

Service public de Wallonie

Convention de recherche relative à l'étude génétique des populations wallonnes de Coronelle lisse (*Coronella austriaca*)



Eric Graitson

avec la collaboration de Sylvain Ursenbacher
(Institut für Natur, Landschafts- und Umweltschutz, NLU - Université de Bâle)

Rapport final
27/11/2012

Convention de recherche relative à l'étude génétique des populations wallonnes de Coronelle lisse (*Coronella austriaca*)

Table des matières

Résumé	3
Introduction.....	4
Matériel et méthodes.....	4
Espèce étudiée	4
Echantillonnage.....	4
Analyses génétiques	6
Traitement des données	6
Analyse spatiale (Landscape genetics).....	7
Résultats	8
Analyse factorielle des correspondances (AFC)	8
Variation et diversité génétique	8
Indice de Consanguinité (F_{is})	9
Indice de diversification (F_{st}).....	9
Analyse de la structure des populations	9
Impact du paysage.....	9
Conclusion et perspectives.....	11

Résumé

L'étude porte sur la génétique des populations de Coronelle lisse (*Coronella austriaca*) en Wallonie, un colubridé prédateur spécialiste fortement inféodé aux milieux rocheux ainsi qu'aux pelouses et landes sèches. Ces derniers habitats ont fortement régressé sur le territoire d'étude au cours des 150 dernières années et sont fortement fragmentés.

L'étude vise, par l'analyse de marqueurs microsatellites de l'ADN nucléaire, à estimer la diversité génétique dans les principales populations, à évaluer leur différenciation génétique et ainsi avoir une approximation des flux de gènes entre les sites, et enfin à rechercher la présence de groupes de populations plus isolées.

L'étude vise également à déterminer quels éléments du paysage pourraient être des obstacles (ou au contraire des corridors) au déplacement et aux flux de gènes entre les sites.

Les différentes analyses ont été conduites sur un total de 419 individus répartis sur 40 sites d'échantillonnage.

Une diversité génétique assez similaire a été observée entre les différents sites, avec des signes de structuration interne seulement pour quelques sites. De plus, la différenciation génétique entre les différents sites est faible à moyennement marquée avec une valeur maximale de 0.16 pour l'unique site analysé situé au nord du sillon Sambre-et-Meuse, lequel semble le plus isolé génétiquement.

L'analyse avec le logiciel STRUCTURE, cherchant à regrouper des individus en fonction de leur génétique, montre que les populations sont très hétérogènes et qu'il n'y a pas de site qui soit particulièrement isolé. Ces résultats suggèrent plutôt qu'on se trouve avec une structure en métapopulation, avec des échanges plus ou moins importants entre les différents sites.

L'auto-corrélation spatiale indique que les individus sont génétiquement plus apparentés jusqu'à une distance de 2 à 3 kilomètres. Ce résultat suggère que la distance maximale parcourue par certains individus est comprise dans cette fourchette.

Un isolement par la distance significatif a été observé, la distance géographique expliquant approximativement 45% de la différenciation génétique observée.

Les analyses du paysages indiquent que l'élément "rivière" est défavorable pour le flux de gènes entre sites situés de part et d'autre de cet élément, alors que l'élément « voie ferrée » est plutôt favorable pour les mêmes sites. Les autres éléments d'occupation du sol analysés (les cultures et les zones urbanisées) n'ont pas montré un impact positif ou négatif significatif sur le flux de gènes et donc sur la fragmentation.

En conclusion, la coronelle lisse affiche une bonne santé génétique en Wallonie. Bien qu'inféodée à des milieux xéro-thermohiles peu répandus en Wallonie, la structure génétique observée suggère une structuration en méta-population dont quelques sous-unités seraient en cours de différenciation. Les sous-populations étudiées ne souffrent apparemment pas d'un manque de connectivité, l'espèce affichant manifestement des capacités de dispersion plus élevées que ce qui est traditionnellement reconnu dans la littérature.

