gehara, M., 2019. Geography best explains global patterns of genetic diversity and postglacial co-expansion in marine turtles. *Mol. Ecol.* 28, 3358–3370. <https://doi.org/10.1111/mec.15165>
- Roberts, M.A., Schwartz, T.S., Karl, S.A., 2004. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green sea turtle (*Chelonia mydas*): analysis of microsatellite loci. *Genetics* 166, 1857–1870.
- Robinson, N.J., Sanfèlix, M.M., Blanco, G.S., Clyde-Brockway, C., Hill, J.E., Paladino, F.V., Tomás, J., Tomillo, P.S., 2022. Effect of water temperature on the duration of the interesting interval across sea turtle species. *J. Therm. Biol.* 110, 103342. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103342>
- Roden, S.E., Morin, P.A., Frey, A., Balazs, G.H., Zarate, P., Cheng, I.J., Dutton, P.H., 2013. Green turtle population structure in the Pacific: new insights from single

- nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Endanger. Species Res.* 20, 227–234.
- Rudrud, R.W., 2010. Forbidden Sea Turtles: Traditional Laws Pertaining to Sea Turtle Consumption in Polynesia (Including the Polynesian Outliers). *Conserv. Soc.* 8, 84–97.
- Ruiz-Urquiola, A., Riverón-Giró, F., Pérez-Bermudez, E., Abreu-Grobois, A., González, M., James-Petric, B.L., Díaz-Fernandez, R., Álvarez-Castro, J.M., Jager, M., Espinosa-Lopez, G., 2010. Population genetic structure of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) based on mitochondrial DNA sequences, with an emphasis on rookeries from southwestern Cuba. *Rev. Investig. Mar.* 31, 33–52.
- Runge, C.A., Watson, J.E.M., Butchart, S.H.M., Hanson, J.O., Possingham, H.P., Fuller, R.A., 2015. Protected areas and global conservation of migratory birds. *Science* 350, 1255–1258. <https://doi.org/10.1126/science.aac9180>
- Sakaoka, K., Sakai, F., Yoshii, M., Okamoto, H., Nagasawa, K., 2013. Estimation of sperm storage duration in captive loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 439, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.11.001>
- Sakaoka, K., Yoshii, M., Okamoto, H., Sakai, F., Nagasawa, K., 2011. Sperm Utilization Patterns and Reproductive Success in Captive Loggerhead Turtles (*Caretta caretta*). *Chelonian Conserv. Biol.* 10, 62–72. <https://doi.org/10.2744/CCB-0878.1>
- Santidrián Tomillo, P., Oro, D., Paladino, F.V., Piedra, R., Sieg, A.E., Spotila, J.R., 2014. High beach temperatures increased female-biased primary sex ratios but reduced output of female hatchlings in the leatherback turtle. *Biol. Conserv.* 176, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.05.011>
- Schaeffer, S.W., Walthour, C.S., Toleno, D.M., Olek, A.T., Miller, E.L., 2001. Protein variation in *Adh* and *Adh*-related in *Drosophila pseudoobscura*. Linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms and protein alleles. *Genetics* 159, 673–687.
- Schuyler, Q., Hardesty, B.D., Wilcox, C., Townsend, K., 2012. To Eat or Not to Eat? Debris Selectivity by Marine Turtles. *PLOS ONE* 7, e40884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040884>
- Schuyler, Q.A., Wilcox, C., Townsend, K.A., Wedemeyer-Strombel, K.R., Balazs, G., van Sebille, E., Hardesty, B.D., 2016. Risk analysis reveals global hotspots for marine debris ingestion by sea turtles. *Glob. Change Biol.* 22, 567–576. <https://doi.org/10.1111/gcb.13078>
- Selkoe, K.A., Gaggiotti, O.E., Laboratory, T., Bowen, B.W., Toonen, R.J., 2014. Emergent patterns of population genetic structure for a coral reef community. *Mol. Ecol.* 23, 3064–3079. <https://doi.org/10.1111/mec.12804>
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9, 615–629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
- Seminoff, J.A., 2004. *Chelonia mydas*. The IUCN Red List of Threatened Species. [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species. URL <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T4615A11037468.en>. (accessed 1.17.20).
- Seminoff, J.A., Balazs, G.H., Dutton, P.H., Eguchi, T., Haas, H.L., Hargrove, S.A., Klemm, D.L., Lauritsen, A.M., MacPherson, S.L., Opay, P., Possardt, E.E., 2015. Status review of

- the green turtle (*Chelonia mydas*) under the U.S. Endangered Species Act. (Technical Memorandum No. NOAA-NMFS-SWFSC-539). NOAA.
- Senko, J.F., Burgher, K.M., del Mar Mancha-Cisneros, M., Godley, B.J., Kinan-Kelly, I., Fox, T., Humber, F., Koch, V., Smith, A.T., Wallace, B.P., 2022. Global patterns of illegal marine turtle exploitation. *Glob. Change Biol.* 28, 6509–6523. <https://doi.org/10.1111/gcb.16378>
- Shamblin, B.M., Bagley, D.A., Ehrhart, L.M., Desjardin, N.A., Martin, R.E., Hart, K.M., Naro-Maciel, E., Rusenko, K., Stiner, J.C., Sobel, D., Johnson, C., Wilmers, T.J., Wright, L.J., Nairn, C.J., 2015a. Genetic structure of Florida green turtle rookeries as indicated by mitochondrial DNA control region sequences. *Conserv. Genet.* 16, 673–685. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0692-y>
- Shamblin, B.M., Berry, B.E., Lennon, D.M., Bagley, D.A., Ehrhart, L.M., Nairn, C.J., 2012a. Tetranucleotide microsatellite loci from the endangered green turtle (*Chelonia mydas*). *Conserv. Genet. Resour.* 4, 783–785. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9643-4>
- Shamblin, B.M., Berry, B.E., Lennon, D.M., Meylan, A.B., Meylan, P.A., Outerbridge, M.E., Nairn, C.J., 2013. Tetranucleotide microsatellite loci from the critically endangered hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Conserv. Genet. Resour.* 5, 23–26. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9720-8>
- Shamblin, B.M., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Hillis-Starr, Z.M., Lundgren, I., Naro-Maciel, E., Nairn, C.J., 2012b. Mitogenomic sequences better resolve stock structure of southern Greater Caribbean green turtle rookeries. *Mol. Ecol.* 21, 2330–2340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05530.x>
- Shamblin, B.M., Dutton, P.H., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Naro-Maciel, E., Santos, A.J.B., Bellini, C., Baptistotte, C., Marcovaldi, M.Â., Nairn, C.J., 2015b. Deeper Mitochondrial Sequencing Reveals Cryptic Diversity and Structure in Brazilian Green Turtle Rookeries. *Chelonian Conserv. Biol.* 14, 167–172. <https://doi.org/10.2744/CCB-1152.1>
- Shamblin, B.M., Faircloth, B.C., Dodd, M.G., Bagley, D.A., Ehrhart, L.M., Dutton, P.H., Frey, A., Nairn, C.J., 2009. Tetranucleotide markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and their cross-amplification in other marine turtle species. *Conserv. Genet.* 10, 577–580. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9573-6>
- Shamblin, B.M., Hart, K.M., Martin, K.J., Ceriani, S.A., Bagley, D.A., Mansfield, K.L., Ehrhart, L.M., Nairn, C.J., 2020. Green turtle mitochondrial microsatellites indicate finer-scale natal homing to isolated islands than to continental nesting sites. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 643, 159–171. <https://doi.org/10.3354/meps13348>
- Sharma, R., Kumar, B., Arora, R., Ahlawat, S., Mishra, A.K., Tantia, M.S., 2016. Genetic diversity estimates point to immediate efforts for conserving the endangered Tibetan sheep of India. *Meta Gene* 8, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2016.01.002>
- Shields, W.M., 1982. Philopatry, Inbreeding, and the Evolution of Sex. State University of New York Press.
- Shimada, T., Duarte, C.M., Al-Suwailem, A.M., Tanabe, L.K., Meekan, M.G., 2021. Satellite Tracking Reveals Nesting Patterns, Site Fidelity, and Potential Impacts of Warming on Major Green Turtle Rookeries in the Red Sea. *Front. Mar. Sci.* 8.
- Silver-Gorges, I., Koval, J., Rodriguez-Zarate, C.J., Paladino, F.V., Jordan, M., 2020. Large-scale connectivity, cryptic population structure, and relatedness in Eastern

- Pacific Olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*). *Ecol. Evol.* 10, 8688–8704. <https://doi.org/10.1002/ece3.6564>
- Soulé, M.E., 1987. *Viable Populations for Conservation*. Cambridge University Press.
- Spotila, J.R., 2004. *Sea Turtles: A Complete Guide to Their Biology, Behavior, and Conservation* [Hardcover]. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Standora, E.A., Spotila, J.R., 1985. Temperature Dependent Sex Determination in Sea Turtles. *Copeia* 1985, 711–722. <https://doi.org/10.2307/1444765>
- Stewart, K.R., Dutton, P.H., 2014. Breeding Sex Ratios in Adult Leatherback Turtles (*Dermochelys coriacea*) May Compensate for Female-Biased Hatchling Sex Ratios. *PLOS ONE* 9, e88138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088138>
- Stoeckel, S., Grange, J., Fernández-Manjarres, J.F., Bilger, I., Frascaria-Lacoste, N., Mariette, S., 2006. Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species -- *Prunus avium* L. *Mol. Ecol.* 15, 2109–2118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02926.x>
- Sugg, D.W., Chesser, R.K., 1994. Effective population sizes with multiple paternity. *Genetics* 137, 1147–1155. <https://doi.org/10.1093/genetics/137.4.1147>
- Summers, T.M., Martin, S.L., Hapdei, J.R., Ruak, J.K., Jones, T.T., 2018. Endangered Green Turtles (*Chelonia mydas*) of the Northern Mariana Islands: Nesting Ecology, Poaching, and Climate Concerns. *Front. Mar. Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00428>
- Svedäng, H., André, C., Jonsson, P., Elfman, M., Limburg, K.E., 2010. Migratory behaviour and otolith chemistry suggest fine-scale sub-population structure within a genetically homogenous Atlantic Cod population. *Environ. Biol. Fishes* 89, 383–397. <https://doi.org/10.1007/s10641-010-9669-y>
- SWOT Scientific Advisory Board, 2011. *SWOT Report - Stat of the World's Sea Turtles (No. IV)*. USA.
- Szulkin, M., Stopher, K.V., Pemberton, J.M., Reid, J.M., 2013. Inbreeding avoidance, tolerance, or preference in animals? *Trends Ecol. Evol.* 28, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.016>
- Tanabe, L.K., Ellis, J., Elsadek, I., Berumen, M.L., 2020. Potential feminization of Red Sea turtle hatchlings as indicated by in situ sand temperature profiles. *Conserv. Sci. Pract.* 2, e266. <https://doi.org/10.1111/csp2.266>
- Tardy, C., Planes, S., Jung, J.-L., Ody, D., Boissin, E., 2020. Characterization of 25 new microsatellite markers for the fin whale (*Balaenoptera physalus*) and cross-species amplification in other cetaceans. *Mol. Biol. Rep.* 47, 6983–6996. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05757-0>
- Tayalé, A., 2007. Etude de la saison de ponte des tortues marines 2007-2008 sur l'île de Tikohau. association Te honu tea.
- Taylor, M.L., Price, T.A.R., Wedell, N., 2014. Polyandry in nature: a global analysis. *Trends Ecol. Evol.* 29, 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.005>
- The IUCN Red List of Threatened Species [WWW Document], 2023. . IUCN Red List Threat. Species. URL <https://www.iucnredlist.org/en> (accessed 3.31.23).
- Theissinger, K., FitzSimmons, N.N., Limpus, C.J., Parmenter, C.J., Phillott, A.D., 2009. Mating system, multiple paternity and effective population size in the endemic flatback turtle (*Natator depressus*) in Australia. *Conserv. Genet.* 10, 329–346. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9583-4>

- Thomson, J.A., Heithaus, M.R., 2014. Animal-borne video reveals seasonal activity patterns of green sea turtles and the importance of accounting for capture stress in short-term biologging. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Charismatic marine mega-fauna* 450, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.10.020>
- Tikochinski, Y., Bendelac, R., Barash, A., Daya, A., Levy, Y., Friedmann, A., 2012. Mitochondrial DNA STR analysis as a tool for studying the green sea turtle (*Chelonia mydas*) populations: The Mediterranean Sea case study. *Mar. Genomics* 6, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2012.01.002>
- Torres-Rodriguez, J., Hernandez, L., Bernal Gutiérrez, J., Pabón-Aldana, K., Jaúregui, A., Pérez, O., 2017. Successful Use of Buccal Swabs to obtain Genetic Material from Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*). *Mar. Turt. Newsl.* 1–3.
- Touron, M., Genet, Q., Gaspar, C., 2018. Final report on the green sea turtle egg-laying season of 2017-2018 (*Chelonia mydas*) on the atoll of Tetiaroa. *Assoc. Te Mana O Te Moana* 54.
- Tribe, A., Booth, R., 2003. Assessing the Role of Zoos in Wildlife Conservation. *Hum. Dimens. Wildl.* 8, 65–74. <https://doi.org/10.1080/10871200390180163>
- Trontti, K., Aron, S., Sundström, L., 2005. Inbreeding and kinship in the ant *Plagiolepis pygmaea*. *Mol. Ecol.* 14, 2007–2015. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02529.x>
- Van Cise, A.M., Baird, R.W., Baker, C.S., Cerchio, S., Claridge, D., Fielding, R., Hancock-Hanser, B., Marrero, J., Martien, K.K., Mignucci-Giannoni, A.A., Oleson, E.M., Oremus, M., Poole, M.M., Rosel, P.E., Taylor, B.L., Morin, P.A., 2019. Oceanographic barriers, divergence, and admixture: Phylogeography and taxonomy of two putative subspecies of short-finned pilot whale. *Mol. Ecol.* 28, 2886–2902. <https://doi.org/10.1111/mec.15107>
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Vargas, S.M., Barcelos, A.C., Rocha, R.G., Guimarães, P., Amorim, L., Martinelli, A., Santos, F.R., Erickson, J., Marcondes, A.C.J., Ludwig, S., 2022. Genetic monitoring of the critically endangered leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) in the South West Atlantic. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 55, 102530. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2022.102530>
- Verheijen, F.J., Wildschut, J.T., 1973. The photic orientation of hatchling sea turtles during water finding behaviour. *Neth. J. Sea Res.* 7, 53–67. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(73\)90032-X](https://doi.org/10.1016/0077-7579(73)90032-X)
- Viaud-Martinez, K.A., Brownell, R.L., Komnenou, A., Bohonak, A.J., 2008. Genetic isolation and morphological divergence of Black Sea bottlenose dolphins. *Biol. Conserv.* 141, 1600–1611. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.04.004>
- Viricel, A., Rosel, P.E., 2014. Hierarchical population structure and habitat differences in a highly mobile marine species: the Atlantic spotted dolphin. *Mol. Ecol.* 23, 5018–5035. <https://doi.org/10.1111/mec.12923>
- Vucher-Visin, J., Petit, M., Brasseur, S., 2010. 1er Symposium international sur les tortues marines en Polynésie française (Symposium). Moorea.
- Wallace, B.P., DiMatteo, A.D., Bolten, A.B., Chaloupka, M.Y., Hutchinson, B.J., Abreu-Grobois, F.A., Mortimer, J.A., Seminoff, J.A., Amorcho, D., Bjørndal, K.A., Bourjéa, J., Bowen, B.W., Dueñas, R.B., Casale, P., Choudhury, B.C., Costa, A., Dutton, P.H.,

- Fallabrino, A., Finkbeiner, E.M., Girard, A., Girondot, M., Hamann, M., Hurley, B.J., López-Mendilaharsu, M., Marcovaldi, M.A., Musick, J.A., Nel, R., Pilcher, N.J., Troëng, S., Witherington, B., Mast, R.B., 2011. Global Conservation Priorities for Marine Turtles. *PLOS ONE* 6, e24510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024510>
- Wallace, B.P., DiMatteo, A.D., Hurley, B.J., Finkbeiner, E.M., Bolten, A.B., Chaloupka, M.Y., Hutchinson, B.J., Abreu-Grobois, F.A., Amoroch, D., Bjørndal, K.A., Bourjea, J., Bowen, B.W., Dueñas, R.B., Casale, P., Choudhury, B.C., Costa, A., Dutton, P.H., Fallabrino, A., Girard, A., Girondot, M., Godfrey, M.H., Hamann, M., López-Mendilaharsu, M., Marcovaldi, M.A., Mortimer, J.A., Musick, J.A., Nel, R., Pilcher, N.J., Seminoff, J.A., Troëng, S., Witherington, B., Mast, R.B., 2010. Regional Management Units for Marine Turtles: A Novel Framework for Prioritizing Conservation and Research across Multiple Scales. *PLOS ONE* 5, e15465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015465>
- Wang, H., Yan, P., Zhang, S., Sun, L., Ren, M., Xue, H., Zhang, F., Wu, R., Wu, X., 2017. Multiple paternity: A compensation mechanism of the Chinese alligator for inbreeding. *Anim. Reprod. Sci.* 187, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.10.016>
- Wang, J., 2016. Individual identification from genetic marker data: developments and accuracy comparisons of methods. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 163–175. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12452>
- While, G.M., Uller, T., Bordogna, G., Wapstra, E., 2014. Promiscuity resolves constraints on social mate choice imposed by population viscosity. *Mol. Ecol.* 23, 721–732. <https://doi.org/10.1111/mec.12618>
- Whitaker, N., 2006. IMMACULATE CONCEPTION, INCUBATION PROTOCOLS, AND EGG CHARACTERISTICS OF THE GANGES SOFTSHELL TURTLE (*ASPIDERETES GANGETICUS*). *Contemp. Herpetol.* 1–6. <https://doi.org/10.17161/ch.vi1.11938>
- Wibbels, T., Owens, D.Wm., Limpus, C.J., Reed, P.C., Amoss, M.S., 1990. Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating, and nesting in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 154–164. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90099-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90099-8)
- Woodruff, D.S., 2001. Declines of biomes and biotas and the future of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 5471–5476. <https://doi.org/10.1073/pnas.101093798>
- Wright, L.I., Fuller, W.J., Godley, B.J., McGowan, A., Tregenza, T., Broderick, A.C., 2013. No benefits of polyandry to female green turtles. *Behav. Ecol.* 24, 1022–1029. <https://doi.org/10.1093/beheco/art003>
- Wright, L.I., Fuller, W.J., Godley, B.J., McGOWAN, A., Tregenza, T., Broderick, A.C., 2012a. Reconstruction of paternal genotypes over multiple breeding seasons reveals male green turtles do not breed annually. *Mol. Ecol.* 21, 3625–3635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05616.x>
- Wright, L.I., Stokes, K.L., Fuller, W.J., Godley, B.J., McGowan, A., Snape, R., Tregenza, T., Broderick, A.C., 2012b. Turtle mating patterns buffer against disruptive effects of climate change. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 2122–2127. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2285>
- Wyneken, J., Lohmann, K.J., Musick, J.A. (Eds.), 2013. Natal Homing and Imprinting in Sea Turtles, in: *The Biology of Sea Turtles, Volume III*. CRC Press.
- Ye, M., Chen, H., Li, M., Duan, J., Li, P., 2020. Observations on the Courtship and Mating Behavior of Captive Green Turtles (*Chelonia mydas*). *Herpetol. Conserv. Biol.*

- Yumnam, B., Jhala, Y.V., Qureshi, Q., Maldonado, J.E., Gopal, R., Saini, S., Srinivas, Y., Fleischer, R.C., 2014. Prioritizing Tiger Conservation through Landscape Genetics and Habitat Linkages. PLOS ONE 9, e111207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111207>
- Zarate, P.M., 2013. BIOLOGY OF THE GREEN TURTLE CHELONIA MYDAS IN THE GALÁPAGOS ISLANDS. University of Florida, Florida.
- Zardoya, R., 2020. Recent advances in understanding mitochondrial genome diversity. F1000Research 9, F1000 Faculty Rev-270. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21490.1>
- Zbinden, J.A., Davy, C., Margaritoulis, D., Arlettaz, R., 2007. Large spatial variation and female bias in the estimated sex ratio of loggerhead sea turtle hatchlings of a Mediterranean rookery. Endanger. Species Res. 3, 305–312. <https://doi.org/10.3354/esr00058>
- Zeh, J.A., Zeh, D.W., 1997. The evolution of polyandry II: post-copulatory defenses against genetic incompatibility. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 264, 69–75. <https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0010>
- Zolgharnein, H., Salari Aliabadi, M. a., Forougmand, A. m., Roshani, S., 2011. Genetic Population Structure Of Hawksbill Turtle (Eretmochelys Imbricata) Using Microsatellite Analysis 9, 56–62.

Annexes

ANNEXE I : CARTOGRAPHIE DES SITES DE PONTE DES TORTUES VERTES DANS LE MONDE (SWOT, 2011).

