

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**INFLUENCE DES ROUTES SUR LA VARIANCE DU SUCCÈS REPRODUCTEUR DES
POPULATIONS DE TORTUES PEINTES (*CHRYSEMYS PICTA*)**

par

Claude-Olivier Silva-Beaudry

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M. Sc.)
en sciences biologiques

Septembre 2008

© Claude-Olivier Silva-Beaudry, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**INFLUENCE DES ROUTES SUR LA VARIANCE DU SUCCÈS REPRODUCTEUR DES
POPULATIONS DE TORTUES PEINTES (*CHRYSEMYS PICTA*)**

Présenté par :
Claude-Olivier Silva-Beaudry

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Thérèse Cabana.....président-rapporteur
Dr. Bernard Angers.....directeur de recherche
Dr. Louis Bernatchezmembre du jury

Septembre 2008

SOMMAIRE

La présence des routes en bordure des cours d'eau a été identifiée comme la cause du déclin de plusieurs populations de tortues. Les tortues sont particulièrement affectées par la mortalité sur les routes, notamment par le fait que les femelles sélectionnent souvent les accotements comme site de ponte, engendrant ainsi un faible taux de survie des œufs. Ce dernier pourrait être affecté par l'écrasement des nids par les véhicules, la prédation et/ou des fluctuations de température plus marquées. L'objectif de ce projet était de déterminer si la présence des routes modifie significativement le succès reproducteur des tortues peintes (*Chrysemys picta*) femelles et de voir comment cet effet se traduisait sur la diversité génétique de ces populations. Notre hypothèse était que l'ADN mitochondrial (transmission uniparentale des mitochondries) serait plus affecté que l'ADN nucléaire, puisque le succès reproducteur des femelles serait plus fortement influencé par la présence des routes que celui des mâles.

Afin de répondre à cet objectif, entre 25 et 39 individus par population ont été capturés pour un total de 252 tortues. Huit populations ont été échantillonnées dans trois régions différentes (Estrie, Montréal, Outaouais). Chaque individu a été génotypé à l'aide de neuf marqueurs microsatellites hypervariables. Par la suite, le succès reproducteur (moyenne, variance et coefficient de variation) des femelles provenant de populations situées à proximité de routes a été comparé à celui des populations venant de milieu naturel.

Les résultats supportent cette hypothèse et démontrent que les femelles pondant aux abords des routes ont une diversité génétique mitochondriale plus faible, ainsi qu'une variance et un coefficient de variation du succès reproducteur supérieurs à ceux des femelles pondant en milieu naturel. À long-terme, bien que la moyenne du succès reproducteur soit plus élevée, la tendance observée pour la diversité génétique, la variance et le coefficient de variation des populations perturbées pourraient entraîner une diminution de la capacité d'adaptation, augmentant du même coup leur probabilité d'extinction. Notre étude a enfin démontré que l'ensemble des populations proviennent

d'un seul refuge glaciaire et que la présence des routes pouvait affecter le succès reproducteur des femelles à différents niveaux.

Des mesures visant à empêcher les femelles de pondre aux abords des routes pourraient aider au recrutement des populations perturbées. Puisque la méthodologie adoptée lors de cette étude est rapide, peu coûteuse et fiable, elle pourrait également confirmer si les routes ont un effet similaire sur le succès reproducteur d'autres espèces de tortues.

Mots clés : *Chrysemys picta*, tortue peinte, route, variance du succès reproducteur, taille efficace, diversité génétique, microsatellite, ADN mitochondrial

SUMMARY

The mortality caused by the presence of roads close to lakes is considered to be a major factor affecting the demography of freshwater turtles. Female turtles often select the verge of roads as hatching sites, which results in a low level of egg survival as a consequence of higher predation, marked temperature fluctuations and/or impacts by vehicles. The objective of this study was to determine whether the presence of roads significantly affects the reproductive success of female painted turtles (*Chrysemys picta*) and how this effect is translated on the genetic diversity of the populations. Our hypothesis was that the diversity of mitochondrial DNA (strict maternal inheritance) would be more affected than the diversity of nuclear DNA, since the reproductive success of females was thought to be more influenced by the presence of roads than that of males.

Between 25 to 39 individuals per population were captured for a total of 252 turtles. Eight populations were sampled in three regions (Eastern Townships, Montreal, Outaouais). We took advantage of the presence of nine hypervariable markers (microsatellites) in both the nuclear and the mitochondrial DNA of painted turtles to estimate the reproductive success. The reproductive success (average, variance and coefficient of variation) of females in perturbed populations was compared to the one of females living in natural areas.

Altogether, the results obtained supported our hypothesis and showed that female painted turtles laying their eggs near roads had a lower mitochondrial genetic diversity and a higher variance and coefficient of variation in reproductive success than those nesting in natural environments. In a long-term perspective, even though the mean in reproductive success is higher, the trend observed for the genetic diversity, the variance and the coefficient of variation of the perturbed populations could lead to a reduction in adaptation capacity, which would increase their probability of extinction. Finally, our analyses indicated that all the individuals originated from the same glacial refuge and that roads could affect the reproductive success of females to a different extents.

Preventing females from laying their eggs on the edge of roads may help maintain recruitment in perturbed populations. Since the methodology suggested is quick, inexpensive and reliable, it should confirm if roads have a similar effect on the reproductive success of other species of turtles.

Key words : *Chrysemys picta*, painted turtle, road, variance in reproductive success, effective population size, genetic diversity, microsatellite, mitochondrial DNA.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Summary	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et des abréviations	xi
Dédicace	xiii
Remerciements	xiv
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Effets des routes	2
1.1.1 Prédation	5
1.1.2 Température	6
1.1.3 Entretien des routes	6
1.2 Écologie de la tortue peinte	7
1.3 Génétique des populations	8
1.4 Marqueurs génétiques	10
1.4.1 Marqueurs mitochondriaux	11
1.4.2 Marqueurs nucléaires	11
1.4.3 Les microsatellites	12
1.5 Objectif de l'étude	12
Chapitre 2 : Impact of roads on the variance in reproductive success of painted turtles (<i>Chrysemys picta</i>)	14
Déclaration des coauteurs d'un article	15
Abstract	16
2.1 Introduction	17

2.2 Materials and Methods	19
2.2.1 Sampling	19
2.2.2 Genetic analyses	22
2.2.3 Statistical analyses	23
2.2.3.1 Genetic diversity	23
2.2.3.2 Population structure	23
2.2.3.3 Demographic parameters	23
2.2.3.4 Inferring the reproductive success	24
2.3 Results	25
2.3.1 Population characteristics	25
2.3.2 Natural vs perturbed	26
2.4 Discussion	29
2.4.1 Effect of roads on the reproductive success of females	29
2.4.2 Perspectives and conservation implications	31
2.5 Acknowledgements	33
Chapitre 3 : Conclusion	34
Références	40
Annexe	61
Appendix I	62

LISTE DES TABLEAUX

Table I. Characteristics of the sampled sites. 21

Table II. Summary of the data for six microsatellite loci for the eight painted turtle populations (Pop) : number of individuals analysed (n), capture efforts (Cpt/efforts), sex-ratio ($m : f$), observed heterozygosity (H_o), number of alleles (A), allelic richness (Ar), gene diversity (H_E), relatedness (R) and haplotypic diversity (h) . The mitochondrial variance in reproductive success (mtDNA-Var), the variance in reproductive success (Var), the average reproductive success measured as the number of descendants per female (Aver), the number of putative mothers (Mo) and the coefficient of variation (C.V.) are also given. The non-homoscedastic variables were tested with a Wilcoxon signed rank test and identified in bold, while the others were tested with an ANOVA tested with permutations. 27

Table III. Partition of the genetic diversity as estimated by AMOVA analyses for eight populations of painted turtles and grouped according to their region of origin. 28

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Location of the study sites in Quebec, Canada. The close-ups represent the location of the eight sampling sites in three different regions : Eastern Townships, Montreal, Outaouais. 20

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

α	Seuil alpha
A	Nombre d'allèle / Number of allele
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
AMOVA	Analyse of molecular variance
A_R	Richesse allélique / Allelic richness
Aver	Average reproductive success
BI	Île-Bizard
bp	Base pairs
°C	Degré Celsius
CA	Calumet
CB	Campbell's Bay
cm	Centimètre
COI	Cytochrome C Oxidase subunit I
cor	Corrélation
Cpt/efforts	Capture efforts
CU	Curtis
C.V.	Coefficient of variation
d.f.	Degree of freedom
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleic triphosphates
F_{ST}	Représente la proportion de diversité génétique retrouvée entre les populations par rapport à la diversité totale
GO	Gowan
h	Haplotypic diversity
H_E	Diversité génétique / Gene diversity
H_0	Observed heterozygotes
IAM	Infinite allele model
km	Kilomètre

L	Litre
LA	LAMRAC
μ l	Microlitre
m	Mètre
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
min	Minute
mM	Millimolaire
Mo	Number of putative mothers
mtDNA	Mitochondrial desoxynucleotide acid
mtDNA-Var	Mitochondrial variance in reproductive success
n	Number of individuals analysed
N	Taille de recensement
<i>N_e</i>	Taille efficace
ng	Nanogramme
nM	Nanomolaire
p	Probability
PCR	Polymerase chain reaction / Réaction de polymérisation en chaîne
Pop	Population
R	Relatedness
s	Seconde
SC	Schwartz
SMM	Stepwise mutation model
SO	Lac des Soeurs
Taq	Thermus aquaticus
TPM	Two-phase model
U	Unité
Var	Variance in reproductive success
vs	Versus
W	Wilcoxon signed rank statistic
10X	Dix fois concentré
χ^2	Test du Chi-carré

It's the moment that you think you can't
You'll discover that you can
The power of the dream

L. Thompson

REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes remerciements à mon directeur de maîtrise, Bernard Angers, à la fois présent et disponible, pour son soutien, son aide, mais aussi pour le partage de ses connaissances et de son expérience.

Je remercie également Frédéric, Jean-François, Martin, Philippe et Stéphanie avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler sur le terrain, peu importe les conditions.

Enfin, un grand merci à tous les membres du laboratoire PGEM, ainsi qu'à Alex, Caro, Carine, Cath, Claude, François, Gab, Isa et Mylene pour leurs sérieux coups de main et leurs nombreux encouragements tout au long de ma maîtrise.

1. INTRODUCTION

1.1 Effets des routes

Au cours du dernier siècle, l'accroissement des activités humaines et l'urbanisation grandissante ont engendré une augmentation préoccupante du taux d'extinction des espèces (Wilson 1988). Cette anthropisation n'a pas cessé d'entraîner des modifications importantes et une dégradation des écosystèmes. Par exemple, le développement routier nécessite des infrastructures de grande envergure engendrant de multiples impacts sur l'environnement (Wilson 1988; Fahrig *et al.* 1995; Forman et Alexander 1998; Gerlach et Musolf 2000; Forman *et al.* 2003; Ramp *et al.* 2006). En empiétant sur les habitats naturels, il divise les écosystèmes, modifie le paysage de façon permanente et est un facteur important de déforestation (Harris 1984; Richardson *et al.* 1997). En plus de dégrader le milieu, le réseau routier entraîne une pollution atmosphérique, sonore et lumineuse pouvant nuire au cycle de vie normal des animaux. En effet, l'éclairage routier peut altérer le rythme circadien des organismes vivant à proximité, en plus de repousser ou d'attirer certaines espèces, notamment les moustiques, les papillons, les mouches et les coléoptères qui recherchent la lumière (Bruderer *et al.* 1999; Eisenbeis et Hassel 2000; Kolligs 2000; Rich et Longcore 2005). De plus, durant l'hiver, l'épandage de sel modifie la composition naturelle des sols. Certains animaux recherchant des minéraux, tels de nombreux cervidés, sont attirés par cette ressource et sont fréquemment victimes de collisions par les véhicules (Groot Bruinderink et Hazebroek 1996; Danielson et Hubbard 1998; Brownlee *et al.* 2000; Knapp 2005). Aussi, le réseau routier participe au réchauffement climatique par les émissions de gaz à effet de serre provenant des véhicules. L'asphalte ayant un fort potentiel de rétention de la chaleur et le déneigement des accotements peuvent produire des modifications locales de la température du sol (Asaeda et Ca 1993). Par exemple, chez les tortues, ces changements de température sont cruciaux puisqu'ils peuvent altérer la survie des rejetons au moment de l'incubation des œufs pondus près des routes (Bobyne et Brooks 1994; Ernst *et al.* 1994; Rhen et Lang 1995).

La perte de connectivité résultant de la présence de routes entre les parcelles d'habitats adéquats isole les différentes populations. La fragmentation qui en résulte a un impact

néfaste sur les espèces requérant de grands espaces non perturbés (Guyot et Clobert 1997; Ricciardi et Rasmussen 1999; Gibbs et Shriver 2002; Aresco 2003). Pour la majorité des espèces, ces routes représentent un obstacle dans leurs mouvements (Forman et Alexander 1998; Malo *et al.* 2004; Saeki et Macdonald 2004). À long terme, les restrictions de mouvements peuvent produire une diminution du flux génique et avoir un impact négatif sur la diversité (Frankham *et al.* 2002) puisque les échanges d'individus entre les populations (immigration et émigration) maintiennent la diversité et la structure des populations (Fahrig et Merriam 1994; Burke *et al.* 1995; Gray 1995; Rubin *et al.* 2001). Dans ces conditions, les populations de faibles effectifs ainsi que celles ayant un faible taux de recrutement sont plus vulnérables aux extinctions locales (Cambray et Bianco 1998; Tucker *et al.* 2001).