La stratégie de conservation de cette espèce patrimoniale doit donc être portée directement sur les sites occupés par l'espèce et les effectifs qu'ils abritent plutôt que sur la connectivité entre sites. En raison de leur relative différenciation, les rares sous-populations situées au nord du sillon Sambre-et-Meuse méritent des mesures de conservation prioritaires.

Introduction

La fragmentation et la perte de l'habitat sont les principales causes de la disparition locale des espèces animales. Alors que la perte de l'habitat réduit directement les effectifs totaux d'une population ou d'une espèce, la fragmentation conduit souvent à un isolement des populations, conduisant à une diminution de la diversité génétique, ce qui augmente le risque de disparition des isolats. L'aspect stochastique est aussi très marqué dans les petites populations. Ajouter à une très faible probabilité de recolonisation, ces paramètres conduisent à la diminution de sites occupés par une espèce. Dans le cadre de la conservation de populations d'espèces menacées, il est donc important de connaître la diversité génétique au sein des isolats, d'évaluer leur interconnexion et les échanges de gènes et de déterminer les éléments du paysage favorisant ou limitant la dispersion des individus.

Le but de cette étude est d'estimer la diversité génétique dans les principales populations de la Coronelle lisse (*Coronella austriaca*) en Wallonie, d'évaluer leur différenciation génétique (et ainsi avoir une approximation des flux de gènes entre les sites), de rechercher la présence de groupes de populations plus isolées et de déterminer quels éléments du paysages pourraient être des obstacles (ou au contraire des corridors) aux déplacements et aux flux de gènes entre les sites où l'espèce est présente.

Ce travail a fait l'objet d'un mémoire de Master en sciences biologiques à l'ULg, celui de Julie Cauwenbergh, disponible en annexe. Le présent rapport est un résumé détaillé de ce travail.

Matériel et méthodes

Espèce étudiée

La Coronelle lisse, est un petit serpent vivipare de la famille des Colubridés. En Wallonie, cette espèce est fortement inféodée aux milieux xéro-thermophiles : milieux rocheux naturels et artificiels comme les voies ferrées, pelouses et landes sèches. A l'exception des voies ferrées, ces milieux ont considérablement régressés et ont subi une fragmentation importante au cours de ces 150 dernières années. En outre, ce reptile, qui est évalué comme espèce vulnérable sur la liste rouge des espèces menacées de Wallonie, est aussi un prédateur spécialiste, sans doute le plus typique des milieux précités. Ces caractéristiques en font un indicateur de choix pour une telle étude.

Echantillonnage

Près de 600 échantillons génétiques (salive prélevée sur un écouvillon ou mues trouvées sur le terrain) ont été prélevés entre 2009 et 2011 sur de nombreux sites wallons. Toutefois, les sites pour lesquels un nombre trop restreint d'échantillons ont été collectés pour permettre l'obtention de résultats exploitables n'ont pas été analysés. Au final, les différentes analyses ont été conduites pour 40 sites répartis sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce en Wallonie pour un total de 417 individus.

