

**INFLUENCE DU TRAFIC ROUTIER SUR LA DIVERSITÉ
GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE TORTUES PEINTES**
Chrysemys picta

Bernard Angers et Claude-Olivier Silva-Beaudry
Département de sciences biologiques
Université de Montréal

Réalisé pour le compte du Ministère des Transports
Gouvernement du Québec

Mars 2006

La présente étude a été réalisée à la demande du ministère des Transports du Québec et a été financée par la Direction de la recherche et de l'environnement.

Les opinions exprimées dans le présent rapport n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs et ne reflètent pas nécessairement les positions du ministère des Transports du Québec.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le ministère des Transports du Québec pour la confiance accordée dans la réalisation de ce projet. Un merci particulier à Richard Laparé, Jean-François Desroches et Isabelle Picard pour leur collaboration tout au long de ce projet. Merci également à Philippe Girard, Frédéric Cyr et Marie-Claire Binet qui ont participé soit aux échantillonnages, soit aux analyses de laboratoire ainsi qu'à Devon Pearse pour les informations relatives à l'utilisation de ses marqueurs microsatellites et à Eric Valiquette de la station de biologie des Laurentides (Université de Montréal) pour la logistique liée à l'échantillonnage.

RÉSUMÉ

L'objectif de ce projet est de déterminer si les mortalités dues au trafic routier modifient significativement la dynamique des populations de tortues peintes (*Chrysemys picta*) vivant à proximité des routes et comment cet effet se traduit sur la diversité génétique de ces populations. La diversité génétique d'une population située à proximité des routes et d'une population de référence a été déterminée à partir de marqueurs microsatellites localisés sur le génome nucléaire et le génome mitochondrial. Les analyses indiquent que la population située à proximité des routes démontre une plus petite taille efficace surtout au niveau du génome mitochondrial, un déséquilibre de Hardy-Weinberg et une grande variance succès reproducteur des femelles, mais pas de signal provenant de la réduction des effectifs. Ces résultats suggèrent que la mortalité des adultes due à la proximité des routes n'a pas d'effet significatif sur la dynamique de la population étudiée. Cependant, la proximité des routes agirait fortement au niveau du recrutement des progénitures. Bien que ces résultats demanderont d'être validés sur un ensemble plus exhaustif de populations, ils suggèrent que la mortalité des adultes par le trafic routier pourrait n'être que la pointe de l'iceberg des perturbations démographiques agissant sur les populations de tortues, et que les effets au niveau du recrutement pourrait avoir des conséquences tout aussi, sinon plus dramatiques sur l'intégrité génétique de ces populations.

TABLE DES MATIÈRES

1- PROBLÉMATIQUE	9
2- MATÉRIEL ET MÉTHODES	10
2.1- LES SITES ET L'ÉCHANTILLONNAGE	10
2.2- LES MARQUEURS GÉNÉTIQUES	10
2.2.1 <i>Marqueur mitochondrial</i>	10
2.2.2 <i>Marqueurs nucléaires</i>	10
2.3- LES ANALYSES GÉNÉTIQUES.....	12
2.4- LES ANALYSES STATISTIQUES	12
3- RÉSULTATS.....	14
3.1- DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS.....	14
3.2- ÉQUILIBRE DE HARDY-WEINBERG	16
3.3- TAILLE EFFICACE ET ÉQUILIBRE MUTATION DÉRIVE	17
3.4- DIFFÉRENTIATION DES POPULATIONS	18
3.5- MARQUEUR MITOCHONDRIAL	19
3.6- ANALYSE CONJOINTE DE TOUS LES MARQUEURS	21
4- INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.....	23
4.1- HISTOIRE DES POPULATIONS	23
4.2- TAILLE DES POPULATIONS	23
4.3- IMMIGRATION	24
4.4- LE TRAFIC ROUTIER.....	25
5- CONCLUSION	26
6- RÉFÉRENCES.....	27

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Amorces et nombre d'allèles détectés dans l'étude pour les marqueurs génétiques utilisés

Tableau 2 : Indices de diversité génétique pour les populations CB et CA pour chacun des marqueurs, en terme de nombre d'allèles (k), d'hétérozygotie attendue sous HW (H_E) et d'hétérozygotie observée (H_O , pertinent pour les marqueurs nucléaires seulement)

Tableau 3 : Résultats des tests d'équilibre de Hardy-Weinberg à chacun des locus et pour l'ensemble des locus nucléaires. Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

Tableau 4 : Résultats des tests d'équilibre mutation-dérive pour les populations CB et CA pour chacun des marqueurs nucléaires. Les indices observés (k et H_E) sont repris pour fins de comparaison avec les indices de H_E générés (H_{EQ}) selon les modèles de mutation IAM, TPM et SMM, ainsi que la probabilité de chaque marqueurs. La probabilité associée à chacune des populations est la probabilité (unilatérale) que la population ait subi un effondrement des effectifs à partir de l'ensemble des marqueurs sous les trois modèle de mutation. Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

Tableau 5 : Résultats des tests de différentiation allélique entre les populations CB et CA pour chacun des marqueurs, pour l'ensemble des marqueurs nucléaires seulement et pour l'ensemble des marqueurs. Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

Tableau 6 : Résultat des tests de déséquilibre génotypique entre chaque paires de locus. Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation des sites d'échantillonnage CB (en haut à droite) et CA (en bas à gauche)

Figure 2 : Fréquences alléliques des marqueurs microsatellites nucléaires pour les populations CB et CA

Figure 3 : Fréquences alléliques du marqueur microsatellite mitochondrial pour les populations CB et CA

Figure 4 : Coefficients de parenté I_{xy} , estimé à partir des marqueurs microsatellites nucléaires pour chaque paire d'individus pour les populations CB et CA

1- PROBLÉMATIQUE

Les tortues sont particulièrement vulnérables à la mortalité sur les routes notamment à cause de la lenteur de leur déplacement et au fait que les femelles sélectionnent souvent l'accotement des routes comme site de ponte (Forman *et al.* 2003; Haxton, 2000). Des études récentes ont évalué l'ampleur de ce phénomène où les mortalités causées par les routes représentent plus de 10% des effectifs des populations (Gibbs et Shriver 2002). Une hausse du taux de mortalité chez les tortues adultes peut mener au déclin des populations (Congdon *et al.* 1994; Seigel et Dodd 2000). L'accroissement constant du trafic routier représente donc une menace pour les populations de tortues périphériques.

Au Québec, la région de l'Outaouais supporte la plus grande diversité et abondance de tortues. Une étude récente a démontré la présence de plus d'une tortue morte par 10 km de route (Desroches et Picard 2005). Toutefois, il est encore impossible de quantifier ou même d'évaluer l'impact réel de cette mortalité routière, puisque très peu d'études scientifiques se sont penchées sur le problème jusqu'à maintenant.