Les reptiles font face à plusieurs menaces qui, lorsque conjuguées, sont fréquemment responsables du déclin des populations. Ainsi, la destruction de leurs habitats, les captures illégales, l'augmentation du nombre de prédateurs et l'introduction d'espèces exotiques sont des phénomènes hautement nuisibles pour ces animaux (Dodd *et al.* 1989; Doroff et Keith 1990; Forman et Alexander 1998; King et Julian 2004). De plus, parmi les causes qui menacent plus spécifiquement les populations de tortues, la mortalité sur les routes est souvent mentionnée (Galois et Bonin 1999; Saint-Hilaire 2003). Les tortues sont particulièrement affectées par la mortalité sur les routes, notamment à cause de la lenteur de leurs déplacements et par le fait que les femelles sélectionnent souvent l'accotement des routes comme site de ponte (Haxton 2000; Gibbs et Shriver 2002; Forman *et al.* 2003). Parmi les phénomènes prédominants qui entraînent un risque sur les espèces désignées par le *Plan de rétablissement de cinq espèces de tortues au Québec*, certains sont directement ou indirectement associés aux infrastructures routières (Équipe de rétablissement de cinq espèces de tortues au Québec 2005). Des études récentes ont évalué l'ampleur de ce phénomène où la mortalité causée par les routes représente plus de 10% des effectifs des populations (Gibbs et Shriver 2002). Ce phénomène est accentué lorsque ces dernières sont adjacentes à un milieu humide (Ashley et Robinson 1996; Clevenger *et al.* 2003).

Au Québec, la mortalité de la tortue peinte (*Chrysemys picta*) résultant directement du trafic routier serait peu importante (Desroches et Picard 2007). D'ailleurs, lors d'une étude effectuée en Outaouais au cours des étés 2003 et 2004, une seule tortue peinte victime de la route a été observée (Desroches et Picard 2003, 2006). Toutefois, la présence des routes pourrait avoir un effet beaucoup plus insidieux. Des résultats préliminaires suggèrent de faibles taux de survie des œufs au bord des routes, tel qu'indiqué par un succès reproducteur des femelles plus faible pour une population vivant à proximité de routes comparativement à une population vivant en milieu naturel (Angers et Silva-Beaudry 2006). Le taux de survie des œufs pourrait être affecté par la pollution, l'écrasement des nids par les véhicules, la prédation et/ou des fluctuations de température plus marquées.

Divers facteurs, tels une maturité sexuelle tardive et le succès reproducteur des parents, affectent la survie des tortues peintes (Brooks *et al.* 1991; Heppell *et al.* 1996; Gibbs et Amato 2000). Au Québec, les tortues peintes mâles atteignent la maturité sexuelle vers l'âge de cinq à sept ans et les femelles vers l'âge de huit à dix ans, relativement à une longévité de vingt à quarante ans (Desroches et Rodrigue 2004). Cette particularité de leur cycle de vie, augmente les pressions sur le taux de survie et les risques de mortalité jusqu'au moment de la reproduction (Congdon *et al.* 1993; Desroches et Rodrigue 2004; Marchand et Litvaitis 2004). Il a aussi été prouvé qu'une augmentation du taux de mortalité chez les juvéniles (de la naissance à la maturité sexuelle) peut affecter sérieusement la survie de la population (Congdon *et al.* 1994; Seigel et Dodd 2000). Ce phénomène est amplifié par le fait que les tortues ne sont pas des animaux à reproduction et recrutement densité-dépendante. Ceci signifie qu'un accroissement de mortalité n'est pas compensé par une baisse de l'âge à laquelle les individus atteignent la maturité ni par une hausse de fécondité (Brooks *et al.* 1991; Congdon *et al.* 1994; Seigel et Dodd 2000).

La survie d'une population est déterminée par le succès reproducteur des parents : plus le nombre de parents contribuant aux effectifs des générations suivantes est grand, plus cette population maintiendra sa diversité et pourra s'adapter aux aléas de l'environnement. De plus, afin de maintenir à long terme les populations de tortues

peintes, un fort recrutement est primordial (Congdon *et al.* 1987). En effet, un faible taux de survie des nouveau-nés durant plusieurs années pourrait mettre en péril ces populations (Burke *et al.* 2000; Gibbs et Amato 2000; Mitchell et Klemens 2000).

1.1.1 Prédation

Certaines études ont identifié la prédation comme cause principale de mortalité des œufs chez les tortues du Québec (Burke *et al.* 2000; Browne 2003). Potentiellement à cause de la disponibilité limitée des sites (Moll et Moll 2000), les femelles tendent à pondre de façon regroupée (Schwarzkopft et Brooks 1987). Des recherches ont démontré que le taux de prédation augmente avec le regroupement (Hammer 1969; Burger 1977; Robinson et Bider 1988). En effet, lorsqu'un prédateur découvre un nid, il trouvera quasi assurément les autres nids situés à proximité à l'aide de son odorat (Shirose *et al.* 1995). Au contraire, les nids situés à l'écart ont moins de chances d'être repérés et dévastés (Wilhoft *et al.* 1979; Snow 1982). Plusieurs femelles vont exploiter les sites adjacents aux routes puisque le substrat est adéquat et le sol est meuble. À cause de l'effet corridor (plusieurs nids enlignés), certains ont suggéré que les œufs pondus à proximité des routes seraient plus sujets à la prédation (Temple 1987; May et Norton 1996; Yahner et Mahan 1997; Boulet et Darveau 2000).

Comme prédateur, on retrouve différentes espèces telles le raton-laveur, la moufette rayée, le renard roux ainsi que certains oiseaux (Petokas et Alexander 1980; Temple 1987; Hamilton *et al.* 2002; Feinberg et Burke 2003). Au cours des dernières années, les populations de certains prédateurs ont eu une forte croissance démographique due aux activités humaines (Congdon *et al.* 1987; Ross et Anderson 1990; Mitchell et Klemens 2000; Hamilton *et al.* 2002). Par exemple, le raton-laveur aurait des effectifs 20 fois plus élevés qu'au début du siècle (Desroches et Rodrigue 2004). De plus, la présence de déchets sur le bord des routes attire certains de ces prédateurs, résultant ainsi en une pression accrue sur les œufs de tortues.

1.1.2 Température

Chez les tortues, lors de l'incubation, la température est un facteur crucial (Bobyne et Brooks 1994; Ernst *et al.* 1994; Rhen et Lang 1995). En milieux tempérés, comme ici au Québec, de légers changements de température peuvent affecter considérablement le développement et la survie des rejets (Bull et Vogt 1979; Galbraith et Brooks 1987; Bobyne et Brooks 1994). Par exemple, la température détermine le développement, la croissance et même le sex-ratio des nouveau-nés, une température trop froide ou trop chaude durant l'incubation peut engendrer une mortalité importante et augmenter la fréquence des anomalies.

Sur le bord des routes, l'asphalte se réchauffe durant la journée et libère de la chaleur en soirée (Asaeda et Ca 1993). De plus, le couvert de neige a un fort potentiel d'isolation. Toutefois, il ne demeure pas en place sur l'accotement comme en milieu naturel. Ainsi, ces modifications de la température au niveau du nid pourraient altérer la survie des rejets.

1.1.3 Entretien des routes

Le nivelage des routes et des accotements est une opération qui consiste à enlever une couche de sol pour égaliser la chaussée. Cette méthode altère l'isolation des nids et peut également exposer les œufs à la prédation et à la dessiccation en révélant les œufs à l'air libre (Gammel 1970). Aussi, les véhicules stationnés ou circulant sur les accotements des routes ainsi que la machinerie entretenant les fossés peuvent compacter le sol. Ceci peut directement écraser les nids ou empêcher les jeunes de se frayer un chemin hors des nids lorsque le sol est trop dur (Hamilton *et al.* 2002). Une forte mortalité et une déformation des carapaces des jeunes ont effectivement été observées (Desroches et Picard 2007).

1.2 Écologie de la tortue peinte

Au Québec, on retrouve huit espèces de tortues d'eau douce, toutes de l'ordre des Testudines (Desroches et Rodrigue 2004). Les tortues serpentine (*Chelydra serpentina*) et les tortues peintes (*Chrysemys picta*) sont les deux seules espèces de tortues d'eau douce n'ayant pas le titre d'espèce en péril (Bider et Matte 1994; COSEPAQ 2006). Par ailleurs, la tortue peinte a été choisie comme sujet d'étude en raison de ses hautes densités de populations et de sa grande abondance.

Chrysemys picta s'accouple généralement au printemps. Les femelles peuvent accumuler le sperme de plusieurs mâles pour une période allant jusqu'à quatre ans et il est possible de retrouver différents pères pour une même couvée (Pearse *et al.* 2002). La polyandrie offre une opportunité de compétition spermatique; seuls les spermatozoïdes des mâles de bonne qualité réussiront à féconder les œufs de la femelle. Chez les tortues, ce comportement augmentera donc le succès reproducteur des femelles (Jennions et Petrie 2000; Pearse *et al.* 2001, 2002).

Pour la ponte, les femelles recherchent des milieux ouverts et non recouverts de canopée (Legler 1954; Desroches et Rodrigue 2004). Les bords des routes semblent être des sites adéquats puisque le sol est meuble, composé de sable et de gravier. Les accotements des routes sont donc fréquemment choisis comme site de nidification (Gemmell 1970; Haxton 2000; Browne 2003; Forman *et al.* 2003; Steen et Gibbs 2004). La ponte a habituellement lieu entre la mi-mai et la fin juin de l'année suivante (Birkhead et Moller 1993). Ainsi, la fréquence de reproduction n'est pas annuelle (Congdon *et al.* 1994). Les femelles pondent entre deux et onze œufs qu'elles abandonnent suite à la ponte (Desroches et Rodrigue 2004). En absence de perturbation, celles-ci sont fidèles au même site de nidification durant plusieurs années (Freedberg *et al.* 2005).

L'incubation des œufs est d'une durée de 70 à 80 jours (Smith 1956; COSEPAC 2006) et les nouveau-nés passeront souvent leur premier hiver à l'intérieur du nid à des températures inférieures à zéro (Breitenbach *et al.* 1984; Churchill et Storey 1992; Nagle

et al. 2000). Cette longue période d'incubation impose une pression supplémentaire sur le taux de survie des œufs et les risques de mortalité par écrasement ou par prédation sont prolongés jusqu'au moment de l'éclosion.

L'éclosion a lieu entre la fin de l'été et le début de l'automne et les portées comportent généralement autant de mâles que de femelles (sex-ratio 1:1) (Gibbons 1970; Edmonds et Brooks 1996; Desroches et Picard 2006). Par ailleurs, le sexe des tortues peintes n'est pas déterminé génétiquement. Il peut varier significativement selon les sites de ponte, en raison des températures d'incubation distinctes : les températures d'incubation fraîches produisent des mâles et celles plus élevées, des femelles (Vogt et Bull 1984; Janzen 1994; Desroches et Rodrigue 2004). Par contre, des températures trop froides pourraient nuire au développement des embryons et, par conséquent, à l'éclosion des œufs (Bobyne et Brooks 1994; Standing *et al.* 2000).

1.3 Génétique des populations

La diversité génétique est l'ensemble des variations héritables à l'intérieur et entre les populations et est une condition essentielle au potentiel évolutif des espèces (Frankel et Soule 1981; Frankham *et al.* 2002). Cette dernière se veut le reflet des différents processus démographiques et évolutifs subis par les populations (migration, fluctuation de la taille de la population, mutation, sélection naturelle, stratégie de reproduction) (Estoup *et al.* 1995; Harding *et al.* 2000). L'évolution de la diversité génétique varie entre les populations car les processus dynamiques des gènes dépendent des paramètres démographiques des populations, qui sont à la fois influencés par la variabilité génétique (exemple de consanguinité) et par la capacité de l'habitat (compétition, site de reproduction, alimentation, parasites, prédation). Certaines régions du génome sont très variables et s'expriment différemment d'un individu à l'autre selon les gènes ou les associations de gènes que chacun possède. La comparaison des individus ou des groupes d'individus sur la base des caractères génétiques permet de reconstituer leurs liens de parenté. Les fluctuations des paramètres démographiques des populations laissent une signature détectable au niveau de la diversité génétique. Par exemple, dans une

population où peu de femelles contribuent aux effectifs (variance du succès reproducteur élevée), on observe une faible variabilité génétique au niveau de l'ADN mitochondrial (ADN transmis uniquement par les mères) et une progéniture présentant de haut niveau d'apparentement (Hartl et Clark 1997; Halliburton 2004).

Une population donnée a une certaine taille réelle (N) représentant le nombre total des individus (taille de recensement). Néanmoins, le maintien de la diversité génétique d'une population dépend principalement de sa taille efficace (N_e). Ce paramètre correspond au nombre d'individus qui transmettent leurs gènes à la génération suivante, en tenant compte de leur succès reproducteur et du sex-ratio. La totalité d'une population n'indique pas nécessairement la diversité génétique qui sera transmise d'une génération à l'autre, puisque plusieurs individus ne sont pas en situation de reproduction ou contribuent inégalement à l'effectif des prochaines générations (Meffe 1986). La taille efficace est un paramètre important de la diversité génétique d'une population, puisqu'elle détermine le taux de perte de la variance génétique et celui d'une augmentation de la consanguinité (Frankham 1996).