Site	Abréviation	Type d'habitat	Code	Coord. X	Coord. Y	Nombre d'ind.
Vodelée	Vo 1	Pelouse sèche	1	175025,223	95090,027	9
Daily	Da 2	Pelouse sèche	2	155397,591	83773,514	7
Wiesme	Wi	Pelouse sèche	3	192808,563	93669,350	11
Barvaux	Ba	Talus rocheux	6	231799,840	115896,930	17
Vodelée	Vo 8	Rocher	8	175064,554	95641,163	5
Biron	Bi	Voie ferrée	10	228666,538	112991,267	10
Anseremme	As	Voie ferrée	11	187215,502	103410,555	5
Nismes	Ni	Pelouse sèche	12	163614,631	84261,109	5
Houyet	Hy	Pelouse sèche	13	196863,726	97085,973	7
Vignée	Vi	Voie ferrée	17	201102,456	94868,920	15
Waulsort	Ws	Voie ferrée	18	186352,650	100869,978	17
Couvin	Co	Ancienne carrière	19	160143,640	84407,149	21
Dailly	Da 20	Pelouse sèche	20	154366,605	83476,221	6
Stoumont	St	Voie ferrée	22	253727,060	122447,026	9
Java	Jv	Voie ferrée	23	204384,514	133452,512	28
Theux	Th	Voie ferrée	24	253010,299	135248,676	13
Vonêche	Vn 25	Voie ferrée	25	193283,470	82989,038	17
Vonêche	Vn 26	Voie ferrée	26	193041,291	84731,334	3
Vonêche	Vn 27	Voie ferrée	27	193694,652	85260,992	1
Vodelée	Vo 29	Pelouse sèche	29	174514,407	94547,507	3
On	On 34	Pelouse sèche / VF	34	214897,278	95906,976	7
On	On 36	Pelouse sèche / VF	36	215622,697	96571,943	3
Aisne	Ai	Pelouse sèche	39	235255,874	117008,214	3
Esneux	Es	Ancienne carrière / VF	46	235403,676	135631,248	10
Saint-Remy	SR	Voie ferrée	47	240093,952	26999,931	9
Esneux	Es	Voie ferrée	48	234677,130	134043,962	2
Hogne	Hg	Voie ferrée	50	214217,770	104364,975	19
Herbeumont	Hb	Voie ferrée	52	216813,140	49757,128	6
Meixdevant Virton	MDV	Voie ferrée	54	230895,397	31478,311	24
Sommerain	So	Rocher	60	252850,464	94835,211	3
Mirwart	Mw	Voie ferrée	61	213582,178	83684,805	33
Mellier	Me 64	Voie ferrée	64	233293,149	49537,525	20
Thanville	Th	Voie ferrée	65	194277,503	85818,113	7
Dolhain	Do	Voie ferrée	66	261110,136	147579,236	15
Limbourg	Li 67	Voie ferrée	67	258888,805	145346,214	8
Limbourg	Li 68	Voie ferrée	68	26005,316	145515,737	3
Bernimont	Be	Voie ferrée	69	230066,560	56402,147	8
Durnal	Du	Carrière/ VF	71	192055,970	112743,635	18
Mellier	Me 72	Jardin	72	232824,380	50921,849	2

Tableau 1: Liste des Sites (localités) avec les habitats correspondants et le nombre d'échantillons analysés par site.