L'objectif de ce projet est de déterminer si les mortalités dues au trafic routier modifient significativement la dynamique des populations de tortues peintes (*Chrysemys picta*) vivant à proximité des routes et comment cet effet se traduit sur la diversité génétique de ces populations. La diversité génétique des populations se veut le reflet des différents processus démographiques et évolutifs subits par ces populations (migration, fluctuation de la taille de la population, mutation, sélection naturelle, stratégie de reproduction). 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 la capacité de l'habitat (compétition, site de reproduction, alimentation, parasites, prédation).

L'information apportée par les marqueurs génétiques est une aide précieuse pour la mise en évidence de tels phénomènes. L'utilisation de marqueurs génétiques hautement variables (notamment les microsatellites) permet l'étude approfondie de la dynamique des gènes dans les populations. Les microsatellites sont actuellement parmi les marqueurs moléculaires les plus utilisés en génétique des populations. Ils sont composés de motifs répétés en tandem (motifs de deux à six nucléotides, par exemple GATA-GATA-GATA). Ils possèdent des hauts taux de mutations générant un polymorphisme important. Ces marqueurs sont également très abondants et permettent ainsi une appréciation globale du génome nucléaire (Estoup et Angers 1998).

2- MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1- Les sites et l'échantillonnage

La population perturbée a été choisie sur le site de Campbell's Bay (CB : N 45° 44' 19.2", O 76 ° 35' 37.7"). C'est un lac de petite taille situé à proximité de la ville de Campbell's Bay, à la jonction des routes 148 et 301 (Figure 1). Le lac est situé à moins de 150 mètres de chacune de ces routes. La population de référence (non perturbée) est le site Calumet (CA : N 45° 41' 49.7", O 76 ° 37' 42.7"). Ce lac de taille comparable à celui du site précédent est situé en région boisée sur l'île du Grand Calumet (Figure 1).

Ces deux sites ont été sélectionnés en fonction de leur proximité géographique. Ils sont distants d'environ 5,3 km et sont situés de part et d'autre de la rivière des Outaouais. Campbell's Bay est à environ 0,69 km à l'est de la rivière Outaouais et le site Calumet à environ 1 km à l'ouest de la rivière Outaouais. La proximité géographique augmente la possibilité de comparer des populations provenant d'une origine commune récente et donc possédant un bagage génétique relativement semblable. Ceci permet d'éviter des signaux pouvant être causés par une source autre que celle testée par notre hypothèse (autocorrélation).

Les sites ont été échantillonnés à l'automne 2005 à l'aide de 10 verveux. Un total de 18 tortues a été capturé à CB, alors que 17 tortues ont été capturées à CA. Les tortues ont été mesurées et un échantillon de peau, d'écaille et de sang a été prélevé pour les analyses génétiques. Les tortues ont ensuite été marquées d'une tâche de peinture à l'acrylique blanche sur leur plastron afin d'éviter les recaptures avant d'être remises en liberté sur les lieux mêmes de leur capture.

2.2- Les marqueurs génétiques

2.2.1 *Marqueur mitochondrial*

Un segment de la région de contrôle du génome mitochondrial contenant un très grand nombre de répétitions de motifs TA et TATTA (microsatellite composé imparfait) a été retenu pour les fins de cette étude. À partir de la séquence déposée dans le répertoire de GENBANK, des amorces ont été conçues de part et d'autre de cette région (Tableau 1).

2.2.2 *Marqueurs nucléaires*

Trois des marqueurs microsatellites utilisés proviennent de Pearse *et al.* (2001), soit CP2, CP3 et CP10. Les autres locus ont été déterminés à partir d'une recherche sur une banque partielle d'ADN de tortue (Angers 2005). Seul le locus CP16 s'est révélé hautement variable. Les caractéristiques de ces marqueurs apparaissent au Tableau 1.

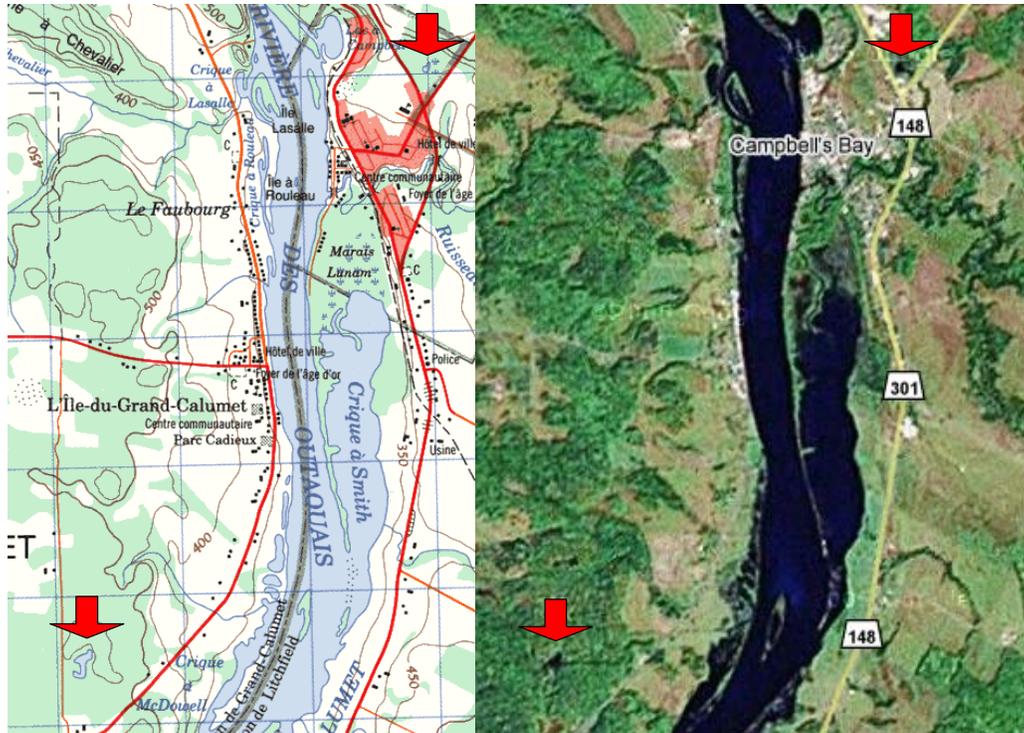


Figure 1 : Localisation des sites d'échantillonnage CB (en haut à droite) et CA (en bas à gauche)

Tableau 1 : Amorces et nombre d'allèles détectés dans l'étude pour les marqueurs génétiques utilisés

Locus	Amorces	k	référence
CP2	CTCTAAGGGTTGCACTTCTCAA GAGGTGGCATCAAACATCAT	12	Pearse <i>et al</i> 2001
CP3	ATCTTTAAGTCTGTGAAC TTCAGGG CTGTCTCATGCAAAGCTGGTAG	7	Pearse <i>et al</i> 2001
CP10	GGTGCAGCAAGTTCAGGAGAC GGTGTTAATGCACTGGAGAATCA	14	Pearse <i>et al</i> 2001
CP16	CCGTTGTCTGTGCCAAAC CTGCTGAATCATCACTTG	16	Cette étude
MT	AGTGAAATAAAAGCACC CCGTGCTTTGTGATAAGC	21	GenBank : AF069423

2.3- Les analyses génétiques

L'extraction de l'ADN a été effectuée à partir des échantillons d'écaille selon un protocole standard (Sambrook *et al.* 1989). Les tissus ont été digérés à l'aide de *Protéinase K* à 50°C durant toute une nuit. Le lendemain, une purification a été réalisée à l'aide de traitements au phénol et au chloroforme puis l'ADN a été précipité dans l'éthanol 95%.