La taille efficace sera influencée par le succès reproducteur qui se réfère, pour chaque individu, au nombre total de rejetons viables engendrés, ayant la capacité de se reproduire. La survie à moyen et à long terme d'une population est déterminée en grande partie par le succès reproducteur des parents : plus le nombre de parents contribuant aux effectifs des générations suivantes est grand, plus cette population maintiendra une grande diversité et pourra s'adapter aux caprices de l'environnement (Frankel et Soule 1981; Congdon *et al.* 1993; Heppell *et al.* 1996; Frankham *et al.* 2002).

La variance du succès reproducteur indique que certains individus laissent plus de descendants que d'autres. Ceci se traduit par une plus grande probabilité de choisir au hasard deux individus ayant les mêmes parents. Chez les populations perturbées par la présence de routes, on s'attend à un plus faible apport de recrutement pour les sites de nidification sur les accotements des routes comparativement aux sites naturels. En conséquence, les femelles des populations en bordure des routes auraient un succès

reproducteur plus faible que celles en milieu naturel et seraient donc plus menacées. Ceci devrait donc augmenter la variance du succès reproducteur des femelles.

Plusieurs études effectuées au cours des dernières années ont su démontrer qu'une forte variance du succès reproducteur pourrait mener à une perte de diversité néfaste pour la colonie (Westemeier *et al.* 1998; Frankham *et al.* 1999; Bijlsma *et al.* 2000). En effet, on dénote une corrélation positive entre des traits reliés à la capacité d'adaptation et l'hétérozygotie chez plusieurs organismes (England *et al.* 2003; Reed et Frankham 2003). À la longue, une perte de diversité mènera à une réduction de la capacité d'adaptation de la population, ce qui à son tour augmentera les probabilités d'extinction de celle-ci. Ce phénomène peut par exemple engendrer un vortex d'extinction par la présence accrue de l'état homozygote d'allèles récessifs (Tallmon *et al.* 2004). Ces effets peuvent se manifester en l'espace de quelques générations (Amos et Balmford 2001). C'est la capacité d'adaptation des populations et des individus qui leur permet de répondre aux changements survenant dans leur environnement. C'est dans un environnement de stress, souvent infligé aux espèces menacées, qu'une faible diversité génétique peut avoir les répercussions les plus importantes (Gibbs *et al.* 1997; Mundy *et al.* 1997; Wise *et al.* 2002).

1.4 Marqueurs génétiques

Dans le sud du Québec, les populations de tortues se sont installées il y a plusieurs milliers d'années (Desroches et Rodrigue 2004). Par la suite, le bagage génétique a progressivement évolué de façon distincte entre chaque population. Les populations actuelles sont donc génétiquement très différentes les unes des autres, de même qu'elles le sont des populations fondatrices (Avisé 1994; Starkey *et al.* 2003). L'information apportée par les marqueurs génétiques est d'une aide précieuse pour la mise en évidence de tels phénomènes, de même que pour déterminer l'impact des routes sur les différentes populations de tortues. En effet, en plus d'avoir été employé dans le cadre de nombreuses études, l'utilisation de marqueurs génétiques hautement variables est extrêmement utile pour un examen détaillé de la variation génétique et des relations d'apparement entre

individus (Tessier *et al.* 2005; Lippé *et al.* 2006; Lang 2007). Aussi, ces marqueurs permettent d'intégrer l'information génétique cumulée au cours de plusieurs générations comparativement à ce qui peut être obtenu par un estimé ponctuel des méthodes écologiques (capture-marquage-recapture).

1.4.1 Marqueurs mitochondriaux

Les marqueurs mitochondriaux présentent de nombreuses caractéristiques avantageuses pour l'étude des populations (Moritz *et al.* 1987). En effet, ces derniers reflètent l'histoire évolutive des lignées maternelles par la transmission uniparentale des mitochondries (Birky *et al.* 1989, Moritz 1994). Chez les animaux, l'ADN mitochondrial est haploïde et ne subit aucune recombinaison (Avisé *et al.* 1987). De plus, les marqueurs mitochondriaux permettent de souligner les relations phylogénétiques existantes entre les lignées évolutives des différentes populations (Bermingham et Moritz 1998).

1.4.2 Marqueurs nucléaires

Les marqueurs nucléaires sont à transmission biparentale, donc ils nous renseignent sur l'histoire évolutive des deux parents. Ces derniers permettent également de mesurer le degré de «liaison génétique» entre deux individus. Ainsi, le coefficient d'apparentement permet de déterminer les différents types de relations de parenté à l'intérieur de chaque population. Le coefficient d'apparentement entre deux individus, i et j , est égal à la probabilité que deux gènes tirés au hasard au même locus, l'un chez i et l'autre chez j , soient identiques par descendance. En effet, ce coefficient permet de différencier deux individus ayant les mêmes parents (frère-frère), deux individus ayant un parent commun (demi-frère) et deux individus ayant deux parents différents (individus non apparentés). La logique du test repose sur le fait que plus les individus partagent d'allèles en commun, plus leur niveau d'apparentement est élevé. Entre deux frères, tout gène de l'un a 50% de chances d'être aussi présent chez l'autre, tandis qu'entre demi-frère, tout gène de l'un a 25% de chances d'être présent également chez l'autre (Queller et Goodnight 1989;

Blouin *et al.* 1996). Donc, plus il y a d'individus apparentés entre eux, moins il y aura de diversité génétique à l'intérieur de la population.

1.4.3 Les microsatellites

Les microsatellites sont actuellement parmi les marqueurs moléculaires les plus utilisés en génétique des populations et en écologie comportementale (Pearse *et al.* 2001; Gagnon et Angers 2006; Girard et Angers 2006). Ils sont composés de deux à six nucléotides répétés en tandem (Whittaker *et al.* 2003). Ils possèdent également de hauts taux de mutation générant un polymorphisme plus important que celui observé chez les autres marqueurs génétiques. Les microsatellites présentent un taux de mutation de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} unités (Ellegren 1995; Estoup et Angers 1998) favorisant ainsi la formation de nombreux allèles et facilitant les études au niveau individuel.

1.5 Objectif de l'étude

L'objectif de ce projet était de déterminer si la présence des routes modifie significativement le succès reproducteur des femelles des populations de tortues peintes (*Chrysemys picta*) et de voir comment cet effet se traduisait sur la diversité génétique des populations vivant à proximité de celles-ci. Afin de répondre à cet objectif, des populations provenant de marais de superficie comparable situés près et loin des routes ont été échantillonnés. Afin d'établir des liens entre la présence ou l'absence de routes et la structure démographique des populations, nous avons utilisé les outils de la génétique. À l'aide de marqueurs génétiques spécifiques et hautement variables, nous avons comparé le niveau de diversité génétique ainsi que le succès reproducteur (moyenne, variance et coefficient de variation) des femelles de ces différentes populations. Afin d'obtenir un signal intégrant plusieurs générations, le succès reproducteur a été estimé à partir du degré d'apparentement entre les individus (génome nucléaire) et de leur origine maternelle (génome mitochondrial). Si les résultats démontrent un bilan neutre ou positif, il sera possible de conclure que les routes n'ont que peu d'impact sur le succès

reproducteur des populations de tortues. Dans le cas contraire, les résultats permettront d'élaborer des mesures d'atténuation et de compensation adéquates.

**2. IMPACT OF ROADS ON THE VARIANCE IN REPRODUCTIVE SUCCESS
OF PAINTED TURTLES (*CHRYSEMYS PICTA*)**

ABSTRACT

Freshwater turtles are particularly affected by roads since females often select berms as nesting sites. The purpose of this research is to determine whether the presence of roads significantly modifies the reproductive success of females painted turtles (*Chrysemys picta*) and how this effect is translated on the genetic diversity of the populations. Our hypothesis was that the diversity of mitochondrial DNA (strict maternal inheritance) will be more affected than the diversity of nuclear DNA, since the reproductive success of females was thought to be more influenced by the presence of roads than that of males. Eight populations of painted turtles were sampled. Between 25 to 39 individuals per population were captured for a total of 252 turtles. The reproductive success (average, variance and coefficient of variation) of females in populations located near roads was compared to that of females living in natural areas and estimated from the maternal origin (mitochondrial genome) and relatedness (nuclear genome) among individuals. Altogether, the results obtained supported our hypothesis and showed that female painted turtles laying their eggs near roads had lower mitochondrial genetic diversity and a higher variance and coefficient of variation in reproductive success than those nesting in natural environments. In a long-term perspective, even though the mean in reproductive success is higher, the trend observed for the genetic diversity, the variance and the coefficient of variation of the perturbed populations could lead to a reduction in adaptation capacity, which would increase their probability of extinction. Finally, our analyses indicated that all the individuals originated from the same glacial refuge and that roads could affect the reproductive success of females to different extents. A reduction of egg mortality would have a significant effect on the survival of painted turtle populations. Preventing females from laying their eggs on the edge of roads may help maintain recruitment in perturbed populations. The methodology suggested should confirm if roads have a similar effect on other species of turtles.

Key words : *Chrysemys picta*, painted turtle, road, variance in reproductive success, effective population size, genetic diversity, microsatellite, mitochondrial DNA.

2.1 Introduction

Habitat fragmentation consequent to the construction of roads results in numerous harmful impacts on multiple species requiring undisturbed large spaces (Guyot and Clobert 1997; Ricciardi and Rasmussen 1999; Gibbs and Shriver 2002; Aresco 2003). Moreover, for a majority of species, the roads represent an impediment in their movements, which can result in a reduction of gene flow and intrapopulation diversity (Frankham *et al.* 2002). In addition to the physical barriers roads represent, death and injuries can occur following collisions with motor vehicles.

Freshwater turtles are particularly affected by roads mortality because of their slowness. The risk of collision is amplified by the fact that females often select the verge of the roads as egg-laying sites (Gemmell 1970; Haxton 2000; Browne 2003; Forman *et al.* 2003; Steen and Gibbs 2004). A recent study estimated that road mortalities affected more than 10% of the freshwater turtle populations (Gibbs and Shriver 2002).

An additional pernicious effect of roads is that berms substrates appear as sites of predilection for nesting. However, egg survival rate could be affected either by higher predation, temperature fluctuations and/or motor vehicles. Predation is a major cause of egg mortality (Burke *et al.* 2000; Browne 2003). Scattered nests are less likely to be located by predators (Wilhoft *et al.* 1979; Snow 1982) than grouped nests (Hammer 1969; Burger 1977; Robinson and Bider 1988). Indeed, when a predator discovers a nest, it can easily find the others located in the vicinity (Shirose *et al.* 1995). Because several females may exploit the sites adjacent to roads, their eggs would be more prone to predation (Temple 1987; May and Norton 1996; Yahner and Mahan 1997; Boulet and Darveau 2000). The incubation temperature is also a crucial factor (Bobyne and Brooks 1994; Ernst *et al.* 1994; Rhen and Lang 1995) and small variations of temperature can considerably affect the sex-ratio, the development and survival of offspring (Bull and Vogt 1979; Galbraith and Brooks 1987; Bobyne and Brooks 1994). When compared to nests in natural habitats, nests on roadsides are expected to be hotter in summer due to the presence of asphalt (Asaeda and Ca 1993) and colder in winter when snow is cleared to

secure road edges. Berms levelling may also alter nest insulation and expose eggs to predation and desiccation (Gemmell 1970). Finally, vehicles circulating on road verges can compact the ground, thus, crushing nests or preventing young turtles to find a way out of their nests (Hamilton *et al.* 2002). In fact, high deformation of carapaces and even high mortality were reported (Desroches and Picard 2007). These effects are also amplified by the fact that in absence of disturbance, female turtles are faithful to the same nesting site during several years (Freedberg *et al.* 2005).

Altogether, these effects strongly suggest that females laying their eggs near roads should have a lower contribution to recruitment than those nesting in natural environments. In other words, roads are expected to increase the variance in the reproductive success of females. As a consequence, a higher probability that offspring share the same parents and a lower genetic diversity of populations are expected.

The objective of this study was to determine whether the presence of roads significantly affects the reproductive success of females painted turtles (*Chrysemys picta*) and how this effect is translated on the genetic diversity of the populations. The painted turtle was selected as a biological model because of its high population densities, therefore it is not considered as endangered. Since females can accumulate sperm from different males for a period up to four years and that clutches can be fathered by multiple males (Pearse *et al.* 2002), we presume that the reproductive success of females will be more influenced by the presence of roads than that of males. For this reason, our hypothesis was that the diversity of mitochondrial DNA (strict maternal inheritance) will be more affected than the diversity of nuclear DNA. The reproductive success (average, variance and coefficient of variation) of females was estimated from the maternal origin (mitochondrial genome) and relatedness (nuclear genome) among individuals. Closely related individuals sharing the same mtDNA are thus expected to be associated to the same maternal group. We took advantage of the presence of hypervariable markers (microsatellites) in both nuclear and mtDNA of painted turtles to estimate reproductive success. The reproductive success (average and variance) of females in populations located near roads was compared to that of females living in natural areas.