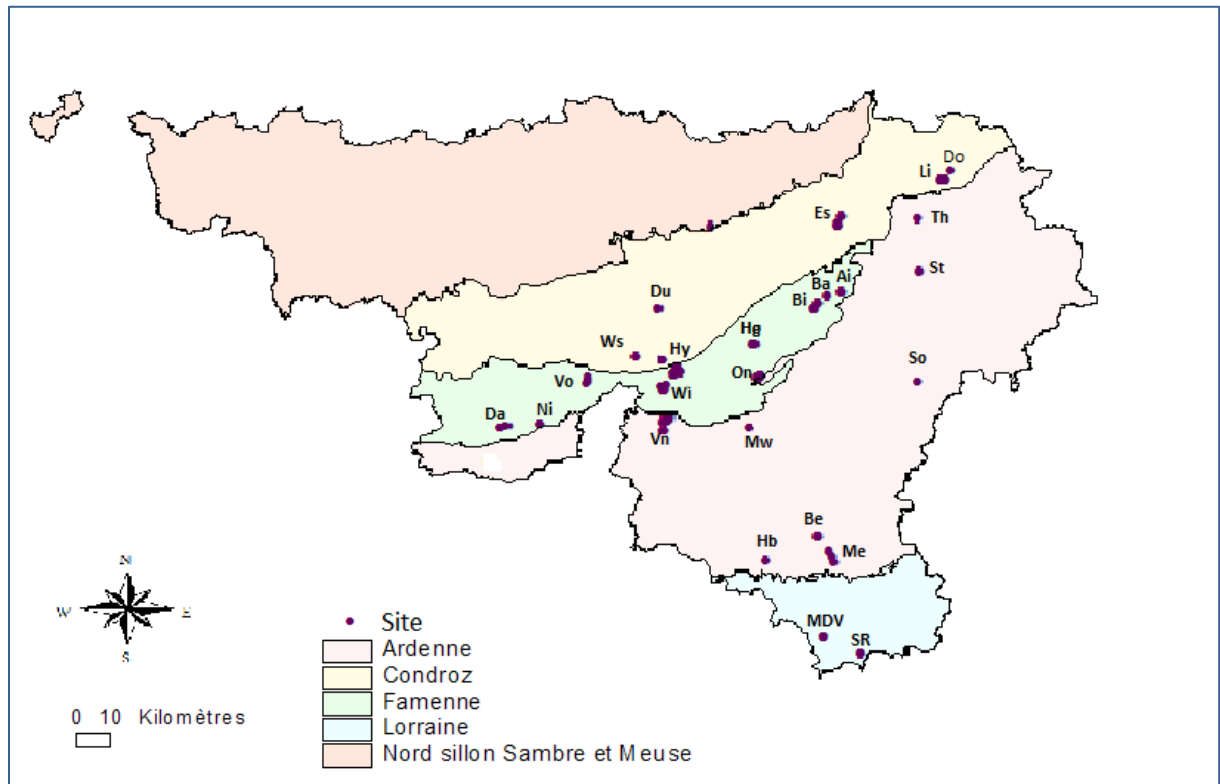


Figure 1 : Localisation des stations échantillonnées.

Analyses génétiques

Sept marqueurs microsatellites ont été analysés. Ces marqueurs nucléaires sont hypervariables et peuvent servir pour l'analyse de paternité. Pour ce travail, ils ont été utilisés pour évaluer le degré d'hétérozygotie (observée: H_O et attendue: H_E), la richesse allélique (A_R), ainsi que les coefficients de structuration interne (inbreeding: F_{IS}) et de différenciation entre les différents sites (F_{ST}). Le possible regroupement des différents sites en unités indépendantes a été testé.

Le travail de laboratoire (extraction d'ADN et amplification des séquences microsatellites) a été réalisée à l'Institut de Biologie de la Conservation (Institut für Natur, Landschafts- und Umweltschutz, NLU) de l'Université de Bâle selon le protocole présenté en annexe.

Traitement des données

Suite aux résultats obtenus sur l'apparentement entre individus, les sites géographiquement très proches (< 2km) ont été regroupés, réduisant à 30 le nombre de stations pour le traitement statistique des données.

Afin de bien visualiser les différences entre individus et populations, une analyse factorielle de correspondance a été effectuée à l'aide du logiciel GENETIX v.4.0.2.

La diversité génétique et la différentiation statistique entre les marqueurs génétiques est testée et estimée à l'aide de FSTAT v.2.9.3.2 soit: les valeurs de la richesse allélique (A_R), d'hétérozygotie attendue (H_E), d'hétérozygotie observée (H_O) ainsi que le coefficient de consanguinité (F_{IS}) et l'indice de fixation (F_{ST}). Ce logiciel permet également de tester les résultats par paire et indique les valeurs significatives de F_{ST} et F_{IS} à l'aide de simulations. Ces deux indices ont été calculés entre les différentes populations pour déterminer le coefficient de structuration

interne (parfois considéré comme indice indirect de consanguinité) et pour obtenir le degré de différenciation entre ces populations.

Pour déterminer si les valeurs moyennes de A_r et de H_e entre les différentes populations étaient significativement différentes entre elles, une ANOVA a été réalisée sur les valeurs moyennes de A_r , car les données de départ présentaient une distribution normale. Par contre, les valeurs initiales de H_e ne présentant pas de distribution normale, c'est donc un test non paramétrique de Kruskal-Wallis qui a été effectué.

La structure génétique des populations à l'échelle spatiale, a été testée à l'aide du logiciel STRUCTURE V2.3.3 sans aucun a priori sur le nombre potentiel de populations. Ce programme regroupe les individus dans des « clusters » en fonction de leur genotype.

Analyse spatiale (Landscape genetics)

Un test d'auto-corrélation a été effectué pour déterminer la distance à laquelle les individus sont apparentés. De plus, l'effet de la distance sur la différenciation génétique a été testé (test de Mantel).