ANNEXE II : CARTE DES DEUX SITES DE TERRAIN VISITÉS : TETIAROA ET MOPELIA.

ANNEXE III : CAHIER DES CHARGES POUR LA CRÉATION DE LA BASE DE DONNÉES

ANNEXE IV : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE II

ANNEXE V : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE III

ANNEXE VI : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE IV

ANNEXE VII : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE V

I. ANNEXE I : CARTOGRAPHIE DES SITES DE PONTE DES TORTUES VERTES DANS LE MONDE (SWOT, 2011)



II. ANNEXE II : CARTE DES DEUX SITES DE TERRAIN VISITÉS : TETIAROA ET MOPELIA

Tetiaroa, image satellite provenant de Google Earth



Mopelia, image satellite provenant de Google Earth



III. ANNEXE III : CAHIER DES CHARGES POUR LA CRÉATION DE LA BASE DE DONNÉES

Preamble

J'ai rédigé ce cahier des charges afin de répondre à la demande de la DIREN de répertorier toutes les données relatives aux individus de tortue verte échantillonnés en Polynésie française. Ce cahier a servi comme base de concertation pour la conception de la base de données, puis comme base de travail pour sa construction.

Création d'une base de données des échantillons de tortue verte *Chelonia mydas*

Cahier des charges

Direction : Serge Planes et Émilie Boissin

Rédactrice : Violaine Dolfo

Client : Direction de l'Environnement de Polynésie

Version 2 – 23 Mars 2020

I. Présentation du projet

1. Contexte et objectifs :

Depuis plusieurs années la DIREN mène des campagnes d'échantillonnage de la tortue verte *Chelonia mydas* en Polynésie Française qui ont permis de récolter plusieurs milliers d'échantillons, ce qui représente un effort unique et inégalé dans cette région du monde. Dans le cadre de la valorisation de ces échantillons par les analyses génétiques par le CRILOBE, il est important de les référencer et stocker de manière systématique afin de permettre une utilisation et un stockage organisé et pérenne.

Le présent projet consiste donc en la réalisation d'une base de données répertoriant les échantillons de *C. mydas* récoltés en Polynésie Française par la DIREN, ainsi que l'état d'avancement de leurs analyses génétiques.

2. Situation existante :

Il n'existe à ce jour aucune base de données informatisée des échantillons de *C. mydas* dans le réseau de la DIREN, la création se fera *de novo*. Les échantillons recensés et les données terrain associées sont saisis sous format Excel, et l'intitulé des colonnes n'est pas commun à tous les fichiers traités. Nous avons pris en considération les champs existants sous Excel relatifs aux caractéristiques des individus échantillonnés dans la conception de la base de données.^[1] La base de données permettra l'importation des fichiers .csv issus de ces tableaux.

3. Identification et besoins des utilisateurs :

Dans le cadre de l'utilisation de la base de données, la DIREN et le CRILOBE sont les seuls utilisateurs. Ces utilisateurs auront besoin de :

- Importer des données en ajoutant des entrées (ie. nouveaux échantillons). Cette option se fera par le CRILOBE par un accès direct à la base de données ;
- Mettre à jour les caractéristiques des entrées (ex. état d'avancement des analyses génétiques). Cette action sera effectuée uniquement par le CRILOBE et se fera par un accès direct à la base de données.
- Consulter et utiliser la base de données. Cette option pourra être effectuée par la DIREN et le CRILOBE, la base de données sera accessible à la consultation en accès privé sur le site internet du CRILOBE.

Au sein du CRILOBE, uniquement l'équipe chargée de projet et le service informatique ont accès à la base de données.

Le « Modèle Conceptuel de Communication » qui indique les actions effectuées par chaque acteur se présente donc sous le schéma suivant :

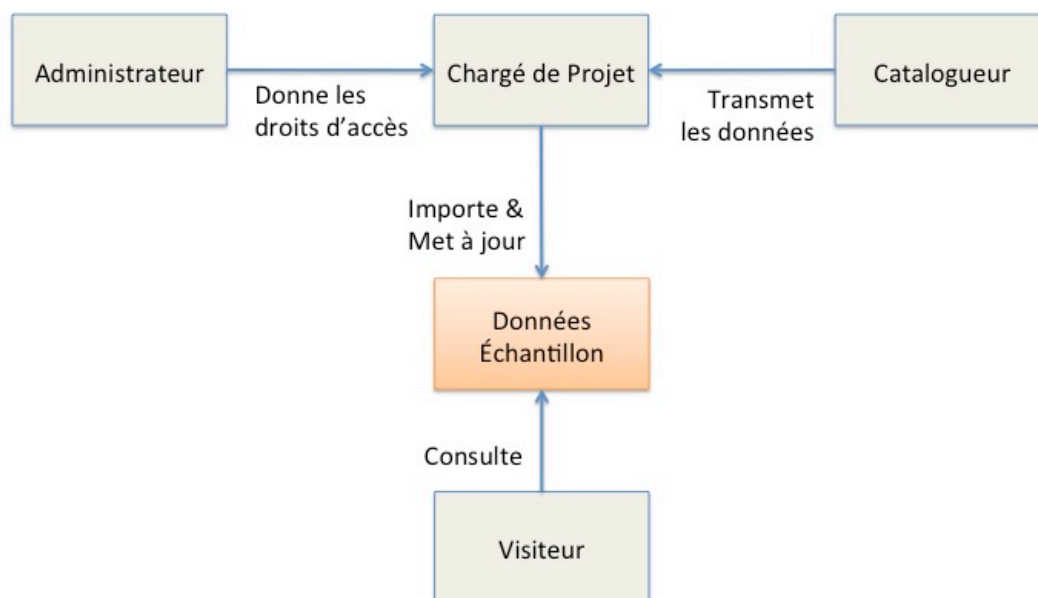


Figure I.1 Modèle Conceptuel de Communication

Dans ce schéma, l'Administrateur est le service informatique du CRILOBE, le Catalogueur est le personnel de la DIREN qui transmet les données des échantillons au CRILOBE, le Chargé de Projet est la personne du CRILOBE chargée des analyses génétiques, qui importera les données et mettra à jour les entrées avec les résultats de ces analyses, et le Visiteur est le personnel de la DIREN qui consulte la base de données. À noter que dans ce projet, le chargé de projet est aussi le créateur de la base de données.

4. Ce que le projet prend en compte :

- Les données de terrain associées aux échantillons de *C. mydas* récoltés
- Les données d'analyse génétique associées aux échantillons récoltés

5. Ce que le projet ne prend pas en compte :

- ☐ Les observations de *C. mydas* sans échantillon associé
- ☐ Les observations d'autres espèces que *C. mydas*
- ☐ Les échantillons fournis au CRIOBE par d'autres organismes que la DIREN
- ☐ Les échantillons d'une autre provenance que la Polynésie Française
- ☐ Les interprétations issues de l'analyse des échantillons (celles-ci feront l'objet de différents rapports)

II. Contraintes techniques

La base de données sera hébergée sur le serveur du CRIOBE. Elle doit prendre en considération et être compatible avec le serveur web du CRIOBE.

1. Caractéristiques du serveur web du CRIOBE :

- Serveur web: Apache HTTP Server 2.4.41
- Moteur php: php-7.4.0 ^[L]_[SEP]
- SGBD: MySQL 5.7.28 et phpMyAdmin 4.7.5 ^[L]_[SEP]

2. Sécurité et sauvegarde :

Le service informatique du CRIOBE fournira le serveur pour l'hébergement de la base de données et assurera sa sécurité.

Une double sauvegarde (Backup) sera effectuée, à la charge du service informatique du CRIOBE. Une sauvegarde sera hébergée sur les serveurs du CRIOBE de Perpignan, une autre sur les serveurs du CRIOBE de Moorea. Une troisième sauvegarde sera transmise à la DIREN.

3. Accès à la base de données :

L'accès à la base de données se fera par une interface web sur le site du CRIOBE, en lecture seule uniquement (pas de modification possible par internet).

III. Etude des données

1. Modèle Conceptuel de Données (MDC)

Le modèle conceptuel de données est un outil simple qui permet de concevoir la base de données. Il permet de construire un modèle relationnel qui facilite la conception de la structure de la base de données relationnelle. Le MDC de la future base de données se compose de 4 « entités », 4 « associations », et 38 « propriétés ».

a. Dictionnaire de données

Les données qui composeront les 38 « propriétés » du MDC sont décrites dans le dictionnaire des données ci-dessous.

Table I.1 Dictionnaire de données. N : numérique, A : alphabétique, AN : alphanumérique.

Code	Désignation	Type	Taille	Remarque
id_ech	Identification numérique d'un échantillon	N		
num_ech	Numéro d'échantillon donné sur le terrain	AN	50	
barcode	Barcode de l'échantillon	AN	100	Libellé échantillon rangement
num_boite	Numéro de la boîte où est stocké l'échantillon	AN	50	
analyse	Etat d'avancement de l'analyse	A	50	Choix : ADN extrait –séquencé – génotypé – séquencé + génotypé – non traité – erreur séquençage – erreur génotypage
qual_ADN	Qualité de l'ADN	A	20	Choix : Bon - mauvais
res_seq	Résultat séquençage	A	1000	nom de l'haplotype ou séquence si pas de nom disponible
res_gen	Résultat génotypage : génotype	AN	1000	Génotype
com_ech	Commentaires sur les analyses	AN	500	
id_ind	Identification numérique d'un individu	N		
nom_ind	Nom donné à l'individu	A	50	
sexe	Sexe	A	1	Choix : F (femelle) – M (mâle) – I (Indéterminé)
age	Classe d'âge	A	3	Choix : ADU (adulte) – JUV (juvénile) – EME (Emergente) – EMB (Embryon) - IND (indéterminé)
long_car	Longueur de la carapace	N	4	En cm, longueur de la carapace (CCL)
larg_car	Largeur de la carapace	N	4	En cm, largeur de la carapace
poids	Poids	N	6	En kg
statut	Etat de santé	A	10	Choix : vivante – morte

contexte	Contexte de l'échantillonnage	A	50	Choix : ponte – tentative de ponte – en descente – en montée – émergence – émergente secourue – clinique – échouage – excavation - autre
bague_G_D_1	Numéros de bagues gauche_droite	AN	50	Si individu bagué
bague_G_D_2	Numéros de bagues gauche_droite	AN	50	Si individu re-bagué quand les premières sont tombées
balise	Numéro balise Argos	AN	50	Si individu tagué
lieu_origine	Nom de l'île d'origine de l'individu	A	50	Remplir si différent du lieu d'échantillonnage. Remplir « inconnu » si lieu inconnu
lieu_ech	Lieu d'échantillonnage	A	50	Lieu où l'échantillon a été pris
date_ech	Date d'échantillonnage	Date	10	Au format AAAA-MM-JJ
com_ind	Commentaires sur l'individu et l'observation	AN	500	
id_nid	Identifiant numérique d'un nid	N		
num_nid	Numéro de nid donné sur le terrain	AN	50	
coord_X	Coordonnée GPS X des nids	AN	20	En degrés décimaux, système WGS84
coord_Y	Coordonnée GPS Y des nids	AN	20	En degrés décimaux, système WGS84
lle_ponte	Ile de ponte	A	50	
lieu_ponte	lieu de ponte	A	50	Précisions sur le lieu de ponte (motu, précision géographique, etc.)
date_eclo	Date d'éclosion pour un nouveau-né	Date	10	Au format AAAA-MM-JJ
h_eclo	Heure de l'éclosion	Heure	6	Au format HH:MM:SS
date_ponte	Date de ponte	Date	10	Au format AAAA-MM-JJ
h_ponte	Heure de ponte	Heure	6	Au format HH:MM:SS
nbre_petits	Nombre de nouveau-nés dans un nid	N	4	
id_obs	Identifiant numérique de l'observateur	N		

prenom_obs	Prénom de l'observateur	A	30	L'observateur est celui qui valide l'observation
nom_obs	Nom de l'observateur	A	30	L'observateur est celui qui valide l'observation
contact_obs	Adresse mail de l'observateur	AN	100	L'observateur est celui qui valide l'observation

b. Description des « entités »

À partir de ces données, les « entités » suivantes sont définies, avec les « propriétés » associées :

Entité	Echantillon	Individu	Nid	Observateur
Identifiant	<u>id_ech</u>	<u>id_ind</u>	<u>id_nid</u>	<u>id_obs</u>
Propriété 1	num_ech	nom_ind	num_nid	prenom_obs
Propriété 2	barcode	sexe	coord_Y	nom_obs
...	qual_ADN	age	coord_X	contact_obs
	analyse	long_car	ile_ponte	
	num_boite	larg_car	lieu_ponte	
	res_seq	poids	date_ponte	
	res_gen	statut	h_ponte	
	com_ech	contexte	date_eclo	
		bague_G_D_1	h_eclo	
		bague_G_D_2	nbre_petits	
		balise		
		lieu_origine		
		lieu_ech		
		date_ech		
		com_ind		

- ☐ **Échantillon** : comporte les informations relatives aux analyses génétiques effectuées sur chaque échantillon, ainsi que la date et le lieu d'échantillonnage ;
- ☐ **Individu** : comporte la description des individus échantillonnés telle qu'effectuée sur le terrain ;
- ☐ **Nid** : comporte les coordonnées GPS des nids, ainsi que les dates et heures de ponte et d'éclosion, et le nombre de nouveau-nés trouvés ;
- ☐ **Observateur** : comporte les noms et contacts de chaque observateur ;

c. Description des « associations »

Sur la base de ces « entités », et avec les « associations » décrites ci-après, le modèle conceptuel de données peut être construit (voir schéma page suivante).

- ☐ **Récolter** : lie les entités **Observateur** et **Echantillon**. Un observateur récolte 1 ou plusieurs échantillons (1,N). Un même échantillon est récolté par un et un seul observateur (1,1).
- ☐ **Être prélevé sur** : lie les entités **Echantillon** et **Individu**. Un même échantillon est prélevé sur une et un seul individu (1,1). Sur un même individu, un et un seul échantillon est prélevé (1,1). Si un même individu est échantillonné

plusieurs fois (par exemple à plusieurs années d'intervalle), il est enregistré comme un individu différent. Ses caractéristiques (numéro de bague ou génotype) permettront de l'identifier. Les individus observés mais non échantillonnés ne sont pas pris en compte dans la base de données, d'où la cardinalité (1,1) et non (0,1).

- **Pondre** : lie les entités **Individu** et **Nid**. Un individu peut pondre 0 (si nouveau né ou tentative de ponte) ou plusieurs nids (0,N). Un même nid peut être pondu par 0 (si la femelle n'a pas été échantillonnée) ou 1 individu (0,1).
- **Naître dans** : lie les entités **Individus** et **Nids**. Un même individu peut être né dans 0 (si femelle adulte ou nouveau-né non associé à un nid) ou 1 nid (si éclosion observée) (0,1). Dans un même nid peuvent naître 1 ou plusieurs individus échantillonnés (1,N).

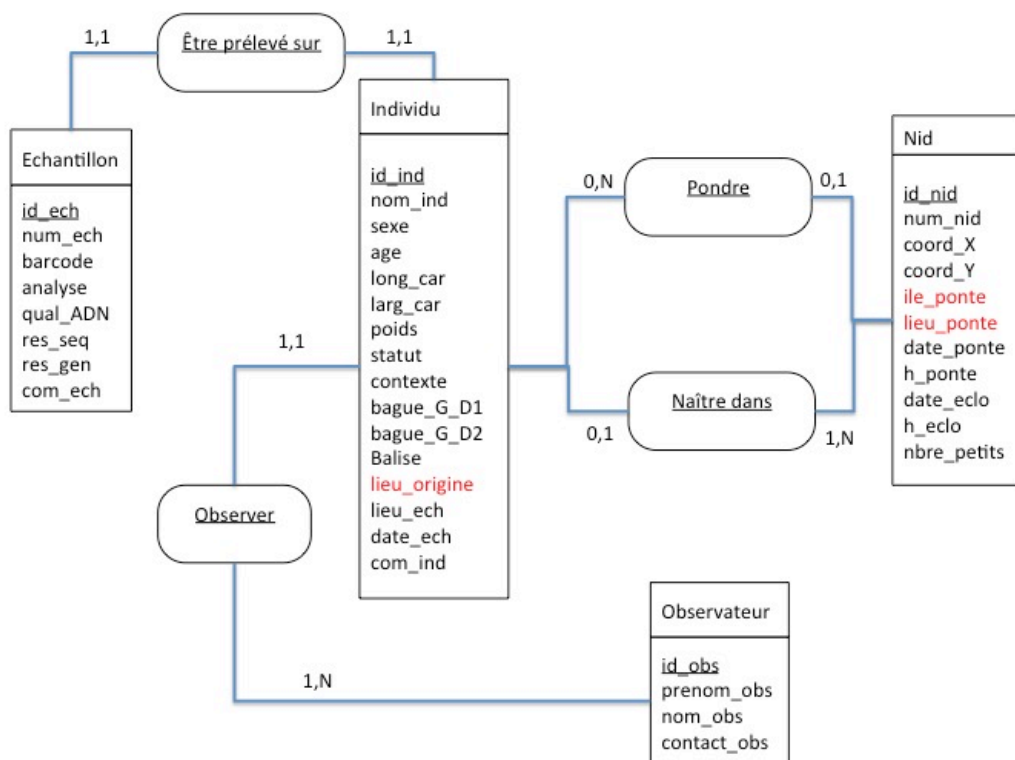


Figure I.2 Modèle Conceptuel de Données

2. Modèle Relationnel de Données (MRD)

À partir du modèle conceptuel il est possible de construire un modèle relationnel de donnée dont la structure servira de base pour la construction de la base de données. Chaque entité ici devient une « relation » dans le modèle relationnel, et sera une « table » de la base de données. Les « associations » sont construites en ajoutant des clés étrangères dans les « relations », ce qui permet de les associer entre elles. Le MRD est présenté dans le schéma ci-dessous.