2.2 Materials and Methods

2.2.1 Sampling

Eight populations of painted turtles (*Chrysemys picta*) were sampled (Figure 1; Table I), which were classified as natural when the distance separating the lake from the road was greater than 800 meters and perturbed when less than 300 meters. Painted turtles can nest up to 600 meters away from a water source but roads located more than 300 meters away from a watery habitat do not have any significant impact on the turtles (Burke and Gibbons 1995; Marchand and Litvaitis 2004; Desroches and Picard 2007). To take demographic events associated to postglacial colonisation into account, the selected populations were located in three geographically distant regions in the province of Quebec : Eastern Townships, Montreal and Outaouais, which are separated from each other by 147 and 207 km, respectively. At least one natural site and one disturbed site were sampled within each region. The selected lakes and marshes were of similar size, to assure a comparable sampling effort between sites.

Turtles were sampled using funnel traps baited with sardines (Iverson 1979; Mitchell 1985; Desroches and Picard 2007). The individuals were measured and their gender was determined by their size and the length of the foreleg claws (Cagle 1954; Bayless 1975; Graham and Doyle 1977; Ernst *et al.* 1994).

A small sample of scale was removed and preserved in 95% ethanol for genetic analyses in the laboratory (Balcombe and Licht 1987; Mockford *et al.* 1999). To avoid recaptures, individuals were marked with a white paint stain under their shell before being released on the same site of their capture (Chabot *et al.* 1993; Koper and Brooks 1998).

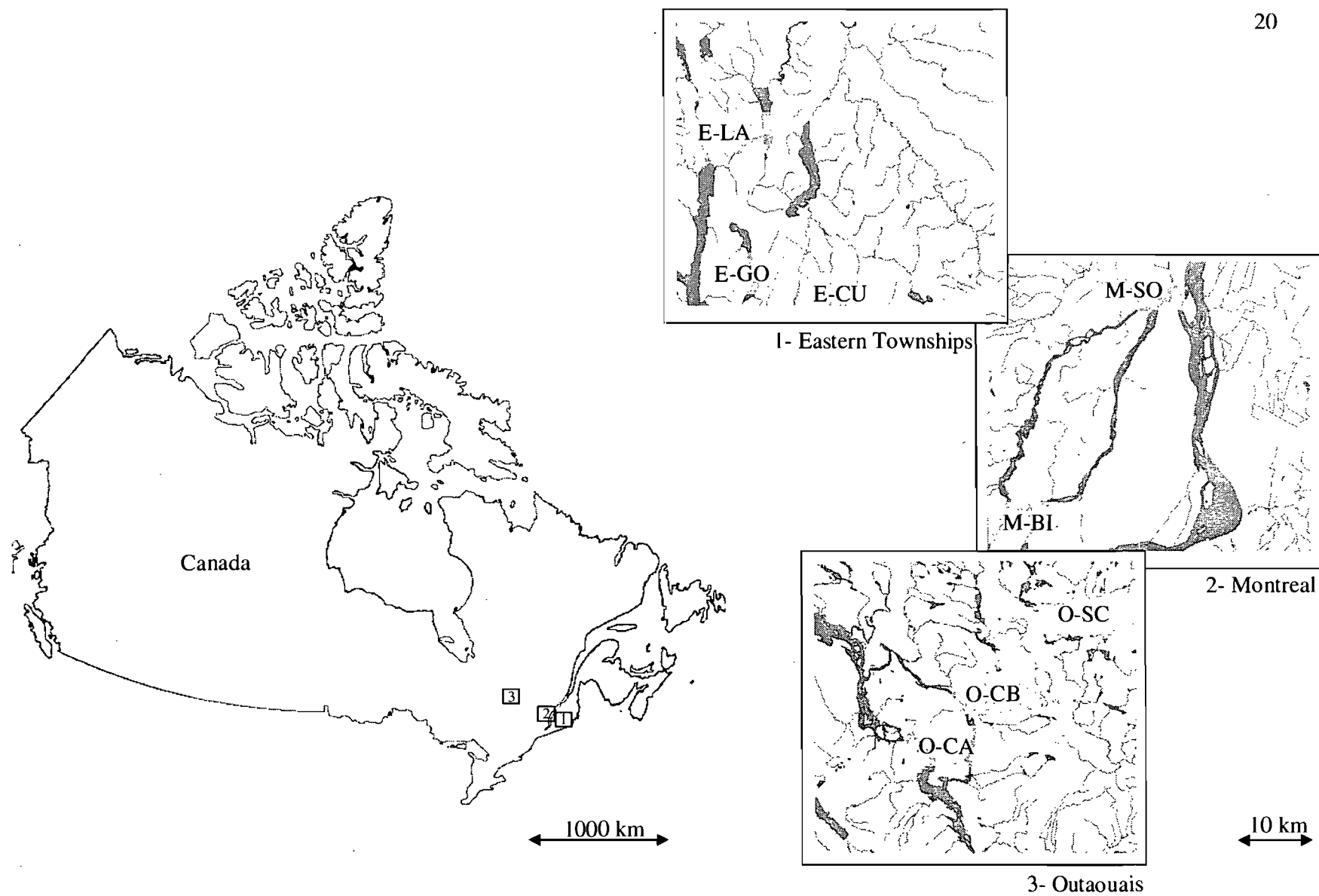


Figure 1. Location of the study sites in Quebec, Canada. The close-ups represent the location of the eight sampling sites in three different regions: Eastern Townships, Montreal, Outaouais.

Table I. Characteristics of the sampled sites.

Areas	Sites	Locations	Number of roads nearby	Road types
Eastern Townships	Rivière aux Cerises (E-LA)	45°17'00"N	0	-
		72°10'40"W		
Outaouais	Calumet (O-CA)	45°41'49"N 76°37'43"W	0	-
Montreal	Île-Bizard (M-BI)	45°30'18"N	0	-
		73°52'44"W		
Eastern Townships	Curtis (E-CU)	45°05'39"N	2	Secondary road Former railway
		72°05'33"W		
Outaouais	Mc Gowan (E-GO)	45°08'16"N	2	Highways
		72°14'19"W		
		Campbell's Bay (O-CB)		
Outaouais	Schwartz (O-SC)	45°48'0"N	1	Highway
		76°21'57"W		
Montreal	Lac des Soeurs (M-SO)	45°43'42"N	2	Highway Secondary road
		73°31'27"W		

2.2.2 Genetic analyses

The total DNA of each individual was extracted from a small piece of its shell by a proteinase K digestion followed by phenol-chloroform purification and ethanol precipitation (Sambrook *et al.* 1989).

Eight nuclear markers were used, *CP2*, *CP3* and *CP10* (designed for *Chrysemys picta* (Pearse and al. 2001)), as well as *GmuB21*, *GmuD21*, *GmuD79*, *GmuD70* and *GmuD87* (designed for *Glyptemys muhlenbergii* (King and Julian 2004)). We also designed primers (AGTGGAAATAAAAGCACC and CCGTGCTTTGTGATAAGC) in the control region of the mtDNA containing a large imperfect microsatellite (allelic range: 100 bp – 214 bp)-composed of TA and TATTA repetitions (GenBank accession number AF069423). The two primers are at positions 16624 bp and 10 bp, respectively, on the *Chrysemys picta* mtDNA control region.

Amplification reactions were carried out in 12.5 μ l volumes containing 1.25 μ l of 10X reaction buffer (Invitrogen Corp., Burlington, Ontario), 2.5 nM L⁻¹ of each dNTP, 1 μ l of each of the primers, 1.5 mM L⁻¹ of MgCl₂, 0.5 U of Taq DNA polymerase and around 100 ng of template DNA. The loci were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the following conditions: an initial denaturation time of 30 s at 92°C followed by 45 cycles at 92°C for 15 s, 15 s at 50°C and 30 s at 68°C, finalizing with a 2 min elongation phase at 68°C. Allele size was discriminated on a 6% polyacrylamide (19:1 acrylamide: bis-acrylamide) denaturing gel and visualized using a silver nitrate solution (Bassam *et al.* 1991).

The origin of the eight populations in term of glacial refuge was inferred using the cytochrome C oxidase subunit I (CO1) (GTGACTTGAAAAACCACCGTTG and GGGTAGCATTGTCTACTG). Four individuals per population were sequenced using a CEQ2000 genetic analyser (Beckman Coulter).

2.2.3 Statistical analyses

2.2.3.1 Genetic diversity

Standard genetic statistics were used to measure genetic variability: the number of alleles (A), haplotypic diversity (h), observed heterozygosity (H_0) and gene diversity (H_E) under Hardy-Weinberg equilibrium. Also, allelic richness (A_R) was calculated with the rarefaction method to account for unequal sampling size. A_R was adjusted to the smallest sample size ($n = 25$). These statistics were computed with FSTAT (Version 1.2) (Goudet 1995). Departure from Hardy-Weinberg equilibrium was assessed using the Markov chain method (Guo and Thompson 1992) with GENEPOP computer package 3.3 (Raymond and Rousset 1995).

2.2.3.2 Population structure

For nuclear loci, genetic differentiation between populations was estimated with F_{ST} values (Weir and Cockerham 1984). GENEPOP was used to evaluate allelic differentiation and estimate F_{ST} . Components of genetic variance were also calculated among populations within regions and between regions with an AMOVA (Michalakis and Excoffier 1996) in Arlequin version 2.2 (Schneider *et al.* 1997)

2.2.3.3 Demographic parameters

We tested for recent ($< 10\,000$ years) and pronounced reductions in population size using BOTTLENECK 1.2.02 (Piry *et al.* 1999) for each nuclear locus as well as across all nuclear loci. This method compares H_E of a population to what is presumed to be found at mutation-drift equilibrium using the nuclear loci. At the time of a bottleneck, allelic diversity is predicted to be lost faster than heterozygosity (Cornuet and Luikart 1996). A Wilcoxon signed-rank test determines if a significant number of loci show an heterozygosity excess as expected in a reduction of population size (Luikart *et al.* 1998). Data were analysed using the infinite allele model (IAM), the stepwise mutation model

(SMM) and the two-phase mutation model (TPM) (Di Rienzo *et al.* 1994; Estoup and Angers 1998).

2.2.3.4 Inferring the reproductive success

The probability of identity was estimated for each population with IDENTITY 1.0 (Wagner and Sefc 1999). Also, to estimate the mean, variance and coefficient of variation in reproductive success, we tentatively inferred the number and size of every maternal groups connected by a given female. Because a maternal group may include half-sibs as well as full-sibs, we used the following conditions: 1- individuals must share the same mtDNA haplotype, 2- every pair of individuals of a given maternal group must share one allele for at least three of the five nuclear loci, 3- since a mother cannot transmit more than two different alleles at each locus to its progenies, individuals of a given maternal group must share less than two alleles for each locus, and 4- we excluded putative mother-sib pairs when at least one allele for the five loci is shared. However, in some maternal groups, cousins or grandmother on the mother's side were observed but in relatively small numbers. We used a coefficient of variation that allowed us to obtain variance values unbiased by the average. An example of the methodology is presented (Appendix I).

Also, we used an ANOVA tested with 9999 permutations to evaluate for each parameter previously mentioned the difference between the natural and the perturbed populations. This analysis requires homoscedasticity between groups which was tested with a Bartlett test. When the requirement of homoscedasticity was not met, we used a non-parametric Wilcoxon signed rank test.

2.3 Results

2.3.1 Population characteristics

The haplotypic diversity (h), the mitochondrial variance in reproductive success (mtDNA-Var) and the average reproductive success (A_{ver}) were not homoscedastic ($p < 0.05$). For these variables, the differences between groups were tested with a Wilcoxon signed rank test. The other variables were tested with an ANOVA tested with permutations (Table II).

Between 25 to 39 individuals per site were captured for a total of 252 turtles (Table II). When considering the five loci, all the probabilities of identity were very low (between $1.44\text{E-}06$ and $8.83\text{E-}06$), indicating a weak probability that two individuals within the same population share the same genotype. The capture efforts varied from 6.25 to 19.5 individuals per day. The sex-ratio of every site did not differ significantly from 1:1 ($p > 0.05$) except for the SC site where an excess of males was sampled ($\chi^2 = 4.8$; $p = 0.02846$).

Three microsatellite loci, *CP10*, *GmuB21* and *GmuD70*, displayed a significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium (homozygote excess) in every population, suggesting the presence of null alleles. These loci were discarded and were no longer considered for the rest of the analyses. Using the five remaining loci, no departure from Hardy-Weinberg equilibrium was detected, indicating a random sampling of individuals within each population.

The five nuclear loci used in this study appeared highly polymorphic, with numbers of alleles per locus ranging from 9 (*GmuD21*) to 24 (*GmuD87*), for a total of 96 alleles and a mean value of 19.2 alleles per locus. The mitochondrial microsatellite marker was also extremely variable, with numbers of alleles per population ranging from 6 (E-GO) to 19 (M-BI), for a mean value of 12.5 alleles per population.

Based on the standardized difference test, no evidence for a population recent bottleneck (< 10 000 years) was detected following a Bonferroni correction ($\alpha = 0.01$) using either IAM, TPM or SMM models. This indicated that the eight populations did not exhibit a number of loci with heterozygosity excess larger than expected for a population at mutation-drift equilibrium.