Pour étudier l'impact du paysage sur la dispersion de l'espèce, la méthode que nous avons utilisé consiste, à l'aide d'un SIG (arcview) et d'une de ses extension (PATHMATRIX) à créer une carte de friction qui va permettre de définir les chemins les plus réalistes empruntés par l'espèce en fonction du paysage et de ses caractéristiques (méthode dite du « Least-cost-path » ou « voie du moindre coût »).

16 variables d'occupation du sol ont été rassemblées sur une même carte où chaque pixel représente une cellule de 25m x 25m (figure 2).

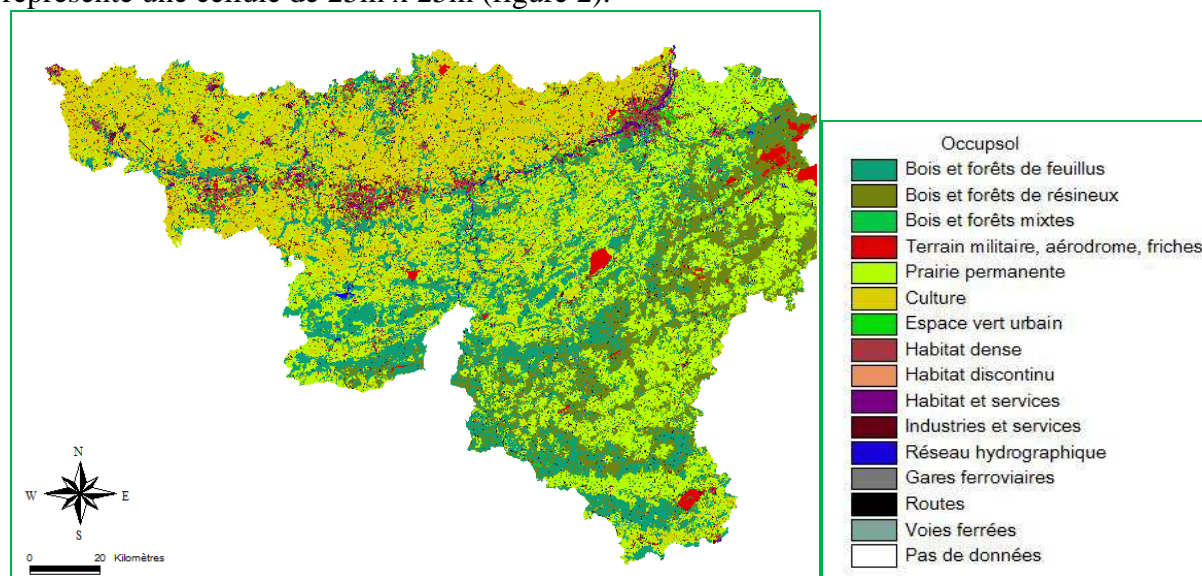


Figure 2: Liste des catégories d'occupation du sol et cartographie utilisée.

Chaque pixel se verra attribuer, en fonction de la variable du paysage qu'il représente, une valeur de « coût », correspondant à la difficulté présumée à traverser la zone. Pour déterminer la valeur de coût représentant au mieux le paysage, on essaye plusieurs valeurs pour chaque scénario testé. On effectue ensuite une corrélation entre les distances génétiques (F_{st}) et le coût total obtenu à l'aide de PATHMATRIX par paire de sites analysés, et la valeur de la corrélation (r^2) est utilisé pour déterminer les valeurs les plus représentatives.

Le chemin de moindre coût pour l'espèce étudiée est calculé en réduisant la valeur total du coût métrique (qui représente la distance réellement effectuée par l'individu lors de son déplacement et en fonction des différents coûts évalués pour chaque élément du paysage) et la distance euclidienne entre chaque station étudiée. Un test de Mantel est effectué afin de comparer ces différents coûts (métrique et least-cost-path) à la distance génétique (F_{st}). Les tests de Mantel indiquent les corrélations entre les distances analysées, ce qui permet de déterminer les variables représentant au mieux le paysage pour l'espèce étudiée.