Les différents marqueurs ont été amplifiés par la méthode de PCR à partir du programme ci-dessous :

1 cycle :
92°C 30 secondes
45 cycles :
92°C 15 secondes
50°C 15 secondes
68°C 30 secondes
1 cycle :
68°C 120 secondes

La taille des fragments pour chacun des individus a été déterminée sur gel dénaturant de polyacrylamide 6% (19:1 acrylamide:bis-acrylamide). La présence d'ADN a ensuite été révélée à l'aide de solution de nitrate d'argent.

2.4- Les analyses statistiques

Pour chacune des populations, la diversité génétique a été évaluée en terme du nombre d'allèles (k), de l'hétérozygotie prédite (H_E) sous l'équilibre de Hardy-Weinberg (HW). Pour les marqueurs nucléaires, la proportion d'hétérozygotes observée (H_O) a également été déterminée. Ces estimateurs

ont été obtenus à l'aide du logiciel GENEPOP version 3.3 (Raymond et Rousset 1995).

La taille efficace (N_E) des populations a été estimée de façon indépendante pour les marqueurs nucléaires et mitochondriaux, à l'aide du programme MIGRATE version 2.0.6 (Beerli et Felsenstein 1999, 2001). Les estimés de theta ($4N_E\mu$ pour les marqueurs nucléaires, $N_E\mu$ pour le marqueur mitochondrial) sont déterminés à partir d'un processus de coalescence, par maximum de vraisemblance. À cause du nombre pratiquement infini d'arbres de coalescence pouvant être produit, un sous échantillonnage est réalisé à l'aide de MCMC (*Markov chain Monte Carlo*). Les valeurs suivantes ont été ajustées pour les différentes simulations : 10 chaînes courtes où 20 000 phylogénies d'allèles ont été produites et 1 000 ont été retenues puis 3 chaînes longues où 160 000 phylogénies ont été échantillonnées et 10 000 ont été retenues. Le modèle de mouvement Brownien a été retenu comme modèle évolutif des marqueurs. Ce processus a été réalisé trois fois de façon indépendante afin de vérifier la concordance des estimés. La moyenne des estimés a été calculée. Afin d'estimer la taille efficace, les valeurs obtenues pour les marqueurs nucléaires ont été divisées par 4μ où les valeurs de μ utilisées varient de $2,5 \times 10^{-4}$ à $4,0 \times 10^{-4}$ (Yue *et al.* 2004, Garcia de Leon *et al.* 1997).

L'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé pour les marqueurs nucléaires seulement à l'aide du logiciel GENEPOP. L'hypothèse nulle de ce test est que les individus proviennent de la rencontre aléatoire des gamètes. La probabilité de ces tests a été évaluée à l'aide de chaîne de Markov (Guo et Thompson, 1992).

La différenciation allélique a été testé pour tous les marqueurs (mitochondrial et nucléaires). L'hypothèse nulle de ce test est que la distribution des allèles est identique entre les populations. Finalement, un estimé du F_{ST} (Weir et Cockerham 1984) a également été déterminé à l'aide pour tous les marqueurs. Cet estimateur décrit la variance de la diversité génétique à l'intérieur des populations *versus* la diversité entre les populations. Le logiciel GENEPOP a été utilisé afin de tester la différenciation allélique et estimer le F_{ST} .

La distance D_{CE} de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) est une distance basée sur la dérive génétique exclusivement. La distance $\delta\mu^2$ de Goldstein *et al.* (1995) est une distance proportionnelle au temps de divergence et son espérance égale ($2\mu t$) deux fois le temps de divergence exprimé en génération (t) fois le taux de mutation des marqueurs (μ). C'est donc une distance qui permet de déterminer directement le temps de divergence entre les populations. Les distances génétiques entre les populations ont été estimées à l'aide du programme POPULATION version 1.2.28 (Langella 1999).

Afin de déterminer si une population a subi des variations démographiques récentes, l'équilibre mutation-dérive a été testé sur les marqueurs nucléaires à

l'aide du programme BOTTLENECK version 1.2.02 (Cornuet et Luikart 1996). La logique de ce test repose sur le fait qu'une population ayant subi une réduction de ses effectifs verra une réduction de son nombre d'allèles plus rapide que la réduction de l'hétérozygotie prédite sous HW (H_E) et ce pour la majorité des marqueurs. En situation d'équilibre, il est attendu d'observer autant de marqueurs en excès qu'en déficit. Un test de rang de Wilcoxon permet de déterminer si un nombre significatif de marqueurs sont en situation d'excès tel qu'attendu lors d'un effondrement des effectifs. Trois modèles de mutation ont été testés, soit le modèle infini d'allèles (IAM), le modèle par pas (SMM) qui représentent les deux modèles extrêmes applicables aux marqueurs microsatellites (Estoup et Angers 1998), et un modèle intermédiaire, le modèle de mutation en deux phases (TPM) en utilisant 10% de mutation non-SMM.

Les cas de déséquilibre génotypique pour chaque paire de marqueurs (nucléaires et mitochondrial) et dans chacune des populations ont été détectés à l'aide du logiciel GENEPOP. L'hypothèse nulle de ce test est que les génotypes à un locus sont indépendants de ceux des autres locus.

Les coefficients de parenté (I_{XY}), ont été calculés entre chaque paire d'individus de chaque population à partir de l'ensemble des marqueurs nucléaires à l'aide du logiciel IDENTIX version 1.1 (Belkhir *et al.* 2002).

3- RÉSULTATS

3.1- Diversité génétique des populations

Les quatre marqueurs microsatellites nucléaires utilisés dans cette étude se sont révélés très variables, démontrant entre 8 et 16 allèles par locus (Tableau 1), pour un total de 49 allèles.

Au niveau des populations, on observe une grande diversité génétique dans les deux populations étudiées (Figure 2, Tableau 2). Un total de 38 allèles différents a été observé pour chacune des populations. Selon le marqueur utilisé, entre 6 et 13 allèles par population ont été détectés.