The global F_{ST} value estimated from nuclear markers was very low (0.05163) and non-significant ($p = 0.0000$), indicating low differentiation among populations. The results were similar when populations were grouped by region (Table III). Results of the cytochrome C oxidase subunit 1 (COI) analysis indicated that all the individuals displayed the same sequence (450 bp), suggesting they originated from the same glacial refuge. Thus, no further analysis was necessary since only one sequence was observed.

2.3.2 Natural vs perturbed

Allelic richness (p -value = 0.57), gene diversity (p -value = 0.57) and number of alleles (p -value = 0.65) estimated from nuclear markers did not differ significantly between perturbed and natural sites. Similarly, relatedness (Belkhir *et al.* 2002) estimated from nuclear markers was not significantly different between perturbed and natural sites (p -value = 0.80). In contrast to nuclear markers, mitochondrial haplotypic diversity (p -value = 0.04), allelic richness (p -value = 0.04) and the number of alleles (p -value = 0.04) were significantly higher in natural sites than in perturbed populations (Table II).

The mean in reproductive success varied between 1.39 and 2.40 descendants per female while the variance ranged from 0.37 to 2.97. The coefficient of variation in reproductive success varied between 43.73 to 71.82. The variance was correlated to the number of mitochondrial haplotypes but was not significant ($cor = -0.66$, p -value = 0.08). The mean, the variance and the coefficient of variation in reproductive success were significantly higher in perturbed than in natural sites (Table II). The variances were similar among natural populations (Levene's test; p -value = 0.18), but displayed a high heterogeneity in the populations close to roads (Levene's test; p -value = 0.01).

Table II. Summary of the data for six microsatellite loci for the eight painted turtle populations (Pop) : number of individuals analysed (n), capture efforts (Cpt/efforts), sex-ratio (m : f), observed heterozygosity (H_0), number of alleles (A), allelic richness (Ar), gene diversity (H_E), relatedness (R) and haplotypic diversity (h) . The mitochondrial variance in reproductive success (mtDNA-Var), the variance in reproductive success (Var), the average reproductive success measured as the number of descendants per female (Aver), the number of putative mothers (Mo) and the coefficient of variation (C.V.) are also given. The non-homoscedastic variables were tested with a Wilcoxon signed rank test and identified in bold, while the others were tested with an ANOVA tested with permutations.

Pop	Number of roads nearby	Nuclear								Mitochondrial			Nuclear + Mitochondrial				
		N	Cpt/efforts	Sex-ratio	H_0	A	Ar	H_E	R	A	Ar	h	mtDNA-Var	Var	Aver	Mo	C.V.
ET-LA	0	28.00	9.33	1.00	0.76	10.80	10.49	0.81	0.25	17.00	16.90	0.96	0.87	0.67	1.40	20.00	58.64
O-CA	0	27.00	6.75	1.33	0.87	13.00	12.71	0.84	0.23	16.00	15.96	0.95	1.14	0.37	1.39	18.00	43.73
M-BI	0	39.00	19.50	1.06	0.77	11.60	10.42	0.79	0.27	19.00	18.01	0.96	1.24	0.49	1.44	27.00	48.33
		31.33	11.86	1.13	0.80	11.80	11.20	0.81	0.25	17.33	16.96	0.96	1.08	0.51	1.41	21.67	50.23
ET-CU	2	39.00	19.50	0.52	0.79	10.40	9.70	0.83	0.24	7.00	6.50	0.74	34.30	1.39	2.05	19.00	57.34
ET-GO	2	26.00	13.00	1.27	0.81	11.00	10.88	0.82	0.28	6.00	6.00	0.69	23.53	1.46	2.36	11.00	51.03
O-CB	2	36.00	18.00	1.67	0.79	12.20	10.87	0.81	0.26	11.00	10.53	0.84	11.59	2.97	2.40	15.00	71.82
O-SC	1	32.00	10.67	2.33	0.82	13.20	12.08	0.81	0.24	17.00	16.59	0.94	2.20	1.02	1.46	22.00	69.48
M-SO	2	25.00	6.25	0.79	0.86	10.20	10.20	0.83	0.24	7.00	7.00	0.85	4.29	2.62	2.27	11.00	71.18
		31.60	13.48	1.32	0.81	11.40	10.74	0.82	0.25	9.60	9.32	0.81	15.18	1.89	2.11	15.60	64.17
p-value		0.99	0.72	0.73	0.72	0.65	0.57	0.57	0.80	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.14	0.05

Table III. Partition of the genetic diversity as estimated by AMOVA analyses for eight populations of painted turtles and grouped according to their region of origin.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	p-value
Among groups	2	30.474	0.05935	2.76	0.02761*
Among populations within groups	5	26.132	0.05164	2.40	0.02470*
Within populations	496	1011.263	2.03884	94.84	0.05163
Total	503	1067.869	2.14983		

* : significant values

2.4 Discussion

2.4.1 Effect of roads on the reproductive success of female painted turtles

The objective of this study was to determine whether the presence of roads significantly affects the reproductive success of females painted turtles (*Chrysemys picta*) and how this effect is translated on the genetic diversity of the populations. Because the study was performed in natural populations, it was required that every population was fully comparable except for the presence of roads. A previous study on the phylogeography of painted turtles found evidences of at least two independent range expansions into previously glaciated regions of north-eastern North America (Starkey *et al.* 2003). However, nuclear markers provided no evidence of a marked population structure, and sequence analyses confirmed that these populations are closely related and have a recent common origin from a unique refuge. In addition, the populations did not experience a recent reduction in size. While the number of loci is low (Cornuet and Luikart 1996) and results must be considered with caution, a high and similar level of nuclear genetic diversity was observed within each of the eight populations. Finally, the number of sampled individuals and the capture efforts are roughly similar and not correlated to perturbed-natural habitats. We are thus confident that the difference observed between both kinds of habitats is a result of the presence of roads nearby.

The first striking result is the mtDNA diversity that appeared to be strongly correlated to the presence of roads. Perturbed populations displayed a lower mitochondrial genetic diversity in terms of allelic richness, number of alleles and haplotypic diversity, while gene diversity, allelic richness, number of alleles and relatedness estimated from nuclear markers were similar. This result is consistent with the prediction of higher variance in reproductive success of perturbed sites. However, the level of mitochondrial diversity in some perturbed populations appears to be unusually low, as three populations have less than eight haplotypes. A founder event associated to postglacial colonization can be ruled out, since these populations are located in different regions and geographically close natural sites displayed a high diversity. Considering the long generation time of painted

turtles and the fact that some roads are relatively recent, the higher variance expected from the presence of roads may not have yet strongly affected the gene pool of these populations (Ciofi *et al.* 2002; Kuo and Janzen 2004). In fact, a long generation time may act as a buffer that contributes to decrease the pace of genetic diversity erosion in threatened species, as has been invoked for other long-lived species such as the Ornate box turtle (*Terrapene ornate*) (Kuo and Janzen 2004) and the Copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*) (Lippé *et al.* 2006). This suggests that, in such populations, additional processes may have affected the diversity of the genome, for instance road kills or poaching (Gibbons 1987, COSEWIC 2004; Desroches and Rodrigue 2004).

Microsatellite markers from both nuclear and mitochondrial genomes were used to estimate the reproductive success of females inferred from the number of offsprings produced by each. Because mitochondrial haplotype similarity was used to identify offspring of a given female, both mtDNA diversity and variance estimators are not completely independent. For instance, the variance decreases as the number of mitochondrial haplotypes with low frequency increases. The procedure used to identify sibs also relies on the absence of mutation for mtDNA, which may result in an underestimation of the variance if mutation rate were high. However, this effect is likely limited because only a few generations were considered and mutation rate is not expected to be different among populations. On the other hand, the use of nuclear genotypes to confirm relatedness provided a variance lower than the one observed for mitochondrial haplotypes only, because a given mitochondrial lineage may be inherited from different females. As a result, the variance is correlated to the number of mitochondrial haplotypes but is not significant.

The results clearly indicated that females living close to roads have higher mean, variance and coefficient of variation in reproductive success than those in natural populations. Previous studies revealed that a strong variance in reproductive success could lead to a loss of genetic diversity (Westemeier *et al.* 1998; Frankham *et al.* 1999; Bijlsma *et al.* 2000). In a long-term perspective, even though the mean in reproductive success is higher, the trend observed for the genetic diversity, the variance and the coefficient of

variation of the perturbed populations could lead to a reduction in adaptation capacity, which would increase their probability of extinction. However, nuclear genetic diversity is similar between natural and disturbed sites, indicating that nuclear DNA is influenced to a lesser extent than mtDNA, due to the higher effective size of the nuclear genome. In addition, females can accumulate sperm from different males (Pearse *et al.* 2002) and while a female is faithful to her egg-laying site, males mate randomly with different females. The loss of nuclear genetic variability is therefore slowed because clutches are fathered most of the time by multiple males (Pearse *et al.* 2002).

2.4.2 Perspectives and conservation implications

Our results supported our hypothesis and revealed an additional process by which roads may affect the turtle populations. While painted turtles are not considered to be endangered, numerous freshwater turtles have a precarious status (COSEWIC 2004; Tardif *et al.* 2005) and the negative effects of the presence of roads on the reproductive success could be amplified in small populations (Hartl et Clark 1997; Halliburton 2004). The present procedure may serve as a guideline for further studies on turtle. In fact, this genetic approach represents a quick, inexpensive and reliable method to estimate the reproductive success of female turtles. It requires only a few amount of DNA (noninvasive method) and the reproductive success can be determined prior to ecological and behavioral experiments. Ultimately, the methodology suggested should confirm if roads have a similar effect on other species of turtles.

According to our results, ecological and genetic studies would be required to further investigate the impact that roads have on painted turtles, according to the type of road, verge substrate, traffic and distance separating the lake from the road. For instance, the O-SC population was found to be the most different from all the other perturbed populations. When compared to the other perturbed populations, the O-SC population shows a higher mitochondrial diversity (similar to the ones of natural sites) and a lower variance in reproductive success (while higher than in natural sites). The fact that the O-

SC population contains a single road instead of the two characterizing the other perturbed populations may explain the lower impact of roads.

In conclusion, the presence of roads appears to affect the reproductive success of female painted turtles. According to Iverson (1991), a reduction of both egg and juvenile mortality would have a higher effect on the survival of populations than the reduction of adult mortality. Preventing females from laying their eggs on the edge of roads by establishing fences and scattered artificial nests close to roads may help maintain recruitment in perturbed populations.

2.5 Acknowledgements

We are particularly grateful to Martin Laporte, Stéphanie Allard, Frédérique Cyr, Philippe Girard and Jean-François Desroches for assistance in the field and to all the members of PGEM for helpful comments. This work was supported by a new researchers grant from the “Fonds Québécois de Recherche en Nature et Technologie” (FQRNT, Quebec) to BA.

3. CONCLUSION

Ce travail avait pour objectif de déterminer si la présence des routes modifie significativement le succès reproducteur des femelles des populations de tortues peintes (*Chrysemys picta*) vivant à proximité des routes et de déterminer comment cet effet se traduisait sur la diversité génétique de ces populations. Les analyses combinées de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire suggèrent que les femelles préférant pondre aux abords des routes ont un succès reproducteur moyen supérieur ainsi qu'une plus forte variance et un plus fort coefficient de variation comparativement aux femelles pondant en milieu naturel. Ce phénomène serait provoqué par des sites de ponte de moindre qualité, un facteur supplémentaire à la détérioration de la diversité génétique de ces populations. À long terme, cette perte de diversité pourrait engendrer une réduction de la capacité d'adaptation de la population, augmentant ainsi leur risque d'extinction (Tallmon *et al.* 2004).

Il a été possible de confirmer notre hypothèse, c'est-à-dire que l'ADN mitochondrial est plus affecté que l'ADN nucléaire. Tel qu'attendu, au niveau mitochondrial, nos analyses ont démontré une diversité haplotypique, un nombre d'allèles ainsi qu'une richesse allélique plus faibles dans les populations perturbées comparativement aux populations naturelles. Néanmoins, au niveau nucléaire, ces mêmes paramètres se sont révélés similaires entre les différentes populations. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les femelles peuvent accumuler le sperme de plusieurs mâles pendant quelques années et donc qu'une même couvée peut provenir de différents pères (Pearse *et al.* 2002). De plus, le génome nucléaire possède une plus grande taille effective que le génome mitochondrial. La perte de diversité nucléaire serait alors ralentie. Aussi, contrairement aux mâles qui se reproduisent de façon aléatoire, les femelles sont fidèles au même site de nidification durant plusieurs années (Freedberg *et al.* 2005). Le génome mitochondrial et le succès reproducteur des femelles seraient donc plus fortement influencés. Ainsi, dans les populations perturbées où peu de femelles contribuent beaucoup aux effectifs (variance du succès reproducteur élevée), on observerait une faible variabilité génétique au niveau de l'ADN mitochondrial et une progéniture présentant un haut niveau d'apparentement tel que constaté dans les marais échantillonnés près des routes.