Puisque la plupart des échantillons proviennent de vallées ou de sites ferroviaires, les scénarios testés se basent sur les rivières et les voies ferrées comme étant des facteurs affectant potentiellement la dispersion des individus. Les scénarios testés sont :

- 1) Les rivières, les cultures et les routes sont des barrières à la dispersion. 5 scénarios différents ont été testés, avec un poids 70x plus marqué pour ces 3 éléments par rapport aux autres éléments (scénario 1); l'inverse (scénario 2) ; un poids différent (entre 5 et 15) pour ces trois éléments (scénarios 3, 4 et 5)
- 2) Les voies ferrées et les zones d'habitats sont des barrières à la dispersion. 6 scénarios différents ont été testés, avec un poids 70x (scénario 6) et 10x (scénario 9) plus marqué pour ces deux éléments par rapport aux autres éléments; les voies ferrées avec un poids plus marqué (70x ; scénario 7), toutes les variables ayant le même poids (scénario 8), des poids de 10x pour les voies ferrées et 20x plus important pour les zones d'habitats (scénario 10) et l'inverse (scénario 11)

L'effet potentiel d'autres variables a également été testé, puisqu'il était possible de tester plusieurs variables en même temps. Il s'agit des routes et de deux éléments non linéaires (matrice du paysage) à savoir les cultures et les zones urbanisées.

Pour chacun des scénarios, des valeurs de coût différentes ont été testées (voir la méthodologie détaillée en annexe).

Les meilleures corrélations obtenues à l'aide des tests de Mantel permettent de déterminer les variables ayant le plus fort d'impact sur la dispersion de l'espèce étudiée.

Résultats

Analyse factorielle des correspondances (AFC)

Les différentes analyses ont été conduites sur un total de 419 individus répartis sur 30 sites.

L'analyse factorielle des correspondances, effectuée à l'aide du programme GENETIX, ne montre pas de différenciation génétique entre les sites échantillonnés, exception faite de quelques rares individus répartis sur diverses stations.

Variation et diversité génétique

Une diversité génétique assez similaire est observée entre les différents sites, avec des signes de consanguinité ou de structuration interne plus prononcés pour seulement quelques sites.

Ainsi, il n'y a pas de différence significative dans les valeurs de A_r (ANOVA, $F = 1,22$, $p=0.3$) et de H_E (test de Kruskal-Wallis = 12,6 $p=0,0001$).

Les valeurs moyennes de la richesse allélique de toutes les populations se situent entre 2,14 et 2,78 tandis que les valeurs d'hétérozygoties moyennes se situent entre 0,55 et 0,78.

Indice de Consanguinité (F_{is})

L'indice de fixation, parfois utilisé comme indicateur de consanguinité (F_{is}), représente la réduction d'hétérozygotie dans les sous-populations. Aucune valeur de F_{is} n'est significative ($p < 0,05$), suggérant aucune structuration ou consanguinité au sein des groupes.

Indice de diversification (F_{st})

Les valeurs F_{st} par paire informent sur la différenciation génétique entre les stations.

La moyenne par station des F_{st} est supérieure à 0,10 pour la moitié d'entre elles (14/30). L'indice le plus élevé atteint 0,17 pour l'unique station située au nord du sillon Sambre-et-Meuse.

L'isolement peut être considéré comme faible à moyen avec, selon la fonction théorique évaluant le nombre de migrants en fonction des F_{st} , de 1.3 à 8.9 migrants par génération.

Analyse de la structure des populations

L'analyse avec le logiciel STRUCTURE, cherchant à regrouper des individus génétiquement similaires, montre que les populations sont très hétérogènes et qu'il n'y a pas de site qui soit particulièrement homogène et donc isolé des autres.