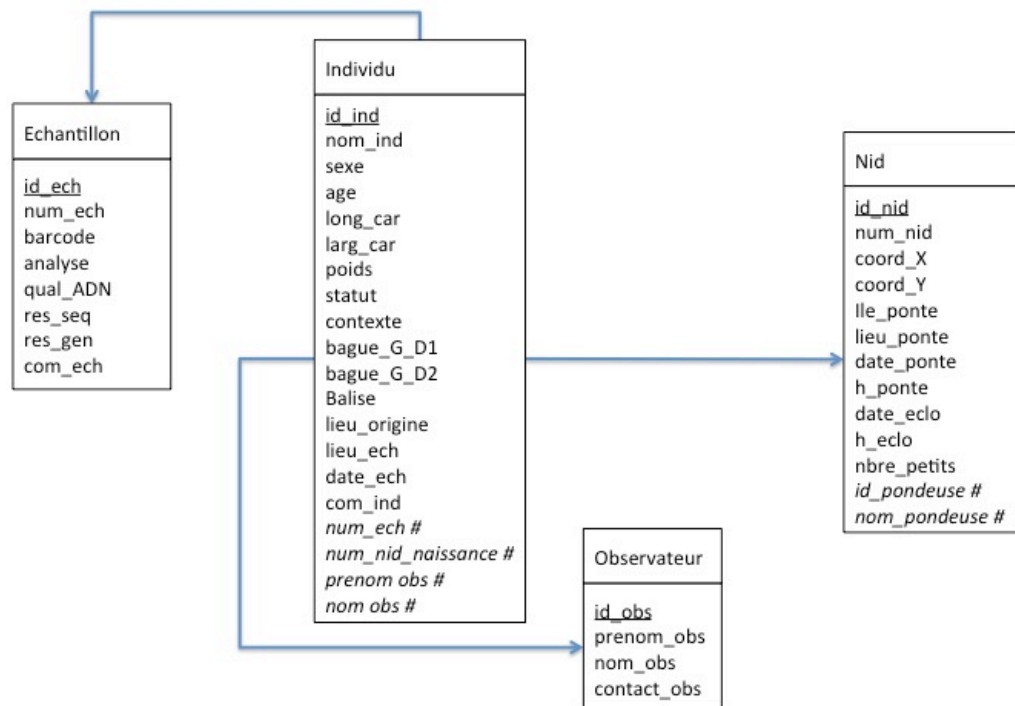


Figure I.3 Modèle relationnel de données. x : clé primaire; x # : clé étrangère. Les flèches matérialisent les associations entre les relations

Ce schéma permet de construire 4 tables dont les champs sont détaillés dans les pages suivantes. Pour pus de précision dans le type de champ, voir :

<https://www.vulgarisation-informatique.com/mysql-types-donnees.php>

Description des tables

Echantillon

Field	Type	NULL	Key	Default	Extra	Rôle
id_ech	SMALINT (5) UNSIGNED		PRIMARY	0	Auto_increment	Identification de l'échantillon
barcode	VARCHAR (100)			0		Barcode de l'échantillon
num_ech	VARCHAR (50)			0		Numéro de l'échantillon donné sur le terrain
qual_ADN	ENUM ('bon', 'mauvais')			'bon'		Qualité de l'ADN
analyse	ENUM ('ADN extrait', 'séquencé', 'génotypé', 'séquencé + génotypé', 'non traité', 'erreur séquençage', 'erreur génotypage')			'non traité'		Etat d'avancement des analyses ADN
res_seq	TEXT (1000)	YES				Résultat séquençage
res_gen	NUMERIC (1000)	YES				Résultat génotypage
com_ech	TEXT (500)	YES				Commentaires

Observateur

Field	Type	NULL	Key	Default	Extra	Rôle
id_obs	SMALINT (5) UNSIGNED		UNIQUE	0	auto_increment	Identifiant de l'observateur
prenom_obs	VARCHAR (30)		PRIMARY			Prénom de l'observateur
nom_obs	VARCHAR (30)		PRIMARY			Nom de l'observateur
contact_obs	VARCHAR (100)	YES				Adresse mail de l'observateur

Individu

Field	Type	NULL	Key	Default	Extra	Rôle
id_ind	SMALINT (5) UNSIGNED		PRIMARY	0	Auto_increment	Identifiant de l'individu
num_nid_naissance	VARCHAR (50)	YES	MUL			Numéro du nid de naissance donné sur le terrain si juvénile. Si adulte, champ nul.
num_ech	VARCHAR (50)		MUL	0		Numéro d'échantillon donné sur le terrain
prenom_obs	VARCHAR (30)	YES	MUL			Prénom de l'observateur
nom_obs	VARCHAR (30)	YES	MUL			Prénom de l'observateur
nom_ind	VARCHAR (50)	YES				Nom de l'individu
sexe	ENUM ('F', 'M', 'I')			I		Sexe
age	ENUM ('ADU', 'JUV', 'EME', 'EMB', 'IND')			IND		Age
long_car	FLOAT (3,1)	YES				Longueur carapace en cm
larg_car	FLOAT (3,1)	YES				Largeur carapace en cm
poids	FLOAT (3,3)	YES				Poids en kg
statut	ENUM ('vivante', 'morte')	YES				Etat de santé
contexte	ENUM ('ponte', 'tentative de ponte', 'émergence', 'en descente', 'en montée', 'émergente secourue', 'clinique', 'échouage', 'excavation', 'autre')	YES				Contexte de l'échantillonnage
bague_G_D_1	VARCHAR (50)	YES				Numéro de bague Gauche_droite 1
bague_G_D_2	VARCHAR (50)	YES				Numéro de bague gauche_droite si re-bagué

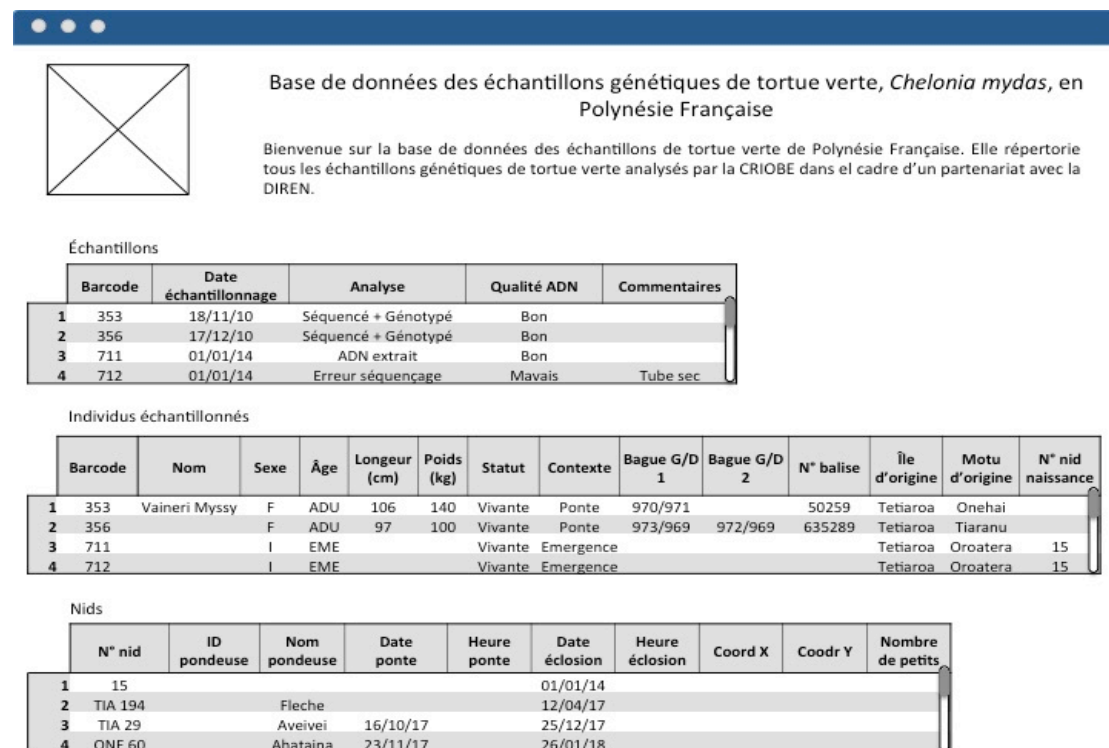
balise	VARCHAR (50)	YES				Numéro balise
lieu_ech	VARCHAR (50)			0		Lieu d'échantillonnage
lieu_origine	VARCHAR (50)	YES				lieu d'origine si différent du lieu d'échantillonnage
date_ech	DATE (10)			01/01/01		Date d'échantillonnage
com_ind	TEXT (500)					Commentaires

Nid

Field	Type	NULL	Key	Default	Extra	Rôle
id_nid	SMALLINT (5) UNSIGNED		PRIMARY	0	Auto_increment	Identifiant du nid
nom_pondeuse	VARCHAR (50)	YES	MUL			Nom de la femelle pondeuse
num_nid	VARCHAR (50)			0		Numéro du nid donné sur le terrain
coord_X	FLOAT (2,5)	YES				Coordonnée GPS X
coord_Y	FLOAT (2,5)	YES				Coordonnée GPS Y
ile_ponte	VARCHAR (50)			0		Ile de ponte
lieu_ponte	VARCHAR (50)	YES				Précisions sur le lieu de ponte
date_ponte	DATE	YES				Date de ponte
h_ponte	TIME	YES				Heure de ponte
date_eclo	DATE	YES				Date d'éclosion
h_eclo	TIME	YES				Heure d'éclosion
nbre_petits	SMALLINT (4) UNSIGNED	YES				Nombre de petits dans le nid

IV. Interface web

L'interface WEB permettra de visualiser les données de la base de données relatives aux échantillons traités. Pour des raisons de sécurité, ces données ne pourront pas être modifiées à travers l'interface web, mais uniquement en interne par le CRIOBE. L'affichage pourra concerner toutes les données, ou seulement certaines, en fonction de ce qui est jugé utile. Un exemple d'affichage est présenté ci-dessous, composé de 3 tableaux représentant les tables Individu, Echantillon, et Nid.



Base de données des échantillons génétiques de tortue verte, *Chelonia mydas*, en Polynésie Française

Bienvenue sur la base de données des échantillons de tortue verte de Polynésie Française. Elle répertorie tous les échantillons génétiques de tortue verte analysés par la CRIOBE dans el cadre d'un partenariat avec la DIREN.

Echantillons

	Barcode	Date échantillonnage	Analyse	Qualité ADN	Commentaires
1	353	18/11/10	Séquence + Génotypé	Bon	
2	356	17/12/10	Séquence + Génotypé	Bon	
3	711	01/01/14	ADN extrait	Bon	
4	712	01/01/14	Erreur séquençage	Mauvais	Tube sec

Individus échantillonnés

	Barcode	Nom	Sexe	Âge	Longeur (cm)	Poids (kg)	Statut	Contexte	Bague G/D 1	Bague G/D 2	N° balise	Île d'origine	Motu d'origine	N° nid naissance
1	353	Vaineri Myssy	F	ADU	106	140	Vivante	Ponte	970/971		50259	Tetiaroa	Onehai	
2	356		F	ADU	97	100	Vivante	Ponte	973/969	972/969	635289	Tetiaroa	Tiaranu	
3	711		I	EME			Vivante	Emergence				Tetiaroa	Oroatera	15
4	712		I	EME			Vivante	Emergence				Tetiaroa	Oroatera	15

Nids

	N° nid	ID pondreuse	Nom pondreuse	Date ponte	Heure ponte	Date éclosion	Heure éclosion	Coord X	Coord Y	Nombre de petits
1	15					01/01/14				
2	TIA 194		Fleche			12/04/17				
3	TIA 29		Aveivei	16/10/17		25/12/17				
4	ONE 60		Ahataina	23/11/17		26/01/18				

Figure I.4 Exemple d'interface web pour la visualisation des données de la base de données

V. Calendrier de livraison

- ☐ Livraison de la base de données MySQL: 1 mois à compté de la validation du cahier des charges
- ☐ Livraison de la 1^{ère} mise à jour avec les données terrain: 2 mois à compté de la validation du cahier des charge
- ☐ Mise en ligne de la base de données sur le site du CRIOBE: minimum 3 mois à compté de la validation du cahier des charges, en fonction de la complexité souhaitée
- ☐ Livraison des sauvegardes : tous les 6 mois après la mise en ligne et jusqu'à la fin du contrat de financement (30/09/2022)

IV. ANNEXE IV : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE II (Characterization of 25 new microsatellite markers for the green turtle, *Chelonia mydas*, and cross-species amplification in other marine turtle species)

Table I.2: Linkage disequilibrium values for each pair of loci (Black & Krafur, GENETIC v4.05.2)

	CMY 03	CMY 04	CMY 07	CMY 08	CMY 09	CMY 10	CMY 11	CMY 14	CMY 15	CMY 16	CMY 17	CMY 18	CMY 19	CMY 20	CMY 21	CMY 22	CMY 25	CMY 26	CMY 27	CMY 29	CMY 32	CMY 33	CMY 35
CMY 04	0.08																						
CMY 07	0.07	0.07																					
CMY 08	0.07	0.08	0.15																				
CMY 09	0.07	0.12	0.07	0.07																			
CMY 10	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08																		
CMY 11	0.09	0.08	0.09	0.07	0.08	0.09																	
CMY 14	0.07	0.08	0.07	0.08	0.11	0.09	0.09																
CMY 15	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	0.11	0.11															
CMY 16	0.07	0.15	0.06	0.07	0.07	0.08	0.08	0.09	0.08														
CMY 17	0.08	0.13	0.11	0.16	0.07	0.08	0.08	0.08	0.09	0.07													
CMY 18	0.08	0.06	0.06	0.07	0.09	0.09	0.08	0.08	0.14	0.08	0.07												
CMY 19	0.07	0.07	0.07	0.10	0.08	0.08	0.10	0.09	0.10	0.07	0.07	0.10											
CMY	0.07	0.09	0.07	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.06	0.08	0.07	0.07	0.07										

	CMY 03	CMY 04	CMY 07	CMY 08	CMY 09	CMY 10	CMY 11	CMY 14	CMY 15	CMY 16	CMY 17	CMY 18	CMY 19	CMY 20	CMY 21	CMY 22	CMY 25	CMY 26	CMY 27	CMY 29	CMY 32	CMY 33	CMY 35
20																							
CMY 21	0.08	0.09	0.05	0.07	0.07	0.09	0.09	0.09	0.06	0.07	0.09	0.10	0.07	0.07									
CMY 22	0.08	0.08	0.07	0.09	0.08	0.07	0.07	0.10	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06								
CMY 25	0.10	0.08	0.07	0.08	0.08	0.08	0.10	0.09	0.11	0.10	0.08	0.10	0.11	0.09	0.09	0.06							
CMY 26	0.07	0.09	0.06	0.09	0.07	0.10	0.10	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.10	0.07	0.11						
CMY 27	0.10	0.09	0.07	0.09	0.12	0.06	0.13	0.11	0.08	0.10	0.08	0.14	0.05	0.12	0.09	0.06	0.13	0.06					
CMY 29	0.07	0.09	0.09	0.08	0.07	0.09	0.11	0.08	0.07	0.07	0.09	0.06	0.08	0.08	0.08	0.07	0.06	0.09	0.10				
CMY 32	0.09	0.11	0.09	0.10	0.08	0.09	0.09	0.09	0.12	0.12	0.09	0.13	0.09	0.07	0.09	0.04	0.06	0.08	0.16	0.12			
CMY 33	0.09	0.07	0.06	0.07	0.10	0.08	0.07	0.09	0.10	0.08	0.06	0.07	0.06	0.06	0.09	0.05	0.13	0.06	0.07	0.09	0.08		
CMY 35	0.08	0.07	0.07	0.06	0.07	0.08	0.08	0.09	0.08	0.13	0.07	0.06	0.11	0.11	0.10	0.10	0.11	0.08	0.13	0.07	0.05	0.03	
CMY 45	0.07	0.08	0.07	0.08	0.07	0.12	0.09	0.08	0.09	0.07	0.08	0.07	0.08	0.07	0.16	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.07	0.08	0.10

Table I.3: P_value for each pair of loci after Bonferroni correction. P_value < 0.05 are considered significant and marked in bold.

	CMY 03	CMY 04	CMY 07	CMY 08	CMY 09	CMY 10	CMY 11	CMY 14	CMY 15	CMY 16	CMY 17	CMY 18	CMY 19	CMY 20	CMY 21	CMY 22	CMY 25	CMY 26	CMY 27	CMY 29	CMY 32	CMY 33	CMY 35
CMY 04	1																						
CMY 07	0.03	1																					
CMY 08	1	1	0.03																				
CMY 09	1	0.03	1	1																			
CMY 10	1	1	1	1	1																		
CMY 11	0.03	1	0.03	1	1	1																	
CMY 14	1	1	1	0.88	0.03	1	1																
CMY 15	1	1	1	1	1	1	1	1															
CMY 16	1	0.03	1	1	1	1	1	0.03	1														
CMY 17	1	0.03	0.03	0.03	1	0.10	1	1	1	1													
CMY 18	1	1	1	1	1	1	1	1	0.25	1	1												
CMY 19	1	1	1	0.03	1	1	0.79	0.03	0.74	1	1	1											
CMY 20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1										
CMY 21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.10	1	1	1									
CMY 22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								

	CMY 03	CMY 04	CMY 07	CMY 08	CMY 09	CMY 10	CMY 11	CMY 14	CMY 15	CMY 16	CMY 17	CMY 18	CMY 19	CMY 20	CMY 21	CMY 22	CMY 25	CMY 26	CMY 27	CMY 29	CMY 32	CMY 33	CMY 35
CMY 25	0.10	1	1	1	1	1	1	1	1	0.25	1	1	0.58	1	1	1							
CMY 26	1	0.39	1	1	1	0.03	0.03	1	1	0.53	0.03	1	1	1	0.15	1	0.95						
CMY 27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
CMY 29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
CMY 32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
CMY 33	0.44	1	1	1	0.03	1	0.25	0.03	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
CMY 35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.03	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
CMY 45	1	1	0.08	1	1	0.03	1	1	1	1	0.03	1	1	1	0.03	1	1	0.03	1	1	1	1	1

Table I.4: Global percentage of Linkage Disequilibrium per locus calculated as the number of pairs with significant LD divided by the total number of pairs for one locus (i.e. 23).

	CMY 03	CMY 04	CMY 07	CMY 08	CMY 09	CMY 10	CMY 11	CMY 14	CMY 15	CMY 16	CMY 17	CMY 18	CMY 19	CMY 20	CMY 21	CMY 22	CMY 25	CMY 26	CMY 27	CMY 29	CMY 32	CMY 33	CMY 35	CMY 45
Pairs with significant LD	2	3	4	3	3	2	3	4	0	3	5	0	2	0	1	0	0	4	0	0	0	2	1	4
% LD per locus	9%	13%	17%	13%	13%	9%	13%	17%	0%	13%	22%	0%	9%	0%	4%	0%	0%	17%	0%	0%	0%	9%	4%	17%

Supplementary Material S1. Haplotype composition of the breeding stocks used for the mixed stock analysis (MSA) on the French Polynesian stock.

212

[illegible]

- 214

7. Piovano, S., Batibasaga, A., Ciriya, A. et al. (2019) Mixed stock analysis of juvenile green turtles aggregating at two foraging grounds in Fiji reveals major contribution from the American Samoa Management Unit. *Sci Rep* 9, 3150.
8. Boissin, E., Neglia, V., Boulet Colomb D'hauteserre, F. et al. (2019) Evolutionary history of green turtle populations, *Chelonia mydas*, from French Polynesia highlights the putative existence of a glacial refugium. *Mar. Biodivers.* 49, 2725–2733.
9. Jensen MP, Pilcher N, FitzSimmons NN (2016b) Genetic markers provide insight on origins of immature green turtles *Chelonia mydas* with biased sex ratios at foraging grounds in Sabah, Malaysia. *Endang Species Res* 31:191-201
10. Nishizawa, H., Joseph, J., Chong, Y.K. et al. (2018) Comparison of the rookery connectivity and migratory connectivity: insight into movement and colonization of the green turtle (*Chelonia mydas*) in Pacific–Southeast Asia. *Mar Biol* 165, 77.
11. Joseph J, Nishizawa H. (2016) Genetic structure and diversity of green turtles (*Chelonia mydas*) from two rookeries in the South China Sea. *J Sustain Sci Manag Spec Issue Int Semin Straits Malacca South China Sea* 11:41-7
12. Naro-Maciel, E., Gaughran, S. J., Putman, N. et al. (2014) Predicting connectivity of green turtles at Palmyra Atoll, central Pacific: a focus on mtDNA and dispersal modelling. *J. R. Soc. Interface* 11.
13. This study

Supplementary Material S2. Simulations for Mixed stock analysis (MSA)

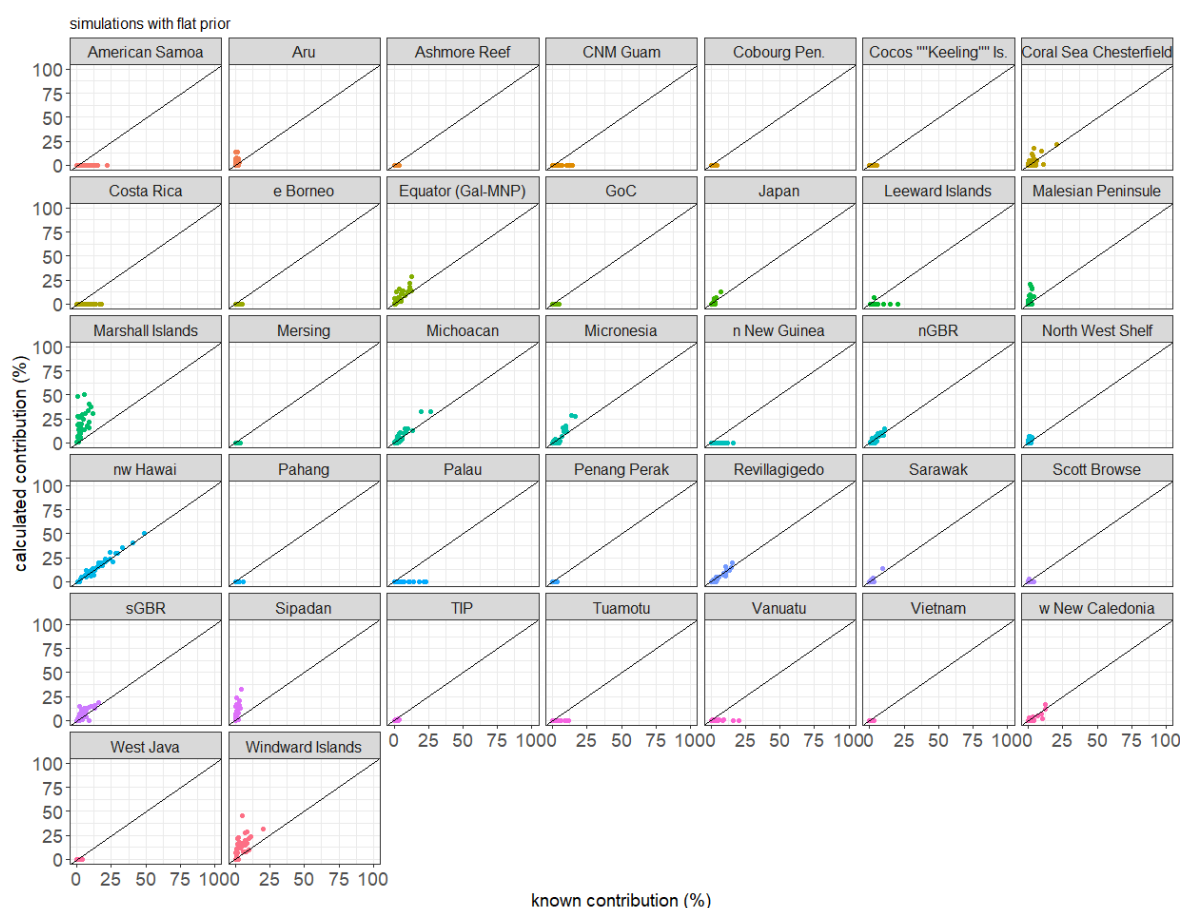
For each baseline scenario and each prior, simulations were run to assess the accuracy of stock contribution estimates. 40 simulations with 200 individuals in the stock were performed with the leave-one-out cross-validation method (Anderson et al., 2008) implemented in the R package *rubias* (Moran and Anderson, 2019).