Nos résultats ont suggéré que la moyenne du succès reproducteur des femelles provenant de populations perturbées est plus élevée que celle des populations en milieu naturel. Ce résultat est contre-intuitif. Ainsi, il semble que dans les populations perturbées les femelles produisent en moyenne plus de rejetons, ce qui à première vue n'est pas mauvais. Différentes hypothèses peuvent être émises quant aux causes de ce phénomène. Il est possible que les milieux perturbés par les routes soient plus eutrophes, enrichis de nutriments engendrant une production primaire et une quantité d'algues plus élevée que dans les milieux naturels (Puigserver *et al.* 2002; Xiaoying et Shijie 2006). Cette augmentation des ressources pourrait améliorer l'état de santé de ces populations et leur permettre un meilleur succès reproducteur. Aussi, lors de cette étude, nous n'avons pas pu mesurer la taille réelle des populations. En effet, si les populations des milieux perturbés étaient plus petites que celles des milieux naturels, il se peut que la compétition moindre dans les populations perturbées permette aux individus d'augmenter leur succès reproducteur puisqu'ils auraient dans ce cas accès à plus d'espace et de ressources. Bien que nous ne puissions pas identifier la cause exacte de ce phénomène, il est à noter que bien que le succès reproducteur moyen soit plus élevé dans les populations perturbées, la variance et le coefficient de variation de celui-ci le sont aussi. Ainsi, les femelles des populations perturbées engendrent de plus grandes portées, mais les individus qui en résultent sont hautement apparentés. À long terme, ceci peut être néfaste pour ces populations puisque la diversité génétique et donc la capacité d'adaptation de ces populations seront diminuées. Nous croyons que des populations ayant une variance et une moyenne du succès reproducteur moindre seraient écologiquement plus résistantes à long terme. Il se peut également que, puisque notre moyenne a été calculée sur les groupes échantillonnés et que nous n'avons pas compté les portées contenant zéro descendant dans les populations perturbées, notre moyenne a été calculée uniquement sur les gros groupes maternels. Ceci aurait donc pour conséquence de garder la moyenne élevée, tandis qu'en intégrant des portées de zéro individu dans les populations perturbées, la moyenne devrait être diminuée et même inférieure aux populations naturelles.

Plusieurs caractéristiques font de cette étude une méthode de choix pour l'estimation du succès reproducteur des différentes populations de tortues. D'abord, l'approche préconisée a eu l'avantage d'être peu dispendieuse et n'a nécessité qu'une faible quantité de tissus (méthode non invasive). En effet, aucun adulte n'a été perturbé lors de sa période de reproduction et aucun nid n'a été altéré. De plus, grâce à la présence d'un microsatellite extrêmement variable sur le génome mitochondrial des tortues peintes, il a été possible de regrouper rapidement de nombreux individus en familles et cette méthode a nécessité un seul échantillonnage. Ce marqueur microsatellite mitochondrial s'est avéré un outil beaucoup plus rapide que les méthodes écologiques traditionnelles de mesure du succès reproducteur tels l'observation des sites lors de la saison de la ponte et le suivi des nids pour déterminer le succès d'éclosion. De plus, au cours de cette étude génétique, nous avons mesuré le succès reproducteur à l'aide d'un estimé intégrateur de plusieurs générations comparativement à un estimé ponctuel obtenu par des méthodes écologiques.

Les répercussions des routes sur le succès reproducteur et sur la diversité génétique des populations de tortues peuvent être longues à discerner puisque de nombreuses années séparent les différentes générations (forte longévité, maturité sexuelle tardive). En considérant ces caractéristiques démographiques, ainsi que le fait que certaines routes soient relativement récentes, on estime que la présence des routes pourrait ne pas avoir encore fortement affecté la diversité génétique de ces populations (Ciofi *et al.* 2002; Kuo et Janzen 2004). Pour évaluer plus précisément les effets de la présence des routes sur la diversité génétique et sur le succès reproducteur des tortues peintes, des suivis à long terme seraient nécessaires (Gibbons et Semlitsch 1982; Burke *et al.* 1995). En effet, ces derniers permettent de comprendre l'évolution de l'état des populations à long terme et de confirmer les données théoriques quant à leurs déclin ou à leurs fluctuations (Desroches et Picard 2007). Dans le cadre d'un suivi à long terme, il serait judicieux d'évaluer différentes variables spécifiques aux divers plans d'eau, à l'aide d'un plus grand effectif de population et d'un plus grand nombre de microsatellites, afin de rapprocher notre estimation du succès reproducteur réel et d'évaluer un gradient de perturbation. Par exemple, il serait possible d'évaluer les effets de différents types de routes sur le succès reproducteur des tortues peintes pour confirmer si la tendance observée est généralisée.

aux populations situées près des routes, puisque le petit nombre de plans d'eau échantillonnés aurait pu mener à une sous-estimation des effets de la présence des routes sur le succès reproducteur. Aussi, il serait important d'estimer la relation entre le succès reproducteur et le pourcentage du périmètre du marais occupé par une ou des routes, de déterminer l'influence des différents substrats composant les accotements, d'évaluer l'importance du trafic routier ainsi que de quantifier l'effet de la pente et de la distance séparant le marais de la route. Il serait également pertinent de combiner certaines méthodes écologiques à notre protocole génétique afin de clarifier nos connaissances de l'effet des routes sur la dynamique des populations de tortues peintes. En effet, au cours d'une prochaine étude, un suivi des nids pour déterminer le taux de prédation ainsi que le succès d'éclosion devrait être effectué conjointement à une mesure des températures des nids aux abords des routes en comparaison aux nids éloignés des routes. De plus, comme les nids sont fréquemment regroupés près des routes, il pourrait être intéressant de caractériser l'emplacement des sites de ponte par rapport à la route, puisque ce facteur influence négativement le taux de survie des œufs.

À la lumière des résultats, nous pouvons donc conclure que les populations situées près des routes ont une situation précaire comparativement aux populations naturelles. Les efforts de conservation devraient être concentrés sur les populations à risque telles que celles de faible effectif. Par le biais de petits gestes aux conséquences cruciales, le recrutement pourrait facilement être optimisé. Par exemple, il a été suggéré de protéger une zone tampon de plus de 300 m autour des habitats aquatiques, zone correspondant à l'espace utilisé en moyenne par les tortues lors de leurs déplacements (Burke et Gibbons 1995, Joyal *et al.* 2001; Semlitsch et Bodie 2003; Desroches et Rodrigue 2004). Dans les cas où la construction de routes aux abords des habitats aquatiques est inévitable, certaines mesures d'atténuation pourraient toutefois être effectuées afin de limiter les répercussions. Afin de rendre les accotements moins attirants pour les femelles, des sites de ponte alternatifs devraient être construits dans des milieux ensoleillés et bien drainés, loin des routes, loin des sources de prédation et loin des sites de ponte déjà existants (Ashley et Robinson 1996, Moll et Moll 2000, Baldwin *et al.* 2004). De plus, un grillage pourrait être placé sur les nids afin de les protéger. Afin d'augmenter le recrutement,

l'entretien des accotements ne devrait pas être effectué entre la saison de la ponte et l'éclosion des œufs, soit entre le début juin et le début octobre. Dans la mesure du possible, près des habitats aquatiques, l'accès aux véhicules sur les accotements devrait être limité. Finalement, la sensibilisation du public à l'impact des routes sur les tortues est certainement une solution simple, efficace et peu coûteuse. La prise de conscience de la population locale pourrait effectivement avoir un impact significativement positif sur les populations de tortues.

Ultimement, la méthodologie proposée devrait permettre de confirmer si les routes ont un effet comparable sur les autres espèces de tortues vivant au Québec. Puisque six des huit espèces de tortues d'eau douce au Québec ont un statut précaire (COSEPAC 2006) et vu l'augmentation constante du trafic routier, il apparaît primordial de connaître les effets de ces facteurs qui pourraient être amplifiés dans des populations de faible effectif. La protection des habitats favoriserait le maintien des populations de tortues peintes, en plus d'être bénéfique à toutes les autres espèces de tortues vivant au Québec et étant associées aux mêmes habitats.

RÉFÉRENCES

Amos, W. et Balmford, A. 2001. When does conservation genetics matter?. *Heredity*. 87 : 257-265.

Angers, B. et Silva-Beaudry, C-O. 2006. Influence du trafic routier sur la diversité génétique des populations de tortues peintes. Rapport présenté au Ministère des Transports du Québec.

Aresco, M.J. 2003. Highway mortality of turtles and other herpetofauna at Lake Jackson, Florida, USA, and the efficacy of a temporary fence/culvert system to reduce roadkills. In : *Proceedings of the 2003 International Conference on Ecology and Transportation*. Ed. Irwin C.L, Garrett P, McDermott K.P. Center for Transportation and the Environment, North Carolina State University, Raleigh, NC, p. 433-449.

Asaeda, T. et Ca, V.T. 1993. The subsurface transport of heat and moisture and its effect on the environment : a numerical model. *Boundary-Layer Meteorology*. 65 : 159-179.

Ashley, E.P. et Robinson, J.T. 1996. Road mortality of amphibians, reptiles and other wildlife on the Long Point Causeway, Lake Erie, Ontario. *Canadian Field-Naturalist*. 110 : 403-412.

Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall. New York, 511 p.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. et Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 18 : 489-522.

Balcombe, J.P et Licht, L.E. 1987. Some aspects of the ecology of the Midland Painted Turtle, *Chrysemys picta marginata*, in Wye Marsh, Ontario. *Canadian Field-Naturalist*. 101(1) : 98-100.

Baldwin, E.A., Marchand, M.N. et Litvaitis, J.A. 2004. Terrestrial habitat use by nesting Painted Turtles in landscapes with different levels of fragmentation. *North-eastern Naturalist*. 11(1) : 41-48.

Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. et Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 196 : 80-83.

Bayless, L.E. 1975. Population parameters for *Chrysemys picta* in a New York pond. *The American Midland Naturalist*. 93(1) : 168-176.

Belkhir, K., Castric, V. et Bonhomme, F. 2002. IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes*. 2 : 611-614.

Bermingham, E. et Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*. 7 : 367-369.

Bider, J.R. et Matte, S. 1994. Atlas des amphibiens et des reptiles du Québec. Société d'histoire naturelle de la vallée du Saint-Laurent et Ministère de l'Environnement et de la Faune, Québec, 106 p.

Bijlsma, R., Gundgaard, J. et Boerema, A.C. 2000. Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila*. *Journal of Evolution and Biology*. 13 : 502-514.

Birkhead, T.R. et Moller, A.P. 1993. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events : sperm storage data from reptile, birds and mammals. *Biological Journal of the Linnean Society*. 50 : 295-311.

Birky, C.W., Fuerst, P. et Maruyama T. 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift : equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*. 121 : 613-627.

Blouin, M.S., Parsons, M., Lacaille, V. et Lotz, S. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*. 5 : 393-401.

Bobyn, M.L. et Brooks, R.J. 1994. Incubation conditions as potential factors limiting the northern distribution of Snapping Turtles, *Chelydra serpentina*. *Canadian Journal of Zoology*. 72 : 28-37.

Boulet, M. et Darveau, M. 2000. Depredation of artificial bird nests along roads, rivers and lakes in a boreal Balsam Fir, *Abies balsamea*, forest. *Canadian Field-Naturalist*. 114(1) : 83-88.

Breitenbach, G.L., Congdon, J.D. et Van Loben Sels, R.C. 1984. Winter temperatures of *Chrysemys picta* nests in Michigan : effects on hatchling survival. *Herpetologica*. 40(1) : 76-81.

Brooks, R.J., Brown. G.P. et Galbraith, D.A. 1991. Effects of a sudden increase in natural mortality of adults on a population of the Common Snapping Turtle (*Chelydra serpentina*). *Canadian Journal of Zoology*. 69 : 1314-1320.

Browne, C.L. 2003. The status of turtle populations in Point Pelee National Park. Mémoire de maîtrise, Département de Sciences Biologiques, Lakehead University, 112 p.

Brownlee, L., Mineau, P. et Baril, A. 2000. Canadian Environmental Protection Act Priority Substances List: supporting documents for road salts: road salts and wildlife: an assessment of the risk. Report submitted to the Environmental Resource Group on Road Salts, Commercial Chemicals Evaluation Branch, Environment Canada, Hull, Quebec, Canada.

Bruderer, B., Peter, D. et Steuri, T 1999. Behaviour of migrating birds exposed to x-band radar and a bright light beam. *Journal of Experimental Biology*. 202(9) : 1015-1022.

Bull, J.J. et Vogt, R.C. 1979. Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science*. 206(4423) : 1186-1188.

Burger, J. 1977. Determinants of hatching success in Diamond-back Terrapin, *Malaclemys terrapin*. *The American Midland Naturalist*. 97(2) : 444-464.

Burke, V.J. et Gibbons, J.W. 1995. Terrestrial buffer zones and wetlands conservation : A case study of freshwater turtles in a Carolina bay. *Conservation Biology*. 9 : 1365-1369.

Burke, V.J., Greene, J.L. et Gibbons, J.W. 1995. The effect of sample size and study duration on metapopulation estimates for Slider Turtles (*Trachemys scripta*). *Herpetologica*. 51(4) : 451-456.

Burke, V.J., Lovich, J.E. et Gibbons, J.W. 2000. Conservation of freshwater turtles. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, p. 156-179.

Cagle, F.R. 1954. Observations on the life cycle of Painted Turtles (*Genus Chrysemys*). *The American Midland Naturalist*. 52(1) : 225-235.