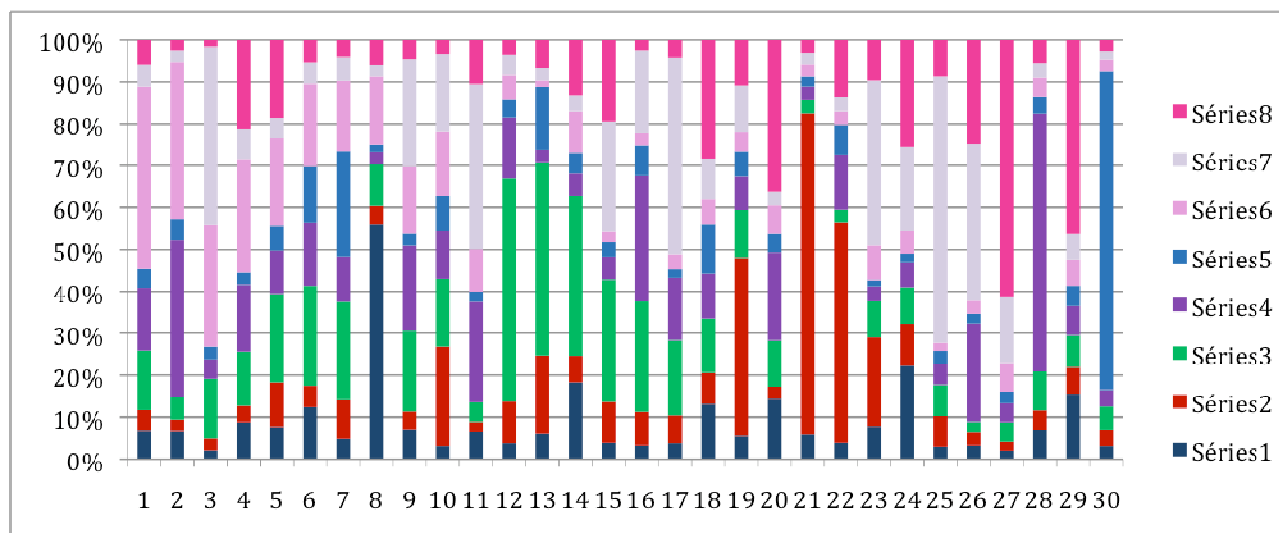


Figure 3: Représentation graphique de l'appartenance (en %) des différents individus aux 8 clusters défini par Structure.

Impact du paysage

Isolation par distance

Les distances géographiques et les distances génétiques (F_{st}) par paire de sites sont corrélées ($R^2=0.465$, $p < 0.001$). Un isolement par la distance significatif est observé, la distance géographique expliquant approximativement 47% de la différenciation génétique observée.

L'auto-corrélation spatiale indique que les individus sont génétiquement plus apparentés jusqu'à une distance de 2 à 3 kilomètres.

Least cost path

Les résultats des tests de corrélation entre les distances métriques et les distances génétiques pour les deux scénarios testés sont repris à la figure 4.

Les résultats concernant le « least cost path » montrent que les différents tests des deux scénarios sont assez similaires malgré les différents coûts alloués aux variables.

Scénario 1 : Les rivières, les cultures et les routes sont des barrières à la dispersion

Le premier scénario est représenté par les tests de 1 à 5. Le graphique indique qu'il n'y a pas de grandes différences entre les divers tests du premier scénario. Aucune des trois variables ne semble avoir un impact plus important les unes par rapport aux autres.

Scénario 2 Les voies ferrées et les zones d'habitats sont des barrières à la dispersion

Le scénario 2, représenté par les tests 6 à 11, montre une corrélation faible pour les coûts métriques et négatives pour les coûts énergétiques lors du test 7 avec une p-value = 0,0256. Pour ce test, seule la variable « voies ferrées » était considérée comme ayant un impact négatif (coût=70) sur la dispersion alors que les variables « zones urbanisées » étaient considérées comme positives avec un coût énergétique de 1 comme toutes les autres variables.

Ces analyses indiquent donc que les voies ferrées sont favorables aux flux de gènes.

Les autres éléments d'occupation du sol analysés, les cultures et les zones urbanisées, n'ont pas fournis d'indication quand à leur éventuel impact sur le flux de gènes et donc sur la fragmentation.

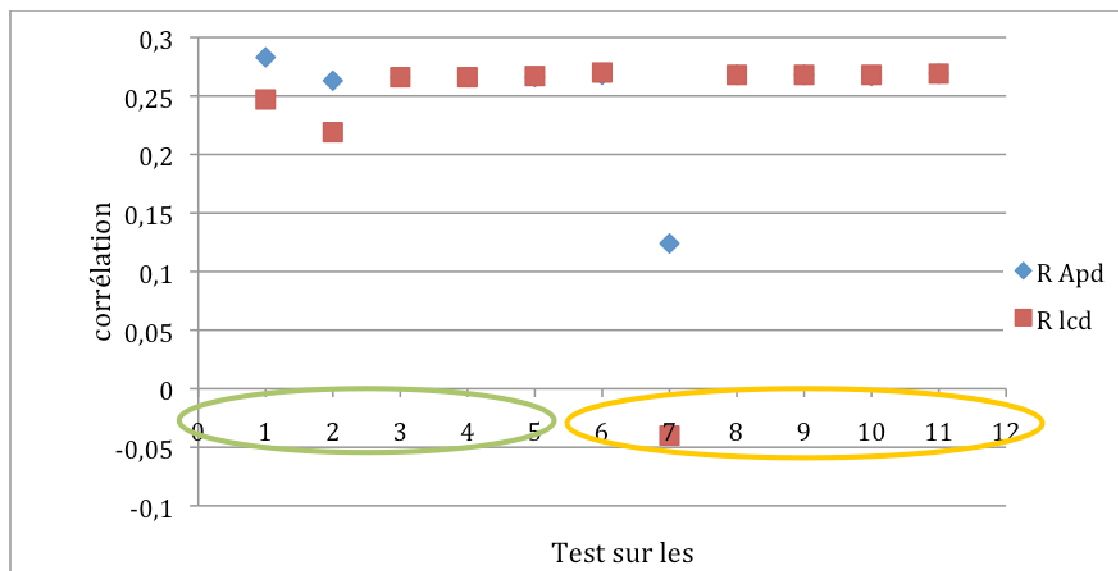


Figure 4: graphique représentant les valeurs de corrélations (r) pour chaque scénario [Vert= scénario 1, orange = scénario 2]. Les distances métriques sont représentées en bleu (R Apd) et les coûts (valeurs de distance pondérées par des coûts différents pour chaque élément du paysage) sont représentés en rouge (R lcd).

Conclusions et perspectives

Précédemment, la génétique des populations de la coronelle lisse a été étudiée dans seulement deux régions :

- l'Alsace (Vacher 2010), à proximité du centre de l'aire de répartition de l'espèce, où la structure génétique des 88 échantillons analysés sur un maximum de 80 km s'apparente à celle d'une métapopulation.
- la Grande Bretagne (Pernatta 2011), où les 147 échantillons répartis sur 10 sites (des fragments de landes séparés par des plantations résineuses situés dans l'extrême nord-ouest de l'aire de répartition de l'espèce) montrent une structuration génétique des populations faible mais significative et ce, pour des sites relativement proches (moins de 10km).

Les résultats obtenus en Wallonie sur 419 individus sont similaires à ceux obtenus en Alsace avec une structure génétique qui s'apparente à celle d'une métapopulation. Nous avons toutefois mis en évidence que certaines sous-unités sont en cours de différenciation.

De plus, nos résultats indiquent que la métapopulation wallonne possède une bonne diversité génétique et ne montre pas de signe de dépression de consanguinité.

En conclusion, la coronelle lisse affiche une bonne santé génétique en Wallonie. Bien qu'inféodées à des milieux xéro-thermohiles peu répandus dans la région, les sous-populations étudiées ne souffrent apparemment pas d'un manque de connectivité, l'espèce affichant manifestement des capacités de dispersion plus élevées que ce qui est traditionnellement reconnu dans la littérature.

La stratégie de conservation de cette espèce patrimoniale doit donc être portée directement sur les habitats fréquentés par l'espèce plus que sur leur connectivité.

En raison de leur relative différenciation, les rares sous-populations situées au nord du sillon Sambre-et-Meuse méritent des mesures de conservation prioritaires avec le maintien d'effectifs suffisants.