Anderson, E.C., Waples, R.S., Kalinowski, S.T., 2008. An improved method for predicting the accuracy of genetic stock identification. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65, 1475–1486. <https://doi.org/10.1139/F08-049>

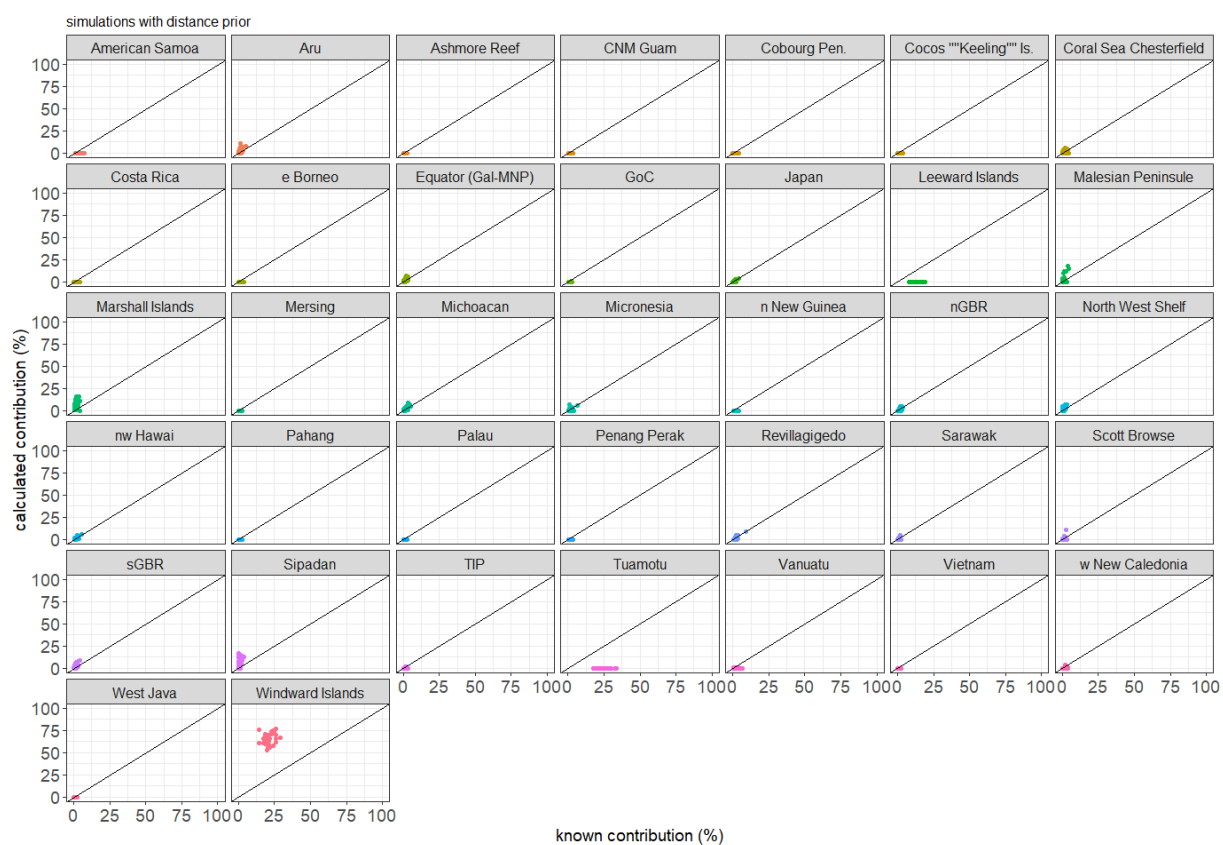
Moran, B.M., Anderson, E.C., 2019. Bayesian inference from the conditional genetic stock identification model. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 76, 551–560. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2018-0016>