Cambray, J. et Bianco, P. 1998. Freshwater fish crisis : a blue planet perspective. *Italian Journal of Zoology*. 65 : 345-356.

Chabot, J., Gagné, B. et St-Hilaire, D. 1993. Étude des populations de tortues du secteur de la baie de Norway de la rivière des Outaouais, comté de Pontiac, Québec. Rapport présenté au Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche.

Churchill, T.A. et Storey, K.B. 1992. Natural freezing survival by Painted Turtles *Chrysemys picta marginata* and *C. picta bellii*. *American Journal of Physiology (Regulatory Integrative and Comparative Physiology)*. 262 : 530-537.

Ciofi, C., Milinkovitch, M.C., Gibbs, J.P. Caccone, A. et Powell, J.R. 2002. Microsatellite analysis of genetic divergence among populations of giant Galapagos tortoises. *Molecular Ecology*. 11 : 2265-2283.

Clevenger, A.P., Chruszcz, B. et Gunson, K.E. 2003. Spatial patterns and factors influencing small vertebrate fauna road-kill aggregations. *Biological Conservation*. 109 : 15-26.

Congdon, J.D., Breitenbach, G.L., Van Loben Sels, R.C. et Tinkle, D.W. 1987. Reproduction and nesting ecology of Snapping Turtles (*Chelydra serpentina*) in South-eastern Michigan. *Herpetologica*. 43(1) : 39-54.

Congdon, J.D., Dunham A.E. et Van Loben Sels, R.C. 1993. Delayed sexual maturity and demographics of Blanding's turtles (*Emydoidea blandingi*): implications for conservation and management of long-lived organism. *Conservation Biology*. 7 : 826-833.

Congdon, J.D., Dunham, A.E. et Van Loben Sels, R.C. 1994. Demographics of Common Snapping Turtles (*Chelydra serpentina*) : implications for conservation and management of long-lived organisms. *American Zoologist*. 34 : 397-408.

Cornuet, J.M. et Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 144 : 2001-2014.

COSEPAC. 2006. Comité sur la situation des espèces en péril au Canada. <http://www.cosepac.gc.ca/>

COSEWIC. 2004. Comité sur la situation des espèces en péril au Canada. <http://www.cosewig.gc.ca/>

Danielson, B.J. et Hubbard, M.W. 1998. A literature review for assessing the status of current methods of reducing deer-vehicle collisions. Report submitted to Report for the Task Force on Animal Vehicle Collisions, The Iowa Department of Transportation, and The Iowa Department of Natural Resources, Iowa, USA.

Desroches, J.-F. et Picard, I. 2003. Road-killed turtles in the Outaouais, Québec, during the nesting season. Conférence présentée au Réseau Canadien de Conservation des Amphibiens et des Reptiles (RCCAR). Île Pelée, Ontario. 12 septembre 2003.

Desroches, J.-F. et Picard, I. 2006. Évaluation de l'impact des routes sur les populations de tortues en Outaouais, Québec. Rapport présenté au Ministère des Transports du Québec.

Desroches, J.F. et Picard, I. 2007. Évaluation de l'incidence des routes sur les populations de tortues en Outaouais, au Québec. Rapport présenté au Ministère des Transports du Québec.

Desroches, J.F. et Rodrigue, D. 2004. Amphibiens et reptiles du Québec et des maritimes. Éditions Michel Quintin, Waterloo, Québec. 288 p.

Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M. et Freimer N.B. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 91 : 3166-3170.

Dodd, C.K. Jr., Enge, K.M. et Stuart, J.N. 1989. Reptiles on highways in North-central Alabama, USA. *Journal of Herpetology.* 23(2) : 197-200.

Doroff, A.M. et Keith, L.B. 1990. Demography and ecology of an Ornate Box Turtle (*Terrapene carolina*) population in south-central Wisconsin. *Copeia*. 1990 : 387-399.

Edmonds, J.H. et Brooks, R.J. 1996. Demography, sex ratio, and sexual size dimorphism in a northern population of Common Musk Turtles (*Sternotherus odoratus*). *Canadian Journal of Zoology*. 74 : 918-925.

Eisenbeis, G. et Hassel, F. 2000. Attraction of nocturnal insects to street lights – a study of municipal lighting systems in a rural area of Rheinhessen. *Natur und Landschaft*. 75(4) : 145-156.

Ellegren, H. 1995. Mutation rates at porcine microsatellite loci. *Mammalian Genome*. 6 : 376-377.

England, P., Osler, G., Woodworth, L., Montgomery, M., Briscoe, D. et Frankham, R. 2003. Effects of intense versus diffuse population bottlenecks on microsatellite genetic diversity and evolutionary potential. *Conservation Genetics*. 4 : 595-604.

Équipe de rétablissement de cinq espèces de tortues au Québec. 2005. Plan de rétablissement de cinq espèces de tortues au Québec pour les années 2005 à 2010 : la Tortue des bois, la Tortue géographique, la Tortue mouchetée, la Tortue musquée et la Tortue ponctuée. Rapport présenté au Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune.

Ernst, C.H., Lovich, J.E. et Barbour, R.W. 1994 *Turtles of the United States and Canada*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, DC, 578 p.

Estoup, A. et Angers, B. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In : Carvalho G. Ed. *Advances in molecular ecology*, IOS press, p. 55-86.

Estoup, A., Tailliez, C., Cornuet, J.M. et Solignac, M. 1995. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Molecular Biology and Evolution*. 12 : 1074-1084.

Fahrig, L. et Merriam, G. 1994. Conservation of fragmented populations. *Conservation Biology*. 8(1) : 50-59.

Fahrig, L., Pedlar, J.H., Pope, S.E., Taylor, P.D. et Wegner, J.F. 1995. Effect of road traffic on amphibian density. *Biological Conservation*. 74 : 177-182.

Feinberg, J.A. et Burke, R.L. 2003. Nesting ecology and predation of Diamondback Terrapins, *Malaclemys terrapin*, at Gateway National Recreation Area, New York. *Journal of Herpetology*. 37(3) : 517-526.

Forman, R.T.T. et Alexander, L.E. 1998. Roads and their major ecological effects. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 29 : 207-231.

Forman, R.T.T., Sperling, D., Bissonette, J.A., Clevenger, A.P., Cutshall, C.D., Dale, V.H, Fahrig, L., France, R., Goldman, C.R., Heanue, K., Jones, J.A., Swanson, F.J., Turrentine, T. et Winter, T.C. 2003. *Road Ecology : Science and Solutions*. Island Press, Washington, Covelo, London. USA. 481 p.

Frankel, O.H. et Soule, M.E. 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 327 p.

Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*. 10 : 1500-1508.

Frankham, R., Ballou, J.D. et Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 617 p.

Frankham, R., Montgomery, M.E., England, P.R., Lowe, E.H. et Briscoe, D.A. 1999. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential?. *Animal Conservation*. 2 : 255-260.

Freedberg, S., Ewert, M.A., Ridenhour, B.J., Neiman, M. et Nelson, C.E. 2005. Nesting fidelity and molecular evidence for natal homing in the freshwater turtle, *Graptemys kohnii*. *Proceedings of the Royal Society B*. 272 : 1345-1350.

Gagnon, M.C. et Angers, B. 2006. The determinant role of proglacial drainages on the genetic structure : a comparative study. *Molecular Ecology*. 15 : 1051-1065.

Galbraith, D.A. et Brooks, R.J. 1987. Survivorship of adult females in a northern population of Common Snapping Turtles, *Chelydra serpentina*. *Canadian Journal of Zoology*. 65 : 1581-1586.

Galois, P. et Bonin, J. 1999. Rapport sur la situation de la tortue des bois (*Clemmys insculpta*) au Québec. Société de la Faune et des Parcs du Québec. Direction de la Faune et des Habitats. Québec. 45 p.

Gemmell, D.J. 1970. Some observations on the nesting of the Western Painted Turtle, *Chrysemys picta bellii*, in northern Minnesota. *Canadian Field-Naturalist*. 84 : 308-309.

GENBANK. *Chrysemys picta* mitochondrion, complete genome. AF069423. www.ncbi.nlm.nih.gov.

Gerlach, G. et Musolf, K. 2000. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation Biology*. 14 : 1066-1074.

Gibbons, J.W. 1970. Sex ratios in turtles. *Researches on Population Ecology*. 12(2) : 252-254.

- Gibbons, J.W. 1987. Why do turtles live so long?. *Bioscience*. 37(4) : 262-269.
- Gibbons, J.W. et Semlitsch, R.D. 1982. Survivorship and longevity of a long-lived vertebrate species : how long do turtles live?. *Journal of Animal Ecology*. 51 : 523-527.
- Gibbs, J.P. et Amato G.D. 2000. Genetics and conservation in turtle conservation. In : Klemens, M. W. Ed. *Turtle Conservation*, chapitre 8, pages 207-217. Smithsonian Institution Press, Washington and London, USA.
- Gibbs, H.L., Prior, K.A., Weatherhead, P.J. et Johnson, G. 1997. Genetic structure of populations of the threatened eastern massasauga rattlesnake, *Sistrurus c. catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*. 6 : 1123-1132.
- Gibbs, J.P. et Shriver, W.G. 2002. Estimating the effects of road mortality on turtle populations. *Conservation Biology*. 16 : 1647-1653.
- Girard, P. et Angers, B. 2006. The effects of the postglacial seas on the genetic diversity of Longnose dace (*Rhinichthys cataractae*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 63 : 1429-1436.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2) : A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*. 86(6) : 485-486.
- Graham, T.E. et Doyle, T.S. 1977. Growth and population characteristics of Blanding's Turtle, *Emydoidea blandingii*, in Massachusetts. *Herpetologica*. 33(4) : 410-414.
- Gray, E.M. 1995. DNA fingerprinting reveals a lack of genetic variation in northern populations of the Western Pond Turtle (*Clemmys marmorata*). *Conservation Biology*. 9(5) : 1244-1255.

Groot Bruinderink, G.W.T.A et Hazebroek, E. 1996. Ungulate traffic collisions in Europe. *Conservation Biology*. 10(4) : 1059-1067.

Guo, S.W. et Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*. 48 : 361-372.

Guyot, G. et Clobert, J. 1997. Conservation measures for a population of Hermann's Tortoise (*Testudo hermanni*) in southern France bisected by a major highway. *Biological Conservation*. 79 : 251-256.

Halliburton, R. 2004. Introduction to population genetics. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. 650 p.

Hamilton, A.M., Freedman, A.H. et Franz, R. 2002. Effects of deer feeders, habitat and sensory cues on predation rates on artificial turtle nests. *The American Midland Naturalist*. 147 : 123-134.

Hammer, D.A. 1969. Parameters of a marsh Snapping Turtle population, Lacreek Refuge, South Dakota. *Journal of Wildlife Management*. 33(4) : 995-1005.

Harding, R.M., Healy, E., Ray, A.J., Ellis, N.S., Flanagan, N., Todd, C., Dixon, C., Sajantila, A., Jackson, I.J., Birch-Machin, M.A. et Rees, J.L. 2000. Evidence for variable selective pressures at MC1R. *American Journal of Human Genetics*. 66 : 1351-1361.

Harris, L. 1984. The fragmented forest : island biogeography theory and the preservation of biotic diversity. University of Chicago Press, Chicago, USA. 234 p.

Hartl, D.L. et Clark, A.G. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. 542 p.

- Haxton, T. 2000. Road mortality of Snapping Turtles, *Chelydra serpentina*, in Central Ontario during their nesting period. *Canadian Field-Naturalist*. 114 : 106-110.
- Heppell, S.S., Crowder, L.B. et Crouse, D.T. 1996. Models to evaluate headstarting as a management tool for long-lived turtles. *Ecological Applications*. 6 : 556-565.
- Iverson, J.B. 1991. Patterns of survivorship in turtles (order *Testudines*). *Canadian Journal of Zoology*. 69 : 385-391.
- Iverson, J.B. 1979. Another inexpensive turtle trap. *Herpetological Review*. 10(2) : 55.
- Janzen, F.J. 1994. Vegetational cover predicts the sex ratio of hatchling turtles in natural nests. *Ecology*. 75(6) : 1593-1599.
- Jennions, M.D. et Petrie, M. 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 75 : 21-64.
- Joyal, L.A, McCollough, M. et Hunter, M.L. 2001. Landscape ecology approaches to wetland species conservation : a case study of two turtles species in southern Maine. *Conservation Biology*. 15 : 1755-1762.
- King, T.L. et Julian, S.E. 2004. Conservation of microsatellite DNA flanking sequence across 13 Emydid genera assayed with novel bog turtle (*Glyptemys muhlenbergii*) loci. *Conservation Genetics*. 5 : 719-725.
- Knapp, K. 2005. Crash reduction factors for deer-vehicle crash countermeasures. *Transportation Research Record*. 1908 : 172-179.
- Kolligs, D. 2000. Ecological effects of artificial light sources on nocturnally active insects, in particular on butterflies (*lepidoptera*). *Faunistisch-Oekologische Mitteilungen Supplement*. 28 : 1-136.

Koper, N. et Brooks, R.J. 1998. Population-size estimators and unequal catchability in Painted Turtles. *Canadian Journal of Zoology*. 76 : 458-465.

Kuo, C. et Janzen, F. 2004. Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of Ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics*. 5 : 425-437.