Même si le nombre total d'allèles ne diffère pas entre les populations, la diversité génétique totale (H_E) apparaît toutefois plus élevée dans la population CA (0,8235) par rapport à celle de CB (0,7885). Ceci se confirme à trois des quatre locus qui démontrent une diversité plus élevée pour CA (Tableau 2). Cette différence est encore plus marquée au niveau de la proportion d'hétérozygotes (H_O) avec des valeurs de 0,8088 pour CA contre 0,7396 pour CB.

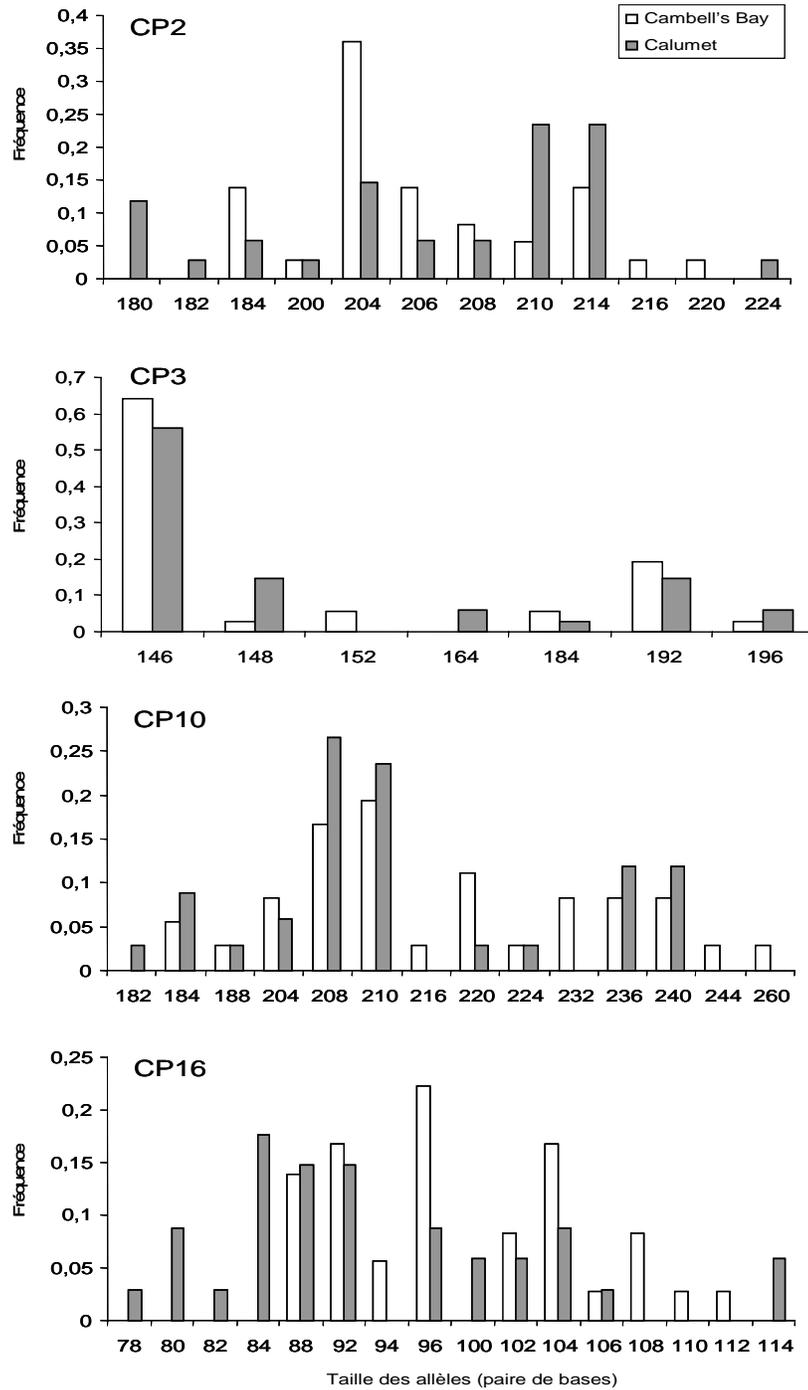


Figure 2 : Fréquences alléliques des marqueurs microsatellites nucléaires pour les populations CB et CA

Tableau 2 : Indices de diversité génétique pour les populations CB et CA pour chacun des marqueurs, en terme de nombre d'allèles (k), d'hétérozygotie attendue sous HW (H_E) et d'hétérozygotie observée (H_O , pertinent pour les marqueurs nucléaires seulement)

Locus	Indices	CB	CA
CP2	k	9	10
	H_E	0,8222	0,8663
	H_O	0,7778	0,8235
CP3	k	6	6
	H_E	0.5619	0.6560
	H_O	0.6667	0.7059
CP10	k	13	10
	H_E	0,8891	0,8556
	H_O	0,6250	0,8235
CP16	k	10	12
	H_E	0,8810	0,9162
	H_O	0,8889	0,8824
MT	k	10	12
	H_E	0.8825	0.9269

3.2- Équilibre de Hardy-Weinberg

Les résultats des tests d'équilibre de Hardy-Weinberg apparaissent au Tableau 3. Ces résultats indiquent que la population CA est à l'équilibre HW, ce pour l'ensemble des locus ($p=0,075$) ainsi que pour chacun des marqueurs individuels ($p > 0,065$). Toutefois, ce n'est pas le cas pour la CB où le test global est hautement significatif ($p < 0,0001$). Pour cette population, un déséquilibre est observé à deux locus (CP2 $p = 0,045$ et CP10 $p < 0,0001$) indiquant qu'il ne s'agit pas d'un hasard. En cherchant la cause de ce déséquilibre, on constate une différence importante entre la proportion d'hétérozygotes prédite sous HW (H_E) et celle observée (H_O) pour ces deux locus (traduit en terme de F_{IS} tableau 3), mais plus particulièrement au locus CP10 (Tableau 2). Cet excès d'homozygotes au locus CP10 est causé notamment par le fait que 8 des 9 occurrences de l'allèle 210 se retrouve dans quatre individus homozygotes (Annexe 1).

Tableau 3 : Résultats des tests d'équilibre de Hardy-Weinberg à chacun des locus et pour l'ensemble des locus nucléaires. Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

	Probabilité	F _{IS}
CB	< 0,0001	
L1	0,0451	+0,056
L2	0,8745	-0,193
L3	0,0000	+0,304
L4	0,7496	-0,009
CA	0,0746	
L1	0,0650	+0,051
L2	0,2511	-0,079
L3	0,4222	+0,039
L4	0,1059	+0,038

3.3- Taille efficace et équilibre mutation dérive

Le paramètre $4N_E\mu$ tel qu'estimé à l'aide du processus de coalescence est en moyenne presque deux fois plus faible pour CB (0,82458) que pour CA (1,50643). Cet estimateur tient compte à la fois de la taille efficace (N_E) et du taux de mutation. En utilisant des taux de mutation moyen observés chez les autres Vertébrés, on obtient une taille efficace variant entre 561 et 872 pour CB et entre 900 et 1400 pour CA.