Scenario 1: 3 MUs in French Polynesia: Leeward Islands, Winward Islands, Tuamotu

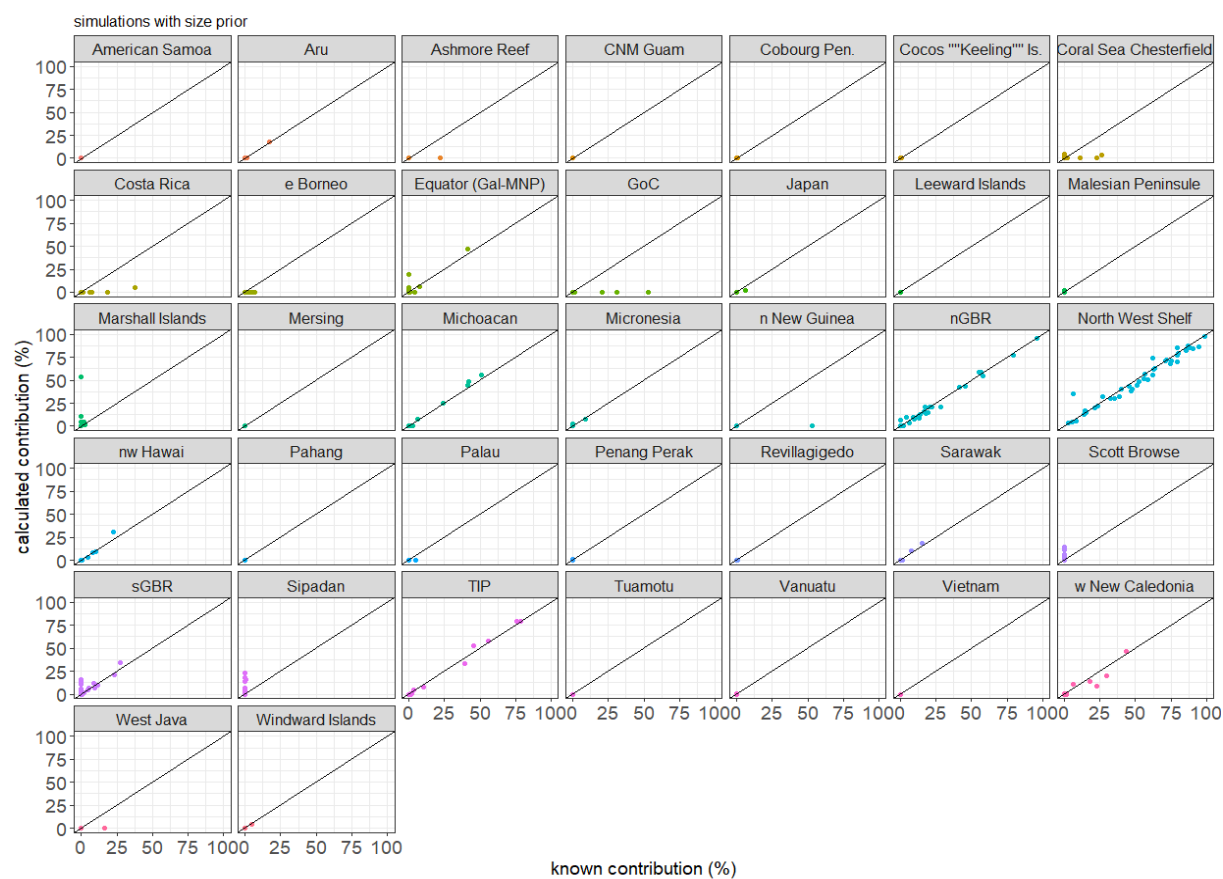
Simulations with flat prior



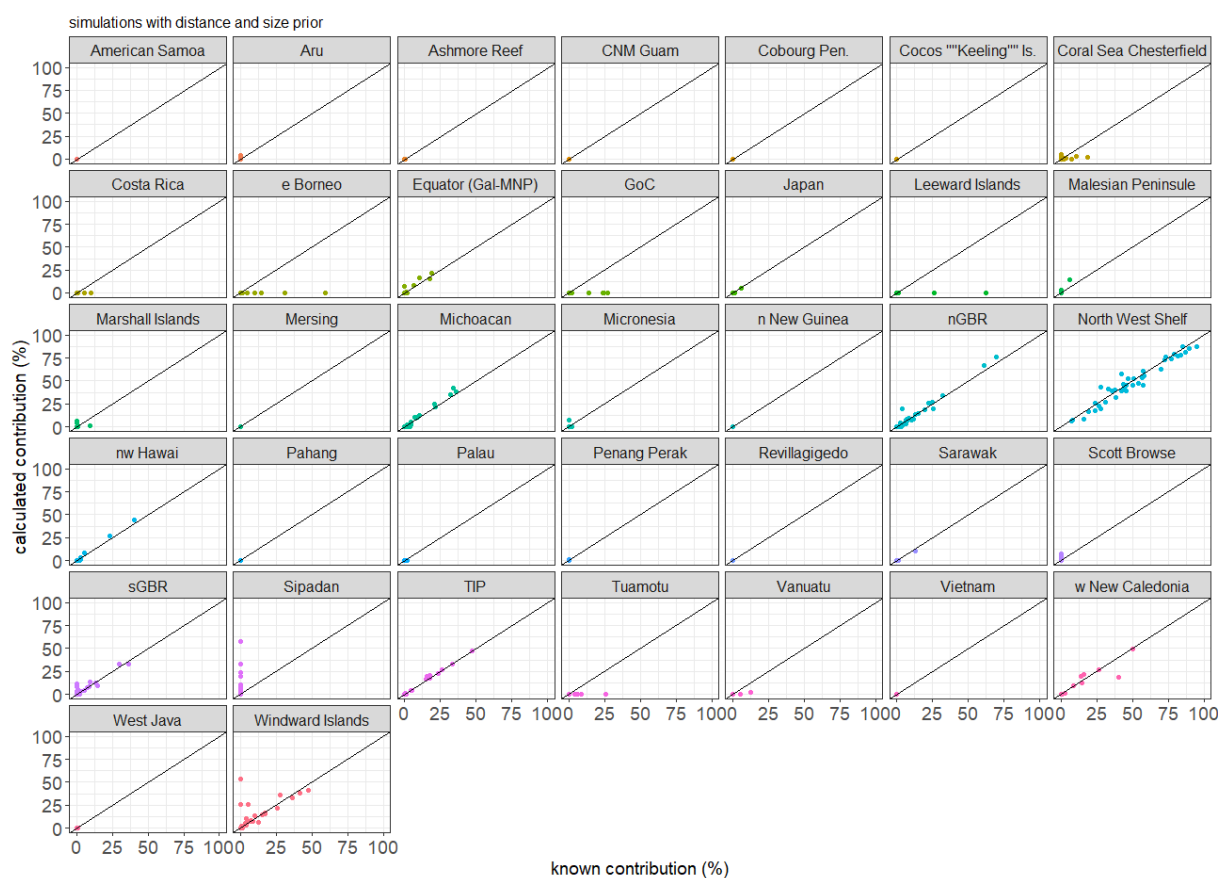
Simulations with distance prior



Simulation with size prior

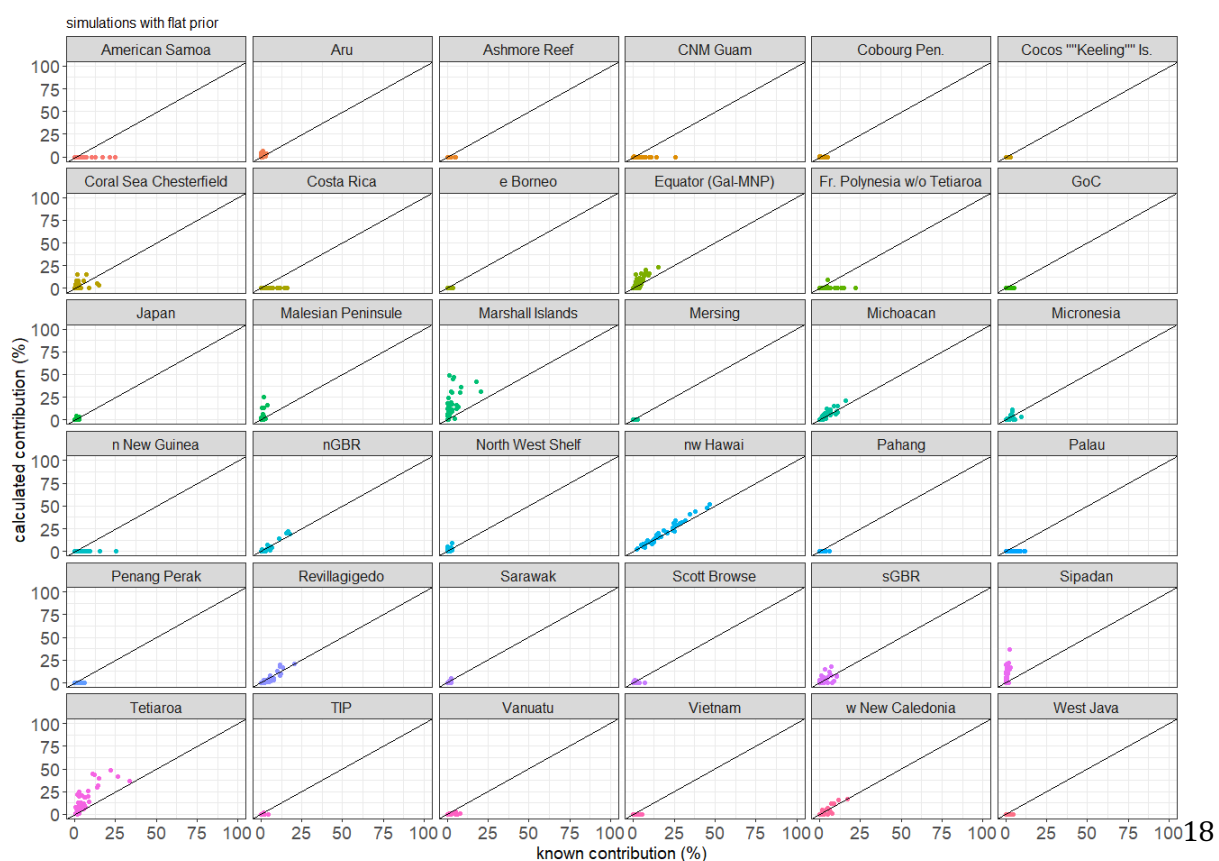


Simulation with size and distance combined prior

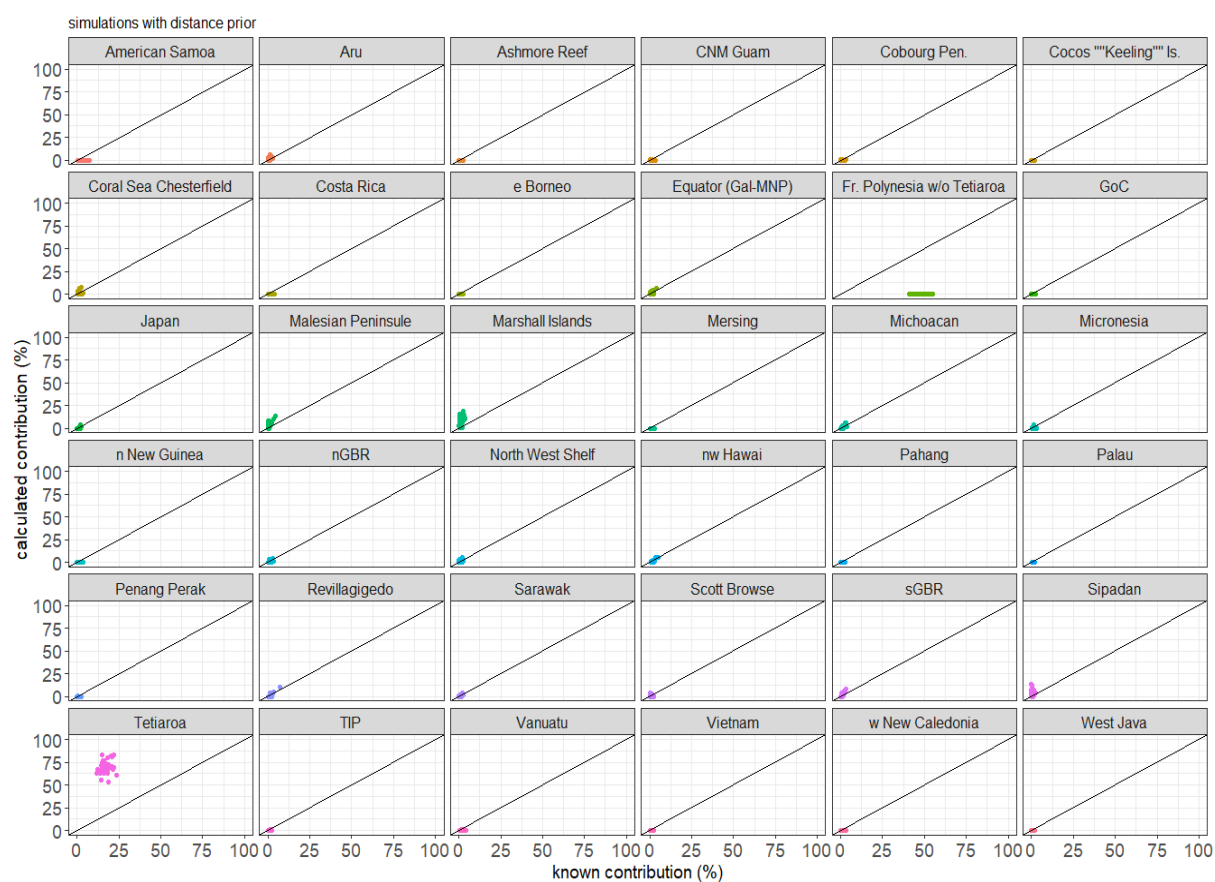


Scenario 2: 2 MUs in French Polynesia: Tetiaroa, other Islands

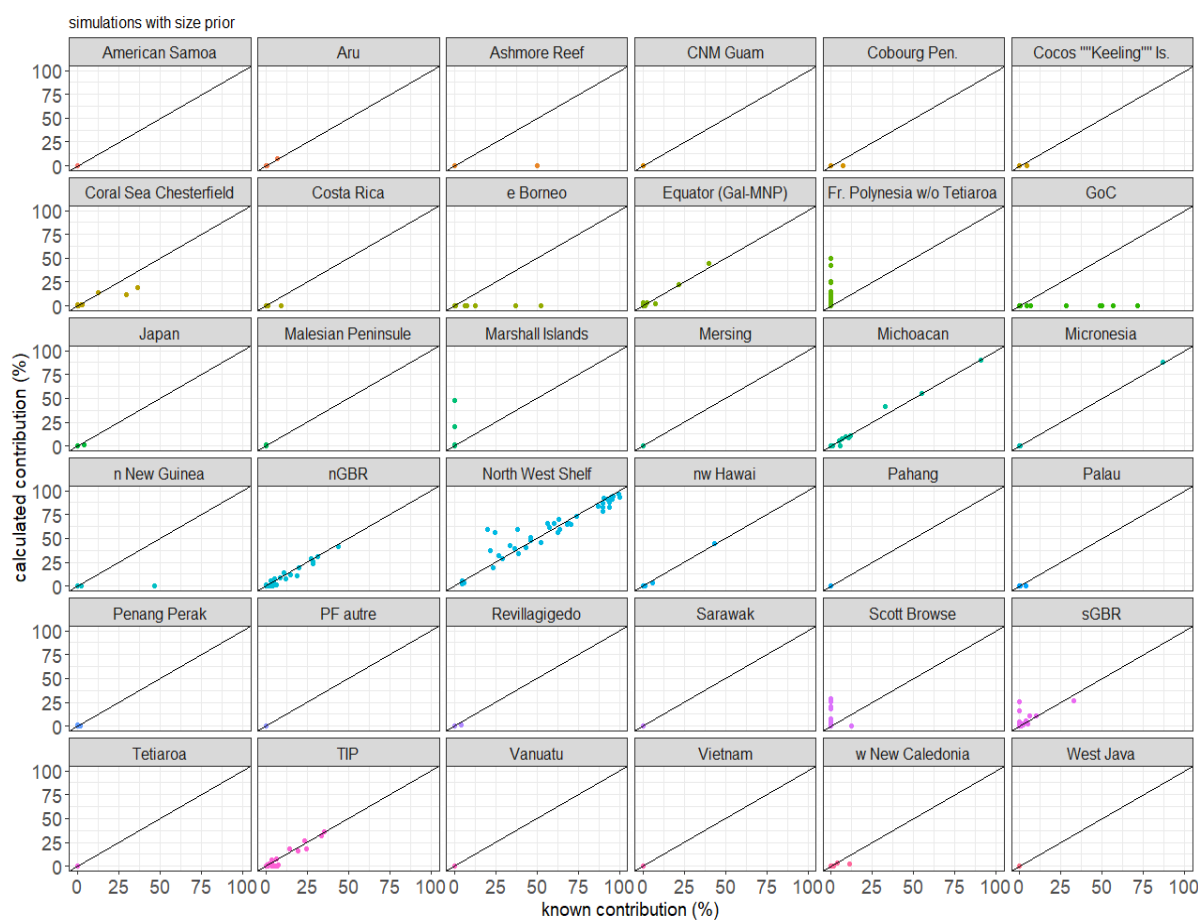
Simulation with flat prior



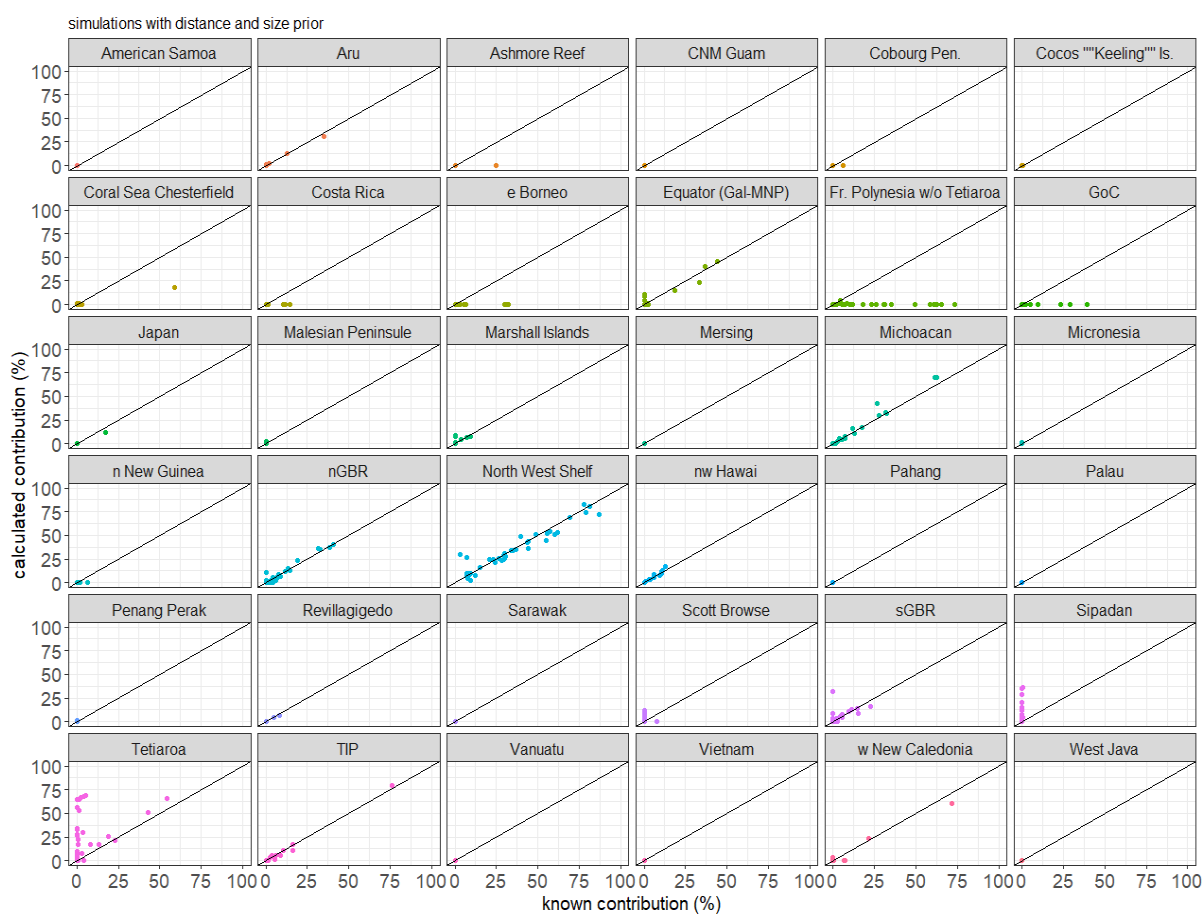
Simulation with distance prior



Simulation with size prior



Simulation with size and distance combined prior



Supplementary Material S3. Results of MSA with flat, distance, size, and size-distance priors.

Scenario 1: French Polynesia breeding stocks: Leeward Islands, Winward Islands, Tuamotu / mixed stock: juveniles only

Breeding stock	flat prior		size prior		distance prior		size-distance prior	
	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)
American Samoa	0.0	0.0 - 0.5	0.0	0.0 - 0.0	2.5	0.8 - 5.1	0.0	0.0 - 0.0
Aru	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.7	0.0 - 2.2	0.0	0.0 - 0.1
Ashmore Reef	0.0	0.0 - 0.5	0.0	0.0 - 0.0	0.7	0.0 - 2.2	0.0	0.0 - 0.0
CNM Guam	0.0	0.0 - 0.6	0.0	0.0 - 0.0	0.8	0.1 - 2.5	0.0	0.0 - 0.0
Cobourg Pen.	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.7	0.0 - 2.2	0.0	0.0 - 0.0
Cocos "Keeling" Is.	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.8	0.0	0.0 - 0.0
Coral Sea Chesterfield	1.0	0.0 - 6.8	0.4	0.0 - 0.0	1.5	0.2 - 3.9	0.4	0.0 - 0.5
Costa Rica	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.9	0.1 - 2.5	0.1	0.0 - 0.6
e Borneo	0.0	0.0 - 0.4	0.1	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 2.0	0.1	0.0 - 1.0
Equator (Gal-MNP)	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.9	0.1 - 2.6	0.1	0.0 - 0.0
GoC	0.0	0.0 - 0.5	0.1	0.0 - 0.0	0.8	0.1 - 2.4	0.1	0.0 - 1.2
Windward Is.	93.5	85.0 - 99.2	92.5	85.0 - 85.85	39.6	32.1 - 47.3	90.8	82.1 - 96.8
Leeward Is.	0.0	0.0 - 2.4	0.0	0.0 - 0.0	13.5	8.2 - 19.7	0.4	0.0 - 4.3
Japan	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 2.0	0.0	0.0 - 0.0
Malesian Peninsula	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.8	0.0	0.0 - 0.0
Marshall Islands	0.0	0.0 - 4.7	0.0	0.0 - 0.0	1.9	0.3 - 4.7	0.1	0.0 - 0.5
Mersing	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.8	0.0	0.0 - 0.0
Michoacan	0.0	0.0 - 0.4	0.1	0.0 - 0.0	1.0	0.1 - 2.8	0.3	0.0 - 2.0
Micronesia	0.0	0.0 - 2.2	0.0	0.0 - 0.0	1.3	0.2 - 3.4	0.1	0.0 - 0.9
n New Guinea	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.8	0.1 - 2.4	0.0	0.0 - 0.1
nGBR	0.0	0.0 - 2.4	1.0	0.0 - 0.0	1.1	0.1 - 3.1	1.3	0.0 - 5.3
North West Shelf	0.0	0.0 - 0.4	1.4	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 2.1	1.7	0.0 - 5.7
nw Hawai	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	1.2	0.2 - 3.1	0.1	0.0 - 1.1
Pahang	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.8	0.0	0.0 - 0.0
Palau	0.0	0.0 - 0.5	0.0	0.0 - 0.0	0.7	0.0 - 2.3	0.0	0.0 - 0.0
Penang Perak	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.8	0.0	0.0 - 0.0
Revillagigedo	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	1.2	0.2 - 3.1	0.0	0.0 - 0.1
Sarawak	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.9	0.0	0.0 - 0.0
Scott Browse	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.7	0.0 - 2.1	0.0	0.0 - 0.0
sGBR	3.0	0.0 - 9.9	3.9	0.0 - 0.0	2.1	0.4 - 4.7	4.0	0.0 - 10.1
Sipadan	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 2.0	0.0	0.0 - 0.0
TIP	0.0	0.0 - 0.4	0.1	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 1.9	0.2	0.0 - 1.5
Tuamotu	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	15.5	11.0 - 20.7	0.0	0.0 - 0.3
Vanuatu	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	1.2	0.2 - 3.1	0.0	0.0 - 0.0
Vietnam	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.8	0.0	0.0 - 0.0
w New Caledonia	0.0	0.0 - 3.3	0.1	0.0 - 0.0	1.6	0.3 - 4.0	0.2	0.0 - 2.7
West Java	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.8	0.0	0.0 - 0.0

Scenario 1: French Polynesia breeding stocks: Leeward Islands, Winward Islands, Tuamotu / mixed stock: juveniles and unknown maturity stages

Breeding stock	flat prior		size prior		distance prior		size-distance prior	
	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)
American Samoa	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	1.7	0.5 - 3.4	0.0	0.0 - 0.0
Aru	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.4	0.0	0.0 - 0.0
Ashmore Reef	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.6	0.0	0.0 - 0.0
CNM Guam	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 2.0	0.0	0.0 - 0.0
Cobourg Pen.	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.5	0.0	0.0 - 0.0
Cocos "Keeling" Is.	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.1	0.0	0.0 - 0.0
Coral Sea Chesterfield	0.3	0.0 - 2.9	0.1	0.0 - 2.1	1.1	0.1 - 2.8	0.2	0.0 - 2.3
Costa Rica	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.1	0.6	0.1 - 1.7	0.0	0.0 - 0.3
e Borneo	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.4	0.4	0.0 - 1.4	0.0	0.0 - 0.5
Equator (Gal-MNP)	0.0	0.0 - 0.6	0.0	0.0 - 0.6	0.8	0.1 - 2.2	0.1	0.0 - 0.9
GoC	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.4	0.5	0.0 - 1.7	0.1	0.0 - 0.6
Windward Is.	97.0	91.2 - 99.9	96.9	93.0 - 99.5	54.3	47.3 - 61.0	95.8	90.5 - 98.9
Leeward Is.	0.2	0.0 - 2.2	0.0	0.0 - 0.0	13.1	8.1 - 18.9	0.3	0.0 - 3.7
Japan	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.4	0.0	0.0 - 0.0
Malasian Peninsule	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.2	0.0	0.0 - 0.0
Marshall Islands	0.5	0.0 - 5.3	0.1	0.0 - 0.2	2.0	0.3 - 4.7	0.1	0.0 - 2.3
Mersing	0.0	0.0 - 0.1	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.1	0.0	0.0 - 0.0
Michoacan	0.0	0.0 - 0.2	0.1	0.0 - 0.6	0.7	0.1 - 2.0	0.1	0.0 - 1.0
Micronesia	0.1	0.0 - 1.2	0.0	0.0 - 0.1	1.0	0.1 - 2.7	0.0	0.0 - 0.4
n New Guinea	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.1 - 1.6	0.0	0.0 - 0.0
nGBR	0.1	0.0 - 0.7	0.3	0.0 - 1.9	0.8	0.1 - 2.1	0.5	0.0 - 2.3
North West Shelf	0.0	0.0 - 0.2	0.6	0.0 - 2.2	0.4	0.0 - 1.4	0.8	0.0 - 2.5
nw Hawai	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.2	0.8	0.1 - 2.1	0.0	0.0 - 0.5
Pahang	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.2	0.0	0.0 - 0.0
Palau	0.0	0.0 - 0.3	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.7	0.0	0.0 - 0.0
Penang Perak	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.2	0.0	0.0 - 0.0
Revillagigedo	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.8	0.1 - 2.2	0.0	0.0 - 0.0
Sarawak	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.3	0.0	0.0 - 0.0
Scott Browse	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.5	0.0	0.0 - 0.0
sGBR	1.2	0.0 - 4.4	1.6	0.0 - 4.6	1.5	0.3 - 3.3	1.7	0.0 - 4.6
Sipadan	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.4	0.0	0.0 - 0.0
TIP	0.0	0.0 - 0.2	0.1	0.0 - 0.7	0.4	0.0 - 1.4	0.1	0.0 - 0.7
Tuamotu	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	10.0	7.0 - 13.5	0.0	0.0 - 0.1
Vanuatu	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.8	0.1 - 2.1	0.0	0.0 - 0.0
Vietnam	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.2	0.0	0.0 - 0.0
w New Caledonia	0.1	0.0 - 0.7	0.0	0.0 - 0.3	1.1	0.2 - 2.7	0.1	0.0 - 0.8
West Java	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.2	0.0	0.0 - 0.0

Scenario 2: French Polynesia breeding stocks: Tetiaroa, FP other islands / mixed stock : juveniles only

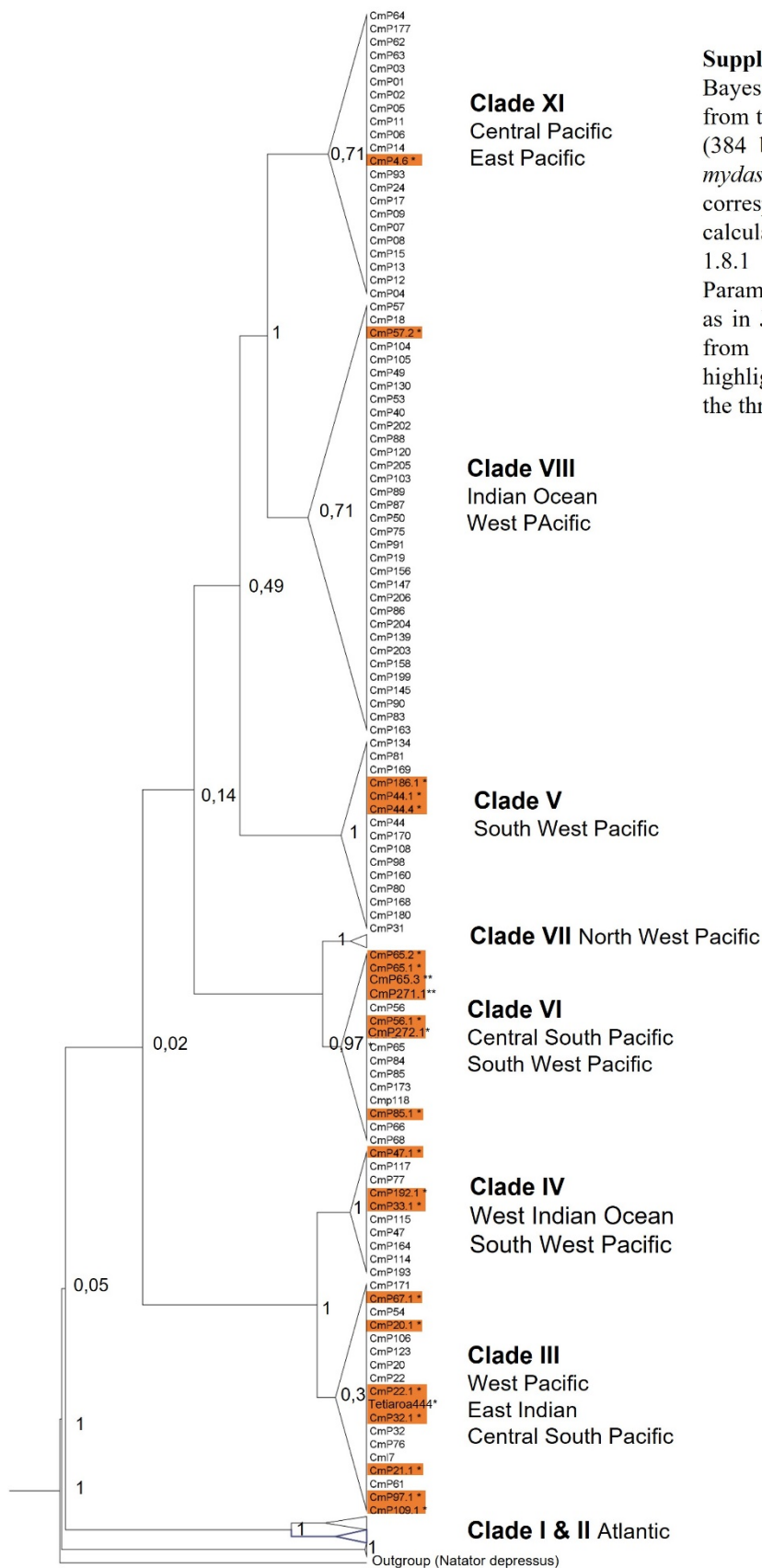
Breeding stock	flat prior		size prior		distance prior		size-distance prior	
	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)
American Samoa	0.0	0.0 - 0.5	0.0	0.0 - 0.0	2.1	0.6 - 4.2	0.0	0.0 - 0.0
Aru	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 1.9	0.0	0.0 - 0.1
Ashmore Reef	0.0	0.0 - 0.5	0.0	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 1.9	0.0	0.0 - 0.0
CNM Guam	0.1	0.0 - 0.7	0.0	0.0 - 0.0	0.7	0.1 - 2.2	0.0	0.0 - 0.0
Cobourge Pen.	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 1.9	0.0	0.0 - 0.0
Cocos "Keeling" Is.	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.5	0.0	0.0 - 0.0
Coral Sea Chesterfield	0.7	0.0 - 6.6	0.3	0.0 - 4.7	1.3	0.2 - 3.3	0.4	0.0 - 4.9
Costa Rica	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.3	0.7	0.1 - 2.1	0.1	0.0 - 0.6
e Borneo	0.0	0.0 - 0.4	0.1	0.0 - 0.9	0.5	0.0 - 1.7	0.1	0.0 - 1.0
Equator (Gal-MNP)	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.4	0.8	0.1 - 2.2	0.1	0.0 - 0.8
GoC	0.0	0.0 - 0.5	0.1	0.0 - 0.9	0.7	0.1 - 2.0	0.1	0.0 - 1.2
Japan	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.7	0.0	0.0 - 0.0
Malesian Peninsula	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.6	0.0	0.0 - 0.0
Marshall Islands	0.4	0.0 - 4.8	0.0	0.0 - 0.0	1.3	0.2 - 3.4	0.1	0.0 - 0.5
Mersing	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.5	0.0	0.0 - 0.0
Michoacan	0.0	0.0 - 0.4	0.1	0.0 - 1.3	0.9	0.1 - 2.4	0.3	0.0 - 2.0
Micronesia	0.2	0.0 - 2.2	0.0	0.0 - 0.2	1.1	0.1 - 2.9	0.1	0.0 - 0.8
n New Guinea	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.7	0.1 - 2.1	0.0	0.0 - 0.1
nGBR	0.2	0.0 - 2.3	0.9	0.0 - 4.7	0.9	0.1 - 2.6	1.2	0.0 - 5.2
North West Shelf	0.0	0.0 - 0.4	1.4	0.0 - 4.9	0.5	0.0 - 1.8	1.7	0.1 - 5.6
nw Hawai	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.5	1.0	0.2 - 2.6	0.1	0.0 - 1.1
Pahang	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.6	0.0	0.0 - 0.0
Palau	0.0	0.0 - 0.5	0.0	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 2.0	0.0	0.0 - 0.0
Penang Perak	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.5	0.0	0.0 - 0.0
FP other islands	4.2	0.0 - 42.1	0.2	0.0 - 0.0	52.6	45.1 - 59.9	11.8	0.0 - 51.0
Revillagigedo	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	1.0	0.2 - 2.6	0.0	0.0 - 0.1
Sarawak	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.6	0.0	0.0 - 0.0
Scott Browse	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.8	0.0	0.0 - 0.0
sGBR	3.4	0.0 - 9.9	3.9	0.0 - 10.0	1.7	0.3 - 4.0	3.9	0.0 - 10.0
Sipadan	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.7	0.0	0.0 - 0.0
Tetiaroa	89.7	52.0 - 99.2	92.5	84.4 - 98.2	21.3	15.2 - 28.0	79.6	40.4 - 96.1
TIP	0.0	0.0 - 0.4	0.1	0.0 - 1.4	0.5	0.0 - 1.7	0.2	0.0 - 1.5
Vanuatu	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	1.1	0.2 - 2.7	0.0	0.0 - 0.0
Vietnam	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.5	0.0	0.0 - 0.0
w New Caledonia	0.2	0.0 - 3.1	0.1	0.0 - 1.5	1.3	0.2 - 3.2	0.2	0.0 - 2.5
West Java	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.6	0.0	0.0 - 0.0

Scenario 2: French Polynesia breeding stocks: Tetiaroa, FP other islands / mixed stock : juveniles and unknown maturity stage