Lang, L.D. 2007. Confirmation génétique de la présence de couguars (*Puma concolor*) dans l'est du Canada. Mémoire de maîtrise, Département des Sciences Biologiques, Université de Montréal, 72 p.

Legler, J.M. 1954. Nesting habits of the Western Painted Turtle (*Chrysemys picta bellii*) (Gray). *Herpetologica*. 10(3) : 137-144.

Lippé, C., Dumont, P. et Bernatchez, L. 2006. High genetic diversity and no inbreeding in the endangered Copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (*Catostomidae*, Pisces): the positive sides of a long generation time. *Molecular Ecology*. 15 : 1769-1780.

Luikart, G., Sherwin, W.B., Steele, B.M. et Allendorf, F.W. 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology*. 7 : 963-974.

Malo, J.E., Suarez, F. et Diez, A. 2004. Can we mitigate animal-vehicle accidents using predictive models?. *Journal of Applied Ecology*. 41 : 701-710.

Marchand, M.N. et Litvaitis, J.A. 2004. Effects of habitat features and landscape composition on the population structure of a common aquatic turtle in a region undergoing rapid development. *Conservation Biology*. 18(3) : 758-767.

May, S.A. et Norton, T.W. 1996. Influence of fragmentation and disturbance of the potential impact of feral predators on native fauna in Australian forest ecosystems. *Wildlife Research*. 23 : 387-400.

Meffe, G.K. 1986. Conservation genetics and the management of endangered fishes. *Fisheries*. 11 : 14-23.

Michalakis, Y. et Excoffier, L. 1996. A genetic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*. 142 : 1061-1064.

Mitchell, J.C. 1985. Variation in the male reproductive cycle in a population of Painted Turtles, *Chrysemys picta*, from Virginia. *Herpetologica*. 41(1) : 45-51.

Mitchell, J.C. et Klemens, M.W. 2000. Primary and secondary effects of habitat alteration. In : Klemens, M. W. Ed. Smithsonian Institution Press, Washington and London, USA. *Turtle Conservation*, p. 5-32.

Mockford, S.W., Wright, J.M., Snyder, M. et Herman T.B. 1999. A non-destructive source of DNA from hatchling freshwater turtles for use in PCR base assays. *Herpetological review*. 30 : 148-149.

Moll, E.O. et Moll, D. 2000. Conservation of river turtles. In : Klemens, M. W. Ed. Smithsonian Institution Press, Washington and London, USA. *Turtle Conservation*, p. 126-155.

Moritz, C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Ecology*. 3 : 401-411.

Moritz, C., Dowling, T.E. et Brown, W.M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 18 : 269-292.

Mundy, N.I., Winchell, C.S., Burr, T. et Woodruff, D.S. 1997. Microsatellite variation and microevolution in the critically endangered San Clemente Island loggerhead shrike (*Lanius ludovicianus mearnsi*). Proceeding of the Royal Society of London series B. 264 : 869-875.

Nagle, R.D., Kinney, O.M. Congdon, J.D. et Beck, C.W. 2000. Winter survivorship of hatchling Painted Turtles (*Chrysemys picta*) in Michigan. Canadian Journal of Zoology. 78 : 226-233.

Pearse, D.E., Janzen, F.J. et Avise, J.C. 2001. Genetic markers substantiate long-term storage and utilization of sperm by female painted turtles. Heredity. 86 : 378-384.

Pearse, D.E., Janzen, F.J. et Avise, J.C. 2002. Multiple paternity, sperm storage, and reproductive success of female and male painted turtles (*Chrysemys picta*) in nature. Behavioural Ecology and Sociobiology. 51 : 164-171.

Petokas, P.J. et Alexander, M.M. 1980. The nesting of *Chelydra serpentina* in northern New York. Journal of Herpetology. 14(3) : 239-244.

Piry, S., Luikart, G. et Cornuet, J.M. 1999. Bottleneck : A computer program for detecting recent reductions in effective population size from allele frequency data. Journal of Heredity. 90 : 502-503.

Puigserver, M., Ramon, G., Moya, G. et Martinez-Taberner, A. 2002. Planktonic chlorophyll a and eutrophication in two Mediterranean littoral systems (Mallorca Island, Spain). Hydrobiologia. 475 : 493-504.

Queller, D.C. et Goodnight, K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. Evolution. 43 : 258-275.

Ramp, D., Wilson, V.K et Croft, D.B. 2006. Assessing the impacts of roads in peri-urban reserves : Road-based fatalities and road usage by wildlife in the Royal National Park, New South Wales, Australia. *Biological Conservation*. 129(2006) : 348-359.

Raymond, M. et Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests 443 and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86 : 248-249.

Reed, D.H. et Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*. 17 : 230-237.

Rhen, T. et Lang, J.W. 1995. Phenotypic plasticity for growth in the Common Snapping Turtle : effects of incubation temperature, clutch, and their interaction. *The American Naturalist*. 146(5) : 726-747.

Ricciardi, A. et Rasmussen, J. 1999. Extinction rates of North American freshwater fauna. *Conservation Biology*. 13 : 1220-1222.

Rich, C. et Longcore, T. 2005. Ecological consequences of artificial night lighting. Island Press, Washington, DC, 458 p.

Richardson, J.H., Shore, R.F., Treweek, J.R. et Larkin, S.B.C. 1997. Are major roads a barrier to small mammals?. *Journal of Zoology*. 243 : 840-846.

Robinson, C. et Bider, J.R. 1988. Nesting synchrony - A strategy to decrease predation of Snapping Turtle (*Chelydra serpentina*) nests. *Journal of Herpetology*. 22(4) : 470-473.

Ross, D.A. et Anderson, R.K. 1990. Habitat use, movements, and nesting of *Emydoidea blandingi* in Central Wisconsin. *Journal of Herpetology*. 24(1) : 6-12.

Rubin, C.S., Warner, R.E., Bouzat, J.L. et Paige, K.N. 2001. Population genetic structure of Blanding's Turtles (*Emydoidea blandingii*) in an urban landscape. *Biological Conservation*. 99 : 323-330.

Saeki, M. et Macdonald, D.W. 2004. The effects of traffic on the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) and other mammals in Japan. *Biological Conservation*. 118 : 559-571.

Saint-Hilaire, D. 2003. Rapport sur la situation de la tortue mouchetée (*Emydoidea blandingii*) au Québec. Société de la Faune et des Parcs du Québec. Direction de l'Aménagement de la Faune de l'Outaouais. Québec. 27 p.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: Laboratory manual* 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schneider, S., Kuffer, J.M., Roessli, D. et Excoffier, L. 1997. Arlequin version 1.1 : A Software for Population Genetic Data Analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. Available at: <http://anthropologie.unige.ch/arlequin/>.

Schwarzkopft, L. et Brooks, R.J. 1987. Nest-site selection and offspring sex ratio in Painted Turtles, *Chrysemys picta*. *Copeia*. 1987(1) : 55-61.

Seigel, R.A. et Dodd, C.K. Jr., 2000. Manipulation of turtle populations for conservation. In : Klemens, M. W. Ed. Smithsonian Institution Press, Washington and London, USA. *Turtle Conservation*, p. 218-238.

Semlitsch, R.D. et Bodie, J.R. 2003. Biological criteria for buffer zones around wetlands and riparian habitats for amphibians and reptiles. *Conservation Biology*. 17 : 1219-1228.

Shirose, L., Bishop, C. et Gendron, A. 1995. Amphibians and Reptiles in Great Lakes Wetlands : Threats and conservation. Rapport présenté à Environnement Canada.

Smith, H.M. 1956. Handbook of Amphibians and Reptiles of Kansas. Topeka: University of Kansas, Lawrence, 356 p.

Snow, J.E. 1982. Predation of Painted Turtle nests : nest survival as a function of nest age. *Canadian Journal of Zoology*. 77 : 1609-1614.

Standing, K.L., Herman, T.B., Shallow, M., Power, T. et Morrison, I.P. 2000. Results of the nest protection program for Blanding's Turtle in Kejimikujik National Park, Canada : 1987-1997. *Chelonian Conservation and Biology*. 3(4) : 637-642.

Starkey, D.E., Shaffer, H.B., Burke, R.L., Forstner, M.R.J., Iverson, J.B., Janzen, F.J., Rhodin, A.G.J. et Ultsch, G.R. 2003. Molecular systematic, phylogeography, and the effects of Pleistocene glaciation in the painted turtle (*Chrysemys picta*) complex. *Evolution*. 57(1) : 119-128.

Steen, D.A. et Gibbs, J.P. 2004. Effects of roads on the structure of freshwater turtle populations. *Conservation Biology*. 18 : 1143-1148.

Tallmon, D., Luikart, G. et Waples, R. 2004. The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology and Evolution*. 19 : 489-496.

Tardif, B., Lavoie, G et Lachance, Y. 2005. Atlas de la biodiversité du Québec; les espèces menacées ou vulnérables. Gouvernement du Québec, Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du Développement Durable, du Patrimoine Écologique et des Parcs, Québec, 60 p.

Temple, S.A. 1987. Predation on turtle nests increases near ecological edges. *Copeia*. 1987(1) : 250-252.

Tessier, N., Rioux Paquette, S. et Lapointe, F.J. 2005. Conservation genetics of the wood turtle (*Glyptemys insculpta*) in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Zoology*. 83 : 765-772.

Tucker, A.D., Gibbons, J.W. et Greene, J.L. 2001. Estimates of adult survival and migration for diamondback terrapins : conservation insight from local extirpation within a metapopulation. *Canadian Journal of Zoology*. 79 : 2199-2209.

Vogt, R.C. et Bull, J.J. 1984. Ecology of hatchling sex ratio in Map Turtles. *Ecology*. 65(2) : 582-587.

Wagner, H.W. et Sefc, K.M. 1999. IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna.

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

Westemeier, R., Brawn, J., Simpson, S., Esker, T., Jansen, R., Walk, J., Kershner, E., Bouzat, J. et Paige, K. 1998. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science*. 282 : 1695-1698.

Whittaker, J.C., Harbord, R.M., Boxall, N., Mackay, I., Dawson, G. et Sibly, R.M. 2003. Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics*. 164 : 781-787.

Wilhoft, D.C., Del Baglivo, M.G. et Del Baglivo M.D. 1979. Observations on mammalian predation of Snapping Turtle nests (*Reptilia, Testudines, Chelydridae*). *Journal of Herpetology*. 13(4) : 435-438.

Wilson, E.O. 1988. The current state of biological diversity. National Academy Press, Washington, DC. p. 3-18.

Wise, C.A., Ranker, T.A. et Linhart, Y.B. 2002. Modeling problems in conservation genetics with *Brassica rapa* : Genetic variation and fitness in plants under mild, stable conditions. *Conservation Biology*. 16 : 1542-1554.

Xiaoying, C. et Shijie, L. 2006. An analysis on the evolvement processes of lake eutrophication and their characteristics of the typical lakes in the middle and lower reaches of Yangtze River. *Chinese Science Bulletin*. 51(13) : 1603-1613.

Yahner, R.H. et Mahan, C.G. 1997. Effects of logging roads on depredation of artificial ground nests in a forested landscape. *Wildlife Society Bulletin*. 25(1) : 158-162.

ANNEXE

Appendix I.

Example of the methodology used to estimate the number of putative mothers, mean, variance, and coefficient of variation in reproductive success.

1) Individuals must share the same mtDNA haplotype :

Individual	mtDNA
T1	A
T2	B
T3	C
T4	A
T5	A
T6	B

Haplotype A	T1-T4-T5
Haplotype B	T2-T6
Haplotype C	T3

Mitochondrial

Mean in reproductive success = $(3+2+1) / 5 = 2$

Variance in reproductive success = $((3-2)^2 + (2-2)^2 + (1-2)^2) / (3-1) = 1$

2) Pair of individuals of a given maternal group must share one allele for at least three of the five nuclear loci:

		Locus 1	Locus 2	Locus 3	Locus 4	Locus 5	Maternal groups					
2 / 5 loci	T2	a	b	e	g	i	k	m	o	q	r	2 groups of 1 individual
	T6	a	a	f	h	j	l	n	p	q	s	
3 / 5 loci	T1	a	a	e	f	i	j	m	p	q	x	
	T4	a	b	e	g	j	k	n	u	r	y	
	T5	a	b	f	g	j	k	o	v	w	z	

- 3) Since a mother cannot transmit more than two different alleles at each locus to its progenies, individuals of a given maternal group must share less than two alleles for each locus:

	Locus 1		Locus 2		Locus 3		Locus 4		Locus 5		Maternal groups
T1	a	a	e	f	i	j	m	P	q	x	1 group of
T4	a	b	e	g	j	k	n	U	r	y	1 individual and
T5	a	b	f	g	j	k	o	V	w	z	1 group of two individuals

Nuclear + Mitochondrial

$$\text{Mean in reproductive success} = (1+1+1+1+2) / 5 = 1.2$$

$$\text{Variance in reproductive success} =$$

$$((1-1,2)^2 + (1-1,2)^2 + (1-1,2)^2 + (1-1,2)^2 + (2-1,2)^2) / (5-1) = 0.2$$

$$\text{Number of putative mothers} = 5$$

$$\text{Coefficient of variation in reproductive success} = (\sqrt{0.2}) * 100 / 1.2 = 37.3$$