La comparaison des H_E prédits sous équilibre mutation-dérive et les H_E estimés à partir des fréquences alléliques ne démontre aucune tendance claire pour l'ensemble des locus (Tableau 4). Les tests d'équilibre mutation-dérive effectués aussi bien en mode de mutation IAM, SMM que TPM (variant de 5-15% de mutation non SMM) ne sont pas significatifs, indiquant que les deux populations sont à l'équilibre mutation-dérive.

Tableau 4 : Résultats des tests d'équilibre mutation-dérive pour les populations CB et CA pour chacun des marqueurs nucléaires. Les indices observés (k et H_E) sont repris pour fins de comparaison avec les indices de H_E générés (H_{EQ}) selon les modèles de mutation IAM, TPM et SMM, leur écart type (S.D.) ainsi que la probabilité de chaque marqueurs (Prob). Les probabilités associées à chacune des populations est la probabilité (unilatérale) que la population ait subi un effondrement des effectifs à partir de l'ensemble des marqueurs sous les trois modèle de mutation. Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

	observé		sous I.A.M		sous T.P.M.		sous S.M.M.	
	k	He	Heq	Prob	Heq	Prob	Heq	Prob
CB				0,4375		0,8437		0,9687
CP2	9	0,822	0,795	0,4350	0,818	0,4350	0,854	0,1350
CP3	6	0,562	0,659	0,1960	0,703	0,0880	0,760	0,0110
CP10	13	0,889	0,891	0,3700	0,904	0,2110	0,917	0,0630
CP16	10	0,881	0,820	0,0940	0,847	0,2160	0,872	0,4710
CA				0,0625		0,1562		0,9375
CP2	10	0,866	0,824	0,2490	0,849	0,4010	0,875	0,3050
CP3	6	0,656	0,676	0,3270	0,703	0,2390	0,762	0,0570
CP10	10	0,856	0,830	0,3990	0,849	0,4620	0,876	0,1640
CP16	12	0,916	0,869	0,0330	0,884	0,1040	0,902	0,2730

3.4- Différentiation des populations

Au niveau de la composition allélique, on constate que 27 des 49 allèles appartenant aux marqueurs nucléaires sont partagés entre les populations (Figure 2). Onze allèles sont uniques à la population CB et onze autres pour CA. Cependant, les allèles uniques ne se retrouvent généralement qu'en faible proportion. Ainsi, ces allèles uniques ne représentent qu'entre 3,1 et 19,4 % des fréquences alléliques selon les locus et les populations. La seule exception provient du locus CP16 où 45,2% des fréquences de la population CA est constitué de ces allèles. La valeur de F_{ST} est donc très faible (0,0123), indiquant que la majorité de la diversité génétique se retrouve à l'intérieur des populations et que ces populations sont relativement semblables.

Malgré cette ressemblance, le test de différenciation allélique globale est significatif (p=0,0178; Tableau 5), indiquant que les populations possèdent une composition génétique différente. En analysant les marqueurs de façon individuelle, on constate que les tests de deux (CP2 et CP16) des quatre marqueurs sont significatifs (Tableau 5). On peut donc en conclure que ces deux populations sont isolées l'une par rapport à l'autre.

Tableau 5 : Résultats des tests de différentiation allélique entre les populations CB et CA pour chacun des marqueurs, pour l'ensemble des marqueurs nucléaires seulement et pour l'ensemble des marqueurs. Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

Locus	Probabilité
CP2	0,02763
CP3	0,26362
CP10	0,81170
CP16	0,01950
mt	< 0,00001
Global nucléaire	0,01777
Global total	< 0,00001

La distance génétique entre ces deux populations est de 0,3687 pour la distance D_{CE} et de 1,33 pour la distance $\delta\mu^2$. En utilisant 2.5×10^{-4} à $4,0 \times 10^{-4}$ comme taux de mutation (moyenne de plusieurs marqueurs microsatellites chez les Vertébrés), on peut estimer le temps de séparation entre ces populations de l'ordre de 1662 à 2660 générations. Si on considère que la maturité sexuelle est atteinte aux environs de 4 ans (Balcome *et al.* 1987), on obtient un temps de divergence 6 650-10 646 ans.

3.5- Marqueur mitochondrial

Le marqueur microsatellite mitochondrial utilisés dans cette étude s'est révélé extrêmement variable, démontrant 10 et 12 allèles pour la population CB et CA respectivement, pour un total de 21 allèles (Tableau 1, Figure 3). La diversité génétique totale (H_E) apparaît plus élevée dans la population CA (0,9269) par rapport à celle de CB (0,8825; Tableau 2).

La caractéristique la plus frappante de ce marqueur est le faible nombre d'haplotypes partagés entre les populations (Figure 3). Ceci est le résultat d'un taux de mutation très élevé du microsatellite (apparition de nombreux allèles) et de la transmission uniparentale du génome mitochondrial (perte plus rapide de la diversité comparativement au génome nucléaire). En fait, un seul haplotype est commun aux deux populations étudiées (haplotype 157). Ceci se traduit par un test de différentiation allélique extrêmement significatif ($p < 0,0001$; Tableau 4)

La taille efficace estimée à l'aide de ce marqueur est consistante avec les estimés obtenus avec les marqueurs nucléaires, en ce sens que la taille de CB est plus faible que celle de CA. La différence est cependant plus accentuée avec le marqueur mitochondrial où les valeurs de $N_{E\mu}$ pour CB est de 0,98 alors que celle de CA est de 2,76, soit près de trois fois plus petite pour CB.

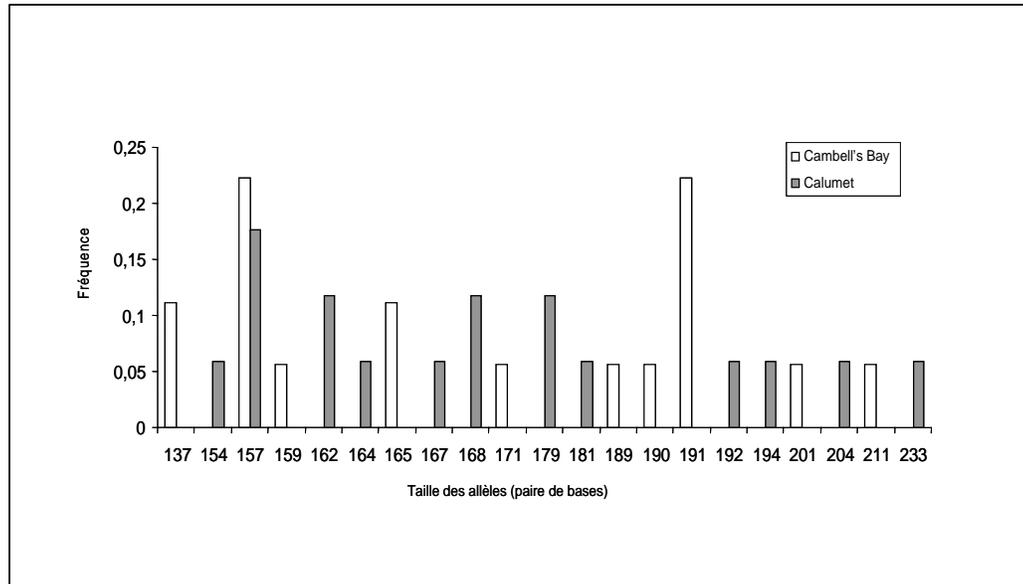


Figure 3 : Fréquences alléliques du marqueur microsatellite mitochondrial pour les populations CB et CA