Breeding stock	flat prior		size prior		distance prior		size-distance prior	
	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)	contribution (%)	CI (%)
American Samoa	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	1.4	0.5 - 2.9	0	0.0 - 0.0
Aru	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.3	0	0.0 - 0.0
Ashmore Reef	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.4	0	0.0 - 0.0
CNM Guam	0.0	0.0 - 0.5	0.0	0.0 - 0.0	0.6	0.0 - 1.8	0	0.0 - 0.0
Cobourg Pen.	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.3	0	0.0 - 0.0
Cocos "Keeling" Is.	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.0	0	0.0 - 0.0
Coral Sea Chesterfield	0.2	0.0 - 2.5	0.1	0.0 - 1.9	0.9	0.1 - 2.4	0.2	0.0 - 1.9
Costa Rica	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.1	0.5	0.1 - 1.5	0	0.0 - 0.3
e Borneo	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.4	0.4	0.0 - 1.2	0	0.0 - 0.4
Equator (Gal-MNP)	0.0	0.0 - 0.4	0.0	0.0 - 0.5	0.7	0.1 - 1.8	0.1	0.0 - 0.7
GoC	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.4	0.5	0.0 - 1.4	0	0.0 - 0.5
Japan	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.2	0	0.0 - 0.0
Malesian Peninsula	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.1	0	0.0 - 0.0
Marshall Islands	0.4	0.0 - 4.2	0.0	0.0 - 0.1	1.4	0.2 - 3.4	0.1	0.0 - 1.6
Mersing	0.0	0.0 - 0.1	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.0	0	0.0 - 0.0
Michoacan	0.0	0.0 - 0.2	0.1	0.0 - 0.6	0.6	0.1 - 1.7	0.1	0.0 - 0.9
Micronesia	0.1	0.0 - 1.4	0.0	0.0 - 0.1	0.9	0.1 - 2.4	0	0.0 - 0.6
n New Guinea	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.4	0	0.0 - 0.0
nGBR	0.0	0.0 - 0.6	0.3	0.0 - 1.7	0.6	0.1 - 1.8	0.4	0.0 - 2.0
North West Shelf	0.0	0.0 - 0.2	0.6	0.0 - 2.1	0.4	0.0 - 1.2	0.7	0.0 - 2.4
nw Hawai	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.2	0.7	0.1 - 1.8	0	0.0 - 0.4
Pahang	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.1	0	0.0 - 0.0
Palau	0.0	0.0 - 0.3	0.0	0.0 - 0.0	0.5	0.0 - 1.5	0	0.0 - 0.0
Penang Perak	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.0	0	0.0 - 0.0
FP other islands	38.4	13.0 - 60.1	33.1	0.0 - 58.9	55.5	48.1 - 62.8	37.9	16.8 - 58.9
Revillagigedo	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.7	0.1 - 1.8	0	0.0 - 0.0
Sarawak	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.1	0	0.0 - 0.0
Scott Browse	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.3	0	0.0 - 0.0
sGBR	1.2	0.0 - 4.2	1.5	0.0 - 4.4	1.3	0.2 - 2.9	1.6	0.0 - 4.5
Sipadan	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.4	0.0 - 1.2	0	0.0 - 0.0
Tetiaroa	59.1	37.4 - 83.9	64.1	38.4 - 98.3	25.3	18.6 - 32.3	58.5	37.6 - 79.7
TIP	0.0	0.0 - 0.2	0.1	0.0 - 0.7	0.4	0.0 - 1.2	0.1	0.0 - 0.7
Vanuatu	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.7	0.1 - 1.9	0	0.0 - 0.0
Vietnam	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.0	0	0.0 - 0.0
w New Caledonia	0.0	0.0 - 0.5	0.0	0.0 - 0.2	0.9	0.1 - 2.2	0	0.0 - 0.6
West Java	0.0	0.0 - 0.2	0.0	0.0 - 0.0	0.3	0.0 - 1.1	0	0.0 - 0.0

Supplementary Material S4. Size of the sampled juveniles

Individual ID	Sampling date	Size (ccl, cm)	Individual ID	Sampling date	Size (ccl, cm)
CMY0175	30/09/2014	42.4	CMY1946	08/04/2014	46
CMY0176	30/09/2014	38.7	CMY1992	12/11/2015	50
CMY0479	20/02/2015	44.5	CMY1993	12/11/2015	42
CMY1835	24/06/2008	49.6	CMY2725	05/08/2020	52
CMY1837	26/12/2007	23	CMY2726	05/08/2020	41.3
CMY1838	18/04/2008	47	CMY2727	17/07/2020	49.4
CMY1839	19/04/2008	47.2	CMY2728	08/10/2020	50.5
CMY1840	19/04/2008	47.2	CMY2729	24/08/2020	50.2
CMY1841	15/06/2008	55.1	CMY2762	29/05/2018	45.5
CMY1845	18/06/2009	7.8	CMY2763	04/04/2019	47
CMY1853	14/04/2011	33	CMY2764	05/09/2018	43
CMY1855	17/11/2015	48	CMY2765	18/05/2019	41.5
CMY1856	17/11/2015	44.5	CMY2766	19/05/2019	41.5
CMY1857	17/11/2015	52	CMY2767	30/12/2019	47.5
CMY1878	15/04/2019	50	CMY2768	29/12/2019	45
CMY1879	22/03/2018	46.5	CMY2780	20/12/2005	16.5
CMY1881	07/06/2017	37	CMY2817	26/02/2009	59
CMY1883	22/11/2017	54	CMY2846	17/01/2011	47
CMY1927	19/03/2015	50	CMY2956	23/07/2011	77
CMY1928	19/03/2015	55	CMY3561	25/02/2021	48.6
CMY1929	19/03/2015	43	CMY3562	02/02/2021	78
CMY1933	15/04/2017	45	CMY3564	10/02/2021	60
CMY1934	15/04/2017	47.5	CMY3565	14/03/2021	56
CMY1940	02/08/2014	48	CMY3566	04/05/2021	51
CMY1945	08/04/2014	49			



Supplementary Figure 1

Bayesian phylogenetic tree inferred from the mitochondrial control region (384 bp) of green turtles, *Chelonia mydas*. Numbers in front of the nodes correspond to posterior probabilities calculated with the program BEAST 1.8.1 (Drummond et al., 2012). Parameters for tree inference were set as in Jensen et al., 2019. Haplotypes from French Polynesia are highlighted in orange, ** identifies the three new haplotypes.

VI. ANNEXE VI : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE IV (Local genetic structure in green sea turtles, *Chelonia mydas*, within French Polynesia discovered with microsatellite markers)

Supplementary Material S1. Results of Bayesian clustering with STRUCTURE on dataset 1 including 839 individuals of *C. mydas*, without and with LOCPRIOR algorithm used to detect weakly differentiated populations

Figure S1.1 : A): Plot of the mean of estimated “log probability of data” for each value of K without LOCPRIOR algorithm. B): DeltaK of Evanno's method based on the rate of change in the log probability of data. C) Within bar-plots for K from 2 to 4. Each individual is represented by a vertical bar partitioned into colored sub-bars whose lengths are proportional to its estimated probability of membership for the K clusters.

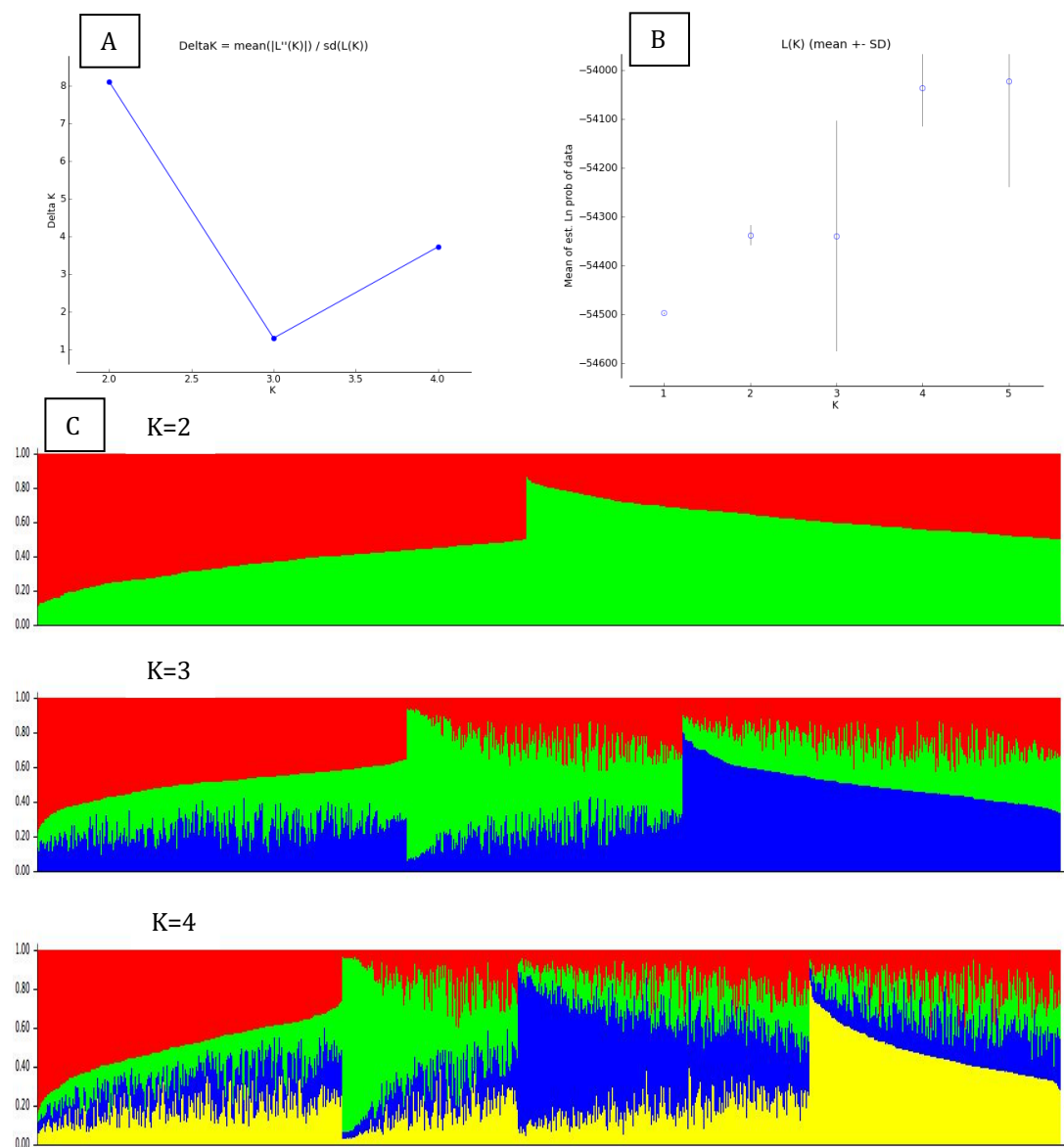
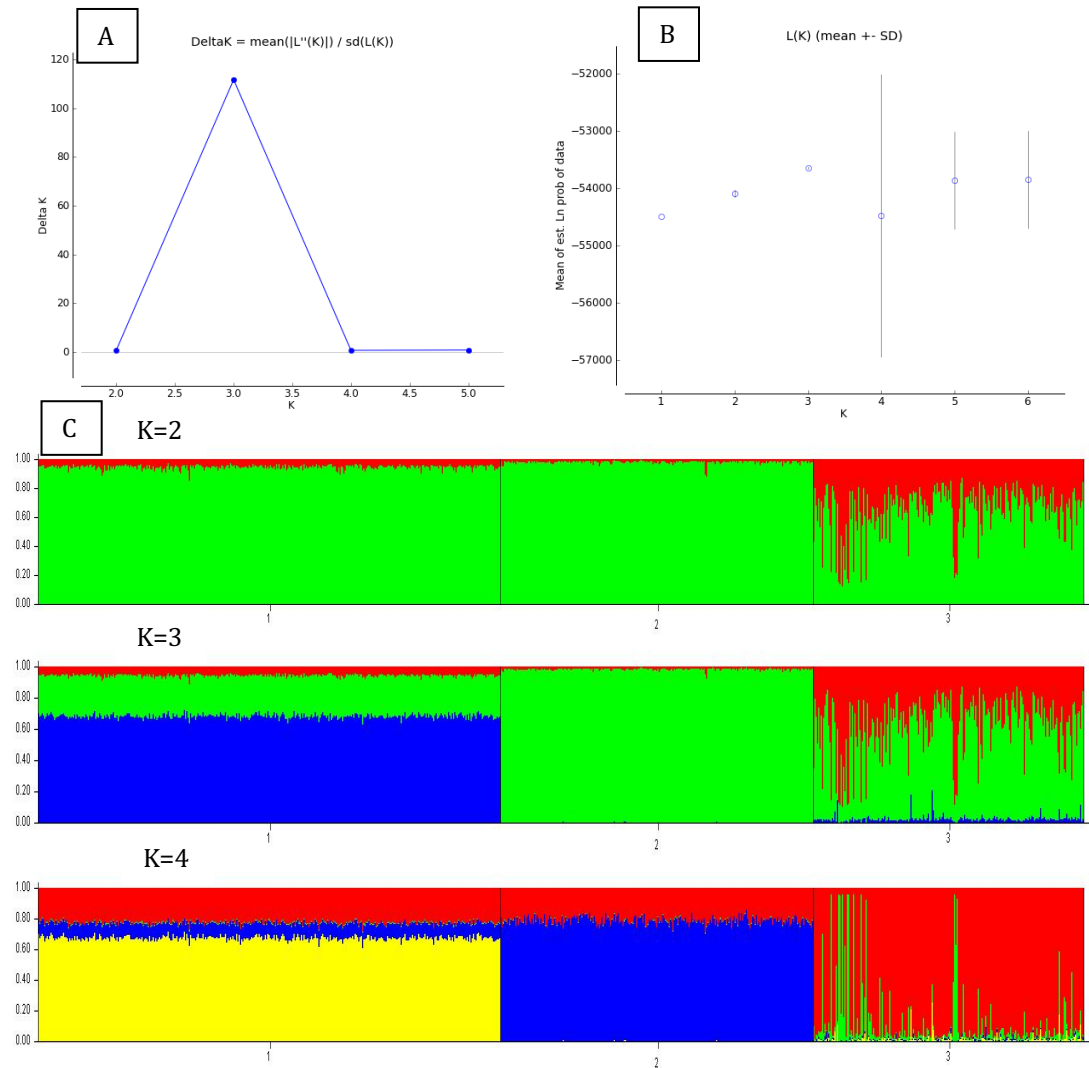
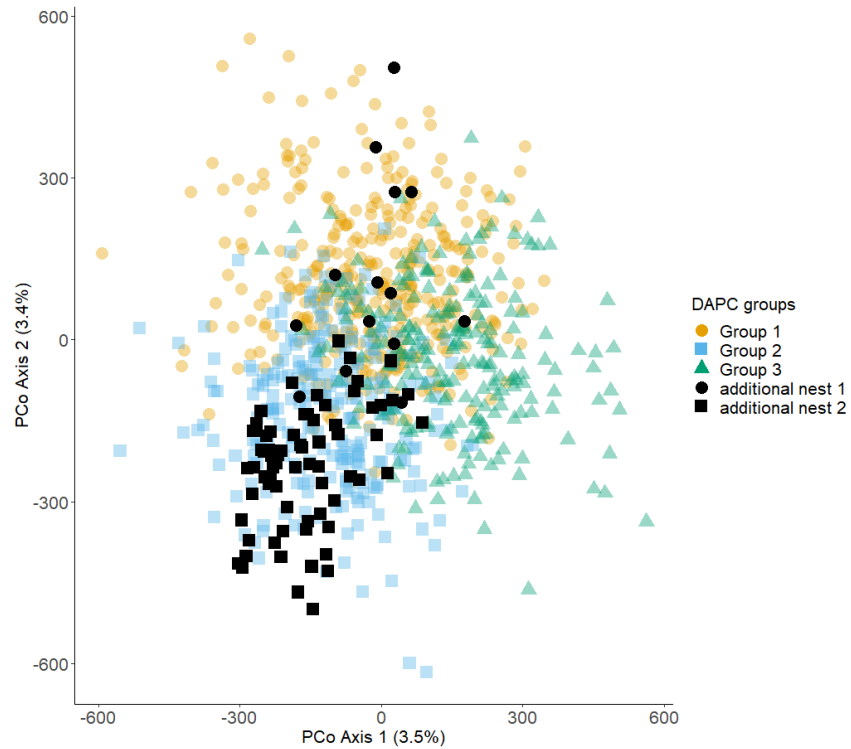


Figure S1.2 : A): Plot of the mean of estimated “log probability of data” for each value of K with LOCPRIOR algorithm . B): DeltaK of Evanno's method based on the rate of change in the log probability of data. C) Within bar-plots for K from 2 to 4. Each individual is represented by a vertical bar partitioned into colored sub-bars whose lengths are proportional to its estimated probability of membership for the K clusters. Groups are numbered according to DAPC groups.



Supplementary Material S2. Additional nests projected on PCoA. Additional nest 1 corresponds to the nest number 1920_ONE33 with 70 hatchlings and clusters in group 1. Additional nest 2 corresponds to 1415_OR084 with 14 hatchlings and clusters in group 2.



Supplementary Material S3. G'st per locus, between DAPC groups and global. *
p_value < 0.05, ** p_value < 0.01, * p_value < 0.001**

Locus	G' _{st} (Hed) Pairwise population			G' _{st} Global
	Groupe 1 vs 2	Groupe 1 vs 3	Groupe 2 vs 3	
CMY03	0.002 *	0.002 **	0.002*	0.002**
CMY04	0	0.010***	0.008***	0.008***
CMY08	0.001	0.002*	0.008***	0.005***
CMY09	0	0.001*	0.004***	0.002*
CMY10	0	0.001	0.003**	0.002**
CMY11	0.002*	0.001	0.005**	0.003**
CMY14	0.002**	0.006***	0.005***	0.006***
CMY15	0.022***	0.028***	0.098***	0.064***
CMY16	0.002**	0.001	0.003**	0.003**
CMY17	0	0.003**	0.005**	0.003**
CMY18	0.001	0.003*	-0.001	0.001
CMY19	0.002*	0.002	0.008***	0.005***
CMY20	0.001	0	-0.001	0
CMY21	0.006***	0.012***	0.037***	0.024***
CMY22	0.009***	0.030***	0.073***	0.049***
CMY25	0.007***	0.013***	0.030***	0.022***
CMY26	0.004***	0.003**	0.001	0.004**
CMY27	0.406***	0.385***	0.008**	0.411***
CMY29	0.007***	0.022***	0.049***	0.035***
CMY32	0	0.004*	0	0.002*
CMY33	0.004**	0.011***	0.029***	0.019***
CMY35	0	0.010***	0.005**	0.006**
CMY45	0.002*	0.001	0.002**	0.002**

Supplementary Masterial S4. DAPC results for dataset 3 and dataset 4.

Figure S4.1 A. Values of Bayesian Information Criterium (BIC) used to determine the optimal number of DAPC clusters, K (i.e. the one that maximizes the variance between groups) for the 581 hatchlings of *C. mydas* from different nests sampled in French Polynesia (dataset 3). The number of clusters that minimise the BIC value should be chosen, in this case K=3 (Jombart et al., 2021). B. DAPC clustering based on this value of K=3. C. PCoA including the same individuals, with colours representing the DAPC groups. Percentage of variance explained by each axis is shown in brackets.

