

Dossier technique

Étude génétique de l'Agrion de Mercure à l'échelle de l'agglomération Strasbourgeoise et de son autoroute de contournement

Rédaction et coordination : Jean-François Arnaud, Anne Duputié, Vincent Vignon



I. **Projet scientifique (projet de thèse) : Étude génétique de l'Agrion de Mercure à l'échelle de l'agglomération Strasbourgeoise et de son autoroute de contournement**

1) **Contexte**

La diversité du monde vivant peut être exprimée à différentes échelles. Cette diversité peut être observée et étudiée au niveau écosystémique, spécifique, individuel ainsi qu'au niveau moléculaire. L'organisation géographique de la diversité génétique des populations est gouvernée par l'action de quatre forces évolutives majeures, la mutation, la sélection, la migration et la dérive génétique. L'étude des modèles spatiaux de la variabilité génétique peut conduire à la compréhension des phénomènes déterminant la répartition de la diversité intra et inter-populations, répartition généralement associée à des différences d'ordre adaptatif ou à des irrégularités purement fortuites qui n'ont pas été gommées par des facteurs uniformisant comme la dispersion des individus (Slatkin 1987 ; Marko & Hart 2011 ; Ellegren & Galtier 2016). De telles hétérogénéités spatiales peuvent également se produire lorsque les populations sont soumises à des processus d'extinctions/recolonisations dont les goulets d'étranglements résultants peuvent accentuer la différenciation génétique entre populations (Whitlock & McCauley 1990).

Par ailleurs, l'intensité des flux migratoires au sein d'une espèce est à mettre en relation directe avec diverses caractéristiques biologiques telles que le système de reproduction ou la capacité de dispersion des individus ou des gamètes. Ces quelques remarques suffisent à montrer que la structure spatiale d'un polymorphisme génétique est un phénomène complexe dont la mise en place dépend aussi bien de pressions sélectives, de facteurs historiques et géographiques, que des traits d'histoire de vie de l'espèce considérée.

Dans le contexte des changements environnementaux actuellement observés, l'étude de l'évolution de la structure génétique neutre et adaptative d'espèces soumises à de fortes pressions anthropiques (agriculture intensive, urbanisation, fragmentation par des infrastructures) est en plein essor. Les raisons sont :

- à la fois appliquées, en biologie de la conservation ;
- mais aussi fondamentales car les zones soumises à ces pressions sont le théâtre d'évolution adaptative très rapide (Munshi-South et al. 2016 ; Johnson & Munshi-South 2017 ; Santangelo et al. 2018 ; Halfwerk et al. 2019).

L'objet de ce travail de thèse est ainsi d'étudier à fine et large échelle spatiale la structure génétique et génomique de populations d'Agrion de Mercure (*Coenagrion mercuriale*), espèce protégée par la Directive Habitat et essentiellement tributaire de la topographie des cours d'eau (Lorenzo-Carballa et al. 2015). Cette description de la structuration génétique spatiale permettra d'inférer l'intensité des flux de gènes s'opérant entre populations d'Agrion de Mercure. Cette étude se place dans le contexte directement appliqué de l'étude des effets des modifications des cours d'eau et des créations d'habitats dans le cadre du projet autoroutier de contournement de Strasbourg. L'Agrion de Mercure est en effet présent au niveau de plusieurs cours d'eau traversés par l'autoroute, dont certains sont réaménagés lors de sa construction.

2) **Approches et questionnements scientifiques**

Les flux géniques sont la conséquence du mouvement des gamètes et des individus dans l'espace, autrement dit, de la dispersion de ces derniers (Broquet & Petit 2009). Au regard de la répartition géographique de la diversité du monde vivant qui, observation frappante, n'est jamais organisée de manière aléatoire dans l'espace, la dispersion des individus ou des gamètes apparaît comme un processus structurant majeur. Ces mouvements de gamètes ou d'individus vont potentiellement conduire à un flux de gènes, c'est-à-dire à l'échange, la diffusion, voire l'invasion de génomes, autrement dit de gènes ou d'allèles à l'intérieur et entre ces populations (Slatkin 1987 ; Marko & Hart 2011). Dépeindre et quantifier des flux géniques au travers des événements de dispersion peut être réalisé au moyen de méthodes dites "directes", via une observation par capture-marquage-recapture ou radiolocalisation des individus (Cayuela et al. 2018). Un moyen plus indirect de retracer les épisodes passés de ces processus revient aussi à étudier la distribution géographique du polymorphisme génétique neutre à l'intérieur et entre les populations, et d'en inférer ensuite le lien entre la structure génétique observée et la dispersion comme un des déterminants évolutifs possibles parmi bien d'autres (Broquet & Petit 2009 ; Cayuela et al. 2018).

Ces méthodes indirectes, toutes fondées sur la signature génétique des allèles introduits par migration, reposent sur des bases théoriques qui remontent à près d'un siècle lorsque Wright (1931, 1943) introduisit pour la première fois une relation entre paramètres de la dispersion, taux de migration et différenciation génétique des populations. Le canevas empirique et théorique utilisé dans ces travaux de recherche sera donc celui de la génétique des populations dont l'enjeu est de comprendre comment les forces micro-évolutives structurent la diversité génétique, condition préalable à l'évolution des êtres vivants (Ellegren & Galtier 2016).

Dans un environnement homogène, les patrons de flux géniques peuvent être décrits assez simplement suivant un modèle classique dit d'isolement par la distance, où la proximité génétique des populations est inversement proportionnelle à la distance géographique les séparant (Wright 1943 ; Malécot 1973).

Toutefois, la fragmentation de l'habitat peut réduire ou créer des barrières à la dispersion, la conséquence classique de ces ruptures de flux géniques étant une diminution de la diversité génétique et/ou une augmentation de la consanguinité en populations naturelles. Ces dernières considérations conduisent à une vision de la structuration géographique de la diversité génétique qui ne fait plus appel à une dispersion de type symétrique et/ou isotrope mais qui revient plutôt à considérer l'effet de la connectivité de l'habitat sur les distances de dispersion, i.e. la capacité d'un habitat à faciliter ou au contraire à réduire les voies de dispersion (Arter 1990 ; Storfer et al. 2007 ; Favre-Bac et al. 2016).

Enfin, les processus d'extinction/recolonisation entraînent généralement des écarts à un équilibre dérive/flux géniques pouvant entraîner l'apparition d'une mosaïque de populations génétiquement très divergentes, ceci même à très fine échelle spatiale (Whitlock & McCauley 1990 ; Faucher et al. 2017).

C'est dans ce contexte qu'il apparaît primordial d'étudier l'effet de la recolonisation du milieu, et des effets fondateurs associés, sur la structure génétique d'une espèce protégée, l'Agrion de Mercure. Ceci permettra d'évaluer notamment les effets des modifications des cours d'eau et l'efficacité de la recréation d'habitats favorables à l'espèce dans le cadre du projet autoroutier de contournement de Strasbourg.

3) Présentation du projet de thèse

L'échantillonnage impliquera des populations localisées au sein de l'agglomération Strasbourgeoise mais également des populations présentes dans des environnements semi-naturels moins impactés par l'homme et situés dans le Nord-Ouest de la France. Cet échantillonnage sera, pour la majeure partie des individus, non destructif et impliquera le prélèvement d'une patte. Les autorisations de collecte seront demandées auprès de la DREAL en 2021. Cet échantillonnage impliquera trois zones : le contournement autoroutier de Strasbourg, l'agglomération Strasbourgeoise et une région moins urbanisée et semi-naturelle localisée en région Hauts-de-France. Cette dernière zone servira d'élément de comparaison entre habitats, et les échantillons sont déjà disponibles.

Sur le tracé de l'autoroute, la présence, la densité et la diversité génétique des populations d'Agrion de Mercure pourront être comparées (Figure 1).



Figure 1. Deux cours d'eau traversés par le contournement autoroutier de Strasbourg, où l'Agrion de Mercure était présent avant les travaux. Le Muhlbach (à droite) fera l'objet d'une dérivation (tracé bleuté), contrairement à la Bruche et au canal de la Bruche (à gauche). Le tracé autoroutier apparaît en noir sur les deux photos. Barre jaune : 100 m.

L'ADN des individus échantillonnés pendant la saison de reproduction sera extrait afin de définir leurs génotypes multilocus au moyen de marqueurs de type microsatellites et SNPs. L'utilisation des marqueurs SNPs permettra une meilleure couverture du génome et des estimations plus fines des tailles efficaces et des niveaux de consanguinité en populations naturelles. Les analyses de données impliqueront ensuite une estimation de flux géniques historiques cumulés au cours du temps, flux classiquement appréhendés au moyen des F-statistiques ou par des approches par maximum de vraisemblance, ceci afin d'estimer le niveau de connectivité entre populations. L'impact de la fragmentation du paysage, due à l'agriculture intensive, à l'abaissement des niveaux des nappes, à la gestion des réseaux hydrographiques, au développement de l'urbanisme, aux infrastructures de transport dont les travaux autoroutiers du contournement de Strasbourg, dans l'élaboration de discontinuités génétiques, sera évalué au travers d'une approche couplée d'écologie du paysage et de génétique et génomique des populations (p.e. Combs et al. 2018 ; Miles et al. 2018).

Cette approche implique classiquement les notions de distances écologiques et de conductance entre populations qui sont définies à partir de la cartographie fine de la matrice paysagère (Michels et al. 2001 ; McRae 2006 ; McRae & Beier 2007). L'utilisation d'outils d'informations géographiques ainsi que de données de cartographie d'utilisation des sols et de la structure hydromorphologique des cours d'eau permettra de définir les éléments constitutifs du paysage impacté par les différentes pressions auxquels il est soumis, dont les travaux autoroutiers. Ces éléments constitutifs modulent en effet les flux de gènes au travers d'effets barrières ou facilitateurs.

Une étude temporelle de la structure génétique de populations anciennement établies et nouvellement fondées permettra de définir les processus de recolonisation et d'avoir des éléments de connaissances sur l'efficacité des mesures effectuées de restauration des cours d'eau. Cette dernière approche permettra également d'avoir une estimation des tailles efficace (N_e) de populations, paramètre clé afin d'évaluer la viabilité à moyen terme des populations échantillonnées (Frankham et al. 2014).

4) Objectifs

Les différents volets de recherche abordés dans le cadre de ce projet de thèse seront les suivants :

- Une analyse fine de la structure génétique spatiale des populations le long de l'axe autoroutier sera effectuée. Il s'agira ici de définir s'il existe des unités génétiques distinctes dues à l'effet barrière de certains éléments du paysage ou, au contraire, de visualiser l'existence d'un simple patron d'isolement par la distance avec diffusion passive des individus. L'évolution de l'appareil génétique entre individus pourra même être étudiée à l'échelle d'un cours d'eau et de ses tributaires, si l'échantillonnage le permet. L'effet à fine échelle du réseau hydrographique et de la restauration des cours d'eau pourra être discuté à la lumière des patrons de structure génétique ainsi révélés.
- Une analyse de la structure génétique régionale de cette espèce sur l'ensemble de l'agglomération Strasbourgeoise sera menée afin d'avoir une vision plus large de l'effet d'un habitat urbanisé sur la présence de l'espèce et les flux de gènes entre populations. Toutefois, afin de généraliser ces résultats au-delà d'une image instantanée de la structure génétique spatiale régionale de l'agglomération Strasbourgeoise et de mieux connaître la biologie de l'espèce, il est nécessaire d'avoir un comparatif avec d'autres régions moins soumises à un impact anthropique (p.e. Combs et al. 2018). Dans cette optique, la structure génétique et les patrons de flux de gènes mis en évidence le long de l'axe autoroutier et sur l'ensemble de l'agglomération Strasbourgeoise pourront être mis en comparaison avec des populations d'Agrion de Mercure déjà échantillonnées et présentant un gradient d'urbanisation au sein de territoires moins anthropisés et localisés dans la Région Hauts-de-France.

Nous pourrions ainsi analyser les effets cumulés des impacts exercés par l'agriculture, l'urbanisation, les infrastructures existantes et en cours de réalisation autour de Strasbourg. Cette approche se réalisera par la prise en compte simultanée des différentes caractéristiques du paysage en réalisant des cartes de frictions multivariées intégrant l'effet de plusieurs variables du paysage, notamment les pressions anthropiques précitées. Une description in situ (surface occupée par des espèces halophytes, végétations des berges, largeur et nature des cours d'eau) des sites Strasbourgeois prospectés sera également effectuée lors de l'échantillonnage des individus sur le terrain à des fins de génotypage. Cet aspect sera réalisé à partir des prélèvements qui seront réalisés en 2021 et en 2022.

- Une étude des processus de recolonisation une fois les restaurations de cours d'eau effectuées sera également réalisée. Ce volet de recherche permettra de définir le type de métapopulation auquel on a affaire et de voir si des systèmes de type source-puits sont à l'œuvre ou au contraire si les colonisateurs proviennent de sources différentes « tous azimuts ». Comme pour le point précédent, cet aspect sera réalisé à partir des prélèvements qui seront réalisés en 2021 et en 2022.
- Un dernier volet éventuel d'étude, qui dépend du système de reproduction de l'Agrion de Mercure, impliquerait une analyse moléculaire des pontes. Sous l'hypothèse que les femelles de cette espèce peuvent s'accoupler avec plusieurs mâles, il serait intéressant de comparer la diversité génétique (révélatrice du nombre de pères) de la progéniture contenue dans des pontes échantillonnées dans des sites anciennement implantés et nouvellement colonisés. Pour peu que l'échantillonnage soit conséquent, une analyse de paternité apporterait également des informations supplémentaires sur la dispersion des individus mâles.
- Enfin, en ce qui concerne les aspects de bilan des opérations de recréation de milieu pour cette espèce et les aspects de restauration de milieux et de gestion à long terme de la viabilité des populations :
 - Ces travaux de thèse permettront de définir une méthode d'évaluation standardisée de la pertinence des restaurations de cours d'eau pour l'Agrion de Mercure ;
 - La pertinence des restaurations effectuées sera évaluée ;
 - Les facteurs d'amélioration de la qualité de l'habitat seront identifiés ;
 - Définir les noyaux de populations à préserver en priorité au regard de la diversité génétique présente ;
 - Définir les populations sources à utiliser en cas de renforcement.

5) Acteurs

Doctorante :

- Agathe Lévêque (Université de Lille / Bureau d'étude O.G.E.).

Encadrants universitaires :

- Jean-François Arnaud (Professeur, Université de Lille) ;
- Anne Duputié (Maître de conférences, Université de Lille).

Le doctorant bénéficiera aussi du soutien logistique de Cécile Godé (Assistant Ingénieur CNRS) pour les aspects de génotypage par séquençage.

Encadrants professionnels :

- Vincent Vignon (Directeur associé, Bureau O.G.E.) ;
- Cédric Vanappelghem (Responsable scientifique, C.E.N. Hauts de France).

6) Structures d'accueil

- Bureau d'études OGE :

Ce bureau d'études s'impliquera dans la formation du doctorant à l'analyse et la cartographie des éléments du paysage au moyen de systèmes d'informations géographiques. Ainsi, ce bureau d'étude participera à l'encadrement pour l'utilisation du logiciel ARCMAP et préparera les missions de terrain ainsi que l'échantillonnage des individus d'Agrion de Mercure. L'utilisation d'ARCMAP est destinée à la cartographie fine des éléments paysagers de l'agglomération Strasbourgeoise.

- Université de Lille, UMR CNRS 8198 Evo-Eco-Paléo :

Ce laboratoire s'impliquera dans la formation du doctorant aux techniques d'extraction d'ADN, de génotypage moléculaire, de création de banques d'ADN, ainsi qu'à l'utilisation des nouvelles techniques de séquençage à haut débit (NGS). Le laboratoire s'impliquera également dans l'encadrement des analyses de données impliquant des analyses de structure génétique et génomique des populations, dans les analyses spatiales de polymorphisme génétique, ainsi que des analyses de type GLM afin d'inférer le rôle des éléments paysagers dans la structuration génétique des populations.

II. Objet de la dérogation

Pour réaliser l'étude génétique des populations d'Agriion de Mercure, nous présentons ici les modalités de prélèvement envisagées sur les imagos de l'Agriion de Mercure, c'est-à-dire : le nombre d'individus souhaité, le calendrier de l'opération, le territoire d'étude. Nous précisons aussi la portée géographique (régionale, nationale et européenne) de cette étude pour la connaissance de cette espèce. Nous joignons également un article scientifique (annexe 1) qui avait évalué l'impact de ce mode opératoire sur cette espèce.

1) Méthodes

La capture de l'individu sera réalisée au filet entomologique et sa manipulation sera la plus délicate (doigts secs) possible et en un temps le plus court possible avec relâcher sur site.

Il sera réalisé dans la majeure partie des cas un prélèvement d'une patte par individu au moyen d'une pince entomologique dure et fine, sinon il ne sera pas possible de prélever la patte ou l'animal sera inutilement abîmé.

La patte médiane droite sera prélevée ; en cas d'absence, il s'agira de la patte médiane gauche. Si plus de deux pattes manquent déjà sur l'individu, il sera relâché aussitôt.

En termes de tailles d'échantillonnage, une patte sera prélevée à 30 individus par station. Ce chiffre constitue une situation idéale pour l'analyse de la structure génétique et génotypique des populations.

Mâles et femelles seront stockés et conservés séparément.

Il sera possible de capturer les individus sur plusieurs jours.

Sur la base de cet échantillonnage non-invasif, un génotypage de 3000 individus au total (dont 500 ont déjà été échantillonnés dans la région Haut-de-France) est prévu au moyen de l'utilisation de 12 locus microsatellites isolés et décrits par Lorenzo-Carballe et al. (2015). Le doctorant bénéficiera du séquenceur automatique ABI 3130 (Applied Biosystem) de la plateforme d'écologie moléculaire de l'UMR CNRS 8198.

Une deuxième approche nécessitera le prélèvement d'individus en entier. Cette approche concerne du génotypage massif par séquençage de marqueurs de type SNP (polymorphisme de simple base), méthode nécessitant une quantité suffisante d'ADN génomique. En faisant l'hypothèse d'une taille de génome d'environ 2 Gb pour l'Agriion de Mercure, la méthode de DDRADseq (p.e. DeSaix et al. 2019) ou la méthode RAD-seq multi-espèces proposée par Delord et al. (2018) seront utilisées afin d'étudier la structure génomique des populations au moyen de la définition d'un jeu de 3000 à 15000 SNPs par cette technologie de génotypage-par-séquençage (GBS). Ce travail impliquera en partie de la sous-traitance pour l'utilisation d'une plateforme de séquençage haut-débit de type HiSeq3000 (Illumina, 1 x 150pb fragments) en utilisant la technologie RAD-seq.

Après préparation de la librairie d'ADN génomique et l'analyse bio-informatique de définition des SNPs (SNP calling), le génotypage par séquençage impliquant Index et Multiplex (Barcode adaptateur) sera effectué sur un sous-échantillonnage de 700 individus. Le Doctorant bénéficiera de la plateforme de bio-informatique du laboratoire.

La mise au point du protocole de génotypage massif par séquençage de marqueurs de type SNP nécessitera donc le prélèvement de 700 individus entiers. Idéalement, cet échantillonnage sera réalisé au sein de 40 stations réparties dans la zone d'étude avec le prélèvement d'une vingtaine d'individus par stations.

2) Liste des personnes pour lesquelles la demande d'autorisation est faite

Agathe LEVEQUE : étudiante en thèse de Doctorat, Bureau d'étude O.G.E./ Université de Lille, UMR CNRS 8198 Evo-Eco-Paléo

Fabien DUEZ, étudiant en 3ème année de licence de biologie, parcours biologie des organismes et des populations, Université de Lille.

Roxane VIAL, étudiante en 3ème année de licence de biologie, parcours biologie des organismes et des populations, Université de Lille.

Cédric VANAPPELGHEM : Master en biologie de la conservation, responsable scientifique au Conservatoire d'espaces naturels du Nord et du Pas-de-Calais.

Claude LAURY, directrice d'agence, bureau d'étude O.G.E.

Anne DUPUTIE, Maître de Conférences, Université de Lille, UMR CNRS 8198 Evo-Eco-Paléo.

Jean-François ARNAUD, Professeur, Université de Lille, UMR CNRS 8198 Evo-Eco-Paléo.

Vincent VIGNON, directeur associé, bureau d'étude O.G.E.

Ponctuellement, d'autres salariés ou bénévoles des deux structures (Bureau d'études O.G.E. – UMR CNRS 8198 Evo-Eco-Paléo de l'Université de Lille) peuvent être mobilisés en fonction des aléas météorologiques, individuels ou des structures.

3) Évaluation de l'impact de la méthode

Une analyse par capture marquage recapture des individus prélevés et d'individus non prélevés ne permettent pas de montrer de différence dans la longévité des deux catégories d'individus, *cf.* en annexe 1 une analyse de données faites pour la DIREN Haute Normandie en 2005.

On notera qu'il est assez fréquent de trouver dans la nature des individus auxquels il manque des pattes, abandonnées pour échapper vraisemblablement à un prédateur.

4) Définition d'une station

Compte tenu de la capacité de dispersion des individus, le prélèvement d'une patte sur 30 individus devra se faire sur un tronçon (cours d'eau ou fossé) de 200 mètres maximum.

En cas de longs linéaires favorables à l'espèce sur un même cours d'eau, les stations seront séparées de 500 mètres minimum. Il s'agit en effet d'éviter de multiplier les stations pour découvrir des dynamiques de populations déjà connues, *cf.* Watts et al, 2006), sachant que les événements de dispersion au-delà de 2 km sont très rares (Watts et al, 2004b). En cas de contraintes de moyens, sur de long linéaires favorables, une station tous les 2 km est acceptable, dans l'idéal tous les 500 mètres.

5) Plan d'échantillonnage

Le plan d'échantillonnage a été construit avec Claude Laury, Vincent Vignon, Cédric Vanappelghem, Anne Duputié et Jean-François Arnaud en fonction des connaissances engrangées sur l'espèce. Il consiste en un prélèvement d'individus sur 30 à 40 stations. Des stations situées dans la région des Haut-de-France ont déjà été échantillonnées par le CEN Nord Pas-De-Calais et le CEN Picardie pour avoir un site extérieur de comparaison.

Ces prélèvements se répartissent :

(1) Le long de l'axe autoroutier de contournement ouest de Strasbourg au sein des communes, à savoir : Ernolsheim-Bruche, Osthoffen, Ittenheim, Hurtigheim, Oberschaeffolsheim, Stutzheim-Offenheim, Dingsheim, Griesheim-sur-Souffel, Pfulgriesheim, Truchtersheim, Lampertheim, Vendenheim, Eckbolsheim.

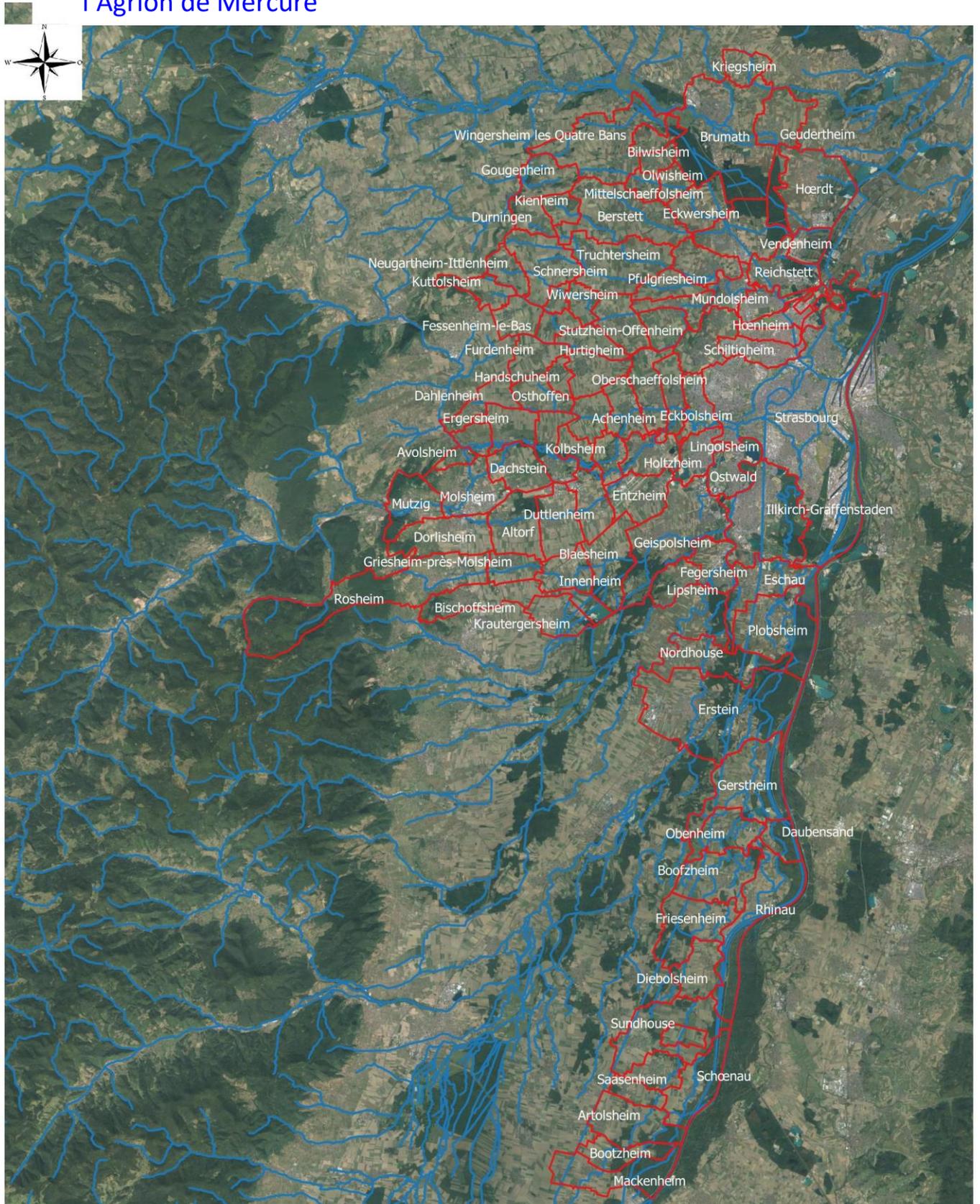
(2) Au niveau des sites compensatoire associé au cours d'eau liés à l'axe autoroutiers si l'échantillonnage le permet, à savoir 3 stations localisées l'une en amont, l'une en aval et une au niveau des travaux de reméandrage.

(3) Un ensemble de stations sera également réparti le long des cours d'eau de la région strasbourgeoise (comprenant l'agglomération strasbourgeoise et ces alentours) au sein des communes : Achenheim, Altorf, Artolsheim, Avolsheim, Berstett, Bilwisheim, Bischheim, Bischoffsheim, Blaesheim, Boofzheim, Bootzheim, Breuschwickersheim, Brumath, Dachstein, Dahlenheim, Daubensand, Diebolsheim, Dingsheim, Donnenheim, Dorlisheim, Dossenheim-Kochersberg, Duppigheim, Durningen, Duttlenheim, Eckbolsheim, Eckwersheim, Entzheim, Ergersheim, Ernolsheim-Bruche, Erstein, Eschau, Fegersheim, Fessenheim-le-Bas, Friesenheim, Furdenheim, Geispolsheim, Gerstheim, Geudertheim, Gougenheim, Griesheim-près-Molsheim, Griesheim-sur-Souffel, Handschuheim, Hangenbieten, Hœnheim, Hœrdt, Holtzheim, Hurtigheim, Illkirch-Graffenstaden, Innenheim, Ittenheim, Kienheim, Kolbsheim, Krautergersheim, Kriegsheim, Kuttolsheim, Lampertheim, Lingolsheim, Lipsheim, Mackenheim, Mittelschaeffolsheim, Molsheim, Mundolsheim, Mutzig, Neugartheim-Ittlenheim, Nordhouse, Obenheim, Oberschaeffolsheim, Olwisheim, Osthoffen, Ostwald, Pfulgriesheim, Plobsheim, Quatzenheim, Reichstett, Rhinau, Richtolsheim, Rosheim, Saasenheim, Schiltigheim, Schnersheim, Schœnau, Souffelweyersheim, Strasbourg, Stutzheim-Offenheim, Sundhouse, Truchtersheim, Vendenheim, Wingersheim les Quatre Bans, Wiwersheim, Wolfisheim, Wolxheim.

4) Quelques stations supplémentaires pourront être échantillonnées au niveau du canal du Rhin afin de caler la structure génétique avec un site extérieur à la région Strasbourgeoise.

La liste prévisionnelle des communes est reprise en annexe 2, cartographiées page suivante.

Localisation des communes potentiellement concernées par la thèse sur l'Agrion de Mercure



— Cours d'eau
 □ Découpage communal

0 5 10 km



Source : Google Satellite, O.G.E 2021

Réalisation : O.G.E. 08/01/2021

Les analyses génétiques seront réalisées par l'Université de Lille, UMR CNRS 8198 Evo-Eco-Paléo sous la direction de Jean-François Arnaud et Anne Duputié.

La restitution se fera par l'intermédiaire dans un premier temps par des rapports d'étapes de la thèse CIFRE commencée par Agathe Lévêque et au final par des publications à caractère scientifique au niveau régional, national et internationales.

6) Calendrier

Les prélèvements se feront durant les saisons de terrain 2021 et 2022.

La mise au point du protocole de développement d'un jeu de SNPs et leur génotypage massif par séquençage ainsi que le génotypage de locus microsatellites seront réalisés au cours de la thèse d'Agathe Lévêque de Décembre 2020 à Juin 2022 au sein du laboratoire Evo-Eco-Paléo de l'Université de Lille.

Les aspects de bilan des opérations de recréation de milieu pour cette espèce et les aspects de restauration de milieux et de gestion à long terme de la viabilité des populations seront diffusés à la fin du contrat de thèse d'Agathe Lévêque fin 2023.

7) Portée

Régionale

Cette étude de l'analyse fine de la structure génétique spatiale des populations le long de l'axe autoroutier permettra de définir des priorités d'intervention en termes d'actions à l'échelle du réseau supposé des populations. À partir de la structuration génétique des populations mise en évidence, il s'agira ici de définir s'il existe des unités génétiques distinctes dues à l'effet barrière de certains éléments du paysage ou, au contraire, de visualiser l'existence d'un simple patron d'isolement par la distance et de prioriser les actions de conservation entre les actions sur les stations ou les liaisons entre ces stations.

Nationale

Ce projet s'inscrit dans le plan national Odonates (Dupont 2010), notamment les fiches action 4 et 5. L'espèce est en limite d'aire continentale dans la région et ces informations sur la structure des populations sont très attendues pour apporter des éléments de priorisation en termes d'action conservatoire, à la fois en agglomération Strasbourgeoise mais également dans des milieux moins anthropisés et semi-naturels localisés dans la région Haut-De-France.

Européenne

Cette étude à fine et large échelle de la structure génétique des populations contribuera à alimenter la connaissance sur la génétique des populations à l'échelle Européenne, notamment au travers des travaux de Philip Watts et Sonia Ferreira (CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (Centre de Recherche en Biodiversité et Ressources Génétiques), Université de Porto et Université des Açores) qui travaillent sur la phylogénie de l'espèce à l'échelle continentale européenne.

8) Bibliographie

Arter, H. E. 1990 Spatial relationship and gene flow paths between populations of the alpine snail *Arianta arbustorum* (Pulmonata: Helicidae). *Evolution* **44**, 966-980.

Broquet, T. & Petit, E. J. 2009 Molecular estimation of dispersal for ecology and population genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics* **40**, 193-216.

Cayuela, H., Rougemont, Q., Prunier, J. G., Moore, J.-S., Clobert, J., Besnard, A. & Bernatchez, L. 2018 Demographic and genetic approaches to study dispersal in wild animal populations: a methodological review. *Molecular Ecology* **27**, 3976-4010.

Chombart C., 2014 – Approfondissement des connaissances sur l'Agrion de mercure (*Coenagrion mercuriale*) dans la moyenne vallée de la Somme en Picardie. Mémoire. Master 2 : Ecologie, Agroécologie et Biodiversité (EAB)-Conservatoire d'espaces naturels de Picardie/Université de Picardie Jules Verne. 85 p.

Combs, M., Puckett, E. E., Richardson, J., Mims, D. & Munshi-South, J. 2018 Spatial population genomics of the brown rat (*Rattus norvegicus*) in New York City. *Molecular Ecology* **27**, 83-98.

Delord, C., Lassalle, G., Oger, A., Barloy, D., Coutellec, M.-A., Delcamp, A., Evanno, G., Genthon, G., Guichoux, E., Le Bail, P.-Y., Le Quilliec, P., Longin, G., Lorvelec, O., Massot, M., Reveillac, E., Rinaldo, R., Roussel, J.-M., Vigouroux, R., Launey, S. & Petit, E. J. 2018 A cost-and-time effective procedure to develop SNP markers for multiple species: a support for community genetics. *Methods in Ecology and Evolution* **9**, 1959-1974.

- DeSaix, M. G., Bulluck, L. P., Eckert, A. J., Viverette, C. B., Boves, T. J., Reese, J. A., Tonra, C. M. & Dyer, R. J. 2019 Population assignment reveals low migratory connectivity in a weakly structured songbird. *Molecular Ecology* **28**, 2122-2135.
- Dupont, P. [coord.] 2010 - Plan national d'actions en faveur des Odonates. Office pour les insectes et leur environnement / Société Française d'Odonatologie – Ministère de Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de la Mer, 170 pp.
- Ellegren, H. & Galtier, N. 2016 Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics* **17**, 422-433.
- Favre-Bac, L., Mony, C., Ernoult, A., Burel, F. & Arnaud, J.-F. 2016 Ditch network sustains functional connectivity and influences patterns of gene flow in an intensive agricultural landscape. *Heredity* **116**, 200-212.
- Faucher, L., Hénocq, L., Vanappelghem, C., Rondel, S., Quevillart, R., Gallina, S., Godé, C., Jaquiéry, J. & Arnaud, J.-F. 2017 When new human-modified habitats favor the expansion of an amphibian pioneer species: evolutionary history of the natterjack toad (*Bufo calamita*) in a coal basin. *Molecular Ecology* **26**, 4434-4451.
- Frankham, R., Bradshaw, C. J. A. & Brook, B. W. 2014 Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* **170**, 56-63.
- Halfwerk, W., Blaas, M., Kramer, L., Hijner, N., Trillo, P. A., Bernal, X. E., Page, R. A., Goutte, S., Ryan, M. J. & Ellers, J. 2019 Adaptive changes in sexual signalling in response to urbanization. *Nature Ecology & Evolution* **3**, 374-380.
- Johnson, M. T. J. & Munshi-South, J. 2017 Evolution of life in urban environments. *Science* **358**, eaam8327.
- Legris, S., Gavory, L. (2009) – Eléments de connaissances préliminaires pour la conservation des populations de l'Agriion de mercure *Coenagrion mercuriale* en Picardie. Picardie Nature. 64p.
- Lorenzo-Carballa, M. O., Ferreira, S., Sims, A. M., Thompson, D. J., Watts, P. C., Cher, Y., Damoy, V., Evrard, A., Gelez, W. & Vanappelghem, C. 2015 Impact of landscape on spatial genetic structure and diversity of *Coenagrion mercuriale* (Zygoptera: Coenagrionidae) in northern France. *Freshwater Science* **34**, 1065-1078.
- Malécot, G. 1973 Isolation by distance. In *Genetic Structure of Populations*. (ed. N. E. Morton), pp. 72-75. Honolulu: University of Hawaii Press.
- Marko, P. B. & Hart, M. W. 2011 The complex analytical landscape of gene flow inference. *Trends in Ecology & Evolution* **26**, 448-456.
- McRae, B. H. 2006 Isolation by resistance. *Evolution* **60**, 1551-1561.
- McRae, B. H. & Beier, P. 2007 Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **104**, 19885-19890.
- Michels, E., Cottenie, K., Neys, L., De Gelas, K., Coppin, P. & De Meester, L. 2001 Geographical and genetic distances among zooplankton populations in a set of interconnected ponds: a plea for using GIS modelling of the effective geographical distance. *Molecular Ecology* **10**, 1929-1938.
- Miles, L. S., Dyer, R. J. & Verrelli, B. C. 2018 Urban hubs of connectivity: contrasting patterns of gene flow within and among cities in the western black widow spider. *Proceedings of the Royal Society of London B* **285**, 20181224.
- Munshi-South, J., Zolnik, C. P. & Harris, S. E. 2016 Population genomics of the Anthropocene: urbanization is negatively associated with genome-wide variation in white-footed mouse populations. *Evolutionary Applications* **9**, 546-564.
- Rouquette, J.R. & Thompson, D.J. 2007 - Patterns of movement and dispersal in an endangered damselfly and the consequences for its management. *Journal of applied ecology*, 44 : 692-701

- Santangelo, J. S., Rivkin, L. R. & Johnson, M. T. J. 2018 The evolution of city life. *Proceedings of the Royal Society of London B* **285**, 20181529.
- Slatkin, M. 1987 Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.
- Storfer, A., Murphy, M. A., Evans, J. S., Goldberg, C. S., Robinson, S., Spear, S. F., Dezzani, R., Delmelle, E., Vierling, L. & Waits, L. P. 2007 Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* **98**, 128-142.
- Vaslin N., Cheyrezy T., 2014 – Plan d'actions Agrion de Mercure - *Coenagrion mercuriale* - sur le Parc Naturel Régional Oise-Pays de France. Conservatoire d'espaces naturels de Picardie. 92 p. version du 12/09/2014
- Watts, P. 2009 - Characteristics of microsatellite loci in Odonata. *International Journal of Odonatology*, 12 (2) : 275-286
- Watts, P.C., Hong-Wu, J., Westgarth, C., Thompson, D.J. & Kemp, S.J. 2004a - A panel of microsatellite loci for the Southern Damselfly, *Coenagrion mercuriale* (Odonata: Coenagrionidae). *Conservation Genetics* **5**, 117-119.
- Watts, P.C., Rouquette, J.R., Saccheri, I.J., Kemp, S.J. & Thompson, D.J. 2004b - Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in the endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale*. *Molecular Ecology* **13**, 2931-2944.
- Watts, P.C., Saccheri, I.J., Kemp, S.J. & Thompson, D.J. 2006 - Population structure and the impact of regional and local habitat isolation upon genetic diversity of the endangered damselfly *Coenagrion mercuriale* (Odonata: Zygoptera). *Freshwater Biology* **51**, 193-205
- Whitlock, M. C. & McCauley, D. E. 1990 Some population genetic consequences of colony formation and extinction: genetic correlations within founding groups. *Evolution* **44**, 1717-1724.
- Wright, S. 1931 Evolution in mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Wright, S. 1943 Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.

**Annexe 1: Effect of leg removal on survival of the damselfly
*Coenagrion mercuriale***

Effect of leg removal on survival of the damselfly *Coenagrion mercuriale*

David J Thompson & Phillip C. Watts

School of Biological Sciences, University of Liverpool, Crown Street, Liverpool, L69 7ZB, UK

Report for DIREN of Haute-Normandie

25 February 2005

Fincke & Hadrys (2001) removed the tibia of the damselfly *Megaloprepus coerulatus* for purposes of DNA extraction, and found no significant difference in lifespan or territory holding capacity between 5 and 6-legged males (n=401 and 236 respectively). Johnson *et al.* (1995) removed the tarsus from larvae of the dragonfly *Epitheca cynosura*. Large numbers of animals from this treatment survived and moulted for five months in field enclosures. Abscission points on the limbs prevent serious fluid loss and rapid healing prevents infection.

In 2001 we began a large-scale mark-release-recapture study in the valley of the River Itchen in southern England. We marked approximately 8000 animals at 7 sites and looked at dispersal, survivorship etc. From each site we also took legs from between 50 and 80 individuals. The legs were taken from newly marked animals and from animals that had previously been marked. The legs were taken on four separate days, the 14th, 15th, 16th and 19th days of the five-week study. The samples were not taken in a systematic way, as we were not planning to test survivorship of five versus six-legged animals. However, at three sites on two days there were reasonable sample sizes of animals that entered the reproductive population on the day that leg removal occurred. Data from these sites and days are presented in Table 1.

Table 1: Effect of leg removal on survivorship of mature adult males of *Coenagrion mercuriale* at three sites in the Itchen Valley, southern England in summer 2001.

	"Day marked"	"Itchen Lower"			"Itchen Middle"			"Mariner's Meadow"		
		"Days survived"	SD	"Sample size"	"Days survived"	SD	"Sample size"	"Days survived"	SD	"Sample size"
"5-legged males"	15	3.29	3.89	28				3.18	3.54	22
	16				2.70	3.49	30	3.60	4.05	15
"6-legged males"	15	3.07	2.80	30				5.73	4.58	11
	16				3.00	5.04	29	3.67	3.00	46
		t	P		t	P		t	P	
t-test	15	0.25	NS					-1.62	NS	
	16				-0.26	NS		-0.06	NS	

There is no statistically significant difference between survivorship of 5 and 6-legged animals at any of the three sites at which a comparison is possible. At the Lower Itchen site, 5-legged males actually survived fractionally longer than those with the full complement of legs. Note that the survivorship of all individuals is slightly less than in other comparable studies of *Coenagrion mercuriale*, but this is almost certainly due to the fact that days 17 and 18 of our study enjoyed very poor weather conditions (heavy rain).

Both males and females continued to engage in reproductive activity following leg removal. The longest mature adult lifespan we found in our study for a 5-legged animal was 19 days (from Highbridge, another of the sites in the Itchen Valley).

In short, we believe that there must be *some* detrimental effect of removing a leg, however carefully it is done. The effect is unlikely to be of major importance in that we were unable to demonstrate a significant change in survivorship.

Bibliography

- Fincke OM, Hadrys H (2001) Unpredictable offspring survivorship in the damselfly, *Megaloprepus coerulatus*, shapes parental behavior, constrains sexual selection, and challenges traditional fitness estimates. *Evolution*, **55**, 762-772.
- Johnson DM, Martin TH, Mahato M, Crowder LB, Crowley PH (1995) Predation, density dependence, and life histories of dragonflies: a field experiment in a freshwater community. *Journal of the North American Benthological Society*, **14**, 547-562.

Annexe 2 : liste prévisionnelle des communes prospectées

Département	Commune	Code postale
67	Achenheim	67001
67	Altorf	67008
67	Artolsheim	67011
67	Avolsheim	67016
67	Berstett	67034
67	Bilwisheim	67039
67	Bischheim	67043
67	Bischoffsheim	67045
67	Blaesheim	67049
67	Boofzheim	67055
67	Bootzheim	67056
67	Breuschwickersheim	67065
67	Brumath	67067
67	Dachstein	67080
67	Dahlenheim	67081
67	Daubensand	67086
67	Diebolsheim	67090
67	Dingsheim	67097
67	Dorlisheim	67101
67	Dossenheim-Kochersberg	67102
67	Duppigheim	67108
67	Durningen	67109
67	Duttlenheim	67112
67	Eckbolsheim	67118
67	Eckwersheim	67119
67	Entzheim	67124
67	Ergersheim	67127
67	Ernolsheim-Bruche	67128
67	Erstein	67130
67	Eschau	67131
67	Fegersheim	67137
67	Fessenheim-le-Bas	67138
67	Friesenheim	67146
67	Furdenheim	67150
67	Geispolsheim	67152
67	Gerstheim	67154
67	Geuderthaim	67156
67	Gougenheim	67163
67	Griesheim-près-Molsheim	67172

67	Griesheim-sur-Souffel	67173
67	Handschuheim	67181
67	Hangenbieten	67182
67	Hœnheim	67204
67	Hœrdt	67205
67	Holtzheim	67212
67	Hurtigheim	67214
67	Illkirch-Graffenstaden	67218
67	Innenheim	67223
67	Ittenheim	67226
67	Kienheim	67236
67	Kolbsheim	67247
67	Krautergersheim	67248
67	Kriegsheim	67250
67	Kuttolsheim	67253
67	Lampertheim	67256
67	Lingolsheim	67267
67	Lipsheim	67268
67	Mackenheim	67277
67	Mittelschaeffolsheim	67298
67	Molsheim	67300
67	Mundolsheim	67309
67	Mutzig	67313
67	Neugartheim-Ittlenheim	67228
67	Nordhouse	67336
67	Obenheim	67338
67	Oberschaeffolsheim	67350
67	Olwisheim	67361
67	Osthoffen	67363
67	Ostwald	67365
67	Pfulgriesheim	67375
67	Plobsheim	67378
67	Quatzenheim	67382
67	Reichstett	67389
67	Rhinau	67397
67	Richtolsheim	67398
67	Rosheim	67411
67	Saasenheim	67422
67	Schiltigheim	67447
67	Schnersheim	67452
67	Schœnau	67453
67	Souffelweyersheim	67471

67	Strasbourg	67482
67	Stutzheim-Offenheim	67485
67	Sundhouse	67486
67	Truchtersheim	67495
67	Vendenheim	67506
67	Wingersheim les Quatre Bans	67539
67	Wiwersheim	67548
67	Wolfisheim	67551
67	Wolxheim	67554