3.6- Analyse conjointe de tous les marqueurs

L'analyse du déséquilibre gamétique entre tous les marqueurs (Tableau 5) indique que le locus nucléaire CP2 et le marqueur mitochondrial sont étroitement associés ($p = 0,021$), mais pour la population CB seulement. Les autres paires de marqueurs ne démontrent pas de déséquilibre ($p > 0,10$).

Tableau 6 : Résultat des tests de déséquilibre génotypique entre chaque paires de locus. Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

Population	Locus 1	Locus 2	Probabilité
CB	CP2	CP3	0,92362
	CP2	CP10	0,32222
	CP3	CP10	0,74449
	CP2	CP16	1,00000
	CP3	CP16	0,51675
	CP10	CP16	1,00000
	CP2	mt	0,02190
	CP3	mt	0,49195
	CP10	mt	0,45440
	CP16	mt	0,28855
CA	CP2	CP3	0,13949
	CP2	CP10	0,27731
	CP3	CP10	0,49499
	CP2	CP16	0,22330
	CP3	CP16	0,37471
	CP10	CP16	1,00000
	CP2	mt	0,32193
	CP3	mt	0,19719
	CP10	mt	0,20396
	CP16	mt	0,14789

Afin d'estimer le succès reproducteur des femelles, le coefficient de parenté a été estimé entre chaque paire d'individus pour chacune des deux populations à partir des génotypes nucléaires (Figure 4). On constate ainsi qu'un grand nombre de paires d'individus de la population CB possède un coefficient supérieur à 0,5 (20) comparativement à CA (13). Grâce à la grande variabilité du marqueur mitochondrial, il est possible de déterminer si les individus fortement apparentés proviennent de la même mère, en partageant le même haplotype mitochondrial. Ainsi, on constate que 10 des 18 individus de CB ne proviendraient que de trois mères différentes (lignée mitochondriale 137 : 2 progénitures, 157 : 4 progénitures, 191 : 4 progénitures) (Annexe 1). Pour CA, seulement 4 des 17 individus proviennent de deux mères différentes (lignée mitochondriale 162 : 2 progénitures, 179 : 2 progénitures). Ces résultats permettent d'estimer la moyenne et la variance du succès reproducteur des femelles pour l'échantillon. Ainsi, on constate que la moyenne et la variance de la population CB est plus élevée (1,63 et 1,45) que celles de la population CA (1,13 et 0,12).

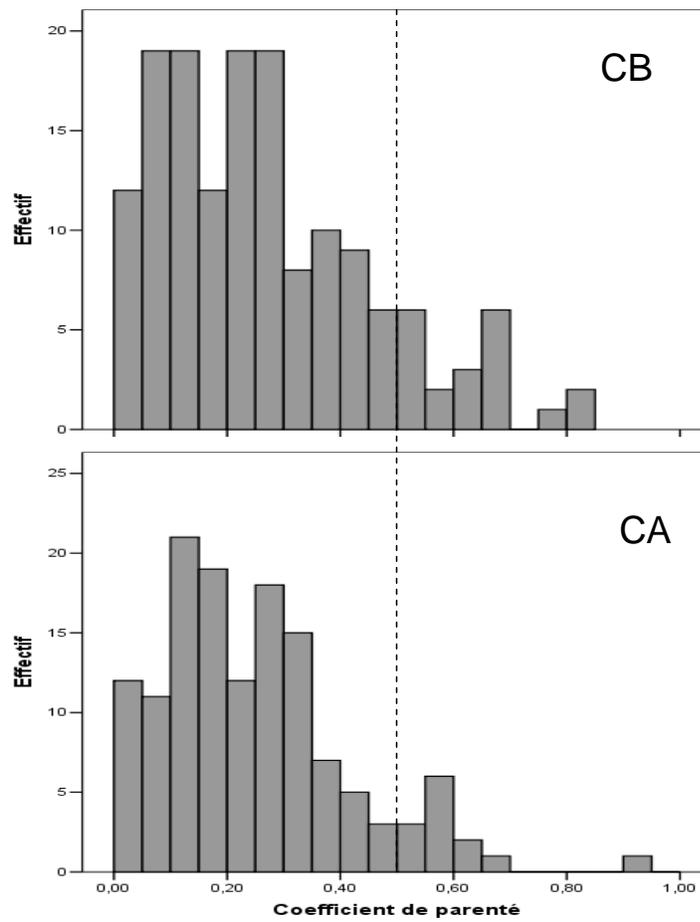


Figure 4 : Coefficients de parenté I_{xy} , estimé à partir des marqueurs microsatellites nucléaires pour chaque paire d'individus pour les populations CB et CA

4- INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

4.1- Histoire des populations

La comparaison de la composition génétique des populations indiquent que celles-ci sont reproductivement isolées; il n'y a donc pas ou peu d'échange entre elles, même si elles ne sont distantes que de quelques kilomètres. Les deux sites représentent donc autant de populations au sens biologique du terme.

D'un autre côté, ces populations quoique reproductivement isolées, sont tout de même très semblables (en terme de composition allélique et de F_{ST}) ce qui suggère qu'elles ont une origine très récente. On peut ainsi présumer que ces populations ont été formées à partir d'un même groupe fondateur suite à la colonisation post-glaciaire. La distance génétique $\delta\mu^2$ confirme que le temps de divergence sont de l'ordre ou légèrement moindre que le temps depuis la colonisation post-glaciaire, soit il y a 8-10 000 ans, suite au retrait du glacier. De même, la distance D_{CE} est du même ordre de grandeur que celle observée entre les populations de trois différentes espèces de poissons du Québec, séparées après la colonisation post-glaciaire (Gagnon et Angers 2006). Ces résultats sont d'une grande importance dans l'optique d'une comparaison entre ces populations : les différences observées actuellement proviennent donc de facteurs survenus après leur formation.