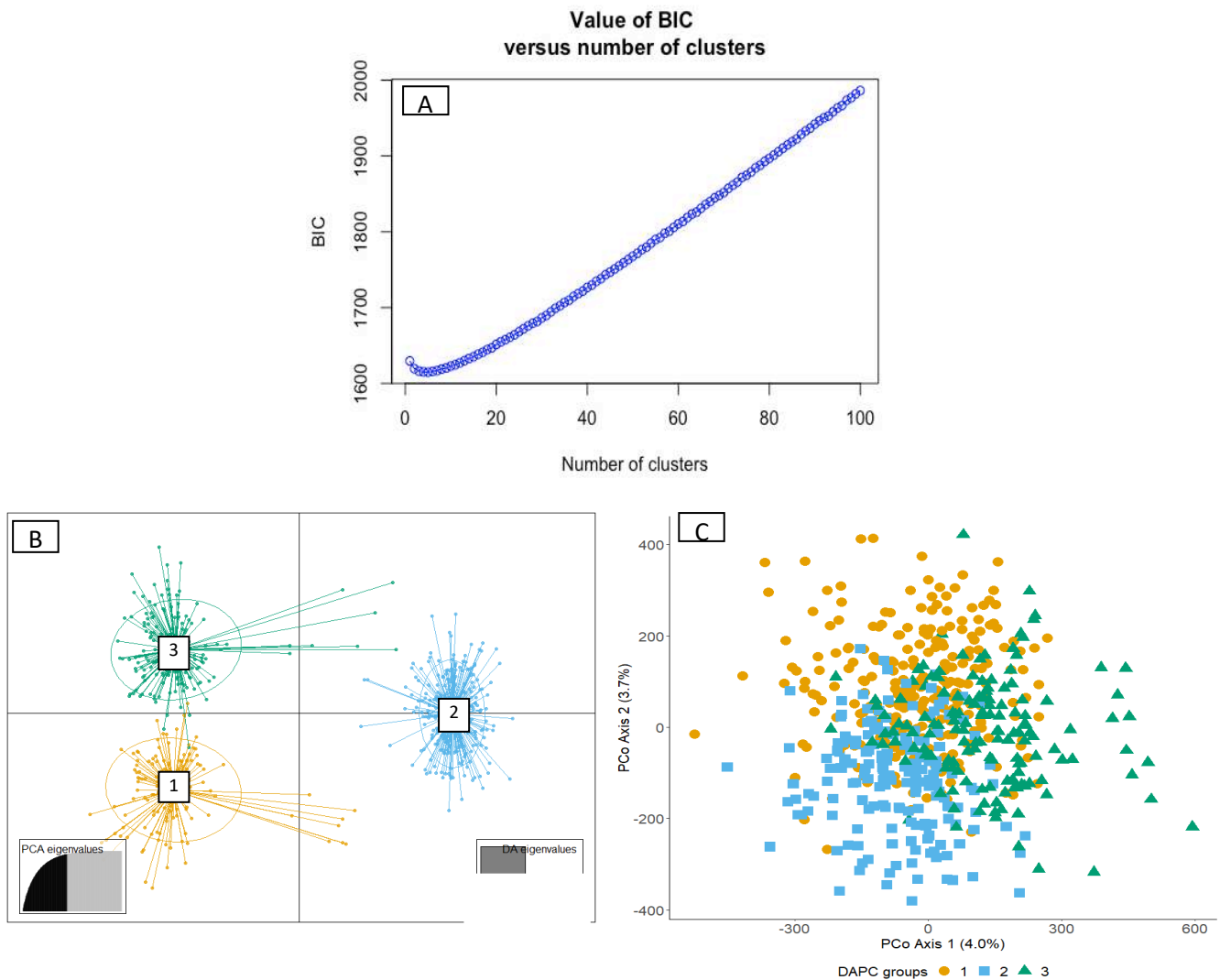
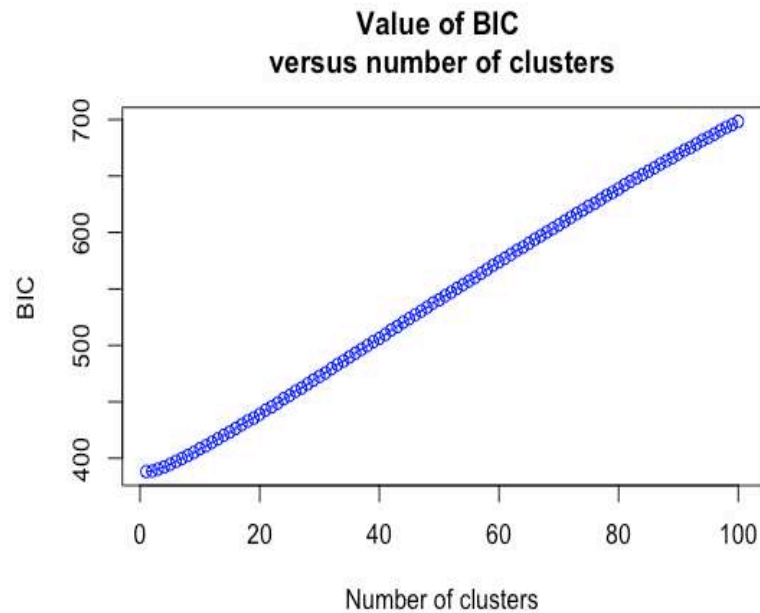


Figure S4.2 Values of Bayesian Information Criterion (BIC) used to determine the optimal number of DAPC clusters, K for the 198 adults and juveniles of *C. mydas* sampled in French Polynesia (dataset 4). Here the minimal value of BIC is met for K=1, indicating a single cluster with all individuals.



VII. ANNEXE VII: MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE DU CHAPITRE V (Investigating the reproductive behavior of the green sea turtle, *Chelonia mydas*, using parentage analysis)

Supplementary data S1. COLONY Calibration with different sets of microsatellite markers

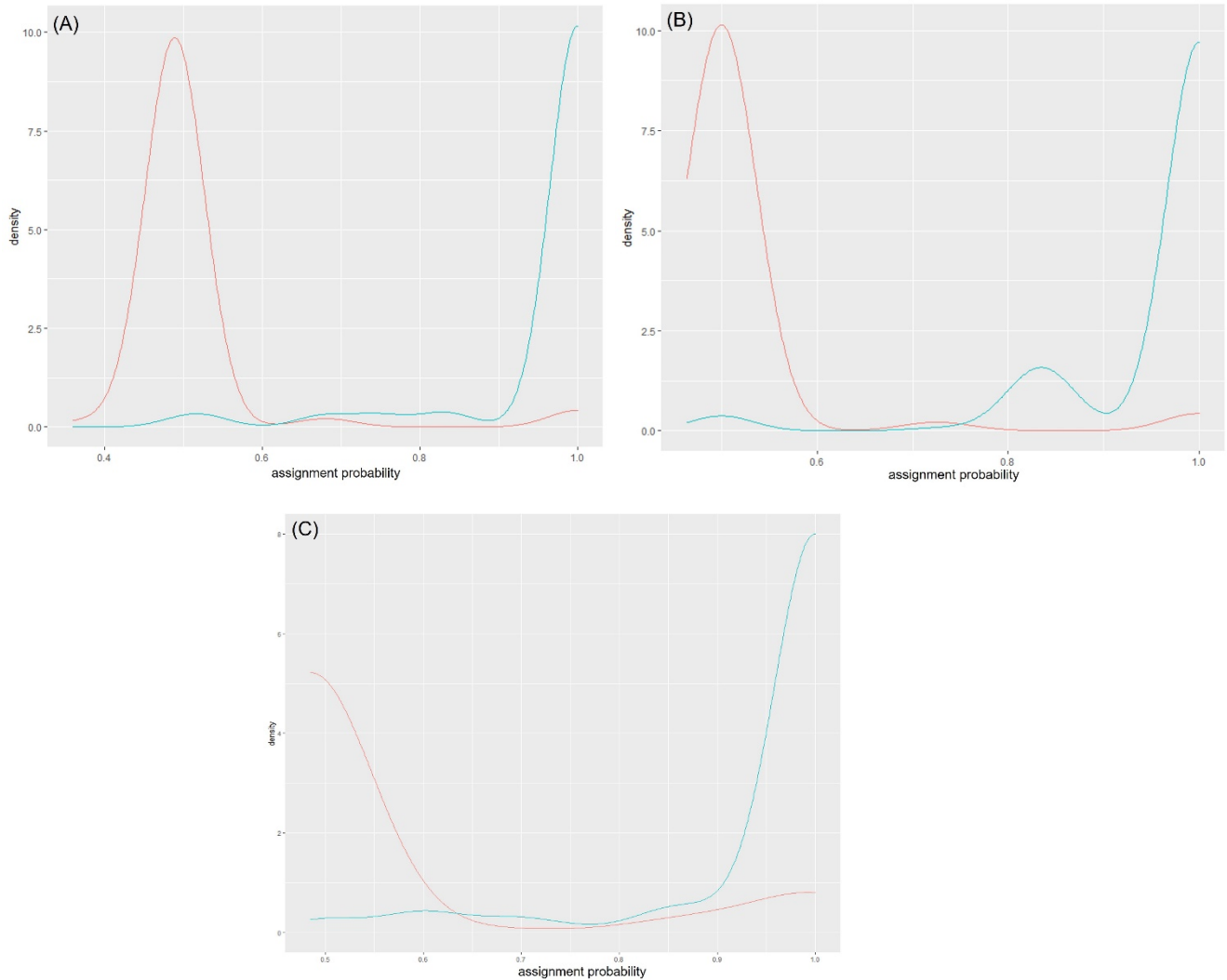


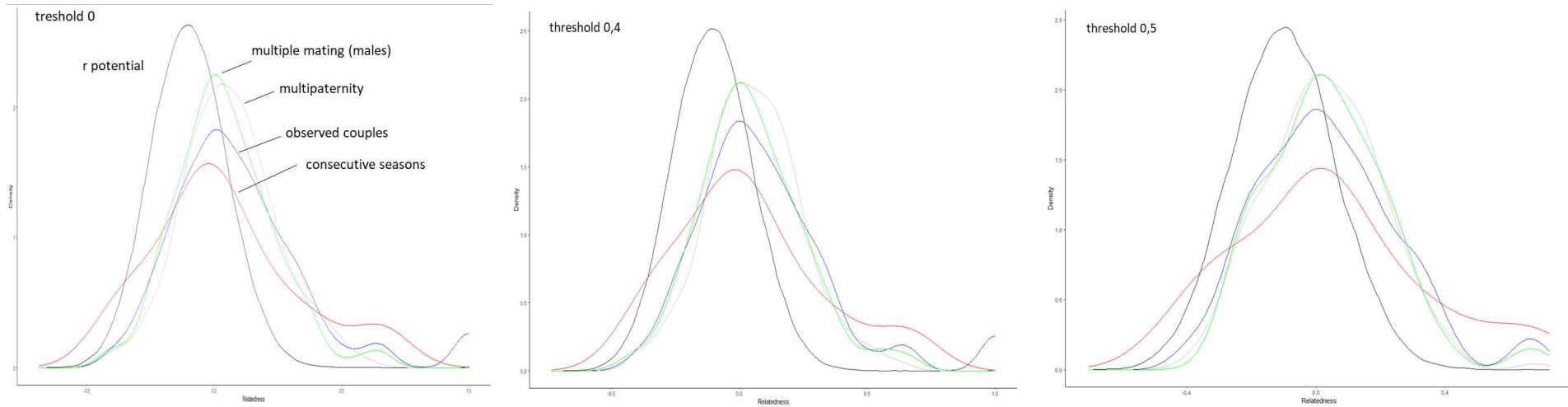
Figure S1. Density of mother-offspring COLONY assignment probabilities for the known mother-offspring relationships of our dataset, and different sets of loci. This calibration made with 58 mother genotypes and 105 hatchling genotypes. True motherhood is represented with the blue line, type II errors are represented with the red line (i.e. “false” motherhood). (A) using the 23 microsatellite markers of Dolfo et al. (2023). (B) using only 20 of these markers. (C) using only the markers that do not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium. See below the list of markers for (A), (B), (C).

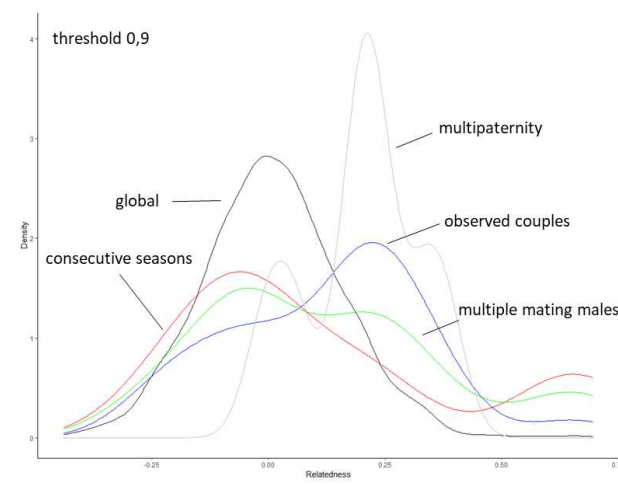
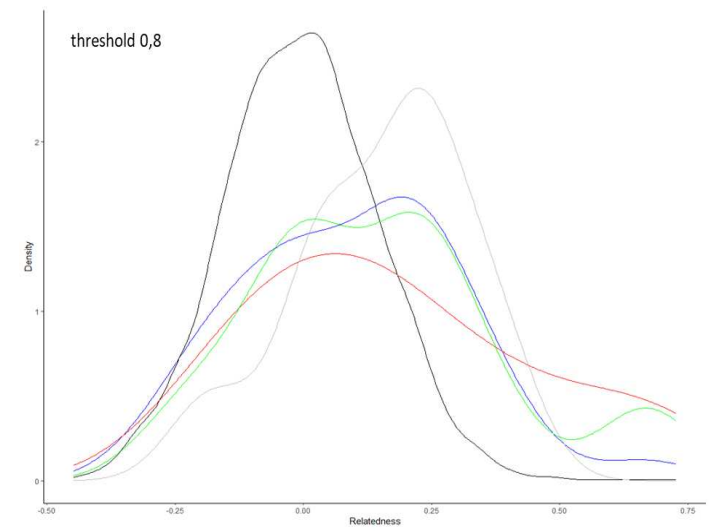
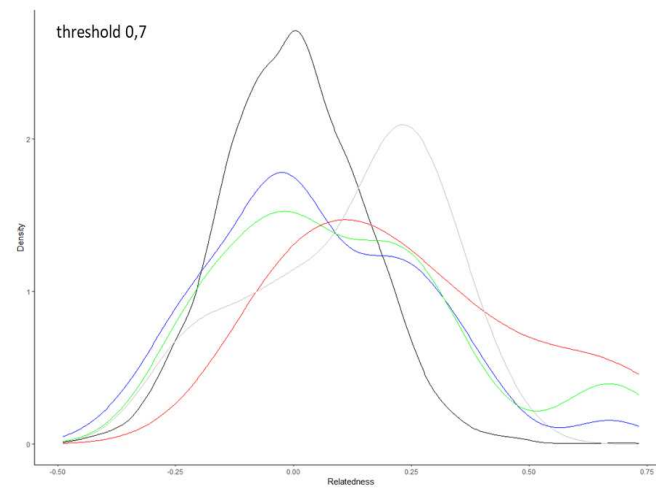
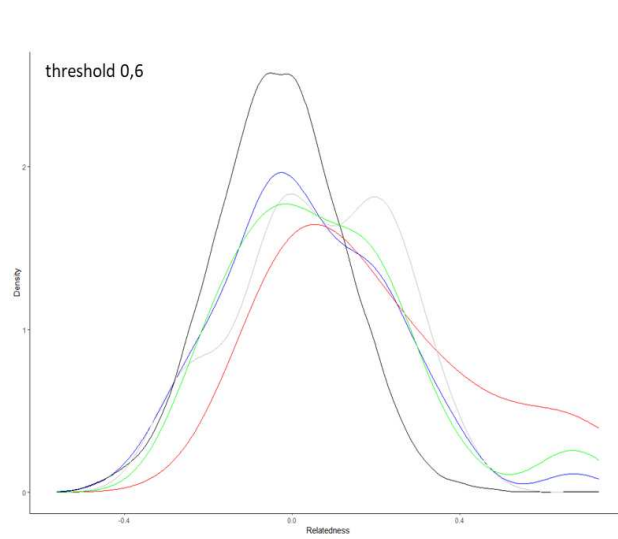
Table S1. List of microsatellite markers used in simulations (A), (B), and (C). The markers are those described in Dolfo et al. (2023)

Simulation (A) – 23 markers	Simulation (B) – 20 markers	Simulation (C) - 14 markers
CMY03	CMY03	CMY03
CMY04	CMY04	CMY04
CMY08	CMY08	CMY08
CMY09	CMY09	CMY16
CMY10	CMY10	CMY17
CMY11	CMY11	CMY20
CMY14	CMY14	CMY21
CMY15	CMY15	CMY22
CMY16	CMY16	CMY25
CMY17	CMY17	CMY27
CMY18	CMY18	CMY29
CMY20	CMY20	CMY32
CMY21	CMY21	CMY35
CMY25	CMY25	CMY45
CMY26	CMY26	
CMY27	CMY27	
CMY29	CMY29	
CMY32	CMY33	
CMY33	CMY45	
CMY45		
CMY19		
CMY22		
CMY35		

Supplementary data S2. Number of parents and relatedness levels for different probability thresholds applied on loci of reconstructed parent genotypes. Probability of 0.8 was chosen as a cut-off for the rest of the analyses.

probability thresholds for locus of reconstructed parent genotypes	nb females	nb males	multipaternity rate	nb nests with multipaternity	OSR	r potential couples			r observed couples			% r > 0.5		% 0.25 < r < 0.5		r females nesting in consecutive seasons			r multiple mating for males			r multipaternity		
						mean r	1st Qu.	3rd Qu.	mean r	1st Qu.	3rd Qu.	observed	potential	observed	potential	mean r	1st Qu.	3rd Qu.	mean r	1st Qu.	3rd Qu.	mean r	1st Qu.	3rd Qu.
0	197	259	30%	154	1.31	-0.0986	-0.2020	0.0010	0.0995	-0.0561	0.2011	5%	0.05%	14%	1%	0.03865	-0.12005	0.162	0.04059	-0.0824	0.143	0.06076	-0.07078	0.1736
0.4	191	251	30%	153	1.31	-0.1067	-0.2126	-0.0001	0.0962	-0.0546	0.1978	6%	0.05%	13%	1%	0.03615	-0.13887	0.16	0.04685	-0.0818	0.1809	0.05962	-0.0697	0.1821
0.5	138	168	20%	128	1.22	-0.0987	-0.2095	0.0088	0.0224	-0.1028	0.1370	1%	0.03%	11%	2%	0.04	-0.14095	0.17	0.04	-0.09	0.16	0.03	-0.10	0.14
0.6	71	68	14%	103	0.96	-0.0296	-0.1326	0.0730	0.0409	-0.0805	0.1919	2%	0.08%	13%	3%	0.1986	0.00635	0.3	0.07274	-0.0832	0.20158	0.05995	-0.0516	0.20515
0.7	54	48	11%	95	0.89	-0.0003	-0.1049	0.0999	0.0546	-0.0727	0.2061	3%	0.16%	16%	5%	0.23682	0.05362	0.3597	0.1087	-0.0505	0.2401	0.1152	-0.0167	0.2401
0.8	31	27	7%	69	0.87	-0.0031	-0.1036	0.0939	0.0966	-0.0637	0.2204	3%	0.17%	17%	4%	0.2938	0.06441	0.03623	0.14304	-0.00545	0.24838	0.1621	0.04955	0.23845
0.9	20	17	8%	52	0.85	0.0097	-0.0897	0.1044	0.1289	-0.0276	0.2405	4%	0.30%	21%	5%	0.1199	-0.0487	0.2088	0.1305	-0.0487	0.2405	0.1999	0.1528	0.2545





Supplementary data S3. Correlation between fitness parameters in the clutches and relatedness or multipaternity.

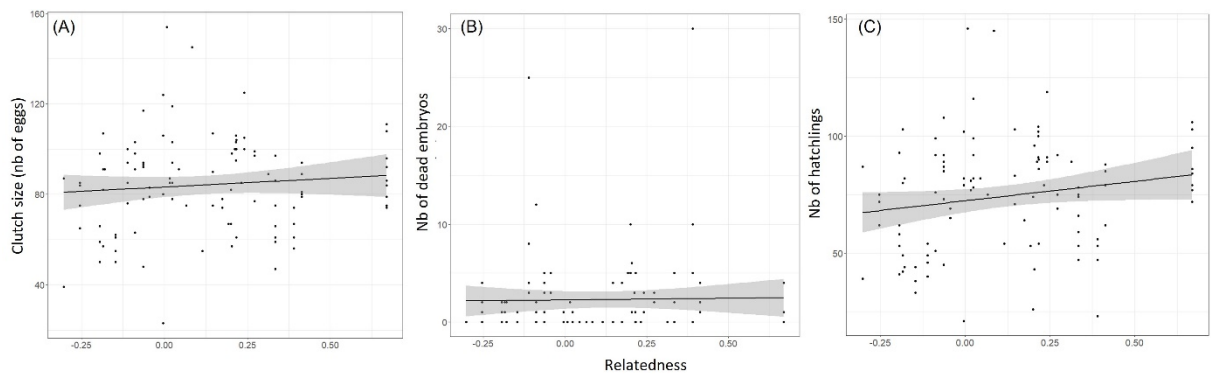


Figure S3.1 Correlation between relatedness of parent pairs and different fitness parameters in the clutches: (A) number of eggs, (B) number of dead embryos, (C) number of hatchlings.

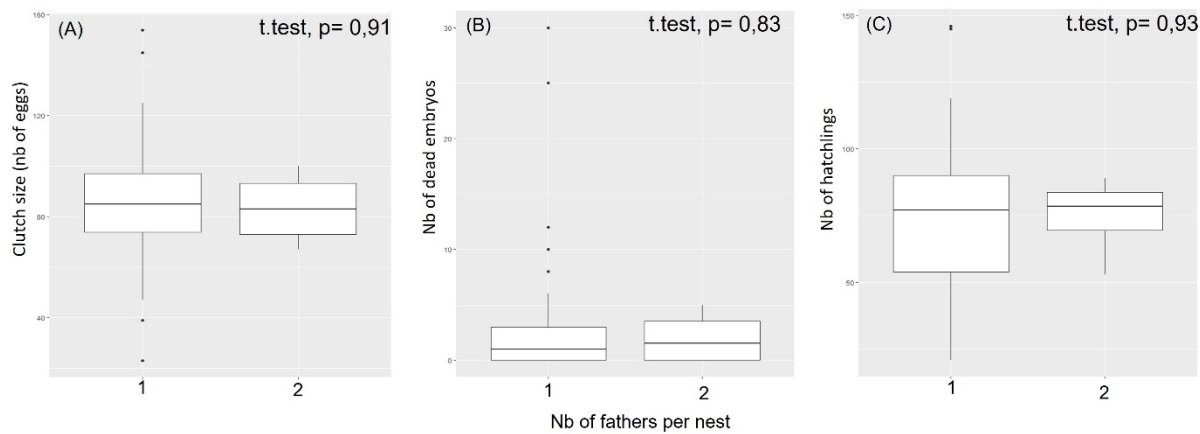


Figure S3.2 Correlation between the number of fathers per nest (i.e. multipaternity) and different fitness parameters in the clutches: (A) number of eggs, (B) number of dead embryos, (C) number of hatchlings.

Supplementary data S4. Number of nests per female within a single season

Nb female	Laid # nests
8	1
8	2
5	3
9	4
5	5
1	8
1	10

Supplementary data S5. Parameters for all nests analyzed in Chapter V.

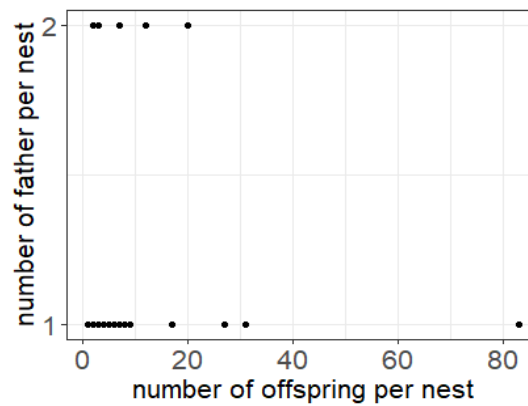
Table S5. Parameter for all nests analyzed in Chapter V. r: relatedness, #: number of.

MotherID	FatherID	r	laying date	season	nest	# genotyped offspring	# total offspring	# successful hatchlings	# dead embryos
CMY0188	*133	0.3342	31/01/2015	1415	1415_ONE13	8	59	59	0
CMY0188	*133	0.3342	13/02/2015	1415	1415_ONE14	9	NA	NA	NA
CMY0188	*133	0.3342	24/02/2015	1415	1415_ONE15	7	NA	NA	NA
CMY0188	*133	0.3342	06/03/2015	1415	1415_ONE16	1	NA	NA	NA
CMY0188	*133	0.3342	17/03/2015	1415	1415_ONE17	6	NA	NA	NA
CMY0188	*133	0.3342	08/11/2014	1415	1415_ONE2	17	66	66	0
CMY0188	*133	0.3342	07/12/2014	1415	1415_ONE6	6	47	47	0
CMY0188	*133	0.3342	18/12/2014	1415	1415_ONE8	12	NA	NA	NA
CMY0188	*129	0.0656	18/12/2014	1415	1415_ONE8	12	NA	NA	NA
CMY0188	*133	0.3342	31/12/2014	1415	1415_ONE9	7	75	75	0
CMY0188	*129	0.0656	31/12/2014	1415	1415_ONE9	7	75	75	0
CMY0188	*133	0.3342	18/10/2014	1415	1415_ORO12	3	NA	NA	NA
CMY0250	*135	0.3132	04/11/2014	1415	1415_ORO38	83	89	89	0
CMY0247	*137	-0.303	30/11/2014	1415	1415_ORO83	9	39	39	0
CMY0247	*137	-0.303	30/11/2014	1415	1415_ORO84	1	87	87	0
CMY3466	*172	0.084	29/11/2015	1516	1516_ONE21	27	145	145	0
CMY1101	*3	0.0234	28/01/2016	1516	1516_ONE32	1	78	78	0
CMY1102	*4	0.3338	07/10/2016	1617	1617_ONE10	3	86	74	2
CMY1102	*4	0.3338	10/01/2017	1617	1617_ONE104	6	61	53	5
CMY1113	*189	0.2164	11/01/2017	1617	1617_ONE106	1	61	54	0
CMY1104	*3	0.6698	11/01/2017	1617	1617_ONE109	4	84	79	1
CMY1102	*4	0.3338	23/01/2017	1617	1617_ONE112	3	NA	NA	NA
CMY1113	*189	0.2164	03/02/2017	1617	1617_ONE115	1	100	86	0
CMY1105	*8	0.4135	05/02/2017	1617	1617_ONE116	2	89	85	2
CMY1105	*8	0.4135	16/02/2017	1617	1617_ONE117	1	79	62	4
CMY1100	*183	0.2153	07/10/2016	1617	1617_ONE12	4	106	104	0
CMY1104	*3	0.6698	09/10/2016	1617	1617_ONE14	3	75	72	1
CMY1103	*185	-0.0043	09/10/2016	1617	1617_ONE15	2	124	102	1
CMY1100	*183	0.2153	29/08/2016	1617	1617_ONE2	3	95	91	0
CMY1100	*183	0.2153	20/10/2016	1617	1617_ONE24	3	103	102	1
CMY1103	*185	-0.0043	22/10/2016	1617	1617_ONE26	1	80	79	0
CMY1104	*3	0.6698	23/10/2016	1617	1617_ONE28	3	79	77	1
CMY1105	*8	0.4135	24/10/2016	1617	1617_ONE29	3	80	79	1
CMY1103	*185	-0.0043	29/08/2016	1617	1617_ONE3	1	106	82	0
CMY1113	*189	0.2164	27/10/2016	1617	1617_ONE31	3	104	90	5
CMY1101	*3	0.0234	27/10/2016	1617	1617_ONE32	2	119	116	1
CMY1103	*185	-0.0043	NULL	1617	1617_ONE34	1	NA	NA	NA
CMY1104	*3	0.6698	04/11/2016	1617	1617_ONE37	2	86	86	0
CMY1100	*183	0.2153	12/09/2016	1617	1617_ONE4	3	100	100	0
CMY1101	*3	0.0234	08/11/2016	1617	1617_ONE43	1	94	92	1
CMY1101	*3	0.0234	21/09/2016	1617	1617_ONE5	2	NA	NA	NA
CMY1101	*3	0.0234	21/11/2016	1617	1617_ONE56	1	103	99	1
CMY1104	*3	0.6698	21/11/2016	1617	1617_ONE57	1	74	77	1
CMY1105	*8	0.4135	28/11/2016	1617	1617_ONE61	2	81	79	1
CMY1103	*185	-0.0043	05/12/2016	1617	1617_ONE72	1	23	21	0
CMY1104	*3	0.6698	05/12/2016	1617	1617_ONE73	1	96	95	0
CMY1105	*8	0.4135	21/12/2016	1617	1617_ONE91	1	94	88	1
CMY1104	*3	0.6698	30/12/2016	1617	1617_ONE97	2	111	103	4
#75	*194	0.146	08/01/2017	1617	1617_ORO113	1	75	71	0
CMY1102	*4	0.3338	09/01/2017	1617	1617_ORO118	1	97	78	0
#75	*194	0.146	07/02/2017	1617	1617_ORO136	2	90	83	4
CMY1196	*168	0.0076	20/12/2016	1617	1617_TIA114	1	154	146	0
CMY1104	*3	0.6698	08/01/2017	1617	1617_TIA176	1	92	84	1
CMY1101	*3	0.0234	21/11/2016	1617	1617_TIA56	1	85	82	0
#75	*194	0.146	01/12/2016	1617	1617_TIA72	3	107	103	0
#106	*57	-0.1114	30/11/2017	1718	1718_HORO14	2	94	54	3
#106	*57	-0.1114	09/12/2017	1718	1718_HORO16	2	100	40	25
#106	*57	-0.1114	22/12/2017	1718	1718_HORO21	2	85	49	4
#106	*57	-0.1114	28/12/2017	1718	1718_HORO23	2	76	46	8
#15	*4	0.2037	02/01/2018	1718	1718_HORO24	1	98	96	1
CMY1104	*3	0.6698	18/12/2017	1718	1718_ONE104	1	108	106	1
CMY1105	*8	0.4135	22/12/2017	1718	1718_ONE113	1	NA	NA	NA
CMY1113	*189	0.2164	22/12/2017	1718	1718_ONE115	1	NA	NA	NA
CMY1384	*62	0.2405	17/02/2018	1718	1718_ONE197	3	100	89	3
CMY1384	*53	0.2121	17/02/2018	1718	1718_ONE197	3	100	89	3
CMY1384	*62	0.2405	06/03/2018	1718	1718_ONE207	2	105	91	1
CMY1101	*3	0.0234	12/11/2017	1718	1718_ONE32	1	NA	NA	NA
CMY1384	*62	0.2405	21/11/2017	1718	1718_ONE52	1	125	119	1

Table S5. Continued.

MotherID	FatherID	r	laying date	season	nest	# genotyped offspring	# total offspring	# successful hatchlings	# dead embryos
CMY1104	*3	0.6698	30/11/2017	1718	1718_ONE70	1	NA	NA	NA
CMY1101	*3	0.0234	02/12/2017	1718	1718_ONE73	1	NA	NA	NA
#75	*194	0.146	25/11/2017	1718	1718_ORO119	1	NA	NA	NA
#15	*4	0.2037	10/11/2017	1718	1718_RIM8	4	57	43	6
CMY2419	*53	0.3907	02/01/2019	1819	1819_HONU15	2	67	53	5
CMY2419	*62	0.1928	02/01/2019	1819	1819_HONU15	2	67	53	5
CMY2419	*53	0.3907	02/01/2019	1819	1819_HONU20	1	74	47	10
CMY2419	*53	0.3907	18/02/2019	1819	1819_HONU25	2	61	56	0
CMY2419	*53	0.3907	19/12/2018	1819	1819_ONE18	2	56	23	30
CMY2416	*53	-0.1945	01/12/2018	1819	1819_TIA14	1	50	41	0
CMY2417	*57	-0.2543	02/01/2019	1819	1819_TIA38	1	65	62	0
CMY2416	*53	-0.1945	09/01/2019	1819	1819_TIA42	1	66	62	0
CMY2417	*57	-0.2543	13/01/2019	1819	1819_TIA43	2	84	75	2
CMY2416	*53	-0.1945	12/01/2019	1819	1819_TIA44	1	98	93	1
CMY2416	*53	-0.1945	20/01/2019	1819	1819_TIA49	3	66	58	2
CMY2417	*57	-0.2543	25/01/2019	1819	1819_TIA52	1	75	72	1
CMY2416	*53	-0.1945	01/02/2019	1819	1819_TIA56	2	59	53	1
CMY2417	*57	-0.2543	04/02/2019	1819	1819_TIA57	2	85	75	4
CMY2745	*51	-0.0642	30/12/2019	1920	920_HORO12	2	48	45	3
#18	*10	0.2323	11/01/2020	1920	920_HORO13	2	85	79	0
CMY2745	*51	-0.0642	11/01/2020	1920	920_HORO13	2	93	85	5
#18	*46	0.0156	15/02/2020	1920	920_HORO16	5	87	81	2
CMY2745	*51	-0.0642	07/10/2019	1920	1920_HORO27	3	78	73	5
CMY2730	*10	-0.0446	09/11/2019	1920	1920_ONE14	2	83	65	5
CMY2744	*168	0.1149	30/11/2019	1920	1920_ONE18	1	55	54	0
CMY2743	*36	0.2003	18/02/2020	1920	1920_ONE26	31	67	26	10
CMY2745	*51	-0.0642	13/11/2019	1920	1920_ORO65	1	92	89	1
CMY2730	*10	-0.0446	24/08/2019	1920	1920_RIM1	1	79	69	3
CMY2734	*10	0.272	22/12/2019	1920	1920_TIA145	5	NA	NA	NA
#18	*46	0.0156	28/12/2019	1920	1920_TIA152	1	85	77	2
CMY2734	*10	0.272	30/12/2019	1920	1920_TIA166	3	99	75	3
CMY2734	*10	0.272	04/10/2019	1920	1920_TIA4	1	77	69	3
CMY2734	*10	0.272	11/11/2019	1920	1920_TIA51	1	97	92	2
CMY2743	*36	0.2003	04/12/2019	1920	1920_TIA94	3	82	74	5
CMY3476	*40	0.174	25/09/2020	2021	2021_HONU5	3	74	64	4
CMY3477	*112	-0.0635	15/12/2020	2021	021_HORO18	6	117	108	4
CMY3477	*112	-0.0635	10/01/2021	2021	021_HORO22	3	94	92	0
CMY3477	*112	-0.0635	22/01/2021	2021	021_HORO23	2	93	87	1
CMY3493	*236	-0.1471	04/01/2021	2021	2021_ONE106	1	50	33	0
CMY3478	*95	-0.0882	17/01/2021	2021	2021_ONE120	2	103	99	0
CMY3493	*236	-0.1471	17/01/2021	2021	2021_ONE121	2	62	38	1
CMY3467	*76	-0.1842	01/10/2020	2021	2021_ONE16	3	91	80	2
CMY3468	*97	-0.18	07/10/2020	2021	2021_ONE17	20	91	82	0
CMY3468	*337	0.0442	07/10/2020	2021	2021_ONE17	20	91	82	0
CMY3467	*76	-0.1842	16/10/2020	2021	2021_ONE22	1	107	103	1
CMY3476	*40	0.174	09/09/2020	2021	2021_ONE3	7	78	64	0
CMY3467	*76	-0.1842	10/09/2020	2021	2021_ONE4	1	82	49	2
CMY3467	*76	-0.1842	12/11/2020	2021	2021_ONE44	2	57	42	2
CMY3468	*97	-0.18	13/11/2020	2021	2021_ONE46	2	91	44	2
CMY3478	*95	-0.0882	20/11/2020	2021	2021_ONE52	2	98	92	2
CMY3493	*236	-0.1471	27/11/2020	2021	2021_ONE70	1	55	44	0
CMY3493	*236	-0.1471	09/12/2020	2021	2021_ONE79	1	61	44	0
CMY3478	*95	-0.0882	29/10/2020	2021	2021_ONE94	1	63	51	1
CMY3478	*95	-0.0882	24/12/2020	2021	2021_ONE97	2	91	76	12

Supplementary data S6. Number of reconstructed fathers per nest against number of offspring per nest (clutch size)



Supplementary data S7. Projection of females and reconstructed males of Tetiaroa in the PCoA showing three populations in French Polynesia (Dolfo et al., in prep)

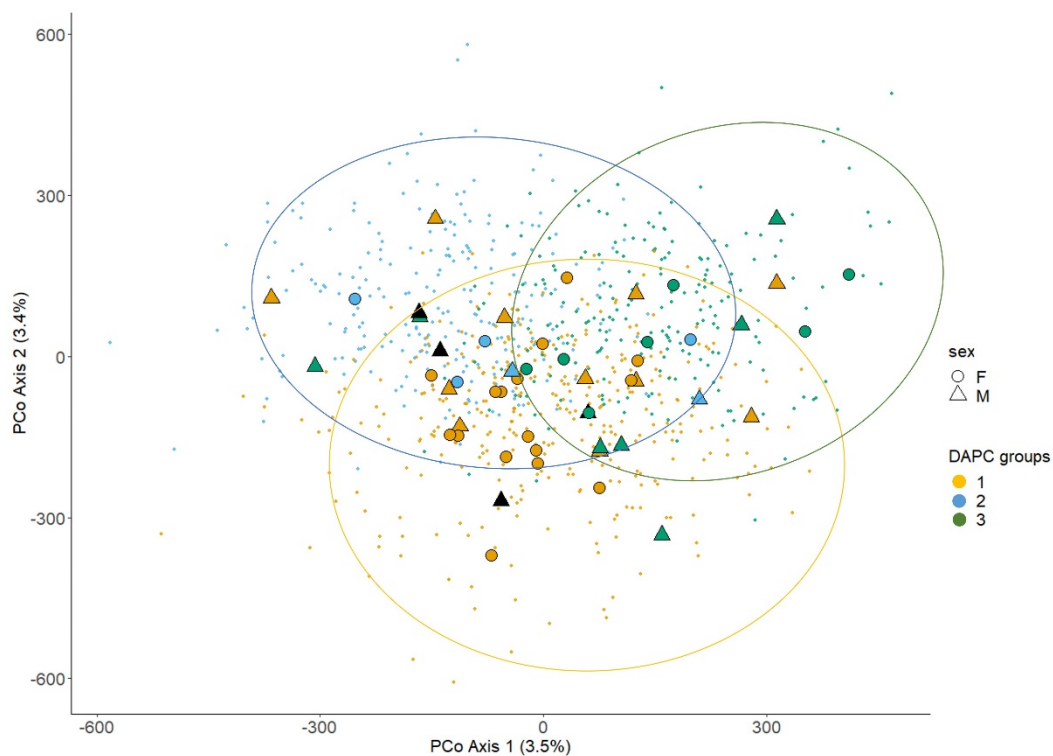


Figure S7. Reconstructed males are indicated with triangles, females are shown with circles. The individuals used in this PCoA are indicated with small dots and cluster into three groups, materialized with circles and different colors. PCoA groups are those found by Dolfo et al. (in prep). The females emphasized here were included in this initial PCoA analysis. Reconstructed males were assigned the group in which the female they mated with was found. Black triangles represented males that mated with females belonging to group 1 and group 2.

RÉSUMÉ

La tortue verte (*Chelonia mydas*) est une espèce migratrice menacée dont les femelles pondent sur leur plage de naissance. Ce comportement de natal homing conduit à l'émergence de populations génétiquement différenciées. La Polynésie française est une zone de ponte et de forte diversité génétique pour cette espèce, et se situe au centre de sa répartition dans l'océan Pacifique, mais aucune étude n'a dressé l'état des lieux des populations sur ce territoire jusqu'à présent. Cette thèse caractérise les populations de tortue verte en Polynésie française par des approches génétiques complémentaires utilisant des marqueurs ADN mitochondriaux et nucléaires sur plus de 1500 individus échantillonnés entre 2008 et 2021.

Dans un premier temps, ce travail se focalise sur l'étude de la structure génétique des populations en Polynésie française et sur leur connectivité avec les autres populations du Pacifique. Deux populations distinctes avec une faible différenciation génétique ont été identifiées sur le territoire avec le marqueur mitochondrial utilisé, correspondant à des zones de ponte situées dans les parties Est et Ouest de l'archipel de la Société. Avec ce même marqueur, une isolation génétique par rapport aux autres populations du Pacifique a été mise en lumière, ainsi que l'origine locale des juvéniles présents sur le territoire. Dans un deuxième temps, une structure génétique plus complexe, composée de trois populations et sans lien avec une organisation spatiale ni avec la structure mitochondriale, a été détectée avec les marqueurs nucléaires microsatellites. Les facteurs conduisant à une telle structure restent à ce jour inexpliqués et plusieurs hypothèses sont discutées. Enfin, les stratégies de reproduction ont été étudiées sur l'île principalement échantillonnée, Tetiaroa. Le génotypage de nombreux individus sur les marqueurs microsatellites couplé à des analyses de parenté, ont permis de mettre en évidence un taux de consanguinité élevé sur cette île, des choix de reproduction non aléatoire, et une certaine plasticité dans les comportements reproducteurs attendus pour l'espèce. Ces éléments permettent une meilleure compréhension du fonctionnement des populations de tortue verte en Polynésie française, et pourront venir en appui aux décisions de gestions mises en place par la Direction de l'Environnement de Polynésie française.

MOTS-CLÉS

Chelonia mydas, Polynésie française, génétique des populations, structure des populations, dynamiques de reproduction, conservation

ABSTRACT

The green sea turtle (*Chelonia mydas*) is an endangered migratory species whose females nest on their natal beach. This natal homing behavior leads to the emergence of genetically differentiated populations. French Polynesia is a nesting area of high genetic diversity for this species and lies at the center of its distribution in the Pacific Ocean. However, a significant knowledge gap in the structure and connectivity of its populations remains. This thesis characterizes the green turtle populations in French Polynesia with complementary genetic approaches using the amplification of mitochondrial and nuclear DNA markers on more than 1500 individuals sampled between 2008 and 2021.

First, this work focuses on studying the genetic structure of green turtle populations in French Polynesia and their connectivity with other populations in the Pacific. Two distinct populations with low genetic differentiation were revealed in the territory with the mitochondrial marker, corresponding to nesting areas located in the eastern and western parts of the Society Archipelago. With this same marker, genetic isolation from other populations in the Pacific was highlighted, as well as the local origin of the juveniles present in the territory. Next, a more complex genetic structure, composed of three populations and unrelated to any spatial organization or mitochondrial structure, was detected with nuclear microsatellite markers. The factors leading to such a structure remain unexplained, and several hypotheses are discussed. Finally, the reproductive strategies were studied on the mainly sampled island, Tetiaroa. Kinship analyses on numerous individuals made it possible to highlight a high inbreeding rate on this island, non-random reproduction choices, and certain plasticity in the reproductive behaviors expected for the species. These elements allow a better understanding of the green turtle populations in French Polynesia. They are valuable in informing management measures implemented by the Direction of the Environment on the territory.

KEYWORDS

Chelonia mydas, French Polynesia, population genetics, population structure, reproduction dynamics, conservation