4.2- Taille des populations

Toutes les informations obtenues à partir de la diversité génétique (H_E , H_O , $N_E\mu$) des populations étudiées indiquent que la population CA possède une taille efficace largement plus grande que celle de CB, et ce pour les marqueurs situés autant sur le génome mitochondrial que nucléaire.

Il faut noter que la taille efficace estimée à partir du paramètre $N_E\mu$ dépendra intimement du taux de mutation des marqueurs utilisés et que les moyennes utilisées peuvent être différentes des valeurs absolues. De plus la taille efficace est un estimé intégrateur de plusieurs générations comparativement à un estimé ponctuel des méthodes écologiques. Puisque les estimés ont été déterminés à partir des mêmes locus, ceux-ci sont complètement comparables entre les populations. Aussi, il est préférable de comparer les valeurs de N_E entre les populations plutôt que comme un paramètre absolu. Lorsque l'on compare la taille efficace et la taille de la population telle qu'estimée à l'aide de la méthode de capture-marquage-recapture, on constate une différence importante entre ces estimés. Ainsi, la taille de la population de CB est estimé à environ $145,6 \pm 28,2$ individus de taille supérieure à 8 cm (Desroches et Picard 2006) alors que la taille efficace varie entre 515 et 820 individus.

La différence entre la taille efficace de CB et de CA peut être le résultat de nombreux facteurs démographiques. Ces résultats ne permettent toutefois pas

de conclure que la mortalité routière soit le facteur responsable de ce fait. Des facteurs naturels associés par exemple à la capacité de soutien de l'habitat pourraient permettre une taille plus grande pour CA que pour CB.

Néanmoins, la différence marquée des estimés selon le marqueur mitochondrial (représentant la taille efficace des femelles exclusivement; CA/CB : 2,81) ou les marqueurs nucléaires (taille efficace de l'ensemble de la population; CA/CB : 1,83) est notable. Cette différence peut s'expliquer par deux hypothèses non mutuellement exclusives.

Premièrement, un rapport des sexes en défaveur des femelles pourrait altérer la taille efficace de celles-ci. Une mortalité importante des femelles sur les routes pourraient conduire à un tel résultat. Cependant, les résultats de Desroches et Picard (2006) indiquent des rapports de sexe sensiblement équivalents dans la population CB, soit 1 mâle pour 0,9 femelle. Le fait qu'une femelle puisse utiliser les gamètes provenant de plusieurs mâles (Pearse et Avise 2001, Pearse *et al.* 2001) ne devrait pas affecter la comparaison puisque l'on assume que ce comportement soit le même dans les deux populations.

Une seconde éventualité pourrait provenir d'une variance importante au niveau du succès reproducteur des femelles de la population de CB. Les analyses de parenté indiquent qu'un faible nombre de femelles aurait laissé une progéniture dans l'échantillon provenant de la population CB. Les femelles démontrent ainsi une forte variance du succès de reproduction. Ceci a comme conséquence de réduire la taille efficace estimée à partir des marqueurs nucléaires de CB par rapport à CA, mais cette réduction se fera sentir davantage au niveau de la taille efficace estimée à partir des marqueurs mitochondriaux.

4.3- Immigration

La population CB démontre un sérieux écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Ceci se traduit par une inadéquation entre la proportion prédite d'individus hétérozygotes dans une population panmictique et la proportion observée d'individus hétérozygotes dans la population et implique donc que différents éléments perturbateurs agissent au niveau de la population CB.

Parmi les facteurs les plus vraisemblables pouvant occasionner ce déséquilibre, on peut mentionner l'immigration d'individus provenant d'autres populations. Certains résultats permettent d'appuyer cette hypothèse, notamment la haute proportion d'individus homozygotes pour l'allèle 210 au locus CP10. À cause de la composition génétique de la population CB, il est peu vraisemblable que ces individus aient été formés dans cette population. De plus, en regardant les haplotypes mitochondriaux de ces individus, on constate qu'ils proviennent tous de mères différentes. On présume donc qu'ils proviendrait d'une population à proximité du site et dans laquelle l'allèle 210 au locus CP10 serait abondant.

Le fait que la population CB représente un puit de migrants peut s'expliquer en tout ou en partie par deux hypothèses. La première hypothèse est que l'immigration provient du transfert d'individus par une intervention humaine. Bien que l'on ne puisse rejeter formellement cette hypothèse, elle apparaît peu vraisemblable compte tenu de la grande similarité génétique des individus conduisant à ce déséquilibre.

La seconde hypothèse est que cette population ne peut pas subvenir à ses besoins démographiques, soit à cause d'une mortalité importante des adultes, soit à cause d'un recrutement trop faible au niveau des progénitures. Il serait encore une fois tentant de faire un lien direct avec la mortalité des femelles gravides sur les routes, ce qui répondrait du coup aux deux sources de ce problème. Cependant, le nombre de mortalité observées à CB semble relativement faible. Une seule tortue peinte victime de la route a été observée au cours des étés 2003-2004 (Desroches et Picard 2006). Sans remettre en question les résultats de cette étude, on peut toutefois se demander si les observations effectuées sur ces deux années sont représentatifs de la situation. Cependant, puisque l'on ne peut détecter de décroissance démographique significative au niveau de cette population, ceci est en accord avec les faibles mortalités d'adultes observées.

Si la mortalité des adultes n'est pas le facteur responsable, un recrutement trop faible au niveau des progénitures pourrait être en cause. un plus faible succès d'éclosion des nids en bordure des routes pourrait limiter le recrutement. En ce sens, les résultats de Desroche et Picard (2006) indiquent que des facteurs autres que la déprédation (nids écrasés, nids non éclos à cause d'un développement trop lent) agissent de façon importante surtout en bordure des routes. La situation observée à CB pourrait donc être le résultat indirect de la présence des routes.

4.4- Le trafic routier

Il est intéressant de constater que l'hypothèse du point précédent rejoint celle évoquée au point 4.3 concernant la variance du succès reproducteur des femelles. Si les femelles nichant en bordure des routes ont une plus faible probabilité de laisser une descendance, et si le nombre de ces femelles est important pour les sites à proximité des routes, on assistera alors à des faibles taux de recrutement, de même qu'à une variance plus grande du succès reproducteur des femelles.

Un plus faible recrutement de juvéniles depuis quelques années pourrait cependant ne pas être détecté par les tests de déséquilibre démographique. D'abord parce qu'il semble y avoir une réponse compensatoire via l'immigration, mais surtout parce ce phénomène ne touche que les progénitures et que la diversité génétique globale demeure relativement inchangée à cause de la longévité de cette espèce.

5- CONCLUSION

Cette étude n'a permis de répondre que partiellement à notre objectif. D'abord à cause du nombre restreint de populations échantillonnées, ce qui ne permet pas de vérifier si la tendance observée est généralisée à une bonne partie des populations vivant à proximité des routes. En second lieu, le nombre de tortues victimes de la route semble également très faible au niveau de la population perturbée sélectionnée suggérant que le trafic routier ait une influence mineure sur la dynamique des adultes de cette populations de tortues.

Cependant, le nombre important de tests et d'estimés touchant particulièrement la population perturbée CB ne peut être juste le fruit du hasard. Ceci indique que cette population est réellement perturbée en comparaison au site de référence CA. Un impact des routes sur le recrutement des juvéniles pourrait expliquer les résultats observés dans la population CB. Cette hypothèse constitue une voie d'exploration pertinente. Ceci suggère que la mortalité des adultes par le trafic routier pourrait n'être que la pointe de l'iceberg des perturbations démographiques agissant sur les populations de tortues, et que les effets au niveau du recrutement pourrait avoir des conséquences tout aussi, sinon plus dramatiques sur l'intégrité génétique de ces populations

6- RÉFÉRENCES

- ANGERS B, BERNATCHEZ L. 1998. Combined use of SMM and non-SMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 143-159.
- ANGERS B. 2005. Caractérisation de marqueurs microsatellites spécifiques à *Chrysemys picta*. Rapport d'étape présenté au Ministère des transports du Québec. 6 pages
- BALCOMBE JP, LICHT LE. 1987. Some aspects of the ecology of the midland painted turtle, *Chrysemys picta marginata*, in Wye Marsh, Ontario, The Canadian Field Naturalist 101 : 98-100.
- BEERLI P, FELSENSTEIN J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 4563-4568.
- BEERLI P, FELSENSTEIN J. 1999. Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152:763-773.
- BELKHIR K, CASTRIC V, BONHOMME F. 2002. IDENTIX , a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes*. 2: 611-614.
- CAVALLI-SFORZA LL, EDWARDS AWF. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* 32, 550-570.
- CONGDON, J. D., DUNHAM, A. E., 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 JM, LUIKART G, 1996 Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- DESROCHES, J-F, PICARD I. 2005. Mortalité des tortues sur les routes de l'Outaouais. *Naturaliste Canadien*. 129 : 35-41
- DESROCHES, J-F, ET I. 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.
- ESTOUP, A. 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
- FORMAN, R. T. T., SPERLING, D., BISSONETTE, J. A., CLEVINGER, 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., WINTER, T. C. 2003. *Road Ecology: Science and Solutions*. Island Press. Washington, Covelo, London. U.S.A. 481 p.
- GAGNON M-C, ANGERS B. 2006. The determinant role of temporary proglacial drainages on the genetic structure of fishes. *Molecular Ecology* 15 : 1051-1065.

- GARCIA DE LEON FJ, CHIKHI L, BONHOMME F. 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology* 6, 51-62.
- GIBBS JP, SHRIVER WG. 2002 Estimating the Effects of Road Mortality on Turtle Populations. *Conservation Biology* 16: 1647-1653
- GUO SW, THOMPSON EA. 1992 Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361-372.
- HAXTON, T. 2000. Road mortality of snapping turtles, *Chelydra serpentina*, in Central Ontario during their nesting period. *Canadian Field-Naturalist* 114, 106-110.
- LANGELLA O. 1999. Populations, version 1.2.28 (12/5/2002). CNRS UPR9034.
- NEI M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- PEARSE DE, AVISE JC. 2001. Turtle Mating Systems: Behavior, Sperm Storage, and Genetic Paternity. *Journal of Heredity* 92:206-211
- PEARSE DE, JANZEN FJ, AVISE JC. 2001. Genetic markers substantiate long-term storage and utilization of sperm by female painted turtles. *Heredity* 86: 378-384
- RAYMOND M, ROUSSET F. 1995. GENEPOP: Population genetics software for exact test and ecumenism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- SANBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SEIGEL, R. A., DODD, C. K., Jr. 2000. Manipulation of turtle populations for conservation. In: Klemens, M. W. (editor). *Turtle Conservation*, chapter 9, 218-238. Smithsonian Institution Press, Washington and London, USA.
- WEIR BS, COCKERHAM CC. 1984. Estimating *F*-statistic for the analysis of population structure. *Evolution* 38 : 1358-1370.
- YUE GH, YANG L, LIAN CHUAN L, LASZLO O. 2004. Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. *Aquaculture*, 237 : 89-102

ANNEXE I

Caractérisation génétique des individus des populations CB et CA pour les quatre locus microsatellites nucléaires diploïdes (CP2, CP3, CP10 et CP16) ainsi que pour le microsatellite mitochondrial haploïde (MT). Le chiffre entre parenthèse représente l'identité d'une mère ayant laissé plus d'un individu dans une population.

	CP2	CP3	CP10	CP16	MT	
CB1	204-214	146-146	208-236	092-096	157	(1)
CB2	204-206	146-146	ND	092-104	157	(1)
CB3	184-216	146-152	210-210	104-104	165	
CB4	204-206	146-196	220-240	104-108	137	(2)
CB5	204-204	146-146	208-208	092-096	191	(3)
CB6	204-214	146-192	236-236	092-104	157	(1)
CB7	184-204	146-192	184-232	096-106	191	(3)
CB8	206-214	146-146	ND	094-108	171	
CB9	184-184	146-146	210-210	088-094	211	
CB10	184-204	146-152	210-210	096-104	159	
CB11	208-210	146-192	210-210	088-112	190	
CB12	204-204	146-192	220-260	096-096	191	(3)
CB13	204-206	146-146	188-220	088-096	191	(3)
CB14	200-220	146-192	208-224	088-102	189	
CB15	208-210	146-148	184-240	088-096	165	
CB16	214-214	184-192	204-210	092-102	157	(1)
CB17	204-206	146-192	220-240	102-108	137	(2)
CB18	204-208	146-184	216-244	092-110	201	
CA1	208-214	146-146	208-210	114-114	164	
CA2	204-210	146-146	208-208	088-096	179	(2)
CA3	210-224	146-192	188-210	088-104	233	
CA4	204-210	146-146	208-236	088-096	181	
CA5	204-210	146-146	208-240	084-092	179	(2)
CA6	204-210	146-184	210-210	092-104	157	
CA7	184-184	146-146	182-236	092-104	157	
CA8	180-200	146-196	184-210	080-102	194	
CA9	214-214	146-148	184-210	080-084	167	
CA10	210-214	146-192	184-240	092-092	154	
CA11	206-210	148-196	210-220	078-084	168	
CA12	180-210	148-164	204-236	088-102	162	(1)
CA13	180-182	148-164	204-236	080-088	162	(1)
CA14	180-206	146-148	208-208	084-100	157	
CA15	204-214	146-192	208-224	082-096	204	
CA16	208-214	146-192	208-210	084-100	168	
CA17	214-214	146-192	236-240	084-